TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRYPANOSOMA CRUZI, *LEISHMANIA TROPICA* VE *TOXOPLASMA GONDII* PARAZİTLERİNİN *EX VIVO* KÜLTİVASYONU VE AURANOFİN ANTİPARAZİTER İLAÇ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

HAZIRLAYAN: AHMET YILDIRIM
DOKTORA TEZİ

TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. KOR YERELİ

MANİSA-2021

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRYPANOSOMA CRUZI, LEISHMANIA TROPICA VE *TOXOPLASMA GONDII* PARAZİTLERİNİN *EX VIVO* KÜLTİVASYONU VE AURANOFİN ANTİPARAZİTER İLAÇ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

HAZIRLAYAN: AHMET YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. KOR YERELİ

TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ ÜYELERİ

PROF. DR. KOR YERELİ	(DANIŞMAN)
PROF. DR. AHMET ÖZBİLGİN	(JÜRİ ÜYESİ)
PROF. DR. İ. CÜNEYT BALCIOĞLU	(JÜRİ ÜYESİ)
PROF. DR. YUSUF ÖZBEL	(JÜRİ ÜYESİ)
PROF. DR. SOYKAN ÖZKOÇ	(JÜRİ ÜYESİ)

MANİSA-2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara da kaynaklar listesinde yer verdiğimi, ayrıca bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ahmet YILDIRIM

TEŞEKKÜR

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na, Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, tez çalışmam süresince tecrübelerini ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Kor YERELİ'ye, öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında her yönden yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN'e, araştırmam boyunca gerekli olanakları sağlayan Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. İ. Cüneyt BALCIOĞLU'na ve tüm öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarım Tülay AKSOY ve İbrahim ÇAVUŞ'a, hayat boyu desteklerini üzerimden hiç eksik etmeyen ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim sevgili annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP 2019-039 ve 2019-082 numaralı projeleri ile desteklenmiştir.

Ahmet YILDIRIM

KISALTMALAR VE SİMGELER

AF	:	Auranofin
AmB	:	Amphotericin B
BZN	:	Benznidazole
CH	:	Chagas hastalığı
DAT	:	Direkt aglütinasyon testi
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DSÖ	:	Dünya sağlık örgütü
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	:	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
GZ-PZR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu
IFAT	:	İndirekt fluoresan antikor testi
ITS	:	Internal transcribed spacer
KL	:	Kutanöz leishmaniasis
L. donovani	:	*Leishmania donovani*
L. infantum	:	*Leishmania infantum*
L. major	:	*Leishmania major*
L. tropica	:	*Leishmania tropica*
MCBÜ	:	Manisa Celal Bayar Üniversitesi
MKL	:	Mukokutanöz leishmaniasis
NFX	:	Nifurtimox
PKDL	:	Post kala azar dermal leishmaniasis
PYR	:	Pirimetamin
PZR	:	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SFDT	:	Sabin-Feldman dye testi
T. cruzi	:	*Trypanosoma cruzi*
TGR	:	Tiyoredoksin glutatyon redüktaz
TrxR	:	Tiyoredoksin redüktaz

TypR	:	Tripanotiyon redüktaz
VL	:	Visseral leishmaniasis
WB	:	Western blot
ZKL, ZCL	:	Zoonotik kutanöz leishmaniasis

İÇİNDEKİLER

BEYAN **İ**

TEŞEKKÜR **İİ**

KISALTMALAR VE SİMGELER **İİİ**

İÇİNDEKİLER **V**

TABLOLAR DİZİNİ **İX**

ŞEKİLLER DİZİNİ **X**

RESİMLER DİZİNİ **Xİ**

GRAFİK LİSTESİ **Xİİ**

1. ÖZET **1**

2. ABSTRACT **2**

3. GİRİŞ VE AMAÇ **3**

4. GENEL BİLGİLER **6**

4.1. CHAGAS HASTALIĞI 6

4.1.1. Taksonomi 6

4.1.2. Morfoloji 6

4.1.3. Evrim 7

4.1.4. Epidemiyoloji 8

4.1.5. Klinik ve Patoloji 9

4.1.5.1. Akut chagas hastalığı 9

4.1.5.2. Konjenital chagas hastalığı 10

4.1.5.3. Kronik chagas hastalığı 10

4.1.6. Tanı 11

4.1.7. Sağaltım 12

4.1.8. Chagas Hastalığı Klinik Öncesi İlaç Araştırmalarının Mevcut Durumu 13

4.2. LEISHMANIASIS 14

4.2.1. Taksonomi 14

4.2.2. Morfoloji 14

4.2.3. Evrim 15

4.2.4. Epidemiyoloji 16

4.2.5. Klinik ve Patoloji 17
4.2.5.1. Visseral leishmaniasis 17
4.2.5.2. Kutanöz leishmaniasis 18
4.2.5.3. Mukokutanöz leishmaniasis 18
4.2.6. Tanı 19
4.2.6.1. Klinik ve ayırıcı tanı 19
4.2.6.2. Laboratuvar tanı yöntemleri 19
4.2.7. Sağaltım 20
4.2.8. Leishmaniasis Klinik Öncesi İlaç Araştırmalarının Mevcut Durumu 21
4.3. TOXOPLASMOSIS 22
4.3.1. Taksonomi 22
4.3.2. Morfoloji 22
4.3.3. Evrim 23
4.3.4. Epidemiyoloji 24
4.3.5. Klinik ve Patogenez 25
4.3.5.1. İmmun sistemi sağlam hastalarda toxoplasmosis 25
4.3.5.2. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda toxoplasmosis 26
4.3.5.3. Gebelikte toxoplasmosis 26
4.3.5.4. Konjenital toxoplasmosis 27
4.3.5.5. Oküler toxoplasmosis 27
4.3.6. Tanı 28
4.3.6.1. Klinik Tanı 28
4.3.6.2. Laboratuvar tanı yöntemleri 29
4.3.6.2.1. Direk tanı yöntemleri 29
4.3.6.2.2. İndirek tanı yöntemleri 30
4.3.7. Sağaltım 31
4.3.8. Toxoplasmosis Klinik Öncesi İlaç Araştırmalarının Mevcut Durumu 31
4.4. HÜCRE İÇİ PARAZİTLERİN *EX VIVO* KÜLTÜRÜ 32
4.5. AURANOFİN 32
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER 34
5.1. MATERYALLER 34
5.1.1. Cihazlar 34
5.1.2. Sarf Malzemeler 35
5.1.3. Besiyeri ve Kimyasallar 36

5.1.4. Canlı Materyaller 36
5.2. YÖNTEMLER 37
5.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması 37
5.2.1.1. Liver-Infusion-Tryptose (LIT) besiyerinin hazırlanması 37
5.2.1.2. Novy-Macneal-Nicolle (NNN) besiyerinin hazırlanması 37
5.2.1.3. RPMI-1640 sıvı besiyerinin hazırlanması 38
5.2.2. Hücre Hatları 38
5.2.2.1. Hücre hatlarının temin edilmesi 38
5.2.2.2. Hücrelerin çözdürülmesi 38
5.2.2.3. Hücrelerinin pasajlanması 39
5.2.2.4. Hücrelerin dondurulması 39
5.2.2.5. Tripan mavisi ile hücrelerin canlılık kontrolü ve hücre sayımı 40
5.2.3. Parazit Suşları 40
5.2.3.1. Parazit suşlarının temin edilmesi 40
5.2.3.2. Parazit suşlarının çözdürülmesi ve *in vitro* kültürü 41
5.2.3.2.1. *Trypanosoma cruzi*'nin *in vitro* kültürü 41
5.2.3.2.2. *Leishmania tropica*'nın *in vitro* kültürü 42
5.2.3.3. Parazit suşlarının dondurulması 42
5.2.3.4. Tripan mavisi ile parazit suşlarının canlılık kontrolü ve sayımı 42
5.2.4. İlaçlar ve İlaç Konsantrasyonları 43
5.2.4.1. Auranofin 43
5.2.4.2. Kontol ilaçları 44
5.2.4.2.1. Amfoterisin b 44
5.2.4.2.2. Primetamin 44
5.2.4.2.3. Benznidazol 44
5.2.5. Parazit Suşlarının *Ex Vivo* Kültivasyonu 44
5.2.5.1. *Trypanosoma cruzi*'nin *ex vivo* kültivasyonu 44
5.2.5.2. *Leishmania tropica*'nın *ex vivo* kültivasyonu 45
5.2.5.3. *Toxoplasma gondii*'nin *ex vivo* kültivasyonu 45
5.2.6. *Trypanosoma cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* Suşlarının *Ex Vivo* Enfeksiyon Oranlarının Değerlendirilmesi 46
5.2.7. Auranofinin Sitotoksik Aktivitesinin Araştırılması 47
5.2.8. Auranofinin *In Vitro* İlaç Etkinliğinin Araştırılması 48
5.2.8.1. Hemositometri yöntemi 49

5.2.8.2. Celltiter-glo yöntemi 49
5.2.9. Auranofinin *Ex Vivo* İlaç Etkinliğinin Araştırılması 50
5.2.9.1. Auranofinin *T. cruzi* üzerine *ex vivo* ilaç etkinliğinin araştırılması 50
5.2.9.2. Auranofinin *L. tropica* üzerine *ex vivo* ilaç etkinliğinin araştırılması 51
5.2.9.3. Auranofinin *T. gondii* üzerinde *ex vivo* ilaç etkinliğinin araştırılması 52
5.2.10. Auranofinin Seçicilik İndekslerinin Belirlenmesi 54
5.2.11. İstatistiksel Analiz 54
5.2.12. Etik Kurul Onayı 54
6. BULGULAR 55
6.1. *TRYPANOSOMA CRUZI*, *L. TROPICA* VE *T. GONDII* PARAZİTLERİNİN *EX VIVO* KÜLTİVASYONU 55
6.2. AURANOFİNİN ANTİPARAZİTER İLAÇ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 62
7. TARTIŞMA 67
8. SONUÇ VE ÖNERİLER 81
9. KAYNAKLAR 83
10. EKLER 95
10.1. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARI 95
10.2. ETİK KURUL KARARI 96
10.3. TEZ ORİJİNALLİK RAPORU 97
11. ÖZGEÇMİŞ 98

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. *Trypanosoma cruzi*'nin taksonomisi 6

Tablo 2. *Leishmania* spp.'nin taksonomisi 14

Tablo 3. *Toxoplasma gondii*'nin taksonomisi 22

Tablo 4. Giemsa boyalı preparatlarda J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki *T. cruzi* amastigot, *L. tropica* amastigot ve *T. gondii* takizoit sayıları 56

Tablo 5. Auranofinin *T. cruzi* tripomastigot ve amastigotları üzerine antitrypanosomal aktivitesi (IC_{50}), J774 makrofaj hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (CC_{50}) ve seçicilik indeksi (SI) 66

Tablo 6. Auranofinin *L. tropica* promastigotları ve amastigotları üzerine antileishmanial aktivitesi (IC_{50}), J774 makrofaj hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (CC_{50}) ve seçicilik indeksi (SI) 66

Tablo 7. Auranofinin *T. gondii* takizoitleri üzerine antitoxoplasmal aktivitesi (IC_{50}), J774 makrofaj hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (CC_{50}) ve seçicilik indeksi (SI) 66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *Trypanosoma cruzi*'nin yaşam döngüsü 8
Şekil 2. Chagas hastalığının dünyadaki dağılımı 9
Şekil 3. *Leishmania* spp.'nin yaşam döngüsü 16
Şekil 4. Leishmaniasisin dünyadaki dağılımı 17
Şekil 5. *Toxoplasma gondii*'nin yaşam döngüsü 24
Şekil 6. Toxoplasmosisin dünyadaki dağılımı 25
Şekil 7. Auranofinin moleküler yapısı 33

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. *Trypanosoma cruzi*'nin yaşam formları 7
Resim 2. *Leishmania* spp.'nin yaşam formları 15
Resim 3. *Toxoplasma gondii*'nin yaşam formları 23
Resim 4. Pasaj sonrasında 8 odacıklı lamdan giemsa boyalı preparat hazırlanması 47
Resim 5. Hücre kültürü flasklarında konfluent olarak üreyen J774, Vero ve HeLa hücre hatlarının invert mikroskobundaki görünümü 55
Resim 6. Giemsa boyalı preparatta *T. cruzi* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki amastigotların pasajlar sonrasındaki görünümü 59
Resim 7. Giemsa boyalı preparatta *L. tropica* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki amastigotların pasajlar sonrasındaki görünümü 60
Resim 8. Giemsa boyalı preparatta *T. gondii* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki takizoitlerin pasajlar sonrasındaki görünümü 61
Resim 9. Auranofin ve kontrol ilaçlarının MTT sonuçlarına göre belirlenen CC_{50} değerleri 65

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. *Trypanosoma cruzi* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında pasajlar sonrasındaki hücre içi amastigot sayıları 57

Grafik 2. *Leishmania tropica* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında pasajlar sonrasındaki hücre içi amastigot sayıları 57

Grafik 3. *Toxoplasma gondii* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında pasajlar sonrasındaki hücre içi takizoit sayıları 58

Grafik 4. Auranofinin *T. cruzi*'ye karşı in vitro antitrypanosomal aktivitesi 62

Grafik 5. Auranofinin *L. tropica*'ya karşı in vitro antileishmanial aktivitesi 62

Grafik 6. Auranofinin *T. cruzi*'ye karşı ex vivo antitrypanosomal aktivitesi 63

Grafik 7. Auranofinin *L. tropica*'ya karşı ex vivo antileishmanial aktivitesi 64

Grafik 8. Auranofinin *T. gondii*'ye karşı ex vivo antitoxoplasmal aktivitesi 64

Grafik 9. Auranofinin sitotoksik aktivitesi 65

Tezin Başlığı : ***Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica* ve *Toxoplasma gondii* Parazitlerinin *Ex Vivo* Kültivasyonu ve Auranofin Antiparaziter İlaç Etkinliğinin Değerlendirilmesi**

Öğrencinin Adı : Ahmet YILDIRIM
Danışmanı : Prof. Dr. Kor YERELİ
Anabilim Dalı : Tıbbi Parazitoloji

1. ÖZET

Amaç: Çalışmamızda; Türkiye'de ilk kez *ex vivo* kültür yöntemiyle üretilen *T.cruzi*'nin yanısıra, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitlerinin J774, Vero ve HeLa hücrelerinde *ex vivo* kültivasyon yöntemiyle virulans özelliklerini kaybetmeden kısa sürede fazla miktarda çoğaltılması ve bu parazitler üzerine auranofinin antiparaziter ilaç etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sıvı azotta saklanan J774, Vero ve HeLa hücreleri birlikte *T.cruzi, L.tropica* ve *T.gondii* parazitleri kullanılarak yapılan *ex vivo* kültivasyonda ardışık 3'er pasaj yapılmıştır. Her pasaj sonrasında giemsa boyalı preparatlar hazırlanarak enfeksiyon oranları ışık mikroskobik incelemeyle değerlendirilmiştir. Auranofin *in vitro* ilaç etkinliği hemositometri ve celltiter-glo yöntemleri ile ve *ex vivo* ilaç etkinliği ise giemsa boyalı preparatların ışık mikroskobik incelenmesi ile araştırılmıştır. Ayrıca MTT ile Auranofinin sitotoksik aktivitesi incelenmiştir.

Bulgular: *Ex vivo* kültivasyon sonucunda *T.cruzi* ve *L.tropica* suşlarının ürediği en iyi hücre hatları sırasıyla J774, Vero ve HeLa, *T.gondii* suşunun ise sırasıyla HeLa, J774 ve Vero olduğu görülmüştür. Auranofinin IC_{50}, CC_{50} ve SI verilerine göre sitotoksik aktivite göstermediği, *T.cruzi*, *L.tropica* ve *T. gondii* üzerine antiparaziter aktivite gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Sonuçlar: Türkiye'de ilk kez *ex vivo* kültür yöntemiyle üretilen *T. cruzi*'nin yanısıra, *L.tropica* ve *T.gondii* suşları, *ex vivo* kültür yöntemiyle virulans özelliklerini kaybetmeden kısa sürede fazla miktarda başarılı bir şekilde üretilmiştir. Auranofinin IC_{50}, CC_{50} ve SI verilerine göre sitotoksik aktivite göstermemesi ve *L.tropica* üzerine dünyada ilk kez olmasının yanısıra, *T.cruzi* ve *T.gondii* üzerine antiparaziter aktivite göstermesi önemli ve ümit verici bir gelişme olarak değerlendirilmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica, Toxoplasma gondii, Ex vivo* kültivasyon, Auranofin

Project Title	**:**	***Ex Vivo* Cultivation of *Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica* and *Toxoplasma gondii* Parasites and the Evaluation of Antiparasitic Drug Efficacy of Auranofin**
Student Name	**:**	Ahmet YILDIRIM
Advisor	**:**	Prof. Kor YERELİ
Master of Science	**:**	Medical Parasitology

2. ABSTRACT

Objective: In our study; It was aimed to reproduce *L.tropica* and *T.gondii* parasites besides *T.cruzi,* produced by *ex-vivo* cultivation for the first time in Turkey, in J774 Vero and HeLa cells by *ex-vivo* cultivation rapidly without losing their virulence properties and to investigate the antiparasitic drug efficacy of auranofin on these parasites.

Materials and Methods: In *ex-vivo* cultivation using *T.cruzi, L.tropica* and *T.gondii* parasites, together with J774, Vero and HeLa cells, stored in liquid nitrogen, three consecutive passages were performed. Infection rates were evaluated by light microscopic examination of giemsa-stained slides prepared after each passage. In-vitro drug efficacy of auranofin was investigated by hemocytometry and celltiter-glo methods and the *ex-vivo* drug efficacy by light microscopic examination of giemsa-stained preparations. Also cytotoxic activity of auranofin was examined by MTT.

Results: As a result of *ex-vivo* cultivation, the best cell lines for *T.cruzi* and *L.tropica* strains were found to be J774, Vero and HeLa, respectively, and for *T.gondii* strains HeLa, J774 and Vero, respectively. According to IC_{50}, CC_{50} and SI data, auranofin didn't show cytotoxic activity, but showed antiparasitic activity on *T.cruzi, L.tropica* and *T.gondii* ($p < 0.05$).

Conclusions: *L.tropica* and *T.gondii* parasites besides *T.cruzi,* produced by *ex-vivo* cultivation in Turkey first, were reproduced in J774 Vero and HeLa cells by *ex-vivo* cultivation rapidly without losing virulence properties. It is considered as an important and promising development that auranofin doesn't show cytotoxic activity according to IC_{50}, CC_{50} and SI data and shows antiparasitic activity on *T.cruzi* and *T.gondii,* besides *L.tropica,* first indicated in the World.

Keywords: *Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica, Toxoplasma gondii, Ex vivo* cultivation, Auranofin

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Chagas hastalığı (CH, Amerika trypanosomiasisi), protozoon parazit olan *Trypanosoma cruzi*'nin neden olduğu potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Dünya genelinde özellikle enfekte kişilerin iş gücünün dışında kalmasına ve yılda 10.000'den fazla ölüme neden olan CH'nın en önemli halk sağlığı sorunlarından biri olduğu bilinen Latin Amerika'da yaklaşık olarak 8 milyon insan *T. cruzi* ile enfektedir ve 25 milyon insan hastalığa yakalanma riski altındadır. Hastalığın endemik olduğu Orta ve Güney Amerika'dan yılda yaklaşık olarak 300.000 turist alan ülkemiz için de önem arz etmektedir (Guarner, 2019; Ayşe Okuyucu, 2018; Chagas disease (American trypanosomiasis). 2018).

Leishmaniasis, Antarktika dışındaki tüm kıtalarda yayılım gösteren ve dişi kum sineği (*Phlebotomus* spp.) vektörü aracılığıyla memeli konaklara bulaştırılan zoonotik/antroponotik karakterli bir paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü 2018 yılı verilerine göre; KL'in 92 ülke veya bölgede, VL'in ise 83 ülke veya bölgede endemik olarak görüldüğü bildirilmiştir. Leishmaniasis için endemik bölgelerde, 1 milyardan fazla insan enfeksiyon riski altında yaşamaktadır. Her yıl tahmini olarak 30.000 yeni VL vakası ve 1 milyondan fazla yeni KL vakası rapor edilmektedir. Leishmaniasis önemli bir halk sağlığı sorunu olmasına karşın günümüzde bile hastalığın kontrol altına alınması için sarf edilen çabalar yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda komşu ülkelerde patlak veren siyasi karışıklıklar ve savaş sonucunda ülkemizde yapılan yoğun göç hareketi dolayısıyla olgu sayıları ve odaklarda önemli artışlar görülmektedir. Ayrıca, yurt dışından dirençli suşların ülkemize girişinde artış görülmektedir. Bu durum, ileriki yıllarda bu sağlık sorunda artış yaşanabileceğini göstermektedir (Burza ve ark., 2018; Özbel ve Toz, 2007; WHO, 2020).

Toxoplasmosis, zorunlu hücre içi apicomplexan protozoon türü olan *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır. Dünya genelinde en yaygın olarak görülen parazitlerden biri olan ve birçok sıcakkanlı hayvan türünde (30'dan fazla kuş türü ve 300 memeli türü) enfeksiyona neden olabilen *T. gondii*, dünya

nüfusunun tahmini olarak %30-50'sini kapsayan prevalansa sahip olmasından dolayı insanlarda en yaygın olarak görülen enfeksiyon hastalığıdır. Ülkemizde *T. gondii* seropozitifliğinin araştırıldığı çok sayıda araştırma yapılmıştır. Son yıllardaki veriler göz önüne alındığında anti-*T. gondii* IgG pozitifliği %17,5-69,5 arasında, anti-*T. gondii* IgM pozitifliği ise %0-5,4 arasında rapor edilmiştir (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020; Paris, 2020; Flegr ve ark., 2014).

Chagas hastalığının etkeni olan *T. cruzi,* leishmaniasis etkeni olan *Leishmania* spp. ve toxoplasmosis etkeni olan *T. gondii* parazitlerinin üretilmesinde *in vitro, ex vivo* ve *in vivo* gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. *Trypanosoma cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitlerinin *ex vivo* olarak üretilmesi, *in vivo* modellere kıyasla çok sayıda avantajlara sahiptir. Bu avantajlar arasında etik değer, düşük maliyet ve kolay uygulanabilirlik yer almaktadır. Çeşitli hücre hatlarının kullanıldığı *ex vivo* kültür yöntemi ile *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitlerinin çoğaltılması, tanı testleri ve yeni tanı kitleri geliştirilmesi, tanıda kullanılan yöntemlerin etkinliğinin değerlendirilmesi, yeni geliştirilen ilaç moleküllerininin taranması ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi, doğal kaynaklardan ve bitkilerden elde edilen ilaç adayı moleküllerin etkinliğini araştırması, farklı kullanım alanlarındaki onaylı ilaçların antiparaziter etkinliğinin değerlendirilmesi, hastalıkların patogenezinin aydınlatılması, konak-parazit ilişkisinin aydınlatılması ve profilaktik ilaçların geliştirilmesi konularında yapılacak bir çok çalışmaya olanak sağlaması bakımından oldukça büyük önem taşımaktadır (Passero ve ark., 2009; Acosta-Dávila ve ark., 2020; Oualha ve ark., 2019; Gonzalez-Fajardo ve ark., 2015; Cobb ve Smeltz, 2012; Stempin ve ark., 2008).

Chagas hastalığı, leishmaniasis ve toxoplasmosis tedavilerinde, güvenli, etkili ve ucuz ilaçlara ihtiyaç vardır. Bu nedenle tedavide kullanılabilecek yeni etken madde ve yeni ilaç adaylarının araştırılması gerekmektedir. Ancak, yeni ilaçların geliştirilmesi, yüksek başarısızlık oranı ile ilişkili olarak pahalı ve zaman alıcı bir süreçtir. Halihazırda onaylanmış ilaçlar için yeni tedavi amaçlarının tanımlanması, yeni ilaç keşfinden daha uygun ve ulaşılabilir olmaktadır. Auranofin, romatoid artrit tedavisi için onaylanmış bir ilaçtır ancak kanser, nörodejeneratif hastalıklar, HIV/AIDS, paraziter ve bakteriyel enfeksiyonlar dahil olmak üzere bir dizi başka hastalıkta potansiyel terapötik olarak kullanımı araştırılmaktadır. Daha önce insan kullanımı için onaylanmış olan AF gibi ilaçlar, tanımlanan yeni tedavi amaçları için

yeni ilaçların maliyetinin küçük bir bölümüyle klinik kullanıma sunulabilmektedir (Roder ve Thomson, 2015).

Bu tez çalışmasında; Türkiye'de ilk kez *ex vivo* kültür yöntemi ile üretilen *T. cruzi*'nin yanısıra, *L. tropica* ve *T. gondii* parazitlerinin J774, Vero ve HeLa hücrelerinde *ex vivo* kültivasyon yöntemi ile parazitlerin virulans özelliklerini kaybetmeden kısa sürede fazla miktarda çoğaltılması ve *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitleri üzerinde AF'in antiparaziter ilaç etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. CHAGAS HASTALIĞI

4.1.1. Taksonomi

Chagas hastalığı etkeni olan *T. cruzi* (Tablo 1), endemik bölgeler arasında gözlenen klinik semptomlardaki önemli değişikliklere katkıda bulunduğundan uzun süredir şüphelenilmekte olan yedi kararlı genetik gruba (TcI-TcVI ve Tcbat) ayrılan genetik çeşitlilik sergilemektedir (Zingales, 2018).

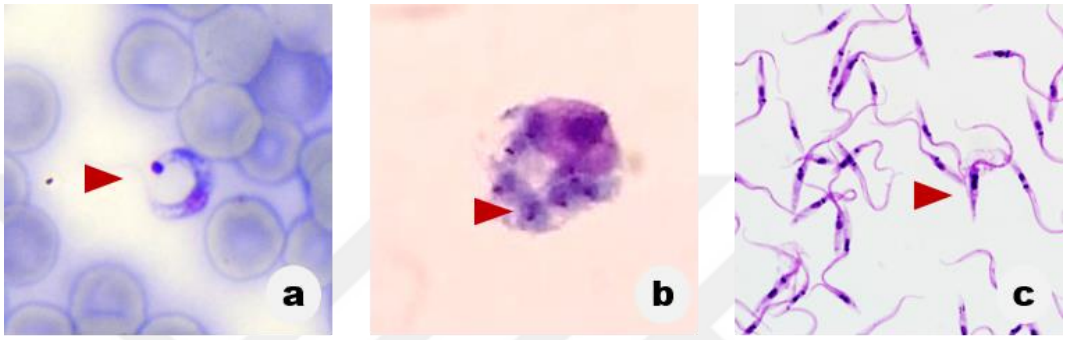
Tablo 1. *Trypanosoma cruzi*'nin taksonomisi (Töz Özensoy ve ark., 2007)

Alem	**:**	Protista
Alt alem	**:**	Protozoa
Şube	**:**	Sarcomastigophora
Alt şube	**:**	Mastigophora
Sınıf	**:**	Zoomastigophora
Takım	**:**	Kinetplastida
Aile	**:**	Trypanosomatidae
Bölüm	**:**	Stercoraria
Cins	**:**	Trypanosoma
Tür	**:**	*Trypanosoma cruzi*

4.1.2. Morfoloji

Trypanosoma cruzi'nin memeli konaklardaki yaşam formları; kan dolaşımındaki trypomastigotlar ve hücre içerisinde yerleşen replikatif amastigot formlarıdır. Vektördeki yaşam formları ise; replikatif epimastigotlar ve enfektif metasiklik trypomastigotları kapsamaktadır. Trypomastigot formunda kinetoplast, nükleusun arkasında ve genelde parazitin en arka ucunda yer almaktadır. Kamçı arka uçtan çıkmakta ve parazitin vücudu boyunca kıvrımlı bir şekilde ilerlemektedir. Ön uçtan çıkarak serbest sonlanan kamçının vücuda bu şekilde tutunması ile, bir yüzgeç gibi

görev yapan ve organizmanın hareketini sağlayan dalgalı zar meydana gelmektedir. Amastigot formunda parazit yuvarlak şekilli olup kamçısı bulunmamaktadır. Kinetoplast genellikle nükleusa çok yakın ve koyu boyanmaktadır. Bu form hareketsiz hücreiçi formdur. Epimastigot formunda ise kinetoplast daha merkezi ve nükleusun önündedir. Kamçı parazitin ortasından başlamakta ve trypomastigotlara göre daha kısa bir dalgalı zar oluşturmaktadır. Trypomastigotlardan daha az hareketlidir (Resim 1) (Töz Özensoy ve ark., 2007).

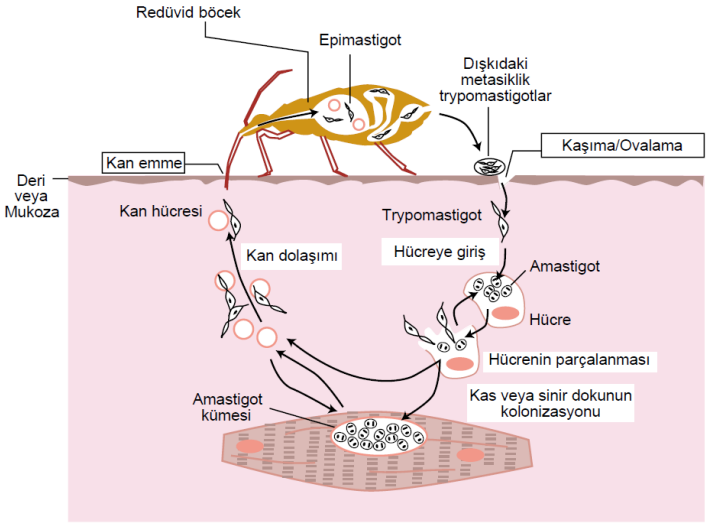


Resim 1. *Trypanosoma cruzi*'nin yaşam formları (Orijinal) (Giemsa, 1000x)
(a:Trypomastigot, **b:**Amastigot, **c:**Epimastigot**)**

4.1.3. Evrim

Trypanosoma cruzi, yaşam döngüsünün belirli aşamalarında omurgalı ve omurgasız konaklara bulaşan bir kinetoplastid protozoondur. Triatoma cinsi redüvid böcekler, enfekte olmuş bir memeli konaktan kan emme esnasında kan dolaşımındaki trypomastigotları almaktadır. Vektörün orta bağırsağında trypomastigotlar, omurgasız konaktaki temel çoğalma aşaması olan epimastigotlara dönüşmektedir. Epimastigotlar vektörün arka bağırsağına göç etmektedir ve vektörün dışkısı ile dışarı atılan enfektif metasiklik trypomastigotlara dönüşmektedir. Metasiklik trypomastigotlar ısırık yarasından veya sağlam mukoz memranlardan memeli konağa girmektedir ve lizozom aracılı bir mekanizma yoluyla birçok çekirdekli hücre türünü enfekte etmektedir. Trypomastigotlar, sitoplazma içerisinde 4-5 günlük bir süre boyunca yaklaşık 12 saatte bir ikiye bölünerek çoğalan hücre içi amastigot formuna dönüşmektedir. Sonrasında, amastigotlar trypomastigotlara dönüşmektedir, konak hücre patlamaktadır ve trypomastigotlar kan dolaşımına salınmaktadır. Kan dolaşımındaki trypomastigotlar daha sonra yeni hücrelere girebilmektedir, yeni

replikasyon döngüleri başlatabilmektedir ve memeli konaktan beslenen vektörleri enfekte edebilmektedir. Başarılı bir antitrypanozomal tedavi uygulanmadığında ise enfeksiyon, memeli konağının ömrü boyunca sürmektedir (Bern Kjos ve ark., 2011; Bern, 2015) (Şekil 1).

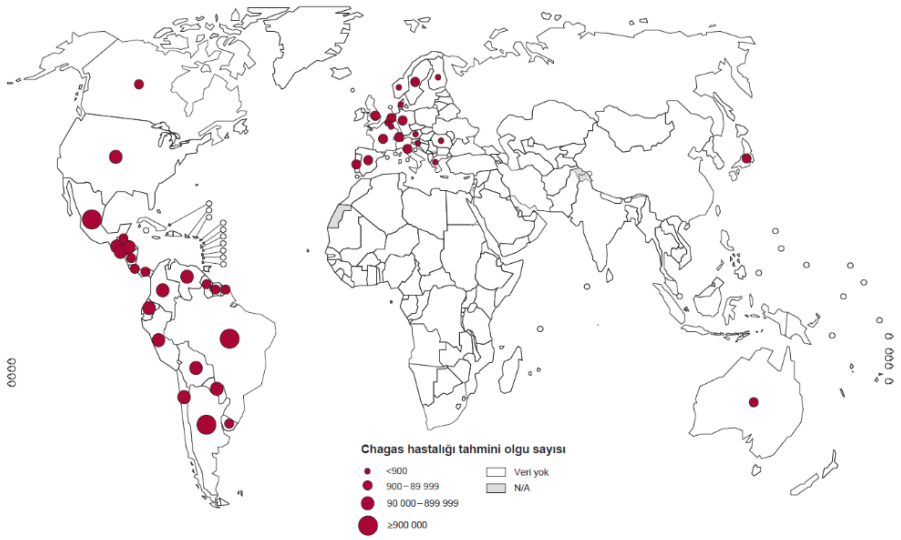


Şekil 1. *Trypanosoma cruzi'nin* yaşam döngüsü (Macedo ve ark., 2002)

4.1.4. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre CH, 17 ihmal edilen tropikal hastalık arasında sınıflandırılmaktadır. Ayrıca CH, dünya çapında yaklaşık 8 milyon insanın *T. cruzi* ile enfekte olması, yaklaşık 100 milyon insanın enfeksiyon riski taşıması ve CH'na bağlı olarak yılda 2000 ölüm görülmesi bakımından ciddi bir halk sağlığı sorunudur (Echeverria ve Morillo, 2019; WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis). 2020). Tahmini *T. cruzi* sero-pozitifliği en yüksek olan ülkenin Bolivya (%6,8-18) olması ile birlikte endemik ülkeler arasında CH prevalansı bakımından önemli farklılıklar vardır. Brezilya (%1) ve Meksika (%1), Arjantin (%4,1) ile birlikte bölgenin en düşük prevalanslarına sahip olmalarına rağmen, Latin Amerika'daki enfekte nüfusun yarısından fazlasını barındırmaktadırlar (Rassi ve ark., 2010; Echeverria ve Morillo, 2019). Endemik ülkelerde, gelişmemiş olan altyapının vektörün gelişimi ve çoğalması için ortam sağlamasından dolayı, ağırlıklı olarak kırsal alanlarda görülen CH çoğunlukla vektör aracılı olarak bulaşmaktadır. Ancak, kırsal alanlardan kentsel alanlara göç eğilimleri diğer bulaş yollarına dikkati çekmiş

ve mevcut durumda kentsel alanları ve çevresini etkileyerek CH'nın epidemiyolojisini değiştirmiştir (Echeverria ve Morillo, 2019). Latin Amerika'da endemik olmasına rağmen, göç paternleri CH'nı küreselleştirmiştir ve Avrupa, ABD, Japonya ve Avustralya'dan olgular bildirilmektedir (Perez ve ark., 2015) (Şekil 2). ABD'nde yaklaşık olarak 300.000 kişinin CH ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (Manne-Goehler ve ark., 2016). Avrupa kıtasında yaklaşık olarak 100.000 CH olgusunun bulunduğu tahmin edilirken, bu olguların 45.000-67.000 kadarı İspanya'da görülmektedir (Echeverria ve Morillo, 2019; Antinori ve ark., 2017). Çoğu *T. cruzi* taşıyıcısının asemptomatik olduğu düşünüldüğünde, gerçek prevalansın hafife alınabileceği düşünülmektedir. Ana bulaşma mekanizmaları; anneden çocuğa dikey geçiş ve kan transfüzyonlarıdır. Bu bakımdan, ABD, İspanya, İtalya, Kanada, Fransa ve Birleşik Krallık gibi ülkelerde, enfekte hastaları tespit etmek veya endemik ülkelerden gelen enfekte insanların kan bağışının önüne geçilmesi için bazı kan taramaları yapılmaktadır (Strasen ve ark., 2014).



