



***Leishmania major* İLE ENFEKTE EDİLEN  
GERBİLLERDE BAZI İNFLAMATUAR VE  
KOMPLEMAN YOLAK GENLERİN İFADELERİNİN  
mRNA VE PROTEİN DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

**Baycan MOR**

**Doktora Tezi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ  
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Berna DEMİRCİ**

**2022**

**Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOKTORA TEZİ**

***Leishmania major* İLE ENFEKTE EDİLEN GERBİLLERDE BAZI  
İNFLAMATUAR VE KOMPLEMAN YOLAK GENLERİN İFADELERİNİN  
mRNA VE PROTEİN DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

**Baycan MOR**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ  
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Berna DEMİRCİ**

**Ana Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Erzurum**

**2022**

**Her hakkı saklıdır**

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

29 / 06 / 2022

Baycan MOR

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

# *Leishmania major* İLE ENFEKTE EDİLEN GERBİLLERDE BAZI İNFLAMATUAR VE KOMPLEMAN YOLAK GENLERİN İFADELERİNİN mRNA VE PROTEİN DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Baycan MOR

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Berna DEMİRCİ

Hücre içi protozoonlardan biri olan *Leishmania* türlerinin neden olduğu leishmaniasis, deri ve iç organ enfeksiyonlarına neden olan ve son yıllarda prevalansı artan sistemik, kronik bir hastalıktır. Toplum sağlığı açısından önemli görülen ve immün sistem hücrelerini de enfekte edebilen *Leishmania* türlerine karşı immün sistemin oluşturduğu bağışıklık mekanizmaları tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu amaçla yola çıkılan çalışmada, gerbillerde (*Meriones unguiculatus*), *L. major* enfeksiyon modelinin oluşturulması, *Leishmania* enfeksiyonlarına karşı immün sistem hücrelerinin cevabının belirlenebilmesi için IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  genlerinin ekspresyon seviyeleri ile inflamatuvar yanıtta rollerinin araştırılması, kompleman sistemde lektin yolağının rolünü incelemek için MBL-1, MBL-2, C2, C3 genlerinin ekspresyon seviyeleri ile bu genlerden MBL-1, C2, C3 proteinlerinin seviyelerinin belirlenmesi, gerbillerde enfeksiyona karşı oluşabilecek oksidatif stresin tespiti için biyokimyasal testler (GSH ve MDA)'in yapılması ve son olarak kandaki lökosit sayılarının değerlendirilmesi için de hematolojik analizlerin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda ilk olarak gerbillerde kutanöz leishmaniasis hayvan modeli oluşturulmuş ve lezyon bölgelerinden alınan örneklerde mikroskopik incelemeler ve kültür çalışmaları ile parazitlerin varlığı tespit edilmiştir. Enfekte edilen gerbillerde inflamatuvar sitokin ve kompleman sistem genlerinin ekspresyon seviyelerinin ve bazı kompleman sistem proteinlerinin önemli ölçüde arttığı, azalan GSH ve artan MDA düzeylerine bağlı olarak oksidatif stresin oluştuğu ve enfeksiyona bağlı olarak lökositlerin miktarında da önemli düzeyde artış olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, kutanoz leishmaniasis enfeksiyonlarında Th1, Th2 ve kompleman sistem yolaklarının aktive olduğu belirlenmiş olup, hastalığın patogenezinde farklı immunpatolojik mekanizmaların da değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

**2022, 97 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Gerbil, İmmün sistem, İnflamatuvar, Kompleman, *Leishmania major*, Leishmaniasis, Lektin.

## ABSTRACT

Ph.D

### INVESTIGATION OF THE EXPRESSIONS OF SOME INFLAMMATORY AND COMPLEMENT PATHWAY GENES AT THE mRNA AND PROTEIN LEVEL IN GERBILS INFECTED WITH *Leishmania major*

Baycan MOR

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Co- Supervisor: Assist. Prof. Dr. Berna DEMİRÇİ

Leishmaniasis caused by *Leishmania* species, one of the intracellular protozoa, is a systemic, chronic disease that causes skin and internal organ infections and its prevalence has increased in recent years. The immunity mechanisms created by the immune system against *Leishmania* species, which are important for public health and can infect immune system cells, have not been completely revealed. For this purpose, in this study, it was aimed to create a *L. major* infection model in gerbils (*Meriones unguiculatus*), investigate of the expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  genes and their roles in the inflammatory response in order to determine the response of immune system cells against *Leishmania* infections, determining the expression levels of MBL-1, MBL-2, C2, C3 genes to examine the role of the lectin pathway in the complement system, and the protein expression levels of MBL-1, C2, C3 from these genes, performing biochemical tests (GSH and MDA) to detect oxidative stress that may occur against infection in gerbils and finally hematological analyzes to evaluate the leukocyte counts in the blood. In this connection, the cutaneous leishmaniasis animal model was created in gerbils firstly, and the presence of parasites was determined in the samples obtained from the lesion areas by microscopic examinations and culture studies. It was determined that the expression levels of inflammatory cytokine and complement system genes increased significantly in infected gerbils, oxidative stress occurred due to decreased GSH and increased MDA levels, and the amount of leukocytes increased significantly due to the infection. At the end of the study, Th1, Th2, and complement system pathways were determined to be activated in the cutaneous leishmaniasis, infections, and it was reached the conclusion that different immunopathological mechanisms should also be evaluated in the pathogenesis of the disease.

**2022, 97 Page**

**Keywords:** Gerbil, Immune system, Inflammatory, Complement, *Leishmania major*, Leishmaniasis, Lectin.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteğini ve emeğini hiçbir zaman esirgemeyen, tecrübelerinden daima faydalandığım, beni cesaretlendiren ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım değerli danışman hocam Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ'e ve çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, maddi ve manevi desteklerinden dolayı eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Berna DEMİRCİ'ye,

Çalışmamın ilk adımını gerçekleştirmek üzere laboratuvarlarının kapılarını açarak ön çalışmalarımı yapma imkânı sağlayan, çalışmamın her anını yakından takip eden ve üzerimde büyük emeği olan gerek parazit suşlarının temininde gerek enfekte hayvan modeli oluşturmamda destek olan Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN hocam'a ve bu laboratuvarlarda bulunduğum sürece yardımlarını esirgemeyen Biyolog İbrahim ÇAVUŞ'a,

Deney hayvanlarının temini ve uygulamalarında, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Serkan BAKIRCI ve Doç. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ'e,

Çalışmamın uygulama sürecinde, büyük bir özveri ile her türlü katkıda bulunan kıymetli dostum Dr. Barış YILDIZ ve laboratuvar ekibine,

Biyokimyasal analizleri gerçekleştirmemde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ahmet HARMANKAYA'ya,

Doktora eğitimim boyunca her türlü destekte bulunan, bilgi ve deneyimleri ile akademik hayatıma ışık tutan, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım, Kafkas Üniversitesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Süleyman GÜL, Prof. Dr. Özkan ARSLAN, Prof. Dr. Zati VATANSEVER, Doç. Dr. Özkan ÖZDEN, Doç. Dr. Neriman MOR, Doç. Dr. Ahmet DENİZ, Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE, Doç. Dr. Nilnur EYERCİ ve Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ'e,

Çalışmamı başından sonuna kadar büyük bir merak ve heyecan ile takip edip destekte bulunan, görev yaptığım Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğrencilerine,

Tez çalışmamın desteklenmesinde Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne,

Son olarak hayatım boyunca varlıklarıyla her zaman gurur duyduğum, koşulsuz destekçilerim olan sevgili annem Nermin MOR'a, abim Azer MOR'a ve kardeşim Kürşad MOR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Baycan MOR**  
**Haziran 2022**

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	x
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. <i>Leishmania</i> .....	1
1.2. <i>Leishmania</i> spp.'nin Taksonomisi.....	2
1.3. <i>Leishmania</i> spp.'nin Morfolojisi.....	3
1.3.1. Promastigot form.....	3
1.3.2. Amastigot form.....	4
1.4. <i>Leishmania</i> spp.'nin Yaşam Döngüsü.....	5
1.5. <i>Leishmania</i> spp.'nin Genetik Yapısı.....	6
1.6. Leishmaniasis.....	7
1.7. Leishmaniasisin Klinik Formları.....	8
1.7.1. Kutanöz Leishmaniasis (KL).....	8
1.7.2. Visseral Leishmaniasis (VL).....	8
1.7.3. Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL).....	9
1.7.4. Diffüz Kutanöz Leishmaniasis (DKL).....	9
1.7.5. Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL).....	9
1.7.6. Kanin Leishmaniasis (KanL).....	10
1.8. Leishmaniasisin Epidemiyolojisi.....	10
1.9. Leishmaniasis'in Laboratuvar Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	13
1.9.1. Direkt tanı yöntemleri.....	14
1.9.1.1. Mikroskopik tanı yöntemi.....	14
1.9.1.2. Kültür tanı yöntemi.....	14
1.9.2. İndirekt tanı yöntemleri.....	15
1.9.2.1. Serolojik tanı yöntemi.....	15
1.9.2.2. Moleküler tanı yöntemleri.....	15

1.10. Leishmaniasis Tedavisi .....	16
1.11. İmmün Sistem .....	17
1.11.1. Doğal immünite.....	17
1.11.2. Adaptif immünite .....	18
1.12. Sitokinlerin Genel Özellikleri .....	19
1.13. Kompleman Sistem .....	22
1.13.1. Kompleman aktivasyonunun erken basamakları .....	23
1.13.1.1. Alternatif yol .....	23
1.13.1.2. Klasik yol .....	23
1.13.1.3. Lektin yolu .....	24
1.13.2. Kompleman aktivasyonunun geç basamakları.....	24
1.14. <i>Leishmania</i> 'nın İmmünopatogenezi.....	27
1.15. Leishmaniasis ve Oksidatif Stres .....	29
<b>2. LİTERATÜR ÖZETLERİ .....</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>40</b>
3.1. Materyal .....	40
3.1.1. Çalışmada kullanılan <i>Leishmania</i> izolatları .....	40
3.1.2. Çalışmada kullanılan deney hayvanları .....	40
3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar .....	41
3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerleri, kitler, kimyasallar ve çözeltiler .....	42
3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....	43
3.1.5.1. Moleküler analizler için kullanılan çözeltiler .....	43
3.1.5.2. Biyokimyasal yöntemler için kullanılan çözeltiler .....	43
3.2. Yöntem.....	44
3.2.1. NNN besiyerinin hazırlanması (Katı Faz).....	44
3.2.2. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması (Sıvı Faz).....	45
3.2.3. <i>Leishmania major</i> 'un kültür ortamında çoğaltılması.....	45
3.2.4. Kültür ortamında çoğaltılan <i>Leishmania major</i> ile gerbillerin enfekte edilmesi ..	46
3.2.5. Enfekte gerbillerden kan ve doku örneklerinin toplanması .....	48
3.2.6. Moleküler analizler ve gen ekspresyon çalışmaları .....	49
3.2.6.1. DNA izolasyonu.....	49
3.2.6.2. Konvansiyonel PCR ile parazitlerin tespiti .....	49
3.2.6.3. Total RNA izolasyonu .....	50
3.2.6.4. cDNA kütüphanelerinin hazırlanması ve RT-PCR reaksiyonu .....	50
3.2.6.5. Real Time-PCR (qPCR).....	51

3.2.7. MBL-1, C2 ve C3 protein ekspresyonlarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi....	53
3.2.8. Biyokimyasal analizler .....	53
3.2.8.1. Doku homojenizasyonu .....	53
3.2.8.2. Glutasyon (GSH) düzeylerinin belirlenmesi .....	54
3.2.8.3. Malondialdehit (MDA) düzeylerinin belirlenmesi.....	54
3.2.8.4. Hematolojik Analizler .....	55
3.2.9. İstatistiksel analizler .....	55
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>57</b>
4.1. Gerbillerde Kutanöz Leishmaniasis Modelinin Oluşumu.....	57
4.2. Gerbillerde Oluşan Lezyonların Mikroskopik İnceleme Sonuçları .....	57
4.3. Ekimi Yapılan Doku Örneklerinin Kültür Ortamında Üreme Sonuçları .....	59
4.4. Moleküler Analiz ve Gen Ekspresyon Çalışmalarının Sonuçları .....	60
4.4.1. Genomik DNA izolasyon sonuçları .....	60
4.4.2. Konvansiyonel PCR sonuçları .....	61
4.4.3. Total RNA izolasyon sonuçları .....	61
4.4.4. cDNA sentezi ve qPCR ile gen ekspresyon çalışmaları.....	62
4.4.5. qPCR ile gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler .....	64
4.4.6. ELISA sonuçları.....	71
4.4.7. Biyokimyasal analiz sonuçları .....	72
4.4.7.1. Glutasyon (GSH) ve Malondialdehit (MDA) düzeyleri .....	72
4.4.7.2. Hematolojik analizlerin sonuçları .....	73
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>75</b>
5.1. Sonuç.....	75
5.2. Öneriler .....	76
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>77</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>96</b>
EK 1 .....	96
EK 2 .....	97

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
bp	Baz Çifti
dk	Dakika
γ	Gama
g	Gram
kb	Kilo Baz Çifti
kDa	Kilo dalton
L	Litre
Mb	Megabaz Çifti
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm <sup>3</sup>	Milimetre küp
mmol	Milimol
ng	Nanogram
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı
sn	Saniye
V	Volt
α	Alfa
β	Beta
µM	Mikromolar

## Kısaltmalar

ASH	Antijen Sunan Hücre
CAT	Katalaz
CT	Döngü Eşiği
DAT	Direkt Aglütinasyon Testi
DKL	Diffüz Kutanöz Leishmaniasis
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
gp63	Glikoprotein63/Leishmanolysin
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutasyon S-Transferaz
IFAT	İndirekt Fluoresan Antikor Testi
IFN	İnterferon
Ig	İmmünoglobulin
IHA	İndirekt Hemaglütinasyon Testi
IL	İnterlökin
ITS	Internal Transkript Spacer
K	Kontrol Grubu
KanL	Kanin Leishmaniasis
kDNA	Kinetoplast DNA
KL	Kutanöz Leishmaniasis
LAT	Lateks Aglütinasyon Testi
LM	<i>Leishmania major</i> Grubu
LPG	Lipofosfolikan
MAC	Membran Atak Kompleksi
MASP	Mannan Bağlayıcı Lektin İlişkili Serin Proteaz
MBL	Mannoz Bağlayıcı Lektin
MDA	Malondialdehit

MKL	Mukokutanöz Leishmaniasis
NK	Negatif Kontrol Grubu
NNN	Novy-MacNeal-Nicol
PBS	Fosfat Buffer Salin
PCR	Polimer Zincir Reaksiyonu
PKDL	Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis
Q-PCR	Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptaz Polimer Zincir Reaksiyonu
SLME	Splice Leader Mini-Exon
SOD	Süperoksit Dismutaz
SSU	Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TCA	Triklorasetik Asit
Th	T helper/Yardımcı T Hücresi
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
UV	Ultraviyole
VL	Visseral Leishmaniasis

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dişi <i>Phlebotomus</i> (Tatarcık).....	1
Şekil 1.2. <i>Leishmania</i> parazitinin promastigot formu.....	4
Şekil 1.3. <i>Leishmania</i> parazitinin amastigot formu .....	5
Şekil 1.4. <i>Leishmania</i> 'nın yaşam döngüsü .....	6
Şekil 1.5. Dünya Sağlık Örgütü 2020 Kutanöz Leishmaniasis verileri .....	12
Şekil 1.6. Dünya Sağlık Örgütü 2020 Visseral Leishmaniasis verileri.....	13
Şekil 1.7. Sitokinlerin endokrin, parakrin ve otokrin etkileri .....	20
Şekil 1.8. Kompleman etkileşmesinin erken basamakları .....	26
Şekil 3.1. NNN Besiyerleri .....	45
Şekil 3.2. <i>Leishmania major</i> 'un RPMI 1640 sıvı besiyerinde üretilmesi.....	46
Şekil 3.3. Anestezi uygulanmış gerbilleri .....	47
Şekil 3.4. Gerbillerin ayak tabanından parazit enjeksiyonu .....	47
Şekil 3.5. Kan ve doku örnekleri alınmak üzere sakrifiye edilmiş gerbil.....	48
Şekil 4.1. Kutanöz leishmaniasisli hayvan modellerine ait ayak lezyon görüntüleri .....	57
Şekil 4.2. <i>Leishmania major</i> amastigotlarının görüntüleri .....	58
Şekil 4.3. Ekim yapılan besiyerlerindeki <i>Leishmania major</i> promastigotlarının görüntüleri .....	59
Şekil 4.4. İzole edilmiş genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	60
Şekil 4.5. Konvansiyonel PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	61
Şekil 4.6. Melt Curve eğrileri .....	63
Şekil 4.7. IL-1 $\beta$ , IL-2 ve IL-6 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait qPCR sonuçları .....	64
Şekil 4.8. IFN- $\gamma$ ve TNF- $\alpha$ genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait qPCR sonuçları .....	67
Şekil 4.9. MBL-1 ve MBL-2 geninin mRNA ekspresyon seviyelerine ait qPCR sonuçları .....	69
Şekil 4.10. C2 ve C3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait qPCR sonuçları ...	70
Şekil 4.11. GSH ve MDA düzeyleri .....	72

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>Leishmania</i> spp'nin sınıflandırılması .....	2
Çizelge 1.2. Sitokinlerin Özellikleri .....	21
Çizelge 3.1. Çalışmada oluşturulan deney grupları ve uygulama protokolü .....	40
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar .....	41
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri, kitler, kimyasallar ve çözeltiler .....	42
Çizelge 3.4. PCR reaksiyon karışımı .....	49
Çizelge 3.5. PCR reaksiyon koşulları .....	50
Çizelge 3.6. RT-PCR reaksiyon karışımı .....	51
Çizelge 3.7. RT-PCR reaksiyon koşulları .....	51
Çizelge 3.8. Gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler ve dizi bilgileri .....	52
Çizelge 3.9. qPCR reaksiyon karışımı .....	52
Çizelge 3.10. qPCR reaksiyon koşulları .....	53
Çizelge 3.11. GSH tayini .....	54
Çizelge 3.12. MDA tayini .....	55
Çizelge 4.1. DNA konsantrasyon değerleri .....	60
Çizelge 4.2. İzole edilen RNA konsantrasyonları .....	62
Çizelge 4.3. ELISA sonuçları .....	72
Çizelge 4.4. Hematolojik analizler .....	73

### 1. GİRİŞ

#### 1.1. *Leishmania*

*Leishmania* türleri, protozoanların Mastigophara alt şubesinden Trypanosomatidae familyasına dahil olan ve leishmaniasis hastalığına neden olan parazitlerdir. Tropikal ve subtropikal bölgelerde görülen leishmaniasis, ciddi bir halk sağlığı problemi olup, gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyon riski gün geçtikçe artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2018 yılında yayınlanan verilere göre, dünya genelinde leishmaniasis için endemik kabul edilen 98 ülke ve 83 bölgede, 1 milyardan fazla insan enfeksiyon riski altında bulunmaktadır. Aynı zamanda tahmini olarak her yıl 30.000 yeni viseral leishmaniasis (VL) ve 1 milyondan fazla yeni kutanöz leishmaniasis (KL) vakası bildirilmektedir (WHO 2022).

*Leishmania* parazitleri, enfekte dişi kum sinekleri aracılığı ile taşınmakta ve bu kum sineklerinin kan emmesi ile omurgalı konakların kan ve dokularına yerleşerek leishmaniasis enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Şekil 1.1.). Hastalığın KL, VL ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç ana formu bulunmaktadır. Bu formlarının yanı sıra diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL), post kala azar dermal leishmaniasis (PKDL) ve en önemli rezervuarı olarak köpeklerde oluşan kanin leishmaniasis (KanL) formları da bilinmektedir (WHO 2022).



**Şekil 1.1.** Dişi *Phlebotomus* (Tatarcık) (CDC 2022)

## 1. GİRİŞ

### 1.2. *Leishmania* spp.'nin Taksonomisi

Tek hücreli ökaryotik grup olan Protozoa içerisinde sistematize edilen *Leishmania* türlerinin dahil olduğu kinetoplastidler; tek hücreli, serbest ya da parazitik yaşayan, flagellumlu ökaryotlardan oluşan öglenezoonlar olarak bilinmektedir. Kinetoplastidler, tek ve büyük bir mitokondri içinde bir DNA kitlesi olarak bilinen kinetoplast varlığı nedeniyle isimlendirilen bir öglenezoon grubudurlar (Bender et al. 2017). DSÖ tarafından sistematize edilen *Leishmania* spp.'nin cins, alt cins ve tür kompleksi Çizelge 1.1.'de belirtilmiştir (WHO 2022).

**Çizelge 1.1.** *Leishmania* spp.'nin sınıflandırılması (Bates 2007; WHO 2022)

<b>Alem</b>	Protista
<b>Alt alem</b>	Protozoa
<b>Şube</b>	Sarcomastigophora
<b>Alt şube</b>	Mastigophora
<b>Sınıf</b>	Zoomastigophora
<b>Takım</b>	Kinetoplastida
<b>Aile</b>	Trypanosomatidae
<b>Cins</b>	<i>Leishmania</i>
<b>Alt cins</b>	<i>Leishmania</i>
<b>Tür</b>	<i>Leishmania donovani</i> , <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania chagasi</i> , <i>Leishmania tropica</i> , <i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania aethiopica</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , ( <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Leishmania venezuelensis</i> , <i>Leishmania pifanoi</i> , <i>Leishmania enriettii</i> )
<b>Alt cins</b>	<i>Viannia</i>
<b>Tür</b>	<i>Leishmania braziliensis</i> kompleksi ( <i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania colombuensis</i> , <i>Leishmania equatorensis</i> , <i>Leishmania peruviana</i> ), <i>Leishmania guyanensis</i> ( <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> , <i>Leishmania shawi</i> ) <i>Leishmania lainsoni</i> , <i>Leishmania naiffi</i>

*Leishmania* genellikle Eski Dünya'da *Phlebotomus*, Yeni Dünya'da ise *Lutzomyia* cinsi olarak bilinen dişi yakarcaların ısırmasıyla omurgalılara bulaşmaktadır. Kamçılı protozoonlar olarak bilinen *Leishmania* cinsine ait yaklaşık 30 farklı tür, leishmaniasis enfeksiyonlarını oluşturmaktadır. Morfolojik olarak ayırt edilemeyen bu türler PCR'a

## 1. GİRİŞ

---

dayalı moleküler yöntemler, izoenzim analizleri ve monoklonal antikorlar kullanılarak belirlenmekte ve tür tayinleri yapılmaktadır (Özbel ve Töz 2007).

### 1.3. *Leishmania* spp.'nin Morfolojisi

*Leishmania* parazitinin promastigot ve amastigot olmak üzere iki farklı forma sahip olduğu bilinmektedir. Parazit, vektör olan kum sineği bağırsağında kamçılı promastigot formda, insanlarda ve diğer memelilerde kamçısız amastigot formda bulunmaktadır (Unat 1991; Markell et al. 1992; Kima 2007). *Leishmania* türlerinin amastigot ve promastigot formları farklı morfolojilere sahip olmalarına rağmen aynı temel hücre düzeninde yer almaktadır (Sunter and Gull 2017). *Leishmania*'nın amastigot ve promastigot formlarında üç tabakalı, 2-4 nm genişliğinde plazma membranı bulunmaktadır. Bu plazma membranının hemen altında da 20-22 nm subpelliküler mikrotübüller uzanmakta ve bunların kalınlıkları, sayıları ve birbirine olan uzaklıkları *Leishmania* türleri arasında farklılık gösterdiği için tür ayırımında önemli kriterler olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda *L. donovani*'de 80-120; *L. mexicana*'da 150-200; *L. tropica*'da 80-115 mikrotübül bulunduğu bildirilmektedir (Özbel ve Töz 2007).

#### 1.3.1. Promastigot form

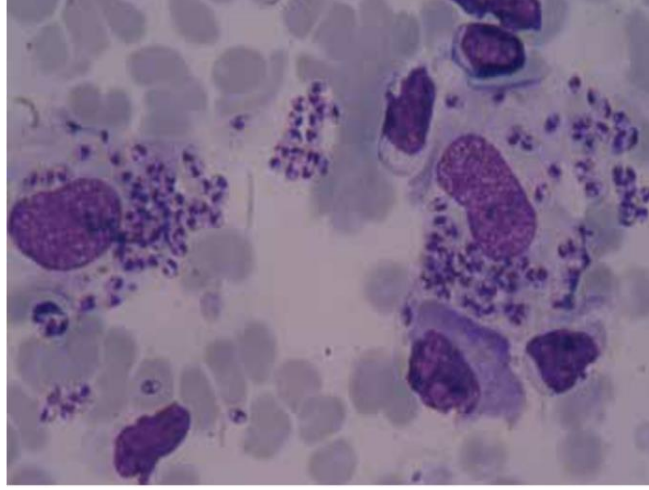
Parazitin promastigot formu vektörün bağırsağında ve *in vitro* kültür ortamında bulunan formudur. Promastigotlar 15-20 µm boy ve 1,5-5 µm genişlikte ince-uzun bir morfolojiye sahiptirler (Şekil 1.2.). Uzunlamasına bölünerek çoğalmakta olan promastigotlar *Phlebotomus*'ların enfekte bir omurgalıyı ısırıldıktan sonra bağırsaklarında 26°C'de 4-25 gün kalabilmektedirler (Torres-Guerrero et al. 2017). Elektron mikroskopu ile incelendiğinde merkezde membranında porları olan bir nükleus, sitoplazmalarında kinetoplast, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı gibi yapılar görülmektedir (Ohan ve Yaşarol 1981; Byrceson 1996; Cook and Zumla 1996; Kuman ve Altıntaş 1996; Malani 2010). Promastigotlar, oldukça hareketli ve hücre membranından daha kalın bir kılıf ile kaplı, 200 nm kalınlığında ve parazitin boyundan daha uzun bir kamçıya (15-28 µm uzunluğunda) sahiptirler. Kamçı kökü etrafında yerleşmiş dokuz çift periferik, bir çift merkezi lifden oluşan bir aksonem (sitoplazmada kalan kısımda) bulunmaktadır (Gerlind 1999).



**Şekil 1.2.** *Leishmania* parazitinin promastigot formu (x100) (Hai et al. 2017)

### 1.3.2. Amastigot form

Kamçısız ve oval şeklinde olan amastigotlar 2,5-6,8 µm büyüklüğünde parazitin hareketsiz formlarıdır (Şekil 1.2.) (Kuman ve Altıntaş 1996). Amastigotların sitoplazmasında bir nukleus ve hemen yanında kinetoplast yer almaktadır. Kinetoplastın kendisine ait bir DNA'sı olup, bu DNA dizileri türden türe farklılık gösterdiği için tür ayırımında hedef bölge olarak kullanılmaktadır. *Leishmania* türlerinin hepsinde yalnızca bir tane mitokondri bulunmaktadır. Promastigotlara benzer şekilde amastigotlarda da kamçı bulunmakta ve kamçı cebi içinde yer alarak hücre dışına çıkmamaktadır. İnsan vücut sıcaklığında (37°C'de) amastigotlar genellikle monositler, makrofajlar, polimorf çekirdekli lökositler veya endotel hücreleri içerisinde uzunlamasına bölünerek çoğalmaktadır (Unat 1991). Amastigotlar membran yapılarından dolayı makrofajların asidik etkilerine karşı dayanıklı olmakta ve makrofaj içinde çoğalarak enfeksiyonları oluşturmaktadırlar (Kuman ve Altıntaş 1996; Alexander et al. 1999; Topçu vd 2002; Malani 2010). Serbest hale geçerek ortama dağılan bu amastigotlar yeni makrofaj hücrelerini ve retiküloendoteliyal sistem hücrelerini enfekte ederek çoğalmaya devam etmektedirler (Jeronimo and Pearson 1992; Cook and Zumla 1996; Saygı 1998; Özbel ve Töz 2007). *Leishmaniasis*te döngü dışı kum sineğinin beslenmek için enfekte bir konaktan kan emmesi ile devam etmekte olup, çevre ısısına bağlı olarak tam bir döngü ortalama 4-25 gün sürmektedir (Despommier et al. 2005; Elçiçek 2009).



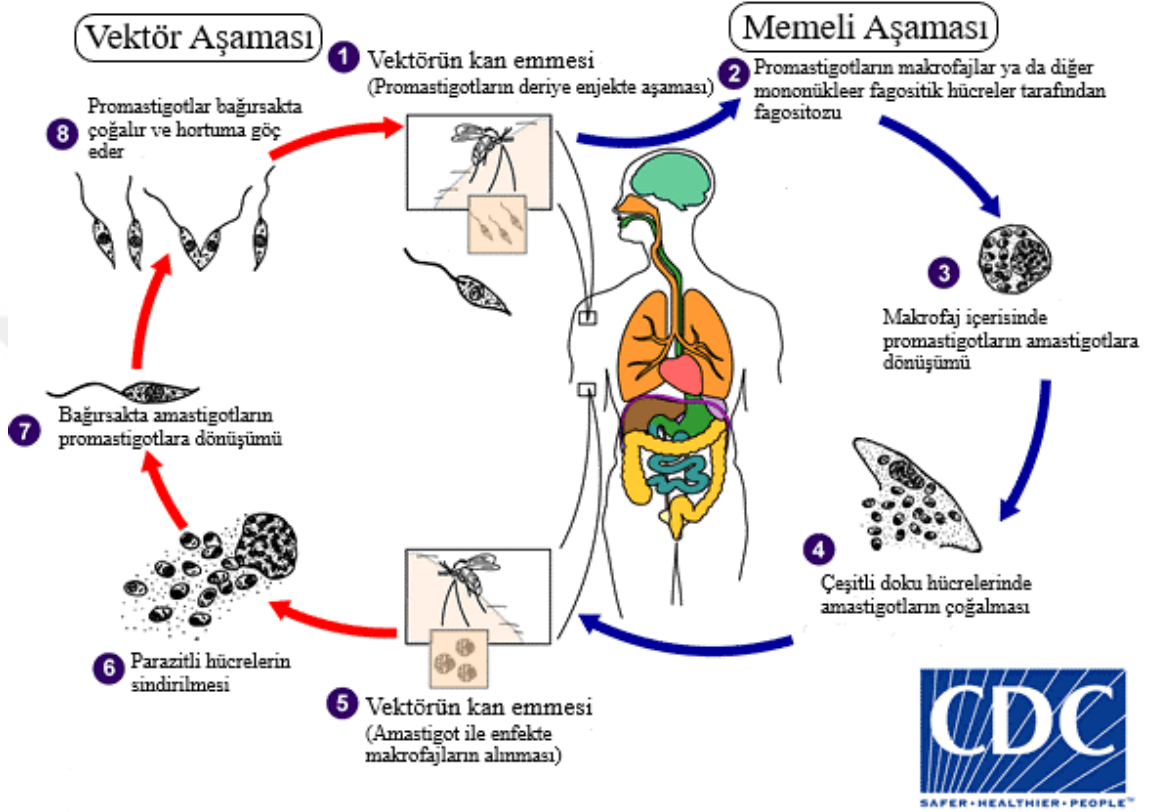
**Şekil 1.3.** *Leishmania* parazitinin amastigot formu (x1000) (Harman 2015)

### 1.4. *Leishmania* spp.'nin Yaşam Döngüsü

Difazik hayat evresine sahip olan *Leishmania*'ların vektörleri olan dişi kum sinekleri enfekte bir omurgalı konaktan kan emerken makrofajlarda bulunan parazitlerin amastigot formlarını almaktadırlar. *Leishmania*'lar ilk olarak kum sineklerinin midelerinde bölünerek çoğalmaya başlamakta ve çoğalan parazitlerin bir kısmı sindirim enzimleri tarafından sindirilirken diğerleri boyları uzayıp kamçılarını geliştirerek enfektif olmayan prosiklik promastigot adı verilen formu oluşturmaktadırlar. Promastigotlar kamçıları sayesinde midenin uç kısmına gelerek önce bağırsak epitel hücrelerine, daha sonra özofagus ve farinks duvarına tutunarak enfektif forma dönüşmekte ve oluşan enfektif metasiklik promastigotlar hortuma geçmektedirler (Topçu vd 2002; Özbel ve Töz 2007; Malani 2010; Mcgwire and Satoskar 2014). Kum sinekleri bir sonraki omurgalı konaktan kan emerken metasiklik promastigotlar konağa geçmektedirler (Descoteaux and Turco 2002). Konak vücuda giren promastigotlar ilk olarak kompleman tarafından opsonizasyona uğrayarak fagosite edilmektedir (Cook and Zumla 1996). Promastigotlar konağa geçince bir kısmı immün sistem tarafından yok edilmektedir. Fagosite edilen promastigotlar, makrofajlar içine girerken kamçılarını kaybederek amastigot forma dönüşmekte ve çoğalmaktadır. Bunun sonucunda hücre parçalanarak tekrardan diğer makrofajları enfekte etmek üzere amastigotlar, ortama dağılmaktadır (Jeronimo and Pearson 1992; Cook and Zumla 1996; Saygı 1998; Özbel ve Töz 2007). Enfeksiyonun bundan sonraki seyri *Leishmania*'nın türüne göre değişmekte olup ya deride lokalize olmakta ya da deriden kan yoluyla başta dalak, karaciğer ve kemik iliği olmak üzere diğer

## 1. GİRİŞ

iç organlara ve dokulara göç ederek birçok farklı patojenik etki oluşturabilmektedir. Fakat bu göç etme hareketi parazit türlerinin visserotropizm/dermatropizm karakterlerine ve enfekte konağın immun sistemine göre farklılıklar gösterebilmekte ve bazen parazitler türüne özgü olmayan bölgelere de göç edebilmektedirler (Özbel ve Töz 2007).



