

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI

***LEISHMANIA TROPICA* PROMASTİGOTLARINDA
APOPTOZ ÜZERİNE İLAÇ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI.**

ERENGÜL BODUÇ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Funda KIRAL

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
VTF-13019 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (VET) Anabilim Dalı Programı çerçevesinde Erengül BODUÇ tarafından hazırlanan “Leishmania tropica promastigotlarında apoptoz üzerine ilaç etkisinin araştırılması.” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/06/2016

Üye

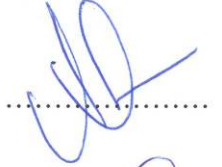
(Tez Danışmanı) : Prof.Dr. Funda KIRAL

ADÜ



Üye : Prof.Dr. Ayşegül BİLDİK

ADÜ



Üye : Prof.Dr. Hatice ERTABAKLAR

ADÜ



Üye : Doç.Dr. Hasan AKŞİT

BAÜ



Üye : Yrd.Doç.Dr. Dilek AKŞİT

BAÜ



ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım Prof. Dr. Funda KIRAL'a, çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK, ADÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Öğretim Üyesi Prof Dr. Sema ERTUĞ, Prof Dr. Hatice ERTABAKLAR, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi lisans öğrencisi Elif Ceren Çümen'e ve Ege Üniversitesi Sinir Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Buse Kayhan'a sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca, aileme, bu tezin her aşamasında destek oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Leishmaniasis	2
2.1.1. Taksonomi	3
2.1.2. <i>Leishmania</i> 'nın Coğrafik Dağılımı.....	4
2.1.3. <i>Leishmania</i> Yaşam Döngüsü	5
2.1.4. <i>Leishmania</i> 'nın Klinik Sendromları	6
2.1.4.1. Kutanöz Leishmaniasis.....	6
2.1.4.2. Diffuz Kutanöz Leishmaniasis	6
2.1.4.3. Mukokutanöz Leishmaniasis	6
2.1.4.4. Visseral Leishmaniasis	7
2.1.4.5. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis	7
2.1.5. Transmisyon	7
2.2. Apoptoz	8
2.2.1. Apoptoz'un Mekanizması.....	9
2.2.2. Apoptoz Geri Dönüşümlü Bir Döngü Müdür?	10
2.2.3. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri	10
2.2.3.1. DNA Kırılması	10
2.2.3.2. Kaspaz Aktivasyonu	11
2.2.4. Apoptozun Morfolojik Özellikleri.....	12
2.2.5. Apoptoz'un Genetiği	12
2.2.5.1. p53	13

2.2.5.2.Bcl-2	14
2.3.Çok Hücreli Organizmalarda Apoptoz	16
2.4.Tek Hücreli Organizmalarda Apoptoz Benzeri Programlı Hücre Ölümü	16
2.5.Parazitlerde Apoptoz Benzeri Programlı Hücre Ölümü	17
2.6.Hücrel Senesens	19
2.7.Otofaji	20
2.7.1. Tek Hücrelilerde Otofaji	22
2.8. Otofaji, Apoptosis ve Senesens İlişkisi	23
2.9.Nekroz	23
2.9.1. Programlı Nekroz: Nekroptoz	25
2.10. Leishmaniasis’de İlaç Tedavisi	26
2.10.1. Pentavalan Antimoniyaller	27
2.10.2. Pentamidin	28
2.10.3. Amfoterisin B	29
2.10.4. Miltefosin	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Promastigotların Üretilmesi	31
3.2.DNA Kırılmasının PCR Yöntemi ile Belirlenmesi	31
3.2.1. Testin Yapılışı	32
3.3. DNA Kırılmasının TUNEL Yöntemi ile Gösterilmesi	33
3.3.1. Testin yapılışı	34
3.4. Promastigotlardaki Bcl2’nin ELİSA Yöntemi ile Analizi	35
3.4.1. Testin Yapılışı	35
3.5. İstatistiksel Analizler	36
4. BULGULAR	37
4.1. DNA kırılmasının PCR yöntemi ile belirlenmesi	37
4.1.1. Staurosporin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Görüntü	37
4.1.2. Miltefosin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Görüntü	38
4.1.3. Glukantim® Uygulanması Sonucu Elde Edilen Görüntü	39
4.2.DNA Kırılmasının TUNEL Yöntemi ile Gösterilmesi	40
4.2.1. Staurosporin Uygulanması	40
4.2.2. Miltefosin Uygulanması	44
4.2.3. Glukantim® Uygulanması	49
4.3. Promastigotlardaki Bcl-2 Düzeyleri	54

5.TARTIŞMA.....	57
6.SONUÇ.....	64
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	81



SİMGELER ve KISALTMALAR

AIF :	Apoptoz İndükleyici Faktör
ATL :	Amerikan Tegumentary Leishmaniasis
ATP:	Adenozin trifosfat
Bp:	Baz çifti
CL:	Kutanöz Leishmaniasis (Cutaneous Leishmaniasis)
cIAP1:	Apoptoz Proteini 1'in Hücresel İnhibitörü (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1)
DCL;	Diffüz Kutanöz Leishmaniasis
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
ELİSA:	Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)
FADD:	Fas associated death domain
Fas:	Hücre Ölüm Reseptörü
ICE:	İnterleukin-1 β dönüştürücü enzim
ML:	Mukozal Leishmaniasis (Mucozal Leishmaniasis)
MCL:	Mukokutanöz Leishmaniasis
NNN:	Novy- Mc Neal-Nicolle besi yeri
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
PKDL:	Post-Kalaazar Dermal Leishmaniasis
RIPK:	Kinaz reseptör etkileşimli protein(kinase receptor-interacting protein)
TUNEL:	TdT-(terminal deoksinükleotidil transferaz)aracılı floresan-Dutp işaretleme
TNF:	Tümör Nekroz Faktörü (Tumor Necrosis Factor)
TNFR-1:	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
TRAF-2:	TNF reseptör ilişkili faktör 2
VL:	Visseral Leishmaniasis
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Apoptozun moleküler yolunun, apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölümü ile ilişkisinin gösterilmesi	15
Şekil 2. Hücre ölüm tipleri ve bunların birbirleri ile ilişkisi	24
Şekil 3. Programlı hücre ölümünü indükleyen durumlar	30
Şekil 4. Staurosporin'in (pozitif kontrol) <i>L. tropica</i> promastigotlarına DNA kırılması indüklemesi	37
Şekil 5. Miltefosin ilacının <i>L. tropica</i> promastigotlarına DNA kırılması indüklemesi	38
Şekil 6. Glukantim® ilacının <i>L. tropica</i> promastigotlarına DNA kırılması indüklemesi	39
Şekil 7. 100µmol dozda staurosporin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları	40
Şekil 8. 50µmol dozda staurosporin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	41
Şekil 9. 25µmol dozda staurosporin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları	42
Şekil 10. 12,5µmol dozda staurosporin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları	43
Şekil 11. 6,75µmol dozda staurosporin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları	45
Şekil 12. 100µmol dozda miltefosin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	45
Şekil 13. 50µmol dozda miltefosin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	46
Şekil 14. 25µmol dozda miltefosin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	47
Şekil 15. 12,5µmol dozda miltefosin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	48
Şekil 16. 6,75µmol dozda miltefosin uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	49
Şekil 17. 15mg/ml dozda Glukantim® uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	50
Şekil 18. 7,5mg/ml dozda Glukantim® uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	51
Şekil 19. 3,75 mg/ml dozda Glukantim® uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	52
Şekil 20. 1,875mg/ml dozda Glukantim® uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	53
Şekil 21. 0,9375 mg/ml dozda Glukantim® uygulanan <i>L. tropica</i> promastigotları.....	55
Şekil 22. <i>L. tropica</i> promastigotlarına uygulanan ilk dozlarda, bcl2 konsantrasyonu	55
Şekil 23. <i>L. tropica</i> promastigotlarına uygulanan ikinci dozlarda, bcl-2 konsantrasyonu	55
Şekil 24. <i>L. tropica</i> promastigotlarına uygulanan üçüncü dozlarda, bcl-2 konsantrasyonu.....	55
Şekil 25. <i>L. tropica</i> promastigotlarına uygulanan dördüncü dozlarda, bcl-2 konsantrasyonu.....	56
Şekil 26. <i>L. tropica</i> promastigotlarına uygulanan beşinci dozlarda, bcl-2 konsantrasyonu.....	56

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. <i>Leishmania</i> etkenlerinin ve oluşturdukları hastalıkların dünya Üzerindeki yayılımı ..	5
Tablo 2. <i>Leishmania</i> türlerinde araştırılan apoptoz belirteçleri.....	18



ÖZET

***Leishmania Tropica* PROMASTİGOTLARINDA APOPTOZ ÜZERİNE İLAÇ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Boduç E. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı
Doktora Tezi, Aydın, 2016.**

Leishmania enfeksiyonu ciddi bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Programlı hücre ölümünün varlığının çok hücreli canlılardan sonra tek hücrelilerde de keşfedilmesi leishmaniasis etkeni olan *Leishmania* protozoonu üzerinde ilgi uyandırmıştır. *Leishmania* türlerinde apoptoz mekanizmasının aydınlatılması leishmaniasis tedavisi için geliştirilecek ilaçlar yönünden önem taşımaktadır. Bu nedenden dolayı bu çalışmada *L. tropica* promastigotları üzerinde miltefosin ve Glukantim® ilaçlarının programlı hücre ölümü belirteçlerine olan etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada NNN besi yerinde üretilmiş *Leishmania tropica* promastigotları çoğalmaları için %10 fetal buzağı serum ilaveli hücre kültürü besi yerinde 24-26°C’li etüvde inkübe edildi. Promastigotlar logaritmik faza ulaştıklarında miltefosin ve Glukantim® ilaçları uygulanarak Elektroforez yöntemi ile DNA kırılması, TUNEL yöntemi ile DNA kırılması ve ELİSA yöntemi ile bcl-2 konsantrasyonu şeklindeki üç apoptoz belirteci yönünden analize alındılar. Bu iki ilacı karşılaştırmak için pozitif kontrol olarak staurosporin ilacı uygulanmıştır. Miltefosin ve staurosporinin promastigotlara uygulama dozları 100 µmol, 50 µmol, 25 µmol, 12.5 µmol ve 6.25 µmol olacak şekilde 24 saat etüvde bekletildi. Glukantim® ise 15mg/ml, 7.5mg/ml, 3.75mg/ml, 1.875 mg/ml ve 0.9375 mg/ml olan dozlarda 72 saat etüvde bekletildi.

Elektroforez yöntemi ile DNA kırılmasının tespitinde pozitif kontrol olan staurosporin ilacında promastigotlarda 50 µmol, 25 µmol, 12.5 µmol ve 6.25 µmol dozları oligonükleozomal DNA kırılması görüntüsü vermiştir. Yine aynı dozlarda TUNEL yöntemi analizinde de promastigotlarda apoptotik DNA kırılması gözlenmiştir. Miltefosin ilacı için oligonükleosomal DNA kırılması 25 µmol olan dozda görüntülenmiştir. 12.5 µmol olan dozda ise tam net bir fragmentasyon görüntülenememiştir. Miltefosin ilacı uygulanan promastigotların TUNEL yöntemi ile amaçlanan DNA kırılması saptanmasında ise 25 µmol ve 12.5 µmol olan dozlarda DNA kırılması gözlenmiştir. Bu iki ilaca karşılık Glukantim® ilacında promastigotlarda oligonükleosomal DNA kırılması gözlenememiştir. Sadece, 0.9375 mg/ml olan dozda belirsiz bir DNA fragmentasyonu benzeri görüntü açığa çıkmıştır.

TUNEL analizinde ise yine Glukantimin® 0.9375mg/ml olan dozunda promastigotlarda, çok hafif bir renkte belli belirsiz bir DNA kırılmasına benzer görüntü oluşmuştur. Diğer dozlarda ise apoptoz bulgusuna rastlanılmamıştır. Böylelikle *Leishmania* tedavisinde etkin bir oral ilaç olan miltefosinin *Leishmania tropica* promastigotları üzerindeki apoptotik etkisinin Glukantim® ilacına göre daha üstün olduğu söylenilebilir.

Bir diğer apoptoz bulgusu olan bcl-2 konsantrasyonuna baktığımızda ise, her ilaç için uygulanan beş ayrı dozdaki konsantrasyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark meydana gelmemiştir. Buna karşılık her bir ilacın grafik değerleri en yüksek dozdan en düşük doza doğru birbirleriyle karşılaştırıldığında, Glukantim®’deki bcl-2 konsantrasyonu beş dozda da diğer iki ilaca göre yüksek değerdedir. En düşük değer ise staurosporinde meydana gelmiştir. Bcl-2 konsantrasyonunun Glukantim® ilacında yüksek olması apoptoz yönünde herhangi bir bulgunun meydana gelmemesiyle ilişkilendirilebilir. Bcl-2 konsantrasyonunun yüksek olmasının apoptozu inhibe ettiği düşünülmektedir.

Leishmania tedavisinde ilaç etkisinin çeşitli *Leishmania* türlerinde programlı hücre ölümü indüklemesine yönelik çalışmalar halen devam etmektedir. Programlı hücre ölümü indüklemesi *Leishmania* tedavisi için etkili bir yol olabilir. Fakat *Leishmania* türlerinin çeşitliliği ve parazitin ilaçlara karşı direnç geliştirmesi *Leishmania* protozoonunda gözlenecek apoptoz bulgularının netlik kazanmasını zorlaştırmaktadır. Yapılan bu çalışma bulgularının *Leishmania infeksiyonuna* yönelik ilaç tedavisine katkı sağlayacağı ve yapılması planlanan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania tropica*, Programlı hücre ölümü, Glukantim®, Miltefosin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF DRUG EFFECTS ON APOPTOSIS IN PROMASTIGOTES OF *Leishmania Tropica*.

**Boduç E. University of Adnan Menderes Health Science Institute Biochemistry Thesis of
Doctorate, Aydın, 2016.**

Leishmania infection continues to be a serious public health problem. After the existence of programmed cell death in multicellular organisms discovered in unicellular organisms has sparked interest on leishmania protozoan that is the causative agent of the leishmaniasis. Elucidation of the mechanisms of apoptosis is important in terms of *Leishmania* species to develop drugs for the treatment of leishmaniasis. For this reason in this study the effects of the drugs which are Glucantim® and miltefosin against the programmed cell death markers was investigated on *L. tropica* promastigotes.

In the study, *L. tropica* promastigotes which were produced in NNN were incubated in cell culture medium by addition of 10% fetal calf serum for grow that 24-26°C. When the promastigotes growth reached logarithmic phase the drugs that were miltefosine and Glucantim® were administrated and they were taken to the analysis for three apoptotic markers that were DNA fragmentation by electrophoresis method, DNA fragmentation by TUNEL method and bcl-2 concentration by ELISA method. Staurosporine, the drug was administered as a positive control to compare the two drugs. The application dose of miltefosin and staurosporin was adjusted as 100 µmol, 50 µmol, 25 µmol, 12.5 µmol and 6.25 µmol then promastigotes were incubated 24 hours .When comes to Glucantime® the application dose was adjusted as 15mg/ml, 7.5mg/ml, 3.75mg/ml, 1.875 mg/ml and 0.9375 mg/ml then promastigotes were incubated 72 hours.

In the determination of DNA fragmentation by electrophoresis method in promastigotes with the drug staurosporine as a positive control yielded DNA fragmentation image in each dose which were 50 µmol, 25 µmol, 12.5 µmol and 6.25 µmol. At the same doses, apoptotic DNA fragmentation was observed also by TUNEL assay analysis in promastigotes. In the drug which was miltefosine displayed oligonucleosomal DNA fragmentation in 25 µmol dose. The dose which was 12.5 µmol, it was not displayed a full clear fragmentation. It was observed DNA fragmentation at 25 µmol and 12.5 µmol doses in also TUNEL assay analysis in

promastigotes with miltefosin. Correspond to this two drugs, it was not observed oligo nucleosomal DNA fragmentation in promastigotes with the drug which was Glucantime®. Only at 0.9375 mg / mL dose, a vague image that was similar to DNA fragmentation was exposed. In TUNNEL analysis Glucantime® again at 0.9375mg / ml dose occurred a very light color was due to a vague image which was similar to DNA fragmentation. Apoptosis was not observed in the other dose finding. Thus, an effective oral medication of miltefosine for the treatment of *Leishmania* can be said to be superior compared to Glucantim® on the apoptotic effect that induced by drug in promastigotes of *Leishmania tropica*.

There was not a statistically significant difference between the concentration values for each drug that was administered at five different doses, when we looked at the bcl-2 concentration which was the other apoptotic marker. In contrast, when each drug chart values compared with each other from the highest dose, to the lowest dose of bcl-2 concentration Glucantime® displayed a high value according to the other two drugs in five doses. The lowest value occurred in staurosporine. The high bcl-2 concentration of Glucantim® drug may be associated with that any finding of apoptosis does not occur. A high concentration of bcl-2 is thought to inhibit apoptosis.

Efforts to induce programmed cell death in various *Leishmania* species of *Leishmania* in the treatment of drug effect is still ongoing. Induction of programmed cell death can be an effective way to treat *Leishmania*. But diversity and the development of resistance to drugs against parasites of *Leishmania* species makes it difficult to gain clarity of apoptosis to be observed in *Leishmania* protozoa. The findings of this study is thought to contribute to the drug treatment for *Leishmania* infection and to shed light on the work planned.

Keywords: *Leishmania tropica*, Programmed cell death, Glucantime®, Miltefosine.

1.GİRİŞ

Leishmania infeksiyonu 88 ülkede yayılım gösteren ve dünyadaki üçüncü en önemli vektör kaynaklı hastalık olan önemli bir halk sağlığı problemidir. Hastalığa karşı etkili bir aşının olmaması tek bir seçenek olan ilaç tedavisini zorunlu hale getirmiştir. Fakat *Leishmania* tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı gelişen direnç durumu ise hastalığı tedavi etmede başka mekanizmalar aranmasını gerektirmektedir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda tek hücreli canlılarda tıpkı memelilerde olduğu gibi bir programlı hücre ölümü varlığından bahsedilmektedir. Bu konuda araştırma yapılan tek hücreli bir canlı da leishmaniasis etkeni olan *Leishmania* protozoonudur. *Leishmania* protozoonunun dünya üzerinde yayılmış olan çeşitli türlerinde ve promastigot ile amastigot formlarında ilaç etkisiyle yapılan çalışmalarda programlı hücre ölümüne ait belirteçler gözlenmiştir. Fakat gerek ilaç direnci gerekse parazitin her bir türüne ait promastigot ve amastigot şeklindeki yaşam formu programlı hücre ölümüne verilecek yanıt olumsuz etkilemektedir. Hatta bazı durumlarda parazit programlı hücre ölümü yerine nekroz ya da başka ölüm tiplerini de tercih etmektedir. Bu da *Leishmania*'da programlı hücre ölümü belirteçlerinin netlik kazanmasını zorlaştırmaktadır. Bu sebepten dolayı günümüzde *Leishmania*'nın programlı hücre ölümü mekanizması ile ilgili yapılan çalışmalar halen devam etmektedir.

Bu çalışmada bir *Leishmania* türü olan *Leishmania tropica* programlı hücre ölümü belirteçlerinden oligonükleosomal DNA kırılması (DNA merdiveni, PCR yöntemi) , apoptotik DNA kırılması (TUNEL yöntemi) ve Bcl-2 konsantrasyonları yönünden incelenecektir. Programlı hücre ölümü indükleyicisi olarak staurosporin (pozitif kontrol), miltefosin ve Glukantim® ilaçları kullanılacaktır. Böylelikle son yıllarda *Leishmania* tedavisinde etkili ve oral bir ilaç olan miltefosin ile Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) leishmaniasisin neredeyse tüm tiplerine karşı ilk önerdiği ilaç grubu olan pentavalen antimonlardan Glukantim® ilacının, programlı hücre ölümü belirteçlerine olan etkisinin de gözlenmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Leishmaniasis

Leishmaniasis, *Lutzomyia* ve *Phlebotomus* türlerine ait kum sinekleri tarafından bulaştırılan, Kinetoplastida sınıfına ait olan, *Leishmania* protozunu tarafından oluşturulan bir hastalıktır (David ve Craft, 2009). Dünya çapında her yıl 1,6 milyon yeni olgunun meydana geldiği fakat bunlardan sadece 600.000'inin kayıtlı olduğu bildirilmektedir (WHO 2010).

Bundan başka leishmaniasis'in Afrika, Amerika, Asya ve Avrupa gibi dört kıtada ve 98 ülkede 12 milyon insanın sağlığını etkilediği rapor edilmektedir (den Boer ve ark, 2011; Kobets ve ark, 2012).

Bulunduğu coğrafyaya göre, leishmaniasis; Eski Dünya ve Yeni Dünya leishmaniasisi şeklinde iki ana sendrom olarak incelenmektedir. Eski Dünya leishmaniasisi iki klinik durum barındırmaktadır. Bunlardan biri, deride sınırlanan kutanöz leishmaniasis (CL) ve dolaşım ile iç organlara lokalize olan visseral leishmaniasis'tir (VL). Yeni Dünya leishmaniasisinin klinik bulguları ise kutanöz ve mukokutanöz leishmaniasisin semptomlarının birleşmiş hali olup, mukoza membranlarından, deriye kadar yayılan bir tablo göstermektedir (WHO, 2010; Kobets ve ark, 2012). Mukokutanöz leishmaniasis (MCL) deri yerine membran mukozasına yerleşir.

Günümüzde leishmaniasisin klinik olgularını tanımlamada ise yeni terimler kullanılmaktadır. Mukozal leishmaniasis (ML), mukoza dokularının *Leishmania spp.* ile sarıldığını gösterir. ML'de bilhassa üst solunum yolları (burun deliklerinden, larinks duvarına kadar) ve oral kavite lezyon ile kaplıdır. Tipik olarak mukozal leishmaniasis, kutanöz leishmaniasisten sonra ilerler, günler hatta yıllar geçtikçe belirginleşir. Bu klasik bir mukokutanöz leishmaniasis ya da 'espundia' olarak adlandırılır (WHO, 2010; Aliaga ve ark, 2003). CL'nin kutanöz leishmaniasis ile birlikte olduğu bir MCL tablosu, Güney Amerika'da görülen tipik bir durumdur ve 'Amerikan Tegumentary Leishmaniasis' (ATL) adı ile karakterize edilmektedir. MCL, Yeni Dünya *Leishmania* türleri olan, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* ve *L. panamensis*'in oluşturduğu enfeksiyonun tipik bir sonucudur. Güney Amerika Kıta'sının dışında mukozal leishmaniasis, MCL'den farklı ve daha az tanımlanmış klinik durumlar göstermektedir. Aslında, ML, kutanöz ya da VL'den önce gelişmekte ya da bu iki klinik duruma eşlik etmektedir (Aliaga ve ark, 2003).

Her durumda mukozal yayılma *Leishmania*'dan kaynaklanan ilk ve tek belgelendirilebilen patolojik durumdur. Genelde bu klinik durumlar *L. donovani*'nin kompleks türlerinde ve özellikle *L. infantumdan* kaynaklanan olgularda görülmektedir (Strazzulla ve ark 2013).

2.1.1. Taksonomi

Tanımlanan 30 *Leishmania* türünün 21 tanesi insanda enfeksiyon oluşturabilmektedir. Bu farklı türlerin morfolojik olarak ayırımı yapılamamasına rağmen, izoenzim analizleri, moleküler metodlar veya monoklonal antikorlar kullanılarak ayrımları ortaya çıkarılabilmektedir.

Leishmania türleri sistematik olarak aşağıdaki gibi bildirilmektedir (Özbel ve Özensoy Töz 2007).

- Kingdom: Protista
- Subkingdom: Protozoa
- Phylum: Sarcomastigophora
- Subphylum: Mastigophora
- Class: Zoomastigophora
- Order: Kinetoplastida
- Family: Trypanosomatidae
- Genus: *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Blastocrithidia*
Herpetomonas, *Leptomonas*, *Phytomonas*
- Genus: *Leishmania*
- Subgenus: *Leishmania*
- Species: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*,
Leishmania chagasi, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*,
Leishmaniaaethiopica, *Leishmania mexicana*
(*L.mexicana*, *L.amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. pifanoi*, *L.enriettii*)
- Subgenus: Viannia
- Species: *Leishmania braziliensis* kompleksi

(*L. braziliensis*, *L. colombiense*, *L. equatorense*, *L. peruviana*),

Leishmania guyanensis (*L. guyanensis*, *L. paramensis*, *L. shawi*),

Leishmania lainsoni, *Leishmania naiffi*.

2.1.2. *Leishmania*'nın Coğrafi Dağılımı

Leishmaniasis, dünya çapında büyük bir alana yayılmış, vektör tarafından oluşturulan bir hastalıktır. Daha detaylı olarak incelenirse, visseral leishmaniasis'in 65 ülkede ve % 90 oranla, ilkel ve kırsal alanlarda meydana geldiği rapor edilmektedir. Bu alanları barındıran ve visseral leishmaniasis rapor edilen beş ülke, Hindistan, Nepal, Bangladeş, Sudan ve Brezilya'dır. Kutanöz leishmaniasis'in ise %90 oranla en fazla rapor edildiği ülkeler, Afganistan, İran, Suudi Arabistan, Suriye, Brezilya ve Peru'dur (Desjeux 2004). Türkiye'de ise visseral leishmaniasis en çok Ege ve Akdeniz Bölgelerinde görülmektedir fakat, nerdeyse bütün bölgelerimizden bildirilmiş olgular mevcut olmaktadır (Özbel ve Özensoy Töz 2007).

Mukozal leishmaniasis olguları ise Güney Amerika'da, Asya'da, Avrupa'da ve Afrika'da rapor edilmiştir. Latin Amerika'da özellikle Amazon bölgesi mukozal leishmaniasis'in en önemli endemik bölgesidir. Dünya çapında, mukozal leishmaniasis genellikle en az şüphelenilen ve en az rapor edilen sağlık olgularından biridir. Avrupa'da mukozal leishmaniasis olguları; İtalya, Fransa, İspanya, Malta, Portekiz, Hollanda, Birleşik Krallık ve Avusturya'da görülmüştür. Akdenizin dışında, mukozal leishmaniasis; Hindistan, Sri-Lanka, Pakistan, İran, Suudi Arabistan ve Sudan'da rapor edilmektedir (Strazzulla ve ark 2013).

Leishmania parazitleri, oluşturdukları hastalıklar ve dünya'daki yayılımları tablo 1'de gösterilmiştir (McGwire ve ark 2013).

Tablo 1. *Leishmania* etkenlerinin ve oluşturdıkları hastalıkların dünya üzerindeki yayılımı

TÜRLER	HASTALIK	COĞRAFİK DAĞILIM
Eski Dünya Türleri		
<i>L. major</i>	CL	Orta Doğu, Afrika
<i>L. tropica</i> , <i>L. infantum</i>	CL	Orta Doğu, Afrika, Akdeniz
<i>L. aethiopica</i>	CL	Afrika
<i>L. donovani</i>	VL	Uzak Doğu
<i>L. infantum</i>	PKDL	Uzak Doğu, Afrika
	VL	Akdeniz, Doğu Avrupa, Uzak Doğu
Yeni Dünya Türleri		
<i>L. infantum/chagasi</i>	VL	Merkez ve Güney Amerika
<i>L. mexicana</i>	CL	Kuzey, Merkez ve Güney Amerika
<i>L. amazonensis</i>	CL, DCL	Güney Amerika
<i>L. panamensis</i>	CL	Merkez ve Güney Amerika
<i>L. braziliensis</i>	CL, MCL	Merkez ve Güney Amerika
<i>L. guyanensis</i>	CL	Güney Amerika
<i>L. peruviana</i> ve <i>L. venezuelensis</i>	CL	Güney Amerika

(CL; Kutanöz Leishmaniasis, VL; Visseral Leishmaniasis, MCL; Mukokutanöz Leishmaniasis, PKDL; Post-Kalaazar Dermal Leishmaniasis, DCL; Diffüz Kutanöz Leishmaniasis) (McGwire ve ark 2013).

2.1.3. *Leishmania* Yaşam Döngüsü

Leishmania iki ana yaşam döngüsü aşamasına sahiptir. Bir tanesi kum sineği vektörünün içinde motil ve flagellalı olan promastigot formudur. Bir diğeri ise flagellasız olup memeli konağında hücre içine yerleşen amastigot formudur (Ueno ve Wilson 2012).

Enfekte kum sineği kan emmesi sırasında reseptör aracılı bağlanan enfektif promastigotları memeli konağın fagositlerine bırakır. Promastigotlar makrofajlar içinde kendi parazit vakuolünü lizozomlar ile eriterek amastigot adı verilen formu oluşturmak üzere replike olurlar. Daha sonra enfekte makrofajlar içindeki amastigotlar hücre dışına çıkıp, çevre dokulara hasar vermeye başlarlar. Parazit ve enfekte makrofajlar iç organlar ve deriye de metastaz yapabilirler (McGwire ve ark 2013).

2.1.4. Leishmania'nın Klinik Sendromları

2.1.4.1. Kutanöz Leishmaniasis

Kutanöz leishmaniasis *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania anazonensis* ve *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panemensis* ve *Leishmania braziliensis* gibi çeşitli *Leishmania* türü tarafından oluşturulan ve hastalığın en az şiddetli olan bir formudur (Goto ve Lauletta Lindoso, 2012). Vektörün ısırıldığı yerde veya yakınında ülseratif veya nodüler bir lezyon görülmektedir. Bu lezyonlar genelde yüz, ön kol ve bacaklar gibi vücudun açıkta kalan bölümlerinde haftalar veya aylarca gelişme göstermektedir (David ve Craft, 2009).

2.1.4.2. Diffuz Kutanöz Leishmaniasis

Bu leishmaniasis türü kutanöz leishmaniasis'e karşı, eksik bir hücresel immun yanıt sonucu şekillenmektedir. *L. amazonensis* gibi türler tarafından vektörün ısırıldığı vücut bölgesinden uzak bir yerde lokalize olarak nodüler bir lezyon şeklinde görülmektedir. Genelde kendiliğinden iyileşme eğiliminde olan diffüz kutanöz leishmaniasis, *L. panomensis* ve *L. braziliensis* türlerinin oluşturduğu olgularda mukokutanöz doku lezyonuna dönüşebilir. Erken tedavi hastalığın ortadan kalkmasını hızlandırmaktadır (Desjeux 2004).