Şekil 2. Chagas hastalığının dünyadaki dağılımı (WHO, 2016)

4.1.5. Klinik ve Patoloji

4.1.5.1. Akut chagas hastalığı

Vektör kaynaklı maruziyeti takiben inkübasyon süresi 1-2 haftadır ve sonrasında CH'nın akut fazı başlamaktadır (Bern, 2015; Bern Martin ve ark., 2011).

Trypanosoma cruzi enfeksiyonunun akut fazı 8-12 hafta sürmektedir (Castro-Sesquen ve ark., 2011). Çoğu hastada spesifik olmayan semptomlar bulunmaktadır veya asemptomatiktir. Hastaların az bir kısmında ise akut enfeksiyon, vektörün ısırdığı bölgede (tipik olarak yüz veya ekstremitelerde) görülen ve chagoma olarak bilinen yangı ve şişlik ile ilişkili olabilmektedir. Konjonktiva yoluyla etkenin vücuda girişi, Romana belirtisi olarak bilinen üst ve alt göz kapağının karakteristik tek taraflı şişmesine yol açabilmektedir (de Barros Moreira Beltrão ve ark., 2009).

4.1.5.2. Konjenital chagas hastalığı

Enfekte annelerin bebeklerinin yaklaşık yüzde %1-10'u akut *T. cruzi* enfeksiyonu ile doğmaktadır (Messenger ve ark., 2017; Bern ve ark., 2009). Konjenital enfeksiyonların çoğu asemptomatiktir veya spesifik olmayan bulgulara neden olmaktadır ve bu olguların tespit edilebilmesi için laboratuvar taraması gerekli olmaktadır (Messenger ve ark., 2017). Düşük doğum ağırlığı (<2500 g), anemi ve hepatosplenomegali, konjenital CH olan bebeklerde enfekte olmamış bebeklere göre daha sık olarak görülmektedir (Torrico ve ark., 2004; Messenger ve ark., 2015). Bir annede CH'nın tanımlanması durumunda tüm çocukları için acilen test yapılması sağlanmalıdır. Enfekte bir bebeği olan annenin diğer çocuklarına bulaştırma riskinin daha yüksek olabileceğini düşünülmektedir (Negrette ve ark., 2005).

4.1.5.3. Kronik chagas hastalığı

Başarılı antitrypanozomal tedavinin uygulanmadığı durumlarda, genellikle enfeksiyonun başlamasından 8-12 hafta sonra ortaya çıkmaktadır ve kronik faz hastanın ömrü boyunca sürmektedir. *Trypanosoma cruzi* ile enfekte olmuş kişilerin neredeyse tamamında kronik fazın ilk 1-30 yılı boyunca hastalık asemptomatik seyretmektedir; hastaların yüzde 20-40'ında ise daha sonra hastalığın kardiyak ve/veya gastrointestinal formlarının geliştiği varsayılmaktadır (Rassi ve ark., 2010). Kronik *T. cruzi* enfeksiyonunun indetermine formundaki hastalar pozitif serolojiye sahiptir, ancak kardiyomiyopati veya gastrointestinal hastalık belirtileri bulunmamaktadır. İndeternine formda 5-30 yıl arasında değişen latent süreç sonrasında hastaların yaklaşık %20-30'unda kardiyomiyopati gelişmektedir. Kronik Chagas kalp hastalığı olan hastalar, asemptomatik olabilmektedirler veya eforda

nefes darlığı, yorgunluk, çarpıntı, baş dönmesi, senkop, göğüs ağrısı ve ödem gibi semptomlar gösterebilmektedirler. Semptomlar kalp yetmezliği, kardiyak aritmiler ve hastalığa bağlı olarak gelişen tromboembolizmden kaynaklanmaktadır (J. P. de Andrade ve ark., 2011; Rassi ve ark., 2001). Gastrointestinal sistem tutulumu daha az yaygın (%10-15) olarak görülmektedir ve periton, mide, bağırsaklar, özofagus veya larinks gibi organların paraziter invazyonu ile ilgili raporların olmasına karşın, organ nakli yapılan veya HIV enfeksiyonu olan hastalarda kronik *T. cruzi* enfeksiyonunun reaktivasyonunda nadir olarak görülmektedir. Gastrointestinal CH'ında mortalite düşüktür, ancak semptomların yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkisi olabilmektedir (de Souza-Lima ve ark., 2013). İmmun sistemi baskılanmış olan hastalarda önceden varolan kronik *T. cruzi* enfeksiyonunun reaktivasyonu, HIV ilaçları veya immun sistemi baskılayan ilaçların uygulanması nedeniyle ortaya çıkabilmektedir (Bern, 2012; Martinez-Perez ve ark., 2014).

4.1.6. Tanı

Trypanosoma cruzi enfeksiyonu için uygun tanı yöntemi, hastalığın evresine ve hastanın durumuna bağlı olarak değişmektedir. Akut fazda, antikoagüle kan veya buffy coattan hazırlanan taze preparatların mikroskobik olarak incelenmesinde hareketli trypomastigotlar saptanabilmektedir. Giemsa boyası veya diğer boyalarla boyanmış kan yaymalarının mikroskobik olarak incelenmesi ile de trypomastigotlar saptanabilmektedir. Standart paraziter besiyerlerinden birinde yapılan kan kültürü, akut faz sırasında nispeten duyarlıdır, ancak parazitlerin üremesi için 2-4 hafta gerekmektedir. Parazitemi seviyesi, tedavi uygulanmadığında dahi enfeksiyon sürecinde 90 gün içerisinde azalmaktadır ve kronik fazda mikroskobik inceleme ile trypomastigotlar tespit edilememektedir. PZR, CH'nın akut fazında hassas bir teşhis aracıdır ve enfekte donörden yapılan organ transplantasyonundan veya kazara maruz kaldıktan sonra gelişen akut *T. cruzi* enfeksiyonunu izlenmesinde kullanılabilmektedir (Bern Kjos ve ark., 2011). Konjenital CH, yaşamın erken dönemlerinde görülen akut *T. cruzi* enfeksiyonudur ve benzer tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Parazitemi seviyeleri doğumdan sonra yükselmektedir ve doğumdan sonraki 30. gün veya sonrasında zirve yapmaktadır. Moleküler teknikler, mikrohematokrit yöntemine göre yaşamın daha erken dönemlerinde konjenital

enfeksiyonların saptanmasında daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Doğumda tanı konulamayan bebeklerde 9. aydan sonra maternal antikorlar kaybolduğunda ve konjenital enfeksiyondan kronik faza geçildiğinde konvansiyonel serolojik yöntemler ile IgG aranması önerilmektedir (Bern Kjos ve ark., 2011). Kronik enfeksiyonun teşhisi, *T. cruzi*-IgG antikorlarını saptayan ve yaygın olarak kullanılan ELISA ve IFA testi gibi serolojik yöntemlere dayanmaktadır. Tanının doğruluğunu arttırmak için farklı antijenlere dayanan iki serolojik test ve/veya tekniklerin paralel olarak çalışılması gerekmektedir. Kronik *T. cruzi* enfeksiyonunda PZR, araştırmalarda kullanılabilmesine karşın, tanısal açıdan kullanışlı bir yöntem değildir (Bern Kjos ve ark., 2011).

4.1.7. Sağaltım

İnsan denemelerinde CH'na karşı etkinliği kanıtlanmış BZN ve NFX olmak üzere iki ilaç bulunmaktadır (Coura ve De Castro, 2002). *Trypanosoma cruzi* trypomastigotları ve amastigotlarına karşı aktivitesi kanıtlanmış olan ve 1971 yılından beri bilinmekte olan BZN, bir nitroimidazol türevidir. BZN, Ağustos 2017'de FDA tarafından 2-12 yaş arasındaki çocuklarda CH'nın tedavisi için onay verilmiştir ve diğer yaş grupları için kullanımı kapsamamaktadır (Drugs for Neglected Diseases Initiative, 2020). Tedavi, genellikle 60 gün olacak şekilde uygulanmaktadır. Yetişkinlere göre çocuklarda ilaca bağlı yan etkiler daha az görülmektedir ve çocuklar daha yüksek dozları daha iyi tolere etmektedirler. Tam kan sayımı, karaciğer enzimleri, bilirubin, serum kreatinin ve kan üre azotunu içeren laboratuvar testleri tedaviye başlamadan önce yapılmalıdır ve tam kan sayımı tedavi sırasında her 2-3 haftada bir tekrarlanmalıdır. Dermatit, periferik nöropati, anjiyoödem ve kemik iliğinin baskılanması gibi yan etkiler görülmektedir (Bern, 2011). *Trypanosoma cruzi* trypomastigotları ve amastigotlarına karşı aktivitesi kanıtlanmış olan ve 1965 yılından beri bilinmekte olan NFX ise, bir nitrofuran bileşiğidir (Coura ve De Castro, 2002; D H Wegner, 1972a, 1972b). NFX, mevcut durumda FDA onayı almamıştır, ancak bir araştırma protokolü altında kullanılabilmektedir. Tedavi, genellikle en az 90 gün olacak şekilde uygulanmaktadır. Yetişkinlere göre çocuklar ilacı daha iyi tolere etmektedir. Gastrointestinal şikayetler ve merkezi sinir sistemi toksisitesini içeren yan etkiler sık

olarak görülmektedir, ancak genellikle tedavi kesildiğinde ortadan kalkmaktadır (Forsyth ve ark., 2016). Laboratuar testleri tedaviye başlamadan önce, tedavi sırasında her 4-6 haftada bir olacak şekilde ve tedavinin sonunda uygulanmalıdır.

4.1.8. Chagas Hastalığı Klinik Öncesi İlaç Araştırmalarının Mevcut Durumu

İlaç adaylarının geliştirilmesi ve test edilmesinde ilerleme yavaş olmasına rağmen, daha az yan etkiye sahip, yeni ve daha etkili ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır (Ribeiro ve ark., 2009). Posakonazol ve ravukonazol dahil ergosterol sentezini inhibe eden triazollerin, *T. cruzi*'ye karşı *in vitro* aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Diniz ve ark., 2010; Urbina, 2010). Ancak, CH'nın tedavisinde posakonazolün etkili olduğuna dair bir klinik çalışma bulunmamaktadır. *In vitro* (ve bazı durumlarda *in vivo*) aktiviteye sahip diğer ilaç adayları arasında diğer nitroimidazoller (örn., feksinidazol), cruzipain inhibitörleri, bifosfonatlar ve tripanotiyon sentez inhibitörleri bulunmaktadır (Urbina, 2009; Bahia ve ark., 2014). Son zamanlarda kaydedilen ilerlemeler ve CH tedavisi ile ilişkili zorluklar göz önüne alındığında, önümüzdeki birkaç yıl içinde ortaya çıkacak olan CH için yeni bir optimal tedavi olasılığı belirsizliğini korumaktadır. Bununla birlikte, bir ilaç keşfi girişiminin başarısının sadece yeni araç ve teknolojilerin uygulanmasına değil, aynı zamanda sağlam fon ve işbirlikçi Ar-Ge modellerinin bulunmasına ve hastalığın patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına da bağlı olduğu açıktır. Bu nedenle, bu alanda çalışanlar sürekli olarak daha fazla destek ve işbirliği için desteklenmelidir ve CH ile ilgili temel soruları cevaplamak için geniş kapsamlı işbirliğine paralel olarak ilaç geliştirme projeleri yürütülmelidir (Kratz, 2019).

4.2. LEISHMANIASIS

4.2.1. Taksonomi

Leishmaniasis'de insan enfeksiyonu 30 *Leishmania* türünün morfolojik olarak ayırt edilemeyen 21'i tarafından oluşturulmaktadır (Tablo 2). Moleküler metodlar, izoenzim analizleri ve monoklonal antikorlar kullanılarak tür ayrımı yapılmaktadır.

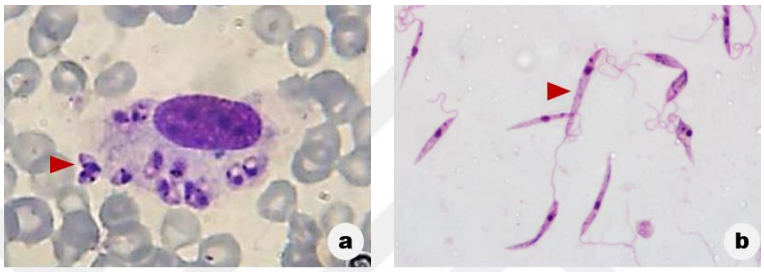
Tablo 2. *Leishmania spp.*'nin taksonomisi (Özbel ve Toz, 2007)

Alem	**:**	Protista
Alt Alem	**:**	Protozoa
Şube	**:**	Sarcoastigophora
Alt Şube	**:**	Mastigophora
Sınıf	**:**	Zoomastigophora
Takım	**:**	Kinetoplastida
Aile	**:**	Trypanosomatidae
Genus	**:**	*Leishmania*
Subgenus	**:**	*Leishmania*
Tür	**:**	*L. donovani, L. infantum, L. chagasi, L. tropica, L. major, L. aethiopica, L. mexicana,* (*L. amazonensis, L. venezuelensis, L. pifanoi, L. enrietii*).
Subgenus	**:**	*Viannia*
Tür	**:**	*L. braziliensis* kompleksi (*L. braziliensis, L. colombuensis, L. equatorensis, L. peruviana*), *L. guyanensis* (*L. guyanensis, L. panamensis, L. shawi*) *L. lainsoni, L. naiffi.*

4.2.2. Morfoloji

Leishmania cinsine ait türlerin yaşam döngülerinde memeli konakta görülen "amastigot" ve vektörde görülen "promastigot" form olmak üzere morfolojik olarak farklı iki form bulunmaktadır. Amastigot formu; 2,5-6,8 µm büyüklüğünde, yuvarlak veya oval şekilli, hareketsiz ve 37°C'de uzunlamasına bölünerek çoğalan yapıdadır. Polimorfonükleer lökositler, monositler ve endotel hücreleri içerisinde tek ya da kümeler halinde veya hücre dışında görülebilmektedirler. Sitoplazma içerinde nukleusun yerleşimi arka uca yakın, kinetoplast ise daha büyük yapıdaki nukleusa

bitişik bir şekilde bulunmaktadır. Promastigot formu ise, 15-20 µm uzunluğunda, 1,5-5 µm genişliğinde mekik biçinde görülen bir kamçısı bulunmakta, vektörde 26°C'de uzunlamasına ikiye bölünerek çoğalmaktadır. Vektörü olan kum sineğinin bağırsağında ve amastigot formlarının uygun besiyerlerinde şekil değiştirmesi ardından görülen yaşam formudur. Kamçının bağlantı noktasında bulunan çukurluğa "kamçı paketi" adı verilmektedir. Kinetoplastın ön kısmında ve kamçının dip kısmında bleforablast yer almaktadır. Ön uçta yuvarlak veya at nalı şeklinde bir kinetoplast, merkezi bir nukleus ve nukleolus ve nukleus membranında da porlar bulunmaktadır (Resim 2) (Scholtyseck, 1979; Markell ve ark., 1999).

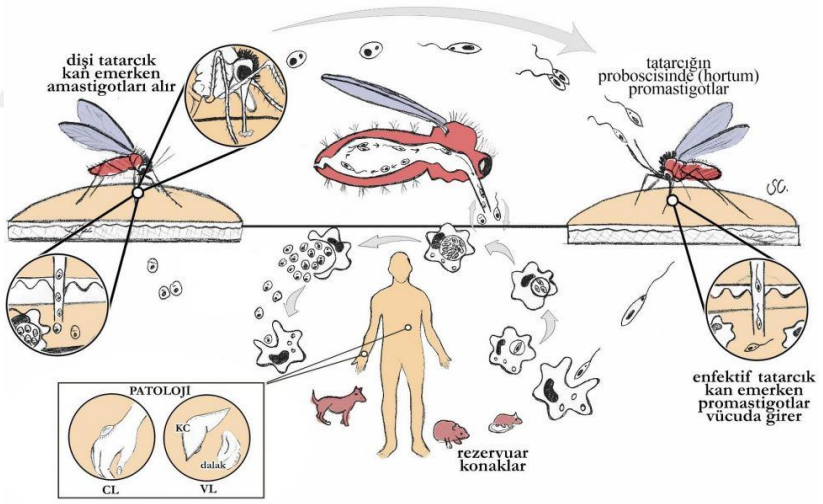


Resim 2. *Leishmania* spp.'nin yaşam formları (Orijinal) (Giemsa, 1000x)
(a:Amastigot, **b:**Promastigot**)**

4.2.3. Evrim

Hastalığı taşıyan omurgalı konağın makrofajları içerisindeki amastigotlar, vektör kum sinekleri (*Phlebotomus* spp. veya *Lutzomyia* spp.) tarafından kam emme sırasında alınmaktadır. Kum sineğinin orta midesinde sindirim enzimlerinin içine salgılandığı peritrofik membran ile sarılan kan içerisindeki *Leishmania*'ların bir bölümü makrofajların parçalanması ile birlikte sindirilirken, vücudu uzayarak kamçı geliştiren diğer *Leishmania*'lar enfektif olmayan prosiklik promastigotlara dönüşmektedir ve bölünerek çoğalmaktadır. Prosiklik promastigotların salgıladıkları enzimler, peritrofik membranın ön bölümünün erimesini ve parazitlerin torasik mideye geçmesini sağlamaktadır. Nektomonad olarak adlandırılan bu parazitlerin şekli daha uzun ve incedir. Torasik midenin ön kısmında bulunan ve kan veya besin emilimi esnasında açılan kapağa geldiklerinde kamçıları ile bağırsak epitel hücrelerinin mikrovilluslarına tutunmasıyla birlikte hektomonadlar gelişmektedir. Bu promastigotlar midenin ön kısmı yönünde hareket ederek özafagus ve farinksdeki

kıvrım ve yarıklara kamçıları ile tutunarak lümenin tıkanmasına neden olmaktadırlar. Bağlandıkları yerden ayrılan promastigotlar daha uzun ve küçük formlar şeklinde olan, ağız parçalarına giren ve enfeksiyondan sorumlu olan metasiklik promastigotlara dönüşmektedirler. Enfektif metasiklik promastigotları taşıyan vektör kum sineğinin omurgalı konaktan kan emmesi esnasında 500-1000 promastigotları kan akımının tersi yönünde inoküle etmektedir. Omurgalı konaktaki promastigotlar, başlangıçta serum içerisindeki kompleman tarafından opsonize edilmektedir ve derideki mononükleer fagositik hücreler tarafından fagosite edilmeleriyle birlikte kamçılarını kaybederek amastigot formuna dönüşmektedirler. Fagositik vakuol içerisindeki amastigotlar, ikiye bölünerek çoğalmaktadır, enfekte hücrenin parçalanmasına neden olmaktadır ve yeniden başka makrofajları enfekte edebilmektedirler. Enfeksiyonun seyrini *Leishmania*'nın türü belirlemektedir. Enfeksiyon, kendini deride sınırlayabilmektedir veya iç organ tutulumu gösterebilmektedir (Şekil 3) (Kıllıck-Kendrıck, 1979; Meinecke ve ark., 1999).



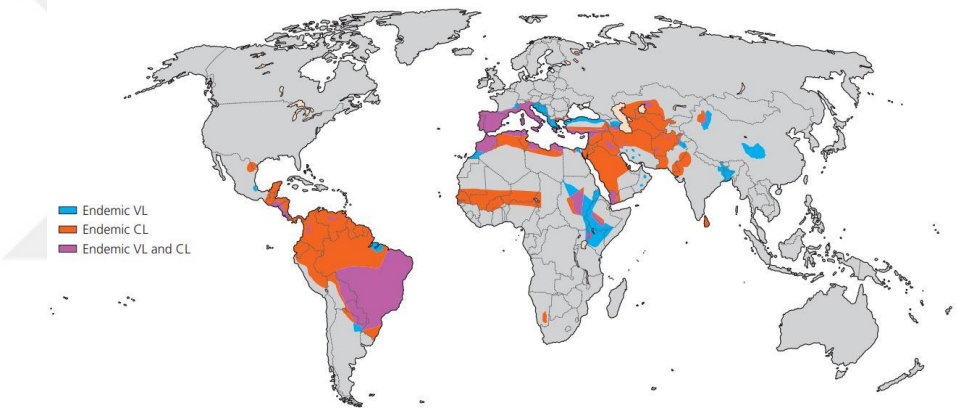
Şekil 3. *Leishmania spp.*'nin yaşam döngüsü (Miman Ö., 2018)

4.2.4. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü 2018 yılı verilerine göre; KL'in 92 ülke veya bölgede, VL'in ise 83 ülke veya bölgede endemik olarak görüldüğü bildirilmiştir. Endemik bölgelerde 1 milyardan fazla insan enfeksiyon riski altında yaşamaktadır. Her yıl tahmini olarak 30.000 yeni VL vakası ve 1 milyondan fazla yeni KL vakası rapor edilmektedir. Kutanöz leishmaniasis olgularının %90'ından fazlası Afganistan,

Brezilya, İran, Irak, Suriye, Cezayir, Kolombiya, Fas, Peru, Sudan, Tunus ve Yemen'de; VL olgularının ise %90'ından fazlası Brezilya, Hindistan, Sudan, Etiyopya, Kenya ve Somali'de meydana gelmektedir (Şekil 4) (Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. 2017; WHO | Epidemiological situation. 2020).

Leishmaniasis, 1988–2010 yılları arasında bildirilen toplam 50.381 KL olgusu ile Türkiye'de önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kutanöz leishmaniasis öncelikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde endemik olarak görülmektedir ve etkeni *L. tropica*'dır, ancak son yıllarda *L. major* ve *L. donovani* suşları ile ülkenin orta ve batı bölgelerinde bildirilen otokton olguların sayısında belirgin bir artış görülmüştür. Bu durum, KL'nin bölgede epidemiyolojisinin değiştiğini işaret edebilmektedir (Özbilgin ve ark., 2020).



Şekil 4. Leishmaniasisin dünyadaki dağılımı (Davidson, 2017)

4.2.5. Klinik ve Patoloji

Leishmaniasisin klinik sınıflandırılması: visseral leishmaniasis (VL), Kutanöz leishmaniasis (KL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç temel sendrom olarak ayrılmaktadır (Davidson, 2017).

4.2.5.1. Visseral leishmaniasis

Viseral leishmaniasis (VL), *L. donovani* ve *L. infantum*'un neden olduğu yaygın bir protozoon enfeksiyonudur. *L. infantum*'un neden olduğu zoonotik hastalık,

Akdeniz havzası, Orta Doğu, Çin ve Güney Amerika'da meydana gelmektedir ve ana rezervuar olarak köpeklere sahiptir. *L donovani*'nin neden olduğu antroponotik form doğu Afrika, Hindistan, Bangladeş ve Nepal'de yaygındır. Şu anda, Hindistan Yarımadası ve Doğu Afrika VL yükünün %70'inden fazlasını taşımaktadır. Eski dünyada VL'e *L. donovani* (Pakistan, Hindistan, Çin ve Afrika bölgelerinde) ve *L. infantum* (Akdeniz bölgesinde) sebep olmaktadır. Yeni Dünyada, VL'ye özellikle Brezilya'da bulunan *L. infantum* neden olmaktadır. VL'li hastaların dalak, karaciğer ve kemik iliğindeki makrofajlardaki parazitlerin proliferasyonu, kemik iliği supresyonu ve ileri hepatosplenomegaliye yol açmaktadır. Tedavi edilmeyen VL'li hastalarda prognozun ölümle sonuçlanma olasılığı yüksektir (Davidson, 2017).

4.2.5.2. Kutanöz leishmaniasis

Kutanöz leishmaniasis (KL), Eski Dünya'daki *L. tropica* ve *L. major*, Orta ve Güney Amerika'nın farklı bölgelerinde *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ve *L. mexicana* türleri ile oluşmaktadır ve kum sineğinin ısırdığı bölgede veya yakınında haftalar/aylar içinde gelişen tekil ülseratif veya nodüler lezyonlar olarak ortaya çıkmaktadır. Bu lezyonlar genellikle yüz, önkol ve alt bacaklar gibi vücudun açıkta kalan bölgelerinde bulunmaktadır. *Leishmania amazonensis*'in neden olduğu gibi diffuz kutanöz hastalıkta, değişken büyüklükteki nodüler lezyonlar, sıklıkla vektörün ısırdığı bölgenin uzağındaki çeşitli bölgelerde görülebilmektedir. Basit kutanöz lezyonlar genellikle kendi kendini sınırlandırarak iyileşmektedir, ancak *L. braziliensis*'in etkeni olduğu bazı durumlarda mukokutanöz doku içerisinde ilerleyebilmektedir (Davidson, 2017).

4.2.5.3. Mukokutanöz leishmaniasis

Mukokutanöz leishmaniasis (MKL), *L. braziliensis*'in etkeni olduğu genellikle burun, ağız oro- ve nazo-farenks ve göz kapağı dokusunun kronik lokal yıkımına neden olan, solunum fonksiyonunu etkileyen ve beslenmeyi engelleyen klinik sendroma neden olmaktadır. Özellikle Peru ve Bolivya'da *L. braziliensis*'e bağlı KL vakalarının ~% 3-10'unda görülmektedir (Davidson, 2017).

4.2.6. Tanı

4.2.6.1. Klinik ve ayırıcı tanı

Tanıda ilk aşamayı oluşturan klinik tanı oldukça önemlidir. Endemik bölgelerde görülen sürekli düzensiz ateş, hipergamaglobulinemi, pansitopeni, splenomegali, hepatomegali, kilo kaybı ve zayıflık semptomları görülen olgularda VL'in düşünülmesi gerekmektedir. Endemik bölgede yaşamını sürdüren ve bu bölgelere seyahat eden insanlar, VL'e yakalanması bakımından risk altındadır. Ayırıcı tanıda akut VL açısından; akut CH, sıtma, tifoid ateş, schistosomiasis, tifo, amibik karaciğer absesi, dizanteri ve biliyer tüberküloz, subakut veya kronik VL açısından; histioplasmosis, enfeksiyoz mononükleoz, hepatosplenik schistosomiasis, bruselloz, kronik sıtma splenomegalisi, uzamış salmonella bakteriyemisi, hepatosplenik schistosomiasis ve KL açısından; kutanöz tüberkülozis blastomycosis, lupus vulgaris, sifiliz sporotrichosis, chromomycosis, lobomycosis, fronkül, lepra, derinin atipik mikobakteri enfeksiyonları, sarkoidoz ve neoplazmaların göz önünde bulundurulması oldukça önemlidir (Pearson, R.D., De Queiroz Sousa, 2000).

4.2.6.2. Laboratuvar tanı yöntemleri

Pek çok endemik bölgede leishmaniasis tanısı genellikle klinik bulgulara ve bölgesel epidemiyolojik faktörlere dayanılarak yapılmaktadır. Ancak, endemik olmayan bölgelerde enfeksiyonun klinik teşhisinin ve tanımlanmasının doğrulanması, klinik örneklerde amastigotların veya kültürde promastigotların gösterilmesi, parazit DNA'sının PCR ile gösterilmesi veya *Leishmania* antijeninin tespiti ile sağlanabilmektedir. *Leishmania* amastigotları, buffy coat smear, doku biyopsileri (örn., Kutanöz, kemik iliği, dalak, lenf düğümü, karaciğer vb.) ve doku aspiratları (örn., Kemik iliği, dalak, vb.) dahil olmak üzere farklı klinik örneklerde tespit edilebilmektedir. Wright veya Giemsa boyaları, yukarıda belirtilen örnek türlerinin herhangi birinde amastigotların güvenilir tespiti için kullanılabilmektedir. Farklı *Leishmania* türlerinin morfolojik olarak benzer olmasından dolayı tür ayrımında ek yöntemlerin (örneğin, PCR ve DNA sekansı) uygulanması oldukça önemlidir. Kültür (NNN besiyeri) ve deney hayvanı inokülasyonu, tanıyı doğrulamak için benzer şekilde yardımcı olsa da, bu yöntemler klinik laboratuvarlarda rutin

olarak mevcut değildir, hasta örneklerinin ekimi için laboratuvara hızlı bir şekilde taşınmasını gerektirmektedir ve sonucun çıkması birkaç hafta sürebilmektedir. Bu nedenle, alternatif yöntemler (PCR, mikroskopi, seroloji) uygulanılabilmektedir (Theel ve Pritt, 2016).

4.2.7. Sağaltım

Beş değerlikli antimon bileşikleri (Sb^V) olan sodyum stiboglukonat 100 mg/mL Sb^V ve meglumin antimonat 85 mg/mL Sb^V içermektedir. Visseral leishmaniasis, KL ve MKL'nin sistemik tedavisinde 28 gün boyunca günde tek uygulama 20 mg/kg kullanılmaktadır. PKDL için 3 aya kadar sürebilen tedavi uygulamaları kullanılmaktadır. Sb^V'ye ilk direnç, Afrika'daki vakaların ~%1'inde ve Hindistan'ın bazı bölgelerinde %60'a kadar yüksek olarak görülmektedir. Relaps oranları <%5 olmalıdır, ancak çok kapsamlı bir şekilde yeniden tedavi edilmedikleri takdirde relaps gösteren hastalarda sekonder Sb^V direnci gelişmesi muhtemeldir. İntralezyonel olarak kullanıldığında, ~1 ml seyreltilmemiş Sb^V, 2–3 haftaya kadar her 2-3 günde bir KL lezyonunun tabanına ve kenarlarına uygulanmaktadır (Davidson, 2017). Amfoterisin B deoksikolat, 1 mg/kg dozda gün aşırı 15 uyguluma şeklinde tedavide kullanılan güçlü bir antileishmanial ilaçtır. Temel sınırlaması ise, hastaneye yatış ve yavaş intravenöz infüzyona gerek duyulmasıdır. Böbrek fonksiyonu ve elektrolitler haftalık olarak izlenmelidir. Amfoterisin, Sb^V tedavisinin genellikle etkisiz olduğu ve toplam 30 mg/kg dozlarının kullanıldığı gelişmiş MKL için tercih edilen ilaçtır. Amfoterisin partikülleri makrofajlar tarafından alınmaktadır ve ilaç enfeksiyon bölgesini hedef almaktadır ve karaciğer ve dalakta çok yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Lipozomal amfoterisin B (AmBisome®), AmB'e göre daha düşük renal ve infüzyon toksisitesine sahiptir, ancak daha pahalıdır. Yaygın bir şekilde kullanılmıştır ve birçok ülkede VL için lisans almıştır. VL için hızla etkilidir ve toksik değildir. Ruhsatlı tedavi rejimi, 10-21 günlük bir süre boyunca günde en az beş uygulama ile 3-4 mg/kg dozda (toplam 20–30 mg/kg) uygulanmaktadır (Davidson, 2017). Miltefosin, VL'ye karşı iyi etkinliği olan bir ilaçtır ve birçok ülkede ruhsatlandırılmıştır. Yan etkileri arasında kusma ve ishal ile birlikte karaciğer enzimleri, üre ve kreatinin yükselmesi sayılabilmektedir. Hamilelikte miltefosinden kaçınılmalı ve çocuk doğurma potansiyeli olan kadınlar tedavi sırasında ve tedaviden

sonraki 2 ay boyunca etkili doğum kontrolü kullanmalıdır. 25 kg ve üzeri hastalar için 28 günlük tedavide 100 mg/gün olarak ve 2-12 yaş arası çocuklar için (8-25 kg) 2,5 mg/kg/gün olarak uygulanmaktadır. Miltefosin, Güney Amerika'da *L. braziliensis*'in etkeni olduğu KL ve MKL'ye karşı oldukça etkili bulunmuştur ve İran'da *L. major*'ün etkeni olduğu KL'e karşı oldukça etkilidir (Davidson, 2017). Paromomisin sülfat, KL ve MKL için düşük etkinliğe sahip olmasına karşın VL'de oldukça etkili ve ucuz olması ile birlikte aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir. Hindistan'da kullanım izni alan paromomisin sülfat, toksik etkilerinin düşük olması ile birlikte 15 mg/kg/gün olarak 21 gün süreyle VL tadavisinde kullanılmaktadır. Kutanöz leishmaniasis tedavisinde kullanılan topikal paromomisin birçok çalışmada değerlendirilmiştir ve plaseboya göre fayda göstermesine karşın genellikle Sb^V'den daha az etkilidir. (Davidson, 2017). Pentamidin, VL için rutin olarak kullanılmamaktadır, ancak kısa uygulamalarda - iki gün arayla yedi doz 2 mg/kg veya gün aşırı 4 doz 3 mg/kg - Yeni Dünya KL'i için etkili bulunmuştur (Davidson, 2017). Ketokonazol, *L. major* ve *L. mexicana*'nın neden olduğu KL için etkilidir, ancak *L. tropica, L. aethiopica* ve *L. braziliensis*'e karşı daha az etkilidir. Flukonazol ve itrakonazol benzer etkinliğe sahiptir ve daha iyi tolere edilmektedir. İmidazoller, VL veya PKDL'i güvenilir bir şekilde tedavi edememektedir (Davidson, 2017).

