

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MUKOKUTANÖZ LEİSHMANİASİS ETKENİ LEİSHMANİA
MAJORA KARŞI ANTİMONİYAL İLAÇ VE CURCUMA LONGA
KAYNAKLI EKSTRASELÜLER VEZİKÜLLERİN
ANTİLEİSHMANİYAL ETKİNLİĞİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ
SİSTEMLERİNDE İNCELENMESİ**

Kübra KARADAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Ocak, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MUKOKUTANÖZ LEİSHMANİASİS ETKENİ LEİSHMANİA MAJORA
KARŞI ANTİMONİYAL İLAÇ VE CURCUMA LONGA KAYNAKLI
EKSTRASELÜLER VEZİKÜLLERİN ANTİLEİSHMANİYAL
ETKİNLİĞİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ SİSTEMLERİNDE İNCELENMESİ**

Kübra KARADAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 19.01.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek BALIK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. E.Ş. Nazlı ARDA, Üye
İstanbul Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Mukokutanöz Leishmaniasis Etkeni Leishmania Major'a Karşı Antimonial İlaç Ve Curcuma Longa Kaynaklı Ekstraselüler Veziküllerin Antileishmanial Etkinliğinin Hücre Kültürü Sistemlerinde İncelenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Kübra KARADAŞ

İmza

Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana her zaman destek olan, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarım sırasında bana her zaman yol gösteren Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarının kurucuları değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e ve Sn. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, araştırmalarımnda bilgi ve deneyimleriyle bana her zaman yol gösteren danışman hocam Sn. Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a,

Ayrıca bölümümüzün kurucusu Prof.Dr. Mustafa AKDESTE'ye, bölümümüzün kurucu üyeleri Prof.Dr. Huriye KUZU'ya ve Prof.Dr. Zeynep AKDESTE'ye

Tezimin değerlendirilmesinde katkılarını esirgemeyen jüri üyelerim Sn. Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK'a ve Sn. Prof.Dr. E.Ş. Nazlı ARDA'ya

Tez çalışmam sırasında sentezlenen nanopartiküllerin SEM görüntülerinin alınmasındaki katkılarından dolayı ArelPOTKAM - Polimer Teknolojiler ve Kompozit Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanı Uzm. Demet SEZGİN MANSUROĞLU'na,

Tez deneylerimin yapılması sırasında bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sahar DİNPARVAR, Tural SAFAROV, Bükre KIRAN, Etkin PARLAR, Buşra AKGÜL, Umut OĞLUOĞLU, Murat IHLAMUR ve tüm Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarı öğrencilerine,

Beni her zaman ve her konuda destekleyen, karşılıksız emekleri ve sevgileri için annem Nejla ÜNAL'a, babam Erdal ÜNAL'a ve kardeşim Merve ÜNAL'a,

Bana olan güvenini ve desteğini her zaman hissettiğim eşim Uğur KARADAŞ'a

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Kübra KARADAŞ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	4
1.3 Hipotez.....	5
2 GENEL BİLGİLER	7
2.1 <i>Leishmania</i>	7
2.1.1 Taksonomi.....	7
2.1.2 Parazit Morfolojisi.....	7
2.1.3 Hayat Döngüsü	8
2.1.4 Epidemiyoloji	9
2.1.5 Klinik Formlar.....	11
2.1.6 Tanı	14
2.1.7 Tedavi.....	15
2.1.8 Leishmaniasis'e Karşı Bitkisel Bileşiklerin Kullanımı.....	18
2.2 Ekstraselüler Veziküller	20
2.2.1 Eksozomlar	21
2.2.2 Ektozomlar	22
2.2.3 Apoptotik Cisimcikler	23
2.2.4 Ekstraselüler Veziküllerin İzolasyonu	23
2.2.5 Ekstraselüler Veziküllerin Karakterizasyonu	26
2.2.6 Ekstraselüler Vezikül Kaynakları	28

2.2.7 Ekstraselüler Veziküllerin Terapötik Uygulamaları	31
3 MATERYAL VE METOD	33
3.1 Materyal.....	33
3.1.1 Ekipman	33
3.1.2 Kimyasallar	34
3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon, Besiyerleri ve Kimyasalların Hazırlanması	35
3.1.4 Deneylerde Kullanılan Hücreler	36
3.2 Metod.....	37
3.2.1 Hücre Kültürü Metodları	37
3.2.2 Ekstraselüler Veziküllerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	40
3.2.3 Hazırlanan Formülasyonların Hücre Hatları üzerinde MTT Yöntemi ile Toksisitelerinin Tayini ve Toksik Olmayan Konsantrasyonların Belirlenmesi	42
3.2.4 Hazırlanan Formülasyonların <i>Leishmania major</i> Amastigot ve Promastigotları Üzerindeki Antileishmanial Etkinliklerinin İncelenmesi.....	42
4 DENEYSEL SONUÇLAR	47
4.1 J774 Makrofaj ve L929 Fibroblast Hücrelerinin Kültürü	47
4.2 Leishmania Kültürü	48
4.3 Ekstraselüler Veziküllerin İzolasyonu.....	49
4.4 Ekstraselüler Veziküllerin Karakterizasyonu.....	50
4.4.1 Ekstraselüler Veziküllerin Boyut Analizi	50
4.4.2 Ekstraselüler Veziküllerin Protein Miktarının Belirlenmesi	51
4.4.3 Ekstraselüler Veziküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu	52
4.4.4 Ekstraselüler Veziküllerin Yüzey Belirteçlerinin Akış Sitometrik Analizi	53
4.5 Hazırlanan Ekstraselüler Veziküllerin Hücre Hatları Üzerinde Etkinliğinin <i>in vitro</i> İncelenmesi.....	55
4.5.1 Ekstraselüler Veziküller, Ekstrakt ve Glukantim'in J774 Makrofaj Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitelerinin Belirlenmesi.....	55
4.5.2 Ekstraselüler Vezikül -Glukantim Kombinasyonlarının <i>L. major</i> Promastigotlarının Proliferasyonu Üzerindeki Antileishmanial Etkisi	58

4.5.3 Ekstraselüler Vezikül -Glukantim Kombinasyonlarının <i>L.major</i> Promastigotlarının Canlılığı Üzerindeki Antileishmanial Etkisi.....	61
4.5.4 Ekstraselüler Vezikül- Glukantim Kombinasyonlarının <i>L.major</i> Amastigotlarının Enfeksiyon İndeksi Üzerindeki Etkisi.....	64
4.5.5 Ekstraselüler Vezikül- Glukantim Kombinasyonlarının <i>L.major</i> Amastigotlarının Proliferasyonu Üzerindeki Antileishmanial Etkinliğinin Mikro Kültür Yöntemiyle Gösterilmesi.....	66
4.5.6 Glukantim ve Ekstraselüler Vezikül Kombinasyonlarının <i>L.major</i> Amastigotlarının Metabolik Aktivitesi Üzerindeki Antileishmanial Etkisi	67
4.5.7 Nanopartikül-Glukantim Kombinasyonlarının Makrofajların Nitrik Oksit Üretimleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi.....	67
 5 SONUÇ VE ÖNERİLER	 69
 KAYNAKÇA	 77
 TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	 86

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
ϵ	Epsilon
g	Gram
kDa	Kilo dalton
L	Litre
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
cm	Santimetre
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AmfB	Amfoterisin B
ATPS	Sulu İkili Faz Sistemi
BSA	Bovine Serum Albümin
CL	Kutanöz Leishmaniasis
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DCL	Diffüz Kutanöz Leishmaniasis
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
EMT	Epitelyalden Mezankimale Geçiş
EV	Ekstraselüler Veziküller
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
GPC	Jel Filtrasyon Kromatografisi
HSP	Isı Şoku Proteini
ILV	Intraluminal Veziküller
MKY	Mikro Kültür Yöntemi
MCL	Mukokutanöz Leishmaniassis
MHC	Major Histouyumluluk Kompleksi
MVB	Multiveziküler Cisimcikler
NTA	Nanopartikül Takip Analizi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKDL	Post Kala- azar Dermal Leishmaniasis
PM	Plazma Membranı
RNA	Ribonükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
VL	Visseral Leishmaniasis

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 <i>Leishmania</i> parazitlerinin promastigot ve amastigot formu	8
Şekil 2. 2 <i>Leishmania</i> parazitlerinin yaşam döngüsü	9
Şekil 2. 3 Dünya genelinde Kutanöz Leishmaniasis görülen bölgeler	10
Şekil 2. 4 Dünya genelinde Visseral Leishmaniasis görülen bölgeler	11
Şekil 2. 5 Kutanöz Leishmaniasis'in sebep olduğu cilt lezyonları.....	12
Şekil 2. 6 Mukokutanöz Leishmaniasis'in sebep olduğu cilt lezyonları.....	13
Şekil 2. 7 Visseral Leishmaniasis sebebiyle oluşan belirtiler	14
Şekil 2. 8 <i>Curcuma longa</i> bitkisi	19
Şekil 2. 9 Hücrelerden salınan eksozom, ektozom ve apoptotik cisimlerin gösterimi.....	21
Şekil 2. 10 Eksozomların (a) kaynağı ve (b) önemli bileşenleri	22
Şekil 2. 11 Bitkisel kaynaklı ekstraselüler veziküllerin tedavide kullanım alanları	31
Şekil 3. 1 Thoma lamı görüntüsü	38
Şekil 4. 1 L929 Fibroblast hücrelerinin görüntüsü.....	47
Şekil 4. 2 J774 Makrofaj hücrelerinin görüntüsü	48
Şekil 4. 3 <i>Leishmania</i> kültürü T25 ve T75'lik flasklar.....	48
Şekil 4. 4 <i>Leishmania</i> parazitlerinin görüntüsü	49
Şekil 4. 5 <i>Curcuma longa</i> bitkisinin izolasyon adımları	50
Şekil 4. 6 <i>Curcuma longa</i> kaynaklı ekstraselüler veziküllerin Zeta- Sizer boyut dağılım grafikleri	51
Şekil 4. 7 BSA Standart Grafiği	51
Şekil 4. 8 <i>Curcuma longa</i> kaynaklı ekstraselüler veziküllerin SEM görüntüsü (40.000X).....	52
Şekil 4. 9 <i>Curcuma longa</i> kaynaklı ekstraselüler veziküllerin SEM görüntüsü(20.000X).....	53
Şekil 4. 10 Ekstraselüler Veziküllerin CD9 Yüzey Belirtecinin Akış Sitometrisi Analizi	54
Şekil 4. 11 Ekstraselüler Veziküllerin CD63 Yüzey Belirtecinin Akış Sitometrisi Analizi	54
Şekil 4. 12 Ekstraselüler Veziküllerin CD81 Yüzey Belirtecinin Akış Sitometrisi Analizi	55
Şekil 4. 13 Ekstraselüler vezikül, ekstrakt ve Glukantim'in J774 makrofaj hücre hattı üzerindeki sitotoksiste analizi.....	56

Şekil 4. 14	Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının J774 makrofaj hücre hattı üzerindeki sitotoksosite analizi	57
Şekil 4. 15	Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının L929 fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksosite analizi	58
Şekil 4. 16	Formülasyonların <i>L. major</i> promastigot kültüründe pH' a olan etkisi (kontrol ve G50V200).....	59
Şekil 4. 17	Ekstraselüler vezikül ve Glukantim'in <i>L. major</i> promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki etkisi	59
Şekil 4. 18	Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının <i>L. major</i> promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki 48. saatteki etkinliği...	60
Şekil 4. 19	Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının <i>L. major</i> promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki 96. saatteki etkinliği...	61
Şekil 4. 20	Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının <i>L. major</i> promastigotlarının canlılığı üzerindeki 48. saatteki etkinliği.....	62
Şekil 4. 21	Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının <i>L. major</i> promastigotlarının canlılığı üzerindeki 96. saatteki etkinliği.....	63
Şekil 4. 22	Farklı formülasyonların <i>L. major</i> promastigotları üzerindeki etkileri	64
Şekil 4. 23	Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının <i>L. major</i> amastigotlarının enfeksiyon indeksi üzerindeki etkisi.....	65
Şekil 4. 24	Ekstraselüler Vezikül- Glukantim Kombinasyonlarının <i>L. major</i> Amastigotlarının Proliferasyonu Üzerindeki Antileishmanial Etkinliğinin Mikrokapiler tüpte görüntüsü (a) kontrol (b) g50v200...	66
Şekil 4. 25	Ekstraselüler Vezikül ve Glukantim Kombinasyonlarının <i>L. major</i> Amastigotlarının Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	67
Şekil 4. 26	Ekstraselüler Vezikül ve Glukantim Kombinasyonlarının J774 makrofaj hücre hattının NO üretimi Üzerindeki Etkisi.....	68