2.1.4.3. Mukokutanöz Leishmaniasis

'Espundia' ismi ile de bilinmekte olan MCL nazofarinks ve orofarinsk de dahil tüm farinks boşluğunda lokalize bir lezyon olup, bu alandaki mukozanın şiddetli hasarlanması, solunum problemlerini de beraberinde getireceği için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Desjeux 2004). Hastalık *L. braziliensis* türü tarafından deriden mukokutanöz dokuya metastaz yaparak ilerler. MCL'nin altında yatan patogenezenüz tam anlaşılabilmiş değildir. Konak ve parazit arasındaki immun reaksiyon eksikliği sonucu oluştuğu düşünülmektedir (de Oliveira ve Brodskyn, 2012). Hastalık ilaç tedavisine direnç göstermektedir ve hastalar çoğunlukla primer enfeksiyondan değil bir diğer ikinci süperenfeksiyon ve malnutrisyon sonucu ölmektedir (Calvopina ve ark, 2004).

2.1.4.4. Visseral Leishmaniasis

Visseral leishmaniasis (kala-azar), Kutanöz leishmaniasis'in ilk safhasında enfekte makrofajların retiküloendotelyal sisteme metastaz yaparak fagositlerin enfektif hale geçmesinin bir sonucu olarak şekillenir. Eski Dünya VL'si *L. donovani* (Pakistan, Hindistan, Çin, Afrika Ülkeleri'nde) ve *L. infantum* (Akdeniz Ülkeleri'nde) tarafından bulaştırılır (McGwire ve ark 2013). VL'li hastalarda karaciğer, dalak ve kemik iliğinde makrofaj proliferasyonu sonucu karaciğer ile dalakta büyüme meydana gelirken aynı zamanda kemik iliği supresyonu da gözlenir. Hastalar tedavi edilmedikleri sürece immunsupresyon gelişir ve başka bir hastalığa karşı eğilimli olarak diğer mikroplarla beraber süperenfeksiyon meydana gelir (ter Horst ve ark, 2008).

2.1.4.5. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis

Visseral leishmaniasis'li bazı hastalarda başarılı tedavinin ardından aylarca, hatta yıllarca bile süregelen, asemptomatik, kalıcılık gösteren ve deride birden gelişen diffuz-makular, makulo-papular ya da nodüler tarzda lezyon gözlenmektedir. Bu duruma Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) denilmektedir (Zijlstra ve ark, 2003). PKDL, başlıca Hindistan ile Sudan'da görülmektedir ve insanlar *L. donovani* tarafından enfekte edilmektedir. PKDL'nin patogenezi tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ama bu durumun interferon γ ile ilişkili olarak, konak immun cevabının olumsuz etkilendiği düşünülmektedir (McGwire ve ark 2013).

2.1.5. Transmisyon

Kum sineği *Phlebotomus* ve *Lutzomyia spp.* loş ve nemli akşam karanlığında enfekte bir insandan ya da karasal memelilerden kan emme sırasında enfeksiyonu kapmaktadır. Kan ile alınan amastigot form kum sineğinin bağırsağında replike olarak promastigot form halini alır. Daha sonra kan emilme sırasında kum sineğinin regurgitasyonu ile enfeksiyon oluşturacağı konağa geçerek döngüyü terk eder (Rogers ve ark, 2004). Bilinen 100 çeşit kum sineğinden sadece 70 tanesi leishmaniasis'i bulaştırmaktadır. Parazitin proteolitik enzim salgısı vektörün bağırsak epitelindeki inhibe edici salgıdan etkilenmediği sürece vektör hastalık yaymada etkindir. Kum sineğinin tükrüğü, konaktaki immun cevabı, sanki deneysel bir kutanöz enfeksiyonu destekler gibi etkilemektedir. Bunun yanında enfekte olmayan bir

kum sineğinin ısırması ya da tükürük proteini ile aşılama yapmak da deneysel bağışıklığa karşı bir korunmayı uyarmaktadır (Sacks 2001).

Visseral leishmaniasis, direk olarak, amastigotların mutlak suretle, ya kan yolu ya da organ transplantasyonu sırasında hastalığa neden olmasıyla meydana gelmektedir. Kutanöz enfeksiyon ise kan olmaksızın da, herhangi bir yere atılan ucu açık iğne, enjektör veya şırınganın enfeksiyon etkeni taşıyıp dikkatsizlik sonucu dokunulmasıyla da meydana gelebilir (Murray ve ark 2005).

2.2. Apoptoz

Apoptoz terimi 1972 yılında, henüz daha morfolojik özellikleri tam olarak aydınlatılmasa bile, ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanmıştır (Kerr 2002). Apoptozun memeli hücrelerindeki mekanizmasının anlaşılması ise *Caenorhabditis elegans* adlı nematod'un gelişimi sırasında gözlenen bulgular sayesinde aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Horvitz 1999).

Apoptoz, hücrelerin genetik olarak elimine edilmesi sürecinde, programlı bir hücre ölümü şeklinde tanımlanmıştır (Formigli, 2000; Sperandio, 2000; Debnath, 2005). Bununla beraber, başka programlı hücre ölümü tipleri de keşfedilmiştir ve hala da keşfedilmeye devam edilmektedir. Apoptoz, organizmanın gelişmesi ve yaşlanması süreçlerinde meydana gelerek dokulardaki hücre popülasyonunun devam ettirilmesi için bir homeostatik mekanizma gibi çalışmaktadır. Aynı zamanda, hücreler bir hastalık ya da zararlı ajanlar sebebiyle hasara uğradıklarında, apoptoz, sanki bir immun reaksiyon gibi savunma mekanizması rolü üstlenmektedir (Norbury ve Hickson 2001).

Apoptozu tetikleyen çok çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlar olsa da bütün hücreler aynı cevabı göstermeyebilirler. Örneğin, kanser kemoterapisinin yarattığı irritasyon ya da ilaçlar, bazı hücrelerde DNA kırılmasıyla, p53-bağımlı yolu seçerek, apoptotik ölüme yol açmaktadır. Yine bir başka örnekle anlatmak gerekirse, kortikosteroidler gibi bazı hormonlar bir takım hücrelerde apoptoz meydana getirirken, diğer hücreler bu durumdan etkilenmemektedir. Bazı hücreler Fas ve TNF reseptörlerini açığa çıkartarak, bağlayıcı ligandlarla ve çapraz protein bağlarıyla apoptozu gerçekleştirmektedir. Bütün bu verilen örneklerin yanı sıra bazı hücrelerde ise apoptoz çeşitli nedenlerle bloke edilebilmektedir (Hirsch ve ark, 1997; Zeiss, 2003).

Bazı durumlarda indükleyici faktörün tipi ya da derecesi hücrenin apoptoz ya da nekrozdan birini tercih etmesini belirlemektedir. Düşük dozlarda sıcaklık, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi bir çok indükleyici faktör apoptoz oluşturabilmektedir, fakat tam aksine, bu faktörlerin yüksek dozları ise nekroz meydana getirmektedir (Elmore 2007).

2.2.1. Apoptoz'un Mekanizması

Apoptoz'da kaspazların aktive olduğu iki büyük mekanizma vardır. Bunlar intrinsik (mitokondri yolu) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü yolu) yollardır (Bratton 2000).

Intrinsik yol, yeterli sitokrom c salındığı zaman, mitokondriyal bozulma ile aktive olur (MacFarlane 2003). Yeterli kaspaz-kaskad varlığında, sitokrom c, Apaf-1, d-ATP/ATP ve prokaspaz-9'un birbirleriyle etkileşimi sayesinde apoptosom formu oluşturulur (Cain K ve Zou K 1999). Bu yol Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenir (Green ve Reen, 1998; Green, 2000).

Ekstrinsik yol ise ligandların hücre yüzeyine bağlanmasını sağlar. Bu ligandlar kaspaz-kaskad'ın aktivasyonunu başlatan ölüm reseptörleridir (Ashkenazi 1998). Ölüm reseptörleri tümör nekroz faktör (TNF) geni superfamilyasının bir bölümü olup apoptoza hızlı ve etkili bir rota sağlamaktadır. Ölüm reseptörleri hücre dışında sisteinden zengin bir ortam ve ölüm alanı adı olarak bilinen hücre içi bir stoplazmik alan içerir ve tip I transmembran proteinleridir. Bu proteinler apoptoz için mutlaka gereklidir. Çünkü ölüm reseptörlerinin birbirine kenetlenmesi kaspazlar olarak bilinen proteazların hareketlenmesini sağlayan süreci tetikler (Kumar ve ark, 2005).

Fas oligomerizasyonunun olması halinde ölüm alanındaki adaptör bir protein olan FADD'ın bağlantı yapıp harekete geçmesi kolaylaşır (Krueger ve ark, 2003). FADD daha sonra ölüm alanındaki kaspaz-8'i harekete geçirir. Kaspaz-8'in homodimerizasyonu ardışık olarak bölünen aspartat kalıntılarının aktive olması ile sonuçlanır. Tamamen aktifleşen kaspaz-8, daha sonra Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid'ten ucu kesik yeni bir Bid'i ya da t-Bid'i oluşturmak için bölünür (Li ve ark, 1998). T-Bid bir diğer Bcl-2 üyesi olan Bax'ın oligomerizasyonunu düzenlemek için mitokondri membranının dışına lokalize olarak mitokondrinin yıkımlanıp sitokrom-c ile Smac/Diablo'nun salınmasını sağlar. Sitokrom c ise Apaf-1 ve kaspaz-9'un ATP'nin varlığında birleşmesini sağlayarak büyük moleküler ağırlıklı ve apoptosom olarak bilinen aktif kaspaz-9'u oluşturur (Cain ve ark, 2000).

Apoptosom da kaspaz-3 ve kaspaz-6 gibi efektör kaspazları aktive ederek hücre bileşenlerini yıkıma uğratarak döngünün sonlanmasını sağlar (Taatzes ve ark, 2008).

2.2.2. Apoptoz Geri Dönüşümlü Bir Döngü Müdür?

Kaspaz aktivasyonu ile işleyen apoptoz, geriye dönüşsüz olaylar zincirinden oluşan bir süreçtir (Hoeppner ve ark, 2001). *C. elegans*'da öldürücü genlerin kısmi fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar, aynı zamanda bazı hücrelerin apoptoz yoluyla programlı olarak ölmesinin de önüne geçerek hayatta kalabilmesini sağlamaktadır (Reddien ve ark, 2001). Vertebralılarda makrofajların bazı dokularda hücre ölümünü teşvik ettiğine dair bazı kanıtlar bulunmuştur. Makrofajların fare gözünün ön kamerasındaki eliminasyonu vasküler endotelial hücrelerin normal bir şekilde apoptoza gitmesine engel olmuştur (Diez-Roux ve Lang, 1997). Benzer şekilde Geske ve arkadaşları (2001), apoptotik hücrelerde erken p53 indüklenmesinin eğer apoptoz uyarını ortadan kalkarsa hücrelerin apoptotik programdan kaçabileceklerini göstermiştir. Yine aynı çalışmada, p53 indüklenmesi olan apoptoz sürecinde DNA onarımı erken gerçekleşirse, bu onarımın hücreyi sıradan bir hücre ölümüne doğru götüren ters bir etki de doğurabildiği gözlenmektedir (Elmore 2007).

2.2.3. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri

2.2.3.1. DNA Kırılması

Apoptozun biyokimyasal değişikliklerinden bir tanesi DNA'nın endojen DNaz'lar tarafından çift sarmallı olarak 180-200 baz çiftli (bp) DNA kırıklarına bölünerek indirgenmesidir (Wyllie 1980). Çekirdek içi kırılma değişik koşullar ve çeşitli hücre tipleri göz önüne alındığında, apoptoz morfolojisini en iyi tanımlayan bir belirteç olarak gözlenmiştir (Bortner ve ark, 1995).

DNA yapısının onarılması, düzenlenmesi ve replikasyonunda birçok tipte kaspaz substratlarına gerek duyulmaktadır (Nicholson ve Thornberry, 1997). DNA kırılma faktörü (DFF40) (Liu ve ark, 1998), kaspaz'a aktive olmuş DNaz (CAD) (Enari ve ark, 1998; Sakahira ve ark, 1998) ve hemotopoietik hücreler (NUC70) dahil olmak üzere DNaz enzimleri, apoptoz süresince DNA kırılmasından sorumlu tutulmaktadırlar (Urbano ve ark, 1998). DFF40 ve CAD inhibitör proteinlerle (DFF45 ve ICAD) beraber normal hücrelerde inaktif heterodimer olarak bulunurlar. Bu enzimler kaspaz 3 aracılığı ile ya da kaspaz ailesinin

diğer üyeleri ile aktive olurlar. Aktive edilen CAD ve DFF40 ile çekirdeğin baskılanması apoptozun tipik morfolojik değişimlerini indüklemeye yeterlidir. 150-300 kbp'lık geniş büyüklükte DNA kırılmalarının oluşması çekirdek içi kırılmalardan daha önce olur ama sözü edilen DNaz enzimlerinin bu süreçteki rolleri henüz daha çalışılmamıştır (Saraste ve Pulkki, 2000).

Çekirdek içi DNA kırılmalarının gösterilmesi apoptoz belirteci olarak büyük bir avantajdır. DNA kırılması elektroforezle ya da TUNEL yöntemi ile saptanabilir. Doku örneklerindeki apoptoz miktarının belirlenmesi bu yöntemlere dayanır (Wyllie 1980).

2.2.3.2. Kaspaz Aktivasyonu

İnterleukin-1 β dönüştürücü enzim (ICE), *Caenorhabditis elegans*'da hücre ölüm proteini CED-3 ile ilişkilendirilmiştir. *Caenorhabditis elegans*'da CED-3, apoptozun meydana gelmesi için gereklidir. ICE ve ilişkili enzimlerin tüm memelilerde bulunduğu ve apoptozun gerçekleşmesi için ilk önem sırasında yer aldığı düşünülmektedir (Yuan ve ark, 1993; Thornberry ve ark, 1992). Proteaz ailesinin ilk üyesi olan ICE, kaspaz olarak adlandırılır (Alnemri ve ark, 1996) ve apoptozun düzenlenmesinde büyük rol oynar (Kumar ve ark, 1994; Kuida ve ark, 1996). Apoptotik hücre ölümünün meydana gelmesinde kaspaz aktivasyonunun son derece gerekli olduğunu gösteren birçok genetik ve biyokimyasal çalışma mevcuttur (Hirsch ve ark, 1997; Janicke ve ark, 1998). Fakat hücre ölümü için kaspazlar üzerine bir bağımlılık söz konusu değildir. Çünkü kaspaz aktivitesi inhibe olduğunda bile hücreler apoptotik olmayan morfolojilerle ölmektedirler (Saraste ve Pulkki, 2000).

Kaspaz aktivitesi ile karakterize iki önemli yol bulunur. Bunlardan bir tanesi Fas ve TNF reseptörlerinin de dahil olduğu ölüm reseptörlerinin ligasyonu ile başlatılan yoldur (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Kaspaz 8 bu yolun en önemli kaspazıdır. Bir diğeri ise p53 ve çeşitli sitotoksik ajanların yol açtığı apoptotik sinyalleri birleştiren mitokondriyal yoldur. Mitokondriyal yol ayrıca reseptörler aracılığı ile sağlanan apoptozu da artırır. Bu yolun önemli noktası ise apoptoz indükleyici faktör AIF gibi mitokondriyal zar boşluğundan sitozole geçen sitocrom c ve diğer kaspaz aktive edici faktörlerin salınmasıdır. Kaspaz-9 bu mitokondriyal apoptotik yoldaki döngüye en çok katılan kaspazdır (Saraste ve Pulkki, 2000). Prokaspaz 9'un aktivasyonu sitokrom c'nin de dahil olduğu sitozolik kompleksi gerektirir. *C.elegans*'da ölüm geni CED-4'ün homoloğu ise apoptoz protease aktive edici faktör (Apaf-1) ve dATP olarak isimlendirilir (Li ve ark, 1997; Srinivasula ve ark, 1998).

2.2.3. Apoptozun Morfolojik Özellikleri

Apoptoz başlangıcı hücre ve çekirdek büzülmesinin yanı sıra çekirdek kromatinin kondenzasyonu ile beraber bir kütle oluşumu ve bu kütle çekirdek membranından belirgin sınırlar halinde ayrılması ile karakterizedir (Saraste ve ark, 2000). Daha sonra çekirdek ilerleyen bir yoğunlaşma gösterir ve parçalanır. Hücre onu çevreleyen dokudan ayrılır ve plazma membranı da bu ayrılan parçanın yerini kapatmak için uzama gösterir. Bu ayrılan apoptotik cisim hücresel organeller ve çekirdek kalıntıları ile doludur. Apoptotik cisim içindeki iyi tanımlanabilen ve korunan özel yapılar ise membranlar ve mitokondridir. Makrofajlar ve parenkimal hücrelerin de dahil olduğu komşu hücreler tarafından apoptotik cisim hızlı bir şekilde fagosit edilir (Kerr ve ark, 1972; Kerr ve ark, 1994). Apoptotik büzülme hücreyi apoptotik cisimcikler şeklinde parçalara ayırır ve her bir hücre inflamasyon olmadan elimine edilir. Yapılan çalışmalar gösterir ki anahtar proteinlerin aktifleşen kaspaz proteazlar tarafından proteolitik bölünmesi apoptotik morfolojilerin tanımlanmasında rol oynar (Martin ve Green, 1995).

2.2.4. Apoptoz'un Genetiği

Apoptozun düzenlenmesinde karşılaşılan ve apoptozu etkileyen en önemli iki yapı p53 ve bcl-2 ailesi üyeleridir (Brown ve Wouters 1999).

2.2.5.1. p53

p53, ilk olarak 1979 yılında smian virus (SV40) T antijenini bağlayan ve kanser hücresi çekirdeğinde biriken bir hücresel protein olarak belirlenmiştir (Deleo, 1979; Linzer ve Levine, 1979). p53 olarak kodlanan ve aslı TP53 olan gen, neoplastik rodent ve insan hücrelerinde çoğaltılmış ve daha sonra rodent hücrelerine verildiğinde zayıf onkojenik aktivite göstermiştir. 1980'lerin sonuna doğru ise araştırmacılar fark etmiştir ki o zamana kadar p53'ün vahşi tipi yerine yanlış kodlanmış şekliyle çalışılmıştır (Scheffner, 1990). 1990'ların başında ise TP53 tüm dünya çapında bütün kanser vakalarında tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır (Donehower, 1992).

p53'ün transkripsiyon faktörü olarak birçok fonksiyonu vardır. İlk olarak hücre olayları döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozda kendini gösteren p53, gen amplifikasyonu,

farklılaşması ve gelişmesinin yanı sıra DNA rekombinasyonu, kromozomal segregasyon ve hücrel senesensde rol oynamaktadır (Harris, 1996; Oren ve Rotter, 1999).

p53 açıkça, DNA hasarı, hipoksi ve onkogenez gibi geniş çaptaki stres koşullarına karşı oluşan hücrel bir yanıttır. p53'ün yanıt mekanizması hücre kültürlerinde, hayvan ve insan modellerinde de gözlenmiştir. p53'ün stres yanıtına karşı verdiği cevap üzerinden biyokimyasal olarak en çok çalışıldığı mekanizma ise apoptozdur. p53 apoptozda adeta bir hücrel muhafız gibidir. Hücrel stresin derecesine göre apoptozu indükler. p53'e bağlı apoptotik cevabın altında yatan biyokimyasal mekanizma tam anlaşılamamasına rağmen p53, hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolda görev alır (Hofseth ve ark 2004).

Apo-1/Fas reseptörü ve TRAIL reseptörü gibi ölüm reseptörlerinin açığa çıkmasında, ekstrinsik yolda p53 seviyesi artar. Bu sırada sitoplazmik p53 kaspaz-8 ve kaspaz-3'ü aktive eder. Intrinsik apoptotik yolda ise çekirdek p53'ü PIDD ve sadece BH3 proteinleri (PUMA, NOXA, BAX ve BID) gibi preapoptotik protein salınmasını aktif hale dönüştürür. Bunları yaparken mitokondri membran potansiyelini arttırarak sitokrom c'nin salınmasını sağlar ve kaspaz-8 ile kaspaz-9 aktive olur. Bu sırada sitoplazmik p53 mitokondriye geçer ve Bcl-2/Bcl-X_L kompleksini oluşturur. Böylece bu yapı da proapoptotik proteinler olan BAX ve BAK'ın açığa çıkmasını sağlar. p53 aynı zamanda apoptosomun anahtar bileşeni olan APAF-1'in salınmasını aktive eder (Lin ve ark, 2002).

Bunlardan başka apoptoz da olduğu kadar otofajinin de baş düzenleyicisi p53'tür. Sonuç olarak p53 kanser tedavisi için önemlidir fakat hala çözömlenmesi karmaşık bir yapıdır (Su ve ark 2013).

2.2.5.2. Bcl-2

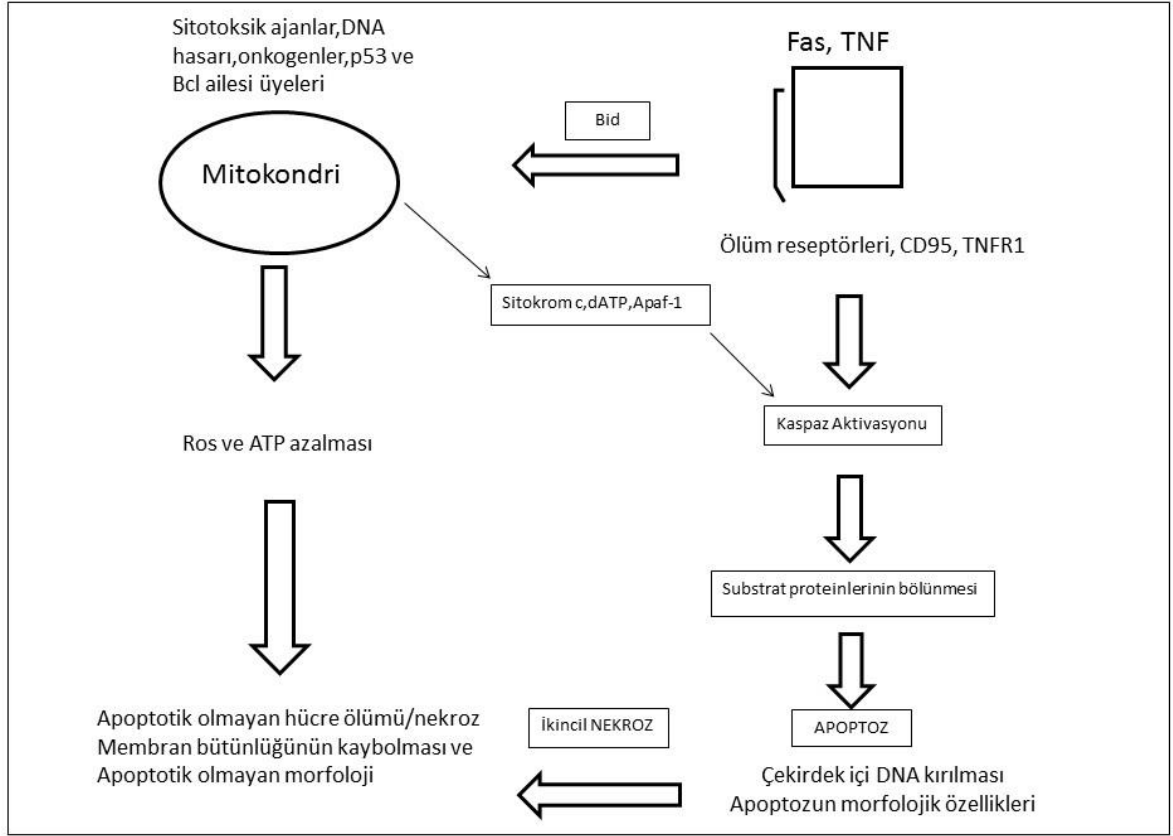
Caenorhabditis elegans'daki programlı hücre ölümüyle ilgili genetik çalışmalarda apoptozun düzenlenmesi ve yürütölmesinde iki genin önemli bir şekilde rol oynadığı tespit edilmiştir. Bunlar, Ced-9 ve Ced-3'tür. Ced-9 ve bunun memelilerdeki karşılığı bcl-2 hücreleri apoptozda girmekten korumaktadır. Ced-3 ise memelilerde interleukin-1β dönüştürücü enzim proteazı (ICE) ya da kaspaz-1 ailesi olarak tanımlanmıştır ve apoptozin meydana gelmesi için gereklidir. Bir memeli proteini olan CPP32 (kaspaz-3) Ced-3'e benzer sekansta substrata özel etki göstermektedir (Yang ve ark, 1997).

Apoptoz önceden de bahsedildiği gibi kaspaz ailesinin sistein proteazlarının bir dizi aktivasyonu sonucu iki önemli yol sayesinde gerçekleşir. Bunlardan biri ekstrinsik yoldur ve

kaspaz-8'in aktivasyonu sonucu oluşur. İntrinsik yol ise mitokondriyal ya da stres yolu olarak bilinir . Bu yol mitokondrinin DNA hasarı gibi herhangi bir stres faktörüne karşı hasarlanıp sitokrom c'yi salgılaması sonucu Araf-1 proteini üzerinden kaspaz-9'un aktive olması sonucu meydana gelmektedir. Kaspaz-9 adındaki reaksiyonu başlatıcı kaspaz bölünerek kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 gibi efektör kaspazları aktive edebilir. İntrinsik yol bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir (Adams ve ark 2007).

Bcl-2 ailesi proapoptotik etki, antiapoptotik etki ve bu iki ailenin homologları olacak şekilde üç grup altında incelenir (Schinzel ve ark, 2004). Antiapoptotik etki bcl-2 benzeri proteinler, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1/Bfl-1'dir. Proapoptotik etkili Bax benzeri proteinler Bax, Bak/Mtd'dir. Proapoptotik BH3 proteinleri ise Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Bik/Nbk, Bık, Noxa, Puma/Bbc3 ve Hrk/DP5'dir. BH3 proteinlerinin hasarlı hücrelerden alınan ölüm sinyallerini birleştirip bir diğer bcl-2 ailesi üyelerine iletilmesi gibi görevleri de vardır. Geniş bir alana yayılan proapoptotik proteinler olan Bax ile Bak ve belki Box mitokondrinin dış ortama olan membran geçirgenliğinden sorumludur. Bunun yanı sıra bu üç proapoptotik protein (Bax, Bak, Bok) en baş sırada yer alan apoptoz düzenleyicilerdir. Bax, Bak'ın yokluğunda mitokondriyel membran geçirgenliği işlevini yerine getiremez, dolayısıyla apoptoz da önlenmiş olur (Martinou ve ark 2011). Bcl-2 ailesinin apoptotik üyeleri, mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek membranı gibi yerlerde bulunurlar. Buna karşılık proapoptotik üyeleri ise sitozolde bulunur.

Bcl-2 molekülü mitokondri kapısının gardiyanı gibidir (Gross ve ark 1999). Mitokondri apoptozun intrinsik yolunda oldukça öneme sahiptir. Özellikle sitokrom c'nin de dahil olduğu suda çözünen proteinler mitokondrinin zarları arasından sitozole geçerek burada kaspaz aktivasyonunu başlatırlar. Bununla beraber mitokondrideki membran geçirgenliği dediğimiz durum ise suda çözünen proteinlerin yoğunluğu ile ilişkilidir. Ancak *C. elegans* ve *Drosophila* için mitokondri membran geçirgenliği durumu gerekli değildir. Omurgalı canlılarda mitokondri membran potansiyeli proapoptotik bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilmektedir (Martinou ve ark 2011).



Şekil 1. Apoptozun moleküler yolunun, apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölümü ile ilişkisinin gösterilmesi. (Ölüm reseptörlerinin ligasyonu ve sitokrom c gibi kaspaz aktive edici faktörlerin mitokondriden salınması, sırasıyla caspase8' in ve 9'un öncü olduğu kademeli kaspaz döngüsünü başlatır. Mitokondri ise reseptör aracılı apoptoza öncülük etmektedir. Fakat bazı durumlarda apoptoz hücrede ikincil bir nekroz meydana getirebilir. Apaf 1: apoptoz proteaz aktive edici faktör, ROS: reaktif oksijen çeşidi) (Saraste ve Pulkki, 2000).

2.3. Çok Hücreli Organizmalarda Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda apoptoz süreci, hücre intihar mekanizmasını etkinleştirerek kromozomal kondenzasyon ve çekirdek DNA'sı kırılması ile sonuçlanmaktadır (Steller, 1995; Wyllie, 1980). Memelilerde apoptozun intrinsik yolu mitokondri membran geçirgenliği ile aktive olmaktadır (Newmeyer ve ark, 1994; Kroemer ve Reed, 2000) . Bununla beraber mitokondri membran proteinleri , sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G (EndoG)'nin sitoplazma içine salınmasını sağlamaktadır.

Kaspazlardan sistein endoproteaz ailesinin aktivasyonu apoptozun katabolik olarak düzenlenmesinin anahtarıdır (Kaczanowski ve ark, 2011). Sitokrom c, AIF ve kaspazların nükleazları aktifleştirmektedirler.

Bitkilerde de apoptoz mitokondriden salınan faktörler sayesinde kromatin kondenzasyonu ve DNA degradesyonu şeklinde gerçekleşmektedir (Reape ve McCabe, 2010). Bitkiler standart kaspazlara sahip olmasalar bile bu rolü kaspaz ortologlarından metakaspaz ailesi üyeleri üstlenmektedir. Bitki metakaspazları memeli kaspazlarıyla karşılaştırıldığında farklı substratlara eğilim göstermektedirler ama hala apoptoz'ın meydana gelmesini sağlayan kaspaz aktivitesine yakın bir biyolojik aktivite ortaya koymaktadır (Reape ve McCabe, 2010; Sundström ve ark, 2009).

2.4. Tek Hücreli Organizmalarda Apoptoz Benzeri Programlı Hücre Ölümü

Bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae* ve taze su algi *chlamydomonas reinhardtii* gibi yaşayan serbest tek hücreli organizmalarda fiziksel ve kimyasal stresin apoptozu başlattığı görülmektedir (Madeo ve ark, 2004; Yordanova ve ark, 2010). Mayalarda apoptozun birçok özelliği memelilerde tariflenen şekline benzer olarak görülmektedir (Sharon ve ark, 2009; Madeo ve ark, 1997). Mitokondriyel proteinlerin, AIF, Endo G ve sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkması gibi özellikler memelilerdeki apoptozla benzerlik göstermektedir (Kaczanowski ve ark, 2011). Maya metakaspazlarının bozulması durumunda , hidrojen peroksitle indüklenen apoptozun inhibe edildiği bildirilmektedir. Metakaspazların aşırı aktivasyonu ise, proteolitik etkilerini artırması sebebiyle hidrojen peroksitle indüklenen bir apoptoz ortaya çıkarmaktadır (Madeo ve ark, 2002).

Serbest yaşayan tek hücreli silialı protozoonlarda da konjugasyon süresince apoptoz meydana gelmektedir. Örneğin, *Tetrahymena thermophila*'da ebeveyn makronükleuslarının sitoplazmadan seçilip elimine edilmesi apoptoz benzeri bir işlemle gerçekleştirilmektedir (Mpoke ve Wolfe 1996).