4.2.8. Leishmaniasis Klinik Öncesi İlaç Araştırmalarının Mevcut Durumu

Geçmiş 50 yıllık süreçte Sb^V bileşikleri olan sodyum stiboglukonat (Pentostam®) ve meglumin antimonat (Glucantime®) leishmaniasis tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Günümüzde bu ilaçlara karşı başta Hindistan'ın kuzeyinde olmak üzere dünya genelinde direncin arttığı bildirilmektedir (Muniaraj ve ark., 2012). Tedaviye dirençli parazitlerin görülmesi nedeniyle leishmaniasis kontrolü oldukça karmaşık bir durum sergilemektedir. Klinik olarak Sb^V bileşiklerine direnç önem kazanmakta olup Güney Amerika (55-57), Avrupa (Carrio ve ark., 2001; Faraut-Gambarelli ve ark., 1997), Orta Doğu (R Hadighi ve ark., 2007; Ramtin Hadighi ve ark., 2006) ve özellikle Hindistan'da (Das ve ark., 2005; Lira ve ark., 1999; Sundar ve ark., 2000) ön plana çıkmaktadır. Alternatif olarak kullanılabilecek az sayıda ilaç bulunmaktadır; bunlar arasında AmB, pentamidin ve miltefosin yer almaktadır (P.L. ve ark., 2005; Croft ve ark., 2006).

4.3. TOXOPLASMOSIS

4.3.1. Taksonomi

Toxoplasma gondii, *Toxoplasma* cinsinde bulunan tek tür olarak kabul edilmektedir (Tablo 3). Tip I, II veya III olarak belirtilen üç ana klonal soy, büyük ölçüde Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak görülmrktedir, ancak insan toxoplasmosis olgularının çoğunluğu tip II genotipindeki suşlar ile ilişkilendirilmektedir (Howe ve Sibley, 1995; Dardé, 2008).

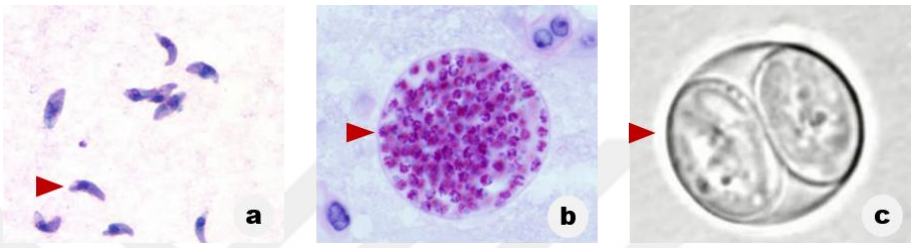
Tablo 3. *Toxoplasma gondii*'nin taksonomisi (Gürüz A.Y., 2007)

Alem	**:**	Protista
Alt alem	**:**	Protozoa
Kök	**:**	Alveolata
Kök altı	**:**	Apicomplexa
Sınıf	**:**	Coccidea
Aile	**:**	Toxoplasmatidae
Cins	**:**	*Toxoplasma*
Tür	**:**	*Toxoplasma gondii*

4.3.2. Morfoloji

Toxoplasma gondii dünya genelinde insanlarda ve hayvanlarda yaygın olarak görülmekte olan bir paraziter protozoondur. *Toxoplasma gondii*'nin bulaştan sorumlu olan; aseksüel olarak hızla çoğalabilen formu olan "takizoit", dokularda oluşan enfektif formu olan "bradizoit ve doku kistleri", enfekte kedi dışkısında görülen ve kedi ince bağırsağında çoğalan parazitin seksüel döngüsü sonucunda oluşan formu olan "ookist" olmak üzere üç yaşam formu bulunmaktadır. Takizoitler, parazitin hızlı üreyen formudur ve 2-4 µm x 4-7 µm boyutlarındadır, ön ucu sivri, arka ucu yuvarlak olan hafif hilal ya da orak şeklindedir ve aseksüel olarak konak hücre içerisinde ikiye bölünerek tekrarlayan endodiyogeni ile çoğalmaktadırlar. Doku kisti içerisinde yavaşça çoğalan ve her biri yaklaşık 1,5-7 µm büyüklüğünde olan bradizoitler, bulunduğu dokularda "doku kistleri" adı verilen ve içerisinde yüzlerce

bradizoit bulunan 200 µm çapına erişebilen yapılara dönüşmektedirler. Bu kistler dokularda latent olarak ömür boyunca kalabilmektedir. Beyin, gözler, iskelet ve kalp kasları dahil olmak üzere sinir ve kas dokularında oldukça sık görülmektedir. Oookistler ise kesin konak kedi ve kedigillerin bağırsağındaki entero-epitelial döngü sonucunda oluşan oval şekilli ve 11-14 x 9-11 µm boyutlarındaki yaşam formudur. İki tabakalı çeperi olan ookistler olgunlaşmamış olarak kedi dışkısı ile dışarı atılmaktadır. Uygun koşullarda geçirdikleri sporulasyon ile ookist içerisinde her birinde 4 sporozoit bulunan 2 sporokist oluşmaktadır (Resim 3) (Gürüz A.Y., 2007).

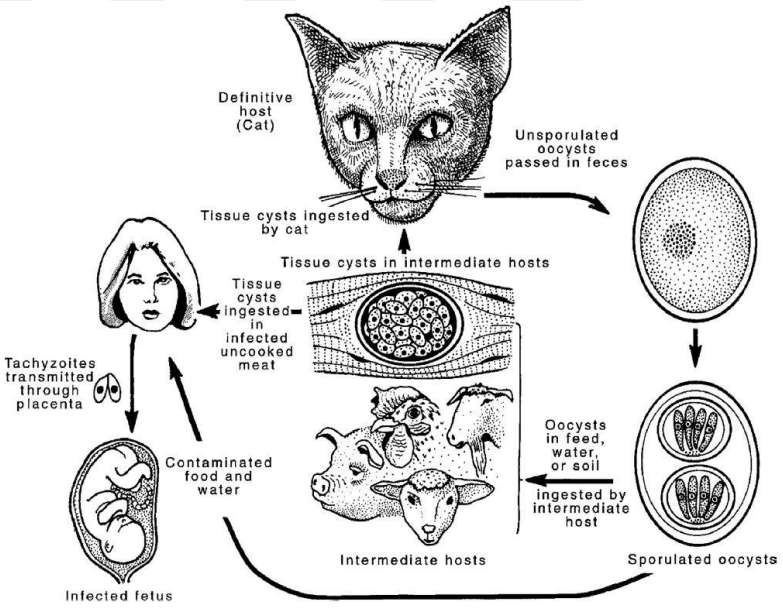


Resim 3. *Toxoplasma gondii*'nin yaşam formları (Dubey, 2013; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020)
(a: Takizoitler, **b:**Bradizoitler ve doku kisti, **c:**Sporlanmış ookist**)**

4.3.3. Evrim

Zoonoz bir parazit olan *T. gondii*'nin kesin konağı kedigiller (Felidae) ve ara konakları ise kedigiller ve insan dahil olmak üzere birçok memeli ve kanatlı türleridir (Şekil 5). Takizoit ya da sporozoit formunda kediler tarafından alınan parazitler, kedilerin ince bağırsak epitel hücreleri içerisinde birkaç kez tekrarlayan şizogoni ile eşeysiz olarak çoğalmaktadır ve ardından parazitin bradizoit formları oluşmaktadır. İnce bağırsak epitel hücreleri içerisinde bradizoitlerden gametositler, gametositlerden ise makrogamet ve mikrogametler gelişmektedir. Bulunduğu epitel hücresinden çıkan, iki kamçılı ve iğ şekinde olan mikrogametlerden bir tanesinin başka bir epitel hücresi içerisinde bulunan makrogamete ulaşması sonucunda döllenme gerçekleşmektedir. Döllenme sonucunda oluşan zigot bağırsak lümenine geçmekte ve ookist adını almaktadır. Sporlanmamış ookistler kedi dışkısı ile dışarı atılmaktadır. Ookist atılımı genellikle 1-3 hafta arasında sürmektedir. Dışarı atılan ookistlerin sporlanarak enfektif hale gelmesi çevresel koşullar altında 1-5 günde tamamlanmaktadır. Başta kuşlar ve kemirgenler olmak üzere doğadaki arakonaklar, ookistler ile kontamine olan su, toprak ve bitkilerin tüketilmesi sonucunda enfekte

olmaktadır. Alınmasından kısa bir süre sonra ookistler takizoitlere dönüşmektedir. Sinir ve kas dokularına yerleşen bu takizoitler, yerleştikleri doku içerisinde oluşturdukları doku kistleri içerisinde bradizoitlere dönüşmektedirler. Kediler, doku kistlerini taşıyan arakonakları yiyerek enfekte olmaktadırlar, ancak sporlanmış enfektif ookistlerin direkt olarak alınması yoluyla da enfekte olabilmektedirler. Çevreden sporlanmış ookistleri alması sonucunda evcil hayvanlar ve yaban hayvanları da enfekte olabilmektedirler. İnsanlar, doku kistleri içeren hayvan etlerinin çiğ ya da iyi pişirilmeden tüketilmesi, kedi dışkısıyla veya sporlanmış ookistleri içeren çevresel materyal ile kontamine olan su ve yiyeceklerin tüketilmesi, doku kistleri veya sporlanmış ookistlerle enfekte olan anneden fetüse transplasental olarak geçmesi, organ nakli ve kan transfüzyonu gibi farklı yollarla enfekte olabilmektedir (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020; Gürüz A.Y., 2007).

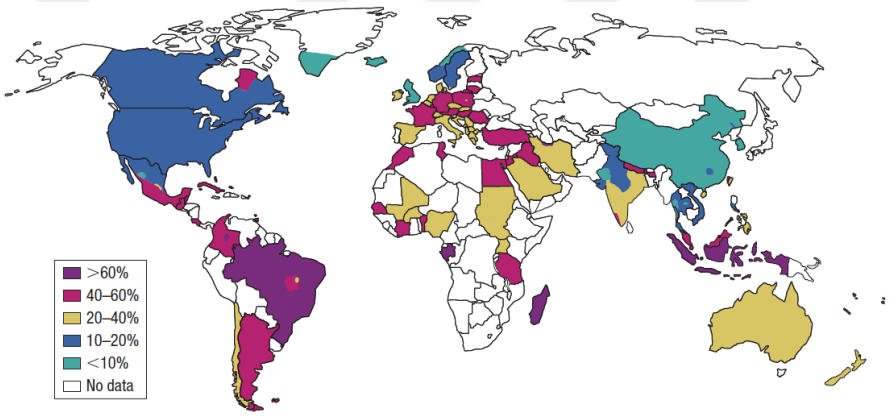


Şekil 5. *Toxoplasma gondii*'nin yaşam döngüsü (Dubey, 2013)

4.3.4. Epidemiyoloji

Toxoplasma gondii prevalansı hastanın beslenme alışkanlıklarına, yaşına, yaşadığı coğrafi bölgeye ve neme göre değişmektedir ve dünya genelinde yetişkin nüfus içerisinde %10-97,4 arasında değişen oranda yüksek serolojik prevalansa sahiptir. Ülkemizde *T. gondii* seropozitifliği ilgili yapılan çok sayıdaki araştırmalar

kapsamında son yıllardaki veriler incelendiğinde anti-*T. gondii* IgG seropozitifliği %17,5-69,5 arasında, anti-*T. gondii* IgM seropozitifliği ise %0-5 arasında bildirilmiştir. Parazitin seroprevalansı üzerinde etkili olan başlıca faktörler; hastanın sosyo-ekonomik düzeyi, hijyen, yeme alışkanlıkları, konak duyarlılığı, coğrafi konum ve toprağın nem oranı olarak bildirilmektedir. Seroprevalansın yüksek olduğu bölgeler incelendiğinde, et ürünlerinin az pişmiş olarak tüketildiği ve çok sayıda kedilerin bulunduğu Latin Amerika ya da Sahra-altı Afrika tropikal bölgelerinde yer alan ülkeler karşımıza çıkmaktadır. Bu bölgelerde 60 yaş üzerindeki nüfusun %65'inin seropozitif olması, bölgedeki iklim özelliklerinin ookistlerin canlılığını koruması için elverişli olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 6) (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020).



Şekil 6. Toxoplasmosisin dünyadaki dağılımı (Paris, 2020)

4.3.5. Klinik ve Patogenez

Toxoplasmosis klinik kolaylık sağlaması açısından beş enfeksiyon kategorisi olarak ele alınmıştır. Herhangi bir kategoride, klinik semptomlar toxoplasmosis için spesifik olarak görülmemektedir ve ayırıcı tanı oldukça fazla ön plana çıkmaktadır. Ayrıca, tanı yöntemleri ve yorumlamaları, her bir klinik kategori kapsamında farklı olarak uygulanmaktadır (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020).

4.3.5.1. İmmun sistemi sağlam hastalarda toxoplasmosis

Edinilmiş toxoplasmosis vakaları çoğunlukla asemptomatik olarak seyretmektedir. Semptomatik vakalarda ise klinik semptomlar; hafif soğuk algınlığı

belirtilerinden enfeksiyöz mononükleoza benzer klinink tabloya ya da ölüm ile sonlanabilen geniş bir spektrumda karşılaşılabilmektedir. Oküler toxoplasmosis, primer enfeksiyon kliniği olan bazı yetişkin olgularında görülebilmektedir (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020).

4.3.5.2. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda toxoplasmosis

Sitotoksik ilaç ya da kortikosteroid tedavisi alan, T hücre aracılı immün yetmezliği veya hematolojik malignitesi bulunan, organ nakli yapılmış olan veya AIDS'li hastalar, ensefalit veya sistemik enfeksiyonlar için toxoplasmosis açısından yüksek risk altındadır. Latent enfeksiyonun yeniden aktivasyonu, immun sistemi baskılanmış olan bu bireylerde ölümcül toxoplasmosise bağlı ensefalit, miyokardit ya da pnömoniye neden olabilmektedir. *Toxoplasma gondii* prevalansının yüksek olduğu bazı ülkelerde, toxoplasmosise bağlı ensefalit halihazırda HIV hastalarında en çok görülen serebral kitle lezyonu olarak bilinmektedir. Son zamanlarda, uygulanan aktif antiretroviral tedaviye bağlı olarak HIV hastalarında toxoplasmosise bağlı ensefalit insidansında önemli ölçüde azalma görülmektedir (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020).

4.3.5.3. Gebelikte toxoplasmosis

Toxoplasmosis tanısında, gebelikteki primer enfeksiyon ve konjenital enfeksiyon tanısının ayrımı oldukça zordur ve bu nedenle çok sayıda yeni yöntem geliştirilmiştir. Bunlar; serum örneğinden IgG avidite testi, vücut sıvıları ve dokularından PZR yöntemi ile yapılan çalışmalar ve anne-bebek çiftlerinden alınan serum örneklerinde uygulanan Western Blot yöntemi ile yapılan çalışmalardır. Bağışıklık sistemi sağlam olduğu sürece hamilelik öncesinde enfeksiyonu geçiren kadınların enfekte bebek doğurma riski bulunmamaktadır. Gebeliğin trimesterine bağlı olarak immünolojik belirteçler değişebilmektedir ve maternal ve neonatal terapötik tedavi sürecinde yenidoğanın bağışıklık yanıtının ortaya çıkması gecikebilmektedir ya da immün yanıtı tamamen ortadan kalkabilmektedir. Üç hafta arayla alınan seri serum örneklerinde spesifik IgG ve IgM antikorları için uygulanan eşzamanlı test, toxoplasmosis taramasında ilk yaklaşım olarak önemini korumaktadır. Ardından, primer enfeksiyon ve konjenital enfeksiyon ayrımı için

avidite testi uygulanmaktadır. Yüksek avidite, genellikle son dört ay içinde geçirilen enfeksiyonu dışlamaktadır. Düşük avidite durumunda ise, amniosentez örneğinde PZR yöntemi ile etkenin araştırılması duyarlılığı daha yüksek bir yöntem olarak görülmektedir (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020).

4.3.5.4. Konjenital toxoplasmosis

Konjenital enfeksiyon, gebelikte annenin primer enfeksiyonu sonrasında takizoitlerin transplasental olarak geçişi ile oluşmaktadır. Gebeliğin erken dönemlerinde enfekte olan ve tedavi almayan fetüsler çoğunlukla uterin veya yenidoğan döneminde yaşamını yitirmektedir ya da ciddi nörolojik ve oftalmolojik sekel bırakabilmektedir. Koryoretinit, hidrosefali ve intrakraniyal kalsifikasyonlar konjenital toxoplasmosisin klasik triadında yer almaktadır. Ancak, hastaların %10'undan daha azında klasik triad ile karşılaşılmaktadır. Konjenital toxoplasmosis asemptomatik seyir, ölü doğum, hidrosefali, mikrosefali, intrauterin gelişim geriliği, retinokoroidit gibi çeşitli klinik semptomlarla ortaya çıkabilmektedir. Eğer klinik açıdan şüpheli olan bebeklerde IgG pozitif iken IgM ve IgA negatif ise; anne ve bebek için IgG/IgM Western Blot testi uygulanılarak kesin tanıya gidilmesi gerekmektedir (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020).

4.3.5.5. Oküler toxoplasmosis

Toxoplasmosise bağlı retinokoroidit, göz hastalıkları arasında dünya genelinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Retinokoroidit tanısı için oftalmolojik muayeneye oldukça büyük önem taşımaktadır. Konjenital ve kazanılmış enfeksiyona bağlı olarak hastalığın akut ya da kronik seyri esnasında gelişmektedir. Konjenital toxoplasmosisi olan yenidoğanlarda koryoretinit ya da gelişim geriliği görülebilmektedir. Primer oküler toxoplasmosiste ise retina ödemi, üveit ve vaskülit gibi klinik semptomlar ortaya çıkabilmektedir. Toxoplasmosise bağlı koryoretinitin ayırıcı tanısında sifiliz, lepra, tüberküloz ve oküler histoplazmoza bağlı olarak gelişen posterior üveitler ön plana çıkmaktadır (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020).

4.3.6. Tanı

4.3.6.1. Klinik Tanı

Toxoplasmosis tanısı ve takibinde bireyin hastalığı geçirip geçirmediğinin saptanması, hastanın yakın zamanda edinilmiş bir enfeksiyona mı, yoksa uzak geçmişte edinilmiş bir enfeksiyona mı sahip olduğunun belirlenmesi ve hastanın klinik durumunun toxoplasmosis mi (yakın zamanda edinilmiş bir enfeksiyon ya da latent enfeksiyonun tekrarı), yoksa toxoplasmosis ile ilişkili olmayan başka bir durumdan mı kaynaklandığının saptanması önem taşımaktadır. Hastalık genellikle asemptomatik geçirilmesinden dolayı diğer hastalıklar ile ayırıcı tanısının yapılması gerekmektedir (Liesenfeld ve ark., 2001). Akut enfeksiyonda, negatif serolojiden pozitif serolojiye dönüşüm olan serokonversiyonu tanımlayan ise IgG antikorlarının bulunmasıdır; tek başına IgM'nin varlığı spesifik olmayabilmektedir veya çapraz reaksiyonlarla ilgili olabilmektedir. ELISA yöntemiyle pozitif IgM ile birlikte IgG titrelerinde iki kat artışa paralel olarak 2-3 haftalık aralıklarla tekrarlanması akut enfeksiyon için önerilmektedir. Modern IgM immünosorbent yöntemleri çok duyarlı ve spesifiktir, ancak bu IgM antikorlarının kalıcılığı, varlıklarının tek başına akut enfeksiyonun tanısı için yeterli olmadığı anlamına gelmektedir. Bu gibi durumlarda, yüksek bir IgG avidite indeksi, akut bir enfeksiyonu dışlayabilmektedir. Tanı, biyopsilerde veya biyolojik sıvılarda PCR ile doğrulanmaktadır. AIDS hastalarında *T. gondii* enfeksiyonunun en yaygın klinik görünümü baş ağrısı, konfüzyon veya motor güçsüzlük ve ateşle birlikte fokal ensefalittir. Beynin BT taraması veya MRG'si tipik olarak, genellikle ilişkili ödem ile birlikte çoklu kontrast arttırıcı lezyonlar göstermektedir. Konjenital toxoplasmosis antenatal tanısında amniyotik sıvıya uygulanan PZR testi altın standart yöntemdir. Ultrasonda ciddi anormallikler tespit edilirse gebeliğin sonlandırılması düşünülebilmektedir. Doğum öncesi tanı negatif ise veya yapılmamışsa, neonatal tanı immunoblot yöntemi ile çocuk/anne karşılaştırması yoluyla yapılmaktadır. Bir haftalık yaşamın ardından, anti-*Toxoplasma* IgM varlığı veya 3 haftalık yaşamdan sonra çocuğun serumunda IgA varlığı tanıyı doğrulamaktadır. Bu durum ISAGA testi yapılarak doğrulanmalıdır. Oküler toxoplasmosis tanısı için mevcut altın standart yöntem kapsamlı bir

oftalmolojik muayenedir. Atipik lezyonu olan hastalarda laboratuvar yöntemleri tanıyı doğrulayabilmektedir (Paris, 2020).

4.3.6.2. Laboratuvar tanı yöntemleri

Toxoplasma gondii enfeksiyonunun laboratuvar tanısında bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalarda tanıda direkt tanı yöntemleri kullanılırken, bağışıklık sistemi sağlam hastalarda indirekt tanı yöntemleri uygulanmaktadır. Ancak bağışıklık sistemi sağlam olan hastaların kan ve doku örneklerinde de parazit saptanılabilmektedir. En az iki yöntemin birlikte uygulanmasının önemli olduğu bildirilmektedir (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020).

4.3.6.2.1. Direk tanı yöntemleri

Akut toxoplasmosis için takizoitlerin hasta kanı ya da vücut sıvılarından izole edilmesi veya yeni doğanlarda alınan plasenta örneklerinde doku kistlerinin mikroskobik olarak saptanması ile kesin tanı konulabilmektedir. *Toxoplasma gondii*'yi saptamak için wright ve giemsa boyaları rutin laboratuvarlarda kullanılmaktadır, ancak *T. gondii*'ye spesifik immünoperoksidaz veya floresan antikor boyaları referans laboratuvarlarda kullanılabilmektedir. Semptom gösteren yüksek riskli bir hastada tek bir negatif sonuç toxoplasmosisi dışlamak için yeterli olmamaktadır (Theel ve Pritt, 2016). *Toxoplasma gondii* parazitinin izolasyonunda hastadan alınan vücut sıvılarının fare peritonuna inokulasyonu "altın standart" yöntemdir. Genellikle 6-10 gün içerisinde *T. gondii* takizoitleri izole edilebilmektedir. *Toxoplasma gondii* histopatolojik olarak takizoit veya kist formu olmak üzere iki şekilde tespit edilebilmektedir. Doku, kan, balgam, amniyotik sıvı, santrifüj edilmiş beyin omurilik sıvısı veya beyin dokusu örnekleri, hematoksilen-eozin, Wright veya Giemsa gibi standart histolojik boyalarla boyanmaktadır. Konjenital enfeksiyon tanısında, gebeliğin 15. ve 19. haftaları arasında alınan amniyosentez örneğinde uygulanan PZR yöntemi ile parazitin varlığı araştırılmalıdır (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020).

4.3.6.2.2. İndirek tanı yöntemleri

Toxoplasmosis genellikle asemptomatiktir ve serolojik testler kullanılarak indirekt tanıya gidilmektedir. IgM antikorları enfeksiyondan yaklaşık 1 hafta sonra saptanabilmektedir ve birkaç ay hatta yıllarca kalabilmektedir. Dolayısıyla, IgM antikorlarının tek başına tespiti, akut enfeksiyonun tesbiti için yetersizdir. IgM'den daha önce üretilen ve birkaç ay sürebilen IgA antikorlarının, akut enfeksiyon için belirleyici olduğu düşünülmektedir. Daha kısa olan bir periyodu olan IgE antikorları, mevcut enfeksiyonun daha büyük bir göstergesi olabilmektedir. IgG antikorlarının varlığı enfeksiyonun geliştiğine işaret etmektedir, ancak enfeksiyonun zamanlaması hakkında herhangi bir bilgi sağlamamaktadır. Serolojik bir test olan Sabin-Feldman dye testi (SFDT), şüpheli hasta serumunda antikor ve kompleman bulunduğu durumda *Toxoplasma* takizoit formlarının yıkımlanması sonucunda pozitif sonuç veren bir nötralizasyon yöntemidir ve *T. gondii* enfeksiyonunun başlangıcından 1-2 hafta sonra yükselen, 6-8 haftada pik yapan ve 1-2 yıl içinde inişe geçen IgG antikorlarını aramaktadır. İnsanlar ve hayvanlarda hem IgG hem de IgM antikorların saptanmasında kullanılan indirek floresan antikor testi (IFAT), canlı *Toxoplasma* parazitlerinin kullanılmasını gerektirmediğinden ve SFDT'ne göre daha ekonomik olduğundan tercih edilen bir testtir. IFAT'nin duyarlılığı %80,4-100 ve özgüllüğü %91,4-95,8 olarak değerlendirilmektedir. Yalnızca IgG antikorlarının aranmasında kullanılan direkt aglütünasyon testinde (DAT), pozitif serum örnekleri incelendiğinde ince mat bir aglütünasyon gözlenirken, negatif serum örneklerinde kuyucukların altında kompakt çöküntüler gözlenmektedir. Lateks aglutinasyon testi (LAT) ise SFDT ile kıyaslandığında duyarlılığın %99 ve özgünlüğünün ise %81 olduğu, ortamda özgün olmayan IgM antikorları bulunduğunda bu testin %1-2 oranında yalancı pozitif sonuç verdiği bildirilmektedir. İndirek hemaglutinasyon testi (İHA), IgG antikorlarının aranmasında basit ve hızlı bir yöntem olması ile birlikte, epidemiyolojik çalışmalar için kitle taramalarında kullanılması önerilmektedir. Enzyme lynked immunosorbent assay (ELISA) testi, antikorların ve tüm antijenik olarak aktif moleküllerin kantitatif tespitinde yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü olan ve en yaygın olarak uygulanan tekniklerden biri olarak kabul edilmektedir. Western blot, konvansiyonel serolojik testlere yardımcı olmaktadır (Ybañez ve ark., 2020; Saadatnia ve Golkar, 2012; Liu ve ark., 2015; Gürüz A.Y., 2007).

4.3.7. Sağaltım

Toxoplasmosis tedavisi, yalnızca *T. gondii*'nin hızla çoğalan formu olan takizoitlere karşı etkili olan ilaçlara dayanmaktadır. Enfekte olan konağın bağışıklık sisteminin tepkisi, takizoitlerin kaslara ve beyne yerleşerek doku kistleri içinde yer alan ve parazitin yavaş çoğalan formu olan bradizoitlere dönüşümünü uyarmaktadır. Halihazırda kullanılan ilaçlar, kronik enfeksiyonun başlangıcıyla ilişkili olan bu yapıları önemli ölçüde etkileyememektedir. Toxoplasmosis tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlar, parazitin çoğalmasını engelleyerek organ hasarına karşı korumaktadırlar, ancak konak organizmadan parazitin tamamen eliminasyonunu sağlayamazlar. HIV ile enfekte hastaların yanı sıra konjenital ve oküler toxoplasmosis tedavisinde önerilen tedavi, pirimetamin, sülfadiazin ve folinik asit kombinasyonudur. Sülfadiazine aşırı duyarlılık reaksiyonu gelişen hastalarda pirimetamin ve klindamisin kombinasyonu alternatif tedavi olarak kullanılabilmektedir. Protein sentezini inhibe ettiği düşünülen klaritromisin, roksitromisin veya azitromisin gibi makrolidlerden biri ile yapılan pirimetamin kombinasyonu da kullanılan diğer bir tedavi rejimidir. Diğer bir antifolat ilaç kombinasyonu da trimetoprim ve sülfametoksazol içeren ko-trimoksazol, esas olarak HIV ile enfekte hastalarda toxoplasmosis profilaksisi için kullanılmaktadır ve aşırı duyarlılık durumunda alternatif olarak dapson ve pirimetamin veya atovakuon uygulaması önerilmektedir. Gebeliğin başlangıcından itibaren fetüs *T. gondii* ile enfekte olmadan önce, spiramisin uygulaması parazitin transplasental geçişini engelleyebilir. Serumdaki CD4 hücre sayısı 200/mm^3'ü geçmediğinde, HIV ile enfekte hastalarda trimetoprim ve sülfametoksazol ile önleyici tedavi de önerilmektedir (Antczak ve ark., 2016).

4.3.8. Toxoplasmosis Klinik Öncesi İlaç Araştırmalarının Mevcut Durumu

Uzun tedavi sürelerine duyulan ihtiyaç ve hastalığın tekrarlama riski kısmen *T. gondii* doku kistlerine karşı etkinlik eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Daha etkili bir tedavi geliştirmenin zorlukları arasında toksisitenin azaltılması, beyinde ve gözde terapötik konsantrasyonlara ulaşılması, sürenin kısaltılması, konakçıdaki doku kistlerinin ortadan kaldırılması, hamilelikte güvenliği ve dünyanın fakir bölgelerinde

kullanım için ucuz ve pratik bir formülasyon oluşturulması yer almaktadır. Son on yılda, toxoplasmosis tedavisi için yeni bileşiklerin belirlenmesi ve geliştirilmesinde önemli ilerleme kaydedilmiştir (Alday ve Doggett, 2017).

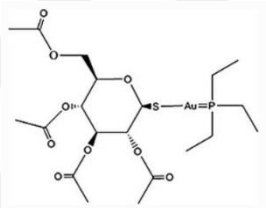
4.4. HÜCRE İÇİ PARAZİTLERİN *EX VIVO* KÜLTÜRÜ

Ex vivo kültür yöntemi ile *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitlerinin çoğaltılması, tanı testleri ve yeni tanı kitleri geliştirilmesi, tanıda kullanılan yöntemlerin etkinliğinin değerlendirilmesi, yeni geliştirilen ilaç moleküllerininin taranması ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi, doğal kaynaklardan ve bitkilerden elde edilen ilaç adayı moleküllerin etkinliğini araştırması, farklı kullanım alanlarındaki onaylı ilaçların antiparaziter etkinliğinin değerlendirilmesi, hastalıkların patogenezinin aydınlatılması, konak-parazit ilişkisinin aydınlatılması ve profilaktik ilaçların geliştirilmesi konularında yapılacak bir çok çalışmaya olanak sağlaması bakımından oldukça büyük önem taşımaktadır (Passero ve ark., 2009; Acosta-Dávila ve ark., 2020; Oualha ve ark., 2019; Gonzalez-Fajardo ve ark., 2015; Cobb ve Smeltz, 2012; Stempin ve ark., 2008).

4.5. AURANOFİN

Romatoid artrit tedavisinde kullanılması için 1985 yılında onay almış olan AF, farklı uygulama alanlarında kullanılabilmesi açısından yüksek potansiyele sahiptir (Tejman-Yarden ve ark., 2013). Auranofin, oldukça iyi bilinen bir toksisite profiline sahip olmak ile birlikte, insan kullanımı için güvenli kabul edilmektedir (Sannella ve ark., 2008). Lineer bir düzenlemede fosfin ve tiyol ligandları olan bir altın (I) bileşiğidir (Şekil 7). Mevcut durumda romatoid artrit için tercih edilen bir ilaç olmayan AF; kanser, paraziter enfeksiyonlar, bakteriyel enfeksiyonlar, HIV, Parkinson hastalığı ve Alzheimer gibi nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde yeni uygulama alanlarında kullanımı için yüksek potansiyele sahiptir. AF'in parazitler

üzerindeki temel etki mekanizması, tiyoredoksin redüktaz (TrxR) gibi redoks enzimlerinin inhibisyonuna dayanmaktadır. AF'in içinde bulunan tiyol ligandı, kararlı ve geri dönüşümsüz bağlar oluşturduğu tiyol ve selenol gruplarına karşı yüksek affiniteye sahiptir. TrxR gibi redoks enzimleri, başta reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre içi seviyelerinin kontrol altında tutulması olmak üzere birçok hücresel işlem için gerekli olmaktadır. Ortaya çıkan DNA hasarını önlemek için ROS seviyesinin kontrol edilmesi, parazitlerin canlılığını sürdürebilmesi için kritik öneme sahiptir. Bu özel hücre tiplerinin hepsi, AF'in bu hücrelere karşı affinitesini arttıran redoks enzimlerini aşırı olarak salgılamaktadırlar. Redoks enzimlerinin inhibisyonu, hücrenin redoks durumunu değiştirmesi ile birlikte hücresel oksidatif strese ve sonuçta hücre içerisinde apoptoza neden olan hidrojen peroksit ve ROS üretiminin artmasına neden olabilmektedir (Roder ve Thomson, 2015).



Şekil 7. Auranofinin moleküler yapısı (Roder ve Thomson, 2015)

5. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Gerekli sarf malzeme, besiyeri ve kimyasallar Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2019-039 ve 2019-082 numaralı araştırma projeleri kapsamında sağlanan kaynak ile temin edilmiştir, çalışmanın gerçekleştirildiği laboratuvar ve cihazlar Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'ndan alınan izinler doğrultusunda kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan canlı materyaller, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde bulunan Parazit Bankası tarafından sağlanmıştır.