TABLO LİSTESİ

Tablo 4. 1 Ekstaselüler vezikül ve glukantim kombinasyonları.....	57
Tablo 4. 2 Ekstraselüler vezikül-glukantim kombinasyonlarının <i>L. major</i> amastigotlarının enfeksiyon indeksi üzerindeki etkisi.....	65
Tablo 4. 3 Formülasyonların <i>L. major</i> promastigot yoğunluğuna etkisi	65

Mukokutanöz Leishmaniasis Etkeni Leishmania Major'a Karşı Antimonial İlaç ve Curcuma Longa Kaynaklı Ekstraselüler Veziküllerin Antileishmanial Etkinliğinin Hücre Kültürü Sistemlerinde İncelenmesi

Kübra KARADAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, Leishmaniasis dünya genelinde sıtmanın ardından en sık görülen parazitik hastalık olup, dünya üzerinde milyonlarca insanın hayatını tehdit etmektedir. Tedavide kullanılan ilaçların toksik özellik göstermesi, ciddi yan etkilere sebep olması ve parazitlerde bu ilaçlara karşı direnç gelişimi tedavi uygulamalarının en büyük dezavantajlarıdır. Bu nedenle, günümüzde hastalığa karşı alternatif tedavi yaklaşımları geliştirmek için çalışmalar devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda bitkilerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin pek çok hastalığın tedavisinde alternatif bir yaklaşım oluşturduğu gösterilmiştir. *Curcuma longa* bitkisinin antiinflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal etkinliklerine yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak *Curcuma longa* kaynaklı ekstraselüler veziküllerin tek başına veya antileishmanial ilaçlarla kombinasyon halinde antileishmanial etkinliğinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında *Curcuma longa* kaynaklı ekstraselüler veziküllerin tek başlarına ve Leishmaniasis tedavisinde altın standart olarak kullanılan Glukantim isimli ilaçla kombinasyon halinde *L.major*'ün promastigot ve amastigot formlarına karşı *in vitro* antileishmanial etkinliklerinin

incelenmesi amaçlanmıştır. Hedefe ulaşmak için öncelikle *Curcuma longa* bitkisinden ekstraselüler veziküllerin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra hazırlanan tüm formülasyonların J774 ve L929 hücreleri üzerindeki non-toksik konsantrasyonları belirlendi. Bu konsantrasyonlar kullanılarak hazırlanan ekstraselüler vezikül-ilaç kombinasyonlarını içeren formülasyonların *L. major* promastigot ve amastigot-makrofaj kültüründeki antileishmanial aktiviteleri incelendi. Aynı zamanda kombinasyonlara maruz kalan makrofajların ürettikleri NO seviyeleri Griess reaksiyonu ile ölçüldü. Deneysel sonuçlara göre, ekstraselüler veziküllerin ortalama boyutunun 198 nm olduğu belirlendi. Ekstraselüler veziküllerin 100 ve 200 µg/ml, Glukantim'in ise 20 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarının non-toksik olduğu belirlendi. Bu konsantrasyonlar kullanılarak hazırlanan kombinasyonların tek başına Glukantim'e kıyasla hem promastigotlar hem de amastigotlar üzerinde yaklaşık 2 kat daha fazla antileishmanial etkinlik gösterdikleri tespit edildi. Kombinasyonlara maruz kalan makrofajlarda NO üretiminin kontrole nazaran arttığı da ortaya çıkarıldı. Böylece bu çalışmada ilk kez, mevcut tedavi yöntemlerine göre daha düşük toksisiteye sahip olan, mevcut ilaçların kullanımını sınırlayan dezavantajları barındırmayan ve yüksek antileishmanial özelliğe sahip bitkisel kaynaklı ekstraselüler vezikül temelli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinin mümkün olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania*, ekstraselüler vezikül, *Curcuma longa*, eksozom, antileishmanial aktivite

Investigation of Antileishmanial Efficiency of Antimonial Drug and Curcuma Longa Derived Extracellular Vesicles against Mucocutaneous Leishmaniasis Agent Leishmania Major in Cell Culture Systems

Kübra KARADAŞ

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah Sefik ABAMOR

According to the World Health Organization, Leishmaniasis is the most common parasitic disease after malaria worldwide, threatening the lives of millions of people. The biggest disadvantages of treatment are that the drugs show toxic properties, cause serious side effects, and the resistance to these drugs. For this reason, studies are continuing for new approaches. Studies have shown that plant derived extracellular vesicles constitute an alternative approach in the treatment of many diseases. There are many studies on the anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Curcuma longa* plant. However, there are no studies investigating the antileishmanial efficacy of *Curcuma longa* derived extracellular vesicles alone or in combination with antileishmanial drugs. In this thesis, it was aimed to investigate the antileishmanial activities of *Curcuma longa* derived extracellular vesicles against L.major parasites alone and in combination with the Glucantime, which is used in the treatment of Leishmaniasis. Firstly the isolation

and characterization of extracellular vesicles were carried out. The non-toxic concentrations on J774 and L929 cells were determined. The antileishmanial activities of the formulations in *L. major* parasites were investigated. NO levels produced by macrophages exposed to the combinations were measured by Griess reaction. According to the results the average size of the extracellular vesicles was 198 nm. 100 and 200 µg/ ml of extracellular vesicles and 20 and 50 µg/ ml of Glucantime were determined to be non-toxic. Combinations prepared using these concentrations were found to have approximately 2 times more antileishmanial activity compared to Glucantime alone. NO production increased in macrophages exposed to combinations compared to control. Thus, for the first time in this study, it has been shown that it is possible to develop plant derived extracellular vesicle-based treatment approaches that have lower toxicity and do not have the disadvantages compared to existing treatment methods and have high antileishmanial properties.

Keywords: Leishmania, extracellular vesicle, *Curcuma longa*, exosome, antileishmanial activity

1.1 Literatür Özeti

Leishmaniasis 20'den fazla *Leishmania* türünün neden olduğu, *Phlebotomus* cinsi kum sinekleri tarafından memeli konakçılara bulaştırılan, vektör kaynaklı bir parazitik hastalık grubudur [1]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2017 raporuna göre, dünyada 102 ülkede hastalık endemik olarak görülmektedir. Dünya üzerinde 12 milyon kişi hastalıkla enfektedir ve halen dünya genelinde 350 milyon kişi Leishmaniasis ile enfekte olma tehdidi altındadır. Leishmaniasis, deride, visseral organlarda ve nazo-orofaringal bölgelerde bulunan makrofajları enfekte eden parazitlerin replike olmasıyla ortaya çıkan ve ciddi endikasyonlara neden olan bir enfeksiyöz hastalıktır. Leishmaniasis'in Kutanöz (CL), Mukokutanöz (MCL) ve Visseral (VL) olmak üzere 3 klinik formu bulunmaktadır. Dünya çapında her yıl 50.000-90.000 yeni VL ve 600.000-1.000.000 yeni CL ve MCL vakası görülmektedir. 2016 yılı itibariyle en çok CL vakası görülen 10 ülke Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, Irak, Pakistan, Peru, Suriye, Tunus ve Yemen'dir ve tüm CL vakalarının %84'ünü oluşturmaktadır [2]. *Leishmania* parazitleri yaşam döngüleri içerisinde promastigot ve amastigot olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Kum sineklerinin gastrointestinal bölgesinden tükürük bezlerine ilerleyen kamçılı promastigot formdaki parazitler, kum sineğinin ısırığı sonucunda memeli konakçı olan insana geçer ve dermal makrofajlar tarafından hücre içerisine alınır ve burada amastigot formda yaşamlarını sürdürür. Kum sineği, enfekte bir konakçıdan beslendiğinde döngü tamamlanır. Kemirgenler ve çoğunlukla da köpek gibi bazı memeliler *Leishmania* parazitlerinin rezarvuarlarıdır [3], [4]. Hastalığın yayılımı enfekte kum sineklerinin kan emme sırasında konakçıya parazit bulaştırması, doğum sırasında anneden bebeğe kan yoluyla parazit geçişi, kan transfüzyonu, laboratuvar kazaları ve kök hücre ve organ transplantasyonu gibi çeşitli yollarla gerçekleşebilir [5]. Zayıf immün sistem, savaş ve göçler, hastalığın tanısında yaşanan problemler ve son yıllarda parazitlerin tedavide kullanılan ilaçlara karşı direnç göstermesi hastalığın giderek yayılmasında oldukça önemli

etkenlerdir [6]. Hastalığın klinik formları arasında en tehlikeli olan VL tedavi edilmezse hayati tehlike arz eden sistemik enfeksiyonlara neden olur ve *L. donovani*, *L. infantum* ve *L. chagasi* VL'nin başlıca etkenleridir. Mukokutanöz form burun, ağız ve boğazda mukoza zarının kısmen veya tamamen işlevini kaybetmesine neden olur. *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* MCL'in başlıca etkenleridir [7], [8]. Kronik cilt yaraları ile sonuçlanan CL etkenleri, eski dünya türleri olan *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* ve yeni dünya türleri *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* ve *L. guyanensis*'dir [1]. Kum sineğinin ısırığının ardından yüz, kollar, bacaklar gibi vücudun açık kısımlarında ortaya çıkan ülseratif lezyonlar Kutanöz Leishmaniasis'in en sık görülen belirtisidir. Hayati tehdit edici değildir, ancak bu lezyonlar birkaç ay içerisinde kendiliğinden iyileşmesine rağmen cildin görülür bölgelerinde hastanın günlük yaşamında ciddi psikolojik ve sosyal travmalara sebep olabilecek izler bırakır [3], [9], [10]. Leishmaniasis tedavisi, hem VL hem de CL tedavisi için kullanılan pentavalent antimonialleri, amfoterisin B ve pentamidini içeren birinci basamak ilaçlar; miltefosin, paramomisin, azoller, allopurinol içeren alternatif ilaçlar; ilaçların tek başlarına kullanımlarında dirençlilik gibi dezavantajların ortadan kaldırılmasını hedefleyen, miltefosin-paramomisin, antimonial- amfoterisin B gibi kombine tedaviler; ve fotodinamik, kriyoterapi, termoterapi gibi bölgesel tedaviler olmak üzere 4 gruba ayrılabilir. Sistemik tedaviler tüm Leishmaniasis türleri için kullanılabilmesine rağmen yüksek toksisiteye sahiptir ve tedavisinin hastaya, enfeksiyon etkeni *Leishmania* türüne ve enfeksiyonun alındığı coğrafi bölgeye göre bireyselleştirilmesi gerekmektedir [11]. Tüm dünyada, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kendi kendine iyileşmeyen Kutanöz Leishmaniasis tedavisi için önerilen yöntem 20-28 gün boyunca günde 20 mg/ kg pentavalent antimonial ilaçların (sodyum stiboglukonat veya meglumin antimoniat) kullanılmasıdır [12]. Günümüzde hala ilk tedavi seçeneği olarak kullanılsa da yüksek maliyet, yüksek toksisite ve zamanla parazitlerin ilaca karşı direnç oluşturmaları tedavide sorunlara sebep olmaktadır [13]. Sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan Amfoterisin B (Amf B), hücre zarındaki ergosterol gibi kompleksler sayesinde iyon dengesini değiştiren ve hücre ölümü ile sonuçlanan gözeneklere neden olur [14]. Bu ajanının uygulamasını kısıtlayan en önemli faktörler, yüksek toksisiteye sahip olması,

düşük terapötik indeksi ve uzun saatler boyunca parenteral uygulama gerektirmesidir [15].