2.5. Parazitlerde Apoptoz Benzeri Programlı Hücre Ölümü

Model organizmalardaki, apoptoz parazit organizmaları ile karşılaştırıldığında programlı hücre ölümü mekanizmasının anlaşılması sınırlı kalmıştır. Bununla beraber,

literatür taramalarında *Trypanosoma*, *Leishmania* ve *Plazmodium* gibi farklı parazitlerde de apoptoz ile yapılan çalışmalara rastlanmaktadır (Kaczanowski ve ark, 2011).

Apoptoz benzeri hücre ölümünün tipik özellikleri olan; hücre büzüşmesi, çekirdek kondenzasyonu veya DNA kırılması, kaspaz ailesi proteazlarının aktivasyonu ve sitoplazmada sitokrom c artışı bu organizmalarda da gözlenmektedir (Arambage ve ark, 2009; Duszenko ve ark, 2006).

Apoptoz hidrojen peroksit ile ya da doğal yolla nitrik oksit donörlerinin oluşması sağlanarak, ilaçlar ve oksidatif stres gibi çeşitli ajanlar kullanılarak indüklenebilir. Apoptoz faktörlerinden iki tanesi olan AIF'in ve Endo G'nin fonksiyonları protozoonlarda da deneysel olarak doğrulanmıştır. Bunlardan başka taksonomik olarak her bir protozoonda apoptoz indüklenmesinin karışık bir mekanizmaya sahip olduğu ve bu mekanizmalarla bağlantılı birçok yol yer alması göz önünde bulundurulmalıdır (Kaczanowski ve ark 2011).

Tablo 2. Leishmania türlerinde araştırılan apoptoz belirteçleri (Deponte 2008).

Leishmania Türü	İndükleyici	Apoptoz Belirteci
<i>Leishmania amazonensis</i>	Ca ²⁺ varlığında sıcaklık stresi, amastigotları nitrik oksit türevleri ile tedavi etmek.	DNA kırılması,kromatin kondenzasyonu, vezikül formu,hücre büzüşmesi.
<i>Leishmania donovani</i>	Promastigotları, kültürdeki logaritmik (sabit) fazda; H ₂ O ₂ , Amfoterisin B, Camptotesin veyaantimikrobiyel peptidlerle tedavi etmek.	DNA kırılması,kromatin kondenzasyonu, hücre büzüşmesi, çekirdek kırılması, vezikül formu, membran şişmesi, glutatyon azalması, reaktif oksijen türlerinde artma,fosfatidilserinin membran yaprağının dışına çıkması, kaspaz-benzeri aktivite, mitokondri membran potansiyelinin ($\Delta\Psi$) kaybolması, sitokrom c salınması.
<i>Leishmania major</i>	Promastigotları, staurosporin ile tedavi etmek, serum uzaklaştırmak, aktif makrofajlardaki amastigotları nitrik oksit türevleri ile tedavi etmek.	DNA kırılması, kromatin kondenzasyonu, hücre büzüşmesi, çekirdek kırılması, vezikül formu, fosfatidilserinin membran yaprağının dışına çıkması, kaspaz-benzeri aktivite, mitokondri membran potansiyelinin ($\Delta\Psi$) kaybolması, sitokrom c salınması.
<i>Leishmania infantum</i>	Amastigotların üç değerlikli antimonlarla (Sb ³⁺),tedavi edilmesi, promastigotların trans-platinum kompleksleriyle tedavisi,sıcaklık stresi.	DNA kırılması, fosfatidilserinin membran yaprağının dışına çıkması, mitokondri membran potansiyelinin ($\Delta\Psi$) kaybolması, reaktif oksijen türlerinde artma.

2.6. Hücresel Senesens

Hücresel senesensiyeterli sayıdaki mitotik hücrelerin olası bir tümör dönüşümü uyarısına karşı geliştirmiş oldukları bir yanıttır. Yapılan çalışmalarda, kısa ve fonksiyonu olmayan telomerazların da dahil olduğu, DNA hasarlanması ve onkogeneze belirtisi gibisenesensi indükleyici bir çok uyarı saptanmıştır.

Apoptoz gibi hücresel senesens de evrimsel ve eski bir yanıt olabilmektedir. Senesense *Sacchanomyces melanogaster* mantarları gibi tek hücreli organizmalarda ve *Drosophila melanogaster ovaryum* gibi çok hücreli ökaryotlarda rastlanmaktadır (Jazwinski, 1996; Margolis ve Spradling, 1995). Buna ek olarak apoptoz gibi senesens de karmaşık yapıları ökaryotlarda tümör çoğalmasını suprese edici kritik bir cevaba sahip olabilmektedir (Sager, 1991; Campisi, 2001). Anne karnında genetiği ile oynanmış farelerin hücrelerinde senesensin engellendiği durumda yavruların prematüre olarak kanserden öldükleri gözlenmektedir (Donehower ve ark, 1992; Harvey ve ark, 1993). Kanser önleyici önemli bir rolde yer alan senesens p53'ünde dahil olduğu birçok tümör suprese edici gen tarafından kontrol edilmektedir (Campisi 2003).

Çoğu hücre hem apoptoz ve hem de senesens indüklemesine yanıt verebilse de hücre tipi, hücreyi apoptoz veya senesens mekanizmalarından hangisini seçeceği konusunda önceden yönlendirmektedir (Campisi ve d'Adda di Fagagna, 2007). Hasara uğramış epitel hücreleri ve fibroblastların senesens'e maruz kaldığı, hasarlanan lenfositlerin ise apoptoz mekanizmasını seçtiği düşünülmektedir. Bundan başka, Bcl-2 ve kaspaz inhibisyonunun baskılanması normalde apoptoza girebilecek bir hücreyi senesense girdirebilir (Nelyudova ve ark, 2007; Rebbaa ve ark, 2003). Benzer şekilde senesens olmasın diye telomeraz aktivitesinin yüksek derecede baskılanması hücreyi senesensden korur, fakat bu mekanizma aynı zamanda apoptoza karşı da hücreyi savunmuş olur (Gorbunova ve ark, 2002; Massard ve ark, 2006). Bu çalışmalar, tümör baskılayıcı protein olan p53'ün seviyelerini belirleyerek apoptoz ve senesens yol ayrımını aydınlatmak için örneklendirilmektedir (Seluanov ve ark, 2001). Ama apoptozve senesensin düzenlenmesinin tanımlanması hala anlaşılmaya uzak olup daha birçok çalışmayı gerekli kılmaktadır (Vicencio ve ark, 2008).

Senesensin apoptoz ile keskin ayırımına bakıldığında, hücresel senesens, hasarlı veya olası tümör özelliği taşıyabilen hücreleri apoptoz gibi seçici olarak temizlemez. Senesens yanıtı sadece dönüşümsüz olarak hücre çoğalmasını önler. Bundan dolayı tümör özelliği taşıyan, ama senesens'e uğrayan hücreler doku içinde kalmaktadır. Apoptoz ve hücresel

senesens çeşitli dış ve iç hücrel sinyallere verilen yanıtlardır. Bu iki sürecin memeliler gibi karmaşık organizmalardaki çoğu dokunun fonksiyonu ve sağlığı bakımından kritik rol oynadığı düşünülmektedir. Apoptoz ve senesens'i beraber gösteren hücreler diğer hücrelere göre özel bir konumda yer alırlar (Vicencio ve ark 2008). Fakat aynı anda apoptoz ve senesens'in karmaşık organizmaları nasıl etkilediği konusunda henüz bir karara varılmamıştır. Bunun yanı sıra apoptoz ve senesens'in kanser önlemede birbirlerine karşı geliştirebilecekleri bir antagonist durum ve tümör suprese edici etkideki bu iki hücrel olayın birbirleri ile dengesi halen araştırılmaktadır (Campisi 2013).

Hücrel senesens organizmanın strese karşı hayatta kalışını uzatıcı bir yanıt olsa da, organizmanın hayatta kalabilmesine negatif etkisi de vardır. Yaşla birlikte, yaşlanan (senescent) hücreler proliferatif dokuda birikmeye başlamaktadır. Bu hücreler büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler ve değişik proteazlar gibi maddeleri salgılamaktadır. Salgılanan maddeler ise komşu hücrelerin fonksiyonunu riske atmaktadır. İleri düzeyde yaşlanan hücrelerin birikimi progenitör kök hücreleri azaltmaktadır. Preneoplastik hücrelerin tümör hücrelerinde gelişimi uzun ömürlü olmanın aksine, ileri yaş kanser riskinin oluşmasına ortam hazırlamaktadır (Vicencio ve ark 2008).

2.7. Otofaji

Otofaji yunanca kökenli bir kelime olup, 'auto' , 'kendi', ' phagein' ise 'yeme' anlamına gelmektedir (Vicencio ve ark 2008). Bu tanım herhangi bir hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik durumlarda, besin sağlamak için, hücre içindeki yapıları nasıl parçaladığını ifade etmek için kullanılmaktadır.

Otofaji hücre içindeki makromoleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınıp lizozomlara yönlendirilerek, lizozomla birleşip parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır. Açlık durumu veya çeşitli stres koşulları hücrede otofajik aktiviteyi harekete geçirmektedir (Öz Arslan ve ark 2011).

Otofaji bir hücrenin hayatta kalım yolu olarak bütün ökaryot hücrelerde korunan bir mekanizmadır (Levine ve Klionsky, 2004). Hücrel homeostasis için bazal seviyede işleyen bir otofaji gereklidir. Fakat, infeksiyon, hipoksi ve besin yokluğu gibi hücre dışı stresin dahil olduğu durumların yanı sıra hasarlanmış protein ve organel birikimi ile yüksek biyoenerji ihtiyacı gibi hücre içi stresin olduğu durumlar hep birlikte otofaji mekanizmasının yeniden düzenlenmesini gerektirmektedir. Memelilerde, yaşlanma karşıtı mekanizmalar ile immun

yanıtın ortadan kaldırılmasındaki fizyolojik ve patolojik süreçlerde gerekli olan otofajinin ilkel ökaryotik hücrelerde besin sıkıntısına karşı geliştirilen bir yaşam sürdürme mekanizması olduğu düşünülmektedir (Shintani ve Klionsky, 2004; Sinha ve Levine, 2008).

Otofaji ve apoptoz ikisi birlikte, kanser karşıtı yollar olarak fonksiyon görmektedir (Su ve ark 2013). Otofajik hücre ölümü apoptoz ile karşılaştırıldığında, otofajik hücre ölümünde, kromatin yoğunlaşması gibi çekirdeğe özgü olaylar apoptotik hücre ölümüne göre çok daha sonra olmaktadır. Ölüm kaspaz etkinliğine bağlı olmadığından DNA merdivenleri ve apoptotik cisim oluşması gözlenmemektedir (Lockshin ve Zakeri, 2007; Krysko ve Vanden Berghe, 2008).

Otofajik hücre ölümü çoğunlukla stoplazmada gelişen bir ölüm tipidir. Apoptozun en önemli amacı ise DNA'nın ait olduğu hücre çekirdeğidir. Buradan da anlaşıldığı üzere apoptotik moleküler mekanizmalar çekirdeği yok ederken otofaji sitoplazmayı ve buradaki organelleri temizleyerek ölüm sürecini çabuklaştırıyor olabilmektedir. Otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki biraz daha incelendiğinde, otofajinin özellikle apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda aktive olduğu ve apoptozla ölmesi mümkün olmayan hücrelerin ölümüne yol açtığı gözlenmektedir. Bunun yanı sıra otofaji apoptoza paralel bir şekilde hücre ölümüne yol açabildiği gibi apoptozu baskılayarak da hücrenin hayatta kalmasını sağlayıp, apoptoz için bir ön koşul haline gelebilmektedir (Eisenberg-Lerner ve ark, 2009). Bütün bunların yanı sıra bazı durumlarda otofaji ve apoptoz hücrelerde birbirine zıt etkiler yapabilmektedir (Karantza-Wadsworth ve ark, 2007). Bu durumlarda otofaji hücre ölümüne karşı bir hayatta kalma mekanizması olarak çalışıp apoptozun durdurulması ve ölümün engellenmesine ortam hazırlayabilmektedir. Bundan başka otofajinin, kendi başına hücre ölümüne sebep olmaksızın, apoptotik hücre ölümüne, yardımcı olabileceği durumu da gözlenmektedir (Öz Arslan ve ark 2011).

Apoptoz yetersizliği hücre ölümü azalmasına yol açtığından dolayı, kanser oluşumunun en önemli etkeni olmaktadır. Apoptoz'un aksine otofaji ise tümör suprese edici bir rol üstlense de kanserdeki mekanizması henüz daha tam anlaşılabilmiş değildir (Su ve ark 2013). Bütün bu araştırmalardan yola çıkılarak apoptoz ve otofaji arasındaki karmaşık ilişkilere moleküler düzeyde bakıldığında otofajinin apoptoz sistemi ile birlikte düzenlenebileceği görüşüne varılabilmektedir (Öz Arslan ve ark 2011).

2.7.1. Tek Hücrelilerde Otofaji

Otofajik, ya da vakuoler hücre ölümü, *S. cerevisiae* mayasında, ipliksi bir mantar olan *P.anserina* 'da ve bunlardan başka *T. thermophila*, *L. donovani*, *E. invadens*, *A. castellanii* ve *T. cruzi* gibi bazı protozoon türlerinde bulunmaktadır. Otofaji apoptozdan farklı olarak çekirdek parçalanmasından önce sitoplazma bütünlüğünün bozulması ile karakterizedir. Otofajinin en önemli ayırıcı özelliklerinden bir tanesi ise membranların dinamik olarak yeniden düzenlenerek otofagosom formunun oluşmasıdır. Otofaji 'ATG' genleri içeren bir ubiquitin-benzeri birleşme sistemi ile ilişkilendirilmektedir. Otofaji genleri kaskadları birleştirici bir rol oynayarak, bu sürecin başlamasını ve düzenlenmesini kontrol etmektedir. Bu moleküler sürecin, insanlara göre tek hücreli ökaryotlarda daha yüksek oranda korunduğu düşünülmektedir (Reggiori ve Klionsky, 2002). Bununla beraber, *S. cerevisiae* mantarlarında yaklaşık 30 adet ATG genlerinin, otofaji için önemli genler olduğu tespit edilmiştir. Bunların arasında 17 tanesi otofagosom için zorunludur. TbAT68B olarak tanımlanan otofaji-ilişkili gen, *T. brucei* protozoonunda tespit edilmiştir. Bu molekül (moleküler ağırlığı:13.7kDa) ubiquitin-benzeri proteinlere ait olup, tipik ubiquitin katlanması göstermektedir. Aynı zamanda LC3 insan homoloğu olan gene, güçlü sekansta bir homoloji olduğu bildirilmektedir (Koopmann ve ark, 2009). Otofajik ubiquitin-benzeri birleştirici sisteme sahip olmaları nedeniyle aslında, ilkel ökaryotların ne kadar sıradan bir moleküler mekanizma barındırdıkları görülmektedir. Kaspaz benzeri proteinler ve otofaji-ilişkili genler tek hücreli ökaryotlarda iki türlü hücre ölümünün varlığını doğrulamaktadır. Bunlar apoptoz benzeri hücre ölümü ve otofajidir (Shemarova 2010).

2.8. Otofaji, Apoptosis ve Senesens İlişkisi

Otofaji , stres ortamındaki hücreleri çoğu durumda hayatta kalmaya adapte ederek desteklemektedir. Gerçekte otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki karmaşıktır ve açıkçası hücrenin ne apoptoz ne de otofaji ile ölüme gittiği henüz tam anlaşılabilmiş değildir. Bazı hücrelerde, apoptoz inhibe olduğunda hücre ölümünün arkasında yatan mekanizmanın otofaji olduğu rapor edilmiştir(Shimizu ve ark, 2004). Bunun aksine eğer hücrede besin kısıtlanması gerçekleşirse otofaji bloke edilip, Bax/Bak veya inhibe kaspazların yavaşlayan yıkımlanmaları hızlanarak apoptoz gerçekleşmektedir (Maiuri ve ark, 2007). Tümör hücreleri, sitotoksik ilaçlara maruz kaldığından otofajik hücre ölümünün apoptozle birlikte senesensiönlediği bildirilmektedir (Demasters ve ark, 2006; Hansen ve ark, 2007). Bütün

bunların ışığında p53 adı verilen tümör suprese edici protein, bütün bu süreçler arasında rehberlik ederek baş düzenleyici olma konumunda kendini yeniden göstermektedir.

Senesensli hücrelerde ve postmitotik hücrelerde otofaji strese karşı gelişen bir adaptasyon mekanizması gibidir. Otofagosom ise yaşlanmış fibroblastlarını biriktirerek sitozoldeki organellerin yenilenme sürecine kolaylaştırıcı etki sağlamaktadır. Hücrelere besin kısıtlaması uygulanması kültürdeki hücreler için iyi tanımlanmış bir otofaji indüklemesidir. Böylelikle otofajinin adaptasyonu memeli hücrelerinin yanı sıra tek hücreli (mantarlar gibi) organizmalarda da rapor edilmiştir. Ayrıca diyet kısıtlamasının güçlü bir otofaji stimülatörü olduğu farelerde ve *C.elegans* nematodunda da gösterilmiştir. Otofajinin yaşlanmayı azaltmadaki kesin etkisi henüz tam olarak anlaşılamamaktadır. Bütün bunların dışında otofajinin arttırılması DNA hasarının uzun süreli etkisini ortadan kaldırmaya yardım etmektedir (Vicencio ve ark 2008).

2.9.Nekroz

Nekroz apoptoz ile kıyaslandığında, hücrenin intihar edip bir anda kendi kendini öldürmesinden ziyade bir dizi yıkım ve parçalanma süreçlerini içeren pasif bir ölüm şeklidir (Kitanaka ve Kuchino, 1999).

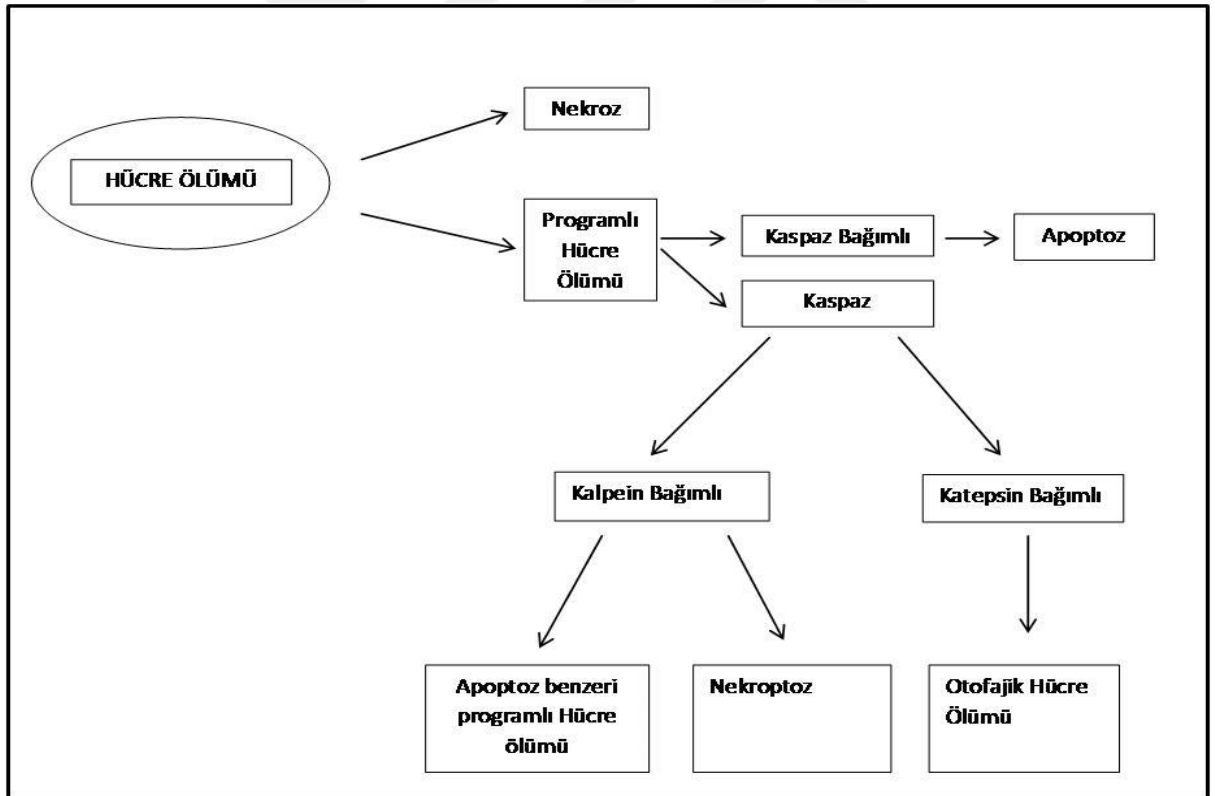
Nekroz morfolojik olarak sitoplazmanın vakuolleşmesi, plazma membranının parçalanması ve inflamasyon olarak kendini göstermektedir. Nekrozda, hücreler sıklıkla çekirdekte meydana gelen morfolojik değişiklikleri gösterirken, kromatin kondenzasyonu ve 200 bp'lik DNA kırılmasıyla karakterize olan apoptotik hücre ölümüne ait bulgulara rastlanmamaktadır (Edinger 2004).

Nekroz, hızlı bir sitoplazmik şişme ile karakterize olduğundan sıklıkla onkosis terimi de kullanılmaktadır (Berghe 2013). Bundan dolayıdır ki, 'onkotik hücre ölümü' ve 'onkotik nekrozis' hücre şişmesi ile karakterize hücre ölümünü ifade etmede kullanılan alternatif terimlerdir (Majno ve Joris, 1995; Levin ve ark, 1999).

Apoptoz ve nekrozun morfolojileri birbirlerinden farklı olsalar dahi bu iki süreç aslında birbirlerine dönüşebilmektedir. Veriler , nekroz ve apoptozun, 'apoptoz ve nekrozis süreci' adı ile tanımlanan morfolojik bir ifade sergilediğini doğrulamaktadır (Zeiss, 2003). Örneğin, hazırda bulunan kaspazların ve hücre içindeki ATP'nin azalması devam eden bir apoptotik süreci nekrotik sürece dönüştürebilir (Leist ve ark, 1997; Denecker ve ark, 2001). Hücrenin apoptoz ya da nekrozla mı öleceği durumu; hücre ölüm sinyallerininin doğası, hücre

tipi, dokuların gelişim aşamaları ve fizyolojik reaksiyonlara bağlı olmaktadır. Aynı anda oluşan apoptoz ve nekrozu birbirinden ayırmak her zaman kolay değildir ve bu durum, indükleyicinin yoğunluğuna, süresine, ATP tüketmesine ve kaspazların varlığına bağlı olmaktadır (Zeiss, 2003). Nekroz kontrol edilemeyen ve pasif bir süreç olup genelde büyük bir hücre topluluğunu etkilerken, apoptoz ise kontrol edilebilen enerji bağımlı bir süreç olup kümeleşmiş ya da tek olan hücreleri etkilemektedir (Elmore, 2007).

Nekrotik hücre yaralanmalarına iki temel mekanizma aracılık etmektedir, bunlar; hücrenin enerji gereksinimine girişim yapılması ve direk hücre zarına hasar verilmesi, şeklinde açıklanabilir. Nekrozla birlikte gerçekleşen bazı major morfolojik değişiklikler; hücrenin şişmesi, sitoplazmik vakuollerin oluşumu, gerilmiş bir endoplazmik retikulum, sitoplazmik kabarcık oluşumu, yoğun, şişmiş ya da kopuk mitokondri, ribozom ufalanması ve ayrılması, bozulmuş organel membranları, şişmiş ve kopmuş lizozomlar ve en nihayetinde parçalanmış bir hücre zarı şeklinde özetlenebilir (Kerr ve ark, 1972; Majno ve Joris, 1995; Trump ve ark, 1997).



Şekil 2. Hücre ölüm tipleri ve bunların birbirleri ile ilişkisi(Nikoletopoulou ve ark, 2013).

2.9.1. Programlı Nekroz: Nekroptoz

Son yıllarda nekrozun, hücre ölümünün programlı bir şekli olarak da fonksiyon gösterebileceği bir formu açıklık kazanmış olup apoptozu indükleyen aynı ölüm sinyalleri ile tetiklenebileceği ortaya çıkarılmıştır. Yapılan bir çalışmada, F 17 hücrelerine TNF α tedavisi ile apoptoz indüklenmek istenirken hücre ölümünün nekrotik formu şekillenmektedir (Nikoletopoulou ve ark, 2013). RIPK1 (reseptör etkileşimli protein 1), RIPK3 (kinase reseptör etkileşimli protein 3) ile etkileşerek nekroz sinyal kompleksini oluşturur ve bu da 'nekrosom' olarak adlandırılır. RIPK1-RIPK3 bağımlı nekrosis ölüm reseptörlerinin birbirine bağlanmasıyla ya da kaspazların inhibisyonu sonucu indüklenmektedir (Berghe 2013).

Nekroptoz terimi ise apoptoz'den farklı, programlanmış düzenli bir nekroz formu olarak tanımlanmıştır. Apoptoz da olduğu gibi TNFR1' e ek olarak FAS, TNFR2, TRAILR1 ve TRAILR2 dahil birçok ölüm reseptörü değişik hücre tiplerinde nekroptozu indüklemektedir (Vercammen ve ark, 1998; Chan ve ark, 2003; Holler ve ark, 2000).

Nekroptoz genelde T hücrelerinde ATP seviyesi çok düşük olduğu zaman apoptozun bloke olmasıyla kendini göstermektedir. TNF α yokluğunda, TNFR1 alt birimleri plazma membranında üç katına çıkmaktadır. TNFR-ilişkili ölüm alanı (TRADD), RIP1 (reseptör etkileşimli protein 1), apoptozun hücrel inhibitörleri cIAP1 (hücre inhibe edici apoptoz proteini), cIAP2, TNF reseptör ilişkili faktör 2 (TRAF2) ve TRAF5'in de dahil olduğu reseptör trimerleri sitozolik uçlarını kuvvetlendirip büyük proteinlere dönüşmek için konformasyonel değişiklikler geçirmektedirler. Sonuç olarak büyük bileşikler plazma membranında kompleks 1'i oluşturmaktadır ve NF- κ B sinyal yolunu aktive etmektedir (Nikoletopoulou ve ark, 2013).

TNF α 'nın TNFR1'e bağlanması sitozolik ölüm-indükleyen sinyal kompleksini , bir diğer adıyla kompleks II'yi oluşturmaktadır. RIP1, çoklu ubiquitin reaksiyonunda sadece NF- κ B aktivasyonunu değil aynı zamanda kompleks I'in kompleks II'ye dönüşmesini de etkilemektedir. Ubiquitin reaksiyonu tersinde, RIP1 de bir protein kompleksine dönüşüp, TRADD, FAS ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) ve kaspaz-8'i etkilemektedir. Kompleks II'deki RIP1 VE RIP3 kaspaz-8'in proteolitik bölünmesiyle inaktive edilir ve böylece pro-apoptotik kaspaz aktivasyon kaskadbaşlatılmış olur. cIAPs'nin inhibisyonu RIP1'in ubiquitin reaksiyonu ve kompleks II formunu korumaktadır bu da, hücrelerin, kaspaz-8'in RIP1-bağımlı aktivasyonu ve apoptoza karşı olan eğilimlerini hassaslaştırmaktadır. Buna karşın,

kaspaz-8 inhibe olduğu zaman kompleks II, apoptotik programı başlatamamaktadır ve TNFR1'in ligasyonu nekroptoz ile sonuçlanmaktadır (Nikoletopoulou ve ark, 2013).

2.10. Leishmaniasis'de İlaç Tedavisi

Bir protozoon paraziti olan *Leishmania* dünyanın bir çok yerinde endemik seyirli olup, sayısız ülkede ciddi bir sağlık problemi oluşturmaktadır. Bu parazitin bir çok formu insanda patojendir ve hastalığın üç patojen formu olan kutanöz, visseral ve mukozal leishmaniasisten sorumlu olmaktadır. Leishmaniasis günümüzde Birleşik Devletler'de acil durum belirten bir zoonoz hastalıktır (Enserink, 2000; McHugh ve ark, 2003; Rosypal ve ark, 2003). Bununla beraber Orta Doğu da risk altındadır. Ne yazık ki tedavi uygulamasında hala bu enfeksiyona karşı geliştirilen bir aşı mevcut değildir. Hastalığa karşı korunma, ilaçlara dayalı bir şekilde yapılmaktadır. Fakat mevcut ilaçların da her birinde tedavi sırasında bir takım eksiklikler fark edilmiştir (Sundar ve ark, 2000).

Pentavalan antimoniyaller anti-*Leishmania* terapisinde uzun süredir kullanılan ve tedavide hala önemli rol oynayan bir ilaçtır. Ama dünyanın bir çok ülkesinde (örneğin, Hindistan'ın kuzeydoğusunda) bu grup ilaçlara karşı direnç gelişmektedir. İkincil kuşak ilaçlardan Pentamidin ve Amfoterisin B ise toksisite ve fiyat dezavantajları yüzünden yaygın olarak kullanılamamıştır. Bu yüzden ilaç güvenilirliği konusunda henüz elde edilen tam bir tecrübe mevcut değildir. Son yıllarda, miltefosin adındaki oral ilaç insandaki visseral leishmaniasis tedavisinde büyük bir rağbet görürken, flukonazol adındaki bir başka oral ilaç da kutanöz leishmaniasis'e karşı etkili bir ilaç olarak uygun görülmekte (Quellette ve ark, 2013).

Leishmania tedavisinde kullanılabilecek ilaçlar için günümüzde halen bir çok deney ve çalışma yapılmaktadır. Mevcut ilaçların da birbiri ile etkileşimi, toksisite durumu, maliyeti, bir ve birden fazla ilaca karşı gelişebilecek direnç ve daha bir çok faktör göz önünde bulundurularak en uygun tedavi protokolü araştırılmaktadır (Quellette ve ark, 2013).

2.10.1. Pentavalan Antimoniyaller

Leishmania tedavisinde, vissera leishmaniasise karşı başlangıçta üç değerlikli antimoniyaller kullanılıp (SbIII), sonraları beş değerlikli antimoniyallerin (SbV) hastalığa karşı hem daha etkili olduğu hem de SbIII'e göre daha az toksik olduğu keşfedilmiştir (Moore

ve ark, 2001; Ritmeijer ve ark, 2001). Birinci kuşak ilaçlardan sodyum stiboglukonat (Pentostam) 50 seneyi aşkın bir süredir denenmektedir. Meglumin antimonat (Glucantime®) klinikte kullanılan bir diğer pentavalan antimoniyal formülasyondur (Roberts ve Rainey, 1993). Antimoniyaller uzun süre tedavide kullanılmasına rağmen hala etki mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir, fakat son yıllarda elde edilen verilerde, antimoniyallerin, tripanotion redüktaz ederek hücre içine tiyol akışını indüklediği belirtilmektedir (Quellette ve ark, 2013).