5.1. MATERYALLER

5.1.1. Cihazlar

- Işık mikroskobu (Olympus®, Almanya)
- Inverted mikroskop (Olympus®, Almanya)
- Biyogüvenlik kabini (Thermo Fisher Scientific®, ABD)
- Luminoskan ascent (Thermo Fisher Scientific®, ABD)
- Santrifüj (Eppendorf®, Almanya)
- Vorteks (Heidolph®, Almanya)
- Sıcak su banyosu (NÜVE®, Türkiye)
- Sıvı nitrojen tankı (Taylor Wharton®, ABD)
- Otomatik pipet (HTL Lab Solutions®, Polonya)
- Soğutmalı inkübatör (Panasonic®, Japonya)
- CO_2'li inkübatör (Thermo Fisher Scientific®, ABD)
- +4 / -20 °C'lik soğutucu (Vestel®, Türkiye)

- -80 ℃'lik soğutucu (B Medical Systems®, Lüksemburg)
- Spektrofotometre cihazı (Biotek Instruments®, ABD)
- Hassas terazi (Radwag®, Polonya)

5.1.2. Sarf Malzemeler

- 8 odacıklı lam /chamber slide (Ibidi®, Almanya)
- 2 ml'lik dıştan kapaklı kriyotüp (Ratiolab®, Almanya)
- 2 ml'lik içten kapaklı kriyotüp (Ratiolab®, Almanya)
- 96'lık steril düz tabanlı plak (Ratiolab®, Almanya)
- 96'lık steril düz tabanlı beyaz plak (Thermo Fisher Scientific®, Danimarka)
- 1,5 ml'lik ependorf tüpü (Ratiolab®, Almanya)
- Cam pasteur pipetleri (ISOLAB®, Almanya)
- Plastik pastör pipetleri (ISOLAB®, Almanya)
- 20 µl'lik steril otomatik pipet uçları (Ratiolab, Almanya)
- 200 µl'lik steril otomatik pipet uçları (Ratiolab®, Almanya)
- 1000 µl'lik steril otomatik pipet uçları (Ratiolab®, Almanya)
- 1 ml'lik enjektör (Set Medikal®, Türkiye)
- 5 ml'lik enjektör (Set Medikal®, Türkiye)
- 10 ml'lik enjektör (Set Medikal®, Türkiye)
- 20 ml'lik enjektör (Set Medikal®, Türkiye)
- Parafilm (ISOLAB®, Almanya)
- Rodajlı Lam (ISOLAB®, Almanya)
- Lamel (ISOLAB®, Almanya)
- Thoma Lamı (Marienfeld®, Almanya)
- 15 ml'lik steril falcon tüp (Ratiolab®, Almanya)
- 50 ml'lik steril falcon tüp (Ratiolab®, Almanya)
- 0,45 µm çaplı şırınga filtresi (Milipore®, ABD)
- Latex eldiven (Beybi®, Türkiye)
- Hücre kazıyıcı (Greiner Bio-One®, Almanya)
- Filtreli 25 cm^2'lik hücre kültür flaskı (Nest®, Çin)

- Filtresiz 25 cm^2'lik hücre kültür flaskı (Cytoone®, ABD)
- 5 ml'lik Steril serolojik pipet (Ratiolab®, Almanya)
- 10 ml'lik Steril serolojik pipet (Ratiolab®, Almanya)
- 50 ml'lik Steril serolojik pipet (Ratiolab®, Almanya)

5.1.3. Besiyeri ve Kimyasallar

- NNN besiyeri
- LIT besiyeri
- RPMI-1640 besiyeri (Thermo Fisher Scientific®, ABD)
- Fetal sığır serumu (Thermo Fisher Scientific®, ABD)
- Gentamisin solüsyonu (Thermo Fisher Scientific®, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (Genemarkbio®, Çin)
- Amfoterisin b (BOC Sciences®, ABD)
- Benznidazol (Sigma Alrich®, ABD)
- Auranofin (Sigma Alrich®, ABD)
- Primetamin (TCI®, Japonya)
- Giemsa boyası (Sigma Alrich®, ABD)
- Tripan mavisi (Sigma Alrich®, ABD)
- Celltiter-glo kiti (Promega®, ABD)
- MTT kiti (Xenometrix®, İsviçre)
- Dimetil sülfoksit (Sigma Alrich®, ABD)
- Etanol (Sigma Alrich®, ABD)
- Metanol (Sigma Alrich®, ABD)
- Agar (Sigma Alrich®, ABD)
- Hepes buffer (Milipore®, ABD)

5.1.4. Canlı Materyaller

- J774.A1 hücre hattı [TIB-67, (ATCC, ABD)]
- Vero hücre hattı [Vero/An10-African green monkey kidney/maymun, (HÜKÜK, TR)]

- HeLa hücre hattı [HeLa/An1-Cervix epithelloid carcinom/İnsan, (HÜKÜK, TR)]
- *Trypanosoma cruzi* (Corpus Christi)
- *Leishmania tropica* (MHOM/SU/58/strain-OD)
- *Toxoplasma gondii* (RH)

5.2. YÖNTEMLER

5.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

5.2.1.1. Liver-Infusion-Tryptose (LIT) besiyerinin hazırlanması

Liver-infusion-tryptose (LIT) besiyerinin hazırlanmasında trietanolamin (10 mL), damıtık su (10 mL) içerisinde karıştırıldıktan sonra üzerine hemin (100 gr) eklenmiştir, iyice çalkalanarak çözdürülmüştür ve hemin stok solüsyonu hazırlanmıştır. Liver infüzyon (35 gr), triptoz (5 gr), NaCl (4 gr), KCl (0,4 gr), $Na_2HPO_4+12H_2O$ (8 mg), glikoz (2 gr) ve hemin stok solüsyonu (4 mL), 1 L damıtık su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak çözdürülmüştür. Ayrıca, gentamisin (%1) ve penisilin/streptomisin (%1) solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım Whatman no.1 filtre kağıdından süzülmüştür ve pH'sı 7,2'ye ayarlanmıştır. Sterilizasyonu, 0,22 μm por çaplı filtreden geçirilerek sağlanmıştır. Her bir tüpe 4,5 mL dağıtılmıştır ve etiketlenerek +4°C'de saklanmıştır. Ekim öncesinde 1 mL %10 FCS içeren RPMI-1640 besiyeri eklenmiştir.

5.2.1.2. Novy-Macneal-Nicolle (NNN) besiyerinin hazırlanması

Katı faz: Agar (5 gr), pepton (2 gr), NaCl (1 gr) ve 200 ml distile su bir balona konularak 121°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Aseptik koşullarda tavşan kalbinden 30 ml kan alınıp defibrinize edilerek küçük steril bir balona alınmıştır. 1,3 ml (%1) gentamisin ve 2,3 ml penisilin/streptomisin (%1) solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. Agar yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulup kan agarın üzerine eklenerek karışması

sağlanmış ve hemen steril tüplere 3-4 ml dağıtılmıştır. Tüplere belli bir eğim verilerek katılaşıncaya kadar oda ısısında tutulup ardından +4°C'de saklanmıştır.

Sıvı faz: Katı faz üzerine 1 ml %10 FCS içeren RPMI-1640 besiyeri eklenmiş ve besiyeri ekim yapmaya uygun hale getirilmiştir.

5.2.1.3. RPMI-1640 sıvı besiyerinin hazırlanması

RPMI-1640 sıvı besiyeri içerisine, kullanmadan önce %10 fetal sığır serumu (FCS), %1 penisilin/streptomisin ve %1 gentamisin eklenmiştir ve +4°C'de hazır bulundurulmuştur. Kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır.

5.2.2. Hücre Hatları

5.2.2.1. Hücre hatlarının temin edilmesi

Bu çalışmada, ticari olarak temin edilen ve M.C.B.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Parazit Bankası'nda sıvı azot tankında saklanan J774A.1 (TIB-67, (ATCC, ABD)), Vero (Vero/An10-African green monkey kidney/maymun, (HÜKÜK, TR)) ve HeLa (HeLa/An1-Cervix epithelloid carcinom/İnsan, (HÜKÜK, TR)) hücre hatları kullanılmıştır.

5.2.2.2. Hücrelerin çözdürülmesi

J774, Vero ve HeLa hücre hatlarının çözdürülmesi sırasında, RPMI-1640 besiyeri oda sıcaklığında hazır bulundurulmuş ve su banyosu 37°C 'ye ayarlanmıştır. Hücre hatları sıvı azot tankından (-196°C'lik soğutucu) çıkarılmış ve sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda hızlıca çözdürülmüştür. Çözdürülen hücre süspansiyonundan 1 ml alınarak, 9 ml RPMI-1640 besiyeri içerisine eklenip pastör pipeti yardımıyla karışması sağlanmıştır. Homojenizasyonu sağlanan hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır ve pellet üzerine 4 ml kadar RPMI-1640 besiyeri eklenmesi ile birlikte süspansiyon haline gelinceye kadar pastör pipeti yardımıyla karışması sağlanmıştır. Bu süspansiyondan 1'er ml, 9'ar ml taze besiyeri içeren hücre kültür

flasklarına eklenmiştir. Ekim yapılan hücre kültürü flaskları %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

5.2.2.3. Hücrelerinin pasajlanması

Hücre kültürü flasklarına ekimi yapılıp %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüve kaldırılan J774, Vero ve HeLa hücreleri, düzenli olarak invert mikroskopta hücrelerin morfolojisi ve sayısı yönünden incelenmiştir. Hücrelerin durumuna göre günaşırı besiyeri değiştirilmiş ve haftada bir pasajı yapılmıştır. Hücre kültürü flaskı içerisindeki RPMI-1640 besiyeri dökülerek PBS ile 2 defa yıkanmıştır. Hücre kültürü flaskı tabanındaki hücre tabakası 10 mL RPMI-1640 besiyeri eklenerek hücre kazıyıcısı yardımıyla yüzeyden ayrılması sağlanmış, 15 mL'lik flakona aktarılmış ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek dipteki hücre pelleti üzerine 4 mL RPMI-1640 besiyeri eklenerek pastör pipeti ile iyice karışması sağlanmıştır. Bu süspansiyondan 1'er ml; 9'ar ml taze besiyeri içeren hücre kültür flasklarına eklenmiştir. İnvert mikroskop ile hücreler kontrol edilmiştir ve hücre kültür flaskları üzerine hücre serisinin adı, tarih ve pasaj sayısı yazılarak %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

5.2.2.4. Hücrelerin dondurulması

Hücre kültürü flaskı içerisindeki RPMI-1640 besiyeri dökülmüştür ve taze RPMI-1640 besiyeri ile 2 defa yıkanmıştır. Hücre kültürü flaskı tabanındaki hücre tabakası 10 mL taze RPMI 1640 besiyeri eklenerek hücre kazıyıcısı yardımıyla yüzeyden ayrılması sağlanmıştır ve 15 mL'lik flakona aktarılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülüp 4 mL taze RPMI 1640 besiyeri eklenmesi ve son konsantrasyonun %15'i DMSO eklenmesinin ardından pastör pipeti yardımıyla süspansiyon homojenize edilerek 1'er mL kriyo tüplere aktarılmıştır. Kriyo tüpleri üzerine hücre serisinin adı, tarih, pasaj sayısı ve canlılık oranı yazılarak dakikada 1°C soğutan özel dondurma kapları (cool cell) içerisinde -80°C soğutucuya kaldırılmıştır. Burada bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankında (-196°C) muhafaza edilmiştir.

5.2.2.5. Tripan mavisi ile hücrelerin canlılık kontrolü ve hücre sayımı

Vital bir boya olan tripan mavisi, canlı hücreleri boyamayıp ölü hücreleri boyamakta olup canlı hücre sayısının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Hücrelerin çalışmalarda kullanılmadan önce sayımı, tripan mavisi ile thoma lamında sayımda kolaylık sağlaması amacıyla 3 kat seyreltme yapılarak uygulanmıştır. Hücre kültürü flaskı içerisindeki RPMI-1640 besiyeri dökülerek RPMI-1640 besiyeri ile 2 defa yıkanmıştır. Hücre kültürü flaskı tabanındaki hücre tabakası 10 mL RPMI-1640 besiyeri eklenerek hücre kazıyıcısı yardımıyla yüzeyden ayrılması sağlanmıştır, 15 mL'lik flakona aktarılmıştır ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek dipteki hücre pelletinden sayım yapılarak mL'deki hücre sayısı hesaplanmıştır. Hücre süspansiyonundan 20 µL alınarak 1,5 mL'lik steril eppendorf tüpü içine konulmuştur. Bu oranın sağlanması için üzerine 40 µL tripan mavisi solüsyonu eklenerek pastör pipeti ile iyice karışması sağlanmıştır. Thoma lamının her iki bölümüne de lam ile lamel arasına 10'ar µL hücre süspansiyonundan eklenmiştir. Tripan mavisi ile maviye boyanmış ve boyanmamış olan hücreler ışık mikroskobunda sayılarak kültürün % canlılık oranı hesaplanmıştır. Hücrelerin thoma lamında sayımı aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır;

Hücre sayısı = Ortalama hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı sabiti

Hücre sayısı	**:**	1 mL'deki hücre (J774/Vero/HeLa) sayısı
Ortalama hücre sayısı	**:**	Thoma lamının alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücrelerin aritmetik ortalaması
Sulandırma katsayısı	**:**	Sayım için yapılan sulandırma katsayısı
Thoma lamı sabiti	**:**	10.000

5.2.3. Parazit Suşları

5.2.3.1. Parazit suşlarının temin edilmesi

Bu çalışmada, M.C.B.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Parazit Bankası'nda sıvı azot tankında saklanan *T. cruzi* (Corpus Christi), *L. tropica* (MHOM/SU/58/strain-OD) ve *T. gondii* (RH) izolatları kullanılmıştır.

5.2.3.2. Parazit suşlarının çözdürülmesi ve *in vitro* kültürü

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Parazit Bankası'nda sıvı azot tankında saklanan *T. cruzi* epimastigotları, *L. tropica* promastigotları ve *T. gondii* takizoitlerini içeren parazit izolatlarının çözdürülmesinde kullanılmak üzere RPMI-1640 besiyeri oda sıcaklığında hazır bulundurulmuştur. Su banyosu, 37°C'ye ayarlanmıştır. Parazit izolatları sıvı azot tankından (-196°C'lik soğutucu) çıkarılarak, sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda hızlıca çözdürülmüştür. Parazitlerin canlılığı tripan mavisi ile ışık mikroskobunda x400 büyütmede kontrol edilmiştir. Çözdürülen her bir parazit izolatından 1 ml alınarak, 9 ml taze RPMI-1640 besiyeri içerisine eklenip pastör pipeti yardımıyla karışması sağlanmıştır. Homojenizasyonu sağlanan parazit izolatları 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak elde edilen pelletin, *T. cruzi* epimastigotları ve *L. tropica* promastigotlarının *ex vivo* kültür öncesinde logaritmik faza girebilmeleri için besiyerine ekimi yapılmıştır. Ancak, sıvı azottan çıkarılarak çözdürülen *T. gondii* takizoitleri direkt olarak *ex vivo* kültür çalışmalarında kullanılmıştır.

5.2.3.2.1. *Trypanosoma cruzi*'nin *in vitro* kültürü

Parazit yoğunluğunun artırılması amacıyla santrifüj sonrasında elde edilen pellette bulunan *T. cruzi* epimastigotları sıvı azottan alınıp hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra LIT besiyerine ekilmiştir. LIT besiyerinde ilk üreme gerçekleştikten sonra fazla miktarda üretmek amacıyla epimastigot süspansiyonu, metasiklogenez aşamasının tamamlanarak enfektif metasiklik trypomastigotların fazla miktarda üretilmesinin sağlanması amacıyla RPMI-1640 besiyerinde kültüre alınmıştır. Bu amaçla, taze RPMI-1640 besiyeri 25 mL'lik flasklara 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve üzerine üreyen epimastigot süspansiyonundan 50 µL ilave edilerek ekim yapılmıştır. Ekim yapılan flasklar 26°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Parazitlerin çoğalması takip edilerek 2-3 günde bir besiyeri eklenmesiyle bol miktarda trypomastigot içeren besiyeri süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen trypomastigot süspansiyonu *ex vivo* kültivasyon için araştırmamızda kullanılmıştır.

5.2.3.2.2. *Leishmania tropica*'nın *in vitro* kültürü

Parazit yoğunluğunun artırılması amacıyla santrifüj sonrasında elde edilen pellette bulunan *L. tropica* promastigotları sıvı azottan alınıp hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra NNN besiyerine ekilmiştir. İlk üreme gerçekleştikten sonra fazla miktarda üretmek amacıyla RPMI-1640 besiyerinde kültüre alınmıştır. Bu amaçla, taze RPMI-1640 besiyeri, 25 mL'lik flasklara 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve üzerine üreyen promastigotlardan 50 µL ilave edilerek ekim yapılmıştır. Ekim yapılan flasklar 26°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Parazitlerin çoğalması takip edilerek 2-3 günde bir besiyerinin eklenmesiyle bol miktarda promastigot içeren besiyeri süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen promastigot süspansiyonu *ex vivo* kültivasyon için araştırmamızda kullanılmıştır.

5.2.3.3. Parazit suşlarının dondurulması

Parazit süspansiyonu (epimastigot/promastigot/takizoit), 15 mL'lik flakona aktarılmıştır ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek taze RPMI-1640 besiyeri ile 2 defa yıkanmıştır. Süpernatant dökülüp 4 mL taze RPMI-1640 besiyeri eklenmesi ve son konsantrasyonun %15'i oranında DMSO eklenmesinin ardından pastör pipeti yardımıyla süspansiyon homojenize edilerek 1'er mL kriyo tüplere aktarılmıştır. Kriyo tüpleri üzerine parazit suşunun adı, tarih, pasaj sayısı ve canlılık oranı yazılarak dakikada 1°C soğutan özel dondurma kapları (cool cell) içerisinde -80°C soğutucuya kaldırılmıştır (*T. gondii* takizoitleri özel dondurma kapları kullanılmadan -80°C soğutucuya kaldırılmıştır). Tüm parazit izolatları -80°C soğutucuda bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankında (-196°C) muhafaza edilmiştir.

5.2.3.4. Tripan mavisi ile parazit suşlarının canlılık kontrolü ve sayımı

Vital bir boya olan tripan mavisi, canlı parazitleri boyamayıp ölü parazitleri boyamakta olup canlı parazit sayısının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Parazit suşlarının (*T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii*) çalışmalarda kullanılmadan önce sayımı, tripan mavisi ile thoma lamında sayımda kolaylık sağlaması amacıyla 10 kat seyreltme yapılarak uygulanmıştır. Parazit (trypomastigot/promastigot/takizoit) süspansiyonu 15 mL'lik flakona aktarılmıştır ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj

edilmiştir. Süpernatant dökülerek dipteki pelletten sayım yapılarak mL'deki parazit (trypomastigot/promastigot/takizoit) sayısı hesaplanmıştır. Pellet üzerine 2 mL taze RPMI-1640 besiyeri eklenerek hazırlanan parazit (trypomastigot/promastigot /takizoit) süspansiyonundan 10 µL alınarak 1,5 mL'lik steril eppendorf tüpüne konulmuştur. Sulandırma oranının sağlanması için üzerine 50 µL tripan mavisi solüsyonu ve 40 µL %20 formaldehit solüsyonu eklenerek pastör pipeti ile iyice karışması sağlanmıştır. Thoma lamının her iki bölümüne de lam ile lamel arasına sulandırılan parazit (trypomastigot/promastigot/takizoit) süspansiyonundan 10'ar µL eklenmiştir. Tripan mavisi ile maviye boyanmış ve boyanmamış olan parazitler (trypomastigot/promastigot/takizoit) ışık mikroskobunda sayılarak parazit süspansiyonunun % canlılık oranı hesaplanmıştır. Parazitlerin (trypomastigot /promastigot/takizoit) thoma lamında sayımı aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır;

Parazit sayısı = Ortalama parazit sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı sabiti

Parazit sayısı	**:**	1 mL'deki parazit (trypomastigot/promastigot/takizoit) sayısı
Ortalama parazit sayısı	**:**	Thoma lamının alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki parazitlerin aritmetik ortalaması
Sulandırma katsayısı	**:**	Sayım için yapılan sulandırma katsayısı
Thoma lamı sabiti	**:**	10.000

5.2.4. İlaçlar ve İlaç Konsantrasyonları

5.2.4.1. Auranofin

Çalısmamızda ticari olarak elde edilen toz halindeki saf AF bileşiği kullanılmıştır. Stok solüsyonu konsantrasyonu %100 DMSO içerisinde çözdürülerek 1 M olarak hazırlanmıştır ve RPMI-1640 besiyeri içerisinde hazırlanan ve çalısma esnasında belirlenen aralıklardaki konsantrasyonlar kullanılmıştır.

5.2.4.2. Kontol ilaçları

5.2.4.2.1. Amfoterisin b

Çalısmamızda ticari olarak elde edilen toz halindeki saf AmB bileşiği kullanılmıştır. Stok solüsyonu konsantrasyonu %100 DMSO içerisinde çözdürülerek 1 M olarak hazırlanmıştır ve RPMI-1640 besiyeri içerisinde hazırlanan ve çalısma esnasında belirlenen aralıklardaki konsantrasyonlar kullanılmıştır.

5.2.4.2.2. Primetamin

Çalısmamızda ticari olarak elde edilen toz halindeki saf PYR bileşiği kullanılmıştır. Stok solüsyonu konsantrasyonu %100 DMSO içerisinde çözdürülerek 1 M olarak hazırlanmıştır ve RPMI-1640 besiyeri içerisinde hazırlanan ve çalısma esnasında belirlenen aralıklardaki konsantrasyonlar kullanılmıştır.

5.2.4.2.3. Benznidazol

Çalısmamızda ticari olarak elde edilen toz halindeki saf BZN bileşiği kullanılmıştır. Stok solüsyonu konsantrasyonu %10 metanol içerisinde çözdürülerek 1 M olarak hazırlanmıştır ve RPMI-1640 besiyeri içerisinde hazırlanan ve çalısma esnasında belirlenen aralıklardaki konsantrasyonlar kullanılmıştır.

5.2.5. Parazit Suşlarının *Ex Vivo* Kültivasyonu

5.2.5.1. *Trypanosoma cruzi*'nin *ex vivo* kültivasyonu

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda, 25 cm^2'lik hücre kültürü flaskları içine eklenmiş olan 9 ml taze RPMI-1640 besiyerine J774, Vero ve HeLa hücre serilerinden 1'er ml ekim yapılmıştır ve %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüve kaldırılmıştır. Hücrelerin tek tabaka halinde tüm flask yüzeyini kaplaması (konflüent) ile birlikte 1:10 (hücre:parazit) oranında *T. cruzi* trypomastigotlarının ekimi yapılmıştır, 72 saat inkübasyona bırakılmıştır ve her gün hücre kültürlerindeki besiyeri taze RPMI-1640 besiyeri ile değiştirilmiştir. 72 saatlik

pasaj sonrasında enfekte hücrelerin flask tabanından hücre kazıyıcı ile kazınması ve santrifüjlenmesi ile elde edilen enfekte hücre pelletinden LIT besiyerine ekimi yapılmıştır ve üreme görülen LIT besiyerinden de taze RPMI-1640 sıvı besiyerine ekim yapılarak 26°C'lik etüvde *T. cruzi* trypomastigotlarının logaritmik faza girmesi sağlanmıştır. Böylece birinci pasaj tamamlanmıştır ve RPMI-1640 sıvı besiyerinde üreyen *T. cruzi* trypomastigotlarının konflüent haldeki yeni J774, Vero ve HeLa hücre serilerine ekimi gerçekleştirilerek ikinci pasaj aşamasına geçilmiştir. Aynı işlemler sırasıyla ikinci ve üçüncü pasajlarda da uygulanmıştır.

5.2.5.2. *Leishmania tropica*'nın *ex vivo* kültivasyonu

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda, 25 cm^2'lik hücre kültürü flaskları içine eklenmiş olan 9 ml taze RPMI-1640 besiyerine J774, Vero ve HeLa hücre serilerinden 1'er ml ekim yapılmıştır ve %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüve kaldırılmıştır. Hücrelerin tek tabaka halinde tüm flask yüzeyini kaplaması (konflüent) ile birlikte 1:10 (hücre:parazit) oranında *L. tropica* promastigotlarının ekimi yapılmıştır, 72 saat inkübasyona bırakılmıştır ve her gün hücre kültürlerindeki besiyeri taze RPMI-1640 besiyeri ile değiştirilmiştir. 72 saatlik pasaj sonrasında enfekte hücrelerin flask tabanından hücre kazıyıcı ile kazınması ve santrifüjlenmesi ile elde edilen enfekte hücre pelletinden NNN besiyerine ekimi yapılmıştır ve üreme görülen NNN besiyerinden de taze RPMI-1640 sıvı besiyerine ekim yapılarak 26°C'lik etüvde *L. tropica* promastigotlarının logaritmik faza girmesi sağlanmıştır. Böylece birinci pasaj tamamlanmıştır ve RPMI-1640 sıvı besiyerinde üreyen *L. tropica* promastigotlarının konflüent haldeki yeni J774, Vero ve HeLa hücre serilerine ekimi gerçekleştirilerek ikinci pasaj aşamasına geçilmiştir. Aynı işlemler sırasıyla ikinci ve üçüncü pasajlarda da uygulanmıştır.

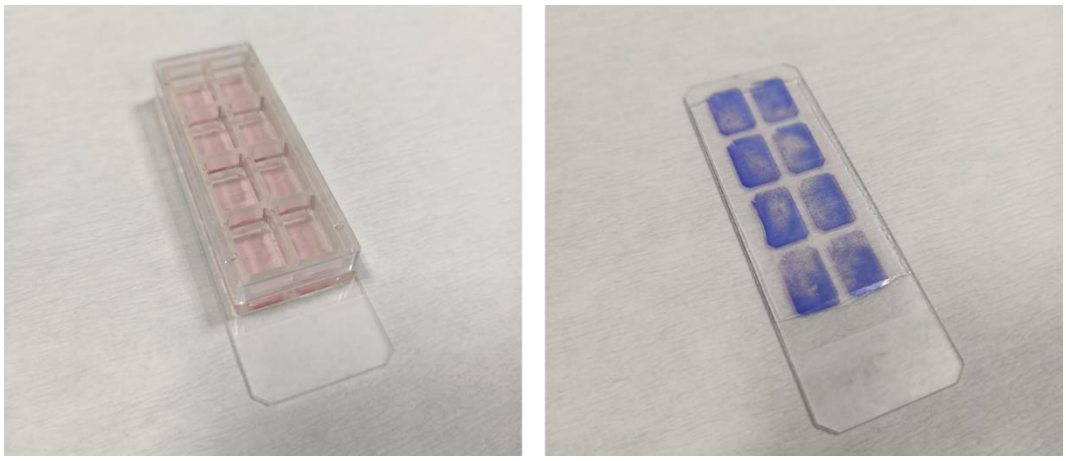
5.2.5.3. *Toxoplasma gondii*'nin *ex vivo* kültivasyonu

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda, 25 cm^2'lik hücre kültürü flaskları içine eklenmiş olan 9 ml taze RPMI-1640 besiyerine J774, Vero ve HeLa hücre serilerinden 1'er ml ekim yapılmıştır ve %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüve kaldırılmıştır. Hücrelerin tek tabaka halinde tüm flask yüzeyini kaplaması (konflüent) ile birlikte 1:10 (hücre:parazit) oranında *T. gondii*

takizoitlerinin ekimi yapılmıştır, 72 saat inkübasyona bırakılmıştır ve her gün hücre kültürlerindeki besiyeri taze RPMI-1640 besiyeri ile değiştirilmiştir. 72 saatlik pasaj sonrasında enfekte hücrelerin flask tabanından hücre kazıyıcı ile kazınması ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmesi ile elde edilen enfekte hücre pelletinden hazırlanan süspansiyon hücre içerisindeki takizoitlerin elde edilmesi için 5 µm por çaplı steril filtreden geçirilmiştir ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır ve dipte kalan takizoitler taze RPMI-1640 besiyeri içerisinde süspanse edilmiştir. Böylece birinci pasaj tamamlanmıştır ve RPMI-1640 sıvı besiyeri içerisindeki *T. gondii* takizoitlerinin konflüent haldeki yeni J774, Vero ve HeLa hücre serilerine ekimi gerçekleştirilerek ikinci pasaj aşamasına geçilmiştir. Aynı işlemler sırasıyla ikinci ve üçüncü pasajlarda da uygulanmıştır.

5.2.6. *Trypanosoma cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* Suşlarının *Ex Vivo* Enfeksiyon Oranlarının Değerlendirilmesi

Trypanosoma cruzi, L. tropica ve *T. gondii* parazitlerinin *ex vivo* kültüründe her pasaj (72 saat inkübasyon) sonrasında oluşan hücre içi *T. cruzi* amastigotları, *L. tropica* amastigotları ve *T. gondii* takizoitlerinin sayılarak enfeksiyon oranlarının belirlenmesi amacıyla enfekte J774, Vero ve HeLa hücre serileri hücre kazıyıcı ile kazınmıştır. Santrifüj yapılarak elde edilen ve thoma lamında sayılarak yoğunluğu her bir odacık için $1x10^4$ olarak ayarlanan hücre pelletinden 100 uL alınarak 8 odacıklı lamlara (Ibidi®, Almanya) ekim yapılmıştır, %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 4 saat inkübe edilmiştir ve metanol ile tespit edilip Giemsa ile boyanarak ışık mikroskobunda x1000 büyütmede incelenerek enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki *T. cruzi* amastigotları, *L. tropica* amastigotları ve *T. gondii* takizoitlerinin sayılması ile enfeksiyon oranları değerlendirilmiştir. Bu işlem her bir parazit izolatı ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre serileri için 3'er pasaj sonrasında uygulanmıştır (Resim 4).



Resim 4. Pasaj sonrasında 8 odacıklı lamdan giemsa boyalı preparat hazırlanması

5.2.7. Auranofinin Sitotoksik Aktivitesinin Araştırılması

Çalışma öncesinde MTT stok solüsyonu hazırlamak amacıyla, 50 mg MTT tozu (-20°C'de saklanan) tartılmıştır ve 10 mL distile su içerisinde sulandırılmıştır. 0,45 µm por çaplı steril şırınga filtreden geçirilerek steril edilmiştir, 10 ml MTT stok solüsyonu vortekslenmiştir ve her bir ependorfta 1 ml olacak şekilde 10 ependorfa dağıtılmıştır. Hazırlanan bu solüsyonlar -20°C'de saklanmıştır. MTT çalışma solüsyonu hazırlandığında ise, MTT stok solüsyonu 1 ependorf (1 ml) -20°C'den çıkartılmıştır ve üzerine 9 ml PBS ile sulandırılmıştır ve vortekslenmiştir.

Auranofin ve kontrol ilaçları olan BZN, AmB, ve PYR ilaçlarının memeli hücreleri üzerindeki potansiyel sitotoksik etkilerini değerlendirmek için RPMI-1640 besiyeri içerinde hazırlanan J774 makrofaj hücre süspansiyonundan ($1x10^4$ hücre/mL) 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 100 µL eklenmiştir ve 37°C' lik etüvde (%5 CO_2 içeren) 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından zemine tutunamayan hücreler RPMI-1640 ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır ve kalan hücreler 100'er µL Auranofin ve kontrol ilaçları olan BZN, AmB, ve PYR ilaçlarının farklı son konsantrasyonlarını içeren (500 µM – 2 µM) RPMI-1640 besiyeri ve ilaç içermeyen RPMI-1640 besiyeri içerisinde 48 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler, MTT (Biomatik®, ABD) kolorimetrik testine tabi tutulmuştur. Bu yöntemle, 48 saat inkübasyondan sonra 96 kuyucuklu test plağı etüvden çıkartılmıştır. J774 hücrelerin bulunduğu düz tabanlı 96 kuyucuklu test plağı içerisindeki tüm sıvı besiyeri (süpernatant) boşaltılmıştır. Üst kısım boşaltıldıktan

sonra her bir kuyucuğa 100'er µl steril PBS eklenerek 1 dakika çalkalayıcı etüvde inkübe edilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından laminar flow kabin içerisinde PBS uzaklaştırılmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra önceden hazırladığımız MTT çalışma solüsyonu (1 ml MTT+ 9 ml RPMI-1640 besiyeri) düz tabanlı 96'lık hücre kültür pleytinin tüm kuyucuklarına 100'er µl dağıtılmıştır. 4 saat, 37°C, CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra etüvden çıkarılan plak 45°lik açı ile bir eğim oluşturularak laminar flow kabine yerleştirilmiştir ve içerisindeki MTT solüsyonu dikkatli bir şekilde otomatik çoklu pipet yardımıyla boşaltılmıştır. Her bir kuyucuğa 100'er µl steril DMSO otomatik çoklu pipet yardımıyla dağıtılmıştır ve aliminyum folyoya sarılmıştır. DMSO eklenen plak 15 dakika süreyle 150 rpm'de ve 37°C'de çalkalayıcı etüvde folyoya sarılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda zaman kaybetmeden pleyt 570 nm dalga boyunda ELISA reader cihazında okuma yapılarak OD değerleri elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen OD değerlerinden Auranofin ve kontrol ilaçları olan BZN, AmB, ve PYR ilaçlarının seçicilik indekslerinin ($SI=CC_{50}/IC_{50}$) hesaplanmasında kullanılan CC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bu işlem farklı zamanlarda 3 kez tekrarlanmıştır.

5.2.8. Auranofinin *In Vitro* İlaç Etkinliğinin Araştırılması

Auranofinin logaritmik faza giren ve çalışma için gerekli üreme yoğunluğun ulaşan *T. cruzi* trypomastigotları üzerine antitrypanosomal ve *L. tropica* promastigotları üzerine antileishmanial aktivitesi, hemositometri yöntemi ve celltiter-glo yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızda 96'lık düz tabanlı hücre kültürü plağının kuyucukları 3'ü blank (Kör kuyucuk), 3'ü ilaçsız parazit kontrol, 3'ü kontrol ilacı (*T. cruzi* için BZN, *L. tropica* için AmB), 3'ü çalışma ilacı olan AF olacak şekilde işaretlenmiştir. Her bir kuyucuğa RPMI-1640 besiyerinden 100 µl konulmuştur. *T. cruzi* trypomastigotları ve *L. tropica* promastigotları olmak üzere 2 tür için ayrı hücre kültürü plakları hazırlanmıştır. AF, BZN ve AmB için ayrılmış olan her plaktaki 3'er bölmenin her birinin ilk kuyucuğuna 100'er µl ilave edilmiş ve otomatik dağıtıcı pipet yardımıyla ilk kuyucuktaki ilaçlar, besiyeri homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Bu karışımlardan seri sulandırmalar hazırlanmıştır. Daha sonra *T. cruzi* trypomastigotları (10^7 trypomastigot/mL) ve *L. tropica* promastigotları (10^7 promastigot/mL) thoma lamı ile sayılarak parazit süspansiyonları hazırlanmıştır.

Hazırlanan parazit süspansiyonlarından 100 µl olacak şekilde bütün kuyucuklara eklenmiştir. Blank bölmelerine parazit ilave edilmemiştir. 96'lık düz tabanlı hücre kültürü plağının kapağı kapatılarak etrafı parafinle kaplanmıştır ve 26ºC'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin sonunda hemositometri yöntemi ve celltiter-glo yöntemi ile *T. cruzi* trypomastigotları ve *L. tropica* promastigotları üzerine AF'in *in vitro* ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi için AF ve kontrol ilaçları olan BZN ve AmB ilaçlarının seçicilik indekslerinin ($SI=CC_{50}/IC_{50}$) hesaplanmasında kullanılan $IC_{50}^{trypomastigot}$ ve $IC_{50}^{promastigot}$ değerleri hesaplanmıştır.

5.2.8.1. Hemositometri yöntemi

Hemositometri yönteminde Neubauer'in Thoma lamı kullanılmıştır. 48 saat sonunda etüvden çıkarılan plakların her bir kuyusundan ayrı ayrı örnek alınarak Neubauer'in Thoma lamında Tripan blue boyası ile büyük büyütme (400x) de canlılıklarına bakılmıştır. Thoma lamının her bir köşesinde bulunan toplam dört kare ve orta alandaki kare içerisinde bulunan *T. cruzi* epimastigotları, *L. tropica* ve *L. infantum* promastigotları sayılmıştır. Toplam parazit sayısı 10.000 ile çarpılıp sayılan kareye bölünerek ml'deki parazit sayısı bulunmuştur. Bu işlem farklı zamanlarda 3 kez tekrarlanmıştır.