Antileishmanial ilaçların bahsedilen dezavantajları ve hastalığın dünya genelinde giderek yayılması nedeniyle Leishmaniasis ile mücadele için yeni yaklaşımların geliştirilmesine oldukça fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut ilaçların dezavantajlarının, toksisitesinin azaltılması ve tedavideki etkinliğinin artırılması için formülasyonların kombinasyon şeklinde uygulanması en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Literatürde Leishmaniasis tedavisinde altın standart olan Glukantim'in çeşitli antileishmanial bileşiklerle kombinasyon olarak kullanılmasına yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur [16]. Leishmaniasis tedavisinde alternatif olarak, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antioksidan özellikler gösteren ve yara iyileşmesini hızlandırıcı etkinliği olan çeşitli bitkisel biyoaktif ajanlar da kullanılmaktadır. *Curcuma longa* bitkisinden ekstrakte edilen kurkuminin *Leishmania* parazitleri üzerinde yüksek düzeyde antiparaziter aktivite gösterdiği bilinmektedir [17]. Son yıllarda kanserin ve enfeksiyon hastalıklarının eradikasyonunda kullanılmaya başlanan alternatif bir diğer tedavi yaklaşımı ise ekstraselüler membran vezikülleridir. Farklı kaynaklardan elde edilen veziküller gerek tek başlarına gerekse de ilaçlarla yüklendikten sonra birçok hastalığın iyileştirilmesinde ümit verici sonuçların ortaya çıkmasına aracı olmuştur. Tüm hücrelerden dış ortama salgılanan ekstraselüler veziküller aracılığıyla komşu hücreye taşınan kargo içeriği, hücresel gelişmeyi, bölünmeyi ve apoptozu indükleyebilir [18]. Ekstraselüler veziküller insan ya da hayvan hücre kültüründen elde edilebileceği gibi farklı bitkilerden de elde edilebilir. Güncel çalışmalarda biyolojik olarak önemli olan bitkisel sıvılardan elde edilecek EV'lerin vücutta ciddi işlevleri olabileceği ve homeostaza katkıda bulunabileceği belirtilmiştir [19]. Bir çalışmada limondan elde edilen ekstraselüler veziküllerin kargo içeriğinde yüksek miktarda sitrat ve C vitamini taşıdığı, ve içeriğinde turuncgillerden farklı dağılım boyutuna sahip kısa RNA dizileri bulundurduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın *in vitro* sonuçları bu veziküllerin oksidatif strese karşı koruyucu etkinliği olduğunu göstermiştir [20]. İnsan akciğer karsinoma hücre hattı A549 ve miyeloid lösemi hücre hattı LAMA84 üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise yine limondan elde edilen ekstraselüler veziküllerin TRAIL aracılı apoptozu aktive ederek kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [21]. Bitkilerden elde

edilen ekstraselüler veziküllerin, bitkileri enfeksiyonlara karşı koruduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu veziküllerin memeli konakçıları enfeksiyonlara karşı koruyuculuğuna yönelik çalışmalar da literatürde mevcuttur. Yapılan bir çalışmada periodontal bir patojen olan *Porphyromonas gingivalis*'in zencefil kaynaklı ekstraselüler veziküllerin kargo içeriği ile etkileşiminin ardından patojenik mekanizmalarında ciddi bir azalma görüldüğü belirtilmiştir [22]. Ancak günümüze kadar literatürde *Curcuma longa* bitkisinden ekstraselüler veziküllerin izole edilmesine yönelik herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Aynı zamanda bitkisel kaynaklı ekstraselüler veziküllerin tek başlarına veya konvansiyonel bir antileishmanial ilaçla kombinasyon halinde *Leishmania* parazitleri üzerindeki antiparaziter etkinliklerinin incelenmesine dair bir çalışma da mevcut değildir.

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada ilk kez *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen ekstraselüler veziküllerin etkinlikleri tek başlarına ve Glukantim isimli antileishmanial ilaç ile kombinasyon halinde *L. major* promastigotları ve amastigotları üzerinde incelenmiş ve bitkisel kaynaklı ekstraselüler veziküllere dayalı yeni bir alternatif tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, *Curcuma longa* bitkisinin suyundan ekstraselüler veziküllerinin izolasyonunun ve karakterizasyonunun yapılması, bu ekstraselüler veziküllerin tek başlarına ve Glukantim ile kombinasyonlarının *L. major* promastigot ve amastigotları üzerindeki terapötik etkinliğinin *in vitro* ortamda belirlenmesidir. Bu tez çalışması ile Leishmaniasis tedavisinde güncel olarak kullanılan Glukantim'in toksisitesinin azaltılması, ilaca karşı gelişen direncin düşürülmesi, ilacın antileishmanial etkinliğinin arttırılması ve bitkisel kaynaklı ekstraselüler veziküllere dayalı yeni bir tedavi yaklaşımının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaca ulaşmak için aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir:

- Ekstraselüler veziküllerin *Curcuma longa* bitkisinden kit kullanılarak izolasyonu ve Zetasizer, SEM, Flow Sitometre ve Bradford yöntemleriyle karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi

- Ekstraselüler veziküllerin ve Glukantim'in sitotoksik etkinliklerinin MTT yöntemi ile incelenmesi
- Ekstraselüler veziküllerin ve Glukantim'in toksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi ve bu konsantrasyonlar ile kombinasyonların hazırlanması
- Hazırlanan kombinasyonların *L. major* promastigotları üzerinde *in vitro* antileishmanial etkinliklerinin MTT ve sayım yöntemleri ile incelenmesi
- Hazırlanan kombinasyonların *L. major* amastigotları üzerinde *in vitro* antileishmanial etkinliklerinin MTT, Giemsa Boyama ve Mikro Kültür yöntemleri ile incelenmesi

1.3 Hipotez

Leishmaniasis tedavisinde Glukantim isimli pentavalent antimonial türü ilaçlar altın standart tedavi olarak kullanılmaktadır. Parazitlerin bu tedaviye karşı direnç geliştirmesi ve ilacın uygulandığı hastalarda ciddi toksik yan etkilere neden olması sebebiyle literatürde alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Glukantim'in farklı ilaçlar veya antileishmanial etkinliği olduğu bilinen ajanlarla kombinasyon olarak kullanılması yaygın bir yöntemdir. *Curcuma longa* bitkisinin içerdiği kurkumin bileşiği nedeniyle antileishmanial özelliğe sahip olduğunun belirtildiği birçok çalışma mevcuttur. Son yıllarda üzerine yoğun çalışmalar yapılan ekstraselüler veziküllerin de zengin kargo içeriği sayesinde çeşitli hastalıkların eradikasyonunda ümit verici sonuçların alınmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir. Buna karşın; şu ana kadar *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen ekstraselüler veziküllerin antileishmanial etkinliği incelenmemiştir.

Bu bilgilere dayanarak bu tez çalışmasının hipotezini;

- Literatürde *Curcuma longa* bitkisinin antileishmanial etkinliğinin olduğunu belirten çalışmaların olması,
- Yapılan çalışmalarda farklı kaynaklı bitkilerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin yüksek düzeyde antikanser ve antibakteriyal etkinlik göstermiş olması,

- Glukantim'e karşı parazitlerin direnç geliştirmesi ve ilacın toksik etkisinin bulunması
- Literatürde *Curcuma longa* bitkisinden ekstraselüler veziküllerin izolasyonuna yönelik çalışmaya rastlanmamış olması,
- Literatürde *Curcuma longa* kaynaklı ekstraselüler veziküller ile Glukantim'in kombinasyonlarının antileishmanial etkinliğinin incelenmemiş olması oluşturmaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışması kapsamında ilk kez olarak Leishmaniasis tedavisinde kullanılmak üzere *Curcuma longa* kaynaklı ekstraselüler veziküllerin izolasyonu, karakterizasyonu, tek başına ve Glukantim ile kombinasyonlarının *Leishmania* parazitlerinin promastigot ve amastigot formları üzerindeki *in vitro* antileishmanial etkinliğinin incelenmesi hedeflenmiştir.

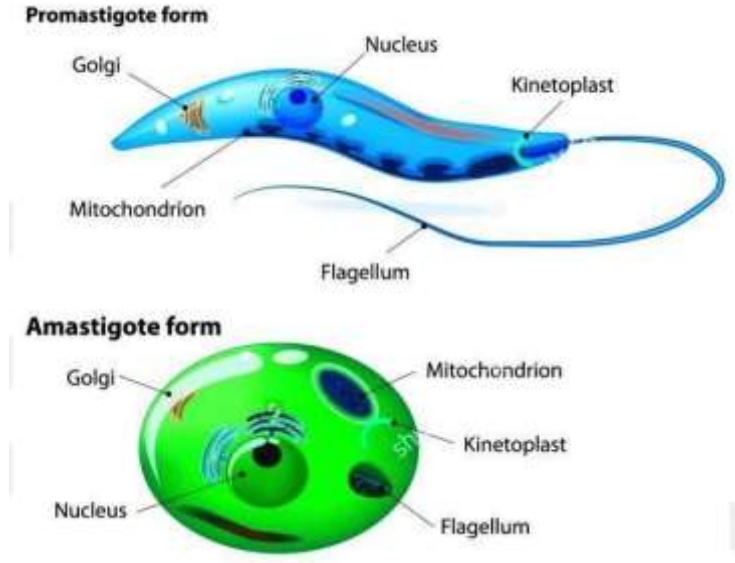
2.1 *Leishmania*

2.1.1 Taksonomi

Trypanosomatidae ailesi, Kinetoplastida sınıfına ait *Leishmania* cinsidir [21]. Tanımlanmış 53 *Leishmania* türünden (*L. tropica*, *L. majör*, *L. infantum* vb.) 31 tanesi memeliler, 20 tanesi ise insanlar için patojeniktir [22].

2.1.2 Parazit Morfolojisi

Leishmania parazitleri, diğer birçok protozoan parazit türünde olduğu gibi vektör ve enfekte ettikleri konakçı memelide digenetik yaşam döngüsüne sahiptir. *Leishmania* parazitlerinin yaşam döngüsü, kum sineklerinin gastrointestinal bölgesinde kamçılı halde bulunan ekstraselüler promastigotlar ve memeli konak makrofaj ve monositleri içinde kamçısız halde bulunan amastigotlardan oluşur [23]. Parazitler, flagellum, bazal gövdeyi oluşturan mitekondriyal kinetoplast ve golgi ve flagellar cep birimlerinden oluşmuştur. Temel hücresel yapı iki morfolojide de korunur ve bu birimler parazitin farklı morfolojilerini oluşturmak için birbirlerine göre konumlanırlar. *Leishmania* morfolojisi, hücre şekli, kamçı uzunluğu, kinetoplast ile çekirdeğin pozisyonu gibi kriterler baz alınarak kesin şekilde tanımlanabilir. Amastigot formda, flagellar cepten belirsiz bir şekilde çıkan, duyuşal fonksiyonları daha yoğun olan, kısa ve hareketsiz kamçısı ile küçük ve küresel bir hücre gövdesi gözlenir. Promastigot formda itici güç sağlayan, flagellar cepten dışarı uzanan ve uzun ve hareketli bir kamçı ile oval bir hücre gövdesi bulunmaktadı [24]. Parazit promastigot formunda 15-20 mikrometre uzunlığında ikin amastigot formda 3-5 mikrometredir [4]. Parazitlerin amastigote ve promastigot formları Şekil 2.1’de verilmiştir.