Leishmania'ya karşı etkili olabilmek için, SbV konak hücrelerine girmek zorundadır ve fagolizozoma lmembranı geçerek hücre içi amastigotlara karşı aktivite göstermektedir. Aynı zamanda SbV etkisini gösterebilmek için üç değerlikli forma (SbIII) indirgenmek zorundadır. Ama bu dönüşümün etki mekanizmasının detayı halen açıklık kazanmamıştır. Bir indirgenme reaksiyonu veya ilaç aktivitesinin kaybolması parazitin ilaca karşı direnç kazanmasıyla ilişkili olabilmektedir. Gerçekte *Leishmania donovani* aksenik amastigotları SbV'ye dirençlidir. SbV'li in vitro ortamdan seçilen ve ilaca karşı direnç gösteren promastigotlar ise SbV'yi SbIII'e az da olsa indirgeme yeteneği göstermektedir (Shaked-Mishan ve ark, 2001).

Antimoniyallerin parazitin önemli biyolojik özelliklerini hedef alarak etki ettikleri düşünülmektedir. Makrofajların enfekte olduğu modellerde SbV leishmanisidaldır, fakat hayvan enfekte modellerde, ilaç etkisi T hücre alt kümeleri ve sitokinlerin de dahil olduğu sayısız faktöre bağımlı olmaktadır (Murray, 2001). Son yıllarda sitokinlere karşı cevapta artışı sağlayan bir protein tirozinfosfataz inhibitörü olan stiboglukonat bulunmuştur (Pathak ve Yi, 2001). SbV parazitleri direk ve indirek mekanizmalarla öldürürken konağın immun sisteminin de SbV aktivitesine etki ettiği söylenebilir (Quellette ve ark, 2013).

Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki, SbIII ve SbV *Leishmania* türlerinde DNA kırılmasını göstermiştir, böylelikle antimoniyallerin parazitleri apoptoz yoluyla öldürebildikleri önerilmektedir. Bununla beraber SbV'nin birikimi kütle spektrometrik analiz ile ölçülüp, aksenik amastigotlarda, promastigotlara oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Gerçeğe bakılırsa, SbV farmakolojik konsantrasyonlarda hem promastigotlarda hem de amastigotlarda birikim gösterse de ilacın in vitro olarak antileishmanial aktivitesine rastlanılmamıştır. Buna rağmen bazı çalışmalarda aksenik amastigotların ilaca hassasiyeti belirlenmiştir (Quellette ve ark, 2013). Ama yine bu durumda hücre kültüründeki Ph, tiyol konsantrasyonu ve ortam şartları gibi faktörlerin de etkili olabileceğinin, göz ardı edilmemesi gerektiği düşünülmektedir (Carrio ve ark, 2000; Santos Ferreira ve ark, 2003).

2.10.2.Pentamidin

Visseral leishmaniasis tedavisinde SbV'ye direnç kazanma durumuna karşı, izetiyonat veya methansülfonat adlı pentamidin tuzları ikinci kuşak ilaçlar olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber, Hindistan'da parazitlerin direnç geliştirmesi sonucu pentamidine tedavisi hızlıca terk edilmiştir (Sundar, 2001). Pentamidinin toksik yan etkileri (hipertansiyon, hipoglisemi, diabet, nefrotoksisite) dikkate alındığında kullanımına sınırlama getirilip ikincil yol olarak uygulanan tedaviden gün geçtikçe vazgeçilmektedir. Fakat ilacın diğer antileishmanial ilaçlarla birlikte kombine edilmesiyle aktivitesinin yenilenip daha iyi bir tedavi protokolü sunacağı düşünülmektedir. Örneğin SbV ile pentamidin kombinasyonunun sonucu şu an bilinmezlik içinde olsa bile, tedavi için umut vadedeceği yönünde görüşler mevcuttur. Hem promastigotlarda hem de aksenik amastigotlarda in vitro şartlarda pentamidine direnç söz konusu olmaktadır. Yapılan önceki çalışmalarda pentamidine olan direncin hücre içi arjinin ve poliamin konsantrasyonları ile ilişkili olduğu, aynı zamanda ilacın hücreye arjinin ve poliamin taşıyıcılarla girdiği önerilmektedir (Basselin ve ark, 2000; Kandpal ve Tekwani, 1997). Son yıllardaki çalışmalar göstermiştir ki, pentamidin mitokondri içinde birikmektedir (Basselin ve ark, 2002) ve gerçekte pentamidin, muazzam bir şekilde mitokondriyal solunum zincir kompleksi II inhibitörünün, etkisini arttırmaktadır (Mehta ve Shaha, 2004). In vitro olarak pentamidine karşı direnç gelişmesi durumunda ise ilaç mitokondride birikmemektedir (Basselin ve ark, 2000).

2.10.3. Amfoterisin B

Amfoterisin B (AmB) sistemik mantar enfeksiyonlar için geliştirilen antifungal bir ilaçtır. AmB fungal membran sterollerinden tercihen ergosterol ile etkileşim halindedir. Mantarlar gibi, *Leishmania*'nın da major membran sterolü, ergostane merkezli yapılandırılmış olup, bu durum AmB'nin *Leishmania*'ya olan etkisini en iyi şekilde açıklamaktadır (Goad ve ark, 1984).

AmB yüksek etkili bir ilaç olmasına rağmen bir çok yan etki bulunduran toksik de bir ilaçtır. Bununla beraber, SbV'ye karşı gelişen direnç durumunda tercih edilmektedir. Kendisine oluşabilecek direncin ise, hemen meydana gelmemesi, bu ilacı avantajlı kılmaktadır. Aynı zamanda AmB'nin lipid formülasyonları, *Leishmania* tedavisine karşı yüksek etkili olup, düşük toksik özellik barındırmaktadır (Sundar, 2000; 2004). AmB'ye direnç gelişimi çok önemli bir problem gibi oluşturmadığı söylenebilir. Ama, sadece HIV-

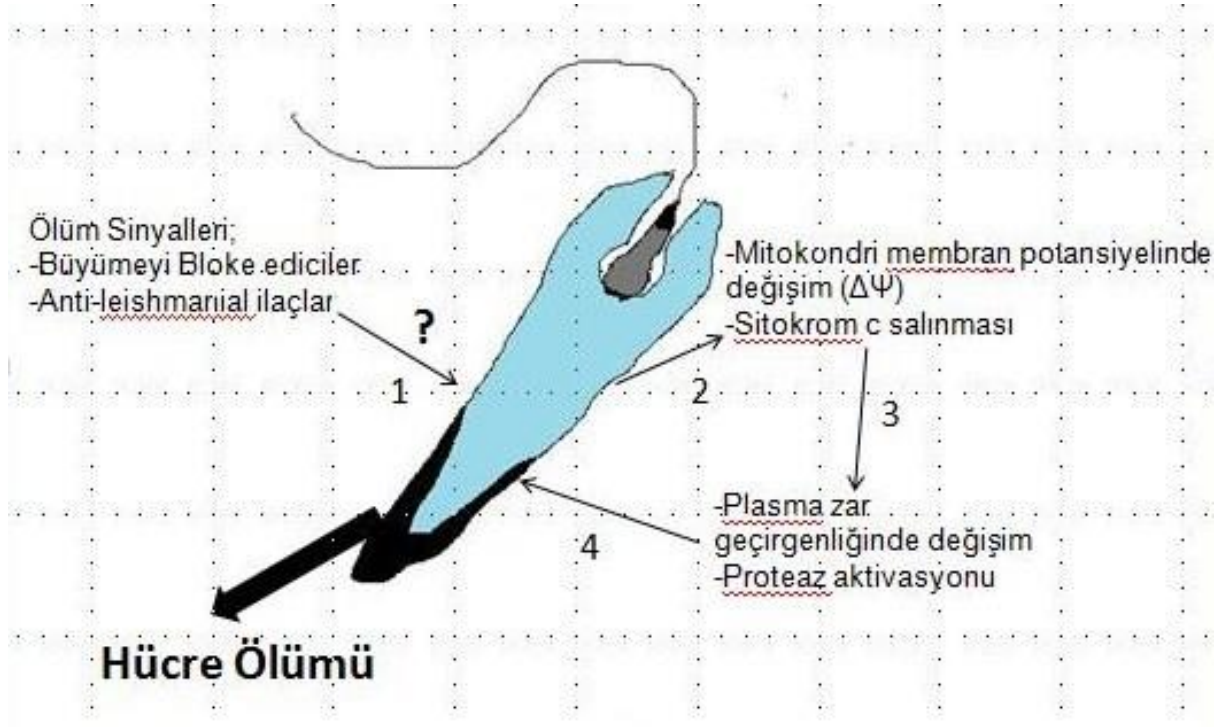
pozitif hastalar için tedavi sonrası hastalığın nüksetme durumu gözlenmiştir ve nüksetme durumundaki artış ilaca olan direnci de arttırmaktadır (Singh ve ark, 2001).

Leishmania'daki sterol kompozisyonunun ve sterol biyosentezinin, mayadakinine benzer olması durumu, *Leishmania*'ya karşı geliştirilebilecek sayıca antifungal sterol biyosentez inhibitörünün, mayalarda test edilmesine olanak sağlamıştır (Roberts ve ark, 2003). Bu veri ışığında *L. major* tarafından oluşturulan kutanöz leishmaniasis'de altı hafta oral olarak flukonazol kullanılmasının etkili olduğu gösterilmiştir (Alrajhi ve ark, 2002). İn vitro olarak yapılan testlerde çeşitli inhibitörler *Leishmania*'nın sterol kompozisyonunda değişiklik yaratmaktadır, fakat *Leishmania*'nın bu duruma hemen adaptasyon gösterdiği ve ilaç etkisinden kurtulup yaşamaya devam etmeyi sürdürdüğü gözlenmektedir. Bu durumda tedavide sterol yapısını hedef tek bir ilacın yeterli olmadığı ve birden fazla ilacın kombine edilmesinin tedavide yarar sağlayacağı düşünülmektedir (Quellette ve ark, 2013).

2.10.4. Miltefosin

Alkalifosfokolinler serisinden (hexadecylphosphocholine) olan antitümör ajanı olarak geliştirilen bir ilaçtır. Miltefosin ilk olarak *L. donovani*'ye karşı in vitro ortamda etkili bir ilaç olduğu keşfedilmiş (Croft ve ark, 1987) ve daha sonra yapılan çalışmalarla desteklenerek Hindistan'da visseral leishmaniasisi için önerilen bir oral ilaç olmuştur (Sundar ve ark, 2002). Miltefosinin aktivite reaksiyonları tam olarak bilinmese de alkali-lipid metabolizması ve fosfolipid biyosentezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Lux ve ark, 2000). Promastigotlarda in vitro yapılan çalışmalarda miltefosinin apoptotik hücre ölümünü indüklediği gözlemiştir (Paris ve ark, 2004). *Leishmania* da diğer metazoa türlerinde olduğu gibi apoptoz mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Debrabant ve ark, 2003; Zangger ve ark, 2002).

Leishmania gibi apoptoz benzeri ölüm şekli gösterebilecek parazitlerde kullanılan ilaçların, moleküler olarak etki mekanizmasının bilinmesi ve ilaç direncinin in vitro olarak gözlenmesi, parazitlerdeki apoptoz mekanizmasının aydınlatılmasına da yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Miltefosinin in vivo olarak uygulanmasının, hastalarda herhangi bir ilaç direnci geliştirmediği önerilmektedir. Ama direnç oluşumunun in vitro çalışmalarla indüklenebileceği de belirtilmektedir (Perez-Victoria ve ark, 2003; Seifert ve ark, 2003).



Şekil 3. Programlı hücre ölümünü indükleyen durumlar ve *Leishmania* promastigotunun bu koşullar altında vereceği olası bir yanıt durumu (Debrabant ve ark, 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Promastigotların Üretilmesi

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda deri leishmaniasisli bir olgudan elde edilen ve NNN besi yerinde üretilmiş, aynı zamanda kriyopreservasyon işlemi yapılarak sıvı nitrojende saklanmış *Leishmania tropica* promastigotları çalışmanın materyalini oluşturdu.

Promastigotların çoğaltılması amacı ile canlandırma işlemi sonrasında promastigotlar %10 Fetal buzağı serum ilaveli 1640 RPMI (Biochorom) besiyerinde 24-26 °C'lik etüvde inkübe edildi. Promastigotların çoğalması logaritmik faza geldiği zaman uygulanacak testler için hazırlanmaya başlandı.

3.2. DNA Kırılmasının Elektroforez Yöntemi ile Belirlenmesi

Leishmania tropica promastigotları iki adet hücre kültürü flaskında çoğaltıldı. Hücreler logaritmik faza ulaştınca flasklardan biri alındı ve promastigotlar toplandıktan sonra, pH'sı 7.0-7.2'ye ayarlanmış steril PBS (0.9%) (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi Ph:7.0-7.2; Dipotasyum hidrojen fosfat 1.1 g; Potasyum dihidrojen fosfat 0.32 g; Sodyum klorür 8.5 g) ile yıkama işlemi yapılarak 2000 rpm'de 2 kez, 5 dk santrifüj edildi. Promastigotların sayısını belirlemek amacıyla pelletten bir miktar alınarak %10 formol ile sulandırıldı. Daha sonra hemositometre lamında promastigotlar sayıldı. Sayı tespit edildikten sonra analiz yapılacak her bir ependorfa 5×10^5 hücre gelmesi için toplam 75×10^5 hücre 1640 RPMI besi yerine konuldu. Hücreler homojen şekilde dağıldıktan sonra iki hücre kültürü flaskına bölündü. Birinci flastaki promastigot süspansiyonu, 1ml'sinde 5×10^5 hücre olacak şekilde beş tane efendorfa konuldu. Staurosporin (Enzo)ilacından her bir efendorfa; 100µmol, 50µmol, 25µmol, 12.5µmol ve 6.25µmol olacak şekilde, 5 doz uygulandı ve 24-26 °C'lik etüvde 24 saat bekletildi. İkinci hücre kültürü flaskındaki hücrelere ise aynı işlemler miltefosin (Impavido®, SantaCruzBiotechnology, Heidelberg, Germany) ilacı için uygulandı.

Glukantim® (SantaCruzBiotechnology) ilacı için ise logaritmik faza ulaşan üreme dönemindeki *Leishmania tropica*'ları içeren bir diğer flask kullanıldı. Hücre kültürü flaskındaki promastigotlar toplandıktan sonra, pH'sı 7.0-7.2'ye ayarlanmış steril PBS ile

yıkama işlemi yapılarak 2000rpm'de 2 kez, 5 dk santrifüj edildi. Promastigotların sayısını belirlemek amacıyla pelletten bir miktar alınarak %10 formol ile sulandırıldı. Daha sonra hemositometre lamında promastigotlar sayıldı. Sayı tespit edildikten sonra analiz yapılacak her bir ependorfa 5×10^5 hücre gelmesi için toplam 75×10^5 hücre 1640 RPMI besi yerine konuldu. Hücreler homojen şekilde dağıldıktan sonra promastigot süspansiyonu, 1ml'sinde 5×10^5 hücre olacak şekilde beş tane ependorfa konuldu. Daha sonra Glukantim® (Meglumin antimonat, N-methyl-glucamine antimoniate) ilacının 15mg/ml dozu, yarı yarıya sulandırılarak (7.5mg/ml, 3.75mg/ml, 1.875mg/ml, 0.9375mg/ml) beş ependorfa uygulandı. Ependorflar 24-26 °C'lik etüvde 72 saat bekletildi.

Beklenilecek süre sonunda Quick Apoptotic DNA LadderDetection Kit (Invitrogen Catalog KHO1021) ticari kit prosedürü doğrultusunda test gerçekleştirildi.

3.2.1. Testin Yapılışı

- 5×10^5 hücre bulunan her bir ependorf 500 g devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet yine aynı devir ve dakikada PBS ile yıkandı.
- Dikkatlice süpernatant kısmı alındı.
- Hücreler 35 µL TE Lizis Tampon Solüsyonu (Tris ve EDTA içeren tampon solüsyonu) ile birkaç defa pipetaj yapılarak lizis işlemi gerçekleştirildi.
- 5µL Tris ve NaCl içeren Enzim A solüsyonukonuldu, vorteks yapıldı ve 37°C de 10 dakika sıcak su banyosuna konuldu.
- 5µL EnzimB solüsyonu (275µL, TE lizis tampon solüsyonunda çözünen Enzim B) konularak 50 °C de lizat berraklaşana kadar 30 dakika sıcak su banyosunda bekletildi.
- 5 µL amonyum asetat solüsyonu konuldu ve 100 µL(-20 °C olan soğuk etanol) konularak vorteks yapıldı, -20 °C de 10-15 dakika DNA'nın çökmesi beklendi.
- Çöken DNA'nın toplanması için 10 dakika 12,000 ve 14,000 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı alındı.
- %70 soğuk etanolden 0.5 ml, DNA pelletlerinin yıkanması için eklenip, tekrar 10 dakika 12,000-14,000 rpm de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant kısmı alındı ve DNA pelletleri 10 dakika oda ısısında kurumaya bırakıldı.
- 30µL DNA süspansiyon tamponu ilave edildi ve pipetaj yapıldı.

- 1.2'lik agaroz jel (1X TBE) hazırlanıp örnekler 15 den 30 µL'ye kadar kuyucuklara yerleştirildi.
- 5 V/cm ayarında 2 saat süre ile testin jelde sonlanması işlemi beklenildi.
- Süre sonunda jel UV ışığı altında fotoğraflandı.

3.3. DNA Kırılmasının TUNEL Yöntemi ile Gösterilmesi

Logaritmik faza ulaşmış promastigotlar toplandıktan sonra, pH'sı ayarlanmış steril PBS ile yıkama işlemi yapılarak 2000 devirde 5 dk 2 kez santrifüj edildi. Daha sonra 1640 RPMI besi ortamı bulunan (24 kuyucuklu) hücre kültürü plağına alındı. Her bir ilacın 5 dozu olduğu için toplam 15 kuyuğa promastigotlu 1640 Medium besi ortamı süspansiyonu hazırlandı. Staurosporine, Miltefosine ve Glukantim® ilaçları promastigotların bu belirlenen kuyucuklara dozları ayarlanarak uygulandı. Staurosporine için beş kuyucuğa 100µmol, 50µmol, 25µmol, 12.5µmol ve 6.25µmol olacak şekilde 5 doz 24 saat boyunca *Leishmania tropica* promastigotlarına etki edecek şekilde 24-26 °C'lik etüvde bekletildi. Miltefosine ilacı da aynı şekilde uygulandı. Glukantim® ise hücre sayısı aynı olacak şekilde 15mg/ml dozundan yarı yarıya sulandırılarak (7.5mg/ml, 3.75mg/ml, 1.875mg/ml, 0.9375mg/ml) 3 gün bekletildi. Miltefosine ve Staurosporin ilaçları ile aynı gün analize alınması için Glukantim® uygulaması daha önce yapıldı. Beklenen süre sonunda hücreler besi ortamı uzaklaştırılarak PBS (0.9%) ile yıkandı. Daha sonra, promastigotlar, %1 paraformaldehit içeren PBS ile karıştırıldı. Bu işlem promastigotların analiz yapılacak kuyucuklu lamlara tutunmaları sağladı. Her kuyucuğa 50-100 µL hücre süspansiyonundan konularak 9 adet yayma preparat hazırlanıp oda ısısında kurumaya bırakıldı. Apoptotik hücrelere özgün 180-200 bazlık DNA parçalarının gösterilmesi için DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlayan in situ DNA fragmentasyonu, TdT (terminal deoksiniükleotidiltransferaz) aracılı floresan-dUTP işaretleme (TUNEL) yöntemine dayanan TUNEL 'ApopTagPeroksidaz in Situ Apoptoz Detection Kit' (Millipore S7101) ticari kiti kullanıldı.

3.3.1. Testin yapılışı

- Hücre süspansiyonunun lamların kuyucuklarında kuruması ve yapışması tamamlanınca 2 defa PBS (0.9%) ile 5'er dakikalık sürelerde yıkamaya alındı.
- %3 hidrojen peroksit içeren PBS'de 5dakika oda ısısında beklenildi.

- Süre tamamlanınca PBS ile iki defa 5'er dakika süre ile yıkamaya alındı.
- Her bir kuyucuğun etrafı temizlenerek kuyucuklara $75\mu\text{L}/5\text{cm}^2$ olacak şekilde dengeleme tamponundan damlatıldı.
- 10 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra $55\mu\text{L}/5\text{cm}^2$ olacak şekilde TdT enzim çalışma solüsyonundan damlatıldı.
- Nemli etüvde 37°C de 1 saat bekletildi.
- Her bir lam yıkama kabına alınarak durdurma solüsyonunda 10 dakika oda ısısında bekletildi.
- Her bir lam 3 kez 1'er dakikalık PBS'de yıkandı .
- Yıkamadan sonra her kuyucuğa Anti-digoksinin peroksidaz konjugat'dan $65/5\text{cm}^2$ damlatılıp, 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- İnkübasyondan sonra lamlar PBS ile 4 kez 2 dakikalık süre ile yıkandı .
- Yıkamadan sonra her bir kuyucuğa $75\mu\text{L}/5\text{cm}^2$ peroksidaz substrat damlatıldı.
- 3-6 dakika oda ısısında bekletildi.
- Bu sürede içinde mikroskopta renk değişimi gözleendiği zaman hiç vakit kaybedilmeden ,reaksiyonu tamamlanan lamlar, deiyonize su dolu yıkama kabına konuldu.
- 3 kez 1'er dakikalık deiyonize su ile yıkama işlemi yapıldı.
- Daha sonra, lamlar deiyonize suda 5 dakika oda ısısında bekletildi.
- Bu işlemden sonra lamlar % 0.5 metilen yeşili içeren kapta 10 dakika bekletildi.
- Lamlar 3 kez, 10 saniye deiyonize su ile yıkandı.
- %100 N-butanol içeren kapta 3 kez 10 saniye süre ile bekletildi.
- Son olarak lamlar, 3 tane ksilen içeren kapta ayrı ayrı iki dakika bekletilip reaksiyon sonlandırıldı.
- Son olarak lamlara lamel kapatılıp mikroskopta incelendi.

3.4. Promastigotlardaki Bcl-2'nin ELİSA Yöntemi ile Analizi

Logaritmik faza ulaşmış promastigotlar üzerine Miltefosin ve Staurosporinde olduğu gibi Glukantim® ilaçlarının aynı dozları uygulandıktan sonra, her bir ilaç için 5'er dozdan

oluşan, beş grup yapıldı. Fakat Glukantim’de ilaç etkisinin oluşması için 24-26 °C’lik etüvde 72 saat bekletildi. Glukantim® grubunun Miltefosin ve Staurosporin gruplarıyla analiz zamanının eşitlenmesi için Glukantim® grubu 3 gün önceden hazırlandı.

Beklenen süre sonunda Bcl-2 düzeyleri EIA kit Catalog No:ADI-900-133 (Enzo®) ticari kiti prosedürü doğrultusunda ELİSA (Optic İvymen System 2100-C, İspanya) cihazında ölçüldü.

3.4.1. Testin Yapılışı

- 5×10^5 hücre bulunan her bir ependorf 500 g devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet yine aynı devir ve dakikada PBS ile yıkandı.
- Dikkatlice süpernatant kısmı alındı.
- Bütün ependorflara, hücre lizis tampon solüsyonundan konularak hücre pelletinin lize olması sağlandı.
- Staurosporin, miltefosin ve Glukantim® gruplarından 100µL alınıp, 96 kuyucuklu ELİSA plağının çalışılacak kuyucuklarına konuldu.
- Pipet ile çalışılan kuyucuklara pipetaj işlemi yapılarak karıştırıldı.
- Plağın üstü şeffaf streç bir bantla kapatılarak 1 saat, oda sıcaklığında 500 rpm’de hafif çalkayan çalkalayıcıda (Insel Hamble SO38DH, İngiltere) inkübe edildi.
- Süre sonunda kuyucuklara, 400µL yıkama solüsyonu konularak 4 kez yıkama işlemine alındı. En son yıkama sonrası kuyucuklardaki sıvı bir hamlede dökülerek, kuyucukların içinde hiç sıvı bırakılmamaya çalışıldı.
- Blank haricinde çalışılan bütün kuyucuklara 100µL mavi konjugat konuldu.
- Plağın üstü şeffaf streç bir bantla kapatılarak 30 dakika, oda sıcaklığında 500 rpm’de hafif çalkayan çalkalayıcıda inkübe edildi.
- Süre sonunda kuyucuklara, 400µL yıkama solüsyonu konularak 4 kez yıkama işlemine alındı. En son yıkama sonrası kuyucuklardaki sıvı bir hamlede dökülerek, kuyucukların içinde hiç sıvı bırakılmamaya çalışıldı.
- Çalışılan her bir kuyucuğa 100µL substrat solusyonundan konuldu.
- 30 dakika, oda sıcaklığında 500 rpm’de hafif çalkayan çalkalayıcıda inkübe edildi.

-Bu süre sonunda çalışılan kuyucuklara 100µL durdurma solüsyonundan konulup Blank'e karşı 450 nm'de plak okuma işlemi gerçekleştirildi.

3.5. İstatistiksel Analizler

Promastigotlardaki bcl-2 ELİSA yöntemi ile belirlenen düzeyleri için, istatistiksel analiz amacıyla, GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) hazır paket programında One Way ANNOVA testi kullanıldı. İstatistiksel açıdan farklarının anlamlı olup olmadığı saptandı.

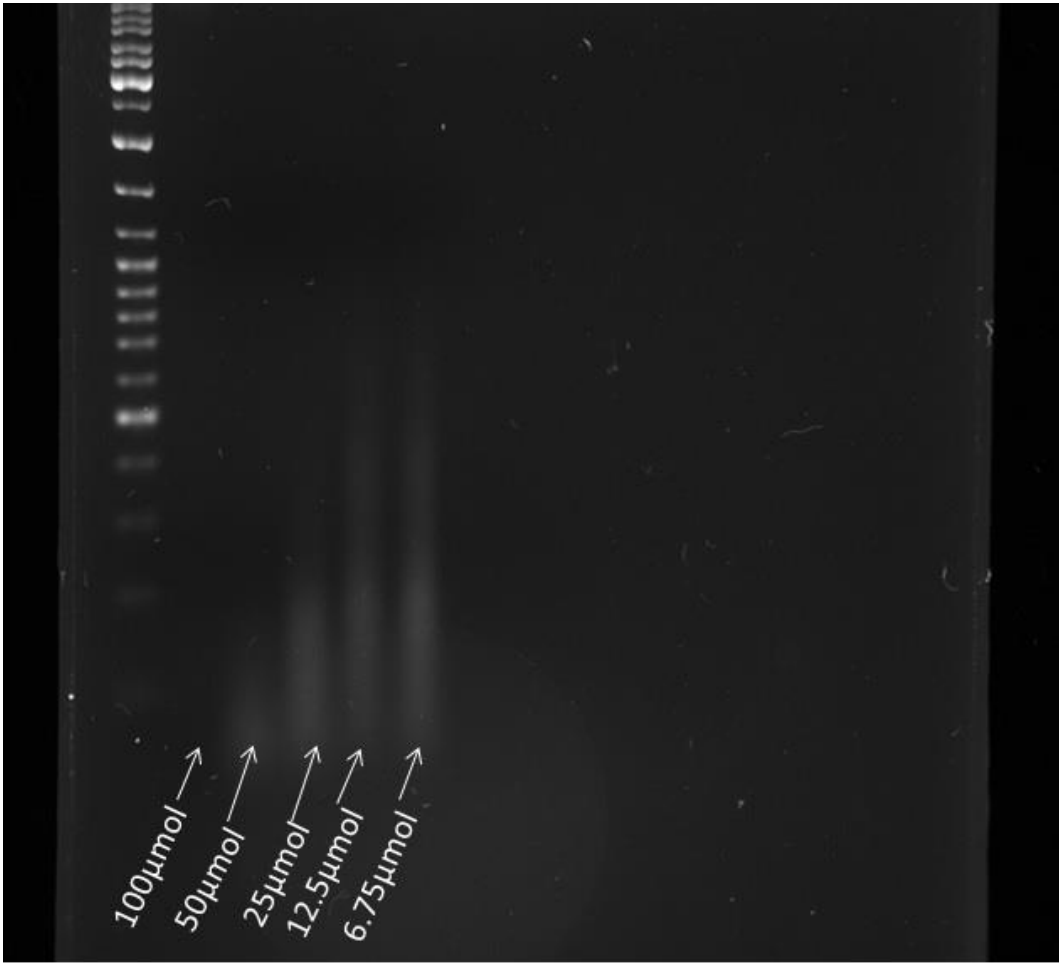


4.BULGULAR

4.1. DNA Kırılmasının Elektroforez Yöntemi İle Belirlenmesi

4.1.1. Staurosporin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Görüntü

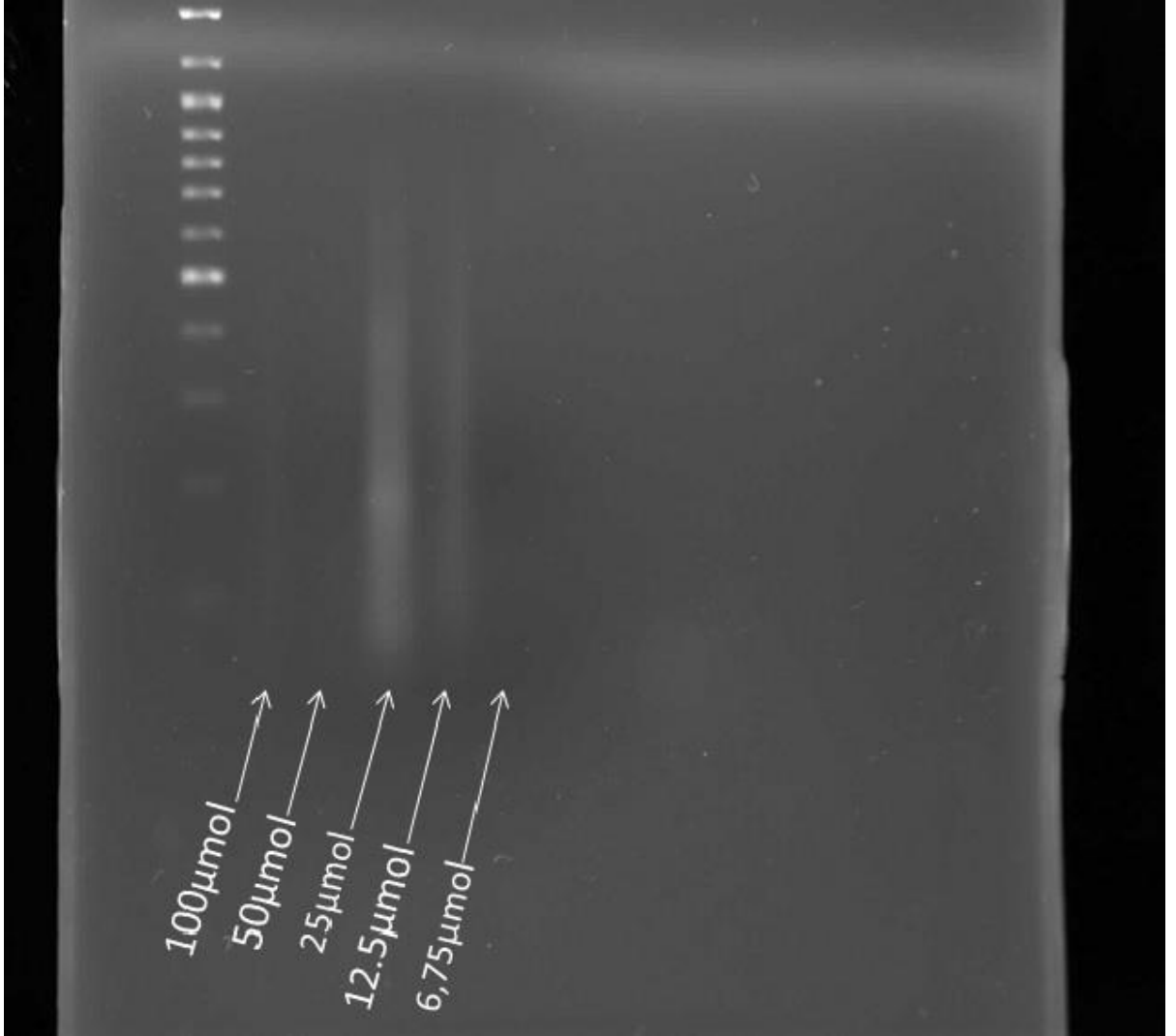
Çalışmada miltefosin ve Glukantim® ilaçlarının karşılaştırılması için pozitif kontrol olarak kullanılan staurosporin ilacının DNA kırılmasını indüklemesi için, *Leishmania tropica* promastigotlarında uygulandığı beş doza (100µmol, 50µmol, 25µmol, 12.5µmol ve 6.75µmol) ait görüntüsü, Şekil 4' de verilmiştir.