5.2.8.2. Celltiter-glo yöntemi

Derin dondurucuda (-20ºC) saklanan celltiter-glo (Promega®, ABD) buffer ve liyofilize celltiter-glo (Promega®, ABD) substratı kullanmadan önce oda sıcaklığında çözdürülmüştür. Liyofilize enzim/substrat karışımı oluşturmak için 10 ml buffer, substratı içeren şişeye aktarılarak celltiter-glo (Promega®, ABD) reaktifi oluşturulmuştur ve homojen bir çözelti elde etmek için hafifçe vorteksleyerek karıştırılmıştır.

Daha önce 48 saat süreyle inkübasyona bırakılan hücre kültürü plakları etüvden çıkarılmış ve her bir kuyucukdan 100 µl alınarak beyaz duvarlı 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına aktarılmıştır. Ardından, kuyucuk başına 100 µl celltiter-glo (Promega®, ABD) reaktifi eklenmiş ve hücre kültürü plakları oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, hücre kültürü plakları luminoskan ascent (Thermo Fisher Scientific®, ABD) cihazında okutulmuş ve çıkan absorbans

değerlerine göre canlılık ve inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çalışmalar farklı zamanlarda üç kez tekrarlanmıştır.

5.2.9. Auranofinin *Ex Vivo* İlaç Etkinliğinin Araştırılması

5.2.9.1. Auranofinin *T. cruzi* üzerine *ex vivo* ilaç etkinliğinin araştırılması

Vero hücre süspansiyonundan $5x10^3$ hücre/odacık yoğunluğunda olacak şekilde 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına 400 µL eklenerek hücrelerin odacık tabanına yapışmasını sağlamak için %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında etüvden çıkarılan 8 odacıklı lamların içerisindeki RPMI-1640 besiyeri dikkatli bir şekilde steril pipet yardımıyla boşaltılmıştır ve her bir odacık 400 µL taze RPMI-1640 besiyeri eklenerek yıkanmıştır. RPMI-1640 besiyeri içerisinde logaritmik fazdaki trypomastigot süspansiyonundan 1:10 (hücre:trypomastigot) oranında 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına 400 µL eklenmiştir ve enfeksiyonun gerçekleşmesi için %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında etüvden çıkarılan 8 odacıklı lamlarda (Ibidi®, Almanya) hücre içerisine girmeyen serbest trypomastigotları içeren besiyeri dikkatli bir şekilde steril pipet yardımıyla boşaltılmıştır. 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına 400 µL taze RPMI-1640 besiyeri eklenerek yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına taze RPMI-1640 besiyerinden 200 µl eklenmiştir. Konsantrasyon aralığı daha önce belirlenmiş olan AF (50 µM – 1 µM) ve BZN (kontrol ilacı) (500 µM – 15 µM) ilaçlarının her biri için ayrılmış olan 8 odacıklı lamın (Ibidi®, Almanya) ilk kuyucuğuna 200 µl ilave edilmiştir. Ardından steril otomatik pipet yardımıyla ilk kuyucuktaki ilaçlar RPMI-1640 besiyeri ile homojen olacak şekilde karıştırılmıştır ve bu karışımlardan seri sulandırmalar hazırlanmıştır. AF ve BZN (kontrol ilacı) ilaçlarının eklenmesinden sonra 8 odacıklı lamlar, %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. Ardından 8 odacıklı lamlar (Ibidi®, Almanya) RPMI-1640 besiyeri ile yıkanmıştır, metanol ile fikse edilmiştir, giemsa ile boyanmıştır ve ışık mikroskobunda her odacık içerisindeki 100 Vero hücresi içerisindeki amastigot sayısı belirlenmiştir. Her konsantrasyonun bulunduğu odacıktaki 100 Vero hücresi içerisindeki amastigot

sayısı ile ilaçsız kontrol odacığındaki 100 Vero hücresi içerisindeki amastigot sayısı belirlenerek aşağıdaki formülde kullanılmıştır ve her konsantrasyon için % anti-amastigot aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\%AA = [1- (\text{amastigot sayısı}/100 \text{ hücre})_{\text{İlaç uygulanan}} / (\text{amastigot sayısı}/100 \text{ hücre})_{\text{Kontrol}}] \times 100$$

Elde edilen verilere göre *T. cruzi* hücre içi amastigotlarının %50 inhibisyonunu sağlamak için gerekli AF ilaç konsantrasyonu olan $IC_{50}^{Amastigot}$ değeri belirlenmiştir. Hücre içi *T. cruzi* amastigotlarına karşı AF'in *ex vivo* ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde, AF varlığında inkübe edilen enfekte Vero hücrelerinin ışık mikroskobu ile incelemesiyle elde edilen sonuçlar ve Chagas hastalığının tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan ilaç olan BZN (kontrol ilacı) varlığında inkübe edilen enfekte Vero hücrelerinin ışık mikroskobu ile incelemesiyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

5.2.9.2. Auranofinin *L. tropica* üzerine *ex vivo* ilaç etkinliğinin araştırılması

Vero hücre süspansiyonundan $5x10^3$ hücre/odacık yoğunluğunda olacak şekilde 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına 400 µL eklenerek hücrelerin odacık tabanına yapışmasını sağlamak için %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında etüvden çıkarılan 8 odacıklı lamların içerisindeki RPMI-1640 besiyeri dikkatli bir şekilde steril pipet yardımıyla boşaltılmıştır ve her bir odacık 400 µL taze RPMI-1640 besiyeri eklenerek yıkanmıştır. RPMI-1640 besiyeri içerisinde logaritmik fazdaki promastigot süspansiyonundan 1:10 (hücre:promastigot) oranında 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına 400 µL eklenmiştir ve enfeksiyonun gerçekleşmesi için %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında etüvden çıkarılan 8 odacıklı lamlarda (Ibidi®, Almanya) hücre içerisine girmeyen serbest promastigotları içeren besiyeri dikkatli bir şekilde steril pipet yardımıyla boşaltılmıştır. 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına 400 µL taze RPMI-1640 besiyeri eklenerek yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına taze RPMI-1640 besiyerinden 200 µl eklenmiştir. Konsantrasyon aralığı daha önce belirlenmiş olan AF (50 µM – 1 µM)

ve AmB (kontrol ilacı) (1 µM – 0,03 µM) ilaçlarının her biri için ayrılmış olan 8 odacıklı lamın (Ibidi®, Almanya) ilk kuyucuğuna 200 µl ilave edilmiştir. Ardından steril otomatik pipet yardımıyla ilk kuyucuktaki ilaçlar RPMI-1640 besiyeri ile homojen olacak şekilde karıştırılmıştır ve bu karışımlardan seri sulandırmalar hazırlanmıştır. AF ve AmB (kontrol ilacı) ilaçlarının eklenmesinden sonra 8 odacıklı lamlar (Ibidi®, Almanya), %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. Ardından 8 odacıklı lamlar (Ibidi®, Almanya) RPMI-1640 besiyeri ile yıkanmıştır, metanol ile fikse edilmiştir, giemsa ile boyanmıştır ve ışık mikroskobunda her odacık içerisindeki 100 Vero hücresi içerisindeki amastigot sayısı belirlenmiştir. Her konsantrasyonun bulunduğu odacıktaki 100 Vero hücresi içerisindeki amastigot sayısı ile ilaçsız kontrol odacığındaki 100 Vero hücresi içerisindeki amastigot sayısı belirlenerek aşağıdaki formülde kullanılmıştır ve her konsantrasyon için % anti-amastigot aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\%AA = [1- (\text{amastigot sayısı/100 hücre})_{\text{İlaç uygulanan}} / (\text{amastigot sayısı/100 hücre})_{\text{Kontrol}}] \times 100$$

Elde edilen verilere göre *L. tropica* hücre içi amastigotlarının %50 inhibisyonunu sağlamak için gerekli AF ilaç konsantrasyonu olan $IC_{50}^{Amastigot}$ değeri belirlenmiştir. Hücre içi *L. tropica* amastigotlarına karşı AF'in *ex vivo* ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde, AF varlığında inkübe edilen enfekte Vero hücrelerinin ışık mikroskobu ile incelemesiyle elde edilen sonuçlar ve leishmaniasis tedavisinde kullanılan AmB (kontrol ilacı) varlığında inkübe edilen enfekte Vero hücrelerinin ışık mikroskobu ile incelemesiyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

5.2.9.3. Auranofinin *T. gondii* üzerinde *ex vivo* ilaç etkinliğinin araştırılması

Vero hücre süspansiyonundan $5x10^3$ hücre/odacık yoğunluğunda olacak şekilde 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına 400 µL eklenerek hücrelerin odacık tabanına yapışmasını sağlamak için %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında etüvden çıkarılan 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) içerisindeki RPMI-1640 besiyeri dikkatli bir şekilde steril pipet yardımıyla boşaltılmıştır ve her bir odacık 400 µL taze RPMI-1640 besiyeri

eklenerek yıkanmıştır. RPMI-1640 besiyeri içerisindeki takizoit süspansiyonundan 1:10 (hücre:takizoit) oranında 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına 400 µL eklenmiştir ve enfeksiyonun gerçekleşmesi için %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında etüvden çıkarılan 8 odacıklı lamlarda hücre içerisine girmeyen serbest takizoitleri içeren besiyeri dikkatli bir şekilde steril pipet yardımıyla boşaltılmıştır. 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına 400 µL taze RPMI-1640 besiyeri eklenerek yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 8 odacıklı lamların (Ibidi®, Almanya) her bir odacığına taze RPMI-1640 besiyerinden 200 µl eklenmiştir. Konsantrasyon aralığı daha önce belirlenmiş olan AF (50 µM – 1 µM) ve PYR (kontrol ilacı) (500 µM – 15 µM) ilaçlarının her biri için ayrılmış olan 8 odacıklı lamın (Ibidi®, Almanya) ilk kuyucuğuna 200 µl ilave edilmiştir. Ardından steril otomatik pipet yardımıyla ilk kuyucuktaki ilaçlar RPMI-1640 besiyeri ile homojen olacak şekilde karıştırılmıştır ve bu karışımlardan seri sulandırmalar hazırlanmıştır. AF ve PYR (kontrol ilacı) ilaçlarının eklenmesinden sonra 8 odacıklı lamlar (Ibidi®, Almanya), %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. Ardından 8 odacıklı lamlar RPMI-1640 besiyeri ile yıkanmıştır, metanol ile fikse edilmiştir, giemsa ile boyanmıştır ve ışık mikroskobunda her odacık içerisindeki 100 Vero hücresi içerisindeki takizoit sayısı belirlenmiştir. Her konsantrasyonun bulunduğu odacıktaki 100 Vero hücresi içerisindeki takizoit sayısı ile ilaçsız kontrol odacığındaki 100 Vero hücresi içerisindeki takizoit sayısı belirlenerek aşağıdaki formülde kullanılmıştır ve her konsantrasyon için % anti-takizoit aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\%AA = [1- (\text{takizoit sayısı}/100 \text{ hücre})_{\text{İlaç uygulanan}} / (\text{takizoit sayısı}/100 \text{ hücre})_{\text{Kontrol}}] \times 100$$

Elde edilen verilere göre *T. gondii* hücre içi takizoitlerinin %50 inhibisyonunu sağlamak için gerekli AF ilaç konsantrasyonu olan $IC_{50}^{Takizoit}$ değeri belirlenmiştir. Hücre içi *T. gondii* takizoitlerine karşı AF'in *ex vivo* ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde, AF varlığında inkübe edilen enfekte Vero hücrelerinin ışık mikroskobu ile incelemesiyle elde edilen sonuçlar ve toxoplasmosis tedavisinde kullanılan PYR (kontrol ilacı) varlığında inkübe edilen enfekte Vero hücrelerinin ışık mikroskobu ile incelemesiyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

5.2.10. Auranofinin Seçicilik İndekslerinin Belirlenmesi

Seçicilik indeksi (SI), bir ilaç ya da bileşiğin parazit çoğalma inhibisyonu üzerindeki etkinliğini belirtmek için kullanılan kapsamlı bir parametredir. Seçicilik indeks (SI) değeri sitotoksik aktivite değerinin (CC_{50}), antiparaziter aktivite değerine (IC_{50}) oranıdır. Auranofinin *T. cruzi* trypomastigot ve amastigotları, *L. tropica* promastigot ve amastigotları ve *T. gondii* takizoitleri üzerindeki etkinliğini değerlendirebilmek için SI değerleri belirlenmiştir.

5.2.11. İstatistiksel Analiz

Trypanosoma cruzi, L. tropica ve *T. gondii* parazitlerinin *ex vivo* kültivasyonu Tukey's multiple comparisons testi ve auranofinin antiparaziter ilaç etkinliği Sidak's multiple comparisons testi uygulanarak elde edilen verilerin istatiksel analizi GraphPad Prism 8 yazılımı (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) kullanılarak istatiksel olarak değerlendirilmiştir.

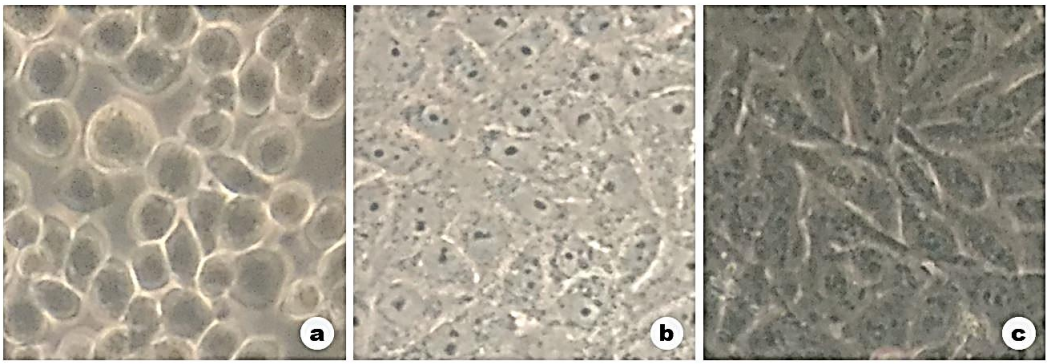
5.2.12. Etik Kurul Onayı

Bu tez çalışması, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 21/05/2019-E.42581 tarih ve sayılı kararı ile yapılmıştır.

6. BULGULAR

6.1. *TRYPANOSOMA CRUZI, L. TROPICA* VE *T. GONDII* PARAZİTLERİNİN *EX VIVO* KÜLTİVASYONU

J774, Vero ve HeLa hücre hatlarının 25 cm^2'lik hücre kültürü flasklarına ekimi yapılmıştır ve %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde flask yüzeyini kaplayarak (konflüent) başarılı bir şekilde üremesi sağlanmıştır (Resim 5). J774, Vero ve HeLa hücre hatları, *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitleri ile başarılı bir şekilde 1:10 oranında enfekte edilmiştir ve *ex vivo* kültür yöntemi ile 3 kez pasajları yapılmıştır. Her pasaj sonrasında 8 odacıklı lamlarda enfeksiyon oranları Giemsa boyalı preparatların ışık mikroskobunda incelenmesi ile değerlendirilmiştir (Tablo 4). *Trypanosoma cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* suşları, J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında *ex vivo* kültivasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde üretilmiştir (Resim 6-8).



Resim 5. Hücre kültürü flasklarında konfluent olarak üreyen J774, Vero ve HeLa hücre hatlarının invert mikroskobundaki görünümü (x400) (**a:** J774 hücre hattı, **b:** Vero hücre hattı, **c:** HeLa hücre hattı)

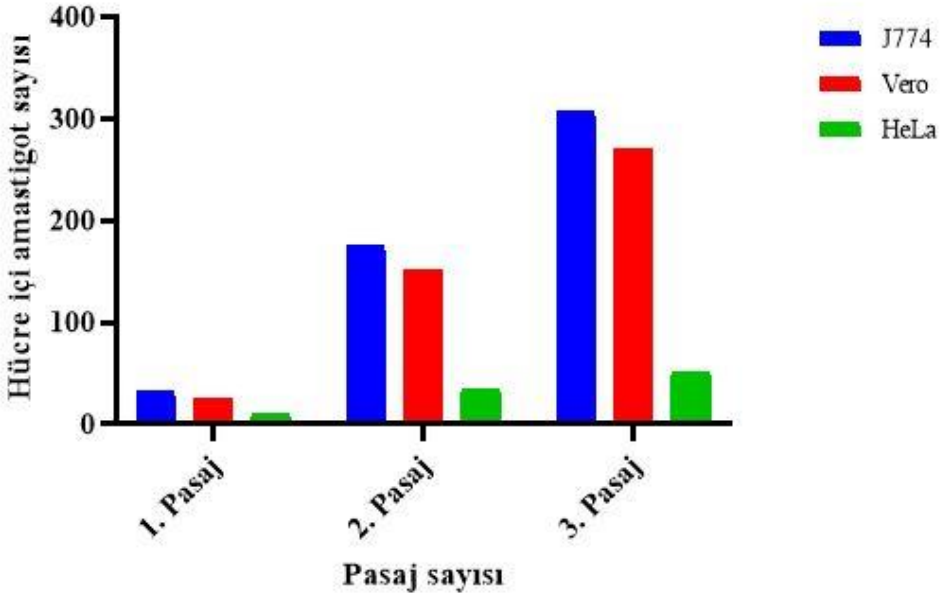
J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında *ex vivo* kültivasyonu yapılan *T. cruzi* ve *L. tropica* suşlarının her bir hücre hattındaki enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde J774 ve Vero hücre hatları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (*p>0,05, Tukey*), ancak J774 ve Hela hücre hatları arasında (*p<0,05, Tukey*) ve Vero

ve HeLa hücre hatları arasında (*p<0,05, Tukey*) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. *T. gondii* suşunun her bir hücre hattındaki enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (*p>0,05, Tukey*) (Tablo 4).

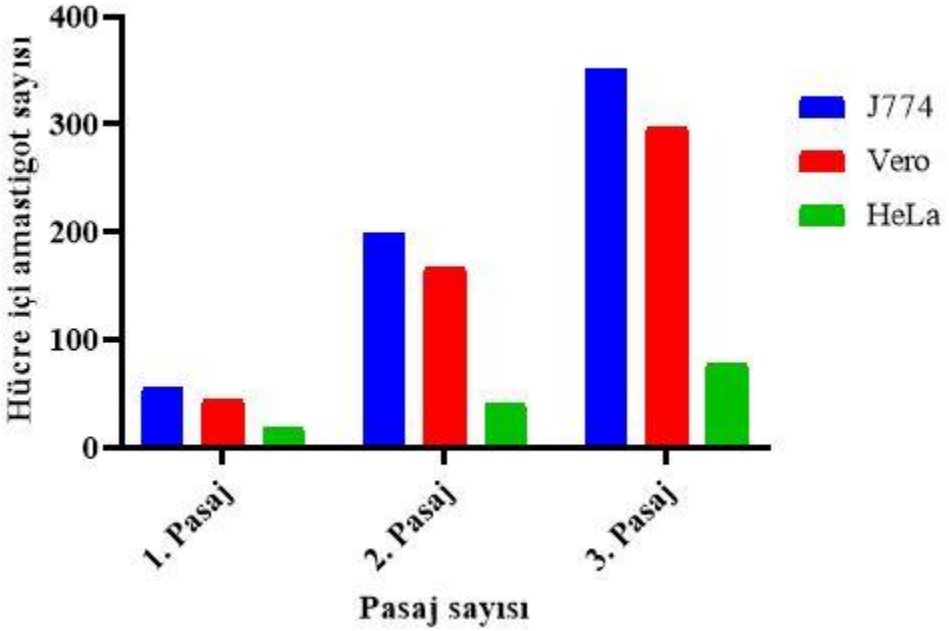
Tablo 4. Giemsa boyalı preparatlarda J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki *T. cruzi* amastigot, *L. tropica* amastigot *ve T. gondii* takizoit sayıları

	J774			**Vero**			**HeLa**		
	1.pasaj	**2.pasaj**	**3.pasaj**	**1.pasaj**	**2.pasaj**	**3.pasaj**	**1.pasaj**	**2.pasaj**	**3.pasaj**
***T.cruzi* (amastigot)**	32	175	307	25	152	270	11	34	51
***L.tropica* (amastigot)**	56	198	352	44	167	297	19	41	78
***T.gondii* (takizoit)**	51	210	298	24	203	270	56	280	320

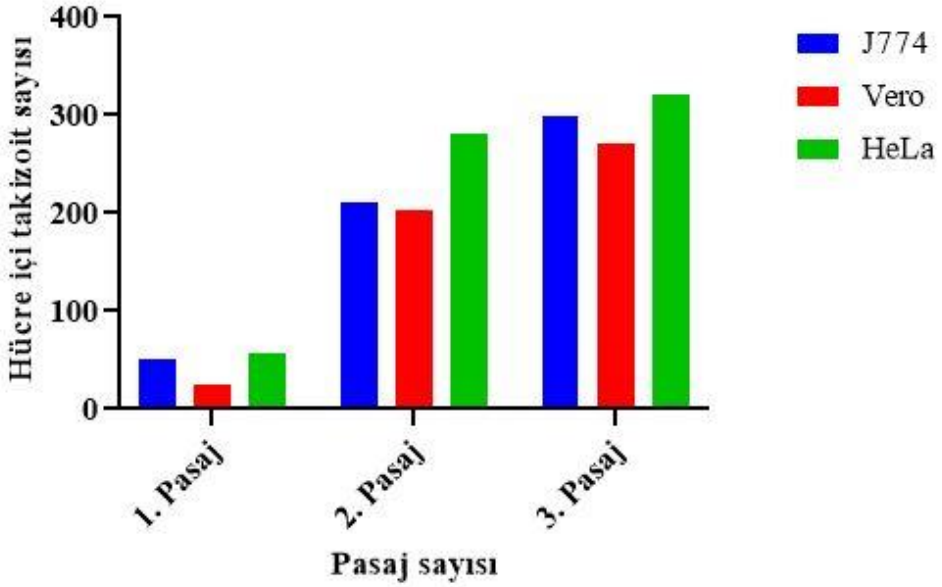
Ex vivo kültivasyon sonucunda her pasaj sonrasında hazırlanan Giemsa boyalı preparatların ışık mikroskobunda incelenmesi ile belirlenen enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde *T. cruzi* ve *L. tropica* suşlarının ürediği en iyi hücre hatları sırasıyla J774, Vero ve HeLa, *T. gondii* suşunun ürediği en iyi hücre hatları sırasıyla HeLa, J774 ve Vero olduğu görülmüştür (Tablo 4) (Grafik 1-3).



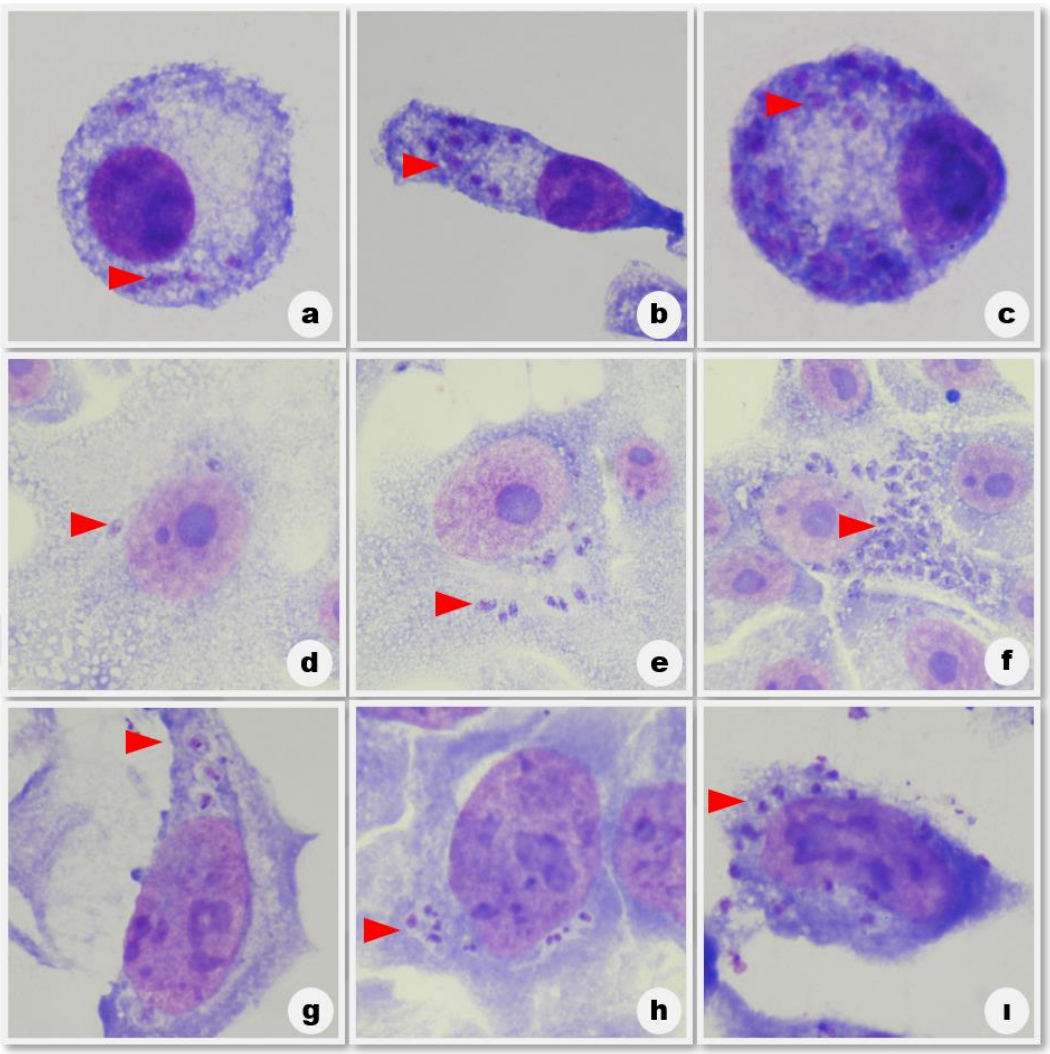
Grafik 1. *Trypanosoma cruzi* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında pasajlar sonrasındaki hücre içi amastigot sayıları



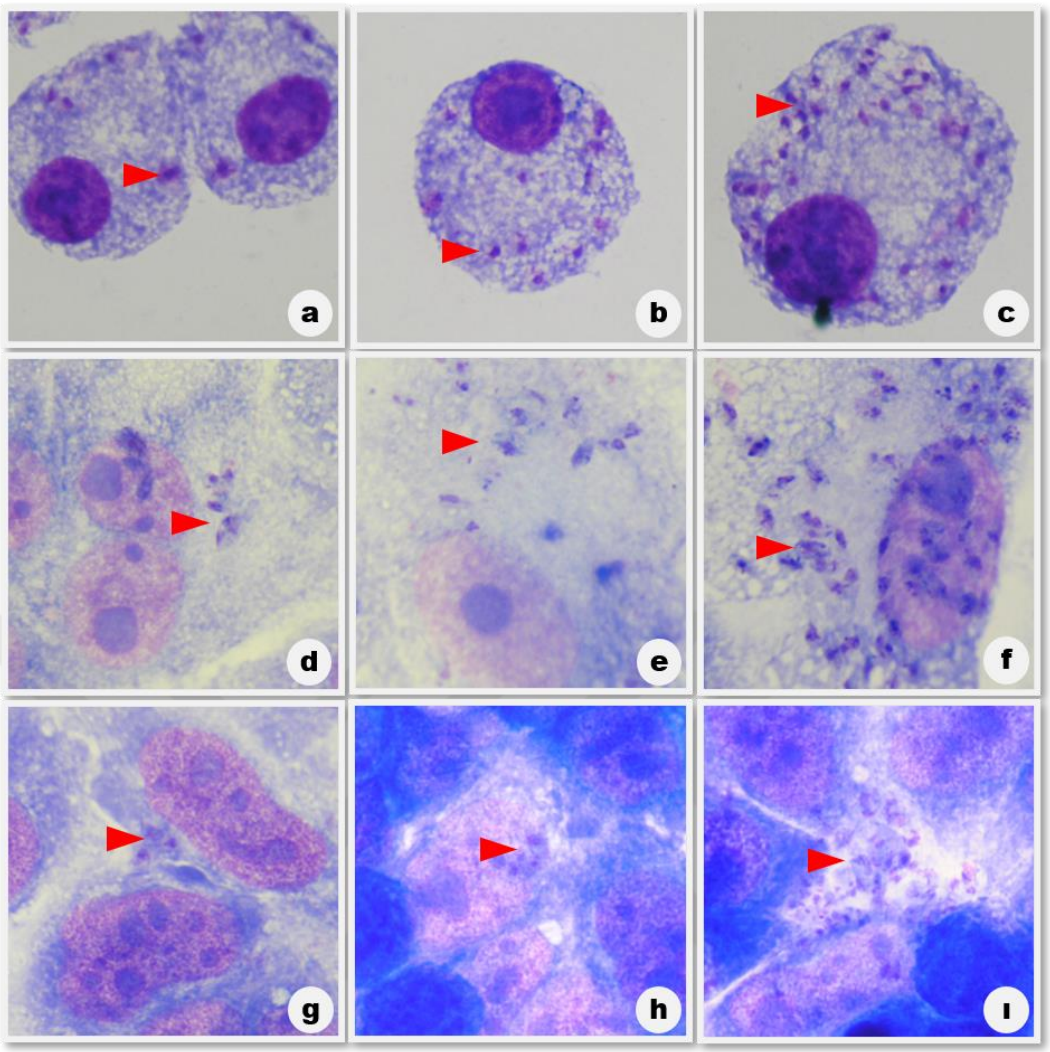
Grafik 2. *Leishmania tropica* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında pasajlar sonrasındaki hücre içi amastigot sayıları



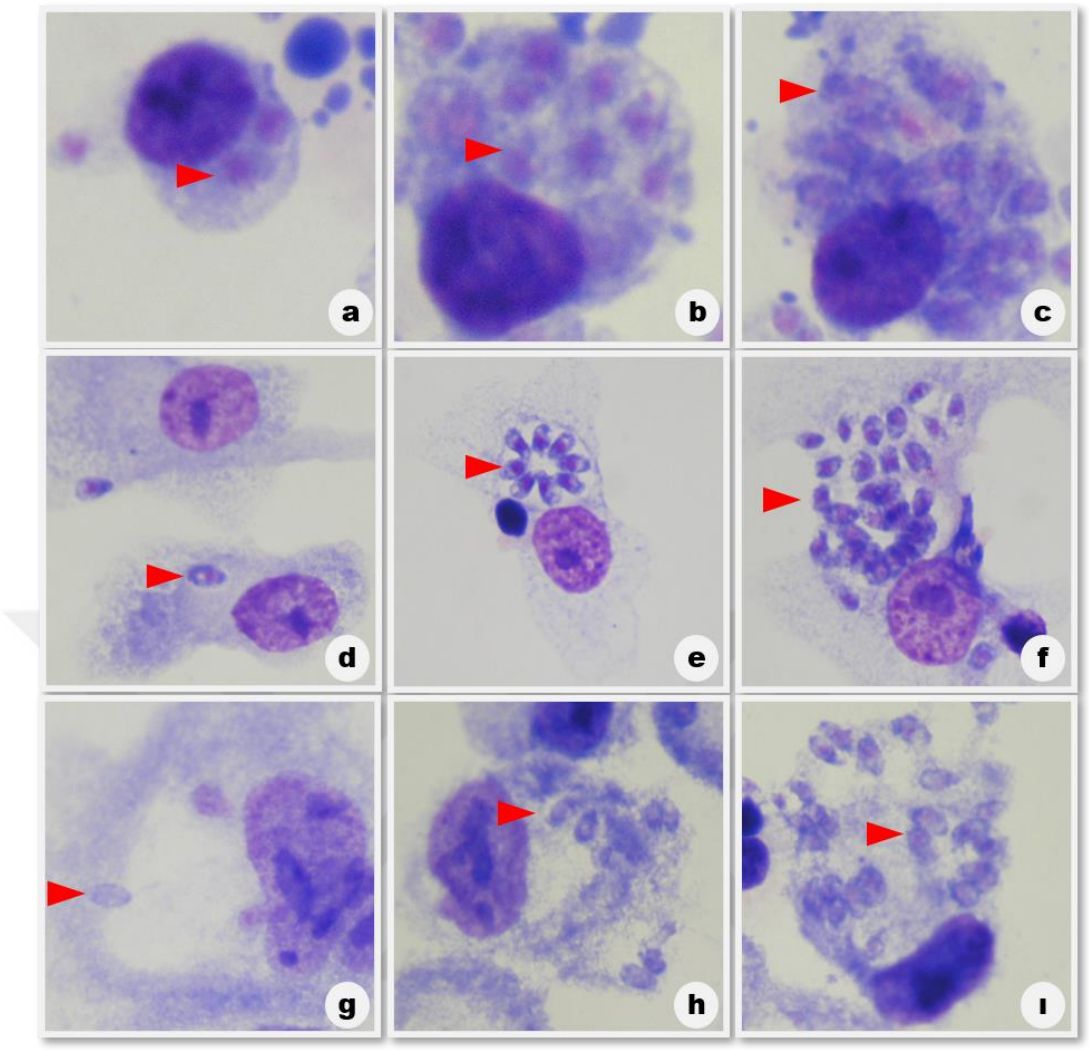
Grafik 3. *Toxoplasma gondii* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında pasajlar sonrasındaki hücre içi takizoit sayıları



Resim 6. Giemsa boyalı preparatta *T. cruzi* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki amastigotların pasajlar sonrasındaki görünümü (**a:** J774 hücre hattında 1. pasaj, **b:** J774 hücre hattında 2. pasaj, **c:** J774 hücre hattında 3. pasaj, **d:** Vero hücre hattında 1. pasaj, **e:** Vero hücre hattında 2. pasaj, **f:** Vero hücre hattında 3. pasaj, **g:** HeLa hücre hattında 1. pasaj, **h:** HeLa hücre hattında 2. pasaj, **ı:** HeLa hücre hattında 3. pasaj)



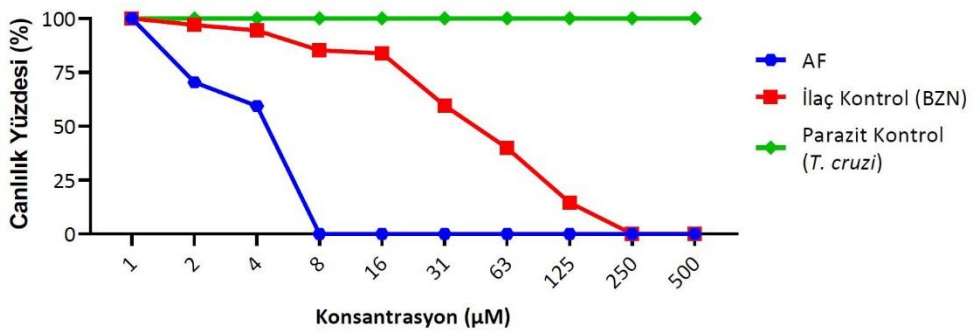
Resim 7. Giemsa boyalı preparatta *L. tropica* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki amastigotların pasajlar sonrasındaki görünümü (**a:** J774 hücre hattında birinci pasaj, **b:** J774 hücre hattında ikinci pasaj, **c:** J774 hücre hattında üçüncü pasaj, **d:** Vero hücre hattında birinci pasaj, **e:** Vero hücre hattında ikinci pasaj, **f:** Vero hücre hattında üçüncü pasaj, **g:** HeLa hücre hattında birinci pasaj, **h:** HeLa hücre hattında ikinci pasaj, **ı:** HeLa hücre hattında üçüncü pasaj)



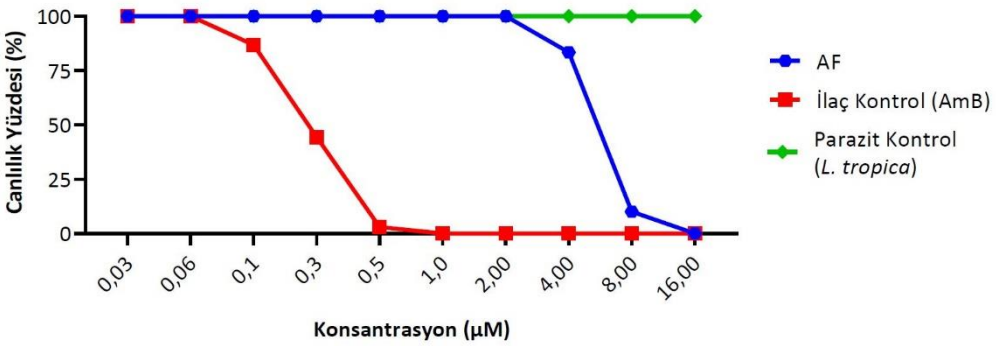
Resim 8. Giemsa boyalı preparatta *T. gondii* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki takizoitlerin pasajlar sonrasındaki görünümü (**a:** J774 hücre hattında 1. pasaj, **b:** J774 hücre hattında 2. pasaj, **c:** J774 hücre hattında 3. pasaj, **d:** Vero hücre hattında 1. pasaj, **e:** Vero hücre hattında 2. pasaj, **f:** Vero hücre hattında 3. pasaj, **g:** HeLa hücre hattında 1. pasaj, **h:** HeLa hücre hattında 2. pasaj, **ı:** HeLa hücre hattında 3. pasaj)

6.2. AURANOFİNİN ANTİPARAZİTER İLAÇ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda, 48 saatlik inkübasyon sonrasında uygulanan hemositometri ve celltiter-glo yöntemleri ile AF'in *T. cruzi*'ye karşı *in vitro* antitrypanosomal aktivitesi değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(trypomastigot)}$ değeri 3,8 µM ve *L. tropica*'ya karşı *in vitro* antileishmanial aktivitesi değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(promastigot)}$ değeri 5,4 µM olarak belirlenmiştir. Auranofinin *in vitro* antiparaziter aktivitesinin araştırılmasında kontrol ilaçları olarak kullanılan BZN'ün $IC_{50}^{(trypomastigot)}$ değeri 42 µM ve AmB'nin $IC_{50}^{(promastigot)}$ değeri 0,05 µM olarak değerlendirilmiştir (Grafik 4) (Grafik 5).