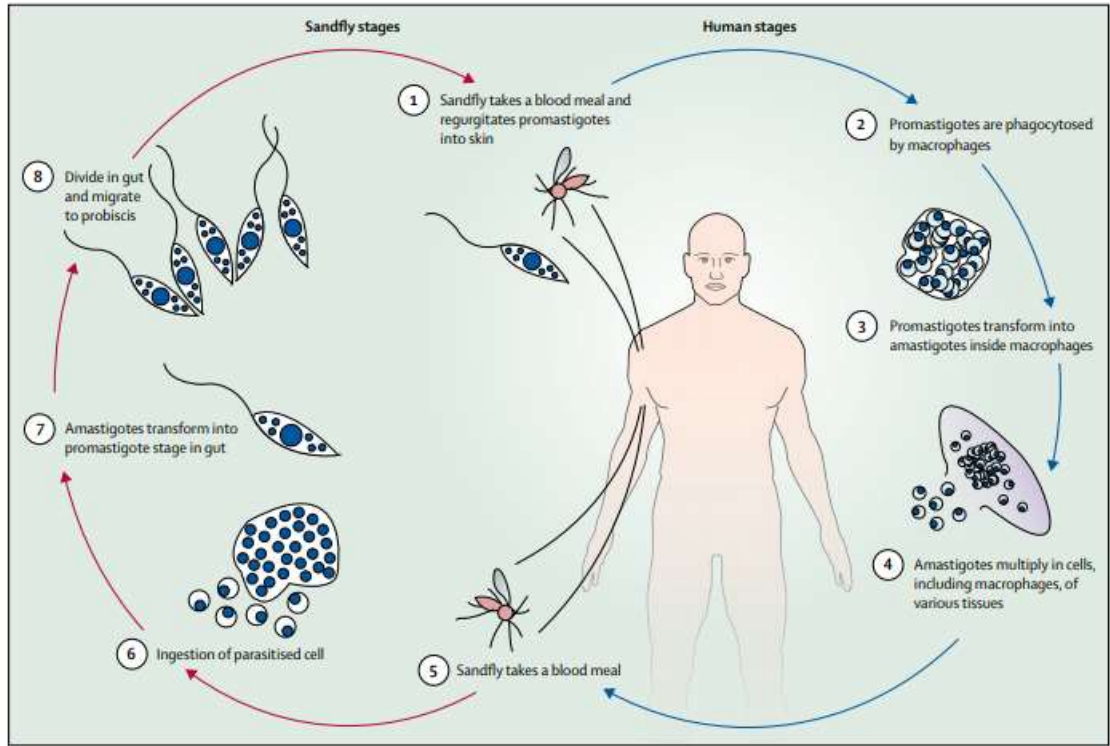


Şekil 2. 1 *Leishmania* parazitlerinin promastigot ve amastigot formları [25]

2.1.3 Hayat Döngüsü

Leishmania parazitleri yaşam döngülerini, konak veya vektörde bulunmalarına bağlı olarak amastigot ve promastigot olmak üzere iki ana morfolojide tamamlar (Şekil 2.2). Promastigot formu, vektörleri olan kum sineklerinin gastrointestinal bölgesinde, amastigot formu ise konakları olan memeli fagositlerinin fagolizozomal vakuollerinde gelişir ve çoğalırlar [26]. Parazitin hayatta kalması, kala-azar, post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) olan insanlar aracılığıyla antroponotik veya köpek gibi rezervuarı olan hayvanlar aracılığıyla zoonotik bulaşma ile gerçekleşir. Enfekte bir kum sineği ısırığı ile metasiklik promastigotlar ısırık bölgesine bırakılır. Isırık bölgesinde makrofajlar yoğunlaşır. Promastigotlar makrofajları enfekte eder ve konakta hayatlarını bu şekilde sürdürürler. Promastigotlar kamçılarından dolayı yüksek hareket kabiliyetine sahiptir. Bu sebeple parazitler ısırık bölgesinde makrofajları enfekte edebilecekleri gibi farklı bölgelerde de fagosit olabilirler. Flagella ile makrofaj içine giren parazit uzun kamçılı formundan amastigot formuna farklılaşır. Amastigotlar, fagosit içerisinde lizis olana kadar çoğalmaya devam eder. Lizis sonrasında diğer makrofajları enfekte etmek üzere hücre dışına salınırlar. Boyama yöntemleri ile hücre içerisinde görülen amastigotlar Leishman-Donovan cisimcikleri olarak adlandırılır. Kum sineği enfekte bir konaktan beslendiği zaman parazitler kum sineklerinin

gastrointestinal bölgesinde tekrar kamçılı promastigot forma dönüşürler ve döngü bu şekilde devam eder [4], [24].

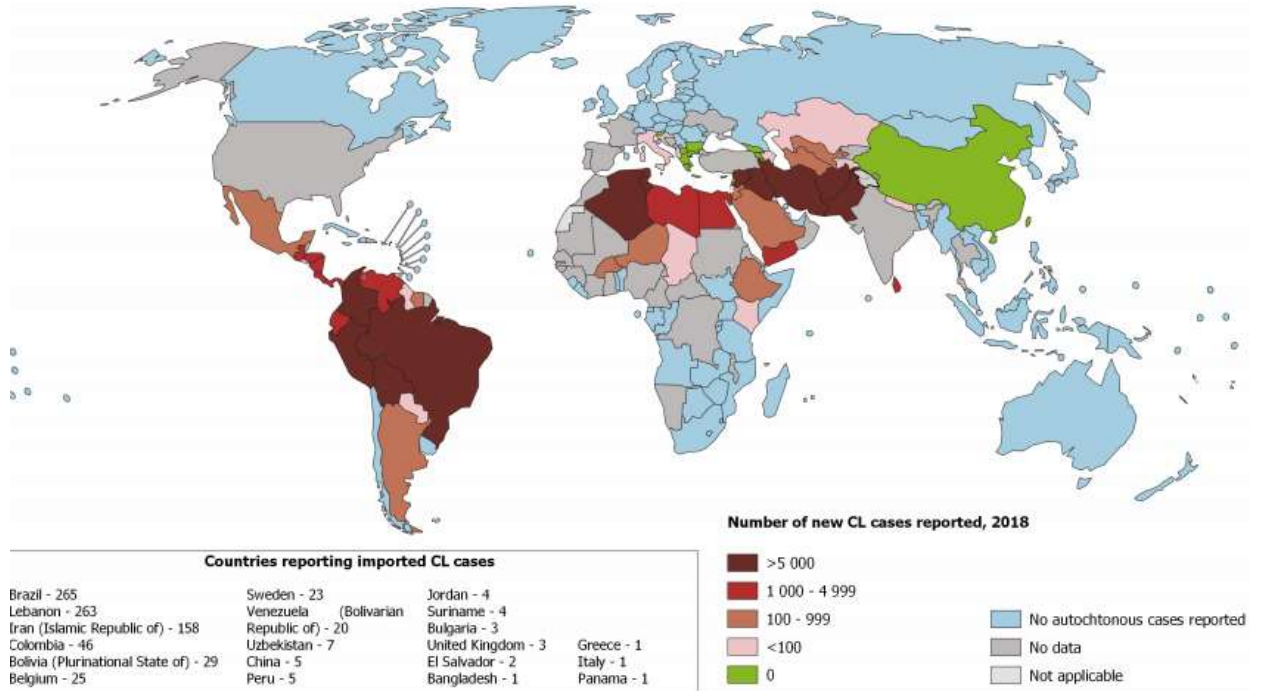


Şekil 2. 2 *Leishmania* parazitlerinin yaşam döngüsü [1]

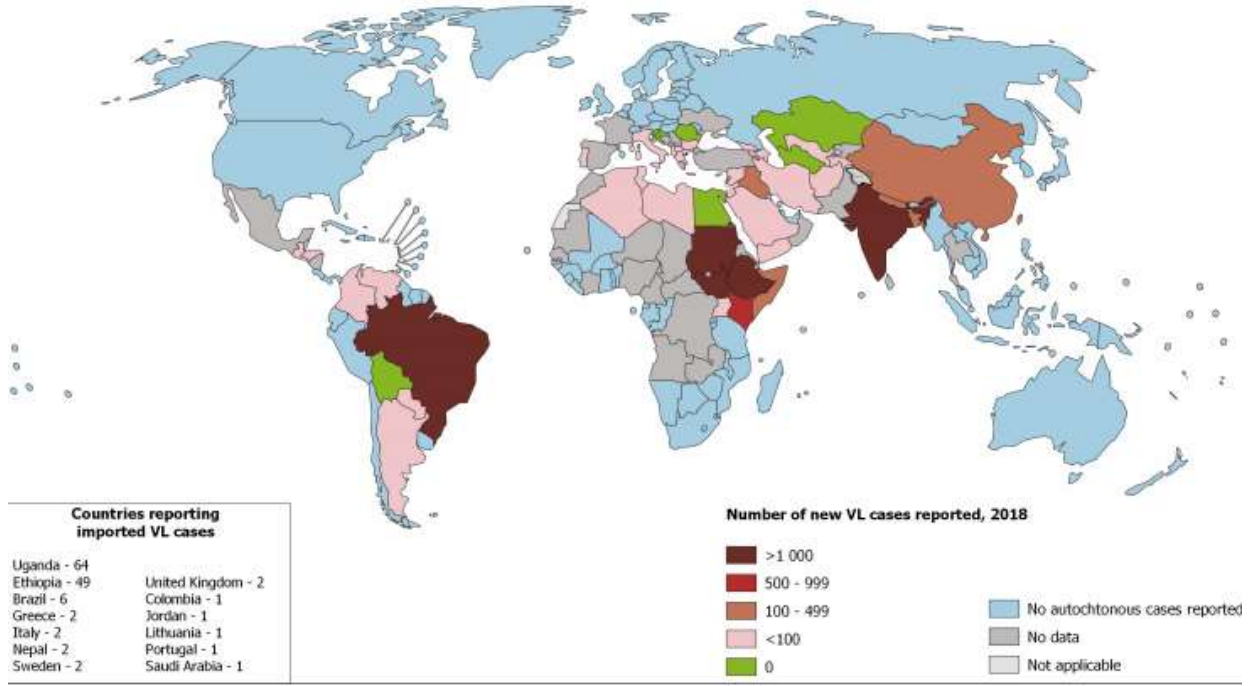
2.1.4 Epidemiyoloji

Dünya sağlık örgütü (WHO)'ne göre Leishmaniasis, en önemli tropikal hastalıklar listesinde sıtmanın ardından 2. sıradadır ve küresel ölüm sebepleri arasında öne çıkmaktadır. 2018 yayınlanan "Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators" raporuna göre bildirilen 200 ülkeden 88'i Kutanöz Leishmaniasis, 78'i ise Visseral Leishmaniasis için endemik olarak kabul edilmiştir. 66 ülke hem CL hem de VL için endemiktir. 2018 yılında 253.435 yeni CL vakası ve 17.223 yeni VL vakası bildirilmiştir [27]. Kolombiya, Suriye, Afganistan, Cezayir, Brezilya, İran, Kosta Rika, Etiyopya, Kuzey Sudan ve Peru, yaklaşık olarak KL insidansının % 70-75'ini oluşturmaktadır [28]. Hastalığın yayılması kum sineklerinin kam emmesi sırasında olabileceği gibi, memeliden memeliye; kan transfüzyonu, doğum sırasında anneden bebeğe, laboratuvar kazaları ile ve ayrıca kök hücre ve organ transplantasyonu gibi çeşitli yollarla

gerçekleşebilir [5]. Leishmaniasis çoğunlukla Akdeniz havzası, Doğu Afrika, Amerika ve Asya yaşayan fakir insanları etkiler [29]. Leishmaniasis'e karşı uzun yıllardır çalışmalar devam etmesine rağmen hastalığı yayılması devam etmektedir. Diğer birçok tropik hastalığa benzer şekilde, leishmaniasis endemik bölgelerdeki nem, sıcaklık, rakım, bitki çeşitliliği gibi faktörlere bağlıdır. Bölgenin ekonomik kalkınmasının da hastalık üzerinde ciddi etkisi vardır. Yeşil alanların azalması, kentleşmenin artması, kentsel alanlara göçün artması ile kum sineğinin yayılması için yeni bölgelerin oluşması, hastalığın rezervuarı olan köpek ve fareler, zayıf immünite, göçler, savaşlar, hastalığın tanısındaki problemler, en önemlisi kullanılan ilaçlara ve insektisitlere karşı direnç gelişmesi hastalığın yaygın olarak görülmesinin sebepleridir [5], [6]. Dünya genelinde Leishmaniasis'in dağılım haritaları Şekil 2.3 ve 2.4 'te verilmiştir.