Şekil 4. Staurosporin'in (pozitif kontrol) *L. tropica* promastigotlarına DNA kırılması indüklemesi için uygulanan beş ayrı dozdaki görüntüsü.

4.1.2. Miltefosin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Görüntü

Visseral leishmaniasis tedavisinde ilk oral ilaç olarak kullanılan miltefosin ilacının (Verma ve ark, 2006), DNA kırılması indüklemesi için, *Leishmania tropica* promastigotlarında uygulandığı beş ayrı doza (100 μ mol, 50 μ mol, 25 μ mol, 12.5 μ mol ve 6.75 μ mol) ait görüntüsü, Şekil 5’de verilmiştir.

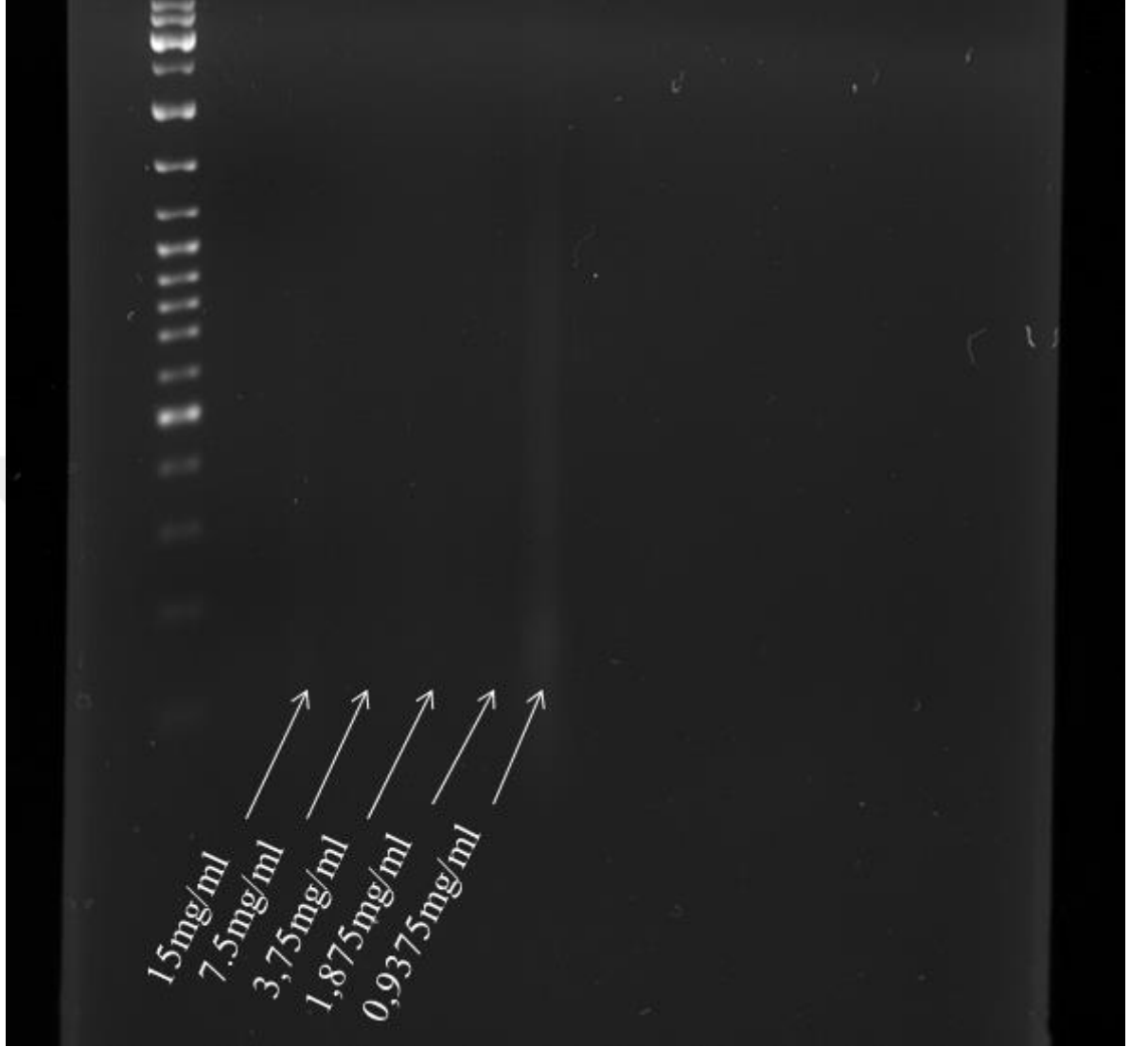


Şekil 5. Miltefosin ilacının *L. tropica* promastigotlarına DNA kırılması indüklemesi için uygulanan beş ayrı dozdaki görüntüsü.

4.1.3. Glukantim® Uygulanması Sonucu Elde Edilen Görüntü

Leishmaniasis tedavisinde kullanılan bir pentavalan antimoniyat olan Glukantim® (N-methyl-glucamine antimoniate) ilacının, DNA kırılması indüklemesi için, *Leishmania tropica*

promastigotlarında uygulandığı beş ayrı doza (15mg/ml, 7.5mg/ml, 3.75mg/ml, 1.875mg/ml, 0.9375mg/ml) ait görüntüsü, şekil 6’da verilmiştir.

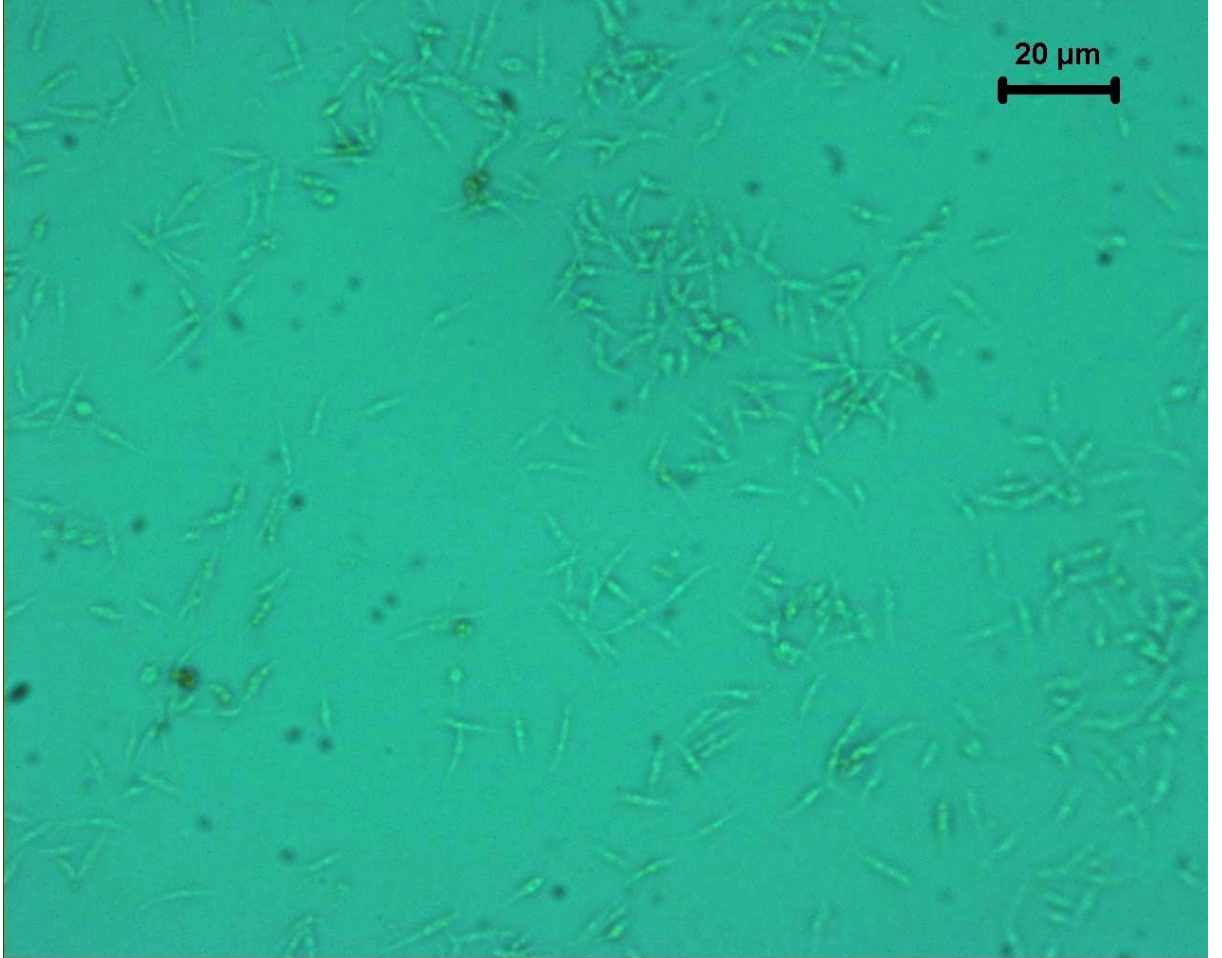


şekil 6. Glukantim® ilacının *L. tropica* promastigotlarına DNA kırılması indüklemesi için uygulanan beş ayrı dozdaki görüntüsü.

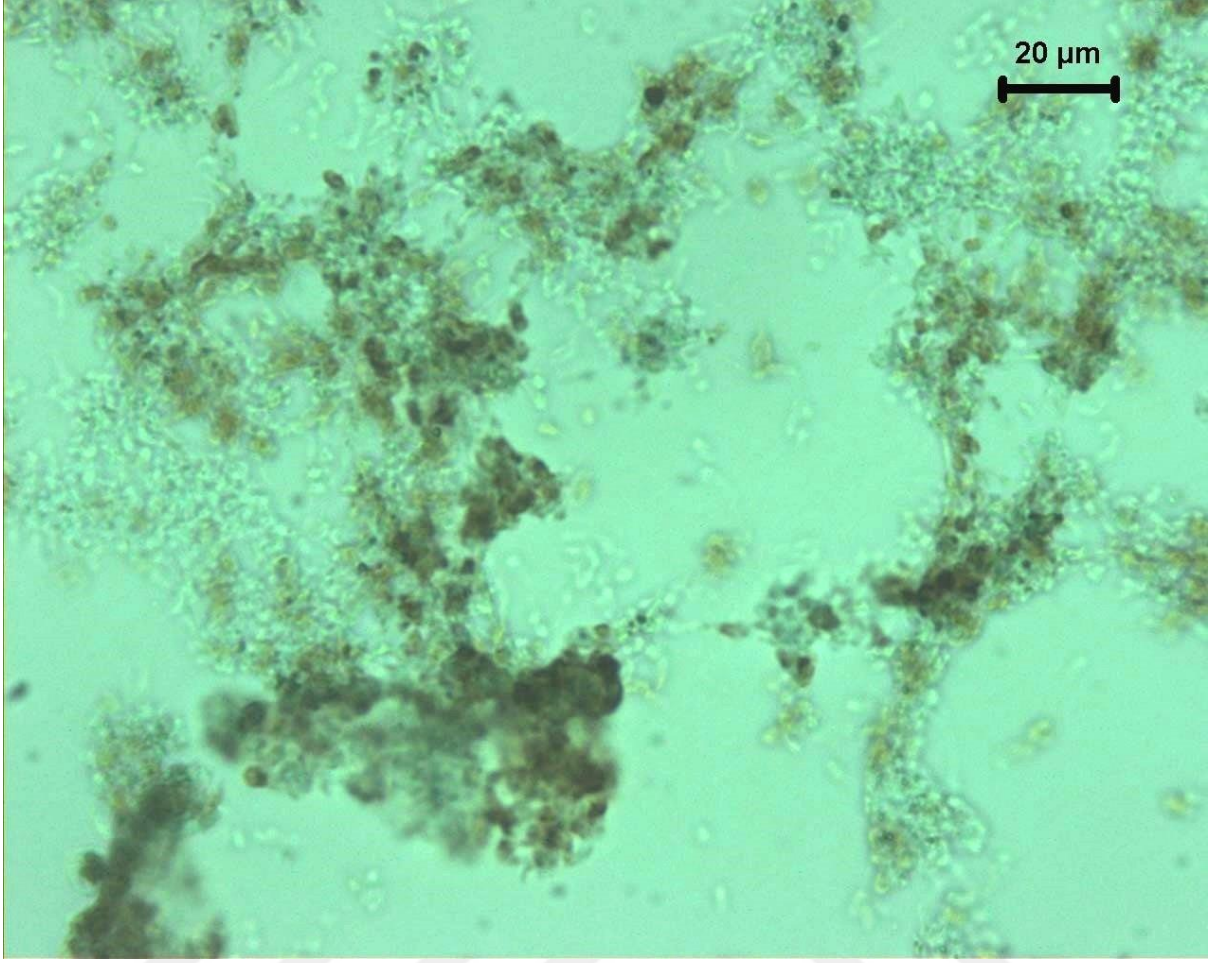
4.2. DNA Kırılmasının TUNEL Yöntemi ile Gösterilmesi

4.2.1. Staurosporin Uygulanması

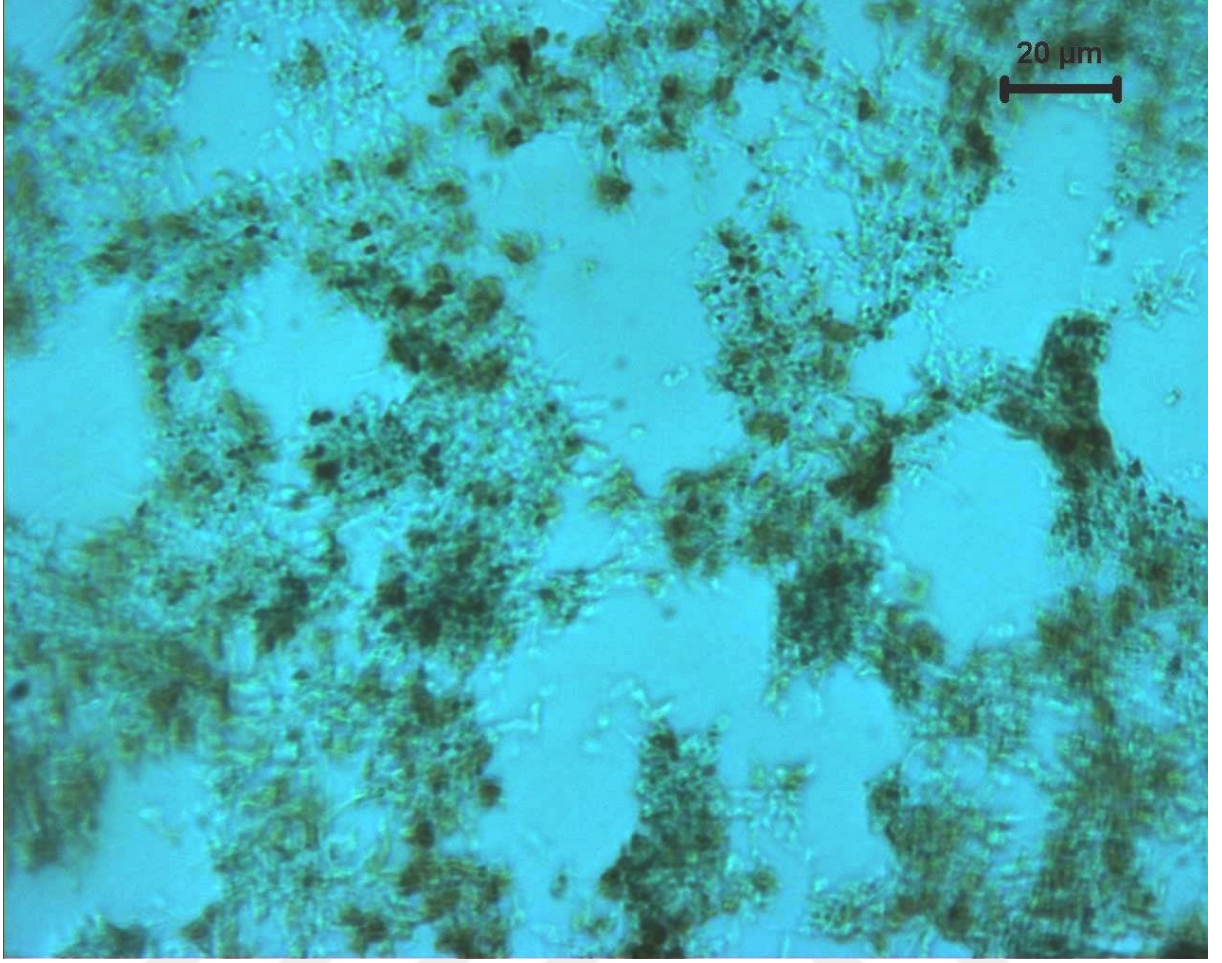
Staurosporinin *L.tropica* promastigotlarına 100 μ mol uygulanmasında DNA kırılması bulgusu gözlenmeyen hücrelerin daha yoğun olduğuna rastlanılmıştır. Buna karşın 50 μ mol, 25 μ mol, 12.5 μ mol ve 6.75 μ mol olan dozlarda DNA kırılması gösteren hücrelerin daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak staurosporinin 50 μ mol ve 25 μ mol ilaç dozlarının promastigotların morfolojik yapısında da değişim meydana getirdiği düşünülmektedir.



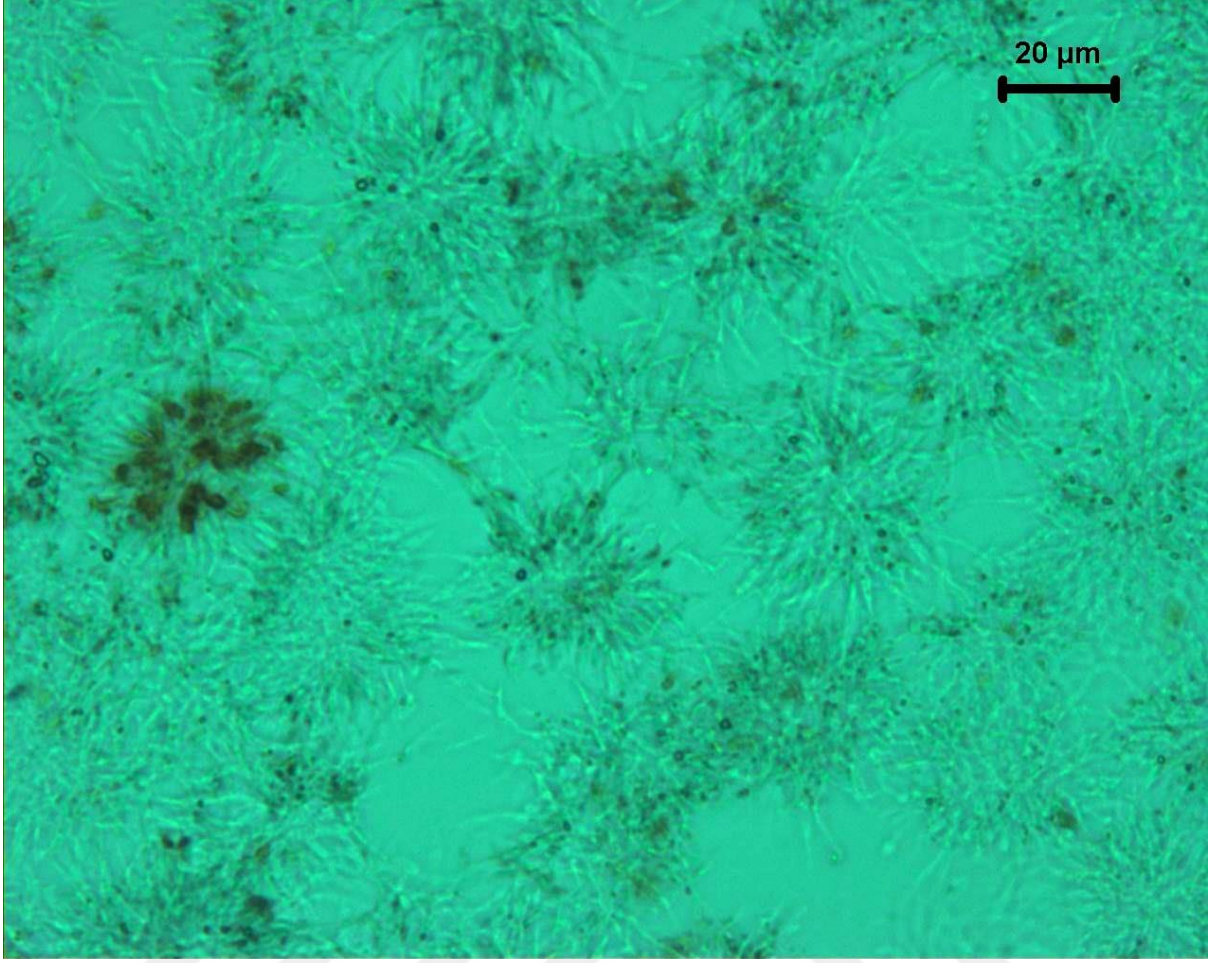
Şekil 7. 100 μ mol dozda staurosporin uygulanması ile apoptoz meydana gelmemiş, yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre hücre topluluğu.



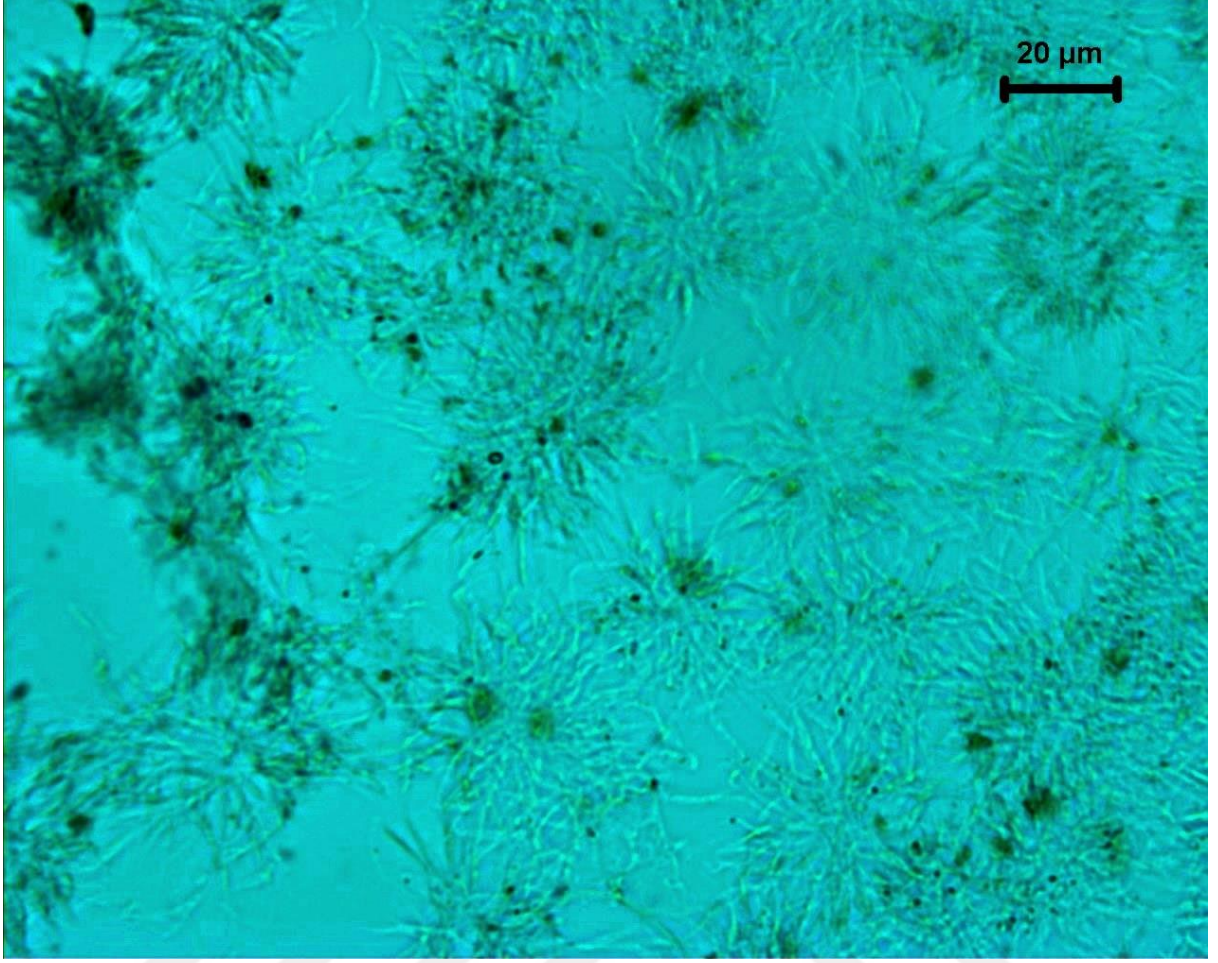
Şekil 8. 50µmol dozda staurosporin uygulanması ile apoptoz meydana gelmiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



Şekil 9. 25µmol dozda staurosporin uygulanması ile apoptoz meydana gelmiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



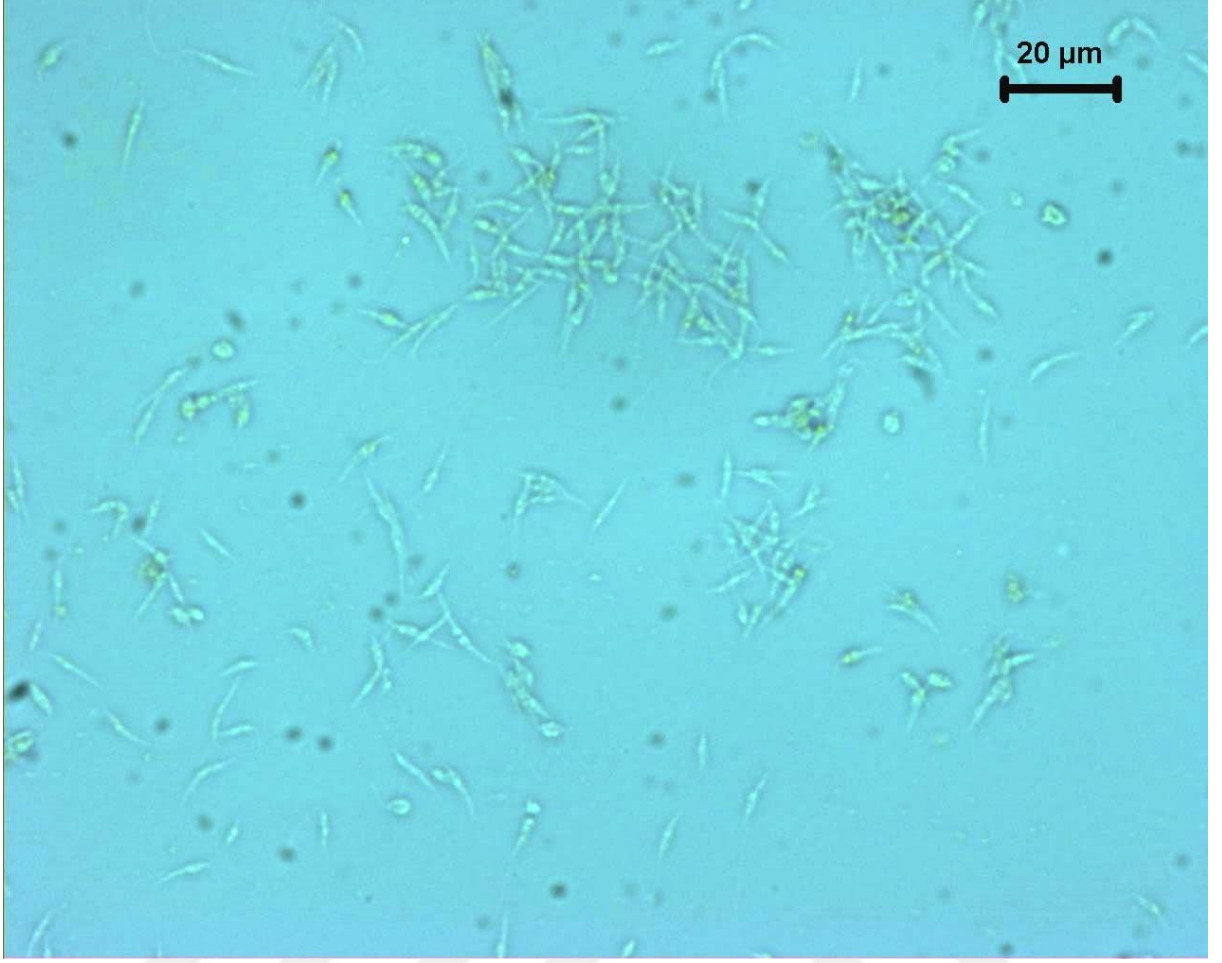
Şekil 10. 12,5μmol dozda staurosporin uygulanması ile apoptoz meydana gelmiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



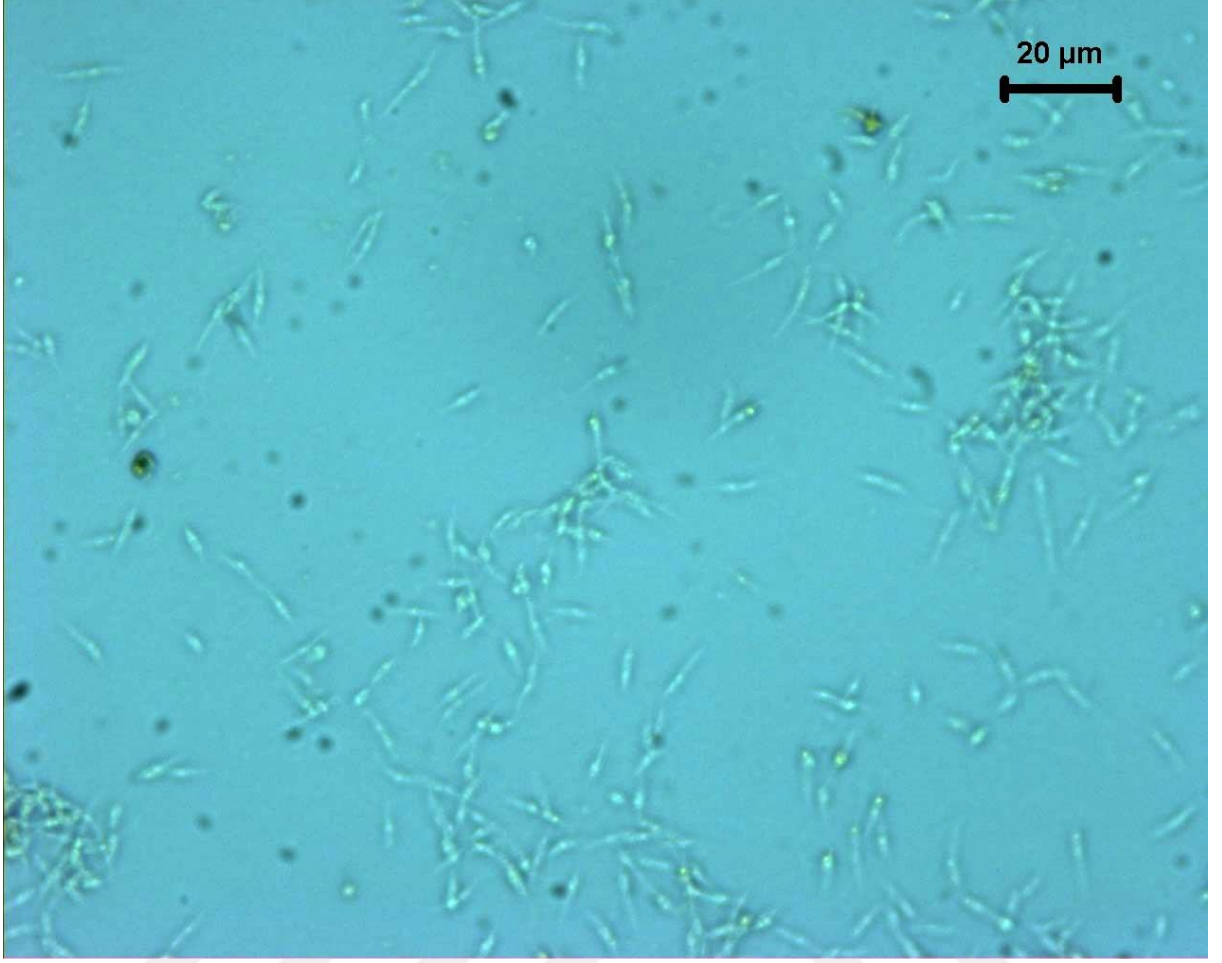
Şekil 11. 6,75μmol dozda staurosporin uygulanması ile apoptoz meydana gelmiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.