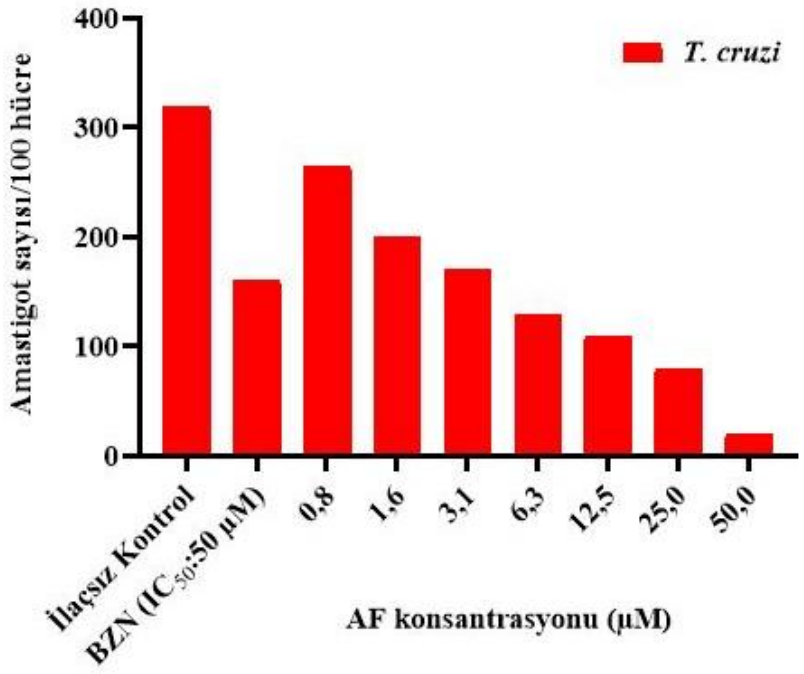


Grafik 4. Auranofinin *T. cruzi*'ye karşı *in vitro* antitrypanosomal aktivitesi

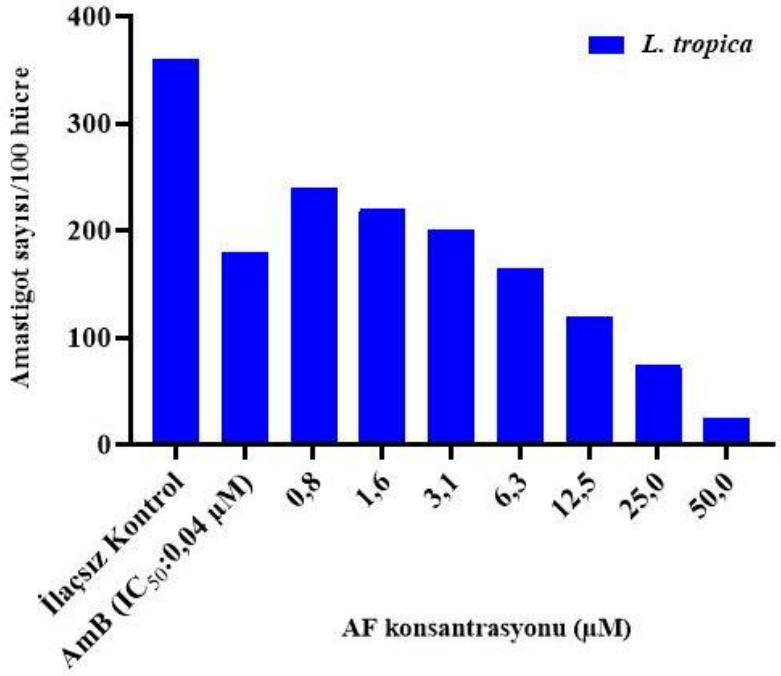


Grafik 5. Auranofinin *L. tropica*'ya karşı *in vitro* antileishmanial aktivitesi

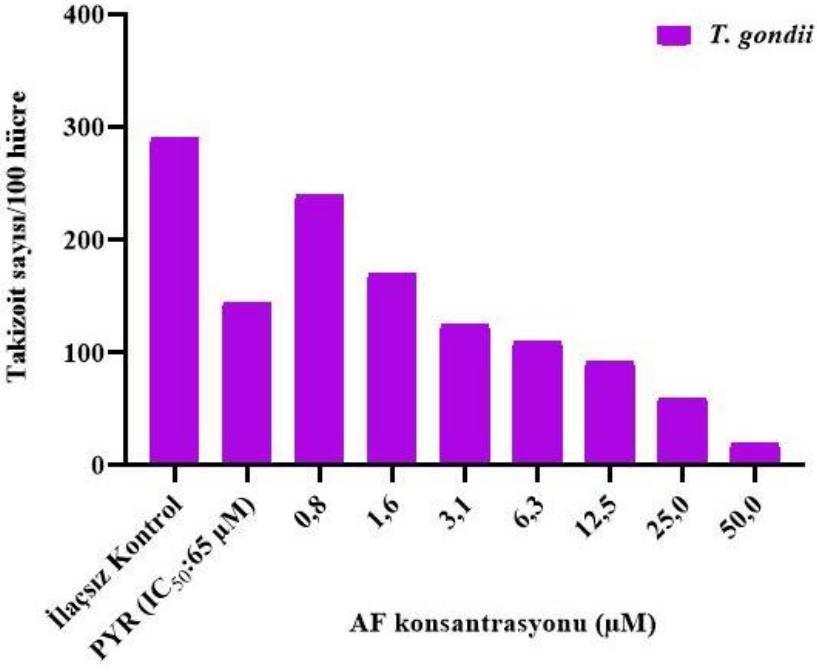
Sekiz odacıklı lamlarda 48 saatlik inkübasyon sonrasında hazırlanan giemsa boyalı preparatların 1000x büyütmede ışık mikroskobu ile incelenmesiyle AF'in *T. cruzi*'ye karşı *ex vivo* antitrypanosomal aktivitesi değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(amastigot)}$ değeri 3,4 µM, *L. tropica*'ya karşı *ex vivo* antileishmanial aktivitesi değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(amastigot)}$ değeri 4,9 µM ve *T. gondii*'ye karşı *ex vivo* antitoxoplasmal aktivitesi değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(takizoit)}$ değeri 2,1 µM olarak belirlenmiştir. Auranofinin *ex vivo* antiparaziter aktivitesinin araştırılmasında kontrol ilaçları olarak kullanılan BZN'ün $IC_{50}^{(amastigot)}$ değeri 50 µM, AmB'nin $IC_{50}^{(amastigot)}$ değeri 0,04 µM ve PYR'in $IC_{50}^{(takizoit)}$ değeri 65 µM olarak değerlendirilmiştir (Grafik 6) (Grafik 7) (Grafik 8).



Grafik 6. Auranofinin *T. cruzi*'ye karşı *ex vivo* antitrypanosomal aktivitesi

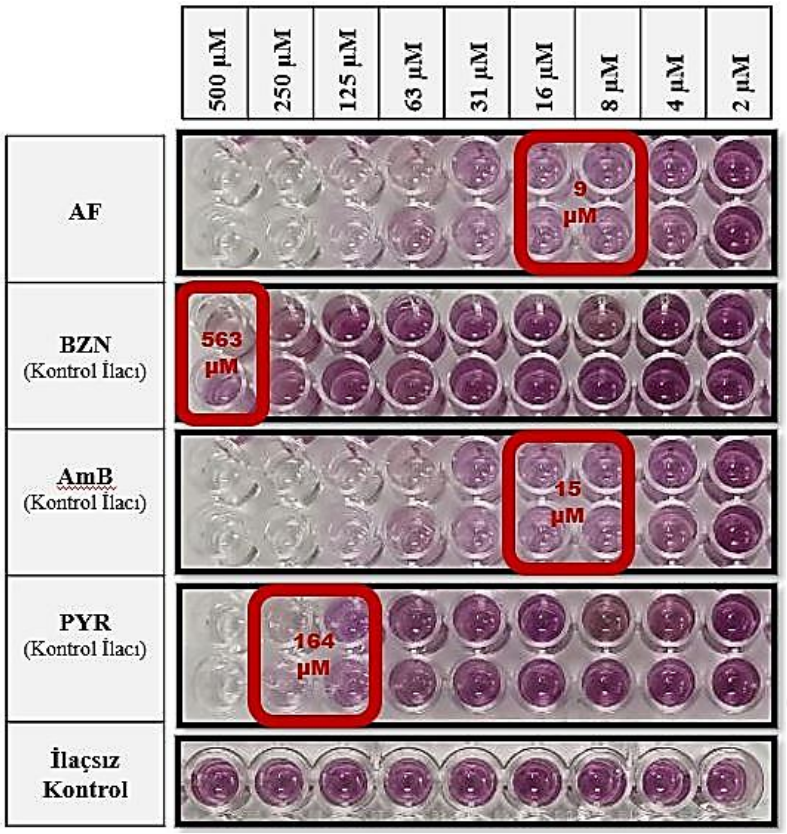


Grafik 7. Auranofinin *L. tropica*'ya karşı *ex vivo* antileishmanial aktivitesi

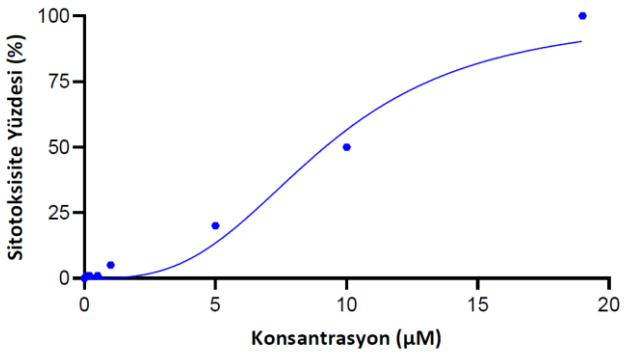


Grafik 8. Auranofinin *T. gondii*'ye karşı *ex vivo* antitoxoplasmal aktivitesi

MTT yöntemi kullanılarak J774 hücrelerinde AF'in CC_{50} değeri 9 µM olarak değerlendirilmiştir ve sitotoksik aktivite göstermediği saptanmıştır. Kontrol ilaçları olarak kullanılan BZN, AmB ve PYR'in CC_{50} değerleri ise sırasıyla 563 µM, 15 µM ve 164 µM olarak değerlendirilmiştir (Resim 9) (Grafik 9).



Resim 9. Auranofin ve kontrol ilaçlarının MTT sonuçlarına göre belirlenen CC_{50} değerleri



Grafik 9. Auranofinin sitotoksik aktivitesi

Trypanosoma cruzi, L. tropica ve *T. gondii* parazitleri üzerine *in vitro* ve *ex vivo* aktivite sonuçları, ilaçsız kontrol grupları ile karşılaştırıldığında AF'in *T. cruzi*'ye karşı antitrypanosomal aktivite gösterdiği, *L. tropica*'ya karşı antileishmanial aktivite gösterdiği ve *T. gondii*'ye karşı antitoxoplasmal aktivite gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, *Sidak*). Elde edilen IC_{50} ve CC_{50} değerleri kullanılarak hesaplanan AF'in SI değerleri ($SI=CC_{50}/IC_{50}$), *T. cruzi* trypomastigotları ve amastigotları için sırasıyla 2,4 ve 2,6 olarak, *L. tropica* promastigotları ve amastigotları için sırasıyla 1,7 ve 1,8 olarak ve *T. gondii* takizoitleri için 2,1 olarak belirlenmiştir ve kontrol ilaçları olarak kullanılan BZN, AmB ve PYR'in SI değerleri ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır (Tablo 5) (Tablo 6) (Tablo 7).

Tablo 5. Auranofinin *T. cruzi* tripomastigot ve amastigotları üzerine anti-trypanosomal aktivitesi (IC_{50}), J774 makrofaj hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (CC_{50}) ve seçicilik indeksi (SI)

İlaçlar	**IC_{50} (μM)**		**CC_{50}**	**SI**	
	Trypomastigot	**Amastigot**	(μM)	**Trypomastigot**	**Amastigot**
AF	3,8	3,4	9	2,4	2,6
BZN (Kontrol ilacı)	42	50	563	13,4	11,26

Tablo 6. Auranofinin *L.* tropica promastigotları ve amastigotları üzerine anti-leishmanial aktivitesi (IC_{50}), J774 makrofaj hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (CC_{50}) ve seçicilik indeksi (SI)

İlaçlar	**IC_{50} (μM)**		**CC_{50}**	**SI**	
	Promastigot	**Amastigot**	(μM)	**Promastigot**	**Amastigot**
AF	5,4	4,9	9	1,7	1,8
AmB (Kontrol ilacı)	0,05	0,04	15	300	375

Tablo 7. Auranofinin *T. gondii* takizoitleri üzerine anti-toxoplasmal aktivitesi (IC_{50}), J774 makrofaj hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (CC_{50}) ve seçicilik indeksi (SI)

İlaçlar	**IC_{50} (μM)**	**CC_{50} (μM)**	**SI**
AF	2,1	9	4,3
PYR (Kontrol ilacı)	65	164	2,5

7. TARTIŞMA

Chagas hastalığı (CH, Amerika trypanosomiasisi), protozoon parazit olan *Trypanosoma cruzi*'nin neden olduğu potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Dünya genelinde özellikle enfekte kişilerin iş gücünün dışında kalmasına ve yılda 10.000'den fazla ölüme neden olan CH'nın en önemli halk sağlığı sorunlarından biri olduğu bilinen Latin Amerika'da yaklaşık olarak 8 milyon insan *T. cruzi* ile enfektedir ve 25 milyon insan hastalığa yakalanma riski altındadır. Hastalığın endemik olduğu Orta ve Güney Amerika'dan yılda yaklaşık olarak 300.000 turist almakta olan ülkemiz için de önem arz etmektedir (Guarner, 2019; Ayşe Okuyucu, 2018; Chagas disease (American trypanosomiasis). 2018).

Leishmaniasis, Antarktika dışındaki tüm kıtalarda yayılım gösteren ve dişi kum sineği (*Phlebotomus* spp.) vektörü aracılığıyla memeli konaklara bulaştırılan zoonotik/antroponotik karakterli bir paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü 2018 yılı verilerine göre; KL'in 92 ülke veya bölgede, VL'in ise 83 ülke veya bölgede endemik olarak görüldüğü bildirilmiştir. Halihazırda 1 milyardan fazla insan leishmaniasis için endemik bölgelerde enfeksiyon riski altında yaşamaktadır. Her yıl tahmini olarak 30.000 yeni VL vakası ve 1 milyondan fazla yeni KL vakası rapor edilmektedir. Leishmaniasis önemli bir halk sağlığı sorunu olmasına karşın günümüzde bile hastalığın kontrol altına alınması için sarf edilen çabalar yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda komşu ülkelerde patlak veren siyasi karışıklıklar ve savaş sonucunda ülkemizde yapılan yoğun göç hareketi dolayısıyla olgu sayıları ve odaklarda önemli artışlar görülmektedir. Ayrıca, yurt dışından dirençli suşların ülkemize girişinde artış görülmektedir. Bu durum, ileriki yıllarda bu sağlık sorunda artış yaşanabileceğini göstermektedir (Burza ve ark., 2018; Özbel ve Toz, 2007; WHO, 2020).

Toxoplasmosis, zorunlu hücre içi apicomplexan protozoon türü olan *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır. Dünya genelinde en yaygın olarak görülen parazitlerden biri olan ve birçok sıcakkanlı hayvan türünde (30'dan

fazla kuş türü ve 300 memeli türü) enfeksiyona neden olabilen *T. gondii*, dünya nüfusunun tahmini olarak %30-50'sini kapsayan prevalansa sahip olmasından dolayı insanlarda en yaygın olarak görülen enfeksiyon hastalığıdır. Ülkemizde *T. gondii* seropozitifliğinin araştırıldığı çok sayıda araştırma yapılmıştır. Son yıllardaki veriler göz önüne alındığında anti-*T. gondii* IgG pozitifliği %17,5-69,5 arasında, anti-*T. gondii* IgM pozitifliği ise %0-5,4 arasında rapor edilmiştir (Beder ve Esenkaya Taşbent, 2020; Paris, 2020; Flegr ve ark., 2014).

Chagas hastalığının etkeni olan *T. cruzi,* leishmaniasis etkeni olan *Leishmania* spp. ve toxoplasmosis etkeni olan *T. gondii* parazitlerinin üretilmesinde *in vitro, ex vivo* ve *in vivo* gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitlerinin *ex vivo* olarak üretilmesi, *in vivo* modellere kıyasla çok sayıda avantajlara sahiptir. Bu avantajlar arasında etik değer, düşük maliyet ve kolay uygulanabilirlik yer almaktadır. Çeşitli hücre hatlarının kullanıldığı *ex vivo* kültür yöntemi ile *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitlerinin çoğaltılması, tanı testleri ve yeni tanı kitleri geliştirilmesi, tanıda kullanılan yöntemlerin etkinliğinin değerlendirilmesi, yeni geliştirilen ilaç moleküllerininin taranması ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi, doğal kaynaklardan ve bitkilerden elde edilen ilaç adayı moleküllerin etkinliğini araştırması, farklı kullanım alanlarındaki onaylı ilaçların antiparaziter etkinliğinin değerlendirilmesi, hastalıkların patogenezinin aydınlatılması, konak-parazit ilişkisinin aydınlatılması ve profilaktik ilaçların geliştirilmesi konularında yapılacak bir çok çalışmaya olanak sağlaması bakımından oldukça büyük önem taşımaktadır (Passero ve ark., 2009; Acosta-Dávila ve ark., 2020; Oualha ve ark., 2019; Gonzalez-Fajardo ve ark., 2015; Cobb ve Smeltz, 2012; Stempin ve ark., 2008).

Acosta-Davila ve ark. tarafından 2020 yılında yapılan ve *T. gondii* ile insan hücreleri arasındaki etkileşimleri incelemek için kültür takviyeleri, antibiyotikler ve kriyoprezervasyon işlemi uygulanmış hücreler kullanılmadan insana ait periferik kan mononükleer hücreleri ile *ex vivo* model (EXMOWS) oluşturulan bir çalışmada üç bağımsız deney yapılmıştır. İlk olarak, insana ait periferik kan mononükleer hücrelerinin kültür plağında canlılığını ve yapışmasını değerlendirmek için 5 insandan alınan kan örnekleri kullanılmıştır. İkinci deney grubunda, *T. gondii* için üç seropozitif ve iki seronegatif insandan alınan kan örnekleri insan periferik kan mononükleer hücrelerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Parazitler ile, 1:1, 1:3 ve

1:5 oranında enfeksiyon gerçekleştirilmiştir ve sonra farklı zamanlarda (1 saat, 6 saat ve 24 saat) kontrol edilmiştir. EXMOWS için enfeksiyonun olası immünomodülatör etkisi, HFF hücrelerinin *T. gondii* ile enfekte edildiği ve anti-*Toxoplasma* IgG pozitif ve IgG negatif insanlardan elde edilen periferik kan mononükleer hücreleri ile birlikte kültivasyonu ise üçüncü bir deney grubu olarak belirlenmiştir. İnsan periferik kan mononükleer hücrelerinin, *T. gondii* enfeksiyonu için bir saat yeterli olmasına rağmen herhangi bir enfeksiyon deneyi gerçekleştirmeden önce yüzeye tutunmasından emin olmak için minimum inkübasyon süresinin 2 saat olduğu ve *T. gondii* RH-GFP ile yeterli düzeyde enfekte olabilmesi için minimum 1:3 enfeksiyon oranının sağlanması gerektiği belirlenmiştir (Acosta-Dávila ve ark., 2020).

Oualha ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan ve farklı klinik belirtilerden sorumlu olan farklı *Leishmania* suşlarının nötrofillerin *ex vivo* fonksiyonel aktivitesini etkileyip etkilemediğini değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada 14 sağlıklı gönüllüden izole edilen insan polimorf nükleer lökositleri ve iki *L. infantum* ve bir *L. major* suşu kullanılarak bu hücrelerin *ex vivo* enfeksiyon modeli oluşturulmuştur. Elde edilen verilere göre, *L. infantum* ve *L. major* suşlarının nötrofillerin *ex vivo* aktivasyonunu ve apoptozunu benzer şekilde indükleyebildiği ancak bu hücrelerden sitokin salınımını farklı şekilde etkilediği belirlenmiştir (Oualha ve ark., 2019).

Gonzalez-Fajardo ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada geliştirilen *ex vivo* model ile KL hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde tek başına miltefosin ve meglumin antimonat ve bu ilaçların pentoksifilin veya CpG 2006 ile kombinasyonlarına konak ve parazit yanıtları belirlenmiştir. Meglumin antimonat veya miltefosine maruz bırakılmış olan lusiferaz raportör geni ile transfekte edilmiş *L. (Viannia) panamensis* promastigotları ile enfekte edilmiş periferik kan mononükleer hücrelerinde parazitin canlılığı ve TNF-a, IFN-y, IL-10 ve IL-13'ün salgılanması eş zamanlı olarak değerlendirilmiştir. Enfekte periferik kan mononükleer hücrelerinin sitokin salgılanmasını etkilemeyen 4 μM miltefosin ve 8 μg Sb^V/mL antileishmanial konsantrasyonları, parazit yükünün yüksek fakat kısmi azalmasına dayalı olarak immünomodülatörler ile kombinasyon halinde değerlendirmesi için seçilmiştir. Hücre içi parazit canlılığı, luminometri ve ELISA ve multipleks testler ile ölçülen sitokin salgılanması ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, insandan elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinin klinik çözümlemeyi

optimize edecek terapötik stratejileri uyarlamak için kullanılabilecek terapötik yanıtın konak ve parazite bağlı determinantları hakkında bilgi sağlayarak bütünleşik olarak antileishmanial tedavinin *ex vivo* olarak değerlendirilmesini sağladığı bildirilmiştir (Gonzalez-Fajardo ve ark., 2015).

Dominguez-Bernal ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan ve Madrid bölgesinde yakalanan *Phlebotomus perniciosus* kum sineği vektörden izole edilen *L. infantum* izolatlarının, fare makrofajları ve dendritik hücreler kullanılarak oluşturulan modelde *ex vivo* virülansının değerlendirildiği bir çalışmada belirtilen endemik bölgeden elde edilen *L. infantum* izolatlarının, VL patogenezinde rol oynayan enfeksiyon indeksi, sitokin üretimi ve enzimatik aktiviteler açısından yüksek virülansa sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilerin, İspanya Madrid'de VL salgını sırasında *P. perniciosus*'tan izole edilen parazitlerin virülans davranışlarının ve bunların immünokompetan konakları enfekte etmedeki rollerinin incelenmesi için bir başlangıç noktası sağladığı belirtilmiştir (Domínguez-Bernal ve ark., 2014).

Cobb ve ark. tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada transkripsiyon faktörü T-bet'in (Tbx21) *T. cruzi* enfeksiyonuna karşı Th17 yanıtlarını IFN-γ'dan bağımsız bir şekilde düzenlediğini ayrıntılı bir şekilde araştırmak için *T. cruzi* enfeksiyonu sırasında Th17 hücrelerinin gelişimini ve plastisitesi incenmiştir. *T. cruzi* ile enfekte edilen Tbx21(-/-) farelerinden alınan Th17 hücreleri, T-bet'in ektopik ekspresyonu azaltılmış IL-17 ekspresyonu nedeniyle T-bet'in inhibitör etkilerine yatkın olduğu bildirilmiştir. Daha sonra IL-12 ailesi sitokinleri olan IL-12 ve IL-27'nin rolüne değinilmiştir ve *T. cruzi* ile enfekte olmuş IL-12p35 (-/-) farelerinin Th17 hücrelerinde ve Th17 ile ilişkili yangıda önemli bir artış sergilediğini bildirilmiştir. Th17 hücrelerinin IL-12 ile *ex vivo* kültürü sonucunda, IL-17 üretiminde önemli oranda bir azalmaya ve buna eşlik eden IFN-γ artışına yol açtığı saptanmıştır. IL-12'nin IFN-y'dan bağımsız olarak IL-17'yi baskılama yeteneğinin oldukça önemli olduğu belirtilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde ve diğer patojenler için bildirilen sonuçların aksine, Ebi-3(-/-) farelerinde *T. cruzi*'ye özgü Th17 yanıtlarında herhangi bir artış gösteremediğinden, IL-27'nin Th17 gelişimi üzerinde hiçbir inhibitör etkisi görülmemiştir. Ayrıca IL-27, *ex vivo* olarak IL-17 üretimini baskılamak için IL-12 ile sinerji oluşturamamıştır. Bu nedenle, IL-27 yerine IL-12'nin, *T. cruzi*'nin Th17 yanıtlarını düzenlemek için kritik olduğu saptanmıştır (Cobb ve Smeltz, 2012).

Passero ve ark. tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada *Leishmania (Viannia) shawi* enfeksiyonu *in vivo* olarak BALB/c ve C57BL/6 farelerinde ve *ex vivo* olarak da BALB/c ve C57BL/6 farelerinin peritonel makrofajlarında incelenmiştir. BALB/c ve C57BL/6 farelerinden alınan peritoneal makrofajlar, logaritmik fazdaki promastigotlarla enfekte edilmiştir ve 24 saat sonrasında enfeksiyon indeksi ve kültür süpernatantındaki nitrik oksit (NO) seviyeleri analiz edilmiştir. BALB/c ve C57BL/6 fareleri, arka ayak tabanından enfeksiyon oluşturulmuştur ve her 2 haftada bir fareler sakrifiye edilmiştir ve deri enjeksiyon alanındaki histolojik değişiklikler, parazitizm ve humoral immun yanıtlar 8 hafta boyunca değerlendirilmiştir. *Ex vivo* deneyler sonucunda, BALB/c makrofajlarının C57BL/6 makrofajlarından daha yüksek enfeksiyon indeksine sahip olduğu ve daha düşük NO seviyeleri sunduğu saptanmıştır. *In vivo* deneyler sonucunda ise, BALB/c farelerinin C57BL/6 farelerine kıyasla klasik bir duyarlılık davranışı gösterdiği saptanmıştır (Passero ve ark., 2009).

Stempin ve ark. tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada p38 mitojenle aktive olan protein kinaz yolağına etki ederek arjinaz aktivasyonuna aracılık eden bir *T. cruzi* antijeni olan cruzipain ve/veya parazitin kendisi tarafından makrofajın (Mvarphi) mitojenle aktive olan protein kinaz yolaklarının fosforilasyonunun indüklenip indüklenemeyeceği araştırılmıştır. Parazitin JNK ve p44/p42'nin fosforilasyonunu gerçekleştirmesine karşın, cruzipainin p38'in aktivasyonunu indüklediği bildirilmiştir. Makrofajlar, *T. cruzi* ile temas etmeden önce cruzipain ile inkübe edildiğinde, MAPK fosforilasyonunun değiştiği ve JNK aktivasyonunun engellendiği bildirilmiştir. Ayrıca, p38 fosforilasyonunu indüklediğinden dolayı JNK inhibitörü olan SP600125'in *T. cruzi* enfeksiyonu üzerindeki rolü araştırılmıştır. Bu nedenle, öncesinde SP600125 uygulanan J774 hücreleri *T. cruzi* ile enfekte edilmiştir. Bu J774 hücre grubunda, Nitrik oksit (NO) üretiminde bir azalma ve arginaz I ekspresyonunda bir artış görülmüştür. Bir başka J774 hücre grubu, SP600125 ile ön işleme tabi tutulmuş ve *T. cruzi* ile enfekte edilmeden önce cruzipain ile inkübe edilmiştir. Bu ikinci grubunun NO üretiminde daha büyük bir azalma gösterdiği bildirilmiştir. Enfekte BALB/c farelerinden elde edilen adherent dalak hücrelerinde SP600125'in *ex vivo* olarak uygulanması parazitin çoğalmasını artırmasından dolayı, bu sonuçlar sonuçlar parazitin üremesi ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, cruzipain ve SP600125'in iNOS/arginaz dengesini değiştirerek *T.*

cruzi‘nin makrofajda hayatta kalmasını sağladığı bildirilmiştir (Stempin ve ark., 2008).

Gangneux ve ark. tarafından 2005 yılında yapılan ve fare, sıçan ve insan primer hepatosit kültürlerinde *L. donovani* suşu ile *ex vivo* enfeksiyon modelleri oluşturulan bir çalışmada *L. donovani* suşu ile hepatositlerde düşük bir seviyede enfeksiyon oluştuğu saptanmıştır. Elde edilen verilere göre, *L. donovani* suşunun hepatositleri enfekte edebildiği ancak büyük ölçüde çoğalmadığı ve deneysel koşullarda oluşan hafif enfeksiyonun hepatositlerin sınırlı hasarı ile sonuçlandığı belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre, hepatositlerin latent enfeksiyon sırasında rezervuar olabileceği bildirilmiştir (Gangneux ve ark., 2005).

Giese ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada olgun insan dendritik hücreleri ile karşılaştırıldığında olgunlaşmamış insan dendritik hücrelerinin enfekte olduğunda hücre içerisinde *T. gondii* parazitlerinin daha az üreme gösterdiği bildirilmiştir. Bu durum, yalnızca 11 günlük kültür sonrasında olgunlaşmamış insan dendritik hücrelerinde görülürken sitokin karışımı kullanılarak *ex vivo* olarak olgunlaştırılan insan dendritik hücrelerinde görülmemiştir. *T. gondii* ile enfekte olmuş olgunlaşmış insan dendritik hücrelerinde ekspresyon görülmemesine karşın, *T. gondii* ile enfekte olmuş olgunlaşmamış insan dendritik hücrelerinde ve monositlerde TNF-R2 ekspresyonu gerçekleşmiştir. Ayrıca, olgunlaşmamış insan dendritik hücrelerinde TNF-R2'nin antikorlar ile bloke edilmesinin toksoplasmostazı ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, olgunlaşmamış insan dendritik hücrelerinde ilk olarak tarif edilen spontan toksoplazmostaz için TNF-R2'nin işlevsel bir rolü bulunduğunu bildirilmektedir (Giese ve ark., 2004).

Yukarıda bahsi geçen bilimsel çalışmalarda kulanım alanı bulan *ex vivo* deney modelleri başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Ancak, *ex vivo* deney modellerinin oluşturulması için parazit virulansını koruyacak şekilde *ex vivo* olarak üretilebilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda, J774, Vero ve HeLa hücre hatları kullanılarak ex vivo kültivasyonu yapılan *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* suşlarının ardışık pasajlar uygulandığında virulans özelliklerini kaybetmediği ve enfeksiyon oranlarının arttığı gözlemlenmiştir.

Jabari ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan ve HeLa, Vero, RBK ve A549 hücre hatlarında *T. gondii* takizoitlerinin kültürünün karşılaştırıldığı bir çalışmada dört hattının kültürü yapılmıştır ve sırasıyla 5.000.000 takizoit ile enfekte edilmiştir.

Her kültürde takizoitlerin ve canlı konak hücrelerin sayısı ve ortamın pH'ı değerlendirilmiştir. En yüksek takizoit verimi HeLa hücre kültüründe görülmüştür. En düşük canlı konak hücre sayısı ve en düşük pH da HeLa hücre kültüründe görülmüştür. En düşük takizoit verimi, en yüksek canlı hücre ve en yüksek pH, Vero hücre kültüründe gözlenmiştir. Dolayısıyla HeLa ve Vero hücre hatlarının, sırasıyla *T. gondii* takizoitlerinin hızlı ve uzun vadeli üremeleri için uygun olduğu bildirilmiştir (Jabari ve ark., 2018).