Şekil 2. 3 Dünya genelinde Kutanöz Leishmaniasis görülen bölgeler [27]



Şekil 2. 4 Dünya genelinde Visseral Leishmaniasis görülen bölgeler [27]

2.1.5 Klinik Formlar

3.1.1.1 Kutanöz Leishmaniasis

Afganistan, Suriye, Brezilya gibi ülkelerin de içinde bulunduğu 70'den fazla ülkede endemik olan ve kronik cilt yaraları ile sonuçlanan CL, hastalığın en yaygın formudur. Eski Dünya'da *L. tropica*, *L. majör*, yeni dünyada ise *L. Braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, ve *L. venesuelensis* CL'nin başlıca etkenleridir. CL, son yıllarda tropikal ülkelere dönen turistler arasında en yaygın görülen 10 cilt hastalığından biridir [30]. Kum sineğinin ısırığının ardından yüz, kollar, bacaklar gibi vücudun açık kısımlarında ülseratif lezyonlar Kutanöz Leishmaniasis'in en sık görülen belirtisidir. Hayatı tehdit edici değildir, ancak bu lezyonlar birkaç ay içerisinde kendiliğinden iyileşmesine rağmen cildin görülür bölgelerinde hastanın günlük yaşamında ciddi psikolojik ve sosyal travmalara sebep olabilecek izler bırakır [3], [9], [10]. Yaraların iyileşmesi enfekte eden *Leishmania* türüne ve konağın bağışıklığına göre 3 aydan 18 aya kadar uzayabilir. Hastalığın tedavisi hastalığın klinik formuna, *Leishmania* türüne ve klinik bulgularına bağlı olarak değişir [31]. Hastalığın Diffüze Kutanöz Leishmaniasis (DCL) olarak adlandırılan formu, yüksek parazit yükü, deri testlerine karşı duyarsızlık ve tedaviye direnç gibi belirleyici özelliklere sahiptir.

Bu hastalarda tüm vücudu saran ülserleşmemiş kutanöz papuller ve nodüller görülür (Şekil 2.5) [5]. *L. tropica* ve *L. major*'un neden olduğu lezyonlar bir yıl içinde kendi kendine iyileşir ancak kalıcı izler bırakma eğilimindedir. *L. aethiopica*'nın yol açtığı lezyonların iyileşmesi ise yıllar alır ve MCL ve DCL formları şeklinde gelişebilir. *L. mexicana*'nın neden olduğu lezyonlar daha hızlı iyileşirken, *L. viannia* daha şiddetli ülser lezyonlar ve MCL gelişebilir. Leishmaniasis iyileşir ancak *L. tropica* nedeniyle deride oluşan skarı çevreleyen ve giderek genişleyen yeni lezyonlar olarak tekrarlayabilir. Kutanöz Leishmaniasis yaraları kendi kendine iyileşmesine rağmen, iyileşmenin hızlandırılması, yara izinin ve yayılma riskinin azaltılması ve ardından MKL gelişiminin engellenmesi gibi durumlarda tedavi uygulanır. Ayrıca çoklu (> 5), büyük (> 4 cm), 6 aydan uzun süren ve yüz veya eklemler gibi hassas bölgelerdeki lezyonlar için de tedavinin başlatılması gerekli görülmektedir [1].



Şekil 2. 5 Kutanöz Leishmaniasis'in sebep olduğu cilt lezyonları [32]

3.1.1.2 Mukokutanöz Leishmaniasis

Mukokutanöz form, burun, ağız ve boğazda mukoza zarının kısmen veya tamamen işlevini kaybetmesine neden olur. Burun deliklerinde kızarıklık ve ülseratif lezyonlarla başlar ve mukozal bölgelerde oluşmasıyla CL'den ayırt edilir (Şekil 2.6). CL'nin tedavisinin yetersiz olduğu durumlarda da MCL görülebilir ve ağır yaralanmalara ve ölüme sebep olabilir [5]. *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* MCL başlıca etkenleridir [7].



Şekil 2. 6 Mukokutanöz Leishmaniasis'in sebep olduğu cilt lezyonları [33]

3.1.1.3 Visseral Leishmaniasis

VL, Kala- azar olarak da adlandırılmaktadır. *L. infantum* ve *L. donovani* parazitin hastalığın etkeni olan türleridir [34]. Hastalığın klinik formları arasında en tehlikeli form olan VL kemik iliği, karaciğer, dalak gibi retiküloendotelyal organları etkiler ve etkili tedavi edilmezse hayati tehlikeye neden olur (Şekil 2.7) [35]. Dünya çapında 200.000'den 500.000'e kadar meydana gelen VL vakalarının büyük çoğunluğu Bangladeş, Brezilya, Etiyopya, Hindistan ve Sudan gibi ülkelerde görülmektedir [36]. İki haftadan uzun süren ateş, yorgunluk, halsizlik, iştah kaybı, genişlemiş lenf düğümleri VL'nin yaygın klinik belirtileridir. Post Kala-azar Leishmaniasis (PKDL) VL sonucunda meydana gelir ve her vaka potansiyel bir PKDL kaynağı olarak düşünülmektedir [37].



Şekil 2. 7 Visseral Leishmaniasis sebebiyle oluşan belirtiler [38]

2.1.6 Tanı

2.1.6.1 Mikroskop ve Kültür

Kutanoz ve Mukokutanöz Leishmaniasis'in tanısı laboratuvar ortamında, lezyonlardan alınan örneklerin Giemsa ile boyaması yöntemiyle mikroskopik olarak yapılır. Bu yöntemde amastigotlar oval şekilli, 2-4 mikrometre çapında görünür. Bu yöntemde ülserleşmiş yaralardan alınan örnekler daha yüksek sonuç vermektedir. Mikroskop ile tanı yönteminin kültür ile kombine edilmesi ile duyarlılık artmaktadır. VL'nin mikroskopik tanısı için genellikle dalak veya kemik iliği aspiratları kullanılmaktadır. Bunların yanında karaciğer, lenf düğümleri, periferel kandan alınan örneklerle de amastigot varlığı belirlenebilir. Tüm bu örneklerin Giemsa boyama sonucu mikroskopik incelemelerinde duyarlılıkları değişiklik göstermektedir. Dalaktan alınan örnekler daha yüksek duyarlılık göstermektedir [39].

2.1.6.2 Mikro Kültür Yöntemi

KL'in tanısı için geliştirilen Mikro Kültür Yöntemi (MKY), mikrokapiler tüp ile uygulanan bir yöntemdir. Geleneksel kültür yöntemiyle (GKY) karşılaştırıldığında duyarlılığı daha yüksek bir yöntem olarak belirtilmiştir. GKY'nin duyarlılığı parazit suşuna, lezyon tipine, alınan bölgeye göre ve parazit yoğunluğuna göre değişiklik gösterirken MKY bu değişkenlere daha duyarsızdır. Mikrokültür yönteminde

gereken inkübasyon süresi çok daha kısadır. Çok daha az sayıda parazit test için yeterlidir [40].

2.1.6.3 Serolojik Yöntemler

Kutanöz Leishmaniasis için kullanılan serolojik yöntemler antileishmanial antikörlerin saptanmasının zor olması ve oluşan zayıf hümmoral yanıt, düşük konsatrasyonda olması sebebiyle düşük duyarlılığa sahiptir. VL'de serolojik yöntemler floresan antikör (IFA), enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), Western Blot ve doğrudan aglütinasyon testi(DAT) olarak sıralanabilir. Bu yöntemlerin en büyük dezavantajı halen var olan veya daha önce hastalığın geçirilmesinin ardından pozitif kalan antikörler arasında ayırım yapılamamasıdır.

2.1.6.4 Moleküler Yöntemler

Külür ile birlikte PCR testi en hassas yöntemdir ancak gelişmekte olan ülkelerde hastalığın az olması sebebiyle aktif olarak kullanılmamaktadır ve pratik değildir. VL'de farklı moleküler yöntemler var olsa da PCR temelli testler özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda kullanılan başlıca tanı yöntemidir. Bu yöntemde leishmania DNA'sını belirlemek için dalak, lenf nodu, kemik iliği, kan gibi bölgelerden alınan örnekler ile gerçekleştirilir [39].

2.1.7 Tedavi

Leishmaniasis için birinci basamak tedaviyi antimonialler oluşturmalarına rağmen ilaca artan direnç tedaviyi sınırlandırmaktadır. Sıtma, zatürre gibi hastalıklarla birlikte gelişen enfeksiyon da, zamanında teşhis ve tedavi edilmezse hastalığın ölümcüllüğünü arttırmaktadır. Alternatif olarak kullanılan pentamidin ve amfoterisin gibi 2. Basamak tedaviler mevcuttur. Ancak bu tedavilerde de oluşan direncin yanında yüksek toksisite görülmektedir. Aynı zamanda Amfoterisin B yüksek maliyetli bir ilaçtır. VL ve CL'nin tedavisi için kullanılan antikanser ilaç olan miltefosin bölgesel etkinliği ve kısa tedav süresi gibi avantajlara sahiptir. Kullanılan bu kemoterapik ilaçlar, parazitin amastigot formunda mononükleer biyosentez inhibisyonu, membranın bozulması ya da protein sentezine müdahale gibi mekanizmalarla etki ederler. Bu ilaçların toksisite, yüksek maliyet, uzun tedavi süresi gibi dezavantajlarını azaltmak için yeni ajanlar geliştirilmelidir [29].

2.1.7.1 Pentavalent Antimonialler

Pentavalent antimonialler [Meglumün antimonat (MA), sodyum stiboglukonat (SSG)] Leishmaniasis tedavisinin temelini oluşturan ve on yıllardır VL, MCL ve KL için kullanılan bir ilaçtır. Günümüzde hala ilk tedavi seçeneği olarak kullanılsa da yüksek maliyet, yüksek toksisite ve zamanla parazitlerin ilaca karşı direnç oluşturması tedavide sorunlara sebep olmaktadır [12]. Antimonialler en az 3 hafta boyunca günde 20mg / kg kullanılmasıdır. İlacın parenteral uygulanması lokal ağrının yanında, bulantı, kusma, halsizlik gibi sistemik yan etkilere sebep olur. Dünya sağlık örgütü (WHO) bu dezavantajlardan dolayı yeni antileishmanial ilaçların geliştirilmesini şiddetle tavsiye etmektedir [41].

2.1.7.2 Amphotericin B

Amf B çok sayıda mantar türünün tedavisinin yanında Leishmaniasis için de kullanılan geniş spektrumlu bir antifungal ilaçtır. Amf B mantarların hücre zarındaki ergosterol bazı leishmania türlerinde de lanosterol gibi kompleksler sayesinde iyon dengesini değiştiren transmembran kanallara neden olur [42]. Antimoniallerin etkisiz olduğu ya da antimoniallere karşı direnç oluşturan vakalarda leishmaniasisin 2. basamak tedavisi olarak geliştirilmiştir. Bu ajanının uygulamasını kısıtlayan en önemli faktörler, yüksek toksisiteye sahip olması, düşük terapötik indeksi ve uzun saatler boyunca parenteral uygulama gerektirmesidir. 15 gün boyunca 1mg/ kg uygulama rejimi zahmetli ve pahalı bir uygulamaya sebep olmaktadır [43]. Amfoterisin B'ye göre daha az toksik olan Lipozomal Amfoterisin B (L- AmB) daha yüksek dozun daha kısa sürede uygulanması sayesinde tedavi süresini kısaltmaktadır [44]. WHO tarafından tavsiye edilen lipozomal amfoterisin B, AmBisome' dur [42].

2.1.7.3 Pentamidin

Pentamidin, Pneumocystis Jiroveci pnömonisinin tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Leishmaniasis tedavisinde de iyi klinik sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. Antimoniallerin etkisiz olduğu ya da antimoniallere karşı direnç oluşturan vakalarda pentamidine, leishmania parazitlerinin sayısının azalmasında klinik başarılar göstermiştir [13]. Pentamidin, leishmanianın kinetoplast DNA'sına bağlanarak etki eden bir mekanizmaya sahiptir [45]. Pentamidin kısa süreli tedavi olanağı sunsa da hastalarda gelişen yüksek derecede (%50) hiperglisemi, pankreas

hasarı, hipotansiyon ve taşikardi pentamidin kullanımı ile ilişkilendirilmektedir [46].