Şekil 1.4. *Leishmania*'nın yaşam döngüsü (CDC 2022)

### 1.5. *Leishmania* spp.'nin Genetik Yapısı

Kinetoplastida takımında yer alan *Leishmania* genomunun 0,3 ile 2,5 megabaz (Mb) arasında değişen büyüklükte 36 kromozomdan oluştuğu ve haploid genom içeriğinin ise yaklaşık 34 Mb olduğu bilinmektedir. *Leishmania* genomunun %30'u tekrarlı dizilerden oluşmakta ve bu tekrarlı dizilerin yarısında telomerik heksamer tekrarları içermektedir. Genom da tekrarlı diziler dışında diğer basit dizi tekrarları, transpozonlar, rRNA, spliced-leader, gp63 ve tubulin gibi dağılmış gen aileleri de bulunmaktadır (Myler et al. 1999).

## 1. GİRİŞ

---

Trypanosomatidae ailesinde yer alan organizmalar polisistronik transkripsiyon, trans-splicing, Pol I'in mRNA ve RNA sentezinde rol oynaması gibi eşsiz mekanizmalar sergilemektedirler (Vanhamme and Pays 1995; Stuart et al. 2005). Genomda polisistronik genler kümeler halinde dizilmiş olup bu organizasyon Tripanosomatidler içerisinde ilk dizilenen *L. major*'un 1. kromozomunda gözlenmiştir (Myler et al. 1999). Genomda, çoğu polisistronik gen kümeleri arasında rRNA genlerinin tekrarlı dizileri ve 2 ila 10 gene kadar tRNA genleri yer almaktadır (Ivens et al. 2005; Padilla-Mejía et al. 2009). Tripanosomatidler ayrıca kromozomlarının uç kısmında tekrar eden GGGTTA dizilerinden oluşan telomerik bölgeler içermektedirler (Sunkin et al. 2000).

*Leishmania* türlerinin de yer aldığı trypanosomatid organizmalar, nükleusta bulunan genomik DNA ve kamçının bazal kısmında yer alan kinetoplast DNA (kDNA) adı verilen mitokondriyal bir genoma sahiptirler. kDNA, "maxicircle" ve "minicircle" adı verilen bir DNA ağı içermektedir. Genomda yaklaşık 10.000 minicircle ve 50 maxicircle bulunduğu bilinmektedir. Maxicircle, 20-35 kilo baz (kb) büyüklüğünde homojen yapıya sahipken minicircle, 0,5-1,5 kb büyüklüğünde heterojen yapıdadır (Gerlind 1999). Minicircle yaklaşık 800 bp uzunluğuna sahip olup, bütün *Leishmania* türleri 120 bp uzunluğunda korunmuş benzer nükleotid dizisine sahiptirler. kDNA genomunda yer alan maxicircle bölgesi türler arası farklılık göstermekte olup, değişken ve kodlanmayan bölgeler içermektedir. Bu nedenle *Leishmania*'nın moleküler tanısı için kDNA yaygın olarak kullanılmakta ve hedef bölgeler olarak genellikle internal transkript spacer I (ITS I), splice leader mini-exon (SLME), SSU rRNA geni, tubülin ve gp63 gibi gen bölgeleri tercih edilmektedir (Brewster et al. 1998; Marfurt et al. 2003; Bensoussan et al. 2006).

### 1.6. Leishmaniasis

Dünyada sıtmadan sonra en fazla ölümlere neden olan *Leishmania* paraziti, hücre içi bir protozoon olup, enfekte dişi kum sineklerinin ısırması ile leishmaniasis hastalığına neden olmaktadır (Chiragkumar and Jimishaben 2017). Hastalığın genel olarak KL, VL ve MKL olmak üzere kabul edilen üç ana formu bildirilmektedir (Kocabaş vd 1998; Köktürk vd 2002). Bunların yanı sıra DKL, PKDL ve KanL formları da bilinmektedir (Pearson et al. 2005). Ülkemizde leishmaniasis, KL ve VL olmak üzere iki şekilde görülmektedir (Ak vd 1995; Unat vd 1995).

### 1.7. Leishmaniasisin Klinik Formları

#### 1.7.1. Kutanöz Leishmaniasis (KL)

Halk arasında Şark Çıbanı olarak bilinen, genelde *L. major* ve *L. tropica* türlerinin retikuloendoteliyal hücreleri enfekte etmesi ile oluşan KL, iyileştiğinde deride papül, nodül ve yara oluşumu ile iz bırakan ve şekil bozukluğuna yol açan leishmaniasisin en yaygın formudur (Desjeux 1996; Zare and Baghestani 2001; Alrajhi 2003). KL enfeksiyonunda, dişi kum sineğinin kan emdiği yerde küçük bir papül oluşmakta ve 3-4 ay içinde çevresi kızarıp, etrafı sert, kabarıklık ve üzeri kabuklu bir yaraya dönüşmektedir. Bu yaralar papüller veya nodüller olarak başlayarak ülserleşebilmektedir. Papüller 1 cm'den küçük ve kabarcık şeklinde, nodüller ise 1-3 cm topak şeklinde olabilmektedir. Bu yaraların boyutları zamanla değişmekte olup, genellikle ağrısız olmakla birlikte ağrılı da seyredebilmektedir (Wortmann et al. 2000). Yaranın üzerindeki kabuk kanatılmadan kaldırırsa alt yüzeyinde "Hulusi Behçet'in çivi belirtisi" denilen sivri çıkıntılar olduğu görülmektedir (Saygı 1998). Parazitin omurgalı konağa girişini takiben yaklaşık 2 hafta ile 3 aylık bir süre sonunda ilk lezyonlar görülmeye başlanmaktadır (Memişoğlu vd 1994).

#### 1.7.2. Visseral Leishmaniasis (VL)

Visseral leishmaniasis, kala-azar olarak da bilinen kronik bir hastalık olup, genellikle dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi çeşitli iç organlara tutulumu ile ölümlere neden olabilen leishmaniasis formudur (Gupta and Nishi 2011). Genellikle *L. donovani* ve *L. infantum* türleri VL etkeni olup, nadiren *L. mexicana*, *L. tropica* ile *L. infantum/donovani* hibritlerinin de VL'ye neden olduğu bilinmektedir (Barral et al. 1986; Sacks et al. 1995; Özbilgin et al. 2016). Enfekte olmuş hastalarda genellikle yüksek ateş, kilo kaybı, dalak ve karaciğer büyümesi yanı sıra anemi, lökopeni ve trombositopeni gibi düşük kan sayımı da görülmektedir (Gupta and Nishi 2011; Gülez vd 2011; van Griensven 2012; McGwire and Satoskar 2014). Ayrıca konağın immünite durumuna bağlı olarak tonsiller, larinks, özofagus ve barsak gibi organları da etkilemektedir (Ashford 1996; Desjeux 1996). Hastalığın inkübasyon süresi konağın immun sistem durumuna göre

## 1. GİRİŞ

---

değişmekte olup, 2-8 ay arası değişiklik göstermekte ve enfeksiyon tedavi edilmediği takdirde ölümle sonuçlanmaktadır (Ready 2014).

### 1.7.3. Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL)

Başlıca etkeni *L. braziliensis* olmakla beraber *L. panamensis*, *L. guyanensis* ve *L. amazonensis* türlerinin de MKL'ye neden olduğu bilinmektedir (Goto ve Lindoso 2010). Genellikle Güney Amerika'da endemik olarak görülen bu hastalık nazal septumda, dudaklarda, damakta, deride ve mukozalarda çoğalarak nodül, papül ya da vezikül şeklinde lezyonların görülmesi ile karakterize edilmektedir (Saygı 1998; Murray et al. 2005; Amato et al. 2007). Hastalığın seyri konağın immun sistemine bağlı olarak değişmekte olup, enfekte bireylerin mukozalarına ulaşarak nazal bölgede doku harabiyeti ve ciddi patolojik değişikliklere neden olmaktadır (Blum et al. 2004; Machado-Coelho et al. 2005; Amato et al. 2007; Konecny and Stark 2007).

### 1.7.4. Diffüz Kutanöz Leishmaniasis (DKL)

Diffüz kutanöz leishmaniasis, ülserleşmeyen, ağrısız papül ve nodüllerle lezyonlar şeklinde immun sistemi baskılanmış bireylerin yüz, ekstremiteler ve kalça kısımlarında kronik bir seyri olan ve sıklıkla tedavi başarısızlıkları ile seyreden leishmaniasis formudur (Sinha et al. 2008). Yeni Dünya'da DKL etkeni *L. mexicana* ve *L. amazonensis*, Eski Dünya'da ise *L. aethiopica* olarak bilinmektedir (Agudelo et al. 1999; Sinha et al. 2008).

### 1.7.5. Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL)

Post kala azar dermal leishmaniasis, visseral leishmaniasisin bir komplikasyonu olup, genellikle bu form *L. donovani* tarafından enfekte olan hastalarda tedaviden sonra görülmektedir. VL'den iyileşen bir hastada ciltte sarı benekler ve nodüler döküntüler ile karakterize edilmektedir. Döküntü genellikle ağız çevresinde başlayarak şiddetine göre vücudun diğer bölgelerine yayılmaktadır. PKDL'de hastalar aylarca ya da yıllarca semptom göstermeyebildiği gibi semptomlar bu süre sonunda da gelişebilmektedir (Esch and Petersen 2013). VL hastalarının periferik kanındaki yüksek interlökin (IL-10)

## 1. GİRİŞ

---

konsantrasyonları, PKDL gelişimini öngörmektedir. VL sırasında interferon gama (IFN- $\gamma$ ), periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) tarafından üretilmemektedir. VL tedavisinden sonra, PBMC'ler IFN- $\gamma$  üretmeye başlamakta, bu da IFN- $\gamma$  üreten hücrelerden kaynaklanan PKDL lezyonlarının ortaya çıkmasıyla örtüşerek deride kalıcı parazitlere tepki olarak deri iltihabına neden olmaktadır (Zijlstra et al. 2003).

### 1.7.6. Kanin Leishmaniasis (KanL)

Kanin leishmaniasis, parazitin doğada en önemli rezervuarı olan köpeklerde meydana gelen enfeksiyon formudur. KanL'in etken türleri arasında *L. infantum*, *L. tropica*, *L. chagasi*, *L. major* ve *L. braziliensis* yer almaktadır. KanL'nin etkeni Eski Dünya'da *L. infantum*, Yeni Dünya'da ise *L. chagasi* olarak bilinmektedir (Reithinger and Davies 1999; De Andrade et al. 2006; Bamorovat et al. 2015; Baneth et al. 2017). KanL, geniş klinik belirti ve şiddet derecesi ile kendini göstermekte ve bu hastalığın yönetimi konusunda yeterli bilimsel anlaşma bulunmamaktadır (Baneth et al. 2008). Enfekte organizmalarda görülen semptomlar özellikle yüz, kulak ve ayaklarda yara, kilo kaybı, lenf bezlerinde büyüme, tüy dökülmesi ve deride kaşıntılı olmayan kızarıklık ve döküntü şeklinde sıralanmaktadır (Handman ve Bullen 2002). Hastalığın ilk evrelerinde belirgin semptomlar görülmemekle birlikte köpeklerde ilk belirtiler halsizlik ve kilo kaybı ile birlikte tüy dökülmesi, kalp krizi, konjonktivit ve böbrek palpasyonunda ağrı semptomları ile seyretmektedir (Alvar et al. 2004). Daha sonraki evrelerde ise köpeklerde yüksek ateş, halsizlik, iştah ve kilo kaybı, aşırı su tüketimi gibi spesifik olmayan semptomlar görülmektedir. Ayrıca bu dönemde enfeksiyona farklı formlarda kutanöz lezyonlar da eşlik edebilmektedir (Ferrer 1989). Enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde kas atrofisi, tırnaklarda kalınlaşma, kırılabilirlik ve tırnak etrafındaki dokuda iltihaplanma gibi semptomlar da gözlemlenmektedir (Slappenden 1988).

### 1.8. Leishmaniasisin Epidemiyolojisi

Hücre içi bir protozoon olan 20'den fazla *Leishmania* türünün neden olduğu leishmaniasis, dünyanın en önemli halk sağlığı problemlerinden birisidir. İnsanlar da dahil olmak üzere yaklaşık 70 hayvan türü, *Leishmania* parazitlerinin doğal rezervuar kaynakları olarak bilinmektedir. Leishmaniasis, DSÖ'nün en önemli tropikal hastalıklar

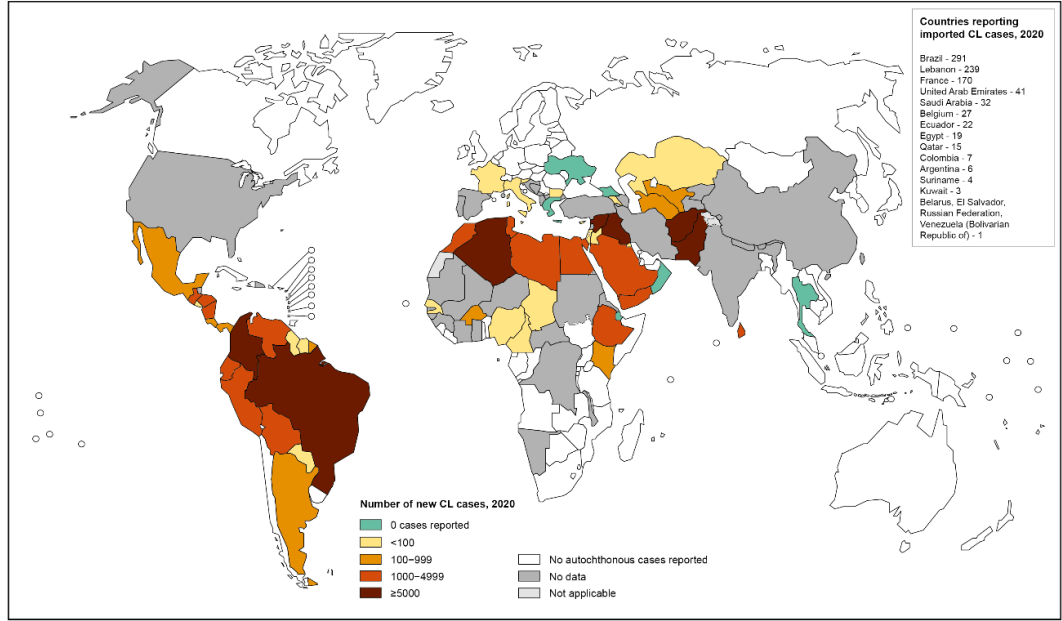
## 1. GİRİŞ

---

listesinin ilk sıralarında yer almaktadır. Dünyada tropik ve subtropik bölgelerde 350 milyon kişi leishmaniasis'e yakalanma riski altındadır. DSÖ'nün verilerine göre hastalığın 98 ülkede endemik olduğu ve bugün 1 milyardan fazla insanın enfeksiyon riski altında yer aldığı bilinmektedir. Bu verilere, her yıl tahminen 30.000 yeni VL vakası ve 1 milyondan fazla yeni KL vakası eklenmekte olup, leishmaniasis kaynaklı ölüm sayısının yıllık 65 bine kadar çıkabileceği tahmin edilmektedir. Hastalık en çok Afrika, Asya ve Latin Amerika'da görülmekte olup, olumsuz barınma koşulları, göçler, sosyoekonomik koşullar, iklim değişiklikleri, yetersiz beslenme, bağışıklık sisteminin zayıflığı gibi faktörlerin hastalığın insidansının artmasında etkili olduğu bilinmektedir. Leishmaniasisin ayrıca ormansızlaşma, barajların inşası, sulama planları ve kentleşme gibi çevresel değişikliklerle de bağlantılı olduğu bildirilmektedir (WHO 2022).

Kutanöz leishmaniasis vakalarının yaklaşık %95'i Akdeniz havzası, Amerika, Orta Asya ve Orta Doğu'da görülmektedir. DSÖ'nün verilerine göre 2020'de yeni KL vakalarının %85'inden fazlası Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, Irak, Libya, Pakistan, Peru, Suriye Arap Cumhuriyeti ve Tunus'tan bildirilmiştir. Dünya genelinde yılda 600.000-1 milyon arasında yeni vakanın ortaya çıkacağı da tahmin edilmektedir (Şekil 1.5.) (WHO 2022). Ülkemizde KL, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Akdeniz Bölgesinde endemiktir. İç Anadolu ve Ege Bölgelerinden de KL vakaları rapor edilmiş olup, Türkiye'de KL'ye neden olan ajanlar *L. tropica*, *L. infantum*, *L. donovani* ve *L. major* olarak bilinmektedir (Uzun et al. 1999; Gurel et al. 2002; Svobodová et al. 2009; Özbilgin et al. 2016).

## 1. GİRİŞ



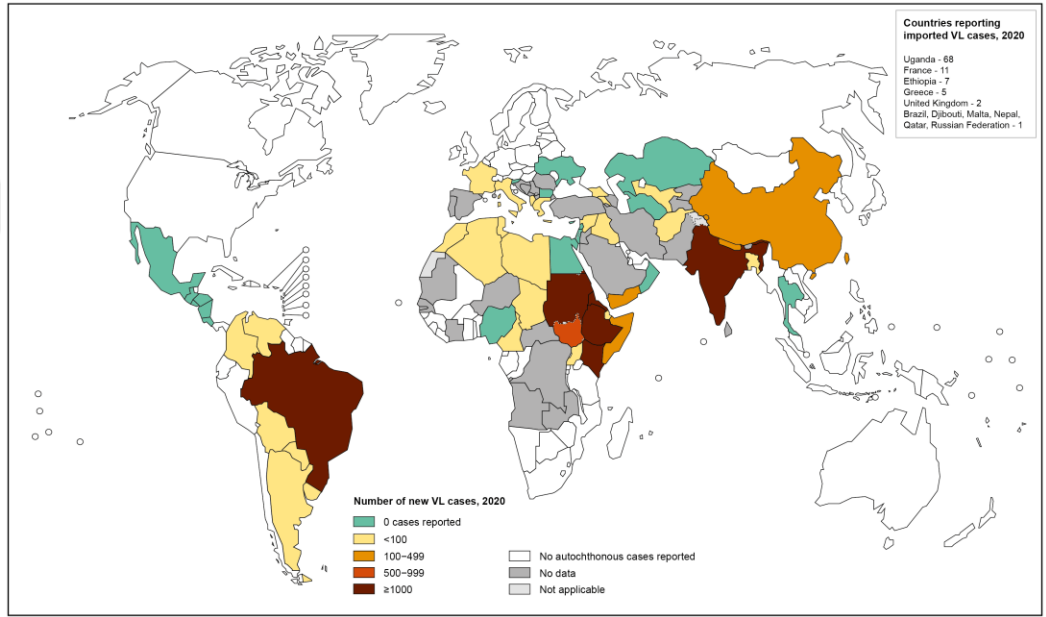
Şekil 1.5. Dünya Sağlık Örgütü 2020 yılı Kutanöz Leishmaniasis verileri (WHO 2022)

Türkiye’de özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde 1950’li yıllardan önce oldukça sık görülen KL vakaları, sıtmaya karşı kullanılan dikloro difenil trikloroethan (DDT)’nin kullanımı neticesinde eradike olan kum sineği popülasyonuna paralel olarak azalmıştır. Fakat 1980’li yıllardan sonra Şanlıurfa, Adana, Diyarbakır ve Osmaniye illeri çevresinde hastalığın insidansının arttığı rapor edilmiştir (Harman 2015). Son yıllarda Suriye’deki iç çatışmalar sebebiyle ülkemize göç eden sığınmacılarla birlikte hastalığın kutanöz formu özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi illeri için önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir (Salman vd 2014; Korkmaz vd 2015; Özkeklikçi et al. 2017). Ülkemizin Güney ve Güneydoğu bölgelerine bu savaştan dolayı yaklaşık 3 milyon sığınmacı giriş yapmış ve bu durum hastalığın insidansının artmasına sebep olmuştur. 2009-2015 yılları arasında ülkemizin Gaziantep ilinde yapılan parazitolojik ve DNA temelli epidemiyolojik bir çalışmada 263 leishmaniasis pozitif hastanın %66,15’inin Türk, %33,46’sının Suriyeli ve %0,38’inin Afgan olduğu ve bu hastalarda (Türk ve Suriyeli) etken türlerin *L. tropica* ve *L. infantum* olduğu bildirilmiştir (Özkeklikçi et al. 2017).

Salgın ve ölüm potansiyeli açısından en önemli paraziter hastalıklardan biri olmaya devam eden VL vakalarının çoğu Brezilya, Doğu Afrika, Hindistan, Bangladeş, Nepal ve Sudan’da görülmektedir (Harman 2015; Özbilgin et al. 2016; WHO 2022). Dünya çapında yılda tahmini 50.000-90.000 yeni VL vakası olduğu bilinmekte ve bu

## 1. GİRİŞ

vakaların DSÖ'ye sadece %25 ile %45'i rapor edilmektedir. DSÖ tarafından 2020'de yeni vakaların %90'ından fazlasının Brezilya, Çin, Etiyopya, Eritre, Hindistan, Kenya, Somali, Güney Sudan, Sudan ve Yemen ülkelerinde olduğu bildirilmiştir (Şekil 1.6.) (WHO 2022). VL etkeni Afrika, Asya ve Avrupa ülkelerinde *L. donovani* ve *L. infantum*, Güney Amerika da ise *L. chagasi* olarak bilinmektedir (Murray et al. 2005; Lukeš et al. 2007). Ülkemizde ise hastalık, en fazla Akdeniz ve Ege Bölgelerinde görülmektedir (Özbel vd 2002; Bodur vd 2003).



Şekil 1.6. Dünya Sağlık Örgütü 2020 yılı Visseral Leishmaniasis verileri (WHO 2022)

### 1.9. Leishmaniasis'in Laboratuvar Tanısında Kullanılan Yöntemler

*Leishmania* türlerinin birçoğunun hastalık sürecinde asemptomatikten ölümcül etkilere kadar ciddi patolojik etkileri bulunmaktadır. Genellikle *Leishmania* türleri ile hastalık tipi/şiddeti arasında korelasyon görülmektedir. Leishmaniasis her zaman klinik semptomlar göstermeyip asemptomatik olarak seyredilmekte veya diğer hastalıkların semptomları ile benzer olabildiği için karıştırılabilmektedir. Dolayısıyla kesin tanı için klinik belirtiler varsa da yeterli kabul edilememektedir. Endemik bölgelerde yaşayan ya da bu bölgelere seyahat eden kişilerde nodül, ülser, nodül, plak, ülser plak, eritematöz papül, vücudun açık bölgelerinde kronik lezyon ortaya çıkması gibi klinik durumlar KL tanısını düşündürmektedir. Ancak klinik olarak KL; bakteriyel deri enfeksiyonları, malign ülserler, mantar enfeksiyonları, deri tüberkülozları, travmatik ülserler, enfekte

## 1. GİRİŞ

---

böcek ısırığı, granülomlar, miyazis, tropikal ülser, sarkoidoz, şarbon, lepramatöz lepra, psödolenfoma ve sporotrikoz gibi çok sayıda hastalığı taklit edebildiğinden ayırıcı tanılamamanın önemi dikkat çekmektedir (Uzun vd 2017). Sürekli ve düzensiz ateş, kilo kaybı, splenomegali, pansitopeni semptomları ise VL tanısını düşündürmektedir. İç organ tutulumu yapan klinik VL enfeksiyonunun akut formu, sıtma, akut chagas hastalığı, tifoid ateş, tifus, tüberküloz, akut schistosomiasis ve ameboma ile karışabildiği gibi bazen de subakut ve kronik formda, brusellosis, enfeksiyöz mononukleosis, histoplazmosis ile karıştırılabilmektedir (Özkocaman 2002). Bu nedenle hastalık teşhisinin konulmasında semptomların değerlendirilmesi yanında parazit etmenin tanısına yönelik de planlama yapılmaktadır. Genel olarak leishmaniasis'in tanısında kullanılan yöntemler, direkt tanı yöntemleri (mikroskopik ve kültür tanı) ve indirekt tanı yöntemleri (serolojik ve moleküler tanı) şeklinde ayrılmaktadır (Goto and Lindoso 2010; Mitropoulos et al. 2010).

### 1.9.1. Direkt tanı yöntemleri

#### 1.9.1.1. Mikroskopik tanı yöntemi

Tanıda en çok kullanılan yöntemlerden biri olan mikroskopik incelemede kan, kemik iliği, dalak, deri lezyonu ve lenf düğümü gibi dokulardan alınan örnekler de parazitin amastigot formu araştırılmaktadır. Bu amaçla hazırlanan yayma ya da touch preparatlar Giemsa veya Leishman ile boyanarak mikroskopta incelenmektedir. Dalak ve karaciğer aspirasyonunda parazitin bulunma oranı çok yüksektir fakat bu yöntemlerde kanama riski olduğu için tanıda kemik iliği aspirasyonunun en güvenli yöntem olduğu bildirilmektedir (Aviles et al. 1999; Schallig et al. 2001; Kuman 2002; Sundar and Rai 2002; Akhoundi et al. 2017).

#### 1.9.1.2. Kültür tanı yöntemi

Kültür yöntemi; promastigotları elde etmek üzere deri kazıntıları, doku aspiratları ve biyopsi örneklerinin *in vitro* kültür ortamında çoğaltılıp mikroskopik olarak görüntülenmesi temeline dayanan bir tanı yöntemidir. Parazitolojik tanı, şüpheli lezyonlardan alınan örneklerin histopatolojik incelenmesi ya da *in vitro* ortamda parazitin varlığının belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır (Akhoundi et al. 2017). Bu yöntemde

## 1. GİRİŞ

---

lezyonun bulunduğu bölgeden alınan numunenin, tavşan kanı içeren katı Novy-MacNeal-Nicole (NNN) ile fetal sıgır serumuyla zenginleştirilmiş Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1629, RPMI 1630, RPMI 1640, Schneider sıvı besiyerlerine ekimi yapılmakta ve amastigotların promastigotlara dönüşüp dönüşmediği kontrol edilmektedir. Genellikle NNN besiyerinde 21 gün içinde, RPMI ve Schneider besiyerinde ise 4-5 günde üreme gerçekleşmektedir (Novy ve McNeal 1904; Unat vd 1995; Saygı 1998; Özbel ve Töz 2007). Kontaminasyon riski dikkate alınarak aseptik koşullarda gerçekleştirilecek kültür yönteminde izolatların yaklaşık 15-35 gün boyunca inkübe edilerek gözlenmesi gerekmektedir (Allahverdiyev et al. 2004; Korkmaz ve Ok 2011).

### 1.9.2. İndirekt tanı yöntemleri

#### 1.9.2.1. Serolojik tanı yöntemi

Serolojik yöntemler, *Leishmania* türlerine spesifik antikörlerin kullanımı ile antijenlerin tespit edilmesi temeline dayanmaktadır (Sundar and Rai 2002). Bu amaçla akut fazda parazite karşı oluşan antikörlerin titreleri belirlenerek tanılama yapılmaktadır. Serolojik testlerin pozitif olması leishmaniasis'de önemlidir. Ancak seronegatif durumlarda diğer parazitolojik tekniklerin de kullanımına ihtiyaç duyulmakta ve birden fazla test uygulanarak kesin tanı gerçekleştirilmektedir (Allahverdiyev et al. 2004). Leishmaniasis tanısında İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT), Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), rK39 antijeninin kullanıldığı Dipstick Testi, Direkt Aglütinasyon Testi (DAT), Lateks Aglütinasyon Testi (LAT), İndirekt Hemagglütinasyon Testi (IHA) ve Western Blot yöntemleri de kullanılmaktadır (Mohammed et al. 1985; Mary et al. 1992; Boelaert et al. 2007; Gavvani et al. 2008).