Duran-Rehbein ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan bir derlemede çalışmanın amacına bakılmaksızın herhangi bir *T. cruzi* suşu veya izolatı ile enfekte hücre kültürlerinin olduğu makaleler için bilimsel dergi veri tabanları araştırılmıştır. Bu makalelerden hücre tipi, parazit genotipi, kültür koşulları ve enfeksiyon sonuçları ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. Chagas hastalığının patofizyolojisi karşılaştırıldığında analiz edilen çalışmalarda kullanılan deneysel koşullarla önemli farklılıklar tespit edilmiştir. *Trypanosoma cruzi, in vivo* olarak stromal hücreleri tercihli olarak enfekte ederken, birçok deney modelinde epitelyal hücre hatları kullanılmaktadır. Ayrıca, en yaygın olarak kullanılan parazit suşu (Tulahuen-TcVI), yalnızca Güney Amerika'nın güneyinde görülen CH kardiyomiyopatisi ile ilişkilendirilmiştir. Bu tutarsızlıkların üstesinden gelmek için CH'nın doğal seyrinin bilinen özellikleriyle ilişkili stromal hücre hatlarının ve parazit genotiplerinin kullanımı önerilmiştir. PubMed MeSH terms aracılığıyla, "*Trypanosoma cruzi*" ve "*T. cruzi*" terimleri ile birlikte aşağıda bahsi geçen hücre tiplerinin her biri ile yapılan bu bağımsız araştırmada elde edilen sonuçlara göre Vero hücreleri 177, HeLa hücreleri 103, PBMC hücreleri 44, LLCMK2 hücreleri 21, HUVEC hücreleri 5 ve HEp-2 hücreleri 2 makale içinde kullanılmıştır (Duran-Rehbein ve ark., 2014).

Evans ve ark. tarafından 1999 yılında yapılan ve sürekli olarak yeterli miktarda *T. gondii* takizoit üretimini sağlayabilen ve sürdürülebilir bir hücre hattı ve kültür yönteminin belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışmada HeLa, LLC ve Vero hücre hatları ve konvansiyonel hücre kültür flaskları, membran tabanlı kültür flaskları ve otomatik kültür sistemi olmak üzere üç hücre kültürü yöntemi kullanılmıştır. HeLa hücrelerinde takizoit üremesi, LLC hücrelerinden ($P<0.00005$) veya Vero hücrelerinden ($P<0.05$) elde edilenlerden önemli ölçüde daha yüksek verimine sahip olduğu bildirilmiştir. Membran tabanlı kültür flaskları ($6,15x10^6$ takizoit/ml) başlangıçta konvansiyonel hücre kültür flasklarından ($1\text{-}2x10^6$ takizoit/ml) daha

yüksek takizoit verimi göstermelerine karşın, sürdürülebilirliğinin düşük olduğu belirtilmiştir. Otomatik hücre kültür sistemi parazit kültürü için uygun bulunmamıştır. 25 cm^2'lik konvansiyonel hücre kültür flasklarında sürekli pasaj başarılı bulunmuştur ve takizoit yoğunluğu $1x10^6$ takizoit/ml olarak saptanmıştır ve 96-120 saatlik enfeksiyondan sonra 38 pasaj boyunca %90'ı aşan canlılık oranı ile üretilebildiği belirtilmiştir. HeLa hücrelerinde yapılan sürekli kültür sonucunda *T. gondii* üretiminin, düzenli canlı takizoit kaynağı olabileceği bildirilmiştir (Evans ve ark., 1999).

Çalışmamızda, J774, Vero ve HeLa hücre hatlarının 25 cm^2'lik hücre kültürü flasklarına ekimi yapılmıştır ve %5 CO_2 içeren 37°C'lik etüvde flask yüzeyini kaplayarak (konflüent) başarılı bir şekilde üremesi sağlanmıştır. J774, Vero ve HeLa hücre hatları, *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitleri ile başarılı bir şekilde 1:10 oranında enfekte edilmiştir ve *ex vivo* kültür yöntemi ile 3 kez pasajları yapılmıştır. Her pasaj sonrasında 8 odacıklı lamlarda enfeksiyon oranları Giemsa boyalı preparatların ışık mikroskobunda incelenmesi ile değerlendirilmiştir. *Trypanosoma cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* suşları, J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında *ex vivo* kültivasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde üretilmiştir. J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında *ex vivo* kültivasyonu yapılan *T. cruzi* ve *L. tropica* suşlarının her bir hücre hattındaki enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde J774 ve Vero hücre hatları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (*P>0,05, Tukey*), ancak J774 ve Hela hücre hatları arasında (*P<0,05, Tukey*) ve Vero ve HeLa hücre hatları arasında (*P<0,05, Tukey*) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. *T. gondii* suşunun her bir hücre hattındaki enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (*P>0,05, Tukey*). *Ex vivo* kültivasyon sonucunda her pasaj sonrasında hazırlanan Giemsa boyalı preparatların ışık mikroskobunda incelenmesi ile belirlenen enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde *T. cruzi* ve *L. tropica* suşlarının ürediği en iyi hücre hatları sırasıyla J774, Vero ve HeLa, *T. gondii* suşunun ürediği en iyi hücre hatları sırasıyla HeLa, J774 ve Vero olduğu görülmüştür.

Chagas hastalığının tedavisinde mevcut durumda BZN ve NFX olmak üzere iki ilaç kullanılmaktadır ve bu ilaçlar enfeksiyonun kronik fazında yüksek toksisite ve düşük etkinlik göstermektedir. Bu nedenle, parazite karşı daha etkili ve insanlar için

daha az toksik olan yeni ilaçlara büyük bir ihtiyaç vardır (Magalhaes Moreira ve ark., 2009).

Leishmaniasis tedavisinde, Meglumin antimoniat (Glucantime®) ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların uzun süre damar yoluyla verilmesi gerekmekte, toksik etkiler de gösterdikleri gibi etkileri de değişken olabilmektedir. Son yıllarda bu ilaçlara karşı özellikle Hindistan'ın kuzeyinde direncin arttığı bildirilmektedir (Muniaraj ve ark., 2012). Tedavide ikinci seçenek olan AmB'de damar yoluyla verilmektedir ve böbrekler üzerine belirgin toksisite göstermektedir. Hindistan'daki visseral leishmaniasise etkili olduğu gösterilen yeni ajanlar arasında yer alan L-AmB ise damar yoluyla kullanılmakta, ancak daha az sayıda enjeksiyon gerektirmekte ve daha iyi tolere edilmektedir, ancak tedavisi oldukça pahalıdır. Diğer yeni ajan olan Miltefosin ise oral yolla kullanılmaktadır ancak teratojen etki gösterebilmektedir (Berman, 2003).

Toxoplasmosis tedavisinde uzun tedavi sürelerine duyulan ihtiyaç ve hastalığın tekrarlama riski kısmen *T. gondii* doku kistlerine karşı etkinlik eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Daha etkili bir tedavi geliştirmenin zorlukları arasında toksisitenin azaltılması, beyinde ve gözde terapötik konsantrasyonlara ulaşılması, sürenin kısaltılması, konakçıdaki doku kistlerinin ortadan kaldırılması, hamilelikte güvenliği ve dünyanın fakir bölgelerinde kullanım için ucuz ve pratik bir formülasyon oluşturulması yer almaktadır. Son on yılda, toxoplasmosis tedavisi için yeni bileşiklerin belirlenmesi ve geliştirilmesinde önemli ilerleme kaydedilmiştir. Toxoplasmosis için yeniden tasarlanan klinik olarak kullanılan ilaçların aksine bu bileşikler, klinik öncesi geliştirme sırasında toxoplasmosise karşı etkinlik için optimize edilmiştir (Alday ve Doggett, 2017).

Chagas hastalığı, leishmaniasis ve toxoplasmosis tedavilerinde, güvenli, etkili ve ucuz ilaçlara ihtiyaç vardır. Bu nedenle tedavide kullanılabilecek yeni etken madde ve yeni ilaç adaylarının araştırılması gerekmektedir. Ancak, yeni ilaçların geliştirilmesi, yüksek başarısızlık oranı ile ilişkili olarak pahalı ve zaman alıcı bir süreçtir. Halihazırda onaylanmış ilaçlar için yeni tedavi amaçlarının tanımlanması, yeni ilaç keşfinden daha uygun ve ulaşılabilirdir. Auranofin, romatoid artrit tedavisi için onaylanmış bir ilaçtır ancak kanser, nörodejeneratif hastalıklar, HIV/AIDS, paraziter ve bakteriyel enfeksiyonlar dahil olmak üzere bir dizi başka hastalıkta potansiyel terapötik olarak kullanımı araştırılmaktadır. Daha önce insan kullanımı

için onaylanmış olan AF gibi ilaçlar, tanımlanan yeni tedavi amaçları için yeni ilaçların maliyetinin küçük bir bölümüyle klinik kullanıma sunulabilir (Roder ve Thomson, 2015).

Farklı uygulama alanlarında yeniden kullanıma girme potansiyeli bakımından giderek daha fazla ilgi gören AF, 1985 yılında romatoid artrit tedavisi için onay almış bir ilaçtır. İyi bilinen bir toksisite profiline sahiptir ve insan kullanımı için güvenli kabul edilir. Lineer bir düzenlemede fosfin ve tiol ligandları olan bir altın (I) bileşiğidir. Auranofin artık romatoid artrit için tercih edilen ilaç olmayabilir, ancak bazı kanserlerin, parazit enfeksiyonlarının, bakteriyel enfeksiyonların, HIV ve hatta Parkinson hastalığı ve Alzheimer gibi nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde yeni uygulamalar için potansiyele sahiptir (Roder ve Thomson, 2015).

Parazitler, sitozol ve mitokondride hidrojen peroksit ve ROS birikimini önlemek için tiyoredoksin redüktaz (TrxR), tiyoredoksin glutatyon redüktaz (TGR) sistemi ve tripanotiyon redüktaz (TypR) gibi redoks enzimlerini kullanarak hücresel redoks dengesini koruması gerekmektedir. Auranofin, TrxR, TGR veya TypR enzimlerinin etkisini baskılayarak, oksidatif stresin parazitlere zarar vermesini sağlamaktadır (Tejman-Yarden ve ark., 2013; Sharlow ve ark., 2014; Debnath ve ark., 2013; Ilari ve ark., 2012; Caroli ve ark., 2012; Watkins ve Eckmann, 2014). Auranofin ilaç etkinliği, *Giardia lamblia* (Debnath ve ark., 2013; Tejman-Yarden ve ark., 2013), *Entamoeba histolytica* (Debnath ve ark., 2013), *Trypanosoma brucei* (Lobanov ve ark., 2020), *L. infantum* (Ilari ve ark., 2012; Sharlow ve ark., 2014), *L. major* (Ilari ve ark., 2012), *Schistosoma mansoni* (Caroli ve ark., 2012; Bonilla ve ark., 2008; Kuntz ve ark., 2007), *Echinococcus granulosus* (Bonilla ve ark., 2008), *Toxoplasma gondii* (R. M. Andrade ve ark., 2014) ve *Plasmodium falciparum* (Sannella ve ark., 2008; Woodcock ve Woosley, 2008) gibi birçok parazit türü üzerinde araştırılmıştır.

Debnath ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada *E. histolytica* trofozitlerinin AF'e maruz kaldıklarında, TrxR inhibisyonu nedeniyle hidrojen peroksit ve ROS'na karşı daha duyarlı hale geldikleri bildirilmiştir (Debnath ve ark., 2013). Tejman-Yarden ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan ve AF'in metronidazole dirençli *G. lamblia* üzerindeki etkilerini araştıran başka bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Tejman-Yarden ve ark., 2013).

S. mansoni ve *E. granulosus* gibi platyhelmintler, ROS'un neden olduğu oksidatif stresi önlemek için TGR'yi kullanmaktadır. AF'in TGR aktivitesini inhibe ederek her iki organizmada daoksidatif stresi indükleyebileceği ve parazitin çoğalmasını inhibe edebileceği bildirilmektedir (Bonilla ve ark., 2008; Kuntz ve ark., 2007; Caroli ve ark., 2012).

Sannella ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada AF'in *P. falciparum*'daki TrxR aktivitesini inhibe ettiği ve yüksek oksidatif stres ile birlikte çoğalmasının baskılanmasına yol açtığı gösterilmiştir (Sannella ve ark., 2008).

Andrade ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışmada AF'in in vitro olarak paraziter replikasyonu ve *in vivo* olarak parazit yükünü azalttığı gösterilmiştir. Akut toksoplazmozis tavuk embriyo modelinde, 1 mg/kg tek doz AF embriyo ölümünü önleyebilmiştir. Bu çalışmanın yazarları, kesin moleküler hedefi henüz belirlememiş olsalar da, AF'in *T. gondii*'de redoks homeostazını korumak için kullanılan çoklu antioksidan enzimlerden birine etki ettiğini düşünmektedirler (R. M. Andrade ve ark., 2014).

Lobanov ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada, *Trypanosoma* ve *Leishmania* türlerinde selenoproteinlerin yüksek oranda korunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, AF'in *T. brucei*'nin kan dolaşımı ve prosiklik yaşam formları için oldukça toksik olduğu gösterilmiştir. Redoks selenoproteinlerinin baskılanmasının bu etkenlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Lobanov ve ark., 2020).

Ilari ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada, AF'in *L. infantum* ve *L. major* promastigotları üzerinde doza bağlı anti-proliferatif bir etkiye neden olabileceği bildirilmiştir ve AF'in *L. infantum* promastigotları üzerindeki IC_{50} değeri 9,68 µM, *L. major* promastigotları üzerindeki IC_{50} değeri 15,66 µM olarak bulunmuştur. Sharlow ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan ve AF'in *L. major* ve *L. amazonensis* üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmaların her ikisinde de, AF'in promastigotlarda apoptozis benzeri bir yanıta neden olarak TypR'yi inhibe edebilme yeteneğini araştırılmıştır (Ilari ve ark., 2012; Sharlow ve ark., 2014).

Auranofinin; 0,14 µM'lik bir IC_{50} ile *P. falciparum* (Sannella ve ark., 2008), 3,8 µM'lik bir IC_{50} ile *Taenia crassiceps* (Martínez-González ve ark., 2010), 0,28 µM'lik bir IC_{50} ile *Toxoplasma gondi* (R. M. Andrade ve ark., 2014), <1 µM'lik bir IC_{50} ile

Trypanosoma brucei (Lobanov ve ark., 2020), 9,68 µM'lik bir IC_{50} ile *L. infantum* (Ilari ve ark., 2012) ve 15,66 µM 'lik bir IC_{50} ile *L. major* (Ilari ve ark., 2012) gibi çeşitli insan parazitlerine karşı in vitro aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

Antiparaziter aktiviteye sahip yeni bileşiklerin belirlenmesindeki ana kriterlerden biri memeli hücrelerine karşı düşük toksisiteye sahip olması ve düşük dozlarda parazite karşı aktivite gösterebilmesidir (da Silva ve ark., 2017). Çalışmamızda, MTT yöntemi kullanılarak J774 hücrelerinde AF'in CC_{50} değeri 9 µM olarak değerlendirilmiştir ve sitotoksik aktivite göstermediği saptanmıştır. Kontrol ilaçları olarak kullanılan BZN, AmB ve PYR'in CC_{50} değerleri ise sırasıyla 563 µM, 15 µM ve 164 µM olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen CC_{50} değerleri kullanılarak SI değerleri hesaplanmıştır.

Chagas hastalığı ve leishmaniasisin vektörlerinde bulunan ve omurgalı konağa bulaştan sorumlu sırasıyla trypomastigot ve promastigot formları olduğu göz önüne alındığında, çalışmalarda kullanılan bileşiklerin bu formlar üzerine antiparaziter aktivitesinin araştırılması başlangıç noktası olarak kabul edilmektedir (da Silva ve ark., 2017). Çalışmamızda, 48 saatlik inkübasyon sonrasında uygulanan hemositometri ve celltiter-glo yöntemleri ile AF'in *T. cruzi*'ye karşı *in vitro* antitrypanosomal aktivitesi değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(trypomastigot)}$ değeri 3,8 µM ve *L. tropica*'ya karşı *in vitro* antileishmanial aktivitesi değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(promastigot)}$ değeri 5,4 µM olarak belirlenmiştir. Auranofinin *in vitro* antiparaziter aktivitesinin araştırılmasında kontrol ilaçları olarak kullanılan BZN'ün $IC_{50}^{(trypomastigot)}$ değeri 42 µM ve AmB'nin $IC_{50}^{(promastigot)}$ değeri 0,05 µM olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen IC_{50} değerleri kullanılarak SI değerleri hesaplanmıştır.

Hücre içi parazitler üzerine etkili yeni ilaçların araştırılmasında hem memeli hücrelerine karşı sitotoksik aktivitenin değerlendirilmesi hem de hastalığın klinik belirtilerinden sorumlu olan ve hücre içi yerleşim gösteren *T. cruzi* ve *L. tropica* amastigotları ve *T. gondii* takizoitleri üzerine antiparaziter aktivitelerinin araştırılması oldukça önemlidir (Aliança ve ark., 2017). Çalışmamızda, 8 odacıklı lamlarda 48 saatlik inkübasyon sonrasında hazırlanan giemsa boyalı preparatların 1000x büyütmede ışık mikroskobu ile incelenmesiyle AF'in *T. cruzi*'ye karşı *ex vivo* antitrypanosomal aktivitesi değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(amastigot)}$ değeri 3,4 µM, *L. tropica*'ya karşı *ex vivo* antileishmanial aktivitesi değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(amastigot)}$ değeri 4,9 µM ve *T. gondii*'ye karşı *ex vivo* antitoxoplasmal aktivitesi

değerlendirildiğinde $IC_{50}^{(takizoit)}$ değeri 2,1 µM olarak belirlenmiştir. Auranofinin *ex vivo* antiparaziter aktivitesinin araştırılmasında kontrol ilaçları olarak kullanılan BZN'ün $IC_{50}^{(amastigot)}$ değeri 50 µM, AmB'nin $IC_{50}^{(amastigot)}$ değeri 0,04 µM ve PYR'in $IC_{50}^{(takizoit)}$ değeri 65 µM olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen IC_{50} değerleri kullanılarak SI değerleri hesaplanmıştır.

Trypanosoma cruzi, L. tropica ve *T. gondii* parazitleri üzerine *in vitro* ve *ex vivo* aktivite sonuçları, ilaçsız kontrol grupları ile karşılaştırıldığında AF'in *T. cruzi*'ye karşı antitrypanosomal aktivite gösterdiği, *L. tropica*'ya karşı antileishmanial aktivite gösterdiği ve *T. gondii*'ye karşı antitoxoplasmal aktivite gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*$p<0,05$, Sidak*).

Seçicilik indeksi (SI), bir bileşik ya da ilacın antiparaziter etkinliğinin olup olmadığının önemli bir göstergesidir. Parazit çoğalmasını inhibe eden bileşiklerin *in vitro* ve *ex vivo* etkinlik çalışmalarında da seçicilik indeksi kullanılmaktadır ve kapsamlı olarak kabul edilen bir parametredir. Bu aşamada, SI değerini hesaplamak için sitotoksik aktivitenin göstergesi olan CC_{50} değerinin antiparaziter aktivitesinin hesaplanan IC_{50} değerine oranı olarak ifade edilmektedir (Badirzadeh ve ark., 2020).

Yapılan çalışmalarda, tıbbi bitki ekstreleri, bileşik ve ilaçların seçici antiparaziter aktivitelerini tanımlamak için çeşitli kriterler ifade edilmiştir. Örneğin; tıbbi bitki ekstreleri için SI değerinin Tempone ve ark. (Tempone ve ark., 2011) 1'den büyük, Arevalo-Lopez ve ark. (Arévalo-Lopéz ve ark., 2018) 2'den büyük ve Joshi ve ark. ise (Joshi ve ark., 2016) 3'ten büyük olduğunda seçici antiparaziter aktivite gösterdiğini ifade etmişlerdir. Bunun yanı sıra, sentetik türevler üzerinde çalışan araştırmacılar SI>6 olmasını iyi bir kriter olarak önermektedirler (Leal ve ark., 2013). Çalışmamızda AF için SI değerinin 1 ve üzeri olması durumunda antiparaziter aktivite gösterdiği kabul edilmiştir. AF'in SI değerleri ($SI=CC_{50}/IC_{50}$), *T. cruzi* trypomastigotları ve amastigotları için sırasıyla 2,4 ve 2,6 olarak, *L. tropica* promastigotları ve amastigotları için sırasıyla 1,7 ve 1,8 olarak ve *T. gondii* takizoitleri için 4,3 olarak saptanmıştır ve kontrol ilaçları olarak kullanılan BZN, AmB ve PYR'in SI değerleri ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Kontrol ilacı olarak kullanılan BZN ve AmB ilaçlarının SI değerleri (sırasıyla 11,26 ve 375) ile karşılaştırıldığında daha düşük SI değerlerine sahip olmalarına rağmen AF'in hücre içindeki parazite ulaşmadan önce karmaşık mekanizmaları aşarak nüfus edebilmesi gerekliliği dikkate alındığında, *T. cruzi* ve *L. tropica* parazitlerinin hücre içi yaşam

formu olan amastigotlar üzerine SI değerlerinin (sırasıyla 2,6 ve 1,8), trypomastigotlar ve promastigotların SI değerlerinden (sırasıyla 2,4 ve 1,7) daha fazla olması bileşiğin selektif olarak antitrypanosomal ve antileishmanial aktivite gösterdiğini vurgulamaktadır. Kontrol ilacı olarak kullanılan PYR'in SI değeri 2,5 olarak değerlendirilmesine karşın, AF'in hücre içi *T. gondii* takizoitleri için SI değeri 4,3 olarak saptanması bileşiğin selektif olarak antitoksoplasmal aktivite gösterdiğini vurgulamaktadır. Çalışmamızda, AF'in SI değerlerinin 1 ve üzeri olmasından dolayı *T. cruzi* trypomastigotları ve amastigotları üzerine antitrypanosomal, *L. tropica* promastigot ve amastigotları üzerine antileishmanial ve *T. gondii* takizoitleri üzerine antitoxoplasmal aktivite göstermesi projenin amacı olan farklı kullanım alanlarında onay almış ve kullanımda olan ilaçların yeni kullanım alanlarındaki etkinliğinin değerlendirilmesi ile birlikte antiparaziter aktivite gösteren ilaçların saptanması konusunda önemli ve ümit verici bir gelişme olarak değerlendirilmektedir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica ve *Toxoplasma gondii* parazitlerinin ex-vivo kültivasyonunun araştırılması kapsamında Türkiye'de ilk kez ex vivo kültür ile üretilen T. cruzi'nin yanısıra, L. *tropica* ve *T. gondii* suşları, J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında *ex vivo* kültivasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde üretilmiştir. *Ex vivo* kültivasyon sonucunda her pasaj sonrasında hazırlanan Giemsa boyalı preparatların ışık mikroskobunda incelenmesi ile belirlenen enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde *T. cruzi* ve *L. tropica* suşlarının ürediği en iyi hücre hatları sırasıyla J774, Vero ve HeLa, *T. gondii* suşunun ürediği en iyi hücre hatları sırasıyla HeLa, J774 ve Vero olduğu görülmüştür. Böylece, çalışmanın amacı olan *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitlerinin *ex vivo* kültivasyonu ile virulans özelliklerini kaybetmeden kısa sürede ve fazla miktarda çoğaltılması sağlanmıştır. *Ex vivo* kültür yöntemi ile *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii*, parazitlerinin çoğaltılması, tanı testleri ve yeni tanı kitleri geliştirilmesi, tanıda kullanılan yöntemlerin etkinliğinin değerlendirilmesi, yeni geliştirilen ilaç moleküllerininin taranması ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi, doğal kaynaklardan ve bitkilerden elde edilen ilaç adayı moleküllerin etkinliğinin araştırması, farklı kullanım alanlarındaki onaylı ilaçların antiparaziter etkinliğinin değerlendirilmesi, hastalıkların patogenezinin aydınlatılması, konak-parazit ilişkisinin aydınlatılması ve profilaktik ilaçların geliştirilmesi konularında yapılacak bir çok çalışmaya olanak sağlayacaktır. Bu çalışma, ülkemizdeki bilim insanlarının *T. cruzi, L. tropica* ve *T. gondii* parazitleri ile yapacakları *ex vivo* çalışmalar için önemli bir kapıyı aralamaktadır.

Bu çalışma; *T. cruzi* ve *T. gondii* parazitleri üzerine AF'in antiparaziter ilaç etkinliğinin Türkiye'de ilk kez araştırılması ve Türkiye'de görülen KL'den sorumlu en yaygın tür olan *L. tropica*'ya karşı dünyada ve Türkiye'de ilk kez AF'in antileishmanial bir ajan olarak değerlendirildiği bir çalışma olması bakımından oldukça büyük önem taşımaktadır.

Auranofinin antiparaziter ilaç etkinliğinin araştırıldığı bu çalışma kapsamında IC_{50}, CC_{50} ve SI verilerine göre sitotoksik aktivite göstermemesi ve *T. cruzi*

trypomastigot ve amastigotları, *L. tropica* promastigot ve amastigotları ve *T. gondii* takizoitleri üzerine antiparaziter aktivite göstermesi projenin amacı olan farklı kullanım alanlarında onay almış ve kullanımda olan ilaçların yeni kullanım alanlarındaki etkinliğinin değerlendirilmesi ile birlikte antiparaziter aktivite gösteren ilaçların saptanması konusunda önemli ve ümit verici bir gelişme olarak değerlendirilmektedir.

9. KAYNAKLAR

Acosta-Dávila A, A Acosta-Espinel, A Hernández-de-Los-Ríos ve ark. (2020) Human peripheral blood mononuclear cells as an ex vivo model to study the host parasite interaction in Toxoplasma gondii. Experimental Parasitology c. 219 Aralık, Academic Press Inc., doi:10.1016/j.exppara.2020.108020.

Alday H, J Doggett (2017) Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. Drug Design, Development and Therapy c. Volume11 Ocak, Dove Medical Press Ltd. ss. 273-293., doi:10.2147/DDDT.S60973.

Aliança AS dos S, AR Oliveira, APS Feitosa ve ark. (2017) In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. European Journal of Pharmaceutical Sciences c. 105 Temmuz, Elsevier B.V. ss. 1-10., doi:10.1016/j.ejps.2017.05.005.

Andrade RM, JD Chaparro, E Capparelli ve ark. (2014) Auranofin Is Highly Efficacious against Toxoplasma gondii In Vitro and in an In Vivo Experimental Model of Acute Toxoplasmosis. PLoS Neglected Tropical Diseases c. 8 sayı (7): ss. 1-8., doi:10.1371/journal.pntd.0002973.

Antczak M, K Dzitko, H Długońska (2016) Human toxoplasmosis–Searching for novel chemotherapeutics. Biomedicine and Pharmacotherapy, Elsevier Masson SAS, doi:10.1016/j.biopha.2016.05.041.

Antinori S, L Galimberti, R Bianco ve ark. (2017) Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. European Journal of Internal Medicine, Elsevier B.V., doi:10.1016/j.ejim.2017.05.001.

Arévalo-Lopéz D, N Nina, JC Ticona ve ark. (2018) Leishmanicidal and cytotoxic activity from plants used in Tacana traditional medicine (Bolivia). Journal of Ethnopharmacology, doi:10.1016/j.jep.2018.01.023.

Ayşe Okuyucu MS (2018) 1990-2015 yılları arasında Türkiye'ye yönelik uluslararası turizm hareketlerindeki değişim. Türk Coğrafya Dergisi c. 71 ss. 7-13., doi:10.17211/tcd.376358.

Badirzadeh A, M Heidari-Kharaji, V Fallah-Omrani ve ark. (2020)

Antileishmanial activity of urtica dioica extract against zoonotic cutaneous leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases, doi:10.1371/journal.pntd.0007843.

Bahia MT, LDF De Figueiredo Diniz, VCF Mosqueira (2014) Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. Expert Opinion on Investigational Drugs, Informa Healthcare, doi:10.1517/13543784.2014.922952.

Beder D, F Esenkaya Taşbent (2020) General Features and Laboratory Diagnosis of Toxoplasma gondii Infection. Turkiye parazitolojii dergisi c. 44 sayı (2):, NLM (Medline) ss. 94-101., doi:10.4274/tpd.galenos.2020.6634.

Berman J (2003) Current treatment approaches to leishmaniasis. Current Opinion in Infectious Diseases, doi:10.1097/00001432-200310000-00005.

Bern C (2011) Antitrypanosomal therapy for chronic chagas' disease. New England Journal of Medicine, Massachussetts Medical Society, doi:10.1056/NEJMct1014204.

Bern C (2012) Chagas disease in the immunosuppressed host. Current Opinion in Infectious Diseases, Curr Opin Infect Dis, doi:10.1097/QCO.0b013e328354f179.

Bern C (2015) Chagas' disease. New England Journal of Medicine c. 373 sayı (5): ss. 456-466., doi:10.1056/NEJMra1410150.

Bern C, S Kjos, MJ Yabsley ve ark. (2011) Trypanosoma cruzi and chagas' disease in the united states. Clinical Microbiology Reviews c. 24 sayı (4): ss. 655-681., doi:10.1128/CMR.00005-11.

Bern C, DL Martin, RH Gilman (2011) Acute and Congenital Chagas Disease. Advances in Parasitology, Academic Press, c. 75, ss. 19-47, doi:10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2.

Bern C, M Verastegui, RH Gilman ve ark. (2009) Congenital Trypanosoma cruzi Transmission in Santa Cruz, Bolivia . Clinical Infectious Diseases c. 49 sayı (11):, Oxford University Press (OUP) ss. 1667-1674., doi:10.1086/648070.

Bonilla M, A Denicola, S V. Novoselov ve ark. (2008) Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. Journal of Biological Chemistry c. 283 sayı (26):, J Biol Chem ss. 17898-17907., doi:10.1074/jbc.M710609200.

Burza S, SL Croft, M Boelaert (2018) Leishmaniasis. The Lancet, Lancet Publishing Group, doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2.

Caroli A, S Simeoni, R Lepore ve ark. (2012) Investigation of a potential mechanism for the inhibition of SmTGR by Auranofin and its implications for Plasmodium falciparum inhibition. Biochemical and Biophysical Research Communications c. 417 sayı (1):, Biochem Biophys Res Commun ss. 576-581., doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.009.

Carrio J, C Riera, M Gallego ve ark. (2001) In vitro susceptibility of Leishmania infantum to meglumine antimoniate in isolates from repeated leishmaniasis episodes in HIV-coinfected patients. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Castro-Sesquen YE, RH Gilman, V Yauri ve ark. (2011) Cavia porcellus as a model for experimental infection by trypanosoma cruzi. American Journal of Pathology c. 179 sayı (1):, Am J Pathol ss. 281-288., doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.043.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2020 Toxoplasmosis - Biology., (17.11.2020), https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html.

Cobb D, RB Smeltz (2012) Regulation of Proinflammatory Th17 Responses during Trypanosoma cruzi Infection by IL-12 Family Cytokines . The Journal of Immunology c. 188 sayı (8):, The American Association of Immunologists ss. 3766-3773., doi:10.4049/jimmunol.1103478.

Conley FK, KA Jenkins, JS Remington (1981) Toxoplasma gondii infection of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate toxoplasma in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. Human Pathology c. 12 sayı (8):, Hum Pathol ss. 690-698., doi:10.1016/S0046-8177(81)80170-0.

Coura JR, SL De Castro (2002) A critical review on chagas disease chemotherapy. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Fundacao Oswaldo Cruz, doi:10.1590/S0074-02762002000100001.

Croft SL, S Sundar, AH Fairlamb (2006) Drug resistance in leishmaniasis. Clinical Microbiology Reviews, doi:10.1128/CMR.19.1.111-126.2006.

D H Wegner RWR (1972a) Experience With Nifurtimox in Chronic Chagas' Infection. Preliminary Report. Arzneimittelforschung c. 22 sayı (9): ss. 1635-1641.

D H Wegner RWR (1972b) The Effect of Nifurtimox in Acute Chagas' Infection. Arzneimittelforschung c. 22 sayı (9): ss. 1624-1635.

da Silva AC, TAR dos Santos, IVB da Silva ve ark. (2017) Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against L. amazonensis. Experimental Parasitology c. 177 Haziran, Academic Press Inc. ss. 57-65., doi:10.1016/j.exppara.2017.04.003.

Dardé ML (2008) Toxoplasma gondii, "new" genotypes and virulence. Parasite, 2008, c. 15, ss. 366-371, doi:10.1051/parasite/2008153366.

Das VNR, A Ranjan, S Bimal ve ark. (2005) Magnitude of unresponsiveness to sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar. National Medical Journal of India c. 18 sayı (3): ss. 131-133.

Davidson RN (2017) Leishmaniasis. Infectious Diseases, Elsevier, ss. 1059-1064.e1, doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00123-4.

de Andrade JP, JAM Neto, AAV de Paola ve ark. (2011) I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of chagas' heart disease. Executive summary. Arquivos Brasileiros de Cardiologia c. 96 sayı (6):, Arq Bras Cardiol ss. 434-442., doi:10.1590/S0066-782X2011000600002.

de Barros Moreira Beltrão H, M de Paula Cerroni, DRC de Freitas ve ark. (2009) Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. Tropical Doctor c. 39 sayı (4):, Trop Doct ss. 231-232., doi:10.1258/td.2009.090035.

de Souza-Lima R de C, M das GV Barbosa, JR Coura ve ark. (2013) Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical c. 46 sayı (4):, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical ss. 510-514., doi:10.1590/0037-8682-1367-2013.

Debnath A, M Ndao, SL Reed (2013) Reprofiled drug targets ancient protozoans: Drug discovery for parasitic diarrheal diseases. Gut Microbes c. 4 sayı (1):, Gut Microbes, doi:10.4161/gmic.22596.

Diniz LDF, IS Caldas, PMDM Guedes ve ark. (2010) Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Antimicrobial Agents and Chemotherapy c. 54 sayı (7):, American Society for Microbiology ss. 2979-2986., doi:10.1128/AAC.01742-09.

Domínguez-Bernal G, M Jiménez, R Molina ve ark. (2014) Characterisation of the ex vivo virulence of Leishmania infantum isolates from Phlebotomus perniciosus

from an outbreak of human leishmaniosis in Madrid, Spain. Parasites and Vectors c. 7 sayı (1):, BioMed Central s. 499., doi:10.1186/s13071-014-0499-1.