2.1.7.4 Miltefosin

Miltefosin, Leishmaniasis'i tedavi etme potansiyeline sahip kullanılan ilk oral ajandır. Anti- tümör etkisine sahip alkilfosfokolin analogudur. Antileishmanial etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Leishmania türleri çeşitli bölgelere göre farklılık gösterdiği için alınan sonuçlar da değişkendir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA, "Food and Drug Administration") bu ilacı *L. Beaziliensis*, *L. Panamensis* ve *L. Guyanensis* için onaylamıştır [47]. Daha fazla *Leishmania* türünde etkinliğinin belirlenmesi için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır [48].

2.1.7.5 Bölgesel Tedaviler

Kriyoterapi Kutanoz Leishmaniasis tedavisi için yaygın olarak kullanılan etkili bir fiziksel yöntem olarak gösterilmektedir. CO₂ veya sıvı azot kullanılarak uygulanan kriyoterapi tek başına veya intralesional veya sistemik paromomisin gibi ajanlarla kombinasyon tedavi olarak kullanılabilir [49]. Tüm *Leishmania* türlerinin termosensitif olması, kriyoterapinin düşük sıcaklıklar sayesinde leishmania parazitleri için öldürücü etki göstermesine sebep olur [50]. Bassiouny ve arkadaşlarının 30 CL hastası ile yaptığı çalışmada hastalar CO₂ kriyomakinesi ile tedavi edilmiş ve 4-5 hafta içerisinde tüm hastalarda iyileşme görülmüştür. Bununla birlikte hiçbir hastada lezyonlar nüks etmemiştir ve tedavi sonrası enfeksiyon görülmemiştir [51]. Diğer bir çalışmada 40 lezyon üzerinde sıvı nitrojen ile kriyoterapi uygulanmış ve 3-8 hafta içerisinde tüm lezyonlarda iyileşme görülmüştür [52]. Kriyoterapi, basit bir yöntem olması, anesteziye gerek duyulmaması, parazitler üzerinde hızlı etki göstermesi gibi birçok avantaja sahiptir. Ancak bu tedavi, özellikle koyu tenli hastalarda kalıcı hipopigmentasyona neden olabilir ve yüksek nüks etme oranına (% 12) sahiptir [49], [50]. *Leishmania* türlerinin termosensitif özelliği, leishmaniasisin tedavisinde sıcak banyo, kızılötesi ışık, fotodinamik tedavi ve lazer ile tedavinin etkili sonuçlar göstereceğini desteklemektedir. Radyofrekans dalgaları tarafından üretilen ısı, çevre dokulara zarar vermeden, leishmania parazitlerinin amastigot formlarının bulunduğu bölgeye kadar etki gösterir [53]. Meksika'da yapılan bir çalışmada, CL tanısı

koyulan 201 hastaya kontrollü olarak ısı üreten LCF-RF ("localized current field-radio frequency") cihazı ile 30 saniye boyunca 50 derecelik ısı ile ısı terapisi uygulanmıştır. 4 hafta sonra incelenen 122 hastada %95 oranında, 8 haftanın sonunda incelenen 191 hastada ise %90 oranında iyileşme görülmüştür [54]. 1970'li yıllardan beri cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılan lazer, CL tedavisinde de bir tedavi seçeneğidir. Bu yöntem sağlıklı dokuya zarar vermeden doğrudan lezyon üzerinde termoliz etkisi oluşturmaktadır. 3-4 hafta içerisinde başarılı kozmetik sonuçlar elde edilmektedir. Tek bir seansın yeterli olması tedavi maliyetini düşürmektedir [55].

2.1.8 Leishmaniasis'e Karşı Bitkisel Bileşiklerin Kullanımı

Leishmaniasis tedavisinde, kullanılan ilaçlara direnç gelişmesi, toksisite, sıtma, zatürre gibi hastalıklarla birlikte gelişen enfeksiyon, aşının bulunmaması gibi tedaviyi sınırlayan nedenlerden dolayı, mevcut ilaçların yerini alacak ya da etkinliklerini arttıracak ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitki ekstraktları ya da bitkilerden elde edilen bileşiklerin alternatif tedavi için etkili bir kaynak olduğu bilinmektedir. DSÖ tarafından Leishmaniasis'in alternatif tedavisi için bitkisel bileşiklerin kullanılması tavsiye edilmektedir. Bitki ekstraktlarının flavonoid, steroid, alkaloid gibi kimyasal bileşenleri biyolojik aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır. *L. amazonensis* promastigotları üzerinde *Centrolobium sclerophyllum* bitkisinden ekstrakte edilen 2 farklı heptanoid, (2[β -(p-hydroxyphenyl)-ethyl]-6(p-hydroxyphenyl)-tetrahydropyran ve 3-hydroxy-1,7-bis-(4',4''-dihydroxyphenyl)-heptane) ve 1 flavonoid (7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavone) bileşiğinin yüksek antileishmanial etki gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada sonuçlar LD₅₀ = 77 nM, LD₅₀ = 86nM and LD₅₀ = 140 nM değerleriyle verilmiştir [56]. Sudan'dan elde edilen bazı bitkilerin antileishmanial etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada *Azadirachta indica* için 11.5 μ g/mL, *Maytenus senegalensis* için 55 μ g/mL ve *Eucalyptus globulus* için ise 78 μ g/mL konsantrasyonlarında *L. major* promastigotları için IC₅₀ değerine ulaşılmıştır [57]. Başka bir çalışmada *Khaya senegalensis* bitkisinden izole edilen proantosyanidinler [catechin-(4 α ,6)-catechin and catechin-(4 α ,8)- catechin] *L. donovani* promastigotları üzerinde etkisiz kalırken (EC₅₀>25.0 μ g/mL) amastigotları üzerinde ciddi antileishmanial etkinlik göstermiştir.

2.1.8.1 Leishmaniasis'e karşı *Curcuma longa* bitkisinin kullanımı

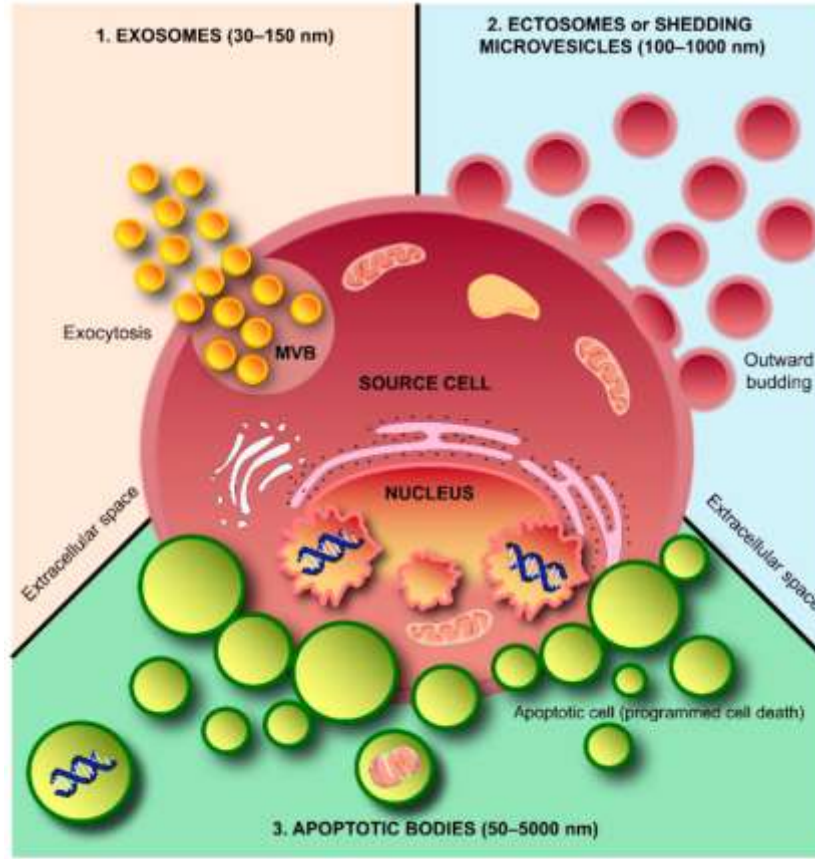


Şekil 2. 8 *Curcuma longa* bitkisi

Curcuma longa, yaygın adı zerdeçal olan, zencefil ailesinden bir bitkidir (Şekil 2.8). Baharat olarak kullanımının yanında, ülser, ateş, yara iyileşmesi, sedef hastalığı gibi birçok hastalıkta tedavi amacıyla kullanılmaktadır. *Curcuma longa*'nın başlıca aktif bileşeni olan kurkumin, hidrofobik bir polifenoldür. *Curcuma longa* demetoksikurkumin, isdemetoksikurkumin ve yakın zamanda tanımlanan siklokurkumin gibi kurkuminoid bileşenlerine de sahiptir. Kurkuminin antiinflamatuvar, antioksidan, antifungal, antibakteriyel, antiviral özellikleri olduğuna yönelik binlerce çalışma mevcuttur. Kurkuminin bu etkinlikleri, transkripsiyon ve büyüme faktörleri, sitokinler, kinazlar, yapışma molekülleri gibi hedefler ile etkileşimi ve bu moleküler hedefleri düzenleme mekanizmalarından kaynaklanır [58]. Kurkuminin bu eşsiz özelliklerinin *Leishmania* parazitleri üzerinde incelendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. *L. major* promastigotları üzerinde tek başına (5- 80 μ M) ve CM11 peptidi ile kombinasyonlarının etkinliği incelenmiş ve kontrol olarak da optimum doz olan 123.5 μ L (10.5 mg pentavalent antimony)/mL Glukantim kullanılmıştır. 5 μ M konsantrasyonunun üzerinde kurkumin promastigotlar üzerinde ciddi inhibisyon göstermiştir [18]. Kurkuminin *L. major* üzerinde etkinliğinin incelendiği bir diğer çalışmada kurkuminin artan konsantrasyonlarına (0- 100 μ M) orantılı olarak yüksek antileishmanial etkinliği olduğu gösterilmiş ve LDU değeri 37.663.5 mM olarak belirtilmiştir [59].

2.2 Ekstraselüler Veziküller

Hücreler arası iletişimin sürdürülmesi çok hücreli organizmalarda hücre gelişimi ve homeostaz için çok önemli bir gerekliliktir. Bu iletişim birbirine bitişik hücrelerin doğrudan teması ile olabileceği gibi dolaşım yoluyla gönderilen sinyallerle de gerçekleşebilir [60]. Son yıllarda, hücreler arası etkileşim veya bazı faktörlerin salgılanmasının yanında hücre dışı veziküllerin de hücreler arası iletişime aracılık ettiği belirtilmektedir. Ekstraselüler veziküller (EV'ler), salgılandığı hücrenin kökenini yansıtan DNA, RNA, lipid, protein ve diğer metabolik yüklerin bulunduğu zengin kargo içeriğini taşır. Birçok farklı hücre tipinden, fizyolojik veya patolojik durumlarda hücre dışı boşluğa salınır [61]. EV'lerin protein içeriği keşfinden itibaren bilinse de RNA varlığı 2007 yılında yapılan çalışma sonucunda doğrulanmış ve içerdiği mRNA'nın *in vitro* koşullarda proteinlere dönüşebileceği gösterilmiştir [62]. Amip, parazit ve memeliler gibi tüm ökaryot hücreler ve prokaryotik hücreler hücre dışı ortama ekstraselüler veziküller salgılamaktadır. EV'ler biyogenezlerine göre eksozom, ektozom veya mikroveziküller ve apoptotik cisimler olmak üzere 3 gruba ayrılır (Şekil 2.9). Bu üç grupta da protein, RNA gibi belirli kargo yükünü çevreleyen lipid çift katmanlı membran bulunur, ancak boyutları farklılık gösterir. Çapları, eksozomlar için 30-150 nm, ektozomlar için 100-1000 nm, apoptotik cisimler için ise 50-5000 nm'dir. Bu veziküllerin boyut, yapı, kaldırma yoğunluğu gibi özelliklerine göre kesin olarak ayırt etmek çok zordur ve yeni izolasyon ve saflaştırma yöntemlerine yönelik çalışmalar devam etmektedir [61], [63].