#### 1.9.2.2. Moleküler tanı yöntemleri

Parazitin doğrudan tanısına yönelik yöntemler güvenilir olmakla beraber genellikle hassasiyeti oldukça düşüktür. Özellikle parazitin az miktarda olması veya kültür yöntemindeki kontaminasyon riski gibi nedenlerden dolayı *Leishmania* parazitlerinin belirlenmesinde zorluklar yaşanabilmektedir. Aynı zamanda tanıda kullanılan serolojik testler de immünitesi baskılanmış kişilerde hatalı sonuçlar vermekte

## 1. GİRİŞ

---

ve eski/yeni vaka ayırmaları tam olarak yapılamamaktadır. Bu nedenlerle birçok moleküler yöntem içerisinde en yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR), hem *Leishmania*'nın tespiti hemde tedaviden sonra hastalığın takibi açısından etkili bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Maia and Campino, 2008). *Leishmania* spp'nin moleküler tiplendirmesinde nested PCR, multipleks PCR, kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ve DNA dizi analiz yöntemleri kullanılabilir. PCR reaksiyonları yüksek duyarlılığa sahip olmaları yanında çok sayıda farklı klinik örnek üzerinde uygulanabilirliği ve oldukça kısa sürede sonuç vermeleri nedeniyle tercih edilmektedirler. ELISA'dan farklı olarak, konak türüne özgü reagentlere ihtiyaç duyulmayan bu yöntemde tek bir reagent ile insan, köpek veya başka bir omurgalı konaktan alınan örnekler analiz edilebilmektedir. *Leishmania* türlerinin saptanması ve tanımlanması için genellikle sitoplazmada çokça bulunan "maxicircle" ve "minicircle" DNA ağı içeren kDNA ve 16S rRNA genleri, PCR testleri için hedef bölgeler olarak seçilmektedir (van Eys et al. 1992; Osman et al. 1997; Aviles et al. 1999; Lachaud et al. 2001; Sambrook and Russell 2001; Schonian et al. 2003). Ancak PCR testlerinin hassasiyeti yüksek olmakla birlikte, uygulaması ve maliyetleri rutin uygulamaları olumsuz etkilemektedir (Sundar and Rai 2002; Eroğlu 2008).

### 1.10. Leishmaniasis Tedavisi

Leishmaniasis için günümüzde geliştirilmiş kesin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Hastalığın tedavisinde çeşitli antibiyotikler, üç ve beş değerlikli antimon bileşikler denenmekte, ancak üç değerlikli antimon bileşiklerinin toksisitesi yüksek olduğu için tedavide tercih edilmemektedir. Tedavide etki mekanizmaları tam olarak kesinleşmemekle birlikte, parazitin moleküler yapısına ve makrofaj-konak ilişkisine etki ettikleri düşünülen beş değerlikli antimon bileşikler, düşük toksisiteleri ve tedaviye daha net yanıt verdikleri için günümüzde en çok kullanılan bileşikler olarak bilinmektedir (Olliaro and Bryceson 1993; Santos et al. 2008; Baiocco et al. 2009). Hastalığın tedavisinde ayrıca Amfoterisin B, Paromomisin, Pentamidin, Miltefosin ve İmikumod da kullanılmaktadır. Polien antibiyotik olarak bilinen Amfoterisin B, *Leishmania* türlerinin amastigot ve promastigot formlarında hücre zarı geçirgenliğini artırıp iyon girişine neden olarak parazitin ölmesini sağlamaktadır (Goto and Lindoso 2010). Paromomisin, 16S ribozomal RNA'ya bağlanarak parazitin protein sentezini bloke

## 1. GİRİŞ

---

etmektedir (Mcgwire and Satoskar 2014). Antimon ile benzer etkiye sahip bir ilaç olan Pentamidin, organizmanın kinetoplast morfolojisini değiştirerek DNA sentezine etki etmekte ve mitokondriyal membranın parçalanmasına neden olmaktadır (Marfurt et al. 2003). Miltefosin, VL tedavisinde oral yolla kullanılmakta (Sundar et al. 2006), imikimod, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve IL-2 gibi pro-inflamatuar sitokinleri indükleyerek makrofaj aktivasyonunu sağlayan bir ajan olarak tedavide değerlendirilmektedir (Arevalo et al. 2001).

### 1.11. İmmün Sistem

Vücudu zararlı tüm antijenlere, özellikle patojenik mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonel hastalıklara karşı koruyan ve birçok organ, doku ve hücrede yer alan savunma mekanizmasını ifade eden sistem “immün sistem” veya “bağışıklık sistemi” olarak tanımlanmaktadır. İmmün sistem tarafından antijenlere veya mikroorganizmalara karşı verilen tepkiye ise immün yanıt adı verilmektedir (Janeway et al. 2005). İmmün sistem; her zaman aktif ve hızlı olup, immünolojik hafıza ve spesifitesi olmayan bir cevap oluşturan “doğal immünite” ile daha yavaş aktive olarak immünolojik hafıza oluşumunu sağlayan “edinsel immünite” olmak üzere iki temel mekanizmaya sahiptir. Doğal ve adaptif immünite vücutta homeostazı korumak ve uyaranlara karşı savunma oluşturmak için sürekli etkileşim halinde olup, bir düzen içinde görev yapmaktadır (Chinen 2006; O'Connor et al. 2014). İmmün sistem hücrelerinden lenfositler, yabancı istilacıların tanınması ve yok edilmesinde görev alan hematopoietik kökenli hücreler olup, lenfoid organlarda, lenf sıvısında ve dolaşımda yer almaktadırlar (Miller 1996). Vücudun herhangi bir ajanla karşılaşması sonucunda lenfosit hücreler bu ajanları yok etmek için aktif hale geçmektedirler.

#### 1.11.1. Doğal immünite

Organizmada doğuştan var olan doğal immünite, enfeksiyonlara yol açan patojen mikroorganizma ve moleküllerin vücuda girişini engelleyen veya vücuda girmeyi başarmış mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için çalışan bağışıklık sistemidir. Doğal bağışıklık sistemi deri, epitelyal bariyerler, kompleman, konak savunma peptidleri, humoral faktörler (sitokin, kemokin vs.), lökositler, makrofajlar, dendritik hücreler, doğal

## 1. GİRİŞ

---

katil hücreler (NK) gibi birçok farklı komponent içermektedir (Goldsmith et al. 2012). Doğal immüitenin ilk savunma hattını deri ve epitelyal bariyerler oluşturmaktadır. Bu bariyeri geçmeyi başaran patojen mikroorganizmalar kompleman sistem proteinleri, fagositler ve doğal katil hücreler tarafından saldırıya uğramaktadır. Doğal immün sistemdeki bu yanıt, yabancı maddeler ile karşılaşır karşılaşmaz harekete geçmekte ve doğal bağışıklık sistemi hücreleri hafızası olmamasına rağmen patojenleri özgün olarak tanımaktadır. Ayrıca doğal immünite, organizmadaki ilk savunma yanıtı oluşturduğu gibi adaptif immün yanıtın oluşmasında da görev almaktadır (Abbas et al. 2015).

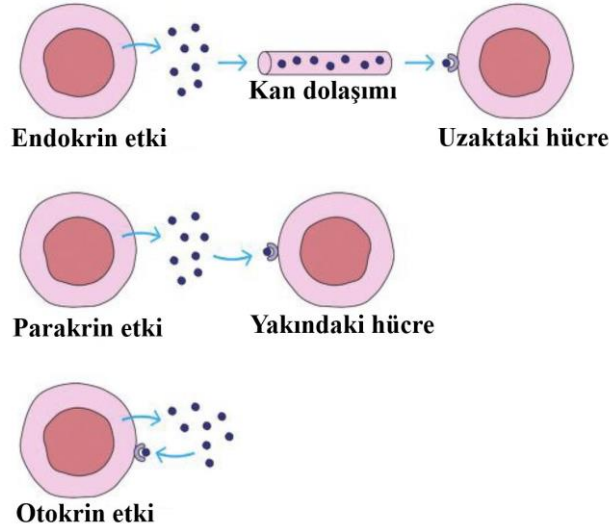
### 1.11.2. Adaptif immünite

Adaptif immünite vücudun enfeksiyona karşı oluşturduğu ikinci savunma hattıdır. Vücuda giren patojen veya antijenler doğal immünite bariyerlerini aşabilirse adaptif immün yanıt tetiklenmektedir. Adaptif immüitenin görevi enfektif ajanların tanınmasını sağlamaktır. Adaptif immünite bu şekilde doğal immün sistem bariyerlerini geçmiş patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonları önlemek için hücreleri ve molekülleri uyararak enfeksiyona neden olan bu patojenlere karşı yanıt verirken aynı zamanda immünolojik bellek oluşturmaktadır (O'Connor et al. 2014). Adaptif immüitenin ana bileşenleri B ve T lenfositleri olmakla beraber doğal bağışıklık sistemi hücreleri olan makrofajlar ve dendritik hücreler de antijen sunucu hücreler olarak adaptif immün sisteme destek sağlamaktadırlar (Delves et al. 2011). Adaptif immün sistem, B hücreleri vasıtasıyla hücre dışı etkenlere karşı antikor bağımlı humoral yanıt ve T lenfositler vasıtasıyla hücre içi etkenlere karşı hücre sel yanıt şeklinde reaksiyon göstermektedir (Janeway et al. 2005). Humoral immün yanıtta B lenfositlerin ürettiği antikorlar sayesinde hücre dışı patojenler ortadan kaldırılmaktadır. Antikorlar dolaşıma, gastrointestinal sisteme, ürogenital sisteme, mukozal organların lümenlerine ve diğer vücut sıvılarına salgılanarak mikropları ve mikropların salgıladıkları toksinleri etkisiz hale getirmektedir. Bu antikorlar salgılandıkları bölgelerde bulunan protein, karbonhidrat, lipit ve nükleik asit gibi antijenlere, patojenlere ve bu patojenlerin toksik ürünlerine bağlanarak fagosite edilmelerini sağlamakta ve böylece hedef hücrelere girişleri engellenmektedir. Hücre sel immün yanıt hücre içi mikroplara karşı oluşmakta ve işleyişine T lenfositler aracılık etmektedir. T lenfositlerinin yardımcı ve sitotoksik olmak üzere iki formu bulunmakta ve bu lenfositler genellikle protein yapıdaki antijenleri tanımaktadır. Yardımcı T lenfositleri

mikropları yok etmek üzere fagositleri harekete geçirirken sitotoksik T lenfositleri sitoplazmada bulunan enfeksiyonları yok etmektedirler. Kısaca B lenfositlerinin ürettiği antikorlar hücre dışı mikropların antijenlerini tanıırken, T lenfositler ise hücre içi mikropların antijenlerini tanıyarak immünite sağlamaktadırlar (Abbas et al. 2015).

### 1.12. Sitokinlerin Genel Özellikleri

Sitokinler, immun ve inflamatuvar yanıtta görev alan, uyarılmış lenfositler, monositler ve makrofajlar ile diğer hücreler tarafından sentezlenen 20-30 kDa (kilo dalton) ağırlığında peptid veya glikoprotein yapısında maddelerdir. Çok düşük konsantrasyonlarda bile etkin olan sitokinler solubl formda bulunmaktadırlar (Kılıçturgay 2003). Sitokinler farklı etkinliğe sahip olmaları ve immün yanıtlarda rolleri farklı olmalarına rağmen bazı önemli özellikleri paylaşmaktadırlar. Bağışıklıkta, inflamasyonda ve hematopoezde görev alan ve bağışıklık hücrelerinin etkinliklerini arttırmada aracı moleküller olarak bilinen sitokinler, depolanmadan sürekli (yeniden/de nova) üretilmektedirler. Dışarıdan gelen uyarılar sonucunda tetiklenen sitokinler hedef aldıkları hücrelerin yüzeyinde bulunan yüksek afiniteli reseptörlere bağlanarak otokrin, parakrin ve endokrin etkiler gösterebilmektedirler. Çoğu sitokin üretildikleri hücre üzerine (otokrin etki) ya da yakınında bulunan hücrelere (parakrin etki) etki ederek işlev görürken, enfeksiyona karşı tetiklenen doğal immün yanıtta dendritik hücreler ve makrofajların uyarılarak bol miktarda sitokin üretilmesi suretiyle de salgılandıkları bölgenin uzağına da etki etmektedirler (endokrin etki) (Şekil 1.7) (Owen et al. 2007; Abbas et al. 2015).



**Şekil 1.7.** Sitokinlerin endokrin, parakrin ve otokrin etkileri (Owen et al. 2007)

Sitokinler lenfokin, kemokin, interlökin, adipokin, koloni uyarıcı faktörler, interferonlar gibi birçok farklı tanım ile sınıflandırmaktadır. Sınıflandırmada sitokinlerin işlevsel yakınlıkları dikkate alındığında, farklı hücreler için pozitif veya negatif büyüme faktörleri olarak hareket eden sitokinler (IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 ve Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF)), proinflamatuvar sitokinler (TNF- $\alpha/\beta$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IFN- $\alpha/\gamma$ , IL-8 ve makrofaj inhibitör protein 1) ve antiinflamatuvar sitokinler (IL-1 reseptör antagonistleri, TNF- $\alpha$  binding protein, IL-1 binding protein, solubl IL-1 reseptörleri) şeklinde üç gruba ayrılabilirler (Gruys et al. 2005). Bağışıklık ve inflamatuvar yanıtları düzenleyen sitokinler lökositlerin birbirleriyle ve başka hücrelerle iletişimini sağlamaktadırlar. Lökositler tarafından sentezlenip lökositler üzerine etkileri dikkate alındığında moleküler olarak tanımlanan sitokinlerin büyük bir bölümü interlökinler olarak adlandırılmaktadır. Doğal immün yanıt kapsamında üretilen sitokinlerin başlıca kaynakları mikroorganizmalarca uyarılan dendritik hücreler ve makrofajlardır, ancak epitel hücreleri ve diğer farklı hücre tipleride sitokinler üretebilmektedirler. Adaptif immün yanıtta sitokinler çoğunlukla CD4<sup>+</sup> T hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Etkinleştikten sonra 1-2 saat içinde CD4<sup>+</sup> T hücrelerinden üretilen ilk sitokin, IL-2'dir. Etkinleşmenin gerçekleşmesi ile yüzeyde yüksek afiniteli IL-2 reseptör sergilemesi gerekmekte ve böylece T hücrelerinin IL-2'ye bağlanma yetisi ve yanıtı hızla artmaktadır (Abbas et al. 2015).

## 1. GİRİŞ

**Çizelge 1.2.** Sitokinlerin Özellikleri (Mayer 2015)

Sitokin	Kaynak Hücre	Hedef Hücre	Başlıca etkileri
IL-1	Monositler Makrofajlar Fibroblastlar Epitelial hücreler Endotelial hücreler Astrositler	T hücreler; B hücreler Endotelial hücreler Hipotalamus Karaciğer	Kostimulatör molekül Aktivasyon (inflamasyon) Ateş Akut faz reaktanları
IL-2	T hücreleri NK hücreleri	T hücreler B hücreler Monositler	Büyüme Büyüme Aktivasyon
IL-3	T hücreleri	Kemik iliği öncülleri	Büyüme ve farklılaşma
IL-4	T hücreleri	Naif T hücreler T hücreler B hücreler	Th2 hücrelere dönüşüm Büyüme Aktivasyon ve büyüme; Ig E'ye izotip çevrimi
IL-5	T hücreleri	B hücreler Eozinofiller	Büyüme ve aktivasyon
IL-6	T hücreleri Makrofajlar Fibroblastlar	T hücreler B hücreler Matür B hücreler Karaciğer	Kostimulatör molekül Büyüme(insanda) Akut faz reaktanları
IL-8	Makrofajlar Epitelial hücreler Plateletler	Nötrofiller	Aktivasyon ve kemotaksis
IL-10	T hücreleri (Th2)	Makrofajlar T hücreler	ASH aktivitesinin inhibisyonu Sitokin üretiminin inhibisyonu
IL-12	Makrofajlar NK hücreleri	Naif T hücreler	Th1 hücreye dönüşüm
IFN- $\gamma$	T hücreleri NK hücreleri	Monositler Endotelial hücreler Özellikle makrofajlar olmak üzere çoğu dokudaki hücreler	Aktivasyon Aktivasyon MHC sınıf I ve II artışı
TGF- $\beta$	T hücreleri Makrofajlar	T hücreler Makrofajlar	İnhibisyon aktivasyon ve büyüme Aktivasyon inhibisyonu
GM-CSF	T hücreleri Makrofajlar Endotelial hücreler Fibroblastlar	Kemik iliği öncülleri	Büyüme ve farklılaşma
TNF- $\alpha$	Makrofajlar T hücreleri	IL-1 ile benzer	IL-1 ile benzer

### 1.13. Kompleman Sistem

Kompleman sistemi, patojenlere karşı konak savunmasında ve antikor aracılı doku hasarında önemli rol oynayan, dolaşımda ve hücre membranında bulunan, ardışık etkileşen bir grup proteinin tamamını ifade eden bir sistemdir. Sistem içerisinde yer alan proteinler, antikorların antimikrobiyal etkisine yardım etme veya tamamlama yeteneğinden dolayı ‘kompleman’ ismini almıştır. İlk defa 1890’larda Bordet ve Erlich tarafından tanımlanan kompleman sistem, çeşitli kimyasal ajanlarla kompleks oluşturarak vücudun patojenlere karşı savunmasında ve inflamatuvar yanıtta görev almaktadır (Dunkelberger and Song 2010). Kompleman sistemin aktivitesi, doğal veya adaptif mekanizmalar tarafından tetiklenebilmektedir. Antikor yokluğunda doğal immun yanıtın bir parçası olan kompleman sistem, patojenlere bağlanan antikorların aktivasyonu ile de adaptif immünitinin bir parçası olduğunu göstermektedir (Abbas et al. 2015). Farklı hücresel mekanizmalara sahip olsalar da bağışıklıkta bu iki sistemin mekanizmaları arasında bağlantı bulunmaktadır (Parkin and Cohen 2001). Kompleman sistemin alternatif, klasik ve lektin olmak üzere üç yolağı bilinmektedir. Alternatif ve lektin yolları antikor yokluğunda patojenler tarafından, klasik yol ise antikorlar tarafından tetiklenmektedir (Abbas et al. 2015). Kompleman sistemde kan ve hücre membranı ile ilişkili 30’den fazla protein bulunmaktadır (Sarma and Ward 2011). Bu proteinler C harfinin yanına konan sayı ve harflerle gösterilmektedir (C1, C2, C3b gibi). Kompleman yolakta C3a ve C5a'nın oluşumuyla sonuçlanan sıralı bir enzimatik reaksiyonlar dizisi gerçekleşmektedir (Kılıçturgay 2003). Alternatif, klasik ve lektin yollarının hepsinde C3 proteini sistemin temel molekülü olmakla birlikte plazmada da en fazla miktarda bulunan proteindir. Kompleman sistemin aktivasyonu erken ve geç basamaklar olmak üzere iki aşama ile gerçekleşmektedir. İlk aşama, erken basamak olarak ifade edilen ve her bir yolakta farklılık gösteren reaksiyonlar dizisidir. Aktivasyon işlemlerinin son aşaması olan geç basamaklar ise her yolak için aynı reaksiyon dizileri ile devam etmektedir (Abbas et al. 2015).

### 1.13.1. Kompleman aktivasyonunun erken basamakları

#### 1.13.1.1. Alternatif yol

Mikroorganizma yüzeylerinde bulunan karbonhidrat, protein veya lipid partikülleri tarafından tetiklenen kompleman sistemi, antijen antikor kompleksine ihtiyaç duymadan erken dönemde önce C3 yapısının düşük seviyede kendiliğinden hidrolizi sonucu hedefe bağlı bulunan C3b yapılarına dönüşmektedir. C3b mikroorganizmanın yüzeyinde biriktiğinde bu yolun aktivasyonu başlamaktadır. Daha sonra bir serin proteaz olan faktör B proteininin yıkımı sonucu oluşan Bb protein parçası, mikroorganizma yüzeyine bağlı C3b proteinlerine bağlanarak C3 konvertazı olan C3bBb kompleksini oluşturmaktadır. C3 konvertaz'ı C3 proteinini C3a ve C3b'ye parçalayan enzimdir. C3bBb kompleksi C3 konvertaz olarak işlev görmesi nedeniyle daha fazla miktarda C3 enzimatik olarak yıkılmakta ve bunun sonucunda daha fazla C3b ve C3bBb molekülü yapılmaktadır. Oluşan bu C3bBb molekülünün bir kısmı mikroorganizmaya bağlanırken, bir diğer kısmı ise C5'i yıkan ve kompleman aktivasyonun geç basamaklarını başlatan C5 konvertaz olarak rol oynayan C3bBb3b'yi oluşturmaktadır (Abbas et al. 2015).

#### 1.13.1.2. Klasik yol

Genellikle özgül antijen ile immünoglobulin M (IgM) ve IgG gibi alt sınıfa ait spesifik antikorların kompleks oluşturarak C1 (C1q, C1r ve C1s) ile etkileşimi sonucunda tetiklenmektedir. Bu bağlanmayla antikorun Fc bölgeleri, kompleman proteinlerinin bağlanabileceği bir pozisyon almaktadır. C1 komplemanın enzimatik olarak aktif hale gelmesi için iki veya daha fazla Fc bölgesine bağlanması gerekmektedir. C1 komplemanı enzimatik olarak aktifleşip C2 ve C4 proteinlerine bağlanarak parçalanmaları sağlanmaktadır. Parçalanma sonucu oluşan C4b2a, antikora ve antikorun bağlı olduğu mikrobiyal yüzeye bağlanmaktadır. C4b2a bu yolağın C3 konvertazı olarak görev yapmaktadır. C3 konvertaz C3'ü parçalamakta ve oluşan C3b'lerin bir kısmı alternatif yolda olduğu gibi mikroorganizma yüzeyinde birikmeye başlarken bir kısmı C4b2a yapısına bağlanarak C4b2a3b kompleksini oluşturmaktadır. Oluşan C4b2a3b kompleksi kompleman aktivasyonunun geç basamaklarını başlatacak olan C5 konvertaz olarak görev yapmaktadır (Abbas et al. 2015).

### 1.13.1.3. Lektin yolu

Kompleman aktivasyonunun üçüncü yolu olan antikor yokluğunda indüklenen lektin yolu; mannoz bağlayıcı lektin (MBL) veya Fikolinlerin (I-ficolin, H-ficolin ve M-ficolin), maya, bakteri, parazit ve virüs gibi mikroorganizmaların yüzeylerindeki karbonhidrat yapılarına bağlandığında tetiklenmektedir. MBL ve Fikolin, serumda MBL ilişkili proteinler ile kompleks oluşturarak dolaşmaktadır. Serumda bulunan MBL ilişkili serin proteaz 1 (MASP1), MASP2 ve MASP3 komplemanın lektin yolunu aktive edebilen moleküllerdir. Bunlara ek olarak MAP19 ve MAP44 molekülleri de MBL'e daha düşük affinite ile bağlanan serin proteazlardır (Thiel 2007). MBL-MASPs kompleksinin hedef mikroorganizmaya bağlanması C4 ve C2'nin yıkımına sebep olmaktadır. MASP2, C4'ün C4a ve C4b'ye parçalanmasından sorumlu iken MASP1 ve MASP2'nin C2'nin parçalanmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. MASP3 ise MASP2'nin C4 ve C2'ye bölünme aktivitesini down regüle etmektedir (Wagner and Frank 2010). MASP2'nin bir alternatif transkripti olan MAP19'un ise MASP2 ile karşılaştırıldığında on kat daha düşük affinite ile süreci gerçekleştirdiği bilinmektedir (Degn et al. 2011). MBL'in fonksiyonu, C1 kompleman proteininin fonksiyonuna eş değer olup, C4 aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu aşamadan sonraki yol klasik yolda gerçekleşen olaylara benzer olup, hidrolize uğrayan C4 ve C2 sonucunda bu yolun C4b2a kompleksi oluşmaktadır. C3 konvertaz olarak görev yapan bu kompleks antikor ve antikorun bağlı olduğu hücreye bağlanmakta ve C3 konvertazın C3 molekülünü C3b'ye parçalaması sonucu oluşan C3b'lerin bir kısmı C4b2a kompleksine bağlanarak kompleman aktivasyonunun geç basamaklarını başlatacak olan C5 konvertazı olarak görev yapan C4b2a3b kompleksinin oluşumunu sağlamaktadır (Nesargikar et al. 2012; Abbas et al. 2015).

### 1.13.2. Kompleman aktivasyonunun geç basamakları

Kompleman sistemin üç yolağında da C3 konvertaza C3b bileşeninin eklenmesi ile oluşan C5 konvertaz, kompleman aktivasyonunun geç basamaklarına geçişi sağlamaktadır. Bu aşamada C5'in proteolizi ile C5a ve C5b oluşmakta, oluşan C5b proteoliz olmadan C6 ve C7'ye bağlanarak kompleks olarak zara bağlanmaktadır. Daha sonra C5b67 kompleksi, hücre membranında polimerize olarak C8'i ve ardından son protein olan çoklu C9'ları kendisine bağlamaktadır. Bunun sonucunda hücre

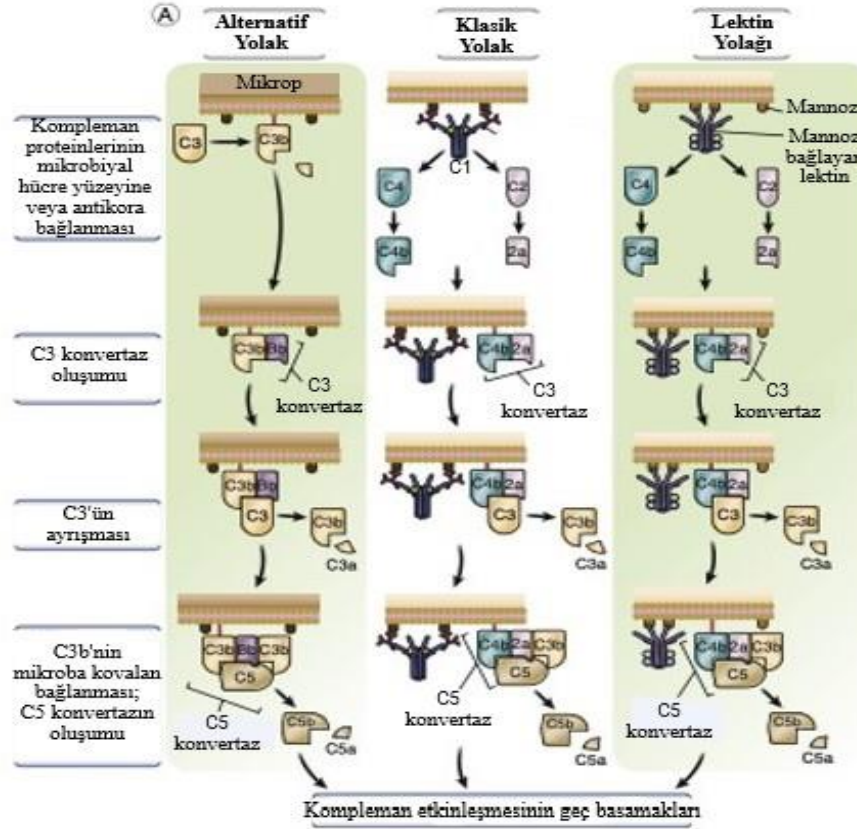
## 1. GİRİŞ

---

membranında delikli bir poli-C9 membran atak kompleksi (MAC) oluşmakta ve bu delikli yapı hücreye su ve iyon girişine yol açarak hücrenin ölümüne yol açmaktadır (Sarma and Ward 2011; Abbas et al. 2015; Liszewski and Atkinson 2015).



# 1. GİRİŞ



**B**

Protein	Serum yoğunluğu µg/ml	İşlev
C3	640-1660	C3b mikrop yüzeyine bağlanarak opsonin ve C3 ile C5 konvertazların bir bileşeni olarak işlev görür. C3a inflamasyonu uyarır.
Faktör B	200	Bb bir serin proteazdır, C3 ve C5 konvertazların etkin enzimidir.
Faktör D	1-2	C3b'ye bağlandığında Faktör B'yi kesen plazma serin proteazdır

**C**

Protein	Serum yoğunluğu µg/ml	İşlev
C1 (C1qr2S2)		Klasik yolağı başlatır; C1q antikorun Fc kısmına bağlanır; C1r ve C1s, C4 ve C2'nin etkinleşmesine yol açan proteazlardır.
C4	150-450	C4b antikorun bağlı olduğu mikrobun veya hücrenin yüzeyine bağlanır ve komplemanı etkin kılar. C4b, C1s tarafından ayrıştırılmak üzere C2'ye bağlanır. C4a inflamasyonu uyarır.
C2	20	C2a bir serin proteazdır. C3 ve C5 konvertazların etkin enzimi olarak işlev görür.
Mannoza bağlayan lektin (MBL)	0.8-1	Lektin yolağını başlatır; MBL mikrobiyal karbonhidratlardaki terminal mannoza artıklarını bağlar. MBL ilişkili proteaz, klasik yolağıdaki gibi C4 ve C2'yi etkin kılar.

(\*A: Alternatif, klasik ve lektin yollarındaki akış benzer olmasına rağmen her üç yolağın antikor ve kullanılan protein gereksinimi farklıdır. B: Alternatif yolak erken basamaklarında yer alan proteinlerin önemli özellikleri. C: Klasik ve lektin yollarının erken basamaklarında yer alan proteinlerin önemli özellikleri)

**Şekil 1.8.** Kompleman etkileneşmesinin erken basamakları (Abbas et al. 2015)

### 1.14. *Leishmania*'nın İmmünopatogenezi

*Leishmania* enfeksiyonlarının, parazitin türü ve patojenitesi, konağın enfeksiyona karşı geliştirdiği immünite ve konağın genetik alt yapısı gibi faktörlerin tamamına bağlı olduğu bilinmektedir (Chang and McGwire 2002; De Almeida 2003). Ökaryotik bir patojen olan *Leishmania*'nın en önemli özelliklerinden biri konak organizmada evrilebilmesi ve uzun süreli kronik enfeksiyonlara neden olmasıdır. *Leishmania* enfeksiyonunun ortadan kaldırılması, çoklu bağışıklık sistemi efektörlerinin koordineli hareketini gerektirmektedir. *Leishmania*'nın konak hücre içerisinde çoğalarak farklı konaklara bulaşabilme özelliği büyük ölçüde bağışıklık sisteminden kaçma kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. *Leishmania* enfeksiyonlarının doğal bağışıklık yanıtı aşamaları hastalığın seyrini belirleyecek en önemli basamak olarak bilinmektedir. *Leishmania* parazitleri fagozomal kompartmanlarda form değiştirerek kompleman sistemden kaçabilmekte ve enzimatik yıkımlara karşı dayanıklı olmaları sebebiyle de immün sistem regülasyonunu (antijen sunumu, DH'ler) bozarak adaptif immüniteyi ele geçirebilmektedir (Sacks and Sher 2002).