4.2.2. Miltefosin Uygulanması

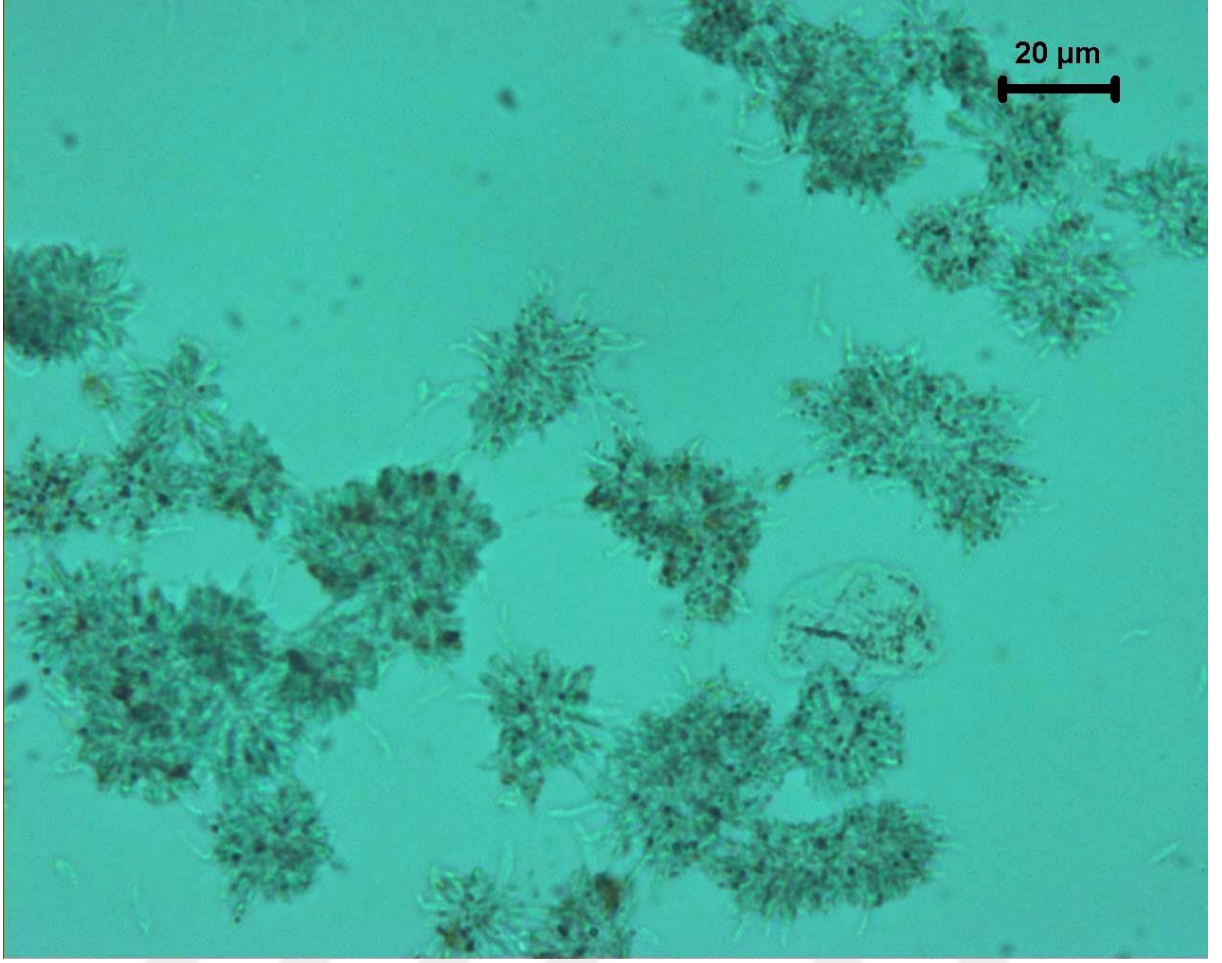
Miltefosinin *L. tropica* promastigotlarına 100μmol, 50μmol ve 6.75μmol uygulanmasında DNA kırılması bulgusu gösteren hücrelere neredeyse hiç rastlanılmamıştır. Buna karşın, 25μmol ve 12.5μmol dozlarda, DNA kırılması gösteren hücrelerin diğer hücrelere göre daha yoğun olduğu tespit edilmiştir.



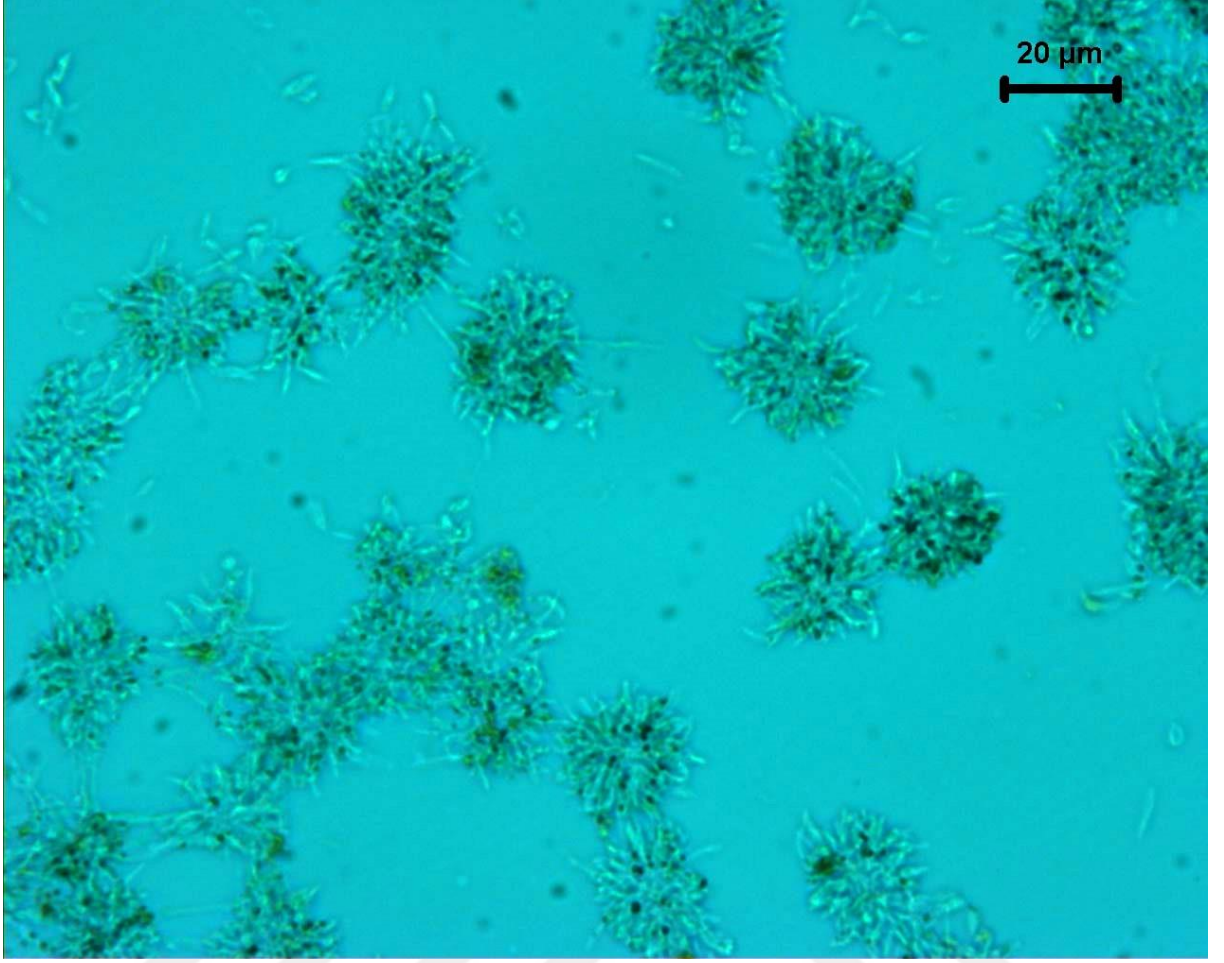
Şekil 12. 100µmol dozda miltefosin uygulanması ile apoptoz meydana gelmemiş olan, yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



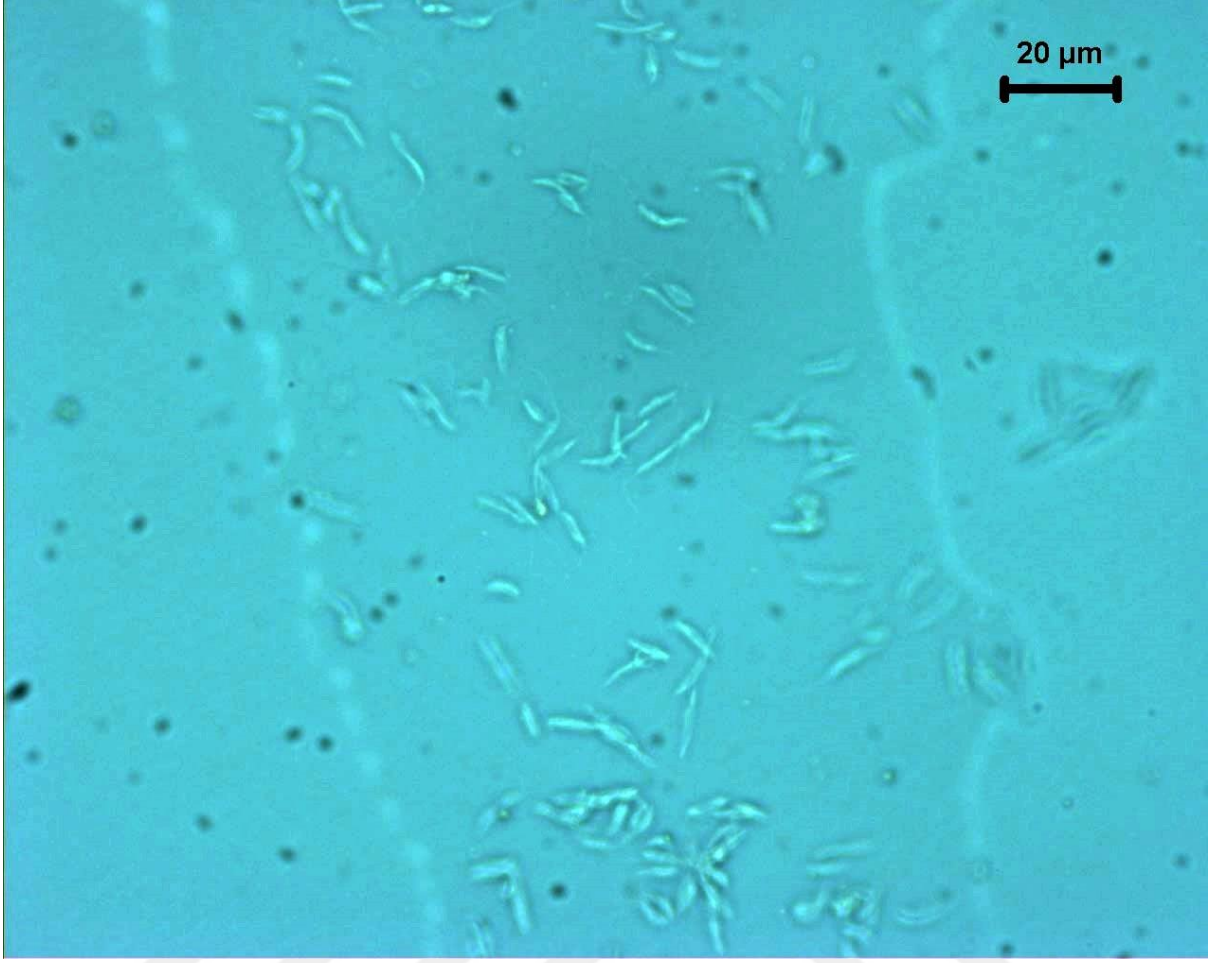
Şekil 13. 50µmol dozda miltefosin uygulanması ile apoptoz meydana gelmemiş olan yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



Şekil 14. 25µmol dozda miltefosin uygulanması ile yüksek oranda apoptoz meydana gelmiş olan *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu .



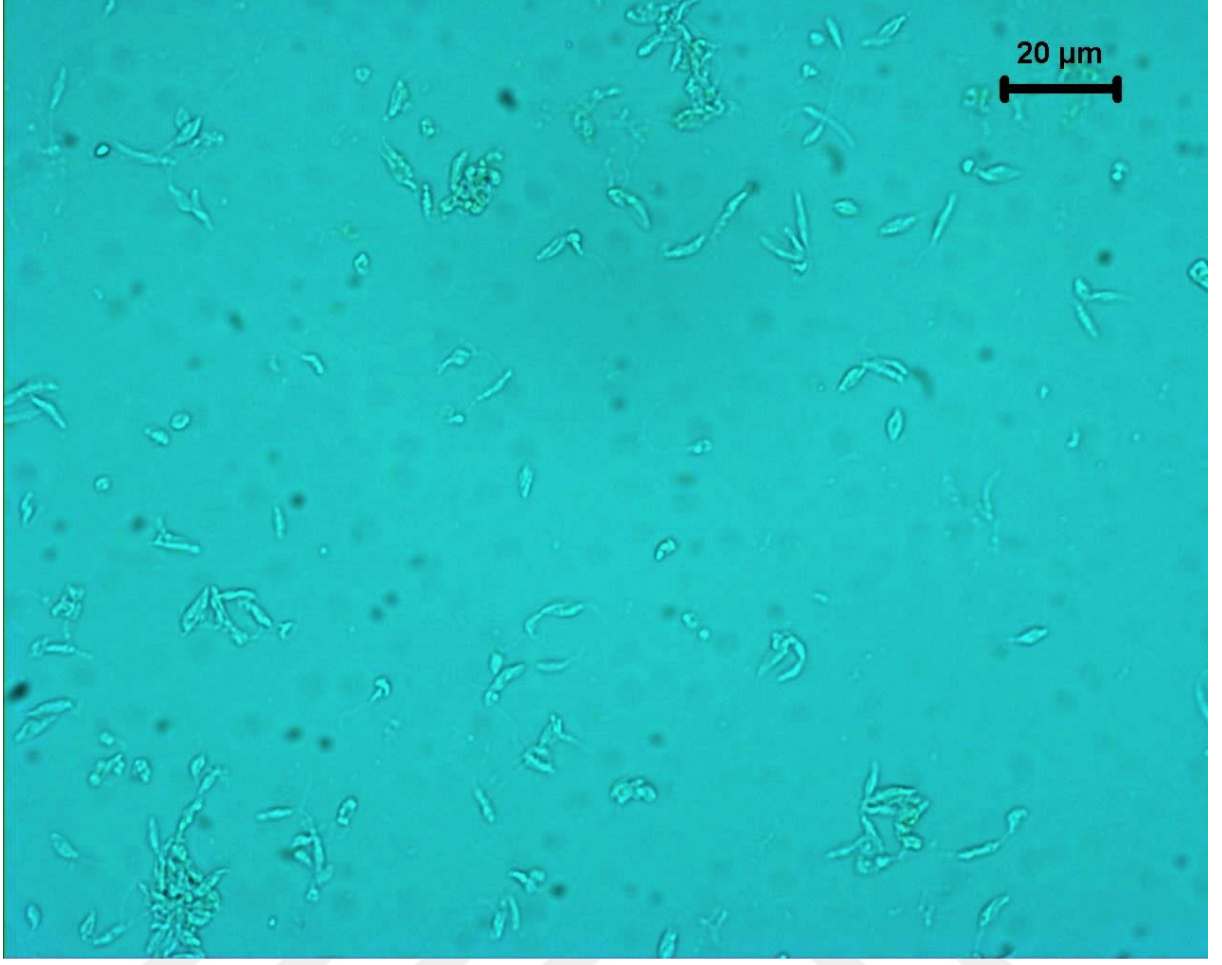
Şekil 15. 12,5µmol dozda miltefosin uygulanması ile yüksek oranda apoptoz meydana gelmiş olan *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



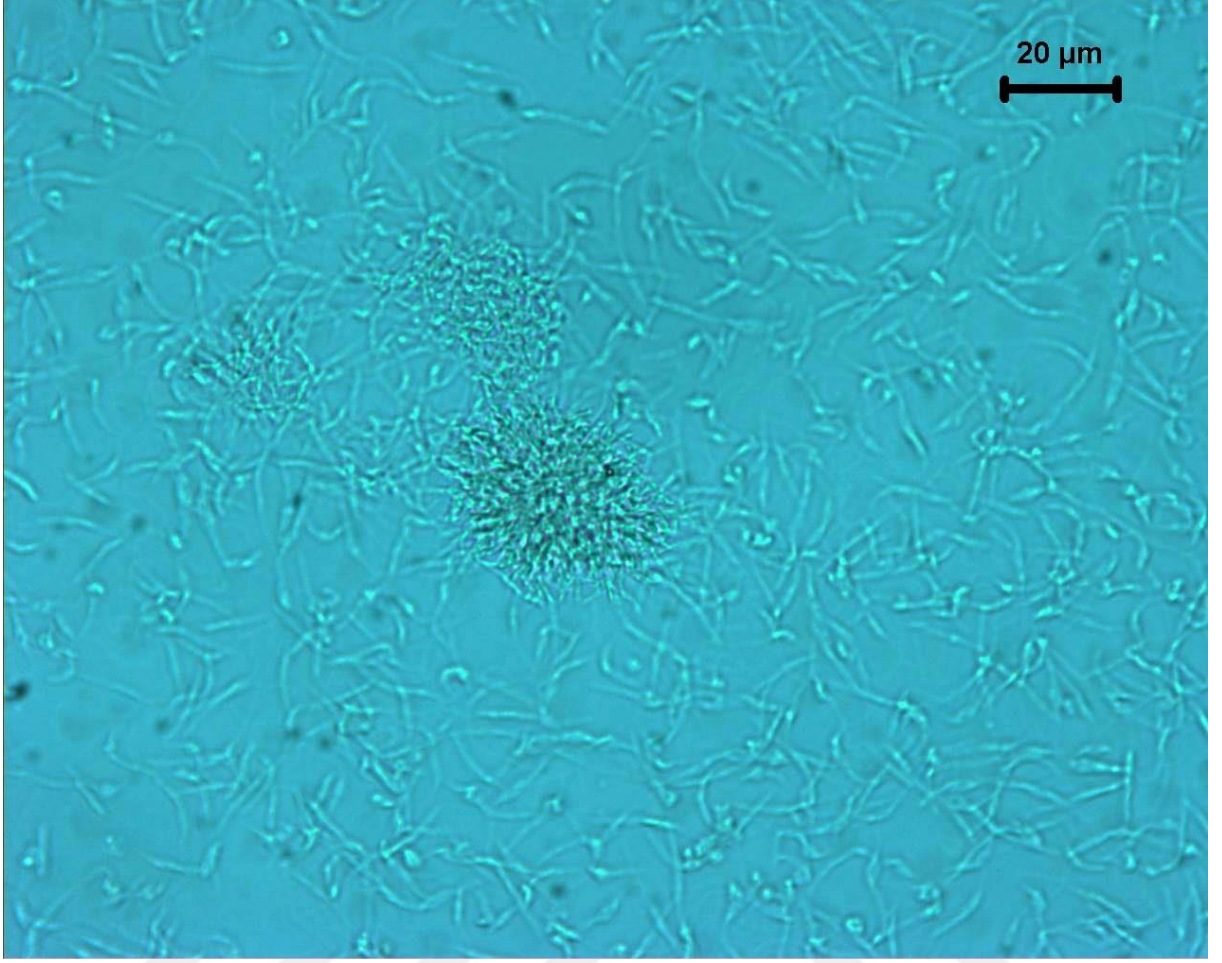
Şekil 16. 6,75µmol dozda miltefosin uygulanan ve apoptoz gözlenmemiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.

4.2.3. Glukantim® Uygulanması

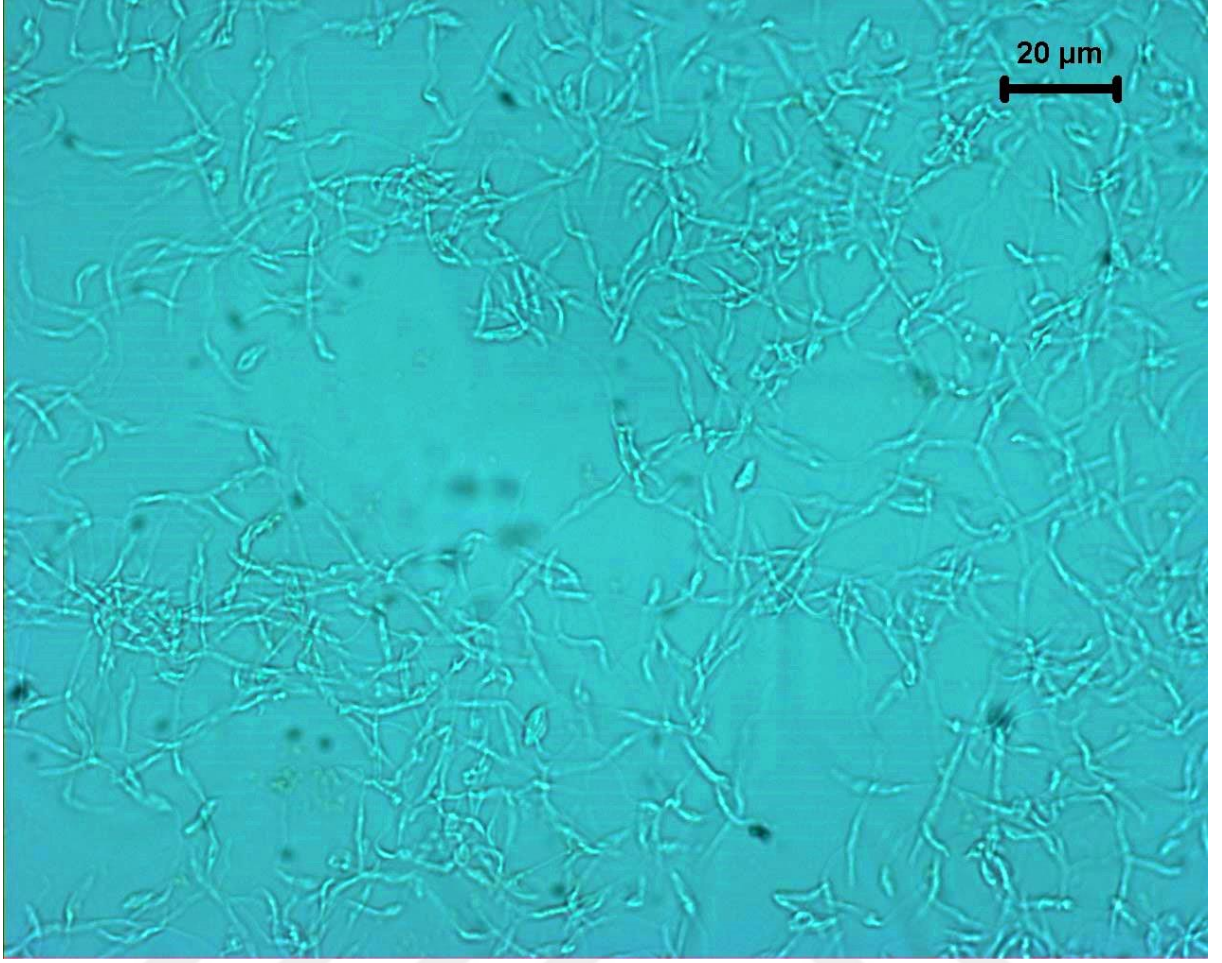
Glukantim®'in *L. tropica* promastigotlarına 15mg/ml dozundan yarı yarıya dilüe edilerek (7.5mg/ml, 3.75mg/ml, 1.875mg/ml, 0.9375mg/ml) uygulanmasında DNA kırılması bulgusuna rastlanılmamıştır. Sadece 0,9375 mg/ml olan dozda bazı promastigotların çekirdeklerinde belli belirsiz bir renk değişimi görülmüştür. Ama yine de tam net bir bulgu tespit edilememiştir.