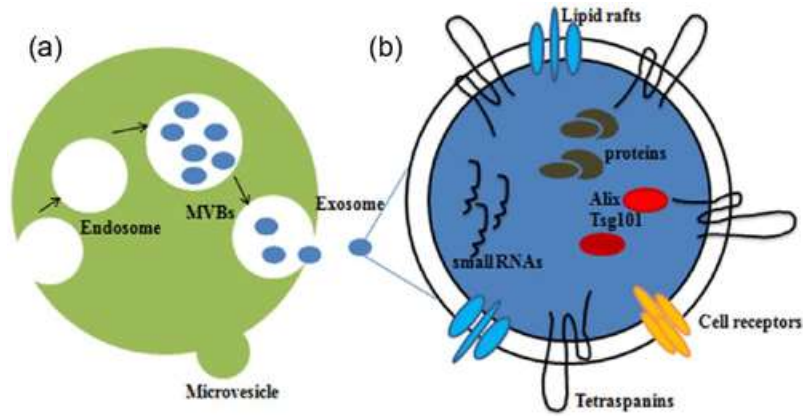


Şekil 2. 9 Hücrelerden salınan eksozom, ektozom ve apoptotik cisimlerin gösterimi [61]

2.2.1 Eksozomlar

Plazma membranının içeri doğru tomurcuklanmasıyla multiveziküler cisimcikler olarak adlandırılan endozomlar, eksozomların oluşmasını sağlar. Plazma membranı ve multiveziküler cisimcikler (MVB)'in füzyonu sonucu MVB'lerin içeriğinde bulunan intraluminal veziküller (ILV'ler) mikroçevreye salındığında eksozom olarak adlandırılır (Şekil 2.10). Son yıllarda eksozomlar üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmış olsa da eksozom kelimesinin geçmişi 1970 yılına dayanmaktadır. Eksozomlar lipit çift tabakalı membranla çevrili DNA, RNA, protein gibi lümen kargosunu taşımakla görevlidir. İçeriğinde taşıma proteinleri (GTPazlar, Anneksinler ve flotillin), ısı şoku proteinleri (Hsp70 ve Hsp90), tetraspaninler (CD9, CD63, CD81 ve CD82)'in yanında kolesterol, sfingolipidler, fosfogliseritler, seramidler gibi farklı lipit türleri de mevcuttur. Bir eksozom veritabanına göre eksozomlar 8000 protein ve 194 lipit içerir. Eksozom içerisinde bulunan tetraspaninler hücrede füzyon, hücre göçü, hücre yapışmasında görevli olmakla birlikte eksozomlardaki görevi tam olarak bilinmemektedir. İntegrinler ise

hücrenin hücre dışı matiese yapışmasında görev alırken eksozomda ise veziküllerin hedef hücreye yapışmasında rol oynar. Eksozom oluşumu sırasında eksozomlara dahil olan CD55, CD59, laktadherin, ALIX ve TSG101 gibi proteinler hücreler arası iletişim için kargo görevi görürler. Tüm bu proteinler eksozomlar için belirteçlerdir. Proteinlerin yanı sıra eksozom yapısında çokça bulunan lipidlerden sfingomiyelin ve GM3 eksozomun rijiditesinin belirlenmesinde, fosfatidilserin eksozomun PM'a sinyal göndermesinde ve füzyonunda görevlidir. Eksozomlar mikroRNA (miRNA), haberci RNA (mRNA) ve kodlayıcı olmayan RNA'ların da olduğu nükleik asitleri bulundurur [60] ,[61]. Eksozomların hücreler arası iletişimde ve fizyolojik süreçlerde kökenlerine de bağlı olarak önemli görevleri olduğu düşünülmektedir. Antijen sunan hücrelerden salınan eksozomların majör histouyumluluk kompleksi (MHC) I ve II moleküllerini ifade etme yetenekleri sayesinde CD8 + ve CD4 + T hücrelerini aktive ederek spesifik bağışıklık tepkilerini uyarmayı sağladıkları gösterilmiştir [64], [65]. Trombositlerden salgılanan eksozomlar inflamatuvar yanıtta görev alırken [66] glioblastoma hücrelerinden salgılananlar mRNA, miRNA, anjiyojenik proteinler içerir ve anjiyogenezin uyarılmasında [67] rol alır.



Şekil 2. 10 Eksozomların (a) kaynağı ve (b) önemli bileşenleri [68]

2.2.2 Ektozomlar

50-1000 nm arasında değişen boyutlara sahip ve PM'dan dışarı doğru tomurcuklanma ile oluşan ve belirli protein ve lipidleri taşıyan veziküllerdir [60]. Ektozomlar da eksozomlar gibi plazma membranının (PM) tomurcuklanmasından dolayı spesifik değişiklikler gösterdiği için farklı membrana sahiptir. Eksozomlara benzer kargo içeriği olsa da daha az araştırılmıştır. Bazı çalışmalarda ektozomların

matris metalloproteinazlar (MMP), glikoproteinler, integrinler, reseptörler ve β -aktin ve α -aktinin-4 gibi proteinleri içerdiği gösterilmiştir [69], [70].

2.2.3 Apoptotik Cisimcikler

Apoptotik cisimler, 50-5000 nm arasında değişen boyutlara sahip, apoptoz geçiren hücreler tarafından hücre dışı boşluğa salınan apoptotik DNA ve sitoplazma parçaları içeren membran vezikülleridir. Bu cisimler fagositleri apoptotik bölgelere yönlendiren sinyaller taşır. Diğer ekstraselüler veziküllerden farklı olarak apoptotik cisimler sadece apoptotik hücre ölümü sırasında salınır. Apoptotik cismin içeriğini oluşturduğu bölgedeki hücresel bileşenler belirler. Bundan dolayı apoptotik cisim yoğun nükleer kromatin içerebileceği gibi sadece sitoplazmik bileşen de içerebilir. Taşıdıkları bu içeriğe göre nükleer apoptotik cisim (NAB) veya sitoplazmik apoptotik cisim (CAB) olarak adlandırılır [71].

2.2.4 Ekstraselüler Veziküllerin İzolasyonu

Ekstraselüler veziküllerin izolasyonu için santrifügasyon, boyut dışlama kromatografisi, filtrasyon, immünoafinite, polimerik çöktürme gibi farklı ilkelere dayanan çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

2.2.4.1 Santrifügasyon

Ekstraselüler veziküller, hücre dışı ortama salındıkları için hücrenin parçalanması gerekmeden hücre kültür süpernatantlarından, biyolojik sıvılardan doğrudan izole edilebilir. Ekstraselüler veziküllerin izolasyonu için kullanılan en temel yöntem diferansiyel santrifügasyondur [72]. Hücre kültür süpernatantından eksozomların izolasyonu için, süpernatant artan hızlarla santrifüjlenir. Düşük hızlarda elde edilen pelletler hücreleri, hücre döküntülerini, trombositleri, biyopolimer agregatlarını ve büyük apoptotik cisimler gibi yüksek kaldırma yoğunluğuna sahip parçaları içerir. 10.000- 20.000 g hızlarında mikroveziküller daha yüksek hızlarda da (100.000 g- 120.000g) eksozomlar pellet oluşturmaktadır. Oluşan pellet PBS ile yıkanarak tekrar ultrasantrifüjlenir ve saflık daha da artırılır. Elde edilen EV çözeltisi 0.1, 0.22 veya 0.45 μ m gözenek çapına sahip filtrelerden uygun olanı seçilerek filtrelendir. Ancak bu yöntem saflığı arttırmakla birlikte EV miktarını azaltmaktadır. Santrifüj süresi, kullanılan tüpün uzunluğu, g kuvveti, rotor tipi, numune viskozitesi, gradyan özellikleri vezikül izolasyonunu etkileyen önemli faktörlerdir. Özellikle daha yüksek viskoziteye sahip örneklerde santrifüj süresi ve

basamak sayısı arttırılmalıdır. Ultrasantrifügasyon işleminde apoptotik cisimler ve eksozom olmayan parçacıklardan kaynaklanan safsızlıkların giderilmesi için çeşitli yoğunluk gradiyentleri kullanılabilir. Bu yöntem mitokondri, peroksizom ve endozom gibi hücre bileşenlerinin ayrılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle EV izolasyonu için uygun bir yöntem olarak düşünülmektedir. Gradyan olarak sükröz, iodiksanol kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada sükröz gradiyenti kullanılmasıyla solüsyonda eksozom dışında kalan protein agregatları gibi safsızlığa sebep olan içerikler dipte kalırken eksozomun gradiyent üzerinde kaldığı belirtilmiştir[73],[74], [75].

2.2.4.2 Filtrasyon

Ticari olarak temin edilebilen filtreler vezikülün izolasyonuna imkan sağlayacak çok küçük gözenek çaplarına sahiptir. Öncelikle izole edilmek istenenden daha büyük parçacıklar uygun gözenek boyutuna sahip bir filtreden (örn. 0,8 mm) geçirilerek ortamdan uzaklaştırılır. Çalışmalarda genellikle filtrenin ardından ultrafiltrasyon basamağı eklenir. Genellikle ilk adımda 0,8, 0,45, 0,22 ve 0,1 µm gibi gözenek çapına sahip sırasıyla filtreler kullanılır. Böylece istenilen vezikül konsantre olarak elde edilmiş olur. Filtre kullanımının büyük veziküllerin veya trombositlerin parçalanmasına sebep olabileceği bu nedenle çok küçük kuvvetlerle uygulanması gerektiği belirtilmektedir [73], [75]. Bir çalışmada idarar kaynaklı EV'lerin konsatrasyonunun artırılması için ticari olarak satılan nanomebranlar içeren ultrafiltrasyon kullanılmıştır [76]. Ancak ultrafiltrasyon yöntemi ile elde edilmiş EV içeriğinin düşük miktarda akuaporin ya da nefrolisin gibi EV proteini içerdiği ve yüksek mikrarda albumin and α -1-antitripsin gibi EV proteini olmayan proteinler tespit edilmiştir [77]. Daha başarılı sonuçlar elde etmek için ultrafiltrasyon ile birlikte satrifüj ve ultrasantrifüj veya arka arkaya ultrafiltrasyon basamakları kullanılmalıdır. 0,65 µm gözenek çaplı filtre ile filtrasyon işlemi ardından 10.000xg'de santrifüj mikroveziküllerin, 0,65, 0,45, 0,22 ve 0,1 µm gözenek çaplı filtre ile ardarda filtrasyon işlemiyle ise eksozomların izolasyonunu sağlar. Başka bir seçici izolasyon yöntemi olarak büyük parçaları uzaklaştıracak düşük protein afinitesine sahip filtre [Millipore Express (PES) membrane Stericup Filter Unit] ile filtrasyonun ardından 5 kez daha küçük kontaminantları uzaklaştıracak teğet akış filtrasyonu (100 nm TrackEtch filtresi, Millipore, Amerika Birleşik Devletleri) gösterilebilir [78].

2.2.4.3 Boyut Dışlama Kromatografisi

Bu yöntem protein, polisakkarit, proteoglikan gibi biyopolimerlerin hidrodinamik yarıçaplarına bağlı olarak izolasyonu için kullanılmaktadır. EV izolasyonu için de kullanılan bu yöntem tekrarlanabilirlik, verimlilik ve madde kaybı olmaması gibi avantajlara sahiptir. EV'ler protein ve lipoproteinler ile karşılaştırıldıklarında daha büyük çapa sahip oldukları için izolasyonları daha kolaydır. Bu yöntem EV'lerin büyük ölçekli izolasyonu için uygundur. Ancak kolonun kolay kontamine olması ve her fraksiyon için zaman alıcı analizlerin gerekmesi uygulamanın dezavantajlarıdır [79]. Yapılan bazı çalışmalarda izolasyon, boyut dışlama kromatografisi ve ultrasantrifüj olmak üzere 2 adımda gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda ilk olarak Bio-Gel A50m ve Sepharose 2B kolonları kullanılmıştır. Daha sonra örneklerin 280 nm'de absorbanları ölçülmüştür. 50×10^6 Da'dan büyük olan fraksiyon için 100.000xg'de 1 saat boyunca ultrasantrifügasyon işlemi gerçekleştirilmiştir [80], [81].