Enfekte dişi kum sineklerinin konak organizmayı ısırmasıyla *Leishmania* promastigotlarının deriye enjekte edilmesi sonucu parazitler hızla lokalize olmaktadır. Bu noktada parazitlerin opsonize edilerek uygun hücreler tarafından fagosite edilmek üzere karşılaştığı ilk konak savunması kompleman proteinleridir. Ancak *Leishmania* parazitleri yüzeyinde bulunan ve hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan kalın lipofosfolikan (LPG) ve leishmanolysin (gp63) tabakaları nedeniyle kompleman aracılı lizisten kaçınmaktadırlar (Brittingham et al. 1995; Franco et al. 2012). Parazitin yaşam döngüsüne bağlı olarak ekspresyon düzeyi değişen determinantlar olarak bilinen LPG ve gp63'ün makrofaja tutunma ve kompleman C'den korunmada olduğu kadar *Leishmania*'nın promastigot formdan amastigot forma dönüşümünde ve amastigotların makrofajlar içerisinde çoğalarak diğer hücrelere yayılmalarında da rolleri olduğu bilinmektedir (Bogdan et al. 1996; Bogdan and Rollinghoff 1998; Alexander et al. 1999; Chang and McGwire 2002; De Almeida 2003; Spath et al. 2003; Awasthi et al. 2004). Konak hücreye giren promastigotun ilk hedefi makrofajlar olup, bu promastigotlar makrofajdaki C' reseptörü 1-3, mannoz-fukoz reseptörü ve Fc reseptörü sayesinde tutunmayı sağlamaktadır (Sacks and Sher 2002). Enfeksiyona karşı oluşan antikorlar ve

## 1. GİRİŞ

---

kompleman C'nin aktif litik formu olan C3b, parazitin yüzeyinde birikerek opsonizasyonu başlatmakta ve C3b molekülü LPG ve gp63'ün yüzeyine tutunarak klasik yoldan C aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. C3b ile opsonize olan *Leishmania*'lar makrofajlar tarafından fagositoza uğramaktadırlar. Ancak *Leishmania* parazitlerinin yüzeyinde bulunan kalın LPG ve gp63 moleküllerinin ekspresyonları artmakta ve böylece kompleman aracılı lizis gerçekleşmemektedir. Dolayısıyla parazitler C5-9 litik kompleksinden korunmuş olmaktadır. Hücre yüzey moleküllerinden gp63 aynı zamanda C3b'yi inaktif formu olan iC3b'ye dönüştürmekte ve iC3b kompleman reseptörlerinden CR3'e bağlanması sonucu IL-12 üretimi baskılanarak adaptif immün sistem aktifleşmemektedir (Alexander et al. 1999; De Almeida 2003; Cecilio et al. 2014; Santos-Mateus et al. 2016).

Leishmaniasis'e karşı organizma karmaşık bir dizi bağışıklık yanıt oluşturmaktadır. *Leishmania* enfeksiyonlarına karşı oluşturulan direnç ya da duyarlılık Th1/Th2 (Th: T helper) dengesine bağlı olup, T hücrelerinin koruyucu immünitede önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (Alexander et al. 1999). Th1/Th2 dengesi, patojen türüne, konak immün sistem ve genetik alt yapısına, virülans faktörlerine, antijen sunan hücre (ASH)'lerin T hücreleri ile etkileşimlerine ve salgılanan sitokinlerin miktarı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Th1/Th2 dengesinin Th2 yönüne kayması veya Th1 yanıtının baskılanmasının leishmaniasis'den sorumlu olduğu düşünülmektedir. Leishmaniasis'e karşı direnç oluşması, Th1 yanıtının gelişmesi ile IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve IL-2 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimine bağlanmakta ve sonuç olarak makrofaj aktivasyonu sağlanarak parazitler yok edilmektedir (Sacks and Noben-Trauth 2002; von Stebut et al. 2003). Leishmaniasis'e karşı duyarlılık söz konusu ise Th2 yanıtı ve IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinlerin üretimi gerçekleşerek parazitin çoğalmasına neden olmaktadır (Sacks and Noben-Trauth 2002; Gordon 2003; Kropf et al. 2005). Ancak KL'nin immünopatolojisinde ve immüno-korunmasında aksi görüşler devam etmektedir. Bu noktada Th1 yanıtının oluşması ve bununla beraber pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı üretiminin organizmada önemli immünopatolojik sorunlara yol açtığı bildirilmektedir (Martin and Leibovich 2005; Eming et al. 2007; Borthwick et al. 2013; Pasparakis et al. 2014). Aynı zamanda, Th2 yanıtının oluşması durumunda düşük seviyelerde anti-inflamatuar sitokin üretiminin, reaksiyonları ve yara iyileştirme sürecini hızlandırdığı da bildirilmektedir (Allen and Wynn 2011; Gause 2013; Pasparakis

## 1. GİRİŞ

---

et al. 2014). Ayrıca IL-22, IL-17 ve IFN- $\gamma$  gibi Th17 inflamatuvar sitokinleri, IL-10 ve TGF- $\beta$  gibi diğer düzenleyici sitokinler, *Leishmania* parazitinin türü ve konağın genetik alt yapısı da hastalığın seyrini olumlu veya olumsuz yönde değiştirebilmektedir (Wu et al. 2010; Seder et al. 2018).

### 1.15. Leishmaniasis ve Oksidatif Stres

Organizmalarda yaşamsal faaliyetlerin kusursuz devam etmesi için oksidan ve antioksidanların denge halinde olması gerekmektedir. Bu denge, antioksidanların yetersiz olması durumunda bozulmakta ve oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (Heyman et al. 2011). Oksidatif strese maruz kalmış bir organizmada, oksijenin kullanımı ve metabolizması sırasında dış yörüngelerinden birinde eşleşmemiş elektron içeren moleküller oluşmaktadır. Bu moleküllere serbest radikaller denilmektedir. Normalde organizma bu serbest radikalleri antioksidanlar vasıtasıyla kontrol altında tutmak isterken bu dengenin bozulması durumunda serbest radikaller sağlıklı hücreleri okside ederek yapılarını bozmakta ve böylece oksidatif stresin oluşmasına neden olmaktadır. Oksitleyici bu ajanlar, organik moleküllerin tamamını etkilemekte ve lipid, protein ve nükleik asitlerin oksidasyonuna sebep olmaktadır. Aynı zamanda mononükleer fagositler içerisinde yer alan *Leishmania* türlerinin bağışıklık sistemi tarafından yok edilmesi sürecinde oluşan reaktif oksijen radikallerinin de bu noktada önemli rolü bulunmaktadır. Mononükleer fagositler, fagositoz sırasında büyük ölçüde artan reaktif oksijen radikalleri ile solunum patlamasına maruz kalabilmektedir. Böylelikle fagositoza uğrayan parazit, solunum patlaması neticesinde oluşan ürünlerin toksik etkisi ile öldürülebilmektedir. Genel olarak serbest radikallerin ve lipid peroksidlerin, kanser, nörolojik, psikiyatrik, böbrek hastalıkları, koroner kalp hastalığı, diyabetes mellitus, yaşlanmayla ilişkili dejeneratif değişiklikler ve leishmaniasis gibi enfeksiyon hastalıklarıyla ilişkisi olduğu bildirilmektedir (Vural et al. 2000; Dei et al. 2002; Hunt et al. 2002; Sofic et al. 2002; Jafari et al. 2015).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu etkileri olan antioksidanlar endojen veya eksojen kaynaklı olup, hücre içinde oluşabilen ya da dışarıdan alınan moleküller olarak bilinmektedir. Endojen antioksidanlar, enzim olan ve enzim olmayan antioksidanlar olarak iki gruba ayrılmaktadırlar. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon

## 1. GİRİŞ

---

peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S-transferaz (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz ve hidroperoksidaz enzim olan endojen antioksidanlar, melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon (GSH), sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin ve albümin ise enzim olmayan endojen antioksidanlardır. Eksojen antioksidanlar ise vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler (Valko 2006).

Enzim olmayan antioksidanlardan olan GSH karaciğerde sentezlenen önemli bir antioksidan olup, serbest radikallere ve peroksitlere karşı savaşarak hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır. Ayrıca GSH hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, detoksifikasyon sisteminde, membran transportunda, gen ekspresyonunda ve apoptozisde görev yapan bir antioksidan olarak da bilinmektedir (Townsend et al. 2003). KL hastalarında oksidatif stresin antioksidan sistemleri uyardığı ve lipid peroksidasyonu sonucu, oksidan antioksidan dengesinin oksidan yönüne değiştiği bildirilmektedir (Vural et al. 2004). Aynı zamanda mononükleer fagositlerde hücre içi *Leishmania* amastigotlarının varlığının oksidan-antioksidan dengesini bozduğu da bilinmektedir (Babior 1987; Locksley and Louis 1992). Bunun yanında KL hastalarında enfeksiyon başlangıcından 90 ve 120 gün sonra karaciğer ve dalakta oksidatif stres indüksiyonu gözlenmiş ve artan oksidatif stresin DNA fragmantasyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Jafari et al. 2015).

Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan ve kan ile idrarda ortaya çıkan malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterdiği için biyolojik materyallerde lipid peroksidasyon seviyelerinin indikatörü olarak kullanılmaktadır. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonu olup, direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar vermekte, dolayısıyla doku hasarına ve birçok hastalığa neden olmaktadır. Hücre membran yapısında yer alan doymamış yağ asitleri, serbest radikallerin aracılık ettiği lipid peroksidasyonu ile parçalanarak membran bütünlüğü bozulmaktadır (Freeman and Crapo 1982). KL hastalarında, antioksidan enzim aktivitelerindeki değişikliklerin leishmanisidal etkiyi artırabileceği, bu değişikliklerin parazitin ölmesine veya diğer hücre ve dokularda oksidatif hasara neden olabileceği bildirilmektedir (Kocyigit et al. 2003).

## 1. GİRİŞ

---

**Tezin Amacı;** Dünyada yaklaşık 12 ila 40 milyon arasında kişiyi enfekte eden, 350 milyona yakın kişiyi ise tehdit eden ve pek çok ülkede ciddi sağlık problemlerinden biri olarak bilinen leishmaniasisin varlığı ülkemizde Güneydoğu Anadolu, Doğu Akdeniz ve Ege Bölgelerinde bildirilmiştir. Türkiye'ye komşu olan Suriye, Irak ve İran'da oldukça endemik tür olan *L. major*'un prevalansı, Türkiye'ye gelen göçmenlerin de etkisiyle gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle çalışmada; öncelikle kutanöz leishmaniasis etkeni olan *L. major* ile gerbillerde (*Meriones unguiculatus*) enfeksiyon modelinin oluşturulması, oluşturulan enfeksiyon sonucunda gerbillerde parazite karşı oluşacak immün sistem yanıtı, bu sistemle ilişkili bazı sitokinlerin inflamatuvar yanıtındaki rollerinin belirlenmesi ve aynı zamanda doğal veya adaptif immünitinin bir parçası olan kompleman sistem yollarında görev alan bazı gen ve proteinlerin ekspresyon seviyelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

*Leishmania* türlerinin neden olduğu leishmaniasis enfeksiyonunda, gerbillerde enfeksiyon modeli oluşumu, immün sistem yanıtı ve bu sistemle ilişkili kompleman sistem yolakları üzerinden yapılan çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Bakırcı vd (2015) tarafından yapılan çalışmada, *L. major* izolatı ile gerbillerde (*M. unguiculatus*) enfeksiyon modeli oluşturulması ve enfeksiyon modeli oluşturulan gerbillerde amastigotların yayılma ve visseralize olma durumları araştırılmıştır. Çalışmada, Bitlis ili kırsalında yaşayan bir bireyden alınan klinik *L. major* izolatı ile enfekte edilmiş gerbillerden alınan doku örnekleri (karaciğer, dalak, akciğer, böbrek, kalp, testis) Giemsa ile boyanıp NNN besiyerine ekimleri yapılarak incelenmiş ve her iki yöntemde de parazitin varlığı tespit edilmiştir. Bunun yanında *Leishmania* parazitlerinin ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) bölgesine özgü tasarlanan primer ve probler ile Real Time PCR (qPCR) testi yapılmış ve parazitin varlığı doğrulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, KL ve VL ile ilişkili yapılacak deneysel çalışmalarda gerbillerin başarı ile kullanılabilmesi bildirilmiştir.

De Miranda Santos et al. (2001) tarafından MBL'nin VL'e duyarlılığı ile ilgili yapılan çalışmada, serumda MBL düzeyinin artışı doğrudan VL gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, MBL'nin makrofaj işlevi üzerine etkisinden dolayı, opsonize edilmiş promastigotlar ve enfekteli monositlerin salgıladıkları sitokinlerin ekspresyonu araştırılmış ve MBL'nin TNF- $\alpha$  ile IL-6 sitokin miktarlarını arttırdığı bildirilmiştir. Buna bağlı olarak yüksek MBL konsantrasyonunun, bu sitokinlerin üretimini artırarak makrofajlardaki leishmaniasidal etkiyi artırabileceği rapor edilmiştir.

Domínguez et al. (2002) tarafından yapılan çalışmada, sağlıklı bireylerde C1q ve C2 kompleman faktörlerinden yoksun serumlarda *Leishmania* türlerinin opsonizasyonunu tetikleyen mekanizmanın belirlenmesi amaçlanmıştır. C3 bağlanma kinetiğini belirlemek amacıyla serumlara C1q ve C2 proteinleri eklenilmiş ve sonuçlar değerlendirildiğinde *Leishmania* türlerinde C3 opsonizasyonu için her iki proteinin de gerekli olduğu kanısına varılmıştır. Çalışmanın sonucunda C1q ve C2 bakımından yoksun

## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

---

serumlarda kompleman sistemin klasik yolağının tetiklenmediği ve C3 opsonizasyonu ile bu yolun aktive olabileceği bildirilmiştir.

Laurenti et al. (2004) tarafından yapılan çalışmada, *L. (L) amazonensis* etkenli KL'li BALB/c farelerde enfeksiyonunun erken evresinde kompleman sistemin rolü araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, total serumda hemolitik testler ile kompleman aktivitesi değerlendirilmiş ve mevcut C3 birikimi immünofloresan yöntemlerle belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, kompleman protein miktarlarının enfeksiyonlu farelerde özellikle 7. günden itibaren oldukça arttığı tespit edilmiş ve kompleman proteinlerin varlığının parazit yayılmasının kontrolünde önemli olabileceği bildirilmiştir.

Bildik et al. (2004) tarafından yapılan çalışmada, KanL köpeklerde antioksidan savunma mekanizmasının durumunu tespit etmek amacıyla enfekteli konaklarda GSH ve MDA gibi bazı parametreler incelenmiştir. Yapılan çalışmada, kontrol grubuna göre KanL köpeklerin GSH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamsız bir azalmanın olduğu, MDA seviyesinde ise anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, oksidanlara karşı kullanılması nedeniyle GSH seviyelerinde azalmanın söz konusu olduğu, aynı zamanda oluşan enfeksiyona bağlı olarak eritrosit zarındaki hasar, hücrel membranların çoklu doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu ile parçalanması ve ardından membran bütünlüğünün bozulması gibi nedenlerden dolayı da MDA düzeylerinde artışın görülebildiği değerlendirilmiştir.

Jacobs et al. (2005), *L. major* enfeksiyonunda kompleman sistemin rolünü ortaya koymak için alfa1-antitripsin promotörünün kontrolü altında kobra zehir faktörünü (CVF) eksprese eden transgenik BALB/c fareler ile *in vivo* çalışmalar gerçekleştirmiştir. Yapmış oldukları çalışmada, CVF ekspresyonunun aktivasyonu ile serumda kompleman C3 protein tüketiminin arttığını ve dolayısıyla parazitlere duyarlı transgenik olmayan BALB/c farelerine göre transgenik farelerde C3 protein miktarının azaldığını bildirmişlerdir. Buna rağmen CVF-transgenik farelerin *L. major* enfeksiyonuna karşı oldukça dirençli olduğunu ve önemli ölçüde azalan bir parazit yayılımı gösterdiğini de rapor etmişlerdir. Aynı zamanda çalışmada, C3 proteininin yokluğunda konakçı hücrelerde kalıcı enfeksiyonların oluşabileceği, kutanöz lezyonların oluşumunun tamamen bloke edebileceği dolayısıyla kompleman aktivasyonunun iki ucu keskin bir

kılıç (double-edged sword) gibi değerlendirilebileceği bildirilmiştir. Bunun yanında yapılan çalışmada T hücre (IFN- $\gamma$  ve IL-4) yanıtının her iki grupta da benzer olduğu ve kontrol grubuna göre her iki grupta IFN- $\gamma$  ve IL-4 sitokin seviyelerinde artışın olduğu da rapor edilmiştir.

Ambrosio and De Messias-Reason (2005) tarafından yapılan çalışmada, serum ve serumdan saflaştırılan MBL'nin *L. braziliensis* promastigotları üzerine etkileri ve non-immün insan serumu (NHS) ile etkileşimden sonra parazit yüzeyinde yer alan MBL, C1q, C4 ve C3 proteinlerinin birikimi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hem serum MBL hem de saflaştırılmış MBL-MASP kompleksinin *L. braziliensis* yüzeyine bağlandığı ve bu bağlanmanın MBL'nin karbonhidrat tanıma alanları yoluyla gerçekleştiği doğrulanmıştır. Ancak MBL bağlanmasının, kompleman proteinlerin parazitler üzerindeki litik etkisini etkilemediği ve NHS ile inkübasyondan sonra C1q, C4, C3 birikimi ve parazit lizisinin gözlemlendiği bildirilmiştir. Sonuç olarak MBL'nin *L. braziliensis*'e bağlandığı ve buna parazitlerin yüzeyindeki spesifik bir karbonhidratın aracılık ettiği ve parazit yüzeyinde kompleman aktivasyonunun antikör-bağımsız mekanizmaları için bir kanıt sağladığı değerlendirilmiştir.

Asgharzadeh et al. (2007) yaptıkları çalışmada, MBL geninin ve promotör varyantlarının sıklığını belirlemek ve MBL alelleri ile VL gelişimi arasındaki korelasyonu belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda yüksek MBL seviyelerinin doğrudan VL gelişimi ile ilişkili olduğunu ve hasta bireylerin genomunda sözkonusu allellerin sıklıkla bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Horimoto and Costa (2009) tarafından yapılan çalışmada, VL ve KL hastalarında otoantikör profili ve kompleman protein seviyelerinin tespiti amaçlanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda KL'li hastaların tamamında VL'li hastaların ise %86,7'sinde kompleman C3 protein seviyelerinin yüksek olduğu, anti-Leishmania antikör testlerinde ise VL'li hastaların tamamında, KL'li hastaların ise %62,2'sinde pozitif olarak belirlendiği bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada, humoral, sistemik ve Th2 yanıtını tetikleyerek oluşan otoantikörler ile VL oluşumu arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

---

Limoncu and Balcioğlu (2011) tarafından Türkiye’de yapılan çalışmada, KL ve VL hastalarında C1, C3 ve C4 kompleman protein düzeyleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada kompleman C3 seviyelerinin KL’li hastalarda kontrole göre oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Çalışmada KL hastalarının lezyon bölgelerinde amastigot sayılarının az olduğu tespit edilse de enfeksiyonlu bireylerde yüksek C3 seviyelerinin (%92) olduğu göz önünde bulundurularak, KL enfeksiyonlarında kompleman C3 seviyelerinin belirlenmesinin leishmaniasis teşhisi için önemli bir parametre olabileceği öngörülmüştür.

Ramer-Tait et al. (2011) tarafından yapılan çalışmada, *L. amazonensis* ile enfekte edilen farelerde, IL-2’nin IL-12 gibi makrofajlardaki fonksiyon bozuklukları üzerinde önemli etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, IL-2’nin düzenleyici T hücrelerinden bağımsız olarak baskın bir immüno-supresif rol oynadığı ve bunu enfeksiyon esnasında lenfositlerin çoğalmasını sağlayan IL-12’nin görevini sınırlayarak yaptığı bildirilmiştir.

Ramírez et al. (2012) tarafından yapılan çalışmada, *Leishmania (Viannia) panamensis* ile enfekte olmuş insanlarda makrofajlar ile potansiyel uygunlukları göz önünde bulundurularak IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve prostaglandin endoperoksit sentaz 2 (PTGS2) genlerinin doğal ve adaptif immün sistem içerisindeki rolü araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, her bir parametrenin gen ekspresyon seviyeleri qPCR yöntemi ile belirlenip Mikroarray Analiz yöntemleri ile doğrulanmış ve IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, *L. panamensis* ve *L. chagasi/infantum* gibi farklı türler tarafından indüklenen makrofaj tepkileri arasında önemli farklılıkların olduğu gösterilmiştir.

De Araujo et al. (2015) tarafından yapılan çalışmada, *L. guyanensis*’in neden olduğu KL ile MBL2 varyant alellerinin genetik ilişkisi araştırılmıştır. Promotör bölgesi ve ekzon 1’de üçer adet olmak üzere toplam altı MBL2 varyantının genotiplendirildiği çalışmada sadece iki varyantın KL ile ilişkili olduğu ve bu varyantlardan da özellikle bir tanesinin yüksek KL riski taşıdığı bildirilmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

---

Mishra et al. (2015) tarafından Hindistan'da yapılan bir çalışmada, VL hastalarında MBL2 fonksiyonel varyantları araştırılmış ve dolaşımdaki MBL serum seviyeleri ölçülmüştür. VL hastalarında MBL düzeylerinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada MBL2 için oluşturulan varyantlardan iki minör allelin serum MBL (insanlarda MBL2 tarafından kodlanır) düzeylerini arttırdığı ve VL'de koruyucu rol oynadığı tespit edilmiştir.

Jafari et al. (2015), *L. major* ile enfekte olmuş dişi farelerin dalak ve karaciğerinde apoptoz oluşumunu araştırdıkları çalışmalarında, karaciğer ve dalakta süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), kaspaz-3 aktiviteleri ile DNA fragmentasyonu, GSH, MDA, total protein ve süperoksit anyon seviyeleri gibi çeşitli parametreleri incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, enfeksiyonun neden olabileceği biyotik stresi belirlemek amacıyla çalışmış oldukları GSH düzeylerinin KL'li farelerde kontrol grubuna göre azaldığını, MDA düzeylerinin ise arttığını bildirmişlerdir. Artan MDA düzeylerine bağlı olarak KL'li farelerde oksidatif stresin oluştuğunu, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz dahil serbest radikallere karşı savaşan çeşitli enzimler için substrat olarak işlev gören GSH'ın azalmasıyla da farelerin biyotik stres yaşadığını rapor etmişlerdir.

Manamperi et al. (2017) tarafından Sri Lanka'da yapılan bir çalışmada, viseralize olan *L. donovani* türünün neden olduğu KL hastalarında Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) ve Th2 (IL-4, IL-10) gen ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda kontrol grubuna göre karışık bir Th1/Th2 sitokin ekspresyon profili gözlenilmiş ve genel olarak Th1 yanıtının arttığı, Th2 yanıtının azaldığı, dolayısıyla enfekteli bireylerde Th1 yanıtına karşı bir yatkınlık olduğuna işaret edilmiştir.

Khudhur and Alomashi (2018) tarafından yapılan çalışmada, KL'li hastalarda makrofaj aktivasyon yolağında multiple pleiotropik etkiye sahip NRAMP1 (Natural resistance associated macrophage protein 1) gen polimorfizminin IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuar sitokinler üzerine etkisi ile KL enfeksiyonuna karşı duyarlılıktaki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin serum konsantrasyonlarının, KL'li hastalarda önemli derecede yüksek olduğu ve bu sitokinlerin kutanöz lezyonların iyileşmesinde temel rol oynadıkları bildirilmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

---

Schwartz et al. (2018) tarafından yapılan çalışmada, paromomisin antibiyotiği ve insan anti-TNF- $\alpha$  antikorlarının hem ayrı ayrı hemde birlikte kullanılarak deri inflamasyonuna etkileri ve bazı inflamatuvar sitokinlerinin gen ekspresyon seviyelerindeki değişimleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda uygulanan tedavinin KL'li farelerin deri inflamasyonları ile ilgili semptomları azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca tedavi uygulanan farelerde IL-6 ve IL-1 $\beta$ 'nin ekspresyon seviyesinin azalması ile anti-inflamatuvar etkinin dolaylı olarak olduğu bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-17 gibi inflamatuvar markerlerin ekspresyon düzeylerinin KL'li farelere göre tedavi uygulanan farelerde azaldığı da rapor edilmiştir.

De Hippólito et al. (2019) tarafından yapılan çalışmada, Amerikan kutanöz leishmaniasis (ACL)'li hastalarda farklı ekspresyon seviyelerine sahip IFN- $\gamma$  geninin IL-10, IL-27, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  ve IL-6 genlerinin ekspresyon profilleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada düşük ekspresyonlu IFN- $\gamma$  grubunda TNF- $\alpha$  seviyesinin, yüksek ekspresyonlu IFN- $\gamma$  grubuna göre daha yüksek olduğu, IL-6'nın enfekteli tüm gruplarda benzer ancak kontrol grubuna göre yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'nın denge halinde olmasının enfeksiyon ve inflamatuvar sürecin kontrolünde önemli rol oynadığı kanısına varılmıştır.

Dakeel and Yousif (2019) tarafından yapılan ve bazı genlerin mRNA gen ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı çalışmada, KL hastalarında IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-10 sitokinlerinin gen ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttığı ve bu sitokinlerin gen ekspresyon seviyesi noktasında birbirleri ile yakın korelasyon gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda, nitrik oksit üreterek makrofajları aktive etmek ve içlerindeki parazitleri yok etmek için birlikte çalışan IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  arasında önemli ve pozitif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir.

Silva et al. (2019) tarafından yapılan çalışmada, KL enfeksiyonunda fotodinamik tedavinin (PDT) ve 5-aminolevülinik asit (ALA) etkinliğinin makrofaj aktivasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla TNF- $\alpha$ , IL-10, induced nitric oxide synthase (iNOS), arginaz-1 ve hem oksijenaz (Hmox) gibi markır genlerin profili değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda bu genlerden TNF- $\alpha$  ve iNOS'un ekspresyon

## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

---

seviyelerinin PDT uygulanan gruplarda arttığı bildirilmiş ve Th1 tepkisinde ki değişimlerin bu sonuçlara bağlı olarak gerçekleştiği kanaatine varılmıştır.

Silva et al. (2019) tarafından yapılan çalışmada, MBL2 gen varyantlarının MBL serum düzeyleri ve *L. chagasi* etkenli VL oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada hasta ve sağlıklı bireylerin MBL düzeyleri arasında herhangi bir fark olmadığı ve serumdaki MBL düzeylerinin de *L. chagasi* enfeksiyonuna karşı duyarlılığı etkilemediği bildirilmiştir.

Navas et al. (2020) tarafından yapılan çalışmada, KL'li hastalarda tedavi öncesi ve sonrası immün yanıt genlerinin ekspresyon profilleri araştırılmıştır. KL'li hastalarda monosit/makrofaj aktivasyonunda rol oynayan IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin ve T hücrelerinden salgılan IFN- $\gamma$ 'nın artan ekspresyon seviyelerinin tedavi sonrası azaldığı rapor edilmiştir.

Darzi et al. (2021) tarafından yapılan çalışmada, antroponotik KL (*L. tropika* etkenli) ve zoonotik KL (*L. major* etkenli) vakalarının patojenitesinde, proinflamatuvar sitokinlerin etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada, her iki grupta da TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  sitokinlerinin ekspresyon seviyelerinin sağlıklı bireylere göre önemli düzeyde arttığı ve proinflamatuvar sitokinlerden özellikle IL-1 $\beta$  ve IL-8'in antroponotik KL hastalarında daha uzun süreli kalıcı lezyon oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir.

Kalavi et al. (2021) tarafından yapılan çalışmada, *L. major* ile enfekte edilmiş insan makrofaj hücrelerinde erken bağışıklık tepkisi ve inflamatuvar yollardaki gen ekspresyon değişiklikleri araştırılmıştır. Çalışmada patojenlerin pro-inflamatuvar yanıt oluşturduğu ve bu yanıtta görev alan sitokinlerden, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  genlerinin ekspresyon seviyelerinin önemli düzeyde arttığı, IL-2'nin T hücrelerinin çoğalmasında ve hayatta kalmasında rol oynadığı ve IL-15 ile benzer işleve sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca IFN- $\gamma$  ekspresyon seviyesinin, makrofajlar, T hücreleri ve NK hücrelerinin aktive edilmesinden dolayı da arttığı rapor edilmiştir.

Yapılan literatür çalışmalarından da anlaşılacağı üzere leishmaniasis hastalığına karşı konak organizmalar tarafından oluşturulan immün sistem mekanizmaları tam olarak

## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

---

açığa kavuşturulamamıştır. Genel olarak sınırlı sayıda yapılan çalışmalarda gözlenildiği üzere, *Leishmania* türleri konak savunma mekanizmalarını aktive ederek veya baskılayarak konakta etkisini göstermekte ve enfeksiyona karşı konak yanıtı da kontrollü sitokin üretimi ile düzenlenmektedir. *L. major* etkenli KL'li organizmalarda özellikle de enfeksiyon modeli için oldukça uygun olan gerbillerde immun sistem mekanizmaları ile ilgili de literatürde yeterli sayıda çalışmanın olmadığı görülmektedir. Dolayısıyla immün yanıtta kritik rol oynayan sitokinleri ve kompleman sistem yollarını, hastalık patogenezinin ve sonuçlarına doğrudan dahil etmek, her bir kategoride ayrıntılı araştırmalar yapmak, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar yanıtların kapsamlı bir analiziyle birleştirilebilecek genomik ve proteomik çalışmaların gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda tez kapsamında prevelansı Türkiye'de artmakta olan *L. major* etkenli KL'ye karşı oluşacak immün sistem yanıtı ve bu sistemle ilişkili olarak kompleman sistem yollarında görev alan bazı gen ve proteinlerin ekspresyon seviyelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan *Leishmania* izolatları

Çalışmada kullanılan *L. major* izolatları (MHOM/TR/2014/CBCL-LM) Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan Parazit Bankası'ndan temin edildi.