Drugs for Neglected Diseases Initiative 2020 U.S. FDA approves Chemo Group's benznidazole to treat children with Chagas disease – DNDi., (31.03.2020), https://www.dndi.org/2017/media-centre/press-releases/fda-approves-benznidazole-chagas-children/.

Dubey JP (2013) The History and Life Cycle of Toxoplasma gondii. Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition, Elsevier Ltd., ss. 1-17, doi:10.1016/B978-0-12-396481-6.00001-5.

Duran-Rehbein GA, JC Vargas-Zambrano, A Cuéllar ve ark. (2014) Mammalian cellular culture models of trypanosoma cruzi infection: A review of the published literature. Parasite c. 21 sayı (c):, doi:10.1051/parasite/2014040.

Echeverria LE, CA Morillo (2019) American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infectious Disease Clinics of North America c. 33 sayı (1):, Elsevier Inc ss. 119-134., doi:10.1016/j.idc.2018.10.015.

Evans R, JMW Chatterton, D Ashburn ve ark. (1999) Cell-culture system for continuous production of Toxoplasma gondii tachyzoites. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases c. 18 sayı (12):, Springer Verlag ss. 879-884., doi:10.1007/s100960050423.

Faraut-Gambarelli F, R Piarroux, M Deniau ve ark. (1997) In vitro and in vivo resistance of Leishmania infantum to meglumine antimoniate: A study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy c. 41 sayı (4): ss. 827-830.

Flegr J, J Prandota, M Sovičková ve ark. (2014) Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. PLoS ONEed. Delmiro Fernandez-Reyes c. 9 sayı (3):, Public Library of Science s. e90203., doi:10.1371/journal.pone.0090203.

Forsyth CJ, S Hernandez, W Olmedo ve ark. (2016) Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. Clinical Infectious Diseases c. 63 sayı (8): ss. 1056-1062., doi:10.1093/cid/ciw477.

Gangneux JP, O Lemenand, Y Reinhard ve ark. (2005) In vitro and ex vivo permissivity of hepatocytes for Leishmania donovani. Journal of Eukaryotic Microbiology c. 52 sayı (6):, J Eukaryot Microbiol ss. 489-491., doi:10.1111/j.1550-

7408.2005.00055.x.

Giese A, S Stuhlsatz, W Däubener ve ark. (2004) Inhibition of the Growth of Toxoplasma gondii in Immature Human Dendritic Cells Is Dependent on the Expression of TNF-α Receptor 2 . The Journal of Immunology c. 173 sayı (5):, The American Association of Immunologists ss. 3366-3374., doi:10.4049/jimmunol.173.5.3366.

Gonzalez-Fajardo L, OL Fernández, D McMahon-Pratt ve ark. (2015) Ex Vivo Host and Parasite Response to Antileishmanial Drugs and Immunomodulators. PLOS Neglected Tropical Diseasesed. Ricardo Toshio Fujiwara c. 9 sayı (5):, Public Library of Science s. e0003820., doi:10.1371/journal.pntd.0003820.

Guarner J (2019) Chagas disease as example of a reemerging parasite. Seminars in Diagnostic Pathology c. 36 sayı (3):, Elsevier ss. 164-169., doi:10.1053/j.semdp.2019.04.008.

Gürüz A.Y. ÖMA (2007) Toxoplasmosis. Tıbbi Parazit Hastalıkları, ed. Özcel MA, İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, ss. 141-189.

Hadighi R, P Boucher, A Khamesipour ve ark. (2007) Glucantime-resistant Leishmania tropica isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs. Parasitology Research c. 101 sayı (5): ss. 1319-1322., doi:10.1007/s00436-007-0638-0.

Hadighi Ramtin, M Mohebali, P Boucher ve ark. (2006) Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous Leishmaniasis due to drug-resistant Leishmania tropica parasites. PLoS Medicine c. 3 sayı (5): ss. 659-667., doi:10.1371/journal.pmed.0030162.

Howe DK, LD Sibley (1995) Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. Journal of Infectious Diseases c. 172 sayı (6):, Oxford Academic ss. 1561-1566., doi:10.1093/infdis/172.6.1561.

Ilari A, P Baiocco, L Messori ve ark. (2012) A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: The X-ray structure of trypanothione reductase from Leishmania infantum in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. Amino Acids c. 42 sayı (2-3):, Amino Acids ss. 803-811., doi:10.1007/s00726-011-0997-9.

Jabari S, H Keshavarz, M Salimi ve ark. (2018) In vitro culture of Toxoplasma

gondii in Hela, Vero, RBK and A549 cell lines. Infezioni in Medicina c. 26 sayı (2):, EDIMES Edizioni Medico Scientifiche ss. 145-147., https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29932087/.

Joshi B, S Hendrickx, LB Magar ve ark. (2016) In vitro antileishmanial and antimalarial activity of selected plants of Nepal. Journal of Intercultural Ethnopharmacology, doi:10.5455/jice.20160728031236.

Kıllıck-Kendrıck R (1979) Biology of Leishmania in phlebotomine sandflies. Biology of the Kinetoplastida, ed. W. H. R. (William Hepburn Russell) Lumsden, D. A. Evans, 2. b., Academic Press, ss. 172-180.

Kratz JM (2019) Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. Acta Tropica, Elsevier B.V., doi:10.1016/j.actatropica.2019.105107.

Kuntz AN, E Davioud-Charvet, AA Sayed ve ark. (2007) Thioredoxin glutathione reductase from Schistosoma mansoni: An essential parasite enzyme and a key drug target. PLoS Medicine c. 4 sayı (6):, Public Library of Science ss. 1071-1086., doi:10.1371/journal.pmed.0040206.

Laibe S, S Ranque, C Curtillet ve ark. (2006) Timely diagnosis of disseminated toxoplasmosis by sputum examination. Journal of Clinical Microbiology c. 44 sayı (2):, American Society for Microbiology Journals ss. 646-648., doi:10.1128/JCM.44.2.646-648.2006.

Leal SM, DF Amado, V V. Kouznetsov ve ark. (2013) In Vitro antileishmanial, trypanocidal, and mammalian cell activities of diverse N,N'-dihetaryl substituted diamines and related compounds. Scientia Pharmaceutica, doi:10.3797/scipharm.1205-14.

Liesenfeld O, JG Montoya, S Kinney ve ark. (2001) Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of Toxoplasma gondii infection in pregnant women: Experience in a US reference laboratory. Journal of Infectious Diseases c. 183 sayı (8):, J Infect Dis ss. 1248-1253., doi:10.1086/319672.

Lira R, S Sundar, A Makharia ve ark. (1999) Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of Leishmania donovani. The Journal of infectious diseases c. 180 sayı (2): ss. 564-567., doi:10.1086/314896.

Liu Q, Z-D Wang, S-Y Huang ve ark. (2015) Diagnosis of toxoplasmosis and typing of Toxoplasma gondii., doi:10.1186/s13071-015-0902-6.

Lobanov A V, S Gromer, G Salinas ve ark. 2020 Selenium metabolism in Trypanosoma: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein., (20.03.2020), doi:10.1093/nar/gkl541.

Macedo AM, RP Oliveira, SDJ Pena (2002) Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. Expert Reviews in Molecular Medicine c. 4 sayı (5): ss. 1-16., doi:10.1017/s1462399402004118.

Magalhaes Moreira DR, A Lima Leite, RR Santos ve ark. (2009) Approaches for the Development of New Anti-Trypanosoma cruzi Agents. Current Drug Targets c. 10 sayı (3):, Bentham Science Publishers Ltd. ss. 212-231., doi:10.2174/138945009787581140.

Manne-Goehler J, CA Umeh, SP Montgomery ve ark. (2016) Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. PLoS Neglected Tropical Diseases c. 10 sayı (11):, Public Library of Science, doi:10.1371/journal.pntd.0005033.

Markell EK, DT John, WA Krotoski (1999) Markell and Voge's medical parasitology, 8. b., Saunders.

Martínez-González JJ, A Guevara-Flores, G Álvarez ve ark. (2010) In vitro killing action of auranofin on Taenia crassiceps metacestode (cysticerci) and inactivation of thioredoxin-glutathione reductase (TGR). Parasitology Research c. 107 sayı (1):, Parasitol Res ss. 227-231., doi:10.1007/s00436-010-1867-1.

Martinez-Perez A, FF Norman, B Monge-Maillo ve ark. (2014) An approach to the management of Trypanosoma cruzi infection (Chagas' disease) in immunocompromised patients. Expert Review of Anti-Infective Therapy, Expert Rev Anti Infect Ther, doi:10.1586/14787210.2014.880652.

Meinecke CK, J Schottelius, L Oskam ve ark. (1999) Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. Pediatrics c. 104 sayı (5):, doi:10.1542/peds.104.5.e65.

Messenger LA, RH Gilman, M Verastegui ve ark. (2017) Toward Improving Early Diagnosis of Congenital Chagas Disease in an Endemic Setting. Clinical Infectious Diseases ® c. 268 sayı (2): ss. 268-275., doi:10.1093/cid/cix277.

Messenger LA, MA Miles, C Bern (2015) Between a bug and a hard place: Trypanosoma cruzi genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. Expert Review of Anti-Infective Therapy, Taylor and Francis Ltd, doi:10.1586/14787210.2015.1056158.

Miman Ö. SG (2018) Temel Tıbbi Parazitolojied. Gülendame Saygı Özlem Miman, 1. b., İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık.

Montoya JG, O Liesenfeld (2004) Toxoplasmosis. Lancet, 12.06.2004, c. 363, ss. 1965-1976, doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X.

Muniaraj M, R Paramasivan, T Mariappan ve ark. (2012) The treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in India: No obvious signs of long-term success. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene c. 106 sayı (12):, Trans R Soc Trop Med Hyg ss. 770-772., doi:10.1016/j.trstmh.2012.08.010.

Negrette OS, MC Mora, MÁ Basombrío (2005) High prevalence of congenital Trypanosoma cruzi infection and family clustering in Salta, Argentina. Pediatrics c. 115 sayı (6):, Pediatrics, doi:10.1542/peds.2004-1732.

Oualha R, M Barhoumi, S Marzouki ve ark. (2019) Infection of human neutrophils with leishmania infantum or leishmania major strains triggers activation and differential cytokines release. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology c. 9 sayı (MAY):, Frontiers Media S.A. s. 153., doi:10.3389/fcimb.2019.00153.

Özbel Y, SO Toz (2007) Leishmaniasis. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları, ed. Ak M Özcel MA, Özbel Y, İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği, ss. 197-244.

Özbilgin A, G Gencoglan, V Tunali ve ark. (2020) Refugees at the Crossroads of Continents: A Molecular Approach for Cutaneous Leishmaniasis Among Refugees in Turkey. Acta Parasitologica c. 65 sayı (1):, Springer ss. 136-143., doi:10.2478/s11686-019-00139-4.

P.L. O, G P.J., G S. ve ark. (2005) Treatment options for visceral leishmaniasis: A systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. Lancet Infectious Diseases c. 5 sayı (12): ss. 763-774.

Paris L (2020) Toxoplasmosis. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, Elsevier, ss. 803-813, doi:10.1016/B978-0-323-55512-8.00106-X.

Passero LFD, J V. Sacomori, TY Tomokane ve ark. (2009) Ex vivo and in vivo biological behavior of Leishmania (Viannia) shawi. Parasitology Research c. 105 sayı (6):, Parasitol Res ss. 1741-1747., doi:10.1007/s00436-009-1614-7.

Pearson, R.D., De Queiroz Sousa A (2000) Leishmania species: Visceral (Kala-azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis. Principles and Practise of Infectious Diseaes, ed. R. Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, 5. b., New York: Churchill

Livingstone, ss. 2831-2845.

Perez CJ, AJ Lymbery, RCA Thompson (2015) Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. Trends in Parasitology, Elsevier Ltd, doi:10.1016/j.pt.2015.06.006.

Rassi A, A Rassi, JA Marin-Neto (2010) Chagas disease. The Lancet, Elsevier, doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

Rassi A, SG Rassi, A Rassi (2001) Sudden death in chagas' disease. Arquivos Brasileiros de Cardiologia c. 76 sayı (1):, Arquivos Brasileiros de Cardiologia ss. 86-96., doi:10.1590/s0066-782x2001000100008.

Ribeiro I, AM Sevcsik, F Alves ve ark. (2009) New, improved treatments for Chagas disease: From the R&D pipeline to the patients. PLoS Neglected Tropical Diseases, PLoS Negl Trop Dis, doi:10.1371/journal.pntd.0000484.

Roder C, MJ Thomson (2015) Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. Drugs in R and D c. 15 sayı (1): ss. 13-20., doi:10.1007/s40268-015-0083-y.

Saadatnia G, M Golkar (2012) A review on human toxoplasmosis. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, doi:10.3109/00365548.2012.693197.

Sannella AR, A Casini, C Gabbiani ve ark. (2008) New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metallodrug, exhibits potent antimalarial effects in vitro: Mechanistic and pharmacological implications. FEBS Letters c. 582 sayı (6):, FEBS Lett ss. 844-847., doi:10.1016/j.febslet.2008.02.028.

Scholtyseck E (1979) Fine structure of parasitic protozoa. An atlas of micrographs, drawings and diagrams. Fine structure of parasitic protozoa. An atlas of micrographs, drawings and diagrams., Berlin: Springer-Verlag.

Sharlow ER, S Leimgruber, S Murray ve ark. (2014) Auranofin is an apoptosis-simulating agent with in vitro and in vivo anti-leishmanial activity. ACS Chemical Biology c. 9 sayı (3):, American Chemical Society ss. 663-672., doi:10.1021/cb400800q.

Stempin CC, V V. Garrido, LR Dulgerian ve ark. (2008) Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of Trypanosoma cruzi in macrophages. Acta Tropica c. 106 sayı (2):, Acta Trop ss. 119-127., doi:10.1016/j.actatropica.2008.02.004.

Strasen J, T Williams, G Ertl ve ark. (2014) Epidemiology of chagas disease in

Europe: Many calculations, little knowledge. Clinical Research in Cardiology, Clin Res Cardiol, doi:10.1007/s00392-013-0613-y.

Sundar S, DK More, MK Singh ve ark. (2000) Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. Clinical Infectious Diseases c. 31 sayı (4): ss. 1104-1107., doi:10.1086/318121.

Tejman-Yarden N, Y Miyamoto, D Leitsch ve ark. (2013) A reprofiled drug, auranofin, is effective against metronidazole-resistant Giardia lamblia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy c. 57 sayı (5):, Antimicrob Agents Chemother ss. 2029-2035., doi:10.1128/AAC.01675-12.

Tempone AG, C Martins De Oliveira, RGS Berlinck (2011) Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. Planta Medica, doi:10.1055/s-0030-1250663.

Theel ES, BS Pritt (2016) Parasites. Microbiology Spectrum c. 4 sayı (4):, Microbiol Spectr s. 27., doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0013-2015.

Torrico F, C Alonso-Vega, E Suarez ve ark. (2004) Maternal Trypanosoma Cruzi Infection, Pregnancy Outcome, Morbidity, and Mortality of Congenitally Infected and Non-Infected Newborns in Bolivia. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene c. 70 sayı (2): ss. 201-209.

Töz Özensoy S, H Ertabaklar, Y Özbel (2007) Trypanosomiosis. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları, ed. M. A. Özcel, Yusuf Özbel, M. Ak, İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği, ss. 246-259.

Urbina JA (2009) New Advances in the Management of a Long-Neglected Disease. Clinical Infectious Diseases c. 49 sayı (11):, Oxford University Press (OUP) ss. 1685-1687., doi:10.1086/648073.

Urbina JA (2010) Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. Acta Tropica c. 115 sayı (1-2):, Acta Trop ss. 55-68., doi:10.1016/j.actatropica.2009.10.023.

Watkins RR, L Eckmann (2014) Treatment of giardiasis: Current status and future directions topical collection on intra-abdominal infections, hepatitis, and gastroenteritis. Current Infectious Disease Reports c. 16 sayı (2):, Current Science Ltd, doi:10.1007/s11908-014-0396-y.

WHO 2020 Leishmaniasis., (28.11.2020), https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1.

WHO (2016) Global distribution Chagas disease 2006-2010. Chagas disease (American trypanosomiasis)2010, http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf?ua=1.

Woodcock J, R Woosley (2008) The FDA Critical Path Initiative and Its Influence on New Drug Development. Annual Review of Medicine c. 59 sayı (1):, Annual Reviews ss. 1-12., doi:10.1146/annurev.med.59.090506.155819.

Ybañez RHD, AP Ybañez, Y Nishikawa (2020) Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Frontiers Media S.A., doi:10.3389/fcimb.2020.00204.

Zingales B (2018) Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta Tropica, Elsevier B.V., doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.017.

Chagas disease (American trypanosomiasis). 2018, (27.11.2018), http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis).

Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. (2017) WHO, World Health Organization.

WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis). 2020, (19.03.2020), https://www.who.int/chagas/en/.

WHO | Epidemiological situation. 2020, (14.03.2020), https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/.

10. EKLER

10.1. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARI

Evrak Tarih ve Sayısı: 04/01/2019-E.1305

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 28233352-302.08.01-
Konu : Bilimsel ve Eğitim Amaçlı

SBE TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüzün 28.12.2018 tarih ve 46/3 sayılı Yönetim Kurulu Toplantısında, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Programı 161355003 numaralı öğrencisi Ahmet YILDIRIM'ın, 20.12.2018 tarihinde yapılan ve kabul kararı verilen tez önerisi savunmasının kabul edilmesine ve tez konusunun, etik kurul onayı alınması kaydı ile **"Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica ve Toxoplasma gondii Parazitlerinin Exvivo Kültivasyonu ve Auranofin Antiparaziter İlaç Etkinliğinin Değerlendirilmesi"** olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Bilal-i Habeş GÜMÜŞ
Enstitü Müdürü V.

Adres:Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Uncubozköy Kampüsü Manisa
Telefon:(0 236) 2360989 Faks(0 236) 2382158
E-Posta:saglik.sekreterlik@cbu.edu.tr Elektronik Ağ:saglikbe.cbu.edu.tr

Bilgi İçin:Ayşe Ertik
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır

10.2. ETİK KURUL KARARI

T.C
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ					
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica ve Toxoplasma gondii Parazitlerinin Ex-vivo Kültivasyonu ve Auranofin Antiparaziter İlaç Etkinliğinin Değerlendirilmesi			
	VARSA ARAŞTIRMA PROTOKOL/PLAN KODU	----			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Kor YERELİ			
	ARAŞTIRMA EKİBİ ÜNVANI/ADI/SOYADI	Arş. Gör. Ahmet YILDIRIM			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Parazitoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MCBÜ Tıp Fak. Tıbbi Parazitoloji A.D.			
	DESTEKLEYİCİ	----			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	----			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Doktora tezi			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Hücre kültürleri ile yapılacak in vitro çalışmalar			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	16.05.2019 / 22351		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	------		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	Belge Adı		**Açıklama**	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		

KARAR BİLGİLERİ	
	Tarih: 20.05.2019
	Araştırma dosyası incelenmiş; araştırma başvuru formu ve gerekli ekleri ile birlikte uygulanmasına bilimsel ve Etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

10.3. TEZ ORİJİNALLİK RAPORU

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tez Adı: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania tropica* ve *Toxoplasma gondii* Parazitlerinin *Ex Vivo* Kültivasyonu ve Auranofin Antiparaziter İlaç Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Tezime ilişkin 28/12/2020 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9'dur.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

28/12/2020

Adı Soyadı : Ahmet YILDIRIM
Öğrenci No : 161355003
Anabilim Dalı : Tıbbi Parazitoloji
Programı : Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
Prof. Dr. Kor YERELİ

Açıklamalar

1-Tez Çalışması Orjinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.

2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)

3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.

Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.

4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)

5-***İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir;*** aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.

6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu" formuna işlenir.

7- ***Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.***

8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu'nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.

9-Turnitin Hakkında Bilgiler: http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ahmet	**Soyadı**	YILDIRIM
Doğum Yeri		**Doğum Tarihi**	
Uyruğu		**Tel**	0
E-mail	cbu.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi	2021
Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2014
Lise	Bilecik Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Araştırma Görevlisi	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi	2015 -

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi

Yabancı Dil Sınav Notu
YDS
82,5

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75,65	77,72	70,41

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Graph pad	İyi

EK: Diğer Bilimsel Faaliyetleri

Proje Çalışmaları

1. Pentavalent antimonial bilesiklere dirençli vahsi Leishmania izolatlarının leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçlara karsı in vitro dirençlerinin karsılastırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel arastırma projesi, Yürütücü: Özbilgin Ahmet, Arastırmacı: Çavus İbrahim, Arastırmacı: Kaya Tuğba, Arastırmacı: **Yıldırım Ahmet**, Arastırmacı: Harman Mehmet, 27/04/2017 - 19/04/2018 (ULUSAL)
2. Leishmaniasisde Gz-Pzr Testi için Sitokrom B (Cytb) Gen Bölgesinden Tür Ayrımı Yapabilen Primer ve Probların Tasarlanması: Pilot Çalısma, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel arastırma projesi, Yürütücü: Özbilgin Ahmet, Arastırmacı: Kaya Tuğba, Arastırmacı: Çavus İbrahim, Arastırmacı: Harman Mehmet, Arastırmacı: **Yıldırım Ahmet**, Arastırmacı: Gündüz Cumhur, Arastırmacı: Göker Bakiye, 08/02/2017-28/12/2017 (ULUSAL)
3. Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica ve Leishmania infantum Parazitlerinde Auranofin In Vitro Ilaç Etkinliginin Degerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel arastırma projesi, Yürütücü: Yereli Kor, Arastırmacı: Özbilgin Ahmet, Arastırmacı: **Yıldırım Ahmet**, 22/04/2019 (ULUSAL)
4. Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica ve Toxoplasma gondii Parazitlerinin Ex Vivo Kültivasyonu, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel arastırma projesi, Yürütücü: Yereli Kor, Arastırmacı: Özbilgin Ahmet, Arastırmacı: **Yıldırım Ahmet**, 17/09/2019 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
5. Türkiye'den İzole Edilen Leishmania tropica'ya Karşı Cynara scolymus Ekstrelerinin Antileishmanial Etkinliğinin Araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel arastırma projesi, Yürütücü: Balcıoğlu Cüneyt, Arastırmacı: Kayalar Hüsniye, Arastırmacı: **Yıldırım Ahmet**, Arastırmacı: Aksoy Tülay, Arastırmacı: Ceylan Şirin Sahra, Arastırmacı: Tayfur Eda, 08/07/2019 – 04/11/2020 (ULUSAL)

SCI-Expanded (Science Citation Index Expanded) tarafından taranan dergilerde yayımlanan makaleler

1. Özbilgin A, Gencoglan G, Tunali V, Çavuş İ, **Yıldırım A**, Gündüz C, Harman M. Refugees at the Crossroads of Continents: A Molecular Approach for Cutaneous Leishmaniasis Among Refugees in Turkey, Acta Parasitologica (2020) 65:136–143.
2. Özbilgin A, Çavuş İ, **Yıldırım A**, Gündüz C. Do The Rodents Have A Role İn Transmission Of Cutaneous Leishmaniasis İn Turkey?, Mikrobiyol Bul. 2018 Jul;52(3):259-272.
3. Özbilgin A, Çavuş İ, **Yıldırım A**, Gündüz C. 2016. The first Monkey Malaria in Turkey: A Case of *Plasmodium knowlesi*, Mikrobiyoloji Bülteni, 50(3), 484-490.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Özbilgin A, Çavuş İ, Kaya T, **Yıldırım A**, Harman M. Pentavalent Antimonial Bileşiklere Dirençli Vahşi Leishmania İzolatlarının Leishmaniasis Tedavisinde Kullanılan İlaçlara Karşı in vitro Dirençlerinin Karşılaştırılması. Turkiye Parazitol Derg 2020;44(1):12-6.
2. Özbilgin A, Göker Bağca B, Harman M, Çavuş İ, Kaya T, **Yıldırım A**, Gündüz C. Leishmaniasis'de gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için sitokrom B gen bölgesinden tür ayrımı yapabilen primer ve probların tasarlanması: Pilot çalışma, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(2):86-94.
3. Özbilgin A, Arserim S.K, Tünger Ö, Çavuş İ, **Yıldırım A**, Tunalı V, et al. First Presentation of the Complete Infection Cycle of Visceralizing Leishmania infantum/ donovani Hybrid Strain in Turkey: The Host, Reservoir and Vector Infect Dis Clin Microbiol 2020; 1: 8-15.
4. Çavuş İ, Kaya T, Aslan A, Özel Y, Çetin M, **Yıldırım A**, Özbilgin A. Türkiye'den Elde Edilen Leishmania İzolatlarının Kanlı ve Çikolata Agardaki Üremelerinin Değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2019;49(4):219-225.

5. Özbilgin A, Kaya T, Çavuş İ, **Yıldırım A**, Özpınar N. Comparison of Reproduction Densities in Different Liquid Media of Trypanosoma cruzi and Cryopreservation. Turkiye Parazitol Derg 2018; 42(4): 249-53.
6. Özbilgin A, Çavuş İ, **Yıldırım A**, Kaya T, Ertabaklar H. Leishmania tropica Üzerinde In vivo İlaç Etkinliğinin Değerlendirilmesi: Pilot Çalışma. Türkiye Parazitol Derg 2018; 42:11-19.
7. Özbilgin A, **Yıldırım A**, Çavuş İ, Baştemir S. 2015 "Manisa ili 3 Yerli Kutanöz Leishmaniasis Olgusu". Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 45(2); 103-108.

Uluslar arası; kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda özet metin olarak yayımlanan bildiri

1. **Yildirim A**, Cavus İ, Ceylan SS, Ozbilgin A. Ex-Vivo Studies On *Leishmania major* Strain Isolated From Turkey: Pilot Study, PS-308, 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Antalya.
2. Ahmet Özbilgin, **Ahmet Yıldırım**, İbrahim Çavuş. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası: 34 Yıllık Deneyimimiz, SS-177, 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Antalya.
3. Arserim SK, Balcıoğlu İC, Çavuş İ, **Yıldırım A**, Kaya T, Gündüz C, Özbilgin A. Manisa ilinde leishmaniasis endemik alanından toplanan kum sineği (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) türlerinde moleküler yöntemlerle Leishmania spp. aranması: pilot çalışma, SBO8-01, 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 25-29 Eylül 2017, Eskişehir.
4. Arserim SK, Kaya T, **Yıldırım A**, Limoncu ME, Cinbilgel İ, Çetin H, Balcıoğlu İC. Dorystaechas hastata (Lamiaceae) bitkisi uçucu yağının baş biti (Pediculus humanus capitis) üzerindeki repellent (kovucu) etkisi, P16, 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 25-29 Eylül 2017, Eskişehir.
5. Kaya T, **Yıldırım A**, Arserim SK, Limoncu ME, Cinbilgel İ, Çetin H, Balcıoğlu İC. Leishmania tropica promastigotları üzerine bazı Lamiaceae türlerinden elde edilen uçucu yağların in vitro anti-leishmanial etkinliğinin değerlendirilmesi: Pilot çalışma, P77, 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 25-29 Eylül 2017, Eskişehir.

6. **Yıldırım A**, Kilimcioğlu AA, Balcıoğlu İC, Girginkardeşler N, Yereli K. 2011-2016 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na kistik ekinokokkozis şüphesi ile gönderilen serum örneklerinin değerlendirilmesi, P114, 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 25-29 Eylül 2017, Eskişehir.
7. Ozbilgin A, Arserim SK, Tunger O, Cavus I, **Yildirim A**, Tunali V, Gunduz C. Leishmaniasis In Turkey: First Clinical Isolation Of Leishmania infantum / Leishmania donovani Hybrid Strain From A Human VL And Canine Leishmaniasis Case And DNA Obtained From Sand Flies (Phlebotomus Tobbi) In The Nature, Poster, 6th World Congress on Leishmaniasis, Toledo, Spain, 16th-20th May 2017.
8. Ozbilgin A, Gencoglu G, Tunali V, Cavus I, **Yildirim A**, Gunduz C, Harman M. Cutaneous Leishmaniasis Among Refugees In Turkey: Clinical Findings, Diagnosis And Genotypes, Poster, 6th World Congress on Leishmaniasis, Toledo, Spain, 16th-20th May 2017.
9. Ozbilgin A, Zeyrek FY, Culha G, Ertabaklar H, Toz S, Kocagoz T, Karatuna O, Ostan Ural I, Cavus I, Tunali V, Yesilova Y, Akyar I, **Yildirim A**, Ozbel Y, Gunduz C, Harman M. Pentavalent Antimonial Resistant CL Cases In Turkey, Clinic, Laboratory Diagnosis, And Genotypes: Case Series, Poster, 6th World Congress on Leishmaniasis, Toledo, Spain, 16th-20th May 2017.
10. Zorbozan O, Harman M, Evren V, Erdogan A, Kilavuz A, Cavus I, **Yildirim A**, Yilmaz O, Ozbilgin A, Turgay N. A New Ex Vivo Model: Infecting Glial Cells With Antimony-Resistant L. tropica, Poster, 6th World Congress on Leishmaniasis, Toledo, Spain, 16th-20th May 2017.
11. Ozbilgin A, Zorbozan O, Tunali V, **Yildirim A**, Cavus I, Gunduz C, Turgay N. Threat Of Four Exotic Leishmania Species To The Europe, Poster, 6th World Congress on Leishmaniasis, Toledo, Spain, 16th-20th May 2017.
12. Ozbilgin A, Toz S, Okudan F, Topal SG, Uzun S, Harman M, Ertabaklar H, Gunduz C, Ostan I, Kurt O, Ertug S, Erat A, Gungor D, Kayabası C, Cavus I, **Yildirim A**, Karakus M, Olgen K, Ozbel Y. Cutaneous Leishmaniasis In Turkey: Comparison Of Diagnostic Methods And Geographical Distribution Of Leishmania Species In Autochthonous Cases, Poster, 6th World Congress on Leishmaniasis, Toledo, Spain, 16th-20th May 2017.

13. Özbilgin A., Tunalı V., Zorbozan O., **Yıldırım A.**, Çavuş İ., Gündüz C., Turgay N. Knock Knock Knockin' On Europe's Door; Are *Leishmania donovani* And *Leishmania major* At Europe's Doorstep?, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya.
14. Özbilgin A., Arserim SK., Tunger Ö., Cavus İ., **Yıldırım A.**, Tunalı V., Gündüz C. Clinical Symptoms Of Infection With *Leishmania infantum/donovani* Hybrid In Man And Dog And Its Natural Vector In Turkey, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya.
15. Özbilgin A., Çavuş İ., **Yıldırım A.**, Gündüz C. Do The Rodents Have A Role In Transmission Of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis In Turkey?, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya.

Uluslar arası; kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda tam metin olarak yayımlanan bildiri

1. **Yıldırım A**, Özbilgin A. Sıtma Olgusunda Doğru Laboratuvar Tanısının Önemi, 21. Parazitoloji Kongresi, 28 Eylül - 3 Ekim 2019, Çeşme - İzmir.
2. **Yıldırım A**, Çavuş İ, Yereli K, Özbilgin A. Trypanosoma cruzi Üzerine Ex vivo Çalışmalar: Pilot Çalışma, 21. Parazitoloji Kongresi, 28 Eylül - 3 Ekim 2019, Çeşme - İzmir.

Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda yayımlanmamış poster ya da sözlü sunu

1. Özbilgin A., **Yıldırım A.**, Arkalı AA., Kuru E., Baştemir S., Çavuş İ. Leishmania tropica amastigotlarının kryoprezervasyonu ve bu amastigotlar ile deney hayvanı modeli oluşturulması: Ön çalışma, PS430, 3.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 18-22 Kasım 2015, Antalya.
2. Özbilgin A., Çavuş İ., **Yıldırım A.**, Gündüz C. *Leishmania donovani* ve *Leishmania major* Avrupa'nın Kapısına mı Dayandı?, PS431, 3.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 18-22 Kasım 2015, Antalya.
3. Özbilgin A., Çavuş İ., **Yıldırım A.**, Gündüz C. Türkiye'de *Leishmania tropica*'nın Etkeni Olduğu Kutanöz Leishmaniasis Kriptik Olarak Seyredebilir Mi?, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya.

4. Baştemir S., Çavuş İ., **Yıldırım A.**, Tunalı V., Arkalı AA., Yereli K., Özbilgin A. Parazit Bankacılığında *Trichomonas vaginalis*'in Farklı Kriyoprotektanlar İle Kriyoprezervasyonu, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya.
5. Özbilgin A., Zorbozan O., **Yıldırım A.**, Tunalı V., Çavuş İ., Gündüz C., Tünger Ö., Turgay N. Türkiye'ye Dışarıdan Gelen *Plasmodium falciparum* Sıtması: Laboratuvar Ve Klinik Bulgular, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya.

Görev Alınan Bilimsel Toplantılar

1. **Yıldırım A.** Zoonotik maymun sıtması: Plasmodium knowlesii, Sıradışı Olgularla Parazitoloji, Yuvarlak Masa, 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 25-29 Eylül 2017, Eskişehir.

Ödüller

1. Çavuş İ., **Yıldırım A**., Tunalı V., Özbilgin A. 2016. Türkiye'de saha şartlarında Leishmaniasis tanısında kullanılan zenginleştirilmiş besiyeri hazırlanması, 37.Türk Mikrobiyoloji Kongresi 16-20 Kasım 2016 Antalya, 1.Geleneksel TMC Film Festivali video ödülü
2. **Yıldırım A**., Çavuş İ., Tunalı V., Özbilgin A. 2016. Parazitlerin Kriyoprezervasyonu ve Arşivlenmesi (Parazit Bankası), 37.Türk Mikrobiyoloji Kongresi 16-20 Kasım 2016 Antalya, 1.Geleneksel TMC Film Festivali video ödülü
3. **Yıldırım A**., Kaya T., Çavuş İ., Aslan A., Özbilgin A. 2016. Leishmaniasis Direnç Testleri, 37.Türk Mikrobiyoloji Kongresi 16-20 Kasım 2016 Antalya, 1.Geleneksel TMC Film Festivali video ödülü
4. Özbilgin A., Tunalı V., Zorbozan O., **Yıldırım A**., Çavuş İ., Gündüz C., Turgay N. 2016. Knock Knock Knockin'on Europe's door; Are Leishmania donovani and Leishmania major at Europe's doorstep?, International Symposium on Parasitic Zoonoses, 18-19 Kasım 2016 Antalya, Best Poster Honorable Mention
5. Özbilgin A., Arserim S.K., Tunger Ö., Çavuş İ., **Yıldırım A**., Tunalı V., Gündüz C. 2016. Clinical Symptoms of Infection with Leishmania infantum/donovani

Hybrid in Man and Dog and Its Natural Vector in Turkey, International Symposium on Parasitic Zoonoses, 18-19 Kasım 2016 Antalya, Best Oral Presentation Award 2nd Place