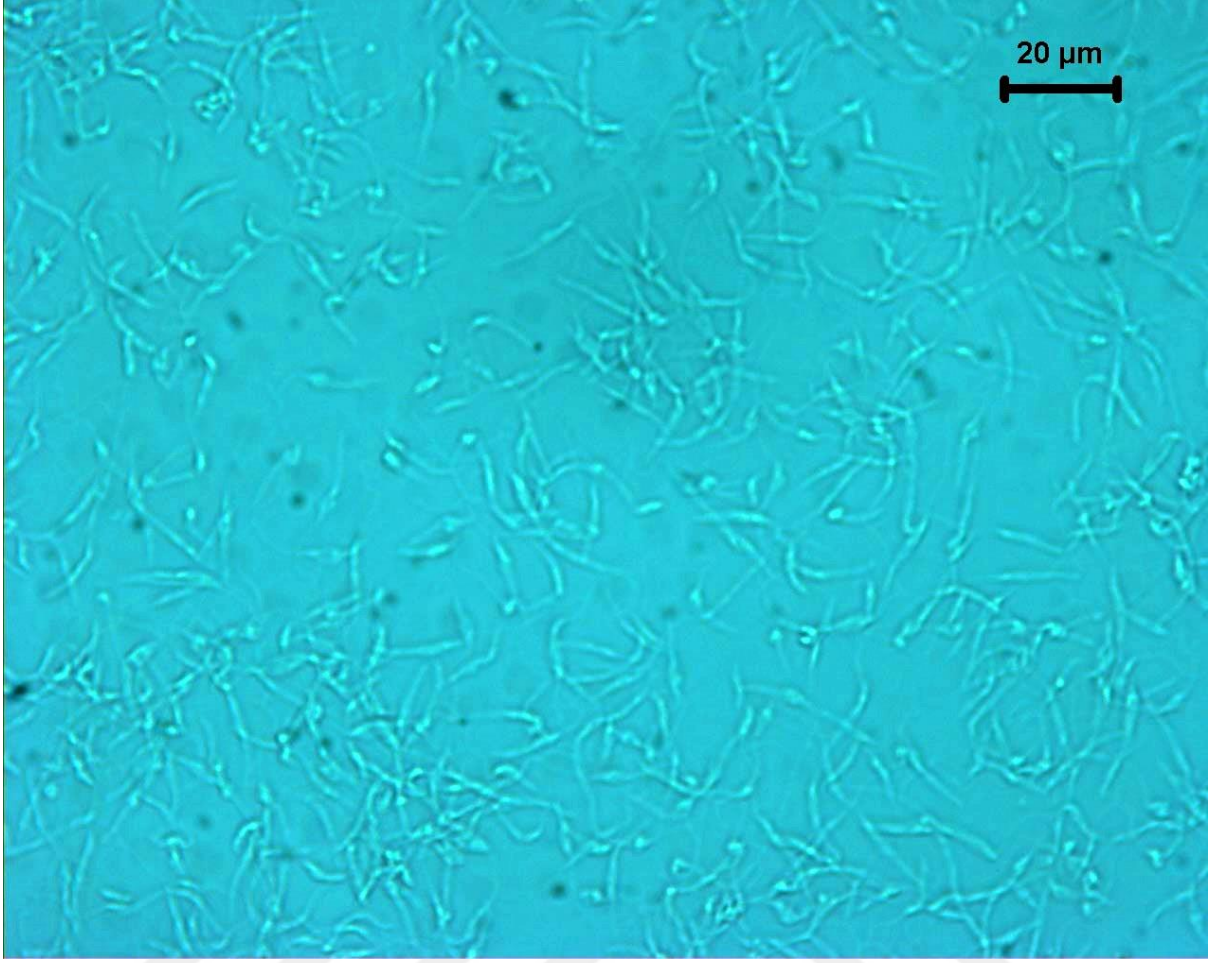
Şekil 17. 15mg/ml dozda Glukantim® uygulanan ve apoptoz gözlenmemiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



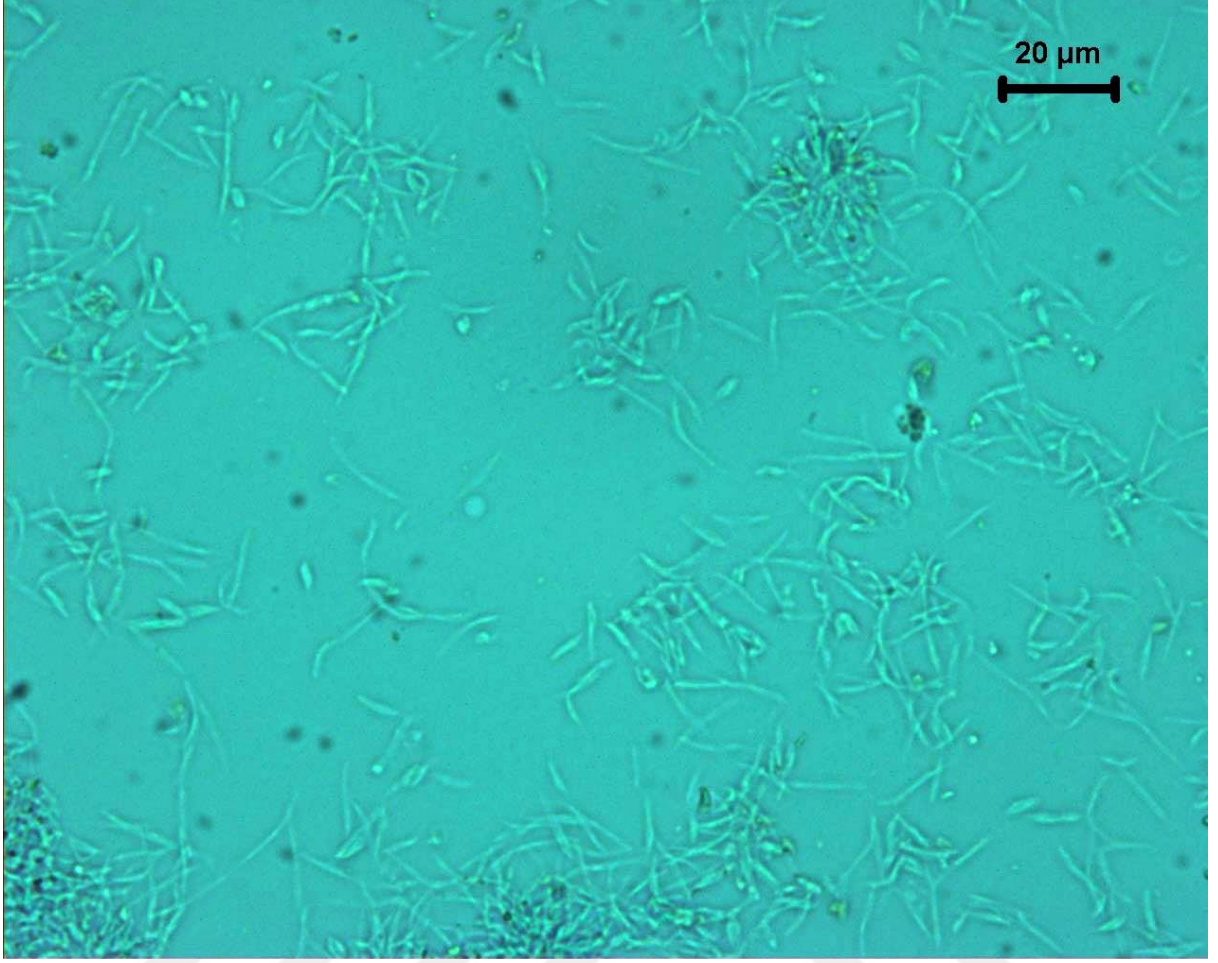
Şekil 18. 7,5mg/ml dozda Glukantim® uygulanan ve apoptoz gözlenmemiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



Şekil 19. 3,75 mg/ml dozda Glukantim® uygulanan ve apoptoz gözlenmemiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



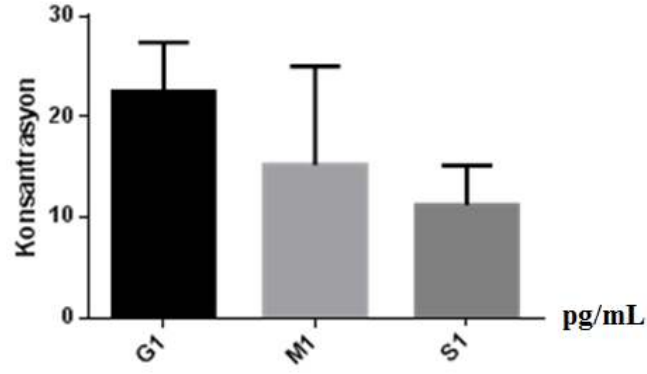
Şekil 20. 1,875mg/ml dozda Glukantim® uygulanan ve apoptoz gözlenmemiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.



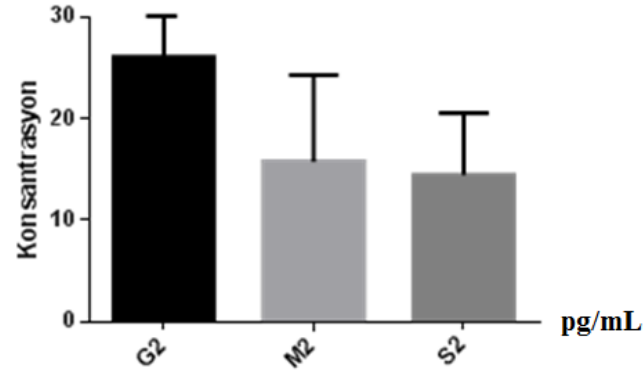
Şekil 21. 0,9375 mg/ml dozda Glukantim® uygulanan ve apoptoz gözlenmemiş yüksek orandaki *L. tropica* promastigotlarına ait hücre topluluğu.

4.3. Promastigotlardaki Bcl-2 Düzeyleri

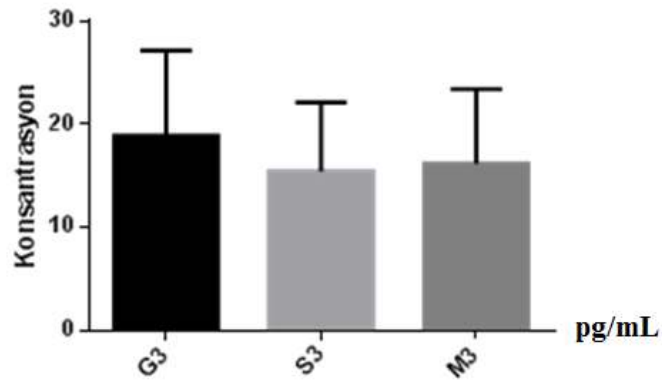
Promastigotlarda bcl-2 konsantrasyon değerlerinin istatistiksel olarak analizinde One-Way ANNOVA testi kullanılmıştır. Hesaplamalar sonucunda değerler arasında herhangi bir anlamlılık bulunamamıştır ($P=0.4087$, $P>0.05$). Fakat, değerlerin birbiri ile ilişkisini gösteren grafikler elde edilmiştir. Toplam beş dozda meydana gelen grafiklere bakıldığında promastigotlara uygulanan Glukantim® ilacı bütün dozlarda diğer ilaçlara göre yüksek bcl-2 konsantrasyonu vermiştir. En düşük değer ise staurosporin ilacındadır. Bcl-2'nin yüksek konsantrasyonda olması apoptozu inhibe edebilir. Bu yüzden Glukantim® ilacı uygulanan promastigotlarda, diğer yapılan iki testte apoptotik bulguya rastlanılmaması ile bcl-2 değerlerinin yüksek olması arasında bir ilişki olabileceği düşünülmektedir.



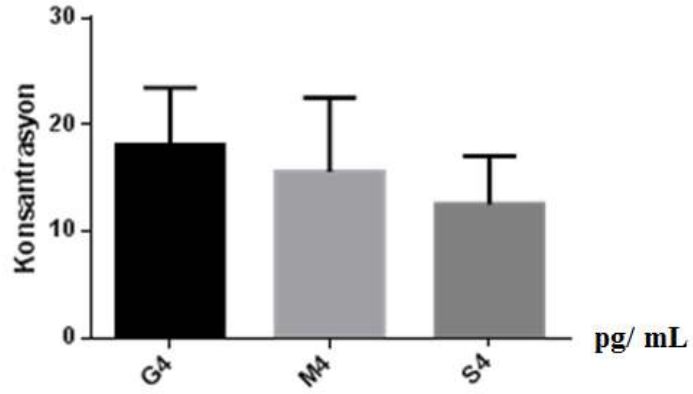
Şekil 22. *L.tropica* promastigotlarına uygulanan Glukantim® 15mg/ml, miltefosin 100µmol ve staurosporin 100µmol şeklindeki ilk dozlarda, bcl-2 konsantrasyonu şematize edilmiştir.



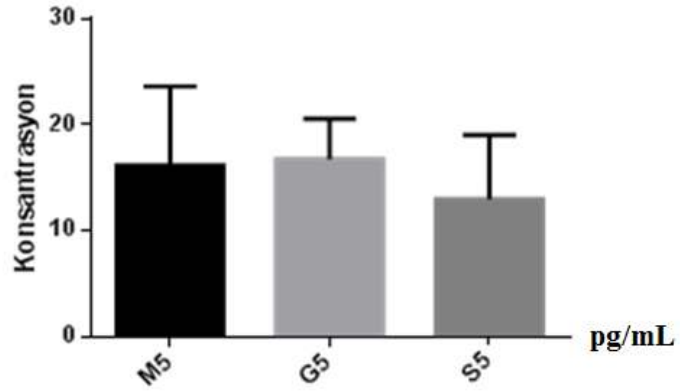
Şekil 23. *L.tropica* promastigotlarına uygulanan Glukantim® 7.5mg/ml, miltefosin 50µmol ve staurosporin 50µmol şeklindeki ikinci dozlarda, bcl-2 konsantrasyonu şematize edilmiştir.



Şekil 24. *L. tropica* promastigotlarına uygulanan Glukantim® 3.75mg/ml, miltefosin 25µmol ve staurosporin 25µmol şeklindeki üçüncü dozlarda, bcl-2 konsantrasyonu şematize edilmiştir.



Şekil 25. *L. tropica* promastigotlarına uygulanan Glukantim® 1.875 mg/ml, miltefosin 12,5 µmol ve staurosporin 12,5 µmol şeklindeki dördüncü dozlarda, bcl-2 konsantrasyonu şematize edilmiştir.



Şekil 26. *L. tropica* promastigotlarına uygulanan Glukantim® 0.9375 mg/ml, miltefosin 6.25 µmol ve staurosporin 6.25 µmol şeklindeki beşinci dozlarda, bcl-2 konsantrasyonu şematize edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Leishmania tek hücreli bir protozoon olup, kendi kendini iyileştirme durumu gösteren kutanöz lezyonlardan, ölümcül visseral infeksiyonlara varan geniş çapta bir lokalizasyon ile insan sağlığını tehlike altına sokmaktadır. Hem eşeyli, hem de eşeysiz üreme sergileyen bir yaşam döngüsüne sahiptir. Bu döngülerden biri; kum sineği vektörünün midesinde gelişen promastigot formu, diğeri ise, vertebralı konağın makrofajlarında gelişme gösteren amastigot formudur. Bu iki gelişim formu parazitin patogenezi için mutlaka oluşmalıdır (Chang ve Dwyer, 1976; Killick, 1979; Alexander ve Russell, 1992). Bu yüzden, hastalığın patogenezi için parazitin büyümesinin kontrolü altında yatan mekanizmanın anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

Leishmania'nın gelişmesi hem iç hem de dış faktörler tarafından kontrol edilebilir (Chang ve Dwyer, 1976; Killick, 1979; Alexander ve Russell, 1972). Dış faktörlere örnek olarak , doğal yoldan besin kısıtlaması veya ilaçla müdahale yöntemleri leishmaniasis tedavisinde kullanılabilir. Diğer taraftan iç faktörlere değinildiğinde *Leishmania* genleri ve ürettikleri maddeler, dış faktörlere cevap oluşturabilmektedir (Debrabant ve ark, 2003).

Hücre biyolojisi için son derece önem taşıyan programlı hücre ölümü 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (Kerr ve ark, 1972). Çok hücreli organizmaların büyüme ve gelişmesinde olduğu kadar (Evan, 1994; Vaux ve ark, 1994); viral, bakteriyel, parazit enfeksiyonları ve kansere karşı da savunma geliştiren programlı hücre ölümü, organizmayı koruma altına almaktadır (Williams, 1994; Duncan ve ark, 1999, 2000; Roulston ve ark, 1999). İstenmeyen hücrelerin programlı hücre ölümü ile elenmesi etkili bir yol olup, aynı zamanda inflamasyonlara karşı oluşabilecek başlangıç reaksiyonlarını da önlemektedir (VauxveStrasser, 1996; Yuan, 1997).

Programlı hücre ölümü iç ve dış birçok tetikleyici tarafından başlatılıp, çeşitli düzenleyiciler tarafından koordine edilmektedir. Bu durumu stimüle eden faktörlere (stres, kimyasal ajanlar, büyüme yetersizliği vb.) bakılmaksızın; plazma zar geçirgenliği, çekirdek kondenzasyonu, DNA kırılması ve çevre hücreler tarafından fagosite edilen apoptotik parçalar gibi apoptoz belirteçlerini sergilemektedir (Vaux ve Strasser, 1996).Buna ek olarak, mitokondri zar geçirgenliği ile proteaz ve nükleaz aktivitesindeki değişiklikler gibi diğer

fizyolojik ve morfolojik değişiklikler de programlı hücre ölümünün ayırt edici özelliklerindendir (Bossy-Wetzel ve Green, 1999).

Programlı hücre ölümü süreci, çok hücreli organizmalar arasında çok az farklılıklar barındırsa da bu durum, tek hücreli organizmalarda daha farklı ve daha karmaşık olmaktadır. Bu yüzden programlı hücre ölümünü, tek hücreli organizmalar gibi daha basit yapıli sistemlerde incelemek bazı karmaşık mekanizmaların aydınlatılmasına yardımcı olabilmektedir. *Leishmania* gibi parazit infeksiyonları durumunda konağın bütün savunma sistemini harekete geçirmek yerine parazitleri programlı hücre ölümü sürecine girdirmek yarar sağlayabilir. Bununla beraber, tek hücreli canlıların programlı hücre ölümündeki moleküler mekanizması çok az bilinmektedir. Tek hücreli canlılarda var olan programlı hücre ölümü çeşidini kavrayabilmek, gizemini hala korumaktadır (Debrabant ve ark, 2003).

Biyokimyasal olarak yapılan deneylerde *Plasmodium* ve *Leishmania*'da programlı hücre ölümü süresince proteazlar aktive edilmektedir (Sen ve ark, 2004). Bununla beraber hangi proteazların apoptoz-benzeri hücre ölümünün merkezinde yer alıp düzenleme yaptığı henüz tam açıklık kazanmamıştır. *Leishmania* ve *Plasmodium* gibi parazitlerde klasik kaspaz geni kodlanmamıştır, bunun yerine metakaspazlar kodlanmıştır (Nedelcu 2009, Meslin ve ark, 2007). Memeli olmayan ökaryotlarda bulunan metakaspazlar gerçek kaspazlar gibi olup CD sistein proteazlar grubuyla, C14 ailesine ait olmaktadır. Metakaspazlar metazoon kaspazlarının fonksiyonel analogları olan biyolojik rollerde görev yapmaktadırlar. Eldeki veriler sınırlı olsada metakaspazların bitki ve mayalardada olduğu düşünülmektedir. Fakat yine de metakaspazların protozoonlardaki programlı hücre ölümüne ait veriler tam net değildir (Madeo ve ark, 2002; Uren ve ark, 2000; Reape ve McCabe, 2010; Sundström ve ark, 2009).

Leishmania türlerinde programlı hücre ölümü araştırmalarında, in vitro olarak, hem promastigot (kum sineğinin midesinde olan form), hem de amastigot (vertebrali makrofajlarında olan form) formlarını üretmek mümkündür (Lee ve ark, 2002). İlk apoptotik belirteç, *L. amazonensis*'in 34-37°C'de inkübe edilen promastigot formuna Ca^{+2} eklenmesiyle gözlenmiştir. Ca^{+2} 'nin yokluğunda ise apoptotik belirteçler kaybolmuştur (Moreira ve ark, 1996).

Besin kısıtlaması yüksek ökaryot hücrelerde programlı hücre ölümü için bir indükleyici olduğundan bu yana, birçok *Leishmania* türünde promastigotlar ve aksenik amastigotların kültürdeki sabit fazında, (logaritmik faz) programlı hücre ölümü belirteçlerinin

analizi yapılmıştır (Lee ve ark, 2002). *L. major*, *L. donovani* ve *L. mexicana*'da hem promastigotlar hem de aksenik amastigotlar DNA kırılmasının çoklu oligonükleosomal ünitelerini göstermiştir (Lee ve ark, 2002; Zangger ve ark, 2002). DNA kırılmasının yoğunluğu kültürde kalan hücrelerin gün sayısı ile ilişkili olmaktadır. *L. donovani*'nin promastigot ve aksenik amastigotlarında sabit fazda besin kısıtlaması durumundan kaynaklanan Phi-PhiLux (PPL) adında bir bölünme aktivitesi indüklenmesi gözlenmiştir (Lee ve ark, 2002). PhiPhiLux (PPL) ise çok hücreli canlılardaki sisteinproeazlara (kaspazlar) benzeyen bir kaspaz-özel substrattır. PPL yüksek ökaryotik canlılarda kaspaz aktivitesini ölçmek için kullanılır (Ehrenberg ve ark, 1988). PPL bölünme aktivitesi kaspazlara özel inhibitörler tarafından , parça parça inhibe edilir. Fakat bu işleme kalpein veya katepsin adındaki sistein proteazlar katılmazlar. Bu yüzden *L. donovani*'deki total PPL-bölünme aktivitesi kaspaz benzeri bir aktivitedir. Bununla beraber promastigot ve aksenik amastigotlar arasındaki PPL-bölünme aktivitesinin total seviyelerinde farklılıklar vardır. Promastigotlarda PPL-bölünme aktivitesinin bazal seviyesi (%5) aksenik amastigotlarla kıyaslandığında (%29) kıyaslandığında daha düşüktür. PPL bölünme aktivitesinin maksimum seviyesi ise sabit fazda promastigotlarda da aksenik amastigotlara göre daha fazladır (Lee ve ark, 2002). Her iki hücre tipinde de indüklenen aktivitenin DNA merdiveni görüntüsüne rastlanılmaktadır.

L. major promastigotlarında programlı hücre ölümünde sistein proteazların bağlanması bir protein kinaz inhibitörü olan staurosporine ilacında da görülmektedir (Arnoult ve ark, 2002). *L. donovani* ile kıyaslandığında kaspaz-benzeri aktivite fareden izole edilmiş *L. major* ve *L. mexicana* amastigotlarının sadece sitoplazmik parçalarında görülmüştür. Buna benzer bir aktivite *L. major* ve *L. mexicana*'nın promastigotlarında ne de *L. mexicana*'nın aksenik amastigotlarında görülmüştür. İki *Leishmania* türünde de amastigotlardaki kaspaz-benzeri aktivitenin kaynağı leishmania kaspazından ziyade amastigotların izole edildiği faredeki, kontamine kaspazlardan ibaret olduğu düşünülmektedir (Zangger ve ark, 2002). Bu nedenden dolayı, *Leishmania* türleri arasında kaspaz benzeri aktivite için bir tutarsızlık dikkate alınmaktadır. Buna ilave olarak leishmania türlerinin hem kaspaz-bağımlı hem de kaspaz-bağımsız bir programlı hücre ölümünü barındırabileceği belirtilmektedir. Çok hücreli organizmalarda apoptoz indüklenmesi, birçok olayı beraberinde getirir. Bunlardan bir tanesi de sitoplazma içindeki bir çok faktörün salınmasıyla sonuçlanan mitokondri membran potansiyelindeki değişimlerdir. Mitokondri membran potansiyeline benzer olarak *L. donovani* promastigotlarında programlı hücre ölümü, yüksek ökaryotik canlılarla benzerlik

göstermektedir. Bununla beraber bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızın eksik yönlerinden biriside *Leishmania*'da mitokondriyel membran potansiyelinin ölçülememesidir. Planlanacak başka çalışmalarda bu ölçümünde yapılmasının yararlı olacağı kanısındayız. Çünkü *Leishmania*'nın diğer tek hücrelilere oranla sahip olduğu büyük mitokondri organelinin, apoptoz belirteçlerinin gözlenmesi bakımından iyi bir model olacağı düşünülmektedir.

L. donovani promastigotlarındaki benzer indüklemelere, sabit fazdaki aksenik amastigotlar da yanıt verebilmektedir. DNA merdiveni formu, çekirdek kondenzasyonu ve kaspaz-benzeri aktivite, *L. donovani*'nin aksenik amastigotlarında da gözlenmektedir. Böylelikle *Leishmania* protozoonunun programlı hücre ölümünün diğer özelliklerine de yanıt verebileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, programlı hücre ölümü özellikleri analizinin her bir *Leishmania* türünde farklılık barındırabileceği de dikkate alınmalıdır (Debrabant ve ark, 2003).

Pentavalan antimonlar, leishmaniasis için birinci kuşak olan tedavi seçeneğidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün leishmaniasis tedavisi için önerdiği ilk sıradaki ilaç olması fakat bu ilaçların programlı hücre ölümü konusundaki çalışmalarının yetersiz kalması bu tez için seçilen ve merak uyandıran ilaçlardan biri olmuştur. *L. donovani* aksenik amastigotlarının logaritmik fazının geç evresinde pentavalan antimonların artan dozlarıyla yapılan tedavide anlamlı bir PPL-bölünme aktivitesine rastlanılmıştır. Fakat buna zıt olarak promastigotlarda ise pentavalan antimonların en yüksek dozlarında dahi PPL-bölünme aktivitesine ait hiçbir veri gözlenmemiştir. Bu durumda *L. donovani* promastigotları için antimoniyal ilaç indüklemesi kaspazlardan bağımsız bir yol izlemektedir. *L. infantum* amastigotlarında antimoniyal tedavisinde hücre ölümü süresinde DNA kırılması gözlenmiştir. Bu bulgu da antimoniyallerın antileishmanial ilaç olarak kullanılmasına ilgi çekici bir medikal bakış açısı sunabilir (Seren ve ark, 2001;Debrabant ve ark, 2003). Fakat, Lima ve arkadaşlarının (2010) Glukantim® (N-methyl-glucamine antimoniate) ile yapmış oldukları bir çalışmada bu ilacın in vitro olarak enfekte makrofajlarda (amastigotlarda) hücre ölümünü apoptotik yol ile değil nekroz yolu ile indüklediği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada Glukantim® ilacının antileishmanial aktivite gösterebilmesi için, genotoksik etkisinin, in vivo ortamda, işlev yaptığının, ama, in vitro ortamda, bu etkinin eksik olduğunun üzerine dikkat çekilmiştir. Dolayısıyla in vitro ortamda apoptozun yokluğundan bahsedilmektedir. Bu çalışmada pentavalen antimon bileşiklerinden Glukantim® ile çalışılmıştır ve literatürdeki verilere paralel olarak apoptoz belirtisi gözlenememiştir. Literatürdeki bilgilerde bir çok *Leishmania*

türünde çalışma mevcuttur fakat *L. tropica* promastigotları üzerindeki çalışmalar yetersizdir. Bu sebepten dolayı bu çalışmanın *L. tropica* promastigotlarında yapılacak başka apoptoz çalışmaları ile desteklenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

Hem *L. donovani* promastigotlarının hem de aksenik amastigotların geç logaritmik fazında on dakika gibi kısa bir zamanda amfoterisin B tedavisinde programlı hücre ölümünün özelliklerinden PPL-bölünme aktivitesi ve DNA merdiveni formu görüntüsü ortaya çıkarılmıştır (Lee ve ark, 2002). Promastigotlar ve aksenik amastigotları %50 oranında öldürebilmek için özellikle amastigotlara uygulanacak amfoterisin B'nin konsantrasyonunun iki kat artırılmasına ihtiyaç vardır. Aksenik amastigotlar ve promastigotlar arasındaki önemli farklılıklar antileishmanial ilaçların da hassasiyetini etkilemektedir (Ephros ve ark, 1999). Logaritmik fazdaki promastigotların amfoterisin B ile tedavisi PPL bölünme aktivitesi ve plasma membran geçirgenliğini indükleyip mitokondri membran potansiyelinde hızlı bir düşme gerçekleştirmiştir (Lee ve ark, 2002). Bu verilerden amfoterisin B etkisinin, besin kısıtlamasının indüklediği etki ile benzer olduğu da söylenebilir. İlginçtir ki, in vitro olarak yapılmış deneylerde *L. donovani*'deki programlı hücre ölümünün membran değişimi, sitoplazmadaki elektron yoğunluğu ve çekirdek kondenzasyonu gibi belirteçleri, hastalardan alınan makrofajların içindeki *L. donovani* parazitlerinde de gözlenmiştir (Chulay ve ark, 1985). Benzer şekilde *Leishmania tropica* tarafından enfekte edilmiş makrofajlarda amfoterisin B tedavisi in vitro olarak yapıldığında programlı hücre ölümü özellikleri saptanmıştır (Langreth ve ark, 1983). Hem ilaç direnci gelişimi sebebiyle hem de literatürde *L. tropica* promastigotlarında amfoterisin B ile meydana gelmiş apoptoz indüklemesi çalışmalarının varlığından ötürü bu çalışma için tercih edilmemiştir.

Protein kinaz inhibitörleri de leishmaniasise karşı kullanılan ilaç türlerindendir. Staurosporin ise tirozin protein kinazlar gibi birçok serin-treonin protein kinazlarına karşı nM konsantrasyonlarında bile aktif bir inhibitördür. *L. major* ve *L. amazonensis* promastigotları için toksik olduğu belirlenmiştir. On dakika gibi kısa süreli bir inkübasyonda 10µM dozda promastigotların %59'u ölmüştür (Becker ve Jaffe, 1997). Bununla beraber apoptoz ile sonuçlanan 4 gün gibi uzun süreli 4µM dozunda inkübasyon periyodunda ise kurtulan parazitlerde morfolojik değişiklikler meydana getirmiştir (Arnoult ve ark, 2002). Staurosporin ile tedavide amastigotların, promastigotlara göre daha az duyarlı olduğu belirlenmiştir. İlginçtir ki, staurosporin ile kısa süreli bir inkübasyondan kurtulan promastigotların hala makrofajları infekte edebilme yetenekleri olduğu gözlenmiştir (Shimony ve Jaffe, 2008). Staurosporine etkisi geri dönüşümsüzdür. Parazitler PBS ile

yıkanıp, yeni bir hücre kültürü plağına aktarılmadan önce bile promastigotların büyüme ve morfolojilerinde değişiklikler bulunmuştur (Becker ve Jaffe, 1997). Bu çalışmada da bu literatür bilgilerine benzer bulgular *L. tropica* üzerinde gözlenmiştir. Yüksek dozlarda parazitin morfolojik yapısının değişmesi gözlenen bulgulardan bir tanesidir. Bunun yanı sıra *L.tropica* üzerinde çok etkili bir apoptoz meydana getirdiğinden yapılacak çalışmalar için pozitif kontrol seçiminde beklentileri karşılayacağı düşünülmektedir.

Miltefosin bir alkalın fosfolipid bileşığı olup ilk başlarda göğüs kanseri ve diğer katı tümörlerin tedavisi için önerilmekteydi (Verweij ve ark, 1992; Dummer ve ark, 1993). Daha sonraları ise yapılan çalışmalardan elde edilen verilerde, miltefosinin, hem in vitro, hem de deneysel hayvan çalışmaları sonucunda antileishmanial tedavi için, üstün bir ilaç olduğu belirtilmektedir (Croft ve ark, 1987, 1996; Kuhlencord ve ark, 1992). Miltefosinin in vitro olarak birçok *Leishmania* türünün, hem promastigotları hem de amastigotları için etkili olduğu gözlenmiştir (Croft ve ark, 1987,1996; Escobar ve ark, 2002). Diğer alkalın-lizofosfolipidler gibi miltefosinin aktivite mekanizması çok az bilinmektedir. Dahası bir çok veride, bu ilacın, kanser tedavisi için, programlı hücre ölümünü tetiklediğı aktivitesinden bahsedilmektedir (Wieder ve ark, 1999; Rybezynska ve ark, 2001; Wright ve ark 2004). *Leishmania*'da ise diğer protozoon ve metazoonlara benzer bir şekilde apoptoz mekanizması olduğu düşünülerek *Leishmania* tedavisinde, miltefosinin parazit üzerindeki ilaç direnci çalışılmaktadır. Apoptoz benzeri hücre ölümü miltefosin ile tedavi edilen *L. donovani* promastigotlarında gözlenmiştir. Bununla beraber bu tür bileşiklerin apoptozu ne memelilerde ne de parazitlerde nasıl bir mekanizma ile indüklediğı daha tam açıklık kazanmamıştır (Sundar ve Olliaro, 2007). Yapılan bir çalışmada miltefosin ile tedavi edilen *L. donovani* promastigotlarının 25µM ilaç dozunda apoptoz benzeri hücre ölümüne gittiğı gözlenmiştir. Bu *L. donovani* promastigotları, 25µM ilaç dozunda, apoptoz belirteçlerinden, oligonükleosomal DNA kırılmasını ve çekirdek kondenzasyonunu göstermişlerdir (Verma ve Dey, 2004). Bu çalışmadada *L. tropica* promastigotları üzerinde miltefosin ilacı ile gözlenen apoptotik bulgular için en etkili doz 25 µmol'dür. Hem TUNEL hem de elektroforez yöntemi ile yapılan DNA kırılması saptanmasında 25 µmol dozunda en iyi görüntüsünü vermiştir.