##### 3.1.2. Çalışmada kullanılan deney hayvanları

Çalışmada hayvan materyali olarak kullanılan gerbiller (*M. unguiculatus*), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarı'ndan temin edildi ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AYDIN ADÜ-HADYEK/64583101/2019/055) tarafından kullanılması onaylandı. Temin edilen hayvanlar çalışma kapsamının amacına yönelik Çizelge 3.1.'de gösterildiği şekilde gruplandırıldı.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada oluşturulan deney grupları ve uygulama protokolü

Deney Grupları	Uygulama Protokolü
<b>Kontrol Grubu (K)</b>	Standart pelet yem ve içme suyu <i>ad libitum</i> olarak verildi (n=5)
<b>Negatif Kontrol Grubu (NK)</b>	Standart pelet yem ve içme suyu <i>ad libitum</i> olarak verildi. Sağ arka ayak tabanından 0,2 ml parazit içermeyen RPMI 1640 besiyeri enjekte edildi (n=3)
<b><i>L. major</i> Grubu (LM)</b>	Standart pelet yem ve içme suyu <i>ad libitum</i> olarak verildi. RPMI 1640 besiyerinde çoğalmış <i>L. major</i> ile sağ arka ayak tabanından 0,2 ml ( $1 \times 10^7$ parazit/ml) enjekte edildi (n=7)

#### 3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan cihazlar

<b>Cihaz Adı</b>	<b>Model</b>
+4°C ve -20°C Soğutucu	Panasonic, Pharmaceutical Refrigeratör/MPR-215F-PE
-80°C Derin Dondurucu	Panasonic/MDF-DU300H-PE
Biyogüvenlik Kabini	X Bio, MSC CLASS II
Buz Makinası	ITV, Icemakers/102204
Çeker Ocak	KF/1500
Elektroforez Ünitesi	BioRad, PowerPac Basic/041BR312026
Hassas Terazı	OHAUS/PR224
Homojenizatör	Roche/MagNA Lyser/03358968001
Işık Mikroskobu	Leica
İnkübatör	Panasonic/MIR-154-PE
İnverted Mikroskop	Invitrogen, AMF4300/K0218-155H-0354
Jel Görüntüleme Sistemi	Invitrogen, iBright CL1000/A32747
Manyetik Isıtıcı	Velp scientifica/SA20500061
Mini Santrifüj	HERMLE/Z 130 M
Nanodrop	Thermo Scientific Multiscan SkyHigh/A51119700
Otoklav	Nüve/OT 40L
PCR Cihazı	Applied Biosystems, MiniAmp Plus/A37029
Real Time PCR Cihazı	Applied Biosystems, StepOne Plus™ S/N: 720012158
Soğutmalı Santrifüj	HERMLE/Z 130 M/Z 216 MK/Z 326 K
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiscan SkyHigh/A51119700
Su Banyosu	Nüve
Vorteks	Velp scientifica/F202A0173

#### 3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerleri, kitler, kimyasallar ve çözeltiler

Çalışma kapsamında kullanılan besiyerleri, kitler ve kimyasal maddeler Çizelge 3.3.'te belirtilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Çalışmada kullanılan besiyerleri, kitler, kimyasallar ve çözeltiler

Besiyerleri, Kitler ve Kimyasallar	Marka
1,1,3,3-tetraetoksipropan	Sigma/MFCD00009240
1-Bütanol	Sigma/MFCD00002964
2X PCR Master Mix	Eco-Tech/ET5
5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)	ThermoFisher/22582
5X DNA Loading Dye	Thermo Scientific/R0611
Agaroz	Sigma/A9539-500G
cDNA sentez kiti	Bio-Rad/64391664
Defibrinated Rabbit Blood	HemoStat/DRB030
Di-sodyum hidrojen fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck/ 10028-24-7
DMSO	BioShop/DMS555.500
DNA Ladder	Vivantis-VC 100bp /NL1401
DNA Marker ( $\lambda$ DNA/EcoRI+HindIII)	Thermo Scientific/SM0191
Etanol	Emsure/1.00983.2511
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Sigma/MFCD00003541
Fetal Bovine Serum	Gibco/10500-064
Gentamisin	Sigma/G1272
Giemsa	Merck/1.09204.0500
Ketamin (% 10)	Vetaketamin-Vetagro
Komplement C2 ELISA kiti	ELK Biotechnology/ELK5097
Komplement C3 ELISA kiti	ELK Biotechnology/ELK5254
Ksilazin (%2)	Rompun/81082405
MBL-1 ELISA kiti	ELK Biotechnology/ELK9752
Metafosforik asit	Sigma/MFCD00011351
NNN Modified Medium	Himedia/M681-500G
Nuclease Free Ultra-Pure Water	ClearBand/DW05L
PBS	Bio Basic/PD0435

**Çizelge 3.3. (Devam)**

Penisilin/Streptomisin	Gibco/15140-122
Redükte L-glutasyon (GSH)	Sigma/MFCD00065939
RPMI 1640 Medium 500 ml	Sigma/R8758
Sodyum klorür (NaCl)	Merck/102406
Sodyum sitrat	Sigma/MFCD00150031
SYBR Green kiti	Bio-Rad/64391682
TAE Buffer (50X)	AppliChem-Panreac/A4686,0500
Tissue Genomic DNA izolasyon kiti	Eco-Tech/E1070
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma/MFCD00006674
Total RNA izolasyon kiti	Eco-Tech/2075
Triklorasetik asit (TCA)	Sigma/MFCD00004177

---

#### 3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

##### 3.1.5.1. Moleküler analizler için kullanılan çözeltiler

**1X TAE tamponu:** 20 ml 50X TAE tampon üzerine 980 ml distile su eklenerek hazırlanıldı.

**Agaroz jel (%1,5'lik):** 200 ml 1X TAE tamponu içerisine 3 g agaroz eklenerek hazırlanan çözeltide agaroz çözününceye kadar ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra üzerine 10 µl etidyum bromür (20:1) eklenildi.

##### 3.1.5.2. Biyokimyasal yöntemler için kullanılan çözeltiler

**Çöktürücü Çözelti:** 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA ve 30 g NaCl alınarak, bir miktar distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Fosfat Çözeltisi (0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>):** 53,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek, hacim 1 litreye tamamlandı.

**DTNB (5,5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoik asit), Ellman's çözeltisi):** 40 mg DTNB alındı ve %1' lik sodyum sitrat ile hacim 100 ml' ye tamamlandı.

**Sodyum Sitrat çözeltisi (%1):** 1g sodyum sitrat alınarak hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**Standart GSH Çözeltisi (1 mM=1000 µM):** 15,4 mg GSH distile suda çözüldü ve hacim 50 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti ile 1000-31,25 µM'lık seri dilüsyonlar hazırlandı. 412 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

**Triklorasetik asit Çözeltisi (TCA, %20):** 20 g triklorasetik asit distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

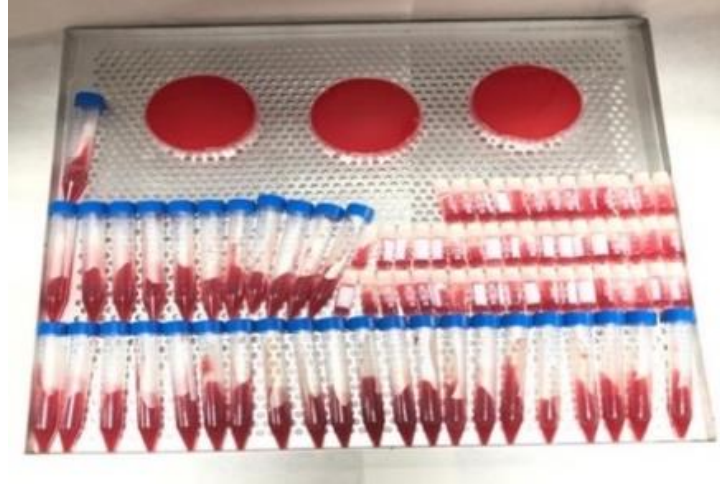
**Tiyobarbütirik asit Çözeltisi (TBA, %0,67):** 1,675 g tiyobarbütirik asit distile suda çözüldü ve hacim 250 ml' ye tamamlandı.

**Standart 1,1,3,3-Tetraetoksipropan Çözeltisi:** 0,494 ml 1,1,3,3-tetraetoksipropan (d: 0,92; %97; MA: 220,3) 100 ml alkolde çözülerek, 20 mmol/L'lik stok standart çözelti hazırlandı. Bundan 0,1 ml alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve 20 mmol/L'lik standart çözelti elde edildi. Bu çözelti ile 2,5-5-10 mmol/L'lik dilüsyonlar hazırlandı ve 535 nm'de köre karşı optik dansiteleri okunarak kalibrasyon eğrisi çizildi.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. NNN besiyerinin hazırlanması (Katı Faz)

NNN Modified Medium Part A (Katı faz) kısmından 6,2 g tartılarak 200 ml distile suya eklenip 500 ml'lik erlen içerisinde karıştırıldı. Karıştırıldıktan sonra erlenin ağzı gazlı bez ve pamukla kapatılarak otoklavda 1,1 atm basınçta 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri yaklaşık 50°C'lik su içerisine alınarak soğutuldu. Yaklaşık 50-55°C'ye kadar soğutulan besiyeri üzerine yaklaşık 15 ml defibrinize tavşan kanı eklenerek üzerine 2 ml penisilin-streptomisin ve 2 ml gentamisin ilave edilip karıştırıldı. Hazırlanan besiyerleri steril tüplere 3-4 ml olacak şekilde aktarıldı. Tüplere aktarılan besiyerleri belli bir eğim oluşturulan zeminde katılaşmaya kadar oda sıcaklığında bekletilip ardından +4°C'de muhafaza edildi (Şekil 3.1.) (Novy and MacNeal 1904; Özbilgin vd 2020).



**Şekil 3.1.** NNN Besiyerleri

#### **3.2.2. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması (Sıvı Faz)**

Hazırlanan NNN besiyerine ilave edilmek üzere, 500 ml RPMI 1640 besiyeri üzerine 50 ml Fetal Bovine Serum (%10, FBS) eklendi. Üzerine 5,5 ml gentamisin (%1,1), 5,5 ml penisilin-streptomisin (%1,1) eklenerek karıştırıldı ve kullanılacağı zamana kadar +4°C’de muhafaza edildi. Hazırlanan stok RPMI 1640 besiyerinden katı faz NNN besiyerinin bulunduğu tüpler üzerine yaklaşık 2-3 ml ilave edilerek çalışmada kullanıldı.

#### **3.2.3. *Leishmania major*'un kültür ortamında çoğaltılması**

Sıvı azotta (-196°C) muhafaza edilen *L. major* promastigotları azot tankından çıkarıldı ve 37°C’lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Çözdürülen izolatların ışık mikroskopu altında canlılık oranları kontrol edildi. Canlılığı tespit edilen promastigotların önceden hazırlanmış NNN+RPMI 1640 besiyerine ekimleri yapılarak 26°C’lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Ekimin yapıldığı günden itibaren 2 günde bir üreme durumları kontrol edildi. Üreyen promastigotların logaritmik faza girmelerini sağlamak için 10. gün, içerisinde 5 ml RPMI 1640 besiyeri bulunan steril bir flask içerisine yaklaşık 0,5-1 ml promastigot eklenerek tekrardan 26°C’lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Üremeleri devam eden promastigotlar çoğaldıkça üzerlerine 2 günde bir yaklaşık 2-3 ml RPMI-1640 eklendi (Şekil 3.2.). 10. ve 18. günler arası Thoma lamında

sayımları yapılarak parazit miktarları takip edildi. Kültür ortamındaki promastigotlar 18. günde  $1 \times 10^7$  parazit/ml'ye ulaştınca hayvan deneyleri için hazır hale getirildi.



**Şekil 3.2.** *Leishmania major*'un RPMI 1640 sıvı besiyerinde üretilmesi

*Thoma lamında parazit sayımı:* Thoma lamının ortasında hacmi  $0.1 \text{ mm}^3$  olan büyük bir kare, bu kare içerisinde de 16 adet orta boy kare bulunmaktadır. Tüm lam 400 küçük kareden oluşmaktadır. Çalışmada, Thoma lamı üzerinde bulunan iki çıkıntı hafifçe ıslatılarak lamın üzeri lamel ile kapatıldı. Promastigotlardan Thoma lamının sayım kamaralarına damlatılarak 40x büyütme ile sayımlar yapıldı. Sayım yapılırken Thoma lamının her köşesinde bulunan toplam dört kare ve orta alandan bir kare içerisinde bulunan promastigotlar sayılarak büyük karedeki ( $0,1 \text{ mm}^3$  hacimdeki) ortalama parazit sayısı hesaplandı. Daha sonra 1 ml' deki promastigot sayısını belirlemek için ise  $0,1 \text{ mm}^3$  hacimdeki promastigot sayısı 10.000 ile çarpıldı.

#### **3.2.4. Kültür ortamında çoğaltılan *Leishmania major* ile gerbillerin enfekte edilmesi**

Gerbillere, enfeksiyon öncesinde 0,025 ml %2'lik Ksilazin ve 0,2 ml %10'luk Ketamin ilaçları ile anestezi işlemi uygulandı (Şekil 3.3.). Anestezi ilaçları gerbillin abdominal bölgesi ile bacağı arasında kalan bölgeden intramüsküler yolla verildi.



**Şekil 3.3.** Anestezi uygulanmış gerbiller

RPMI 1640 besiyerinde çoğalmış parazitlerden gerbilen arka ayak tabanına yaklaşık 0,2 ml ( $1 \times 10^7$  parazit/ml) enjekte edildi (Şekil 3.4.). Çalışma kapsamında yer alan negatif kontrol grubunda bulunan gerbillere ise sağ arka ayak tabanlarından 0,2 ml parazit içermeyen RPMI 1640 besiyeri enjeksiyonu gerçekleştirildi. Parazit enjeksiyon işleminden sonra 16 haftalık enfekte etme süreci boyunca her bir gerbilen kafeslerde tek tek barınması sağlanarak yem ve suları *ad libitum* olarak verildi (Bakırcı vd 2015; Özbilgin vd 2018).



**Şekil 3.4.** Gerbillerin ayak tabanından parazit enjeksiyonu

#### 3.2.5. Enfekte gerbillerden kan ve doku örneklerinin toplanması

Enfeksiyon oluşumu için beklenen 16 haftalık süreç sonunda hayvanların birçoğunda ayak lezyonlarının olduğu gözlemlendi. Bu lezyonların oluşmasının ardından hayvanlara anestezi işlemi uygulanarak her bir lezyondan lam üzerine sürüntü örnekleri alındı ve giemsa ile boyama işlemine tabi tutuldu. Daha sonra hayvanlara ötenazi işlemi uygulanarak biyokimyasal ve hematolojik analizleri yapmak üzere kan örnekleri toplandı. Bu işlemden sonra karaciğer doku örneklerinden sürüntü örnekleri alınarak giemsa ile boyama işlemine tabi tutuldu. Daha sonra her bir hayvanın ayak lezyonundan ve karaciğer dokularından steril koşullarda birer küçük parça alınarak NNN besiyerlerine ekimleri yapıldı. *L. major*, KL etkeni olmakla beraber bazen iç organlara da göç etme ihtimali olması nedeniyle çalışmada karaciğer dokularından alınan doku parçalarının da NNN besiyerlerine ekimi yapıldı. Kalan doku örnekleri hayvandan alınır alınmaz azot içerisinde dondurularak paketlenildi ve kan serumları ile moleküler ve biyokimyasal analizlerin yapılacağı güne kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.



**Şekil 3.5.** Kan ve doku örnekleri alınmak üzere sakrifiye edilmiş gerbil

*Giemsa ile boyama:* Sürüntü örnekleri alınan preparatlar kurutularak metanol ile 2 dk tespit edildi. Metanol kuruduktan sonra pastör pipet yardımıyla lamın üzerini kaplayacak şekilde giemsa boyası dökülerek 25-30 dk bekletildi ve süre sonunda distile suyla yıkanarak kurutuldu. İncelemeye hazır hale gelen preparatlar immersiyon yağı damlatılarak 100x büyütme ile mikroskop altında incelendi (Özbilgin vd 2020).

#### 3.2.6. Moleküler analizler ve gen ekspresyon çalışmaları

##### 3.2.6.1. DNA izolasyonu

Enfeksiyon süreci tamamlandıktan sonra (16 hafta) çalışmaya dahil edilen tüm gerbillerden alınan karaciğer dokularından DNA izolasyonları yapıldı. DNA izolasyon işlemi üretici firmanın önermiş olduğu protokol basamaklarına göre hazır ticari kit (EcoTech Tissue Genomic DNA kiti, Cat No: E1070) kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen tüm DNA'ların konsantrasyonları Nanodropta ölçüldü ve DNA'lar %1,5'lik agaroz jelde (20:1 oranında etidyum bromür içeren) 50 dakika boyunca 90V'de yürütme işlemi yapılarak UV görüntüleme cihazında değerlendirildi. Yapılan yürütme işleminde 1xTAE buffer, kontrol amacıyla DNA marker ( $\lambda$  DNA/EcoRI+HindIII) ve örneklerin jele yüklenmesinde 5x yükleme boyası kullanıldı.

##### 3.2.6.2. Konvansiyonel PCR ile parazitlerin tespiti

DNA izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra karaciğer dokularında parazitin varlığını kontrol etmek amacıyla *Leishmania* spp.'nin Internal Transcribed Spacer 1 "ITS1" gen bölgesi için tasarlanmış primerler (Forward (F) 5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3', Reverse (R) 5'-GAA GCC AAG TCA TCC ATC GC-3') kullanılarak PCR işlemi yapıldı (Bakırcı vd 2015). PCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.4.'de, PCR reaksiyon koşulları ise Çizelge 3.5.'te belirtildi.

**Çizelge 3.4.** PCR reaksiyon karışımı

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar (<math>\mu</math>l)</b>
2X PCR Master Mix	12,5 $\mu$ l
Forward primer	1 $\mu$ l
Reverse primer	1 $\mu$ l
Ultra Pure dH <sub>2</sub> O	9,5 $\mu$ l
Template DNA	1 $\mu$ l
<b>Toplam Hacim</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

**Çizelge 3.5.** PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (sn/dk)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94	4 dk	-
Denatürasyon	94	40 sn	} 40
Bağlanma	53	30 sn	
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	10 dk	-

PCR ürünlerinin konsantrasyonları Nanodropta ölçüldü ve PCR ürünleri 20:1 oranında etidyum bromür içeren %1,5'lik agaroz jelde 50 dakika boyunca 90V'de yürütüldü. Yürütme işleminde kontrol amaçlı 100 bp DNA ladder kullanıldı ve 5X yükleme boyası ile örnekler jele yüklenerek UV görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

#### 3.2.6.3. Total RNA izolasyonu

Çalışmada yer alan tüm gerbillerin karaciğer dokularından total RNA izolasyon işlemi üretici firmanın önermiş olduğu protokol basamaklarına göre hazır ticari kit (Eco-Tech Total RNA kiti, Cat. No: E2075) kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların Nanodrop cihazında konsantrasyon ölçümleri yapılarak cDNA kütüphaneleri oluşturuldu.

#### 3.2.6.4. cDNA kütüphanelerinin hazırlanması ve RT-PCR reaksiyonu

Çalışmada izole edilen RNA'lardan cDNA kütüphaneleri oluşturmak için hazır ticari kit (Bio-Rad iScript cDNA sentez kiti, Cat. No: #1708891) kullanıldı ve üretici firmanın önermiş olduğu protokol basamaklarına göre çalışmalar gerçekleştirildi. cDNA kütüphanesinin oluşturulması için, RNA konsantrasyonları belirlenen örneklerin tamamı normalize edildi ve elde edilen cDNA konsantrasyonları eşitlendi. cDNA sentezi için oluşturulan RT-PCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.6.'da, reaksiyon koşulları ise Çizelge 3.7.'de verildi.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

**Çizelge 3.6.** RT-PCR reaksiyon karışımı

Reaktif	Miktar (µl)
5X iScript Reaksiyon Mix	4 µl
iScript Reverse Transkriptaz	1 µl
Nükleaz-Free Water	5 µl
RNA örneği	10 µl
<b>Total Reaksiyon Hacmi</b>	<b>20 µl</b>

**Çizelge 3.7.** RT-PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Priming	25	5
Reverse Transkriptaz	46	20
RT inaktivasyonu	95	1
Opsiyonel adım	4	∞

Reaksiyon sonucunda oluşturulan cDNA örnekleri qPCR reaksiyonlarında kullanılmaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

#### 3.2.6.5. Real Time-PCR (qPCR)

Gen ekspresyon çalışmaları için hazır ticari kit (Bio-Rad SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix, Cat. No: #1725271) kullanıldı ve üretici firmanın önermiş olduğu protokol basamaklarına göre çalışmalar gerçekleştirildi. Her örnek 3 tekrarlı çalışıldı ve gerçekleştirilen her reaksiyonun ardından, Melt Curve eğrileri de analiz edilerek, elde edilen PCR ürünlerinin doğruluğu teyit edildi. Reaksiyonlarda kullanılan her bir örneğin normalizasyonu için  $\beta$ -actin primerleri kullanıldı. Reaksiyonlar sonunda elde edilen Ct değerleri kullanılarak katlanma değerleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) hesaplandı ve hesaplanan katlanma değerleri uygun istatistiksel testler ile analiz edildi. Reaksiyonda kullanılan Forward ve Reverse primer setleri, gerbil (*M. unguiculatus*) türünün NCBI veritabanında bulunan gen sekansları referans alınarak, Geneious R9.1.8 yazılımında Primer3 2.3.4 aracı kullanılarak tasarlandı. Kullanılan gen bölgelerinin bilgileri Çizelge 3.8’de, qPCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.9.’da, reaksiyon koşulları ise Çizelge 3.10.’da verildi.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

**Çizelge 3.8.** Gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler ve dizi bilgileri

Genler	Forward (F) - Reverse (R)	Bp/Tm(°C)	Referanslar
<b>β-actin</b>	F: 5'-CTGGTCGTACCACTGGCATT-3'	234bp/60°C	XM_0216529
	R: 5'-AGTCCAGGGCAACATAGCAC-3'		73
<b>IL-1β</b>	F: 5'-CTGAAAGCTCTCCACCTC-3'	296bp/60°C	AB164705.1
	R: 5'-GTGCTGATGTACCAGTTGG-3'		
<b>IL-2</b>	F: 5'-CTTGGACCTCTGCATGATGTG-3'	230bp/60°C	XM_0216322
	R: 5'-GCACGCGTTATTGAGTCAT-3'		88.1
<b>IL-6</b>	F: 5'-CTCCGCAAGTAAGTGAAGGC-3'	162bp/60°C	AY570509.1
	R: 5'-GTGAAGGGAAGGCAAAGCAG-3'		
<b>IFN-γ</b>	F: 5'-ATGTCTTGAGGAAGTGGCAA-3'	282bp/57°C	XM_0216583
	R: 5'-TGACTCTGGGTGACAGATGGCCCA-3'		85.1
<b>TNF-α</b>	F: 5'-GCTCCCCCAGAAGTCGGCG-3'	254bp/60°C	XM_0216559
	R: 5'-CTTGGTGGTTGGGTACGACA-3'		00.1
<b>MBL-1</b>	F: 5'-AATCAGAACTGGAGCACACC-3'	303bp/60°C	XM_0216577
	R: 5'-CATGGTCATTGGGCTCGTC-3'		87.1
<b>MBL-2</b>	F: 5'-GTTCTCCAGGCCTGAATGG-3'	79bp/60°C	XM_0216478
	R: 5'-CTTGACCTGGTTCTCCCTTTT-3'		96.1
<b>C2</b>	F: 5'-AATTCACCCTCAGCCATGG-3'	280bp/60°C	XM_0216559
	R: 5'-CATGCTCACACTCGAAGCTC-3'		02.1
<b>C3</b>	F: 5'-GAGCCCCATGTACTCCATCA-3'	124bp/60°C	XM_0216318
	R: 5'-TGGGAAGTTATGCACGGAGA-3'		21.1

**Çizelge 3.9.** qPCR reaksiyon karışımı

Reaktif	Miktar (µl)
SYBR Green Supermix	5 µl
Reverse Primer	1 µl
Forward Primer	1 µl
Nükleaz-Free Water	2 µl
cDNA örneği	1 µl
<b>Total Reaksiyon Hacmi</b>	<b>10 µl</b>

**Çizelge 3.10.** qPCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (sn/dk)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	30 sn	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	} 40
Bağlanma-Uzama*	60°C	1 dk	
Melting Curve	95°C-60°C	-	1

\*Yalnızca IFN- $\gamma$  için bağlanma-uzama sıcaklığı 57°C'de çalışılmıştır.

#### 3.2.7. MBL-1, C2 ve C3 protein ekspresyonlarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi

Çalışma kapsamında oluşturulan tüm deney gruplarında yer alan gerbillerin karaciğer dokularında MBL-1, C2 ve C3 proteinlerinin seviyelerini belirlemek için ticari ELISA kitleri (MBL-1: ELK9752, C2: ELK5097, C3: ELK5254) kullanılarak üretici firmanın önermiş olduğu protokol basamaklarına göre çalışmalar gerçekleştirildi. Gerbillerden alınan karaciğer doku örneklerinden 100 mg tartılarak içerisinde 900  $\mu$ l soğuk fosfat tamponu (PBS, +4°C) bulunan eppendorf tüplere aktarıldı. Boncuklu homojenizatörde homojenize edildi. Homojenizasyon süresince örneklerin ısınmasının engellenmesi için her örnek belirli aralıklarla buz içerisinde soğutuldu. Elde edilen süspansiyon, ultrasonik hücre bozucu prob yardımı ile çözelti berraklaşana kadar sonikasyona tabi tutuldu. Sonikasyon işleminden sonra örnekler +4°C'de ve 10000xg'de 5 dakika santrüfjü edildi. Oluşan süpernatantlar yeni eppendorf tüplerine aktarılarak 3 set aligot oluşturuldu. Her bir numunenin total protein miktarı Bradford yöntemiyle (*ClearBand* Bradford Reagent) tespit edilerek normalize edildi ve analiz aşamasına geçildi.

#### 3.2.8. Biyokimyasal analizler

##### 3.2.8.1. Doku homojenizasyonu

Çalışma kapsamında oluşturulan tüm deney gruplarında yer alan hayvanların kan ve karaciğer dokularından örnekler alınarak oksidan ve antioksidan parametreler (GSH ve MDA) çalışıldı. Bu amaçla, hayvanlardan alınan karaciğer dokusundan 0,1 g tartılarak eppendorf tüplere alındı ve üzerlerine 1ml PBS eklendi. Boncuklu homojenizatörde 30

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

saniye boyunca homojenize edilerek 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve oluşan süpernatantlar başka eppendorflara aktarılarak analizler yapılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

#### 3.2.8.2. Glutatyon (GSH) düzeylerinin belirlenmesi

GSH analizleri için kör, standart ve numune tüpleri hazırlandı. Bu amaçla ilk olarak kör tüpüne 2 ml distile su ve 3 ml çöktürücü çözelti eklendi. Standart tüpe 200 µl standart GSH çözeltisi, numune tüpüne 200 µl örnek konulduktan sonra her iki tüpe 1,8 ml distile su ve 3 ml çöktürücü eklendi. Hazırlanan karışımlar buzlu suda 5 dakika bekletildikten sonra 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek üst fazdan yeni tüplere 2 ml aktarıldı. Aktarılan süpernatantların üzerine 8 ml fosfat çözeltisi ve 1 ml DTNB eklendikten sonra 412 nm'de UV spektrofotometrede ölçümleri yapıldı ve sonuçlar µmol/g doku olarak hesaplandı (Çizelge 3.11.) (Beutler et al. 1963).

**Çizelge 3.11.** GSH tayini

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
<b>Numune</b>	-	-	200 µl
<b>Standart</b>		200 µl	-
<b>Distile Su</b>	2 ml	1,8 ml	1,8 ml
<b>Çöktürücü Çözelti</b>	3 ml	3 ml	3 ml
Buzlu suda 5 dakika bekletildi. Ardından 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve başka tüplere süpernatantdan 2 ml aktarıldı.			
<b>Fosfat Çözeltisi</b>	8 ml	8 ml	8 ml
Karıştırıldı			
<b>DTNB</b>	1 ml	1 ml	1 ml
412 nm'de tüplerin optik dansitleri köre karşı okundu.			

#### 3.2.8.3. Malondialdehit (MDA) düzeylerinin belirlenmesi

MDA analizi için vida kapaklı cam tüplere homojenize edilmiş kan serumu ve karaciğer numunelerinden 500 µl alınarak üzerine %20'lik 2,5 ml TCA eklenip

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

karıştırıldı. Karışımın üzerine %0,67'lik 1 ml TBA eklenildi. Kör tüpü, 3 ml TCA ve 1 ml TBA ile hazırlanıldı. Tüpler sıkıca kapatılarak 90°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra su altında soğutuldu. Reaksiyon tüplerine 1-butanol ilave edilerek 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan tabaka ayrılarak 535 nm'de UV spektrofotometrede ölçümleri yapıldı ve sonuçlar  $\mu\text{mol/g}$  doku olarak hesaplandı. Çalışmalarda standart olarak 1,1,3,3- tetraetoksipropan kullanıldı (Çizelge 3.12.) (Yoshioko et al. 1979).

#### 3.2.8.4. Hematolojik analizler

Gerbillere ötenazi işlemi uygulanırken alınan kan örneklerinden 1 ml antikoagülanlı tüplere konuldu ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalında bulunan otoanalizörde hücre sayımları yapıldı.

Çizelge 3.12. MDA tayini

	Kör	Test
Numune	-	500 $\mu\text{l}$
TCA	3 ml	2.5 ml
TBA	1 ml	1 ml
90°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra tüpler su altında soğutuldu.		
1-Bütanol	4 ml	4 ml
3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi		
Oluşan tabaka ayrılarak 535 nm'de köre karşı optik dansiteler okundu.		

#### 3.2.9. İstatistiksel analizler

Elde edilen veriler IBM SPSS 26 yazılımına aktararak veri setleri oluşturuldu. Oluşturulan veri setine öncelikle Shapiro-Wilk normallik testi uygulandı ve verilerin normal dağılıma uyup uymadıklarına bakıldı. Normal dağılıma uyan (parametrik) verilere One-Way ANOVA testi uygulanarak istatistiksel farklılıkların bulunduğu tüm gruplara, Levene homojenite testi uygulandı ve elde edilen önemlilik değerlikleri doğrultusunda uygun PostHoc ikili karşılaştırma testleri gerçekleştirildi (LSD veya Games-Howell).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

Normal dağılıma uymayan (non-parametrik) verilerde ise gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde Mann-Whitney testi uygulandı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak belirtildi ve yapılan tüm istatistiksel analizlerde  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Gerbillerde Kutanöz Leishmaniasis Modelinin Oluşumu

Çalışma kapsamında hayvan materyali olarak kullanılan gerbillerde KL modelinin oluşturulması, literatürde oldukça sık uygulanan *L. major* promastigotlarının gerbillerin arka ayak tabanlarından subkutanöz enjeksiyon işlemi ile gerçekleştirildi. Enjeksiyon işleminden 3 hafta sonra birkaç gerbilde, 16 haftanın sonunda ise gerbillerin tamamında ayak bölgesinde lezyonlar görüldü (Şekil 4.1.).



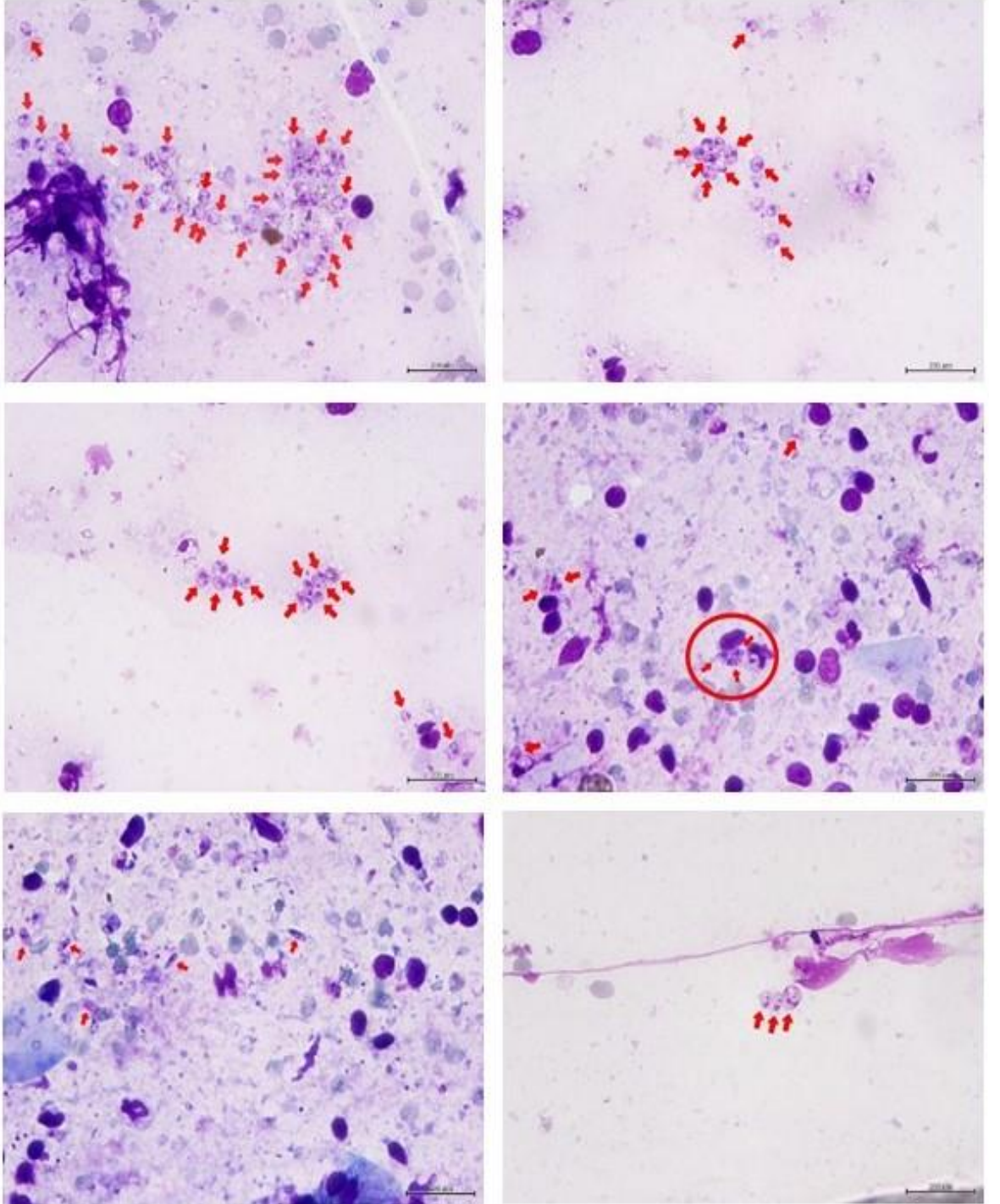
Şekil 4.1. Kutanöz leishmaniasisli hayvan modellerine ait ayak lezyon görüntüleri

### 4.2. Gerbillerde Oluşan Lezyonların Mikroskopik İnceleme Sonuçları

Enfekte edilen gerbillerde görülen lezyon bölgeleri %70'lik alkol ile temizlenip kurutulduktan sonra enfeksiyon bölgesi ile sağlam dokunun birleştiği alandan lanset yardımıyla seröz sıvı alındı ve yayma preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar metanol ile tespit edilerek Giemsa boya çözeltisi ile boyandı. Işık mikroskop altında incelenen preparatlarda saptanan bazı *L. major* amastigotlarının görüntüsü Şekil 4.2.'de

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

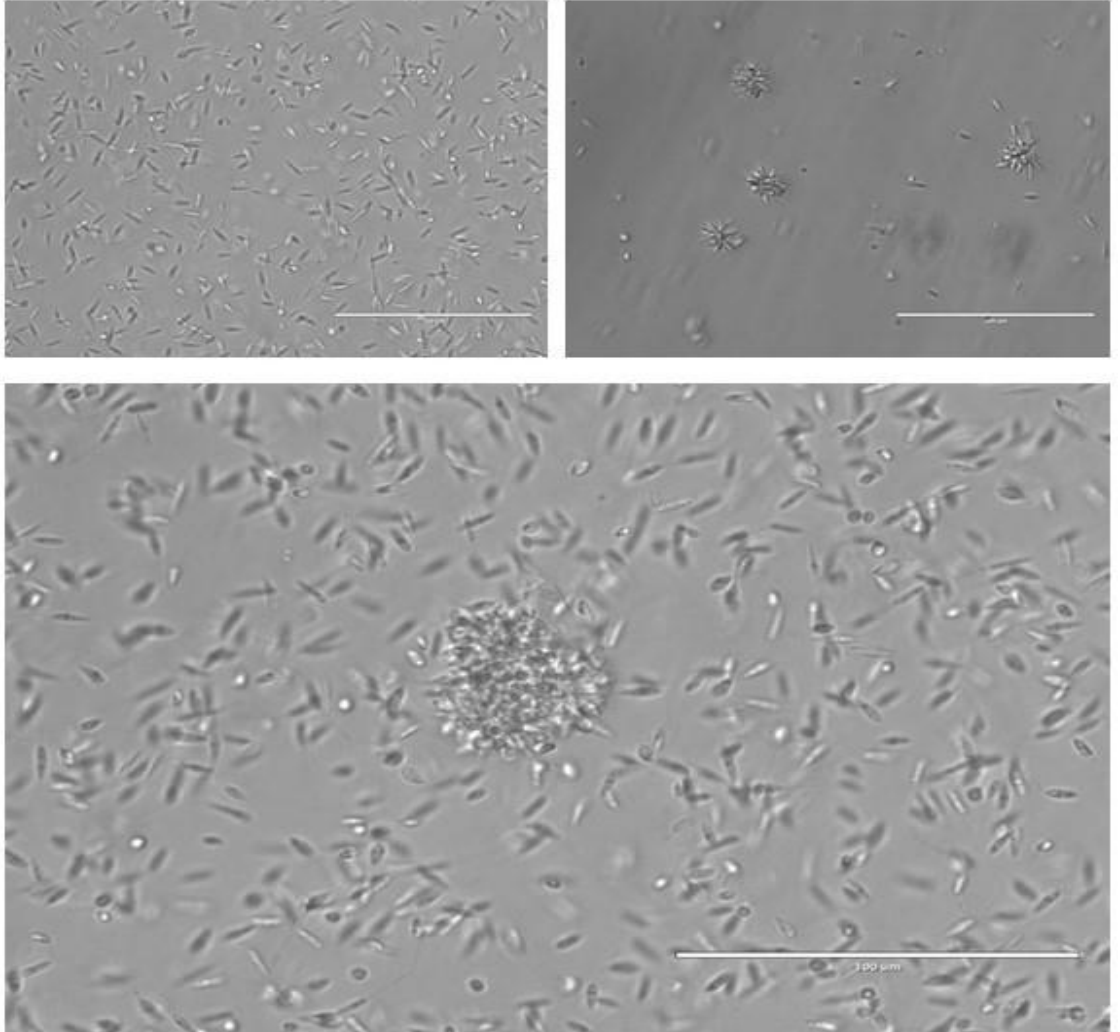
gösterilmiştir. Çalışmada alınan karaciğer doku örneklerinden hazırlanan prepatlarda ise herhangi bir amastigot varlığına rastlanılmadı.



**Şekil 4.2.** *Leishmania major* amastigotlarının görüntüleri (x1000) (Kalibrasyon barı=100µm).

### 4.3. Ekimi Yapılan Doku Örneklerinin Kültür Ortamında Üreme Sonuçları

Gerbillere ötenazi işlemi uygulandıktan sonra havyanların ayak lezyon ve karaciğerinden alınan doku örneklerinde parazitlerin varlığını araştırmak amacıyla aseptik koşullarda NNN besiyerinin sıvı fazına (RPMI 1640 kısmına) ekimler yapıldı. Hayvanların ayak lezyonlarından alınan örneklerde, besiyerlerinin tamamında ekimden 6 gün sonra promastigot varlığına rastlanıldı (Şekil 4.3.). Karaciğer dokularından alınan örneklerde ise üreme olup olmadığını tespit etmek amacıyla 5-6 hafta boyunca besiyerleri inverted mikroskopta günlük olarak takip edildi ve NNN besi yerine ekimi yapılan karaciğer dokularında herhangi bir üreme görülmedi. Bu durum *L. major*'un viseralize olmadığını gösterir nitelikte değerlendirildi.

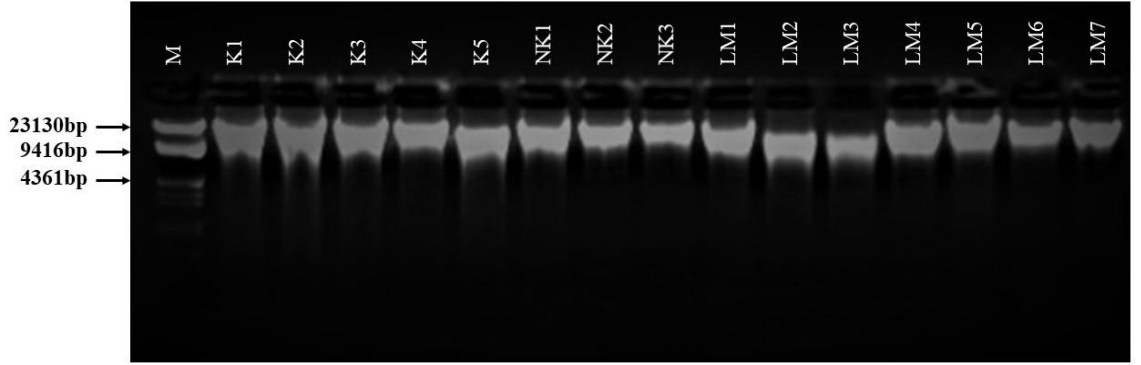


**Şekil 4.3.** Ekim yapılan besiyerlerindeki *Leishmania major* promastigotlarının görüntüleri (x400) (Kalibrasyon barı=100µm).

#### 4.4. Moleküler Analiz ve Gen Ekspresyon Çalışmalarının Sonuçları

##### 4.4.1. Genomik DNA izolasyon sonuçları

Gerbillerin karaciğer dokularından yapılan total DNA izolasyonu sonucunda, izolasyon işleminin başarılı olup olmadığını görmek amacıyla izole edilen DNA'lar agaroz jelde yürütülerek UV görüntüleme cihazında görüntülendi. Yapılan elektroforez sonucunda genomik DNA'ların tamamının izole edildiği belirlendi ve izole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü Şekil 4.4.'de konsantrasyonları ise Çizelge 4.1.'de gösterildi.



(M: Marker (Lambda DNA/HindIII Marker), K: Kontrol Grubu, NK: Negatif Kontrol Grubu, LM: *L. major* Grubu)

Şekil 4.4. İzole edilmiş genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü

Çizelge 4.1. DNA konsantrasyon değerleri

Genomik DNA İzolatları	DNA Konsantrasyonu (ng/µl)
K1	189,5
K2	186
K3	174
K4	172,5
K5	175
NK1	133,5
NK2	112
NK3	109,5
LM1	105,5
LM2	121

**Çizelge 4.1.** (Devam)

LM3	113
LM4	170
LM5	163,5
LM6	113
LM7	140

#### 4.4.2. Konvansiyonel PCR sonuçları

*Leishmania major*, KL etkeni olmasına rağmen bazı durumlarda iç organlara göç etme ihtimali de göz önünde bulundurularak PCR işlemine tabi tutuldu. DNA izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra KL etkenlerine spesifik ITS bölgeleri hedef alınarak gerçekleştirilen tekrarlı PCR reaksiyonları sonucunda *L. major*'un karaciğer dokusuna ulaşmadığı tespit edildi (Şekil 4.5.) Yapılan PCR sonucunda parazitin karaciğer dokularına viseralize olmadığı gözlenildi ve yapılan besiyeri kültürü ve mikroskopik inceleme teknikleri ile de desteklenildi.



(M: Marker 100bp, K: Kontrol Grubu, NK: Negatif Kontrol Grubu, LM: *L. major* Grubu, N: PCR Negatif Kontrol, P: PCR Pozitif Kontrol)

**Şekil 4.5.** Konvansiyonel PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü

#### 4.4.3. Total RNA izolasyon sonuçları

Çalışmada oluşturulan tüm deney gruplarında yer alan hayvanlardan alınan örneklerden total RNA izolasyon işlemi üretici firmanın önermiş olduğu protokol basamaklarına göre gerçekleştirildi ve izole edilen RNA konsantrasyonları Çizelge 4.2.'de verildi.

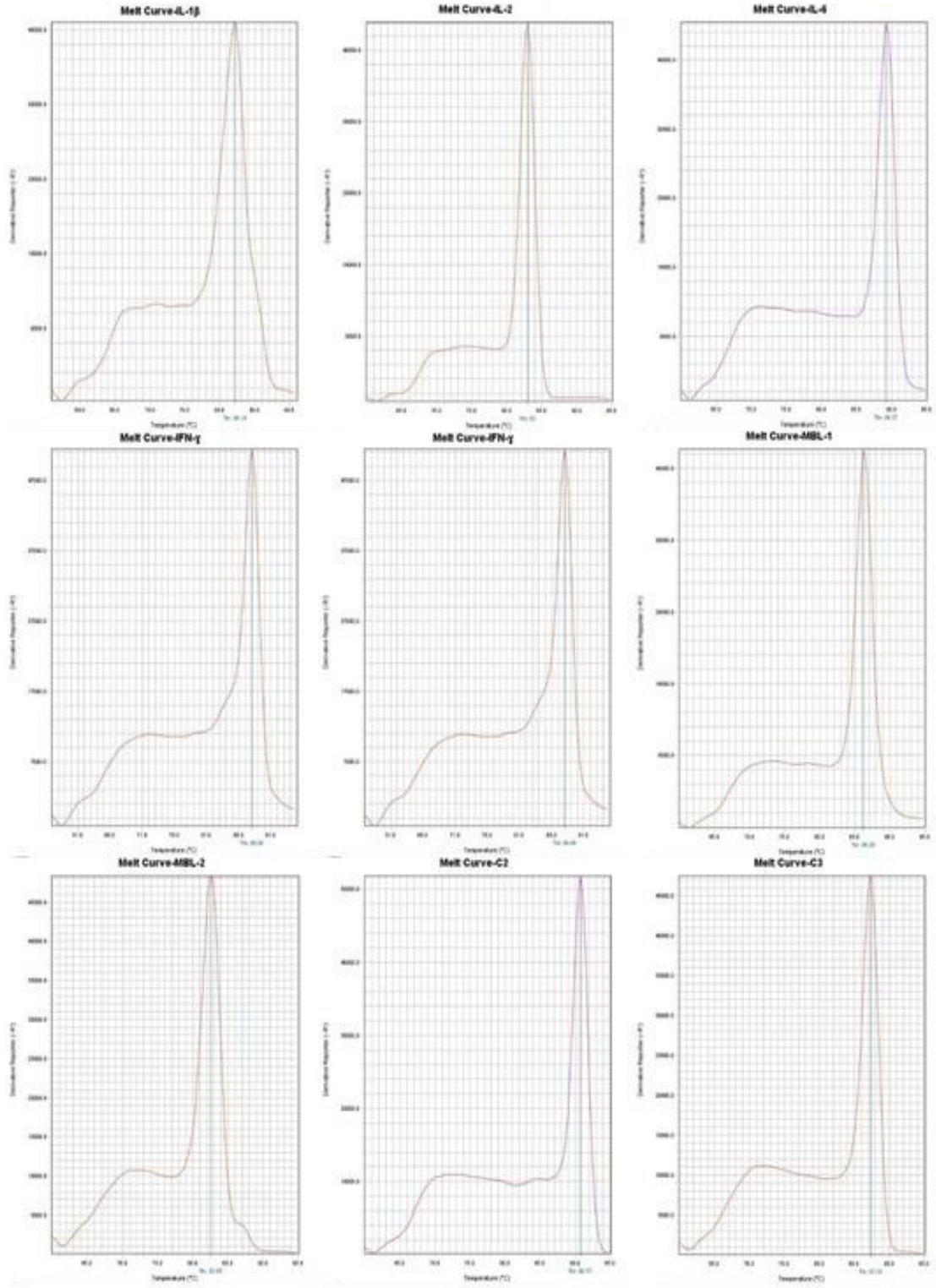
**Çizelge 4.2.** İzole edilen RNA konsantrasyonları

RNA İzolasyonu	RNA Konsantrasyonu (ng/μl)
K1	282,2
K2	196,0
K3	755,0
K4	172,0
K5	287,7
NK1	197,7
NK2	454,0
NK3	386,7
LM1	180,5
LM2	408,5
LM3	884,0
LM4	507,3
LM5	428,0
LM6	683,0
LM7	387,0

#### 4.4.4. cDNA sentezi ve qPCR ile gen ekspresyon çalışmaları

İzole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyonları belirlendikten sonra qPCR sonuçlarının doğruluğu için RNA'lar normalize edildi ve üretici firmanın kit için önerdiği protokol basamaklarına göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MBL-1, MBL-2, C-2 ve C-3 genlerine ait spesifik primerler ile qPCR'da amplifiye edildi. Her bir genin normalizasyonu için  $\beta$ -actin primerleri kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen Ct değerleri kullanılarak katlanma değerleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) hesaplandı. Kurulan her reaksiyonun ardından, her bir genin Melt Curve eğrileri de analiz edilerek, elde edilen PCR ürünlerinin doğruluğu teyit edildi (Şekil 4.6.).

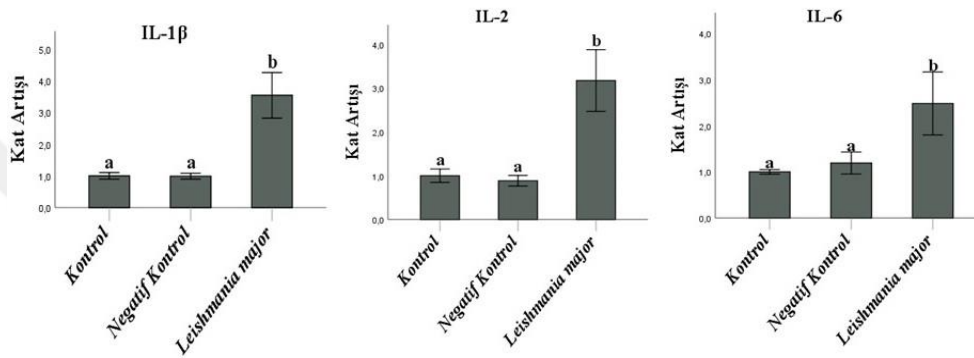
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.6. Melt Curve eğrileri

## 4.4.5. qPCR ile gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler

Tez çalışması kapsamında IL-1 $\beta$ , IL-2 ve IL-6 genlerinin, Kontrol, Negatif Kontrol ve *L. major* grupları arasında mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Yapılan incelemelerde, *L. major* grubunda IL-1 $\beta$ , IL-2 ve IL-6 gen ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı ve her üç genin de kontrol grupları arasında herhangi bir fark görülmediği tespit edilmiştir (IL-1 $\beta$  için  $p<0,001$ ; IL-2 için  $p<0,01$ ; IL-6 için  $p<0,05$ ).



(IL-1 $\beta$ : One-Way ANOVA  $p<0.001$ . PostHoc (Games-Howell) <sup>ab</sup> $p<0,001$ )

(IL-2: One-Way ANOVA  $p<0.001$ . PostHoc (Games-Howell) <sup>ab</sup> $p<0,01$ )

(IL-6: One-Way ANOVA  $p<0.01$ . PostHoc (Games-Howell) <sup>ab</sup> $p<0,05$ )

**Şekil 4.7.** IL-1 $\beta$ , IL-2 ve IL-6 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait qPCR sonuçları.

Genel olarak, leishmaniasis ile ilgili bağışıklık mekanizmaları karmaşık olup, bazı sitokinlerin kesin rolü belirsizliğini sürdürmektedir. Hücreler arası sinyal alışverişinde kritik rol oynayan sitokinler leishmaniasis'e karşı bir immünolojik reaksiyon sırasında sinerjistik veya antagonistik etkilerinden dolayı immün yanıtın yönünü değiştirebilmektedir (Maspi et al. 2016). Bağışıklık tepkisinin bir göstergesi olarak da bilinen sitokinlerin ekspresyon düzeyleri, patojen türüne, virülans faktörlere ve ayrıca konağın genetik geçmişine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. *L. major*'a karşı konak organizmada geliştirilen bağışıklık tepkisi, enfeksiyonun vücuda girdiği andan itibaren başlamakta ve enfeksiyon süresi boyunca devam etmektedir. Bu süreçte *L. major* hayatta kalabilmek için konak savunma mekanizmalarını kendi lehine çevirebilmekte ve hedef hücre olan makrofajları kendisi için güvenli bir ortama dönüştürme eğilimi taşımaktadır. Bu süreçte *Leishmania* enfeksiyonuna karşı konak organizmada oluşacak

bağışıklık mekanizmaları, Th1/Th2 dengesine bağlı olarak direnç ya da duyarlılık ile sonuçlanabilecek karmaşık bir dizi yanıt oluşturabilmektedir. *Leishmania* enfeksiyonları bağışıklık sistemi hücreleri içerisinde çoğalabildiğinden konak hücrenin koruyucu immünesinde özellikle T hücrelerinin önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Alexander et al. 1999). Konak tarafından belirlenen T hücre aktivitesi, sitokin sekresyonu ve *Leishmania* türleri arasındaki etkileşim konakta hangi tür yanıtın gelişeceğini belirlemektedir. Konağın enfeksiyonu kontrol etme yeteneği, hücre içi parazitleri ortadan kaldırmak için konak makrofajlarını aktive edebilen hücre aracılı bağışıklık tepkilerinin oluşmasını gerektirmektedir (Rosas et al. 2005). Ancak enfekte olmuş konakçı hücrelerdeki birçok sitokin ekspresyonu bu patojenler tarafından değiştirilebilmektedir. Bu amaçla leishmaniasis'te pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin değişiklikleri ile ilgili literatürde birçok çalışma yer almaktadır (Ewunetu et al. 2015; Maspi et al. 2016). Bu bağlamda yürütülen tez çalışmasında da leishmaniasis ile ilişkili olduğu düşünülen sitokin parametreleri çalışılarak sonuçları değerlendirilmiştir.

*Leishmania* enfeksiyonlarında, makrofajlar tarafından da salgılanan ve TNF- $\alpha$ 'nın alarm sitokini olarak görev yaptığı bilinen önemli pro-inflamatuar sitokin IL-1'in koruyucu veya patojenik etkileri önem arz etmektedir (Auron 1998; Mantovani et al. 1998; Stylianou and Saklatvala 1998; Apte and Voronov 2008; Charmoy et al. 2016). Kostka et al. (2006) tarafından yapılan çalışmada, *L. major* ile enfekte C57BL/6 farelerde IL-1 $\beta$ 'nin Th1 yanıtını desteklediği ve böylelikle enfeksiyona karşı koruyucu etkisinin olduğu aynı zamanda IL-1 $\alpha$  ile de Th2 yanıtının uyarıldığı bildirilmiştir. Ayrıca Kalavi et al. (2021) tarafından yapılan çalışmada, *L. major* ile enfekte makrofaj hücrelerinde pro-inflamatuar yanıtın olduğu ve bu yanıtta görev alan sitokinlerden birinin de IL-1 $\beta$  olduğu belirtilmiştir. Bu kapsamda tez çalışmasında *L. major* ile enfekte edilmiş gerbillerde pro-inflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$  geninin ekspresyon seviyesinin kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı tespit edilmiş olup, söz konusu sitokin TNF- $\alpha$  üretimini de uyardığı göz önüne alınarak gerbillerde Th1 yanıtının indüklenmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda elde edilen bulgular literatürdeki çalışmaları destekler nitelikte değerlendirilmektedir (Kostka et al. 2006; Kalavi et al. 2021).

Tez çalışması kapsamında ekspresyon seviyesi araştırılan bir diğer pro-inflamatuar sitokin olan IL-2'nin, CD4<sup>+</sup>T hücreleri başta olmak üzere CD8<sup>+</sup>T, NK ve

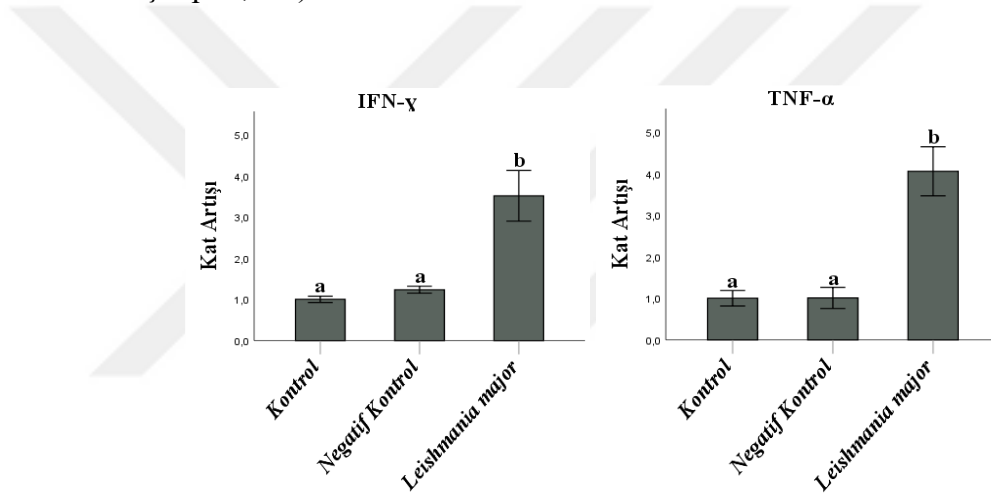
NKT hücreleri tarafından sentezlenen bir büyüme faktörü olduğu bilinmektedir (Malek 2008). IL-2'nin genellikle IFN- $\gamma$  ile birlikte KL'de Th1 yanıtını uyarması sonucunda makrofajları aktive ederek enfeksiyona karşı koruyucu rol üstlendiği bildirilmiştir (Alexander et al. 1999; Wang and Mosmann 2001; Goyonlo et al. 2014; Oliveira et al. 2015). Kalavi et al. (2021) tarafından yapılan çalışmada da, *L. major* ile enfekte makrofaj hücrelerinde IL-2 üretiminin adaptif immünitenin ana bileşiklerinden olan T hücrelerinin çoğalmasında ve hayatta kalmasında rol oynadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte IL-4 üretimi vasıtasıyla IL-2'nin, Th2 yanıtını uyardığı da bilinmektedir (Le Gros 1990). Bu bağlamda IL-2'nin KL'e karşı hem duyarlılığı hem de direnci arttırdığı sonucuna varılabilmektedir (Maspi et al. 2016). Tez çalışması kapsamında *L. major* ile enfekte edilen gerbillerde IL-2 gen ekspresyon seviyesinin kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı tespit edilmiş olup, literatürdeki verilerle uyumludur (Alexander et al. 1999; Wang and Mosmann 2001; Goyonlo et al. 2014; Oliveira et al. 2015; Kalavi et al. 2021). Ayrıca çalışma kapsamında incelenen diğer pro-inflamatuar sitokinlerin artışı ile beraber artan IL-2 seviyelerinin de KL'li gerbillerde Th1'i tetiklediği ve böylelikle immün yanıtta koruyucu rol üstlenildiği düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında araştırılan bir diğer sitokin IL-6, hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar sitokin olarak işlev gören pleiotropik bir sitokin olup, B hücresi büyüme faktörü olarak da bilinmektedir (Titus et al. 2001; Scheller et al. 2011). IL-6 makrofajlar, endotelial hücreler ve T hücreleri gibi çeşitli hücreler tarafından salgılanmaktadır (Scheller et al. 2011). Literatürde yapılan *in vivo* deneylerde, KL enfeksiyonlarında IL-6'nın, Th2 yanıtını desteklediği ve dolayısıyla duyarlılık faktörü olarak değerlendirildiği bilinmektedir (Moskowitz et al. 1997; Saha et al. 1999; Maspi et al. 2016). Ancak sanılanın aksine Titus et al. (2001), tarafından yapılan çalışmada, *L. major* ile enfekteli ve IL-6 eksikliği olan BALB/c farelerde hem Th1 hem de Th2 sitokinlerinin üretiminin azaldığı ve genel olarak pro-inflamatuar sitokin olarak bilinen IL-6'nın KL'de anti-inflamatuar sitokin olarak da görev yaptığını ve böylelikle de Th1 ve Th2 yanıtında IL-6'nın değerlendirilemeyeceği bildirilmiştir. Yapılan tez çalışması kapsamında, *L. major* ile enfekte edilen gerbillerde IL-6 gen ekspresyon seviyesinin kontrol gruplarına göre arttığı tespit edilmiştir. Bu durum yukarıda bahsedilen çalışmalarla kıyaslandığı zaman gerbillerde Th2 yanıtının oluşma ihtimalini de göstermektedir. Aynı zamanda yapılan tez çalışması kapsamında ekspresyon düzeyi

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

araştırılan diğer sitokinlerin (IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ ) gen ekspresyon seviyelerindeki artışlar da göz önüne alındığında gerbillerde hem Th1 hem de Th2'nin aktive olduğu, IL-6'nın akut faz proteinlerini de biyolojik olarak aktive ettiği değerlendirildiğinde kompleman yolağını da tetiklediği düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  genlerinin Kontrol, Negatif Kontrol ve *L. major* gruplarında mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Yapılan incelemelerde, *L. major* grubunda IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  gen ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı ve her iki genin kontrol grupları arasında herhangi bir fark görülmediği tespit edildi (IFN- $\gamma$  için  $p < 0,01$ ; TNF- $\alpha$  için  $p < 0,001$ ).