Apoptoz çalışmalarında en az iki yöntem kullanılması nedeniyle bu çalışmada DNA kırılmasına hem TUNEL hem de elektroforez yöntemiyle bakılmıştır. Bunun yanı sıra *L. tropica* promastigotları üzerinde bcl-2 konsantrasyonunun ölçümü ile ilgili, literatürde herhangi bir veriye rastlanılmamıştır. Bu çalışmada *L. tropica* promastigotlarında Glukantim® ilacı indüklemesi sonucu bcl-2 değerleri, uygulanan bütün dozlarda, çok yüksek

bulunmuştur. Miltefosin ve staurosporin ilaçlarında ise durum tam tersi olup en düşük değer staurosporinde gözlenmiştir. DNA kırılması durumuna bakıldığında ise staurosporin ve miltefosin bu apoptoz bulgusunu göstermiştir. Fakat Glukantim®’de apoptoz bulgusuna rastlanılmamıştır. Bcl-2 değerinin yüksek olmasının apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu durumda *L. tropica* promastigotlarında DNA kırılması ile bcl-2 konsantrasyonu arasında bir ilişki olabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber bu çalışmanın diğer *Leishmania* türleri ile yapılacak başka çalışmalarla da desteklenmesi gerekmektedir.



6.SONUÇ

Leishmania türlerinde apoptoz benzeri bir programlı hücre ölümü mevcut olduğu düşünülmektedir. Fakat *Leishmania*’nın hem türleri arasında hem de her türün promastigot ve amastigot formlarında programlı hücre ölümünü gösteren belirteçler arasında farklılık bulunmaktadır. Bu nedenden dolayı programlı hücre ölümü indükleyicilerine verilen yanıtta da farklı durumlar meydana gelmektedir.

Leishmania tropica’da yapılan programlı hücre ölümü çalışmaları çok az sayıdadır. Bu çalışmada, *Leishmania* tedavisinde oral bir ilaç olup son yıllarda kullanımı en çok tercih edilen miltefosin ilacı ile pentavalen antimon bileşikleri adıyla anılan birinci kuşak ilaçlardan Glukantim®, programlı hücre ölümü belirteçlerinden DNA kırılması yönünden, *L.tropica* promastigotlarında incelenmiştir. Aynı zamanda bu iki ilacın promastigotlardaki bel-2 konsantrasyonuna olan etkisi de analiz edilmiştir. Bu araştırmalar yapılırken bu iki ilaç *Leishmania* tedavisinde etkisi çok güçlü olan ve çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan staurosporin ilacı ile karşılaştırılmıştır. Staurosporinin 50µmol, 25µmol, 12.5µmol ve 6.25µmol dozları *L. tropica* promastigotlarında oligonükleozomal DNA kırılması görüntüsü vermiştir. Yine aynı dozlarda TUNEL yöntemi analizinde de apoptotik DNA kırılmasına uğrayan hücreler diğer hücrelere göre daha yoğun olarak gözlenmiştir. Bu durumda pozitif kontrol olarak kullandığımız staurosporinin *L. tropica* promastigotlarının üzerinde gerçekleştirdiği apoptoz indüklenmesinde etkili olabileceği kanısına varılmıştır. Buna ek olarak literatür bilgisinde belirtildiği gibi staurosporinin 50µmol, 25µmol, dozlarında promastigotların yapısında morfolojik değişimler de gözlenmiştir. Miltefosin ilacı ile indüklenen oligonükleozomal DNA kırılması *L. tropica* promastigotlarına uygulanan 25 µmol olan dozda görüntülenmiştir. 12.5µmol olan dozda ise tam net bir fragmentasyon görüntülenememiştir. Miltefosinin ilacı uygulanan promastigotların TUNEL yöntemi ile amaçlanan DNA kırılması saptanmasında ise 25µmol ve 12.5µmol olan dozlarda DNA kırılması gözlenen hücreler diğer hücrelere göre sayıca daha yoğundur. Glukantim® uygulanan *L. tropica* promastigotlarında ise durum biraz farklıdır. Bu ilacın uygulamasında oligonükleozomal DNA kırılması gözlenememiştir. Sadece, 0.9375 mg/ml olan dozda belirsiz bir DNA fragmentasyonu benzeri görüntü açığa çıkmıştır. Yine benzer şekilde TUNEL analizinde de Glukantimin®, 15mg/ml, 7.5mg/ml, 3.75mg/ml, 1.875mg/ml olan dozlarında DNA kırılması meydana gelmemiştir. 0.9375mg/ml dozda olan uygulamada ise sayıca az

olan birkaç hücrelerin DNAsında belli belirsiz bir renk değişimi gözlenmiştir.. Yapılan staurosporin ve miltefosin ilaçları uygulanmasında *Leishmania tropica*'da, 25 µMol dozda hem TUNEL metodunda DNA kırılması oluşturmuştur, hem de apoptotik DNA merdiveni analizinde oligonükleosomal DNA kırılması görüntüsü gözlenmiştir. Buna karşın Glukantim® ilacı uygulamasında net bir apoptotik bulguya rastlanılmamıştır. Literatür bilgisinde, Glukantim® ilacının in vitro ortamda, fareden alınan, *Leishmania* ile enfekte makrofajlarda , genetoksik etkisinin, eksikliğinden ötürü apoptoz indüklenmesini gerçekleştiremediğinden bahsedilmektedir. Bu çalışmada ise *Leishmania tropica* promastigotlarında in vitro ortamda Glukantim®'in apoptoz belirteçlerinden DNA kırılmasına yanıt veremediği gözlenmektedir.

L. tropica promastigotlarında staurosporin, miltefosin ve Glukantim® ilaçlarının beş dozdaki bcl-2 konsantrasyonlarına bakıldığında Glukantim® ilacındaki bcl-2 konsantrasyonu beş dozda da diğer ilaçlara göre en yüksek değerdedir. Bu durumda bcl-2 konsantrasyonu ile DNA kırılması arasında bir ilişki olabileceği düşünülmektedir. Çünkü bcl-2'nin apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir ve dolayısıyla Glukantim® ilacında apoptoz bulgusuna rastlanılmamıştır. Buna karşın miltefosin ile staurosporin ilaçlarında bcl-2 seviyesi daha düşük çıkmıştır ve DNA kırılması gözlenmiştir. Bu durumda leishmaniasis tedavisinde *L. tropica* promastigotları üzerinde, miltefosinin apoptoz indüklemesi açısından Glukantime® göre daha etkili bir ilaç olduğu söylenilebilir.

KAYNAKLAR

- Adams J.M, Cory S.** Bcl-2 regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology* 2007, 19, 488-496.
- Aimee L Edinger, Craig B Thompson.** Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology* 2004, 16(6), 663–669.
- Alain Debrabant, Nancy Lee, Sylvie Bertholet, Robert Duncan, Hira L Nakhasi.** Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *International Journal for Parasitology* 2003, 33, 257–267.
- Alexander J, Russell D.G.** The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol* 1992, 32, 175–254.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J.** Human ICE/CED- 3 protease nomenclature. *Cell* 1996, 87, 171.
- Alrajhi A.A, Ibrahim E.A, De Vol E.B, Khairat M, Faris R.M, Maguire J.H.** Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N. Engl. J. Med.* 2002, 346, 891–895.
- Antti Saraste, Kari Pulkki.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 2000, 45, 528–537.
- Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998, 281(538), 1305-8.
- Arambage SC, Grant KM, Pardo I, Ranford-Cartwright L, Hurd H.** Malaria ookinetes exhibit multiple markers for apoptosis-like programmed cell death in vitro. *Parasit Vectors* 2009, 2, 32.
- Arnould D, Akarid K, Grodet A, Petit P.X, Estaquier J, Ameisen J.C.** On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilisation. *Cell Death Differ.* 2002, 9, 65–81.
- Atan Gross, James M. McDonnell, Stanley J. Korsmeyer.** Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 1999, 13, 1899-1911.
- B.Levine, D.J. Klionsky.** Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell* 2004, 6(4), 463-477.

- Basselin M, Coombs G.H, Barrett M.P.** Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 2000, 109, 37–46.
- Basselin M, Denise H, Coombs G.H, Barrett M.P.** Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 46, 3731–3738.
- Becker S, Jaffe C.L.** Effect of protein kinase inhibitors on the growth, morphology, and infectivity of *Leishmania* promastigotes. Parasitol Res. 1997, 83, 273–280.
- Berghe T.V, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko D.V, Takahashi N, Vandenabeele P.** Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. Methods 2013, 61(2), 117–129.
- Bossy-Wetzel E, Green D.R.** Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. Mutat. Res. 1999, 434, 243–251.
- Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA.** The role of DNA fragmentation in apoptosis. Trends Cell Biol 1995, 5, 21–26.
- Bradley A.** Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature 1992, 356, 215–221.
- Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen G.M.** Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. Experimental Cell Research 2000, 256(1), 27–33.
- Brown J.M, Wouters B.G.** Apoptosis, p53, and Tumor Cell Sensitivity to Anticancer Agents. Cancer Research 1999, 59, 1391–1399.
- C. V. David and N. Craft.** Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatologi Therapy 2009, 22(6), 491–502.
- Campisi J.** Aging, Cellular Senescence, and Cancer. Annu Rev Physiol. 2013, 75, 685–705.
- Campisi J, d’Adda di Fagagna F.** Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2007, 8, 729–740.
- Campisi J.** Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. Experimental Gerontology 2003, 38, 5–11.
- Campisi J.** Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. Trends Cell Biol. 2001, 11, 27–31.
- Carrio J, de Colmenares M, Riera C, Gallego M, Arboix M, Portus M.** *Leishmania infantum*: stage-specific activity of pentavalent antimony related with the assay conditions. Exp. Parasitol. 2000, 95, 209–214.

- Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM.** Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 2000, 275, 6067–6070.
- Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM.** Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase activating complex. *J Biol Chem* 1999, 274(32), 22686-92.
- Calvopina M, Armijos RX, Hashiguchi Y.** Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, 99, 663–72.
- Chan F.K, Shisler J, Bixby J.G, Felices M, Zheng L, Appel M, Orenstein J, Moss B, Lenardo M.J.** A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 51613-51621.
- Chang K.-P, Dwyer D.M.** Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science* 1976, 193, 678–680.
- Chulay J.D, Fawcett D.W, Chung C.N.** Electron microscopy of *Leishmania donovani* in splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis during treatment with sodium stibogluconate. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1985, 79, 417–429.
- Clark and Gideon Berke.** The regulation of CD95 ligand expression and function in CTL. *J Immunol* 1998, 161(8), 3943-9.
- Croft S.L, Neal R.A, Pendergast W, Chan J.H.** The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol* 1987, 36, 2633–2636.
- Croft SL, Snowdon D, Yardley V.** The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother* 1996, 38, 1041–7.
- D.Vercammen, G. Brouckaert, G.Denecker, M. Van de Craen, W. Declercq, W. Fiers, P. Vandenabeele.** Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.* 1998, 188, 919-930.
- David CV, Craft N.** Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 2009, 22, 491–502.
- Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G.** Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 2005, 1, 66–74.
- Debrabant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R, Nakhasi H.L.** Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int. J. Parasitol.* 2003, 33, 257–267.

Den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment Access. Clin Microbiol Infect 2011, 17, 1471-1477.

De Leo A B, Jay G, Appella E, Dubois G C, Law L W, Old L J. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the Mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1979, 76, 2420-2424.

De Masters G, Di X, Newsham I, Shiu R, Gewirtz D.A. Potentiation of radiation sensitivity in breast tumor cells by the vitamin D3 analogue, EB 1089, through promotion of autophagy and interference with proliferative recovery. Mol Cancer Ther 2006, 5, 2786–2797.

Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. Cell Mol Life Sci 2001, 58, 356–70.

de Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. Front Immunol 2012, 3, 145.

Deponte M. Programmed cell death in protists. Biochimica ve Biophysica Acta 2008, 1783, 1396-1405.

Diez-Roux G, Lang RA. Macrophages induce apoptosis in normal cells in vivo. Development 1997, 124, 3633–8.

Donehower, L.A, Harvey M, Slagle B.L, McArthur M.J, Montgovery Jr C.A, Butel J.S, Taatjes D.J, Sobel B.E, Budd R.C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. Histochem Cell Biol 2008, 129, 33–43.

Dummer R, Krasovec M, Röger J, Sindermann H, Burg G. Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. J Am Acad Dermatol. 1993, 29, 963–70.

Duncan R, Muller J, Lee N, Esmaili A, Nakhasi H.L. Rubella virus-induced apoptosis varies among cell lines and is modulated by Bcl-XL and caspase inhibitors. Virology 1999, 255, 117–128.

Duncan R, Esmaili A, Law L.M, Bertholet S, Hough C, Hobman T.C, Nakhasi H.L. Rubella virus capsid protein induces apoptosis in transfected RK13 cells. Virology 2000, 275, 20–29.

Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC. Death of a trypanosome: a selfish altruism. Trends Parasitol 2006, 22, 536-542.

Ehrenberg B, Montana V, Wei M.D, Wuskell J.P, Loew L.M. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. Biophys. J. 1988, 53, 785–794.

Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners. apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 2009, 16, 966-75.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998, 391, 43–50.

Enserink M. Infectious disease. Has leishmaniasis become endemic in the US? *Science* 2000, 90, 1881-1883.

Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43, 278–282.

Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.* 2002, 81, 151–7.

Evan G. Why we live and why we die. *Chem. Biol* 1994, 1, 137–141.

Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 2000, 182, 41–9.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998, 281(5381) 1309-12.

Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000, 102(1), 1-4.

Goad L.J, Holz G.G, Beach D.H. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Mol. Biochem. Parasitol* 1984, 10, 161–170.

Goto H. Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* 2012, 26, 293–307

Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 2002, 277, 38540–38549.

Hansen K, Wagner B, Hamel W, Schweizer M, Haag F, Westphal M, Lamszus K. Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. *J Neurochem* 2007, 103, 259–275.

Harris CC. p53 Tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic- an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 1996, 17, 1187-1198.

Harvey M, Sands A.T, Weiss R.S, Hegi M.E, Wiseman R.W, Pantazis P, Giovanella B.C, Tainsky M.A, Bradley A, Donehower L.A. In vitro growth characteristics of embryo fibroblast isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* 1993, 8, 2457-2467.

Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 1997, 15, 1573–81.

Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer J.L, Schneider P, Seed B, Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 2000, 1, 489-495.

Hoeppner DJ, Hengartner MO, Schnabel R. Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2001, 412, 202–6.

Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Research* 1999, 59, 1701–1706.

Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998, 273, 9357–9360

Jazwinski S.M. Longevity, genes and aging. *Science* 1996, 273, 54-59.

Kaczanowski S, Sajid M, Reece S.E. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites & Vectors* 2011, 4(44), 1-8.

Kandpal, M, Tekwani B.L. Polyamine transport systems of *Leishmania donovani* promastigotes. *Life Sci.* 1997; 60; 1793–1801.

Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007, 21, 1621–1635.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002, 181(182), 471–4.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994, 73, 2013–2026.

Killick-Kendrick. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand flies. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of Kinetoplastida, I*. Academic Press, New York, 1979; 395–449.

Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999, 6, 508-515.

Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000, 6, 513-519.

- Krueger A, Fas S.C, Baumann S, Krammer P.H.** The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 2003; 193:58–69.
- Krysko DV, Vanden Berghe T, D’Herde K, Vandenabeele P.** Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008, 44, 205-21.
- Kobets T, Grekov I, Lipoldova M.** Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Current Medicinal Chemistry* 2012, 19(10), 1443–1474.
- Koopmann R, Muhammad K, Perbandt M, Betzel C, Duszenko M.** *Trypanosoma brucei* ATG8: structural insights into autophagic-like mechanisms in protozoa. *Autophagy* 2009, 5(8), 1085-1091.
- Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C.** Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992, 36, 1630–4.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell R.A.** Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Cell* 1996; 384: 368– 372.
- Kumar R, Herbert P.E, Warrens A.N.** An introduction to death receptors in apoptosis. *International Journal of Surgery* 2005, 3, 268-277.
- Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Copeland NG, Jenkins NA.** Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes Dev* 1994, 8, 1613–1626.
- L. Aliaga, F. Cobo, J. D. Mediavilla Bravo J, Osuna A, Amador JM, Martín-Sánchez J, Cordero E, Navarro JM.** Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmani infantum* clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine* 2003, 82(3), 147–158.
- Langreth S.G, Berman J.D, Riordan G.P, Lee L.S.** Finestructural alterations in *Leishmania tropica* within human macrophages exposed to antileishmanial drugs in vitro. *J. Protozool.* 1983, 30, 555–561.
- Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi H.L.** Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell. Death Differ.* 2002,9, 53–64.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P.** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997, 185, 1481–6.
- Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, LeGrand EK, Maronpot RR, Trump BF.** The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol* 1999, 27, 484–90.

- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula S.M, Ahmad M, Alnemri E.S, Wang X.** Cytochrome C and dATP- dependent formation of Apaf-1/ caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997, 91, 479–489.
- Lin H.Y, Shih A.I, Davis F.B, Tang H, Martino L.J, Bennett J.A, Davis P.J.** Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *Journal of Urology* 2002, 168, 748-755.
- Linzer D.I, Levine A.J.** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979, 17, 43-52.
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X.** The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induce DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 1998, 95, 8461–8466.
- Lockshin RA, Zakeri Z.** Cell death in health and disease. *J Cell Mol Med* 2007, 11, 1214-24.
- Hofseth L.J, Hussain S.P, Harris C.C. p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* 2004, 25, 177-181.
- Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Oppender F.R.** Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000, 111, 1–14.
- Mac Farlane M.** TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* 2003, 139, 89-97.
- Madeo F, Fröhlich E, Fröhlich KU.** A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* 1997, 139, 729-734.
- Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lächelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist S.J, Wesselborg S, Fröhlich K.** A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 2002, 9, 911-917.
- Madeo F, Herker E, Wissing S, Jungwirth H, Eisenberg T, Fröhlich KU.** Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2004, 7, 655-660.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G.** Selfeating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8, 741–752.
- Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995, 146, 3–15.
- Martinou J, Youle R.C.** Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell* 2011, 21, 92-101.

- Margolis J, Spradling A .** Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 1995, 121, 3797-3807.
- Martin SJ, Green DR.** Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell* 1995, 82, 349–352.
- Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, Larochette N, Métivier D, Sabatier L, Kroemer G, Lima MI, Arruda VO, Alves EV, de Azevedo AP, Monteiro SG, Pereira SR.** Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. *Archives of Toxicology* 2010, 84(3), 227-232.
- McGwire B.S, Satoskar A.R.** Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Qj Med* 2013, 1-8.
- McHugh C.P, Thies M.L, Melby P.C, Yantis Jr L.D, Raymond R.W, Villegas M.D, Kerr S.F.** Short report; a disseminated infection of *Leishmania mexicana* in an eastern woodrat, *Neotoma floridana* collected in Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003, 69, 470-472.
- Mehta A, Shaha C.** Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 11798–11813.
- Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, De Monbrison F, Kaiser K, Picot S.** Through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis* 2007, 195, 1852-1859.
- Su M, Mei Y, Sinha S.** Role of Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. *Journal of Oncology* 2013, 102735, 1-14.
- Moreira M.E, Del Portillo H.A, Milder R.V, Balanco J.M, Barcinski M.A.** Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *J. Cell Physiol.* 1996, 167, 305–313.
- Moore E, O’Flaherty D, Heuvelmans H, Seaman J, Veeken H, de Wit S, Davidson R.N.** Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Bull. World Health Organ.* 2001, 79, 388–393.
- Mpoke S, Wolfe J.** DNA digestion and chromatin condensation during nuclear death in *Tetrahymena*. *Exp Cell Res* 1996, 225, 357-36.
- Murray H.W, Berman, Davies C.R, Saravia N.G.** Advances in leishmaniasis. *The Lancet.* 2005, 366(9496), 1561-1577.
- Murray H.W.** Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2185–2197.

Murray H.W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the Center of the Indian Epidemic. Clin. Infect. Dis. 2000, 31, 1104-1107.

Nedelcu AM, Driscoll WW, Durand PM, Herron MD, Rashidi A. On the paradigm of altruistic suicide in the unicellular world. Evolution 2010.

Nelyudova A, Aksenov N.D, Pospelov V, Pospelova T. By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. Cell Cycle 2007, 6, 2171–2177.

Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. Cell 1994, 79, 353-364.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci 1997, 22, 299–306.

Nikolietopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy .Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 2013, 1833(12), 3448–3459.

Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001, 41, 367–401.

Oren M. Rotter V. Introduction : p53-the first twenty years. Cell. Mol. Life Sci. 1999, 55, 9-11.

Shimony O, Jaffe C.L. Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania* amastigotes. Journal of Microbiological Methods. 2008, 75(2), 196–200.

Öz Arslan D, Korkmaz G, Gözüaçık D. Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2011, 2(4), 184-194.

Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniosis. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M. (Eds). Tıbbi Parazit Hastalıkları. 1. Baskı. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri 2007, 198-241.

Paris C, Loiseau P.M, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrob. Agents Chemother. 2004, 48, 852–859.

Pathak M.K, Yi T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. J. Immunol. 2001, 167, 3391–3397.

P Desjeux. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2004, 27(5) 305–318.

Perez-Victoria F.J, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 2397–2403.

Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin B.L. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 2003, 22, 2805–2811.

Reape TJ, McCabe PF. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis* 2010, 15, 249-256.

Reddien PW, Cameron S, Horvitz HR. Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. *Nature* 2001, 412, 198–202.

Reggiori F, Klionsky D.J. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 2002, 1, 11–21.

Ritmeijer K, Veeken H, Melaku Y, Leal G, Amsalu R, Seaman J, Davidson R.N. Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent; HIV co-infected patients have a poor outcome. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001, 95, 668–672.

Roberts C.W, McLeod R, Rice D.W, Ginger M, Chance M.L, Goad L.J. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003, 126, 29–142.

Roberts W.L, Rainey P.M . Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, 37, 1842–1846.

Rogers M.E, Ilg T, Nikolaev A.V, Ferguson M.A.J, Bates P.A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004, 430, 463-467.

Roulston A, Marcellus R.C, Branton P.E. Viruses and apoptosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 199, 53, 577–628.

Royspal A.C, Troy G.C, Zajac A.M, Duncan Jr. R.B, Waki K, Chang K.P, Lindsay D.S. Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the United States: isolation and immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* from foxhounds from Virginia. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2003, 50, 691-693.

Rybczynska1 M, Spitaler M, Knebelb NG, Boeckc G, Grunicke, Hofmann J. Effects of miltefosine on various biochemical parameters in a panel of tumor cell lines with different sensitivities. *Biochem Pharmacol* 2001, 62, 765–72.

S Elmore. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 2007, 35, 495–516.

- S. Sinta, B. Levine.** The autophagy effector Beclin1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 2008, 27, 137-148.
- Sacks DL.** Leishmania-sand fly interactions controlling species specific vector competence. *Cell Microbiol* 2001, 3, 189-196.
- Sager R.** Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ. Health Perspect.* 1991, 93, 59-62.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S.** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998, 391, 96–99.
- Santos Ferreira C, Martins P.S, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frezard F.** Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals* 2003, 16, 441–446.
- Scheffner M, Werness B.A, Huibregtse J.M, Levine A.J, Howley P.M.** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990, 63, 1129-1136.
- Schinzl A, Kaufmann T, Borner C.** Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1644, 95-105.
- Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft S.L.** Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int. J. Antimicrob. Agents* 2003, 22, 380–387.
- Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, Shohat G, Goldfinger N, Rotter V.** Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 2001, 21, 1552–1564.
- Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre J.L.** Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2064–2069.
- Sen N, Das B.B, Ganguly A, Mukherjee T, Tripathi G, Bandyopadhyay S, Rakshit S, Sen T, Majumder H.K.** Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ* 2004, 11, 924–936.
- Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D.** Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 3971–3976.

- Sharon A, Finkelstein A, Shlezinger N, Hatam I.** Fungal apoptosis: function, genes and gene function. *FEMS Microbiol Rev* 2009, 33, 833-854.
- Shemarova I.V.** Signaling mechanisms of apoptosis-like programmed cell death in unicellular eukaryotes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 2010, 155, 341-353.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Craig B. Thompson CB, Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004, 6(1), 221– 1228.
- Shintani T, Klionsky D.J.** Autophagy in health and disease:a double-edged sword.*Science* 2004, 306(5698), 990-995.
- Singh A.K. Papadopoulou B, Ouellette M.** Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. *Exp. Parasitol.* 2001, 99, 141–147.
- Soria J-C.** hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2006, 25, 4505–4514.
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE.** An alternative, non- apoptotic form of programmed celldeath.*Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97, 14376–81.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998, 1, 949–957.
- Sundar S, Olliaro P.L.** Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2007, 3(5), 733–740.
- Sundar S, Mehta H, Suresh A.V, Singh S.P, Rai M, Murray H.W.** Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 38, 377–383.
- Sundar S, Rai M.** Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2002, 15, 593–598.
- Sundar S.** Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* 2001, 6, 849–854.
- Sundar S, Gupta L.B, Rastogi V, Agrawal G, Murray H.W.** Short-course, cost-effective treatment with amphotericin B-fat emulsion cures visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000, 94, 200–204.
- Sundar S, More D.K, Singh M.K, Singh V.P, Sharma S, Makharia A, Kumar P.C, Murray H.W.** Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the Center of the Indian Epidemic. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 31, 1104-1107.

Sundström J.F, Vaculova A, Smertenko AP, Savenkov E.I, Golovko A, Minina E, Tiwari B.S, Rodriguez-Nieto S, Zamyatnin AA Jr, Välineva T, Saarikettu J, Frilander M.J, Suarez M.F, Zavialov A, Ståhl U, Hussey P.J, Silvennoinen O, Sundberg E, Zhivotovsky B, Bozhkov P.V. Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat Cell Biol* 2009, 11, 1347-1354.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995, 267, 1445-1449.

Quellette M, Drummel-Smith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates* 2004, 7, 257-266.

ter Horst R, Collin SM, Ritmeijer K, Bogale A, Davidson RN. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clin Infect Dis* 2008, 46, 1702–9.

Thornberry N.A, Bull H.G, Calaycay J.R, Chapman K.T, Howard A.D, Kostura M.J, Miller D.K, Molineaux S.M, Weidner J.R, Aunins J, Elliston K.O, Ayala J.M, Casano F.J, Chin J, Ding G.J, Egger L.E, Gaffney E.P, Limjuco G, Palyha O.C, Raju S.M, Rolando A.M, Salley J.P, Yamin T.T, Lee T.D, Shively J.E, Maccross M, Mumford R.A, Schmidt J.A, Tocci M.J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992, 356, 768–774.

Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 1997, 25, 82–88.

Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol* 2012, 28, 335–44.

Urbano A, McCaffrey R, Foss F. Isolation and characterization of NUC70, a cytoplasmic, hematopoietic apoptotic endonuclease. *J Biol Chem* 1998, 273, 34820–34927.

Uren A.G, O'Rourke K, Aravind L.A, Pisabarro M.T, Seshagiri S, Koonin E.V, Dixit V.M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* 2000, 6, 961–967.

Vaux D.L, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994, 76, 777–779.

Vaux D.L, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 2239–2244.

Verma N.K, Dey C.S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, 48(8), 3010–3015.

Verweij J, Planting A, van der Burg M, Stoter G. A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1992, 118, 606–8.

Vicencio J.M, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, Morselli E, Younes A.B, Maiuri M.C, Lavandro S, Kroemer G. Senescence, Apoptosis or Autophagy? *Gerontology* 2008, 54, 92–99.

Wieder T, Reutter W, Orfanos CE, Geilen C.C. Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. *Prog Lipid Res.* 1999, 38, 249–59.

Williams G.T. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol* 1994, 2, 463–464.

Wright MM, Howe AG, Zarembeg V. Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. *Biochem Cell Biol*, 2004, 82, 18–26.

World Health Organization. World Health Organization Working to overcome the global impact of neglected tropical disease. First WHO Report on Neglected Disease, World Health Organization, 2010, Geneva, Switzerland.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980, 284, 555–556.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim C.N, Ibrado A.M, Cai J, Peng T, Jones D.P, Wang X. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science* 1997, 275, 1129-1132.

Yordanova ZP, Iakimova ET, Cristescu SM, Harren FJ, Kapchina-Toteva VM, Woltering EJ. Involvement of ethylene and nitric oxide in cell death in mastoparan-treated unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Biol Int* 2010, 34, 301-308.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993, 75, 641–652.

Yuan J. Transducing signals of life and death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997, 9, 247–251.

Zangger H, Mottram J.C, Fasel N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ.* 2002, 9, 1126–1139.

Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 2003, 40, 481–95.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Boduç Erengül
Uyruk : Türkiye
Doğum yeri ve tarihi : Malatya 06.09.1984
Telefon : 0530 784 95 86
E-mail : erenboduc@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce, İspanyolca.

EĞİTİM:

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Beş yıllık yüksek öğretim	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	21.07.2009

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

Tübitak-Cost proje no: 109S220 *Leishmania tropica* Promastigot ve Amastigotlarının Apoptozisinde Galektin-3 ve Bcl-2'nin Rollerini ile Oksidatif Stresin Etkilerinin Araştırılması adlı projede bursiyer (2009-2012).

AKADEMİK YAYINLAR

1.MAKALELER

Hatice ERTABAKLAR¹, Serçin ÖZLEM ÇALIŞKAN², Erengül BODUÇ¹, Sema ERTUĞ¹.
Kutanöz Leşmanyazis Tanısında Direkt Mikroskopi, Kültür ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2015, 49(1), 77-84.

2. PROJELER

Tübitak-Cost proje no: 109S220 *Leishmania tropica* Promastigot ve Amastigotlarının Apoptozisinde Galektin-3 ve Bcl-2'nin Rollerini ile Oksidatif Stresin Etkilerinin Araştırılması. (2009-2012)

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Seyrek K¹, Ertabaklar H², Ertug S², Bildik A³, Kıral F³, Akşit H⁴, Boduc E³, Gökbulut C⁵, Paşa S⁶, Özbel Y⁷. In spite of increased nitric oxide production heat stress protects *Leishmania tropica* from apoptosis.IV Annual Meeting COST Action BM0802 Life or Death of Protozoan Parasites, 2012, 6-7.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Seyrek K¹, Ertabaklar H², Ertug S², Bildik A³, Kıral F³, Akşit H⁷, Boduc E³, Gökbulut C⁴, Paşa S⁵, Özbel Y⁶. *Leishmania tropica*'da apoptozis oranı. V. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, AYDIN 2011, 199.