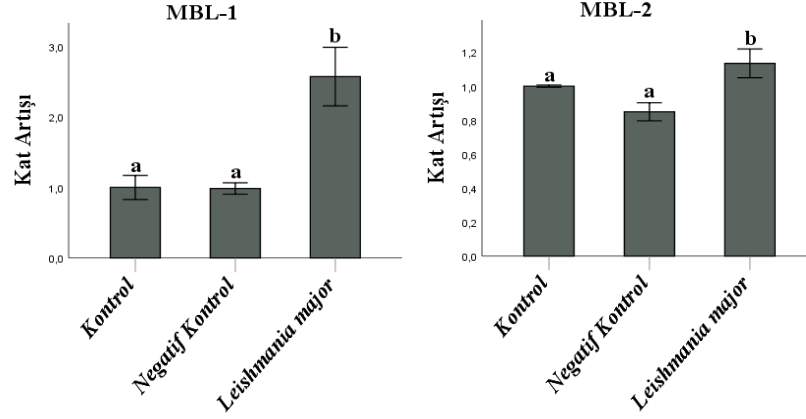
(IFN- $\gamma$ : One-Way ANOVA  $p < 0,001$ . PostHoc (Games-Howell) <sup>ab</sup> $p < 0,01$ ; TNF- $\alpha$ : One-Way ANOVA  $p < 0,001$ . PostHoc (LSD) <sup>ab</sup> $p < 0,001$ )

**Şekil 4.8.** IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait qPCR sonuçları

Tez çalışması kapsamında değerlendirilen KL'nin immünoproteksiyonu ve immünopatolojisinde pro-inflamatuar sitokinlerden IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  kritik rollere sahiptir. IFN- $\gamma$  temel olarak CD4<sup>+</sup> T hücreleri, CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositleri, NK hücreleri ve NKT hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Bu sitokinler, hücre içi patojenlerin ve tümör hücrelerinin kontrolünde önemli rollere sahip olmakla beraber yüksek miktarda üretildiklerinde otoimmün hastalıklara da yol açabilmektedir (Schoenborn and Wilson 2007). Sharma and Singh (2009) tarafından yapılan çalışmada, IFN- $\gamma$ 'nın makrofajlarda nitrik oksit sentezini uyararak hücre içi parazitin çoğalmasını engellediği bildirilmiştir. Liew et al. (1997) tarafından yapılan çalışmada, TNF- $\alpha$ 'nın makrofaj aktivitesindeki artışa ve nitrik oksit sentezine bağlı olarak *Leishmania*'da

önemli rol oynadığı bildirilmiştir. TNF- $\alpha$ , *L. major* enfeksiyonuna karşı Th1/IFN- $\gamma$  tepkilerini destekleyebilmektedir. *L. major* ile enfekte olmuş TNF- $\alpha$  eksik C57BL/6 farelerde, makrofajlar tarafından IFN- $\gamma$  ve IL-12 üretimine rağmen ölümcül iç organ enfeksiyonlarının görüldüğü bildirilmiştir (Wilhelm et al. 2001). Aynı zamanda BALB/c farelerinin TNF- $\alpha$  ile tedavisinin, KL'de parazit yükünü ve lezyon boyutunu azalttığı tespit edilmiştir (Theodos 1991). Ancak, aşırı TNF- $\alpha$  üretiminin, dirençli C57BL/6 farelerde *L. major* enfeksiyonlarında iyileşmeyen lezyonlara yol açtığı da rapor edilmiştir (Garcia et al. 1995). IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'nın artan nitrik oksit miktarına bağlı olarak makrofajları uyarmasıyla *L. major* enfeksiyonuna karşı sinerjistik öldürme etkilerinin olduğu bilinmektedir (Liew et al. 1990). Yapılan klinik çalışmalarda, KL hastalarının lezyonlarında IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  saptandığı bildirilmiş olup IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'nın yukarı regülasyonu enfeksiyon bölgesindeki doku hasarı ile ilişkilendirilmiştir (Gaafar et al. 1999; Pompeu et al. 2001; D'oliveira et al. 2002; Antonelli et al. 2004; Oliveira et al. 2011). *L. braziliensis* ile enfekte KL hastalarında IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  seviyeleri ile lezyon boyutu arasında pozitif korelasyon gözlenmiş olup, daha büyük lezyonlu hastaların enfeksiyon bölgesinde bu sitokinlere ilave olarak IL-10'unda tespit edildiği bildirilmiştir (Bacellar et al. 2002; Antonelli et al. 2004, 2005). Dolayısıyla parazit eradikasyonu ve enfeksiyon bölgesinin temizlenmesi için aşırı üretilen IFN- $\gamma$  sitokinlerinin konakçı dokularda ciddi hasarlara neden olduğu kanıtlanmıştır. Tez çalışması kapsamında *L. major* ile enfekte edilerek oluşturulan KL'li gerbillerde, kontrol gruplarına göre IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış tespit edilmiş olup bu artışın Th1 yanıtını ve özellikle TNF- $\alpha$ 'nın kompleman proteinleri aktive edebileceği bununla beraber ilgili sitokinlerdeki artışın enfeksiyon bölgesindeki lezyon boyutu ve doku hasarı ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında MBL-1 ve MBL-2 genlerinin Kontrol, Negatif Kontrol ve *L. major* gruplarında mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. Yapılan incelemelerde, *L. major* grubunda MBL-1 ve MBL-2 gen ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı ve her iki genin de kontrol grupları arasında herhangi bir fark görülmediği tespit edilmiştir (MBL-1 için  $p<0,001$ ; MBL-2 için  $p<0,05$ ).



(MBL-1: One-Way ANOVA  $p < 0.001$ . PostHoc (LSD)  $^{ab}p < 0,001$ )  
(MBL-2: One-Way ANOVA  $p < 0.001$ . PostHoc (Games-Howell)  $^{ab}p < 0,05$ )

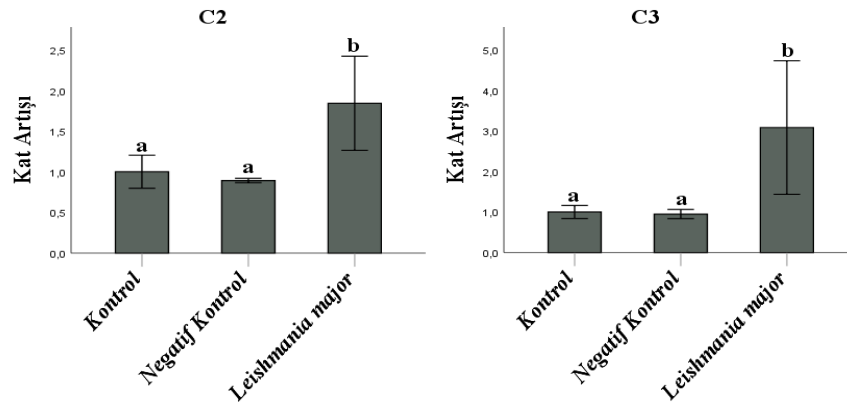
**Şekil 4.9.** MBL-1 ve MBL-2 geninin mRNA ekspresyon seviyelerine ait qPCR sonuçları

İmmün sisteme sahip organizmalarda, antikor aracılı doku hasarında ve patojenleri ortadan kaldırmada önemli rol oynayan kompleman proteinleri serum ve hücre membranında bulunan ardışık bir dizi proteinden oluşan konak savunma sisteminin önemli unsurlarıdır. Kompleman aktivasyonu, üç farklı yoldan meydana gelebilir. Klasik yol, antikor varlığını gerektirir ve C1'in ilk aktivasyonunun ardından C4 ve C2 proteinlerinin bağlanması ile reaksiyon devam eder. Alternatif yolun aktivasyonu, antikorların yokluğunda doğrudan mikroorganizma yüzey yapıları tarafından tetiklenir. Lektin yolu ise istilacı mikroorganizmanın yüzeyindeki karbonhidratlara bağlanan MBL ile antikorların yokluğunda aktive edilir (Thiel 1992). Etkili bir opsonin ve aktivatör olarak hareket eden MBL, fagositik hücreler tarafından mikroorganizmaların alımını artırır (Abbas et al. 2015). *Leishmania* türlerinin opsonizasyona uğrayarak konak organizmada fagosite edilmek üzere karşılaştığı ilk savunma mekanizması kompleman proteinleridir. *Leishmania* parazitleri yüzeylerinde bulunan LPG ve gp63 tabakaları sayesinde kompleman lizizinden korunmaktadırlar (Brittingham et al. 1995; Franco et al. 2012). Literatürde kompleman yollarının araştırıldığı bazı çalışmalar olmasına karşın lektin yolağı ile leishmaniasis hastalığı ilişkisi noktasında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (De Miranda Santos et al. 2001; Ambrosio and De Messias-Reason 2005; Asgharzadeh et al. 2007; De Araujo et al. 2015; Mishra et al. 2015; Silva et al. 2019). De Miranda Santos et al. (2001) tarafından yapılan çalışmada, *L. chagasi* etkenli VL olgularında serumda MBL düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir. MBL'nin makrofajların işlevi üzerine etkisinden dolayı, opsonize edilmiş parazitler ile enfekte olmuş monositlerde MBL artışı ile paralel olarak pro-inflamatuar sitokinlerden

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinlerinin üretiminin de arttığı ve böylelikle yüksek MBL ve sitokin oranına bağlı olarak makrofajların leishmaniasidal etkisinin de önemli derecede etkilendiği çalışmada rapor edilmiştir. Yapılan tez çalışması kapsamında yukarıda bahsedilen çalışmadan farklı olarak VL yerine *L. major* etkenli KL oluşturulan gerbillerde MBL-1 ve MBL-2 gen ekspresyon düzeylerinin, ayrıca MBL-1 geninin protein seviyesinin de kontrol gruplarına göre arttığı (Çizelge 4.3) tespit edilmiştir. MBL1 ve MBL2 ile birlikte TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinlerinin de gen ekspresyon düzeylerinin arttığı göz önünde bulundurulduğunda yürütülen çalışma, De Miranda Santos et al. (2001) tarafından önerilen sonuçları destekler niteliktedir. Dolayısıyla tez çalışması kapsamında araştırılan MBL1 ve MBL2 genlerindeki artışa bağlı olarak gerbillerde lektin yolağının tetiklendiği ve bununla beraber pro-inflamatuvar TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinlerindeki artışta değerlendirmeye alındığında KL olgularında makrofajların leishmaniasidal etkisinin arttığı düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında C2 ve C3 genlerinin Kontrol, Negatif Kontrol ve *L. major* gruplarında mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. Yapılan incelemelerde, *L. major* grubunda C2 ve C3 gen ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı ve her iki genin de kontrol grupları arasında herhangi bir fark görülmediği tespit edilmiştir (C2 ve C3 için;  $p < 0,05$ ).



(C2: One-Way ANOVA  $p < 0.05$ . PostHoc (LSD)  $^{ab}p < 0,05$ )

(C3: One-Way ANOVA  $p < 0.05$ . PostHoc (Games-Howell)  $^{ab}p < 0,05$ )

**Şekil 4.10.** C2 ve C3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine ait qPCR sonuçları

Kompleman yolağın aktive olmasında MBL-MASPs kompleksinin hedef mikroorganizmaya bağlanması ile C2 hidrolize uğrayarak (C2a) C3 konvertaz olarak

görev yapan kompleksin (C4b2a) yapısına katılmaktadır. Dolayısıyla C2 ve C3 kompleman yolağında önemli kontrol proteinleri olarak çalışılabilmektedir (Domínguez et al. 2002; Abbas et al. 2015). Kompleman yolak genlerinden plazmada en fazla bulunan C3, alternatif, klasik ve lektin yollarının hepsinde yer alan sistemin temel proteindir. Bununla beraber kompleman yolağında C2 proteininin yer alması klasik ve lektin yolağının ayrı bir göstergesi olarak da değerlendirilebileceğinden tez çalışmasında C2 ve C3 proteinlerinin her ikisinin gen ve protein ekspresyonları (Çizelge 4.3) değerlendirilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında C3'ün KL'li hastalarda kontrollere göre oldukça yüksek olduğu tespit edildiğinden lezyon bölgesinde yetersiz amastigot olması durumunda leishmaniasis teşhisi için önemli bir parametre olarak değerlendirilmekte ve aynı zamanda parazit yayılımının kontrolünde de etkin bir rol üstlenmektedir (Laurenti et al. 2004; Limoncu and Balçioğlu 2011). Literatüre benzer şekilde tez çalışması kapsamında da *L. major* etkenli oluşturulan KL'li gerbillerde C2 ve C3 gen ve protein ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre arttığı tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre C3 artışına bağlı olarak gerbillerde mevcut KL enfeksiyonlarında kompleman sistemin aktive olduğu ve her iki proteinin artışına bağlı olarak da kompleman yolağın parazitin kontrolünde etkisinin olabileceği değerlendirilmiştir. Aynı zamanda C2 proteinlerinin gen ve protein ekspresyon düzeylerindeki artışı ile kompleman yolakta klasik ve lektin yolağının aktive olduğunu, bununla beraber MBL genlerinin de değerlendirmeye katıldığında lektin yolağının tetiklendiği belirlenmiştir.

#### 4.4.6. ELISA sonuçları

Tez çalışması kapsamında MBL-1, C2 ve C3 genlerinin Kontrol, Negatif Kontrol ve *L. major* gruplarının protein seviyelerindeki değişimler Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir. Yapılan incelemelerde, *L. major* grubunda MBL-1, C2 ve C3 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı ve her iki proteinin de kontrol grupları arasında herhangi bir fark görülmediği tespit edilmiştir (MBL-1 için  $p < 0,05$ ; C2 için;  $p < 0,001$ ; C3 için  $p < 0,01$ )

Çizelge 4.3. ELISA sonuçları

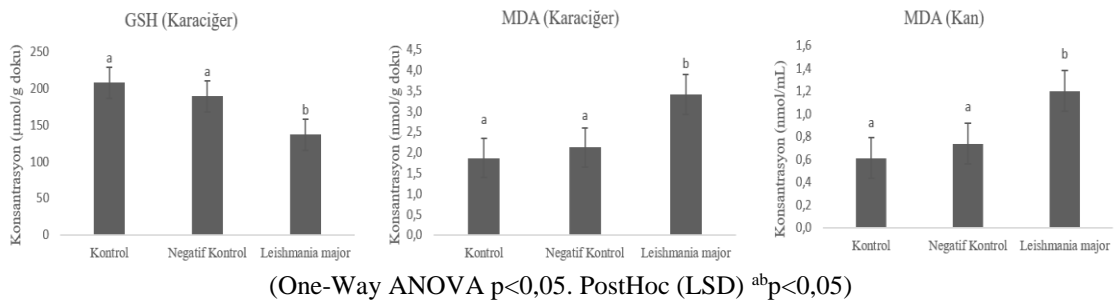
Proteinler	K	NK	LM	P değeri
MBL-1 (ng/mL)	5,61±1,17 <sup>a</sup>	5,95±0,59 <sup>a</sup>	7,88±1,41 <sup>b</sup>	<sup>ab</sup> p<0,05
C2 (ng/mL)	5,37±0,13 <sup>a</sup>	5,43±0,15 <sup>a</sup>	7,81±0,15 <sup>b</sup>	<sup>ab</sup> p<0,001
C3 (ng/mL)	15,79±3,11 <sup>a</sup>	15,49±1,28 <sup>a</sup>	24,26±5,26 <sup>b</sup>	<sup>ab</sup> p<0,01

(K: Kontrol Grubu, NK: Negatif Kontrol Grubu, LM: *Leishmania major* Grubu. Aynı satırdaki harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkları göstermektedir. One-Way ANOVA: MBL-1 için; p<0,05, C3 için; p<0,01, C2 için; p<0,001 olarak kabul edildi)

#### 4.4.7. Biyokimyasal analiz sonuçları

##### 4.4.7.1. Glutatyon (GSH) ve Malondialdehit (MDA) düzeyleri

Çalışmada hayvanlarda oluşabilecek oksidatif stresin belirlenmesi amacıyla biyokimyasal testlerden GSH ve MDA düzeylerinin analizleri yapılmıştır. Karaciğer dokusunda GSH ve MDA düzeylerindeki değişim ile kan örneklerindeki MDA düzeyleri Şekil 4.11.'da verilmiştir. *L. major* grubunun karaciğer GSH seviyesinin, Kontrol ve Negatif Kontrol gruplarına göre önemli düzeyde azaldığı (p<0,05) tespit edilmiş olup, Kontrol ve Negatif Kontrol grupları arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Karaciğer ve kandaki MDA düzeylerinin ise, *L. major* grubunda Kontrol ve Negatif Kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir (p<0,05). Kontrol ve Negatif Kontrol gruplarının karaciğer ve kan MDA düzeyleri arasında herhangi bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.11. GSH ve MDA düzeyleri

Enzim olmayan önemli antioksidanlardan biri olan GSH, temel olarak karaciğerde sentezlenmekte ve özellikle serbest radikaller ile peroksitlere karşı savaşarak hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır (Townsend et al. 2003). Literatürde yapılan

çalışmalarda leishmaniasis’li olgularda genel olarak GSH düzeylerinin azaldığı, MDA düzeylerinin ise arttığı bildirilmiştir (Bildik et al. 2004, Jafari et al. 2015). Bu durumunda GSH’nin serbest radikallere karşı savaşması, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz dahil olmak üzere çeşitli enzimler için substrat olarak işlev görmesi nedeniyle GSH-tükenmesine (glutathione depletion) bağlı olarak oluştuğu rapor edilmiştir. Bununla beraber artan MDA düzeylerine bağlı olarak da leishmaniasis olgularında oksidatif stresin oluştuğu bildirilmiştir. Yapılan tez çalışmasında da serbest radikallere karşı savaşması ve çeşitli enzimlere substrat olarak işlev görmesi gibi nedenlerden dolayı GSH seviyelerinde azalma, enfeksiyondan dolayı eritrosit zarındaki hasar, hücrel membranların çoklu doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu ile parçalanması ve ardından membran bütünlüğünün bozulması gibi nedenlerden dolayı da MDA düzeyinde artışın olabileceği değerlendirilmiştir. Bu kapsamda elde edilen sonuçlar ve değerlendirmeler literatürü destekler niteliktedir.

#### 4.4.7.2. Hematolojik analizlerin sonuçları

Leishmaniasis enfeksiyonu boyunca kan değerlerindeki değişimi belirlemek amacıyla yapılan hematolojik analizlerde lökosit (WBC), nötrofil, lenfosit, monosit ve eozinofil seviyeleri ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4.’te gösterilmiştir. Hematolojik analizlerde *L. major* grubunda lökosit, nötrofil, lenfosit, monosit ve eozinofil seviyelerinin, Kontrol ve Negatif Kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı ( $p<0,05$ ) tespit edilmiş olup, Kontrol ve Negatif Kontrol grupları arasında herhangi bir fark görülmemiştir.

**Çizelge.4.4.** Hematolojik analizler

Kan Hücreleri	K	NK	LM	P değeri
<b>WBC (Lökosit) (<math>10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	3,90±0,26 <sup>a</sup>	4,07±0,24 <sup>a</sup>	5,66±0,50 <sup>b</sup>	
<b>Nötrofil (<math>10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	0,81±0,18 <sup>a</sup>	0,84±0,24 <sup>a</sup>	2,30±0,25 <sup>b</sup>	
<b>Lenfosit (<math>10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	1,80±0,30 <sup>a</sup>	1,96±0,10 <sup>a</sup>	2,86±0,32 <sup>b</sup>	$p<0,05$
<b>Monosit (<math>10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	0,14±0,02 <sup>a</sup>	0,20±0,02 <sup>a</sup>	0,42±0,07 <sup>b</sup>	
<b>Eozinofil (<math>10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	0,10±0,01 <sup>a</sup>	0,12±0,01 <sup>a</sup>	0,24±0,06 <sup>b</sup>	

(**K**: Kontrol Grubu, **NK**: Negatif Kontrol Grubu, **LM**: *Leishmania major* Grubu. Aynı satırdaki harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkları göstermektedir. Anlamlılık derecesi  $p<0,05$  olarak kabul edildi)

Beyaz kan hücresi (WBC) ya da akyuvar olarak bilinen lökositler enfeksiyon ve yangısal hastalıklarda vücudun savunmasında çok önemli rol oynamaktadırlar. Lökositlerin en önemli görevi, vücuda girmiş olan bakteri, virüs, parazit, mantar ve zehirli toksinler gibi antijenleri tanımak ve onları yok etmektir. Lökositler vücudun savunmasında kritik role sahip olması yanı sıra doku hasarını gelişiminde de önemli role sahiptirler (Çöl ve Durgun 2007). Lökositler, beş farklı tipte beyaz kan hücresini (nötrofiller, lenfositler, monositler, eozinofiller, bazofiller) içermektedirler. Bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan lökositlerin yabancı bir organizma ile karşılaşmaları durumunda sayıları hızla artmaktadır. Özellikle eozinofiller, paraziter enfeksiyonlara karşı konak savunması ve alerjik inflamasyonda önemli rolü olan periferik kan ve doku granülositleri olarak bilindiğinden kan dolaşımındaki eozinofil sayısının alerjik hastalıklar ve paraziter enfeksiyonlarda arttığı bilinmektedir (Yücel 2018). Bununla beraber literatürde yapılan çalışmalarda parazitlerle enfekteli organizmalarda genel olarak lökosit miktarının yüksek olduğu ancak tedavi sonrası ya da iyileşme süreci sonunda lökosit miktarının azaldığı bildirilmiştir (Yücel 2018; An et al. 2019). Nicolato et al. (2013) tarafından yapılan çalışmada ise, KanL köpeklerde beyaz kan hücre sayısının kontrol grubuna göre arttığı ancak eozinofil miktarında azalmanın gözleendiği, bu durumda hastalık şiddetiyle ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda da *L. major* etkenli KL'li gerbillerde beyaz kan hücreleri sayısının, kontrol gruplarına göre arttığı tespit edilmiş olup literatürü destekler nitelikte değerlendirilmiştir.

### 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan tez çalışması kapsamında öncelikle hücre içi bir protozoon olan *L. major* ile enfekte edilen gerbillerde (*M. unguiculatus*) kutanöz leishmaniasis hayvan modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Kutanoz leishmaniasis modeli oluşturulan bu gerbillerde immün sistem ve bu sistemle ilişkili kompleman sistemin önemli proteinleri ve özellikle lektin yolağı ile ilgili belirlenen bazı genlerin ekspresyon ve protein düzeyleri belirlenerek inflamatuvar yanıtta rolleri incelenmiştir. Ayrıca çalışmada kutanöz leishmaniasis'e karşı oluşabilecek oksidatif stresi belirlemek amacıyla biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Son olarak paraziter hastalıklarda önemli bir belirteç olan kan değerleri belirlenerek değerlendirilmiştir.

#### 5.1. Sonuç

1. Gerbillerde *L. major* etkenli kutanoz leishmaniasis hayvan modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuştur.
2. *Leishmania major* ile enfekte edilen gerbillerde oluşan lezyonlarda mikroskopik incelemeyle amastigot varlığı tespit edilmiştir.
3. Lezyon bölgelerinden alınan sıvı veya doku örneklerinden besiyerlerine ekim yapılarak promastigotların varlığı saptanmıştır.
4. Çalışmada kullanılan *L. major* izolatının 16 haftalık enfeksiyon süresi sonunda viseralize olmadığı tespit edilmiştir.
5. Gen ekspresyon çalışmalarında, inflamatuvar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  genlerinin ekspresyon seviyelerinin ve kompleman yolak (lektin) ile ilgili olarak MBL-1, MBL-2, C2 ve C3 genlerinin ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir.
6. MBL-1, C2 ve C3 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin gen ekspresyon seviyelerine paralel olarak önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir.
7. Yapılan gen ekspresyonu sonuçlarına göre *L. major* enfeksiyonu sonucunda Th1, Th2 ve kompleman sistem yolaklarının aktive olduğu tespit edilmiştir.
8. Biyokimyasal analizlerde; GSH ve MDA düzeylerine bağlı olarak oksidatif stresin oluştuğu belirlenmiştir.

9. Hematolojik analizlerde, parazit enfeksiyonuna bağılı olarak lökositlerin miktarında önemli düzeyde artış olduğu tespit edilmiştir.

### 5.2. Öneriler

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, gerbillerde kutanöz leishmaniasis enfeksiyonunda immün sistem hücreleri tarafından Th1 yanıtı daha yatkın olmak suretiyle Th1/Th2 sitokin ekspresyon profili oluştuğu belirlenmiştir. Ancak bununla beraber Kutanöz leishmaniasis enfeksiyonlarında immün mekanizmaların tam olarak anlaşılması güçtür. Bu nedenle leishmaniasis hastalığının patogenezi ve bu hastalığın etkilerini aydınlatma noktasında gelecekte yapılacak çalışmalarla pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin, kemokinlerin ve sinyal iletiminde önemli diğer parametrelerin de çalışmalara dahil edilerek kapsamlı genomik ve proteomik analizlerin yapılması ve böylelikle tüm mekanizmanın aydınlatılması gerekmektedir. Böylelikle enfeksiyonların tedavisine katkı sağlanmasının da mümkün olacağı değerlendirilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. 2015. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Elsevier Limited. Çevirenler: Camcıoğlu Y. ve Deniz G. (eds) Temel İmmünoloji İmmün Sistemin İşlevleri ve Bozuklukları. 4. Baskı. Güneş Tıp Kitapevleri, 334, Türkiye.
- Agudelo, S.P, Restrepo, S. and Vélez, I. D. 1999. Cutaneous New World leishmaniasis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. Journal of the American Academy of Dermatology, 40(6), 1002-1004.
- Ak, M., Özbel, Y., Özensoy, S. ve Turgay, N. 1995. Visseral leishmaniosis. Özcel, M. A. (Eds) İmmün Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği. Ege Üniversitesi Basım Evi, 12, 69-119, İzmir.
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L. and Sereno, D. 2017. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. Molecular Aspects of Medicine, 57, 1–29.
- Alexander, J., Satoskar, A.R. and Russell, D.G. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. Journal of Cell Science, 112(18), 2993-3002.
- Allahverdiyev, A. M., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M. and Memisoglu, H. R. 2004. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 70(3), 294–297.
- Allen, J. E. and Wynn, T. A. 2011. Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. Plos Pathogens, 7(5), e1002003.
- Alrajhi, A. 2003. Cutaneous leishmaniasis of the Old World. Skin Therapy Letter, 8(2), 1-4.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J. and Nieto, J. 2004. Canine leishmaniasis. Advances in Parasitology, 57, 1–88.
- Amato, V. S., Tuon, F. F., Siqueira, A. M., Nicodemo, A. C. and Neto, V. A. 2007. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 77(2), 266–274.
- Ambrosio, A. R. and De Messias-Reason, I. J. T. 2005. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. Parasite Immunology, 27(9), 333-340.
- Antonelli, L. R. D. V., Dutra, W. O., Almeida, R. P. D., Bacellar, O. and Gollob, K. J. 2004. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human

- leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clinical & Experimental Immunology*, 136(2), 341-348.
- Antonelli, L. R., Dutra, W. O., Almeida, R. P., Bacellar, O., Carvalho, E. M. and Gollob, K. J. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology Letters*, 101(2), 226-230.
- Apte, R. N. and Voronov, E. 2008. Is interleukin-1 a good or bad ‘guy’ in tumor immunobiology and immunotherapy?. *Immunological Reviews*, 222(1), 222-241.
- Arevalo, I., Ward, B., Miller, R., Meng, T. C., Najar, E., Alvarez, E., Matlashewski, G. and Alejandro, L. C. 2001. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases*, 33(11), 1847-1851.
- Asgharzadeh, M., Mazloumi, A., Kafil, H. S. and Ghazanchaei, A. 2007. Mannose-binding lectin gene and promoter polymorphism in visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(11), 1850-1854.
- Ashford R. W. 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 523-532.
- Auron, P. E. 1998. The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9(3-4), 221-237.
- Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F. P. and Harris, E. 1999. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *The Journal of Parasitology*, 85(2), 181-187.
- Awasthi, A., Mathur, R. K. and Saha, B. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*, 119, 238-258.
- Babior, B. M. 1987. The respiratory burst oxidase. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 241-243.
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W. O., Gollob, K. J. and Carvalho, E. M. 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, 70(12), 6734-6740.
- Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S. and Ilari, A. 2009. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(8), 2603-2612.
- Bakırcı, S., Bilgiç, H. B., Köse, O., Aksulu, A., Hacılarlıoğlu, S., Karagenç, T., Çavuş, İ ve Özbilgin, A. 2015. Deney hayvanı olarak gerbiller (*Meriones unguiculatus*): *Leishmania major* için iyi bir rol model olabilir mi?. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39, 212-7.

- Bamorovat, M., Sharifi, I., Dabiri, S., Mohammadi, M. A., Fasihi Harandi, M., Mohebbali, M., Aflatoonian, M. R. and Keyhani, A. 2015. *Leishmania tropica* in stray dogs in southeast Iran. Iranian Journal of Public Health, 44(10), 1359–1366.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. and Ferrer, L. 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in Parasitology, 24(7), 324–330.
- Baneth, G., Yasur-Landau, D., Gilad, M. and Nachum-Biala, Y. 2017. Canine leishmaniosis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: comparative findings and serology. Parasites & Vectors, 10(1), 113.
- Barral, A., Badaró, R., Barral-Netto, M., Grimaldi, G., Jr, Momem, H. and Carvalho, E. M. 1986. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 35(4), 732–734.
- Bender, S. K., Buckley, D. H., Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Stahl, D. A. 2017. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Çeviri Editörü: Çökmüş, C. 14. baskı, Palme Yayınevi, 543-566, Ankara.
- Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F. and Jaffe, C. L. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology, 44(4), 1435-1439.
- Beutler, E. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 61, 882-888.
- Bildik, A., Kargın, F., Seyrek, K., Pasa, S. and Özensoy, S. 2004. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. Research in Veterinary Science, 77(1), 63-66.
- Blum, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B. and Hatz, C. 2004. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53(2), 158–166.
- Bodur, H., Korkmaz, M., Akıncı, E., Çolpan, A., Eren, S. S. ve Erbay, A. 2003. Viseral layşmanyaz: iki olgu bildirisi. Klimik Dergisi, 16(2), 95-97.
- Boelaert, M., Bhattacharya, S., Chappuis, F., El Safi, S.H., Hailu, A., Mondal, D., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M. and Peeling, R.W. 2007. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. Nature Reviews Microbiology, 5(11), 31-39.
- Bogdan, C. and Röllinghoff, M. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. International Journal for Parasitology, 28(1), 121–134.

- Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W. and Röllinghoff, M. 1996. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Current Opinion in Immunology*, 8(4), 517–525.
- Borthwick, L. A., Wynn, T. A. and Fisher, A. J. 2013. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(7), 1049-1060.
- Brewster, S., Aslett, M. and Barker, D. C. 1998. Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitology Today*, 14(11), 437-438.
- Brittingham, A., Morrison, C. J., McMaster, W. R., McGwire, B. S., Chang, K. P. and Mosser, D. M. 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Parasitology Today*, 11(12), 445–446.
- Byrceson, A.D.M. 1996. *Leishmaniasis*, Manson's Tropical Diseases, Cook, G. C. (Eds). WB Saunders Company Ltd. 1213-1245, London.
- Cecílio, P., Pérez-Cabezas, B., Santarém, N., Maciel, J., Rodrigues, V. and Cordeiro da Silva, A. 2014. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. *Frontiers in Immunology*, 5, 480.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=10277>. Erişim Tarihi: 23.04.2022.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>. Erişim Tarihi: 23.04.2022.
- Chang, K. P. and McGwire, B. S. 2002. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 1(1), 1.
- Charmoy, M., Hurrell, B. P., Romano, A., Lee, S. H., Ribeiro-Gomes, F., Riteau, N., Barber, K.M., Cottier, F.T. and Sacks, D. L. 2016. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 $\beta$ , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *European Journal of Immunology*, 46(4), 897-911.
- Chinen, J., Finkelman, F. and Shearer, W. T. 2006. Advances in basic and clinical immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(2), 489-495.
- Chiragkumar, J.G. and Jimishaben, D. K. 2017. "Review on Leishmaniasis,". *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, Biomedical Research Network, 1(5), 1453-1455.
- Cook, G.C. and Zumla, A. 1996. *Manson's tropical diseases*. WB Saunders Company Ltd, 631-651, Newberg.

- Çöl, R. and Durgun, Z. 2007. Sepsis, lökositler, sitokinler ve dissemine intravasküler koagukasyon. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 23(1), 97-106.
- Dakeel, M. H. and Yousif, J. J. 2019. Gene expression of some cytokines in patients with Cutaneous leishmaniasis in Al-Diwanyah province. In *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 1294, No. 6, 062094.
- Darzi, F., Davoudian, R. and Nateghi Rostami, M. 2021. Differential inflammatory responses associated with *Leishmania major* and *L tropica* in culture. *Parasite Immunology*, 43(8), e12841.
- De Almeida, M. C., Vilhena, V., Barral, A. and Barral-Netto, M. 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 861–870.
- De Andrade, H. M., Reis, A. B., dos Santos, S. L., Volpini, A. C., Marques, M. J. and Romanha, A. J. 2006. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 140(3-4), 231–238.
- De Araujo, F. J., Mesquita, T. G., Da Silva, L. D. O., De Almeida, S. A., De S Vital, W., Chrusciak-Talhari, A., Guerra, J.E.O., Talhari, S. and Ramasawmy, R. 2015. Functional variations in MBL2 gene are associated with cutaneous leishmaniasis in the Amazonas state of Brazil. *Genes & Immunity*, 16(4), 284-288.
- De Hippólito, D. D. C., Gomes, A. H. S., Maia, M. M., da Silva Meira-Strejevitch, C., Kanamura, C. T., Lindoso, J. A. L. and Pereira-Chioccola, V. L. 2019. Gene expression profile of cytokines produced in biopsies from patients with American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 189, 69-75.
- De Miranda Santos, I. K., Costa, C. H., Krieger, H., Feitosa, M. F., Zurakowski, D., Fardin, B., Gomes, R. B. B., Weiner, D.L., Harn, D. A., Ezekowitz, R.A.B. and Epstein, J. E. 2001. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 69(8), 5212-5215.
- Degn, S. E., Andersen, S. H., Jensen, L., Thiel, S. and Jensenius, J. C. 2011. Assay interference caused by antibodies reacting with rat kappa light-chain in human sera. *Journal of Immunological Methods*, 372(1-2), 204–208.
- Dei, R., Takeda, A., Niwa, H., Li, M., Nakagomi, Y., Watanabe, M., Inagaki, T., Washimi Y., Yasuda, Y., Horie, K., Miyata, T. and Sobue, G. 2002. Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 104(2), 113-122.
- Descoteaux, A. and Turco, S. J. 2002. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes and Infection*, 4(9), 975–981.
- Desjeux, P. 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 417–423.

- Despommier, D. Gwadz, R. Hotez, P. and Knirsch, C. 2005. Parasitic diseases. Apple Trees Production, 23-27. New York.
- D'Oliveira Junior, A., Machado, P., Bacellar, O., Cheng, L. H., Almeida, R. P. and Carvalho, E. M. 2002. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35, 7-10.
- Domínguez, M., Moreno, I., López-Trascasa, M. and Toraño, A. 2002. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(4), 451-459.
- Dunkelberger, J. R. and Song, W. C. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), 34-50.
- Elçiçek, S. 2009. Polimerlerin Leishmania-Konak Hücre Etkileşimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 114, İstanbul.
- Eming, S. A., Krieg, T. and Davidson, J. M. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514-525.
- Eroğlu, F. 2008. Kutanoz leishmanyozlu hastalarda etken türlerin PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, 72, Adana.
- Esch, K. J. and Petersen, C. A. 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58-85.
- Ewunetu, T., Deressa, T., Gedle, D., Kumera, G. and Diro, E. 2015. Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Visceral Leishmaniasis. *Journal of Cell Science & Therapy*, 6(3), 1-8.
- Ferrer, L. 1989. Leishmaniosis canina en España: datos para el clínico [Canine leishmaniasis in Spain: data for the clinician]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 7(6), 293-295.
- Franco, L. H., Beverley, S. M. and Zamboni, D. S. 2012. Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Parasitology Research*, 1-11.
- Freeman, B. A. and Crapo, J. D. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; A journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5), 412-426.
- Gaafar, A., Veress, B., Permin, H., Kharazmi, A., Theander, T. G. and El Hassan, A. M. 1999. Characterization of the Local and Systemic Immune Responses in Patients

with Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania major*. *Clinical Immunology*, 91(3), 314-320.

- Garcia, I., Miyazaki, Y., Araki, K., Araki, M., Lucas, R., Grau, G. E., Milon, G., Belkaid, Y., Montixi, C., Lesslauer, W. And Vassalli, P. 1995. Transgenic mice expressing high levels of soluble tnf-r1 fusion protein are protected from lethal septic shock and cerebral malaria, and are highly sensitive to *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* infections. *European Journal of Immunology*, 25(8), 2401-2407.
- Gause, W. C., Wynn, T. A. and Allen, J. E. 2013. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nature Reviews Immunology*, 13(8), 607-614.
- Gavgani, A. M., Vatan, S. K. and Ghazanchaei, A. 2008. KAtex antigen-detection test as a diagnostic tool for latent visceral leishmaniasis cases. *African Journal of Biotechnology*, 7(7), 852-859.
- Gerlind, A. 1999. PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and West Bank Development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies. Phd, The kuvin center fort the study of infectious and tropical disesaes, The Hebrew University, 136, Germany.
- Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilcrest, B. A., Paller, A. S., Leffell, D. J. and Wolff, K. 2012. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8th edition. McGrawHill Medical, 105-499.
- Goto, H. and Lindoso, J. A. L. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(4), 419-433.
- Goyonlo, V. M., Elnour, H. and Nordlind, K. 2014. Interleukin-2 expression in lupoid and usual types of old world cutaneous leishmaniasis. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(11), e5410.
- Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A. and Koopmans, S. J. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University*, 6(11), 1045-1056.
- Gupta, S. and Nishi 2011. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *The Indian Journal of Medical Research*, 133(1), 27-39.
- Gurel, M. S., Ulukanligil, M. and Ozbilge, H. 2002. Cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997-2000). *International Journal of Dermatology*, 41(1), 32-37.
- Güleç, P., Hızarcıoğlu, M. ve Dinçel, N. 2011. Viseral Leishmaniasis ile birlikte hemofagositik sendrom: İki olgu sunumu. *Journal of Pediatric Infection/Çocuk Enfeksiyon Dergisi*, 5(3), 106-109.

- Hai, N., Akhter, R. P. and Ali, I. 2017. Isolation, maintenance and detection of *Leishmania* parasite by microscopy and culture technique. In 2017 14th International Bhurban Conference on Applied Sciences and Technology (IBCAST), 179-182.
- Handman, E. and Bullen, D. V. 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 18(8), 332–334.
- Harman, M. 2015. Kutanöz Leishmaniasis. *Turkish Journal of Dermatology/Turk Dermatoloji Dergisi*, 9(4), 168-76.
- Heyman, S. N., Rosen, S. and Rosenberger, C. 2011. A role for oxidative stress. *Controversies in Acute Kidney Injury*, 174, 138-148.
- Horimoto, A. M. C. and Costa, I. P. D. 2009. Frequency of autoantibodies and serum complement levels in patients with visceral or cutaneous leishmaniasis. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 49, 529-546.
- Hunt, M. J., Aru, G. M., Hayden, M. R., Moore, C. K., Hoit, B. D. and Tyagi, S. C. 2002. Induction of oxidative stress and disintegrin metalloproteinase in human heart end-stage failure. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(2), 239-245.
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M. and Myler, P. J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436-442.
- Jacobs, T., Andrä, J., Gaworski, I., Graefe, S., Mellenthin, K., Krömer, M., Halter, R., Borlak, J. and Clos, J. 2005. Complement C3 is required for the progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania major* infection. *Medical Microbiology and Immunology*, 194(3), 143-149.
- Jafari, M., Shirbazou, S., Sadraie, S. H., Kaka, G. and Norozi, M. 2015. The role of apoptosis in the cellular response of liver and spleen of BALB/c mice in cutaneous leishmaniasis. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 40(2), 133.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. J. 2005. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science, 622, New York.
- Jeronimo, S.M. and Pearson, R.D. 1992. The *Leishmania*. Protozoans adapted for extracellular and intracellular survival, *Subcell Biochem*, 18, 1-37.
- Kalavi, K., Jorjani, O., Faghihi, M. A. and Mowla, S. J. 2021. Cytokine gene expression alterations in human macrophages infected by *Leishmania major*. *Cell Journal (Yakhteh)*, 22(4), 476.
- Khudhur, H. R. and Alomashi, G. B. 2018. Effect of NRAMP1 gene polymorphism on levels of (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) cytokines in cutaneous Leishmaniasis patients in Iraq. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology*, 3(2), 15-22.

- Kılıçturgay, K. 2003. İmmünoloji. 3. Baskı. Nobel & Güneş Yayın Evi, 57-64, İstanbul.
- Kima, P. E. 2007. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1087–1096.
- Kocabaş, E., Antmen, B., Alhan, E., Yıldıztaş, D. ve Aksaray, N. 1998. Çocukluk çağında kala-azar. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 23, 95-101.
- Kocayigit, A., Gurel, M. and Ulukanligil, M. 2003. Erythrocyte antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation levels in patients with cutaneous leishmaniasis. *Parasite*, 10(3), 277-281.
- Konecny, P. and Stark, D. J. 2007. An Australian case of New World cutaneous leishmaniasis. *The Medical Journal of Australia*, 186(6), 315–317.
- Korkmaz, M. ve Ok, U. Z. 2011. Parazitolojide Laboratuvar. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları*, 23(20), 307-308, İzmir.
- Korkmaz, S., Özgöztaş, O. ve Kayıran, N. 2015. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Leishmaniasis Tanı ve Tedavi Merkezine Başvuran Kutanöz Leishmaniasis Olgularının Değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39, 13-16.
- Kostka, S. L., Knop, J., Konur, A., Udey, M. C. and Von Stebut, E. 2006. Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established *Leishmania major* infections. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(7), 1582-1589.
- Köktürk, A., Baz, K., Aslan, G. ve Kaya, T. 2002. İçel’de Kutanöz Leishmaniasis’in durumu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 26(4), 367-369.
- Kropf, P., Fuentes, J. M., Fähnrich, E., Arpa, L., Herath, S., Weber, V., Soler, G., Celada, A., Modolell, M. and Müller, I. 2005. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 19(8), 1000-1002.
- Kuman, H. A. 2002. *Leishmania* Türleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Topçu W. A, Söyletir G, Doğanay M, eds. Nobel Tıp Kitapevleri, 2, 1870-1878. İstanbul.
- Kuman, H. A. ve Altıntaş, N. 1996. Leishmanialar. *Protozoon Hastalıkları*. Ege Üniversitesi Basımevi, 79-100, İzmir.
- Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Reynes, J., Lamothe, J. and Bastien, P. 2001. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 613–617.
- Laurenti, M. D., Orn, A., Sinhorini, I. L. and Corbett, C. E. P. 2004. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection

- in BALB/c mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(3), 427-434.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F. D. and Paul, W. E. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(3), 921-929.
- Liew, F. Y., Li, Y. and Millott, S. 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *The Journal of Immunology*, 145(12), 4306-4310.
- Liew, F. Y., Wei, X. Q. and Proudfoot, L. 1997. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 352(1359), 1311-1315.
- Limoncu, M. E. and Balciolu, I. C. 2011. Complement C1, C3 and C4 levels in Sera of Leishmaniasis cases in Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 720-724.
- Liszewski, M. K. and Atkinson, J. P. 2015. Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations. *Human Genomics*, 9(1), 7.
- Locksley, R. M. and Louis, J. A. 1992. Immunology of leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology*, 4(4), 413-418.
- Lukes, J., Mauricio, I. L., Schönian, G., Dujardin, J. C., Soteriadou, K., Dedet, J. P., Kuhls, K., Tintaya, K. W., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, C., Pralong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F. J. and Miles, M. A. 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9375-9380.
- Machado-Coelho, G. L., Caiaffa, W. T., Genaro, O., Magalhães, P. A. and Mayrink, W. 2005. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(1), 55-61.
- Maia, C. and Campino, L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 274-287.
- Malani, P. N. 2010. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *Journal of the American Medical Association*, 304(18), 2067-2071.
- Malek, T. R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annual Review of Immunology*, 26, 453-479.
- Manamperi, N. H., Oghumu, S., Pathirana, N., de Silva, M. V. C., Abeyewickreme, W., Satoskar, A. R. and Karunaweera, N. D. 2017. In situ immunopathological

- changes in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania donovani*. *Parasite Immunology*, 39(3), e12413.
- Mantovani, A., Muzio, M., Ghezzi, P., Colotta, C. and Introna, M. 1998. Regulation of inhibitory pathways of the interleukin-1 system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840(1), 338-351.
- Marfurt, J., Niederwieser, I., Makia, N. D., Beck, H. P. and Felger, I. 2003. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46(2), 115-124.
- Markell, E. K. John, D. T. and Krotoski, W. A. 1992. *Markell and Voge's Medical Parasitology*, W.B. Saunders Company. 7, 148-160.
- Martin, P. and Leibovich, S. J. 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 15(11), 599-607.
- Mary, C., Lamouroux, D., Dunan, S. and Quilici, M. 1992. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(6), 764-771.
- Maspi, N., Abdoli, A. and Ghaffarifar, F. 2016. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and Global Health*, 110(6), 247-260.
- Mayer, G. 2015. *Microbiology and Immunology On-line*. Department of Pathology, Microbiology and İmmünology. University of South Carolina School of Medicine. Yula, E. (Edt) Sitokinler ve immünoregülasyon. İmmünoloji- Bölüm 13.
- Mcgwire, B. S. and Satoskar, A. R. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*, 107(1), 7-14.
- Memişoğlu, H.R., Kotogyan, A., Acar, M. A. ve Özpoyraz, M. 1994. Leishmaniosis Nobel Tıp Kitabevleri, 220-230, İstanbul.
- Miller, J. F. A. P. 1996. The thymus in immunity. In *Principles of Medical Biology*. Elsevier, 6, 1-20.
- Mishra, A., Antony, J. S., Gai, P., Sundaravadivel, P., Jha, A. N., Singh, L., Velavan, T. P. and Thangaraj, K. 2015. Mannose-binding Lectin (MBL) as a susceptible host factor influencing Indian Visceral Leishmaniasis. *Parasitology International*, 64(6), 591-596.
- Mitropoulos, P., Konidas, P. and Durkin-Konidas, M. 2010. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(2), 309-322.

- Mohammed, E. A., Wright, E. P., Kager, P. A., Laarman, J. J. and Pondman, K. W. 1985. ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(3), 344–350.
- Moskowitz, N. H., Brown, D. R. and Reiner, S. L. 1997. Efficient immunity against *Leishmania major* in the absence of interleukin-6. *Infection and Immunity*, 65(6), 2448-2450.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., and Saravia, N. G. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 366(9496), 1561–1577.
- Mylers, P. J., Audleman, L., DeVos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., and Stuart, K. 1999. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 2902-2906.
- Navas, A., Fernández, O., Gallego-Marín, C., Castro, M. D. M., Rosales-Chilama, M., Murillo, J., Cossio, A., McMahon-Pratt, D., Saravia, N. G. and Gómez, M. A. 2020. Profiles of local and systemic inflammation in the outcome of treatment of human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *Infection and Immunity*, 88(3), e00764-19.
- Nesargikar, P. N., Spiller, B. and Chavez, R. 2012. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 2(2), 103–111.
- Nicolato, R. D. C., Abreu, R. T. D., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. D. O., Reis, L. E. S., Carvalho, M. D. G. and Reis, A. B. 2013. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *Plos One*, 8(12), e82947.
- Novy, F. G. and McNeal, W. J. 1904. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Infectious Diseases*, 1-30.
- Nylén, S. and Eidsmo, L. 2012. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 34(12), 551-561.
- O'Connor, J. E., Herrera, G., Martínez-Romero, A., de Oyanguren, F. S., Díaz, L., Gomes, A., Balaguer, S. and Callaghan, R. C. 2014. Systems Biology and immune aging. *Immunology Letters*, 162, 334–345.
- Oliveira, F., Báfica, A., Rosato, A. B., Favali, C. B., Costa, J. M., Cafe, V., Netto, M. B. and Barral, A. 2011. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 70.
- Oliveira, P. R., Dessen, H., Romano, A., Cabantous, S., de Brito, M. E., Santoro, F. and Dessen, A. J. 2015. Il2ra genetic variants reduce il-2-dependent responses and

- aggravate human cutaneous leishmaniasis. The Journal of Immunology, 194(6), 2664-2672.
- Olliaro, P. L. and Bryceson, A. D. M. 1993. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. Parasitology Today, 9(9), 323-328.
- Orhan, V. ve Yaşarol, Ş. 1981. *Leishmania*'ların morfolojisi, fizyolojisi ve evrimi. Leishmaniasis: Kala-azar ve Şark Çıbanı Türkiye Parazitoloji Derneği. Ege Üniversitesi Basım Evi, 11-24, İzmir.
- Osman, O. F., Oskam, L., Zijlstra, E. E., Kroon, N. C., Schoone, G. J., Khalil, E. T., El-Hassan, A. M. and Kager, P. A. 1997. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology, 35(10), 2454–2457.
- Owen, J. A., Punt, J. and Stranford, S. A. 2007. Kuby immunology. 7th Edition, 103-107, Macmillan, USA.
- Özbel, Y. ve Töz, S. 2007. Leishmaniasis, İçinde: Tıbbi Parazit Hastalıkları. Özcel, M.A. Özbel, Y. ve Ak, M. (eds), Türkiye Parazitoloji Derneği, Meta Basım, 22, 199-241, İzmir.
- Özbel, Y., Turgay, N., Alkan, M., Babaoğlu, A., Özensoy, S. ve Babalıoğlu, N. 2002. Batı Karadeniz Bölgesinde zoonotik visseral leishmaniasis odağı: Karabük. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 26(4), 362-366.
- Özbilgin, A., Çavuş, İ., Yıldırım, A., Kaya, T. ve Ertabaklar, H. 2018. *Leishmania tropica* üzerinde *in vitro* ve *in vivo* ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi: Pilot çalışma. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 42(1), 11-19.
- Özbilgin, A., Çulha, G., Uzun, S., Harman, M., Topal, S. G., Okudan, F., Zeyrek, F., Gündüz, C., Östan, İ., Karakuş, M., Töz, S., Kurt, Ö., Akyar, I., Erat, A., Güngör, D., Kayabaşı, Ç., Çavuş, İ., Bastien, P., Pratlong, F., Kocagöz, T. and Özbel, Y. 2016. Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of *Leishmania major* from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. Tropical Medicine & International Health, 21(6), 783-791.
- Özbilgin, A., Tünger, Ö., İnanır, I., Çavuş, İ., Perk, N. E. ve Özel, Y. 2020. Layşmanyaz tanısı için karaciğer ekstreli besiyerinin Novy-Macneal-Nicolle besiyeri ve moleküler yöntemle karşılaştırılması. Klimik Journal/Klimik Dergisi, 33(2), 137-141.
- Özkeklikçi, A., Karakuş, M., Özbel, Y. and Töz, S. 2017. The new situation of cutaneous leishmaniasis after Syrian civil war in Gaziantep city, Southeastern region of Turkey. Acta Tropica, 166, 35–38.
- Özkocaman, V. 2002. Yüksek ateş, pansitopeni, masif splenomegali ayırıcısı tanısında bir genç kala-azar olgusu ve lipozomal amfoterisin b ile başarıyla tedavisi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 28(3), 121-124.

- Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernández-Rivas, R., Myler, P. J. and Martínez-Calvillo, S. 2009. Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics*, 10(1), 1-18.
- Parkin, J. and Cohen, B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* (London, England), 357(9270), 1777–1789.
- Pasparakis, M., Haase, I. and Nestle, F. O. 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 289-301.
- Pearson, R.D., De Queiroz Sousa, A. and Jeronimo, S.M.B. 2005. *Leishmania* Species: Visceral (kala-azar), Cutaneous and Mucosal leishmaniasis. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of infection Diseases. Mandell, G. L. Bennett, J. E, Dolin, R. Elsevier (Eds), Churchill Livingstone Philadelphia, 265(6), 2460-2492.
- Pompeu, M. M. D. L., Brodskyn, C., Teixeira, M. J., Clarêncio, J., Van Weyenberg, J., Coelho, I. C. B., Cardoso, S. A., Barral, B. A. and Barral-Netto, M. 2001. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. *Infection and Immunity*, 69(12), 7453-7460.
- Ramer-Tait, A. E., Petersen, C. A. and Jones, D. E. 2011. IL-2 limits IL-12 enhanced lymphocyte proliferation during *Leishmania amazonensis* infection. *Cellular Immunology*, 270(1), 32-39.
- Ramírez, C., Díaz-Toro, Y., Tellez, J., Castilho, T. M., Rojas, R., Ettinger, N. A. and McMahon-Pratt, D. 2012. Human macrophage response to *L.(Viannia) panamensis*: microarray evidence for an early inflammatory response. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1866.
- Ready, P. D. 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6, 147–154.
- Reithinger, R. and Davies, C. R. 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(4), 530–541.
- Rosas, L. E., Keiser, T., Barbi, J., Satoskar, A. A., Septer, A., Kaczmarek, J., Lezama-Davila, C. M. and Satoskar, A. R. 2005. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *International Immunology*, 17(10), 1347-1357.
- Sacks, D. and Noben-Trauth, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, 2(11), 845–858.

- Sacks, D. and Sher, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*, 3(11), 1041–1047.
- Sacks, D. L., Kenney, R. T., Kreutzer, R. D., Jaffe, C. L., Gupta, A. K., Sharma, M. C., Sinha, S. P., Neva, F. A. and Saran, R. 1995. Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet* (London, England), 345(8955), 959–961.
- Saha, B., Saini, A., Germond, R., Perrin, P. J., Harlan, D. M. and Davis, T. A. 1999. Susceptibility or resistance to *Leishmania* infection is dictated by the macrophages evolved under the influence of IL-3 or GM-CSF. *European Journal of Immunology*, 29(7), 2319-2329.
- Salman, I. S., Vural, A., Unver, A. ve Saçar, S. 2014. Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bülteni*, 48(1), 106-113.
- Sambrook, J. and Russell, R.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 8-22. New York.
- Santos, D. O., Coutinho, C. E., Madeira, M. F., Bottino, C. G., Vieira, R. T., Nascimento, S. B., and Castro, H. C. 2008. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*, 103(1), 1-10.
- Santos-Mateus, D., Passero, F., Rodrigues, A., Valério-Bolas, A., Silva-Pedrosa, R., Pereira, M., and Santos-Gomes, G. 2016. The battle between *Leishmania* and the host immune system at a glance. *International Trends in Immunity*, 4(1), 28-34.
- Sarma, J. V. and Ward, P. A. 2011. The complement system. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 227–235.
- Saygı, G. 1998. *Temel Tıbbi Parazitoloji*. Esnaf Ofset Matbaacılık, 158-163, Sivas.
- Schallig, H. D., Schoone, G. J., Kroon, C. C., Hailu, A., Chappuis, F. and Veeken, H. 2001. Development and application of 'simple' diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, 190(1-2), 69–71.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. 2011. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(5), 878-888.
- Schoenborn, J. R. and Wilson, C. B. 2007. Regulation of interferon- $\gamma$  during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology*, 96, 41-101.
- Schonian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D., Presber, W. and Jaffe, C. L. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(1), 349–358.
- Schwartz, J., Moreno, E., Calvo, A., Blanco, L., Fernández-Rubio, C., Sanmartín, C., Nguewa, P., Irache, J.M., Larrea, E. and Espuelas, S. 2018. Combination of

- paromomycin plus human anti-TNF- $\alpha$  antibodies to control the local inflammatory response in BALB/mice with cutaneous leishmaniasis lesions. *Journal of Dermatological Science*, 92(1), 78-88.
- Seder, R. A., Darrah, P. A. and Roederer, M. 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature Reviews Immunology*, 8(4), 247-258.
- Sharma, U. and Singh, S. 2009. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47(6), 412-23.
- Silva, E. L., Pestana, A. L., Monteiro, S. G., Caldas, A. J. M., Patrício, F. J. B., Santos, M. D. C., Campos, M.J. and Pimentel, M. M. G. 2019. Polymorphisms of the mannose binding lectin (MBL2) gene are related to protein plasma levels but not with visceral leishmaniasis in a northeastern brazilian population. *Genetics and Molecular Research*, 18(2), 3-10.
- Silva, M. L. F., Alves, P. M., Souza, D. M., Silva, M. V., Dos Santos, J. P., Paulino, T. D. P., Rodrigues, D. B. and Rodrigues, V. 2019. Analysis of macrophage activation markers in an experimental model of cutaneous leishmaniasis treated with photodynamic therapy mediated by 5-aminolevulinic acid. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 37(5), 298-304.
- Sinha, S., Fernández, G., Kapila, R., Lambert, W. C. and Schwartz, R. A. 2008. Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *International Journal of Dermatology*, 47(12), 1263–1270.
- Slappendel, R. J. 1988. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *The Veterinary Quarterly*, 10(1), 1–16.
- Sofic, E., Rustembegovic, A., Kroyer, G. and Cao, G. 2002. Serum antioxidant capacity in neurological, psychiatric, renal diseases and cardiomyopathy. *Journal of Neural Transmission*, 109(5), 711-719.
- Spath, G. F., Garraway, L. A., Turco, S. J. and Beverley, S. M. 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), 9536–9541.
- Stuart, K. D., Schnauffer, A., Ernst, N. L. and Panigrahi, A. K. 2005. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(2), 97-105.
- Stylianou, E. and Saklatvala, J. 1998. Interleukin-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(10), 1075-1079.
- Sundar, S. and Rai, M. 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5), 951–958.



- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Bhattacharya, S. K. and Rai, M. 2006. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 26-33.
- Sunkin, S. M., Kiser, P., Myler, P. J. and Stuart, K. 2000. The size difference between *Leishmania major* Friedlin chromosome one homologues is localized to subtelomeric repeats at one chromosomal end. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 109(1), 1-15.
- Sunter, J. and Gull, K. 2017. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7(9), 170165.
- Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvůrák, V., Hlavacková, J., Mysková, J., Seblová, V., Kasap, O. E., Belen, A., Votýpka, J. and Volf, P. 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *International Journal for Parasitology*, 39(2), 251–256.
- Theodos, C. M., Povinelli, L., Molina, R., Sherry, B. and Titus, R. G. 1991. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. *Infection and Immunity*, 59(8), 2839-2842.
- Thiel S. 2007. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Molecular Immunology*, 44(16), 3875–3888.
- Thiel, S. 1992. Mannan-binding protein, a complement activating animal lectin. *Immunopharmacology*, 24(2), 91-99.
- Titus, R. G., DeKrey, G. K., Morris, R. V. and Soares, M. B. 2001. Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease. *Infection and Immunity*, 69(8), 5189-5192.
- Topçu, W. A. Söyletir, G. ve Doganay, M. 2002. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevi, 2384, İstanbul.
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J. and Arenas, R. 2017. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750.
- Townsend, D. M., Tew, K. D. and Tapiero, H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), 145-155.
- Unat, E. K. 1991. Tıp Parazitolojisi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayını, 564-565, İstanbul.
- Unat, E., Yücel, A., Altaş, K. ve Samastı, M. 1995. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayını, 271-285, İstanbul.

- Uzun, S., Gürel, M. S. ve Harman, M. 2017. Kutanöz layşmanyazis tanı ve tedavi rehberi. Türk Dermatoloji Derneği, 1-30, İstanbul.
- Uzun, S., Uslular, C., Yücel, A., Acar, M. A., Ozpoyraz, M. and Memişoğlu, H. R. 1999. Cutaneous leishmaniasis: evaluation of 3,074 cases in the Cukurova region of Turkey. *The British Journal of Dermatology*, 140(2), 347–350.
- Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- van Eys, G. J., Schoone, G. J., Kroon, N. C. and Ebeling, S. B. 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51(1), 133–142.
- van Griensven, J. and Diro, E. 2012. Visceral leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics*, 26(2), 309-322.
- Vanhamme, L. and Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiological Reviews*, American Society for Microbiology, 59(2), 223-240.
- von Stebut, E., Ehrchen, J. M., Belkaid, Y., Kostka, S. L., Molle, K., Knop, J., Sunderkotter, C. and Udey, M. C. 2003. Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(2), 191–199.
- Vural, H., Aksoy, N. and Ozbilge, H. 2004. Alterations of oxidative–antioxidative status in human cutaneous leishmaniasis. *Cell Biochemistry and Function*, 22(3), 153-156.
- Vural, H., Aksoy, N., Arslan, S. and Bozer, M. 2000. Effects of vitamin e and selenium on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in colon of methylazoxymethanol treated rats. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(10), 1051-1053.
- Wagner, E. and Frank, M. M. 2010. Therapeutic potential of complement modulation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(1), 43–56.
- Wang, X. and Mosmann, T. 2001. In vivo priming of CD4 T cells that produce interleukin (IL)-2 but not IL-4 or interferon (IFN)- $\gamma$ , and can subsequently differentiate into IL-4–or IFN- $\gamma$ –secreting cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(8), 1069-1080.
- Wilhelm, P., Ritter, U., Labbow, S., Donhauser, N., Röllinghoff, M., Bogdan, C. and Körner, H. 2001. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *The Journal of Immunology*, 166(6), 4012-4019.
- World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Erişim Tarihi: 23.04.2022.

- Wortmann, G. W., Aronson, N. E., Miller, R. S., Blazes, D. and Oster, C. N. 2000. Cutaneous leishmaniasis following local trauma: a clinical pearl. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 31(1), 199–201.
- Wu, W., Huang, L. and Mendez, S. 2010. A live *Leishmania major* vaccine containing CpG motifs induces the de novo generation of Th17 cells in C57BL/6 mice. *European Journal of Immunology*, 40(9), 2517-2527.
- Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T. and Mori, M. 1979. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 135(3), 372-376.
- Yücel, U. D. E. 2018. Çocuklarda eozinofiliye güncel yaklaşım. *Klinik Tıp Pediatri Dergisi*, 10(2), 55-61.
- Zare, S. and Baghestani, S. 2001. Cutaneous leishmaniasis in Hormozgan, Iran. *International Journal of Dermatology*, 40(10), 629–631.
- Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., El Hassan, I. M. and El-Hassan, A. M. 2003. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(2), 87-98.

## EKLER

### EK-1

	<p>T.C. AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (AYDIN ADÜ-HADYEK)</p>	
Aydın, 21/05/2019		
<b>Oturum</b>	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2019 Yılı V. Oturum	
<b>Sayı</b>	: 64583101/2019/055	
<b>Proje Başlığı</b>	: Kutanöz ve Viseral Leishmaniasis Üzerine Genomik ve Proteomik Analizler.	
<b>Proje Yürütücüsü</b>	: Serkan BAKIRCI	
<b>Proje Ekibi</b>	: Arzu GÖRMEZ, Berna DEMİRCİ, Baycan MOR	
	<b>Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:</b>	
	İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması	
	İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması	
	Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması	
<b>Hayvan Çalışması</b>	İnsanlarda araştırma	
	İnsan olmayan primatların kullanılması	
	Transgenik hayvanların kullanılması	
	Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.	
<b>Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.</b>		
Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.		



Belge No : 2012/003  
Verildiği Tarih : 30.04.2012

T. C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

## DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Sayın, Baycan MOR

*Kafkas Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HADYEK) ve Kafkas Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (KAÜSEM) tarafından 16-27 Nisan 2012 tarihleri arasında düzenlenen 80 saatlik Deneysel Hayvanlar Kullanım Sertifikası Eğitim Programı'nı başarıyla tamamlayarak Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin ilgili hükümleri kapsamında bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.*

Yrd. Doç. Dr. Murat TAŞDAN  
KAÜSEM Müdürü

Prof. Dr. İsa ÖZAYDIN  
KAÜ-HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Sami ÖZCAN  
Rektör