2.2.4.4 İmmünoafinite

Ekstraselüler veziküllerde bulunan spesifik yüzey proteinlerinin varlığı immünoafinite izolasyonunun temelini oluşturur. İmmünolojik teknikler EV izolasyonunda yüksek özgüllük ve saflık potansiyeline sahiptir ancak verimi düşük olabilir. Antikorların çeşitli boncuklar veya matrislerle kovalent ya da yüksek afiniteli etkileşimi, düşük hızlı santrifüj ile ya da manyetik tekniklerle fiziksel ayırmayı sağlar [73]. Ekstraselüler veziküllerin izolasyonu için birçok farklı antikor bağlı mikroboncuk çeşidi ticari olarak elde edilebilmektedir. Yaygın olarak kullanılan diğer yüzey proteinleri ise CD9, CD63 ve CD81 içeren tetraspaninler ve epitel hücre adezyon proteinleridir (EpCAM). Yapılan çalışmalarda EV'lerin lipid katmanındaki fosfatidilserin bağlayıcı proteinlerinin bulunmasından dolayı bu proteinleri içeren Tim-4 bağlı mikroboncuklar, heparinin EV'lerin hücre tarafından alınmasında rolü olduğu için, heparin bağlı sefaroze boncuklarla immünoafinite temelli izolasyon yöntemleri kullanılmıştır [82] [83].

2.2.4.5 Polimerik Çöktürme

Bu izolasyon yönteminin temelini ticari olarak elde edilen polimerik karışımların izolasyonu yapılacak solüsyonun içerisinde gece boyunca inkübe edilmesi oluşturur. İnkübasyonun sonucunda EV düşük hızla santrifügasyon işlemi

sonucunda pellet oluşturmuş olur. Polietilen glikol (PEG), dekstran, polvinil gibi polimerler ya da ticari olarak temin edilen ExoQuick, Total Exosome Isolation Reagent ve miRCURY gibi polimer bazlı reaktifler kullanılmaktadır. Bu yöntemin sahip olduğu polimer bazlı reaktiflerinin kullanım kolaylığı, gereken pratik zamanın az olması, ultrasantrifüj gibi özel ekipmanlar gerekmemesi gibi avantajları kullanımını popüler hale getirmektedir. En büyük dezavantajlarından biri ise ExoQuick, Exospin gibi bu yönteme dayalı izolasyon kitlerinin temin edilmesi için ciddi bütçeler gerektirmesidir [83].

2.2.4.6 Sulu İkili Faz Sistemi

İzolasyondan protein kontaminasyonunu önlemek için PEG ve dekstran kullanılan bir yöntem önerilmektedir. Bu polimerler suda çözünerek 2 faz oluşturur. EV'ler ve uzaklaştırılmak istenen diğer moleküller polimerlerle spesifik fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak tercihli bir birikme gerçekleştirir. EV'ler dekstran fazında birikirken diğer moleküller PEG fazında tercihli birikim gerçekleştirir. PEG solüsyonu ile sürekli ortamdan uzaklaştırılarak kontaminant içeriği azaltılmış olur. PEG içeriğinin 4 kez yenilenmesi protein konsantrasyonunu 10 kat düşürmekte ve EV kaybı olmamaktadır [84].

2.2.5 Ekstraselüler Veziküllerin Karakterizasyonu

2.2.5.1 Elektron Mikroskobu (EM)

EV'lerin boyut ve morfolojisinin karakterizasyonu için kullanılan en net yöntem ışık yerine elektron ışını kullanarak nano boyuttaki nesnelerin yüksek çözünürlüklü görüntüsünün alınmasını sağlayan elektron mikroskoplarıdır. Taramalı ve geçirimli elektron mikroskopları (SEM ve TEM) en yaygın kullanılan iki elektron mikroskobu türüdür. SEM'de görüntü analiz alanının elektron ışınıyla taranması ve alandaki atomlar tarafından yayılan ikincil elektronların tespit edilmesiyle EV yüzeyinin topografyası oluşturulur. TEM'de ise yayılan değil numuneden geçen elektronlar ile görüntü oluşturulur. Bu iki mikroskopta da analiz edilecek hücre veya vezikülün sabitlenmesi ve kurutulması gerekmektedir. Örneğin dehidrasyonunu önlemek amacıyla çok düşük sıcaklıklarda ultra ince sıvı filmin görüntülenmesi temeline dayalı kriyo-TEM yöntemi uygulanır. Bu yöntemle EV'ler kendi doğal durumlarında yüksek çözünürlüklü olarak görüntülenebilir [85].

2.2.5.2 Atomik Kuvvet Mikroskobu

Atomik kuvvet mikroskobunda prensip numunenin yüzeyinin çok sivri bir uç ile taranarak yükseklığe çevrilmesine dayanan taramalı prob mikroskobudur. Örneğin topolojisinin nano boyutlarda yüksek çözünürlükle görüntülenmesini sağlar. EV analizi için kuru ve sabitlenmiş örnekler kullanılır ve boyut ve yapı belirlenir [86].

2.2.5.3 Nanopartikül İzleme Analizi (NTA)

NTA EV'lerin konsatrasyonunun ve boyut dağılımının analiz edilmesini sağlayan optik partikül izleme yönteminin ticari adıdır. Cihazdan saçılan bir lazer ışınının çarptığı her parçacık için ortalama hız, bir şarja bağlı (CCD) kameranın kaydettiği Brownian hareketine bağlı olarak Stokes Einstein denkleminde hesaplanır. Floresan etiketli EV'lerin analizi için floresan modundaki NTA kullanılabilir [73]. Örneğin NTA'sından önce lipoprotein, protein kompleksleri gibi EV'lere benzer boyuttaki partiküllerin iyi izole edilmesi gerekmektedir. Büyük protein komplekslerinin EV'ler ile benzer Brownian hareketlerinden dolayı ışık saçılım modunda kullanılan NTA sonucunda hesaplanan vezikül konsatrasyonunda veziküler olmayan yapılar da bulunabilir [73].

2.2.5.4 Ayarlanabilir dirençli darbe algılama (tRPS)

Bu yöntemde parçacıklar teker teker ayarlanabilir nano boyuttaki gözenekten geçerken elektrik akımındaki değişiklikler ölçülerek analiz gerçekleştirilir. Elektrik akımındaki düşüşün büyüklüğü gözenekten geçen partikül boyutuyla doğru orantılıdır. Son zamanlarda boyutları bilinen polisitren gibi nanopartiküllerle kalibre edilmiş cihazlar EV'nin boyut ve konsatrasyonunu belirlemek için kullanılmaktadır. Bunların yanında EV'lerin nanogözenekten geçme zamanları ölçülerek zeta potansiyelleri de belirlenebilir. Zeta potansiyelinin belirlenmesi, farmokinetik özellikleri etkilediği için EV'lerin terapötik uygulamaları için önem arz etmektedir [85].

2.2.5.5 Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Dinamik Işık Saçılımı EV'lerin boyut dağılımını belirlemek için kullanılmaktadır. EM ve AFM'den farklı olarak, DLS'de veziküllerin tek tek değil toplu olarak difüzyon katsayısı belirlenir. Bunun için EV'lerin hareketi sonucu saçılan lazer ışığının yoğunluk dalgalanmaları analiz edilir. DLS ölçümün basitliği ve kısa sürmesi sebebiyle EV analizi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [87].

2.2.5.6 Akış Sitometrisi (FC)

Akış sitometrisi EV'leri yüksek verimde ölçebilen ve fenotipleyeabilen bir yöntem olduğu için EV'lerin karakterizasyonu için aktif olarak kullanılan bir yöntemdir. Akış sitometrisi cihazlarının temelini parçacıkları ölçmek için birden fazla lazerin saçılmasının kullanılması oluşturur. Akış sırasında kırılma indisi farkından dolayı saçılan ışık farklı dedektörler tarafından algılanır. İleri dağılım hücre boyutunu verirken yan dağılım bileşimi hakkında bilgi verir. EV'lerin küçük boyutları nedeniyle çözelti ile kırılma indislerinin yakın olması EV'lerin ışık saçılımı daha düşük olmasına sebep olur [85]. Bu sebeple EV'lerin akış sitometrisi ile analizi için boccuk temelli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntem EV'lerin boncuklarla birleştirilmesi, florokrom- konjuge birincil veya sekonder antikorlar kullanılarak EV'lerin floresan etiketlenmesi ve akış sitometrisinde analizi olmak üzere üç adımdan oluşmaktadır. Bu yöntem gelişmiş ya da daha özel bir sitometri cihazına ihtiyaç duymadan EV tespiti yapılmasına olanak sağlar [83]. Stoner ve arkadaşları tarafından geliştirilen vezikül akış sitometrisi(VFC) EV'lerin bir floresan libip probu ile etiketlenmesinin ardından yüksek hassasiyetle tek partikül analizine imkan sağlar. Veziküllerin çapı 120 nm ortalama çapa sahip di-8-boyalı lipozomlarla karşılaştırılarak tespit edilir. Floresan sinyali EV'lere özgü olan iki katlı lipid membrana özgü olduğu için lipoprotein, protein kompleksleri gibi EV olmayan kontaminantların dahil edilmesi engellenmiş olur [88].

2.2.5.7 Western Blotting

Bu yöntemde EV markırları kullanılarak (CD9, CD63, CD81, TSG101, Aliks, aktin, tübülün, flotilin-1, HSC70 / HSP73, HSP70 / HSP72 ve MHC) istenilen proteinin varlığı ya da yokluğunun belirlenmesi için kullanılır. EV'lerin miktarını belirlemez [83].

2.2.6 Ekstraselüler Vezikül Kaynakları

Ekstraselüler veziküller mezenkimal kök hücreler, tümör hücreleri gibi hücre kültürlerinin süpernatantlarından, çok hücreli organizmalarda kan, idrar, tükürük, anne sütü, beyin omurilik sıvısı, amniyon sıvısı gibi vücut sıvılarından ve çeşitli bitkisel kaynaklardan izole edilebilirler.

2.2.6.1 Hücre Kültürü Kaynaklı Ekstraselüler Veziküller

Hücre kültürü süpernatantlarından elde edilen EV'ler yapılan çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücreler (MSC), doku onarımı ve yara iyileşmesindeki rolleri, osteoblast, kondrosit, adiposit, endotelyal, kardiyovasküler ve nörojenik hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri ve izolasyonunun etik olmasından dolayı güvenilir bir terapötik ajan olarak sunulmaktadır. Yapılan çalışmalarda güçlü antienflamatuar ve immünosupresif özellikleri olduğu da gösterilmiştir. MSC'lerin bu özellikleri ve çeşitli hayvan modellerinde yapılan çalışmalar MSC kaynaklı EV'lerin terapötik potansiyeli olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda MSC'den EV izolasyonu sürdürülebilir ve tekrarlanabilir özelliklere sahiptir [89]. Ayrıca MSC kaynaklı EV'lerin akut ve kronik böbrek hastalıklarında kullanılmasına yönelik çok sayıda umut vaat eden çalışma mevcuttur [90]. Melanom hücrelerinden salgılanan EV'ler anjiyogenez, immün regülasyon ve dokunun mikroçevresinin düzenlenmesi gibi tümör öncesi süreçlerde rol almaktadır. Melanom kaynaklı EV'ler hücrelerin değişen mikroçevreye uyumunu ve anti- tümör immün yanıtlara ve terapötik zorluklara hızlı adaptasyonunu sağlar. Bu sebeplerle bu EV'ler melanom hücreleri için biyobelirteç olarak kullanılabilir ve tümör aşıları için yüksek potansiyele sahiptir [91]. Kanseri için Doğal öldürücü (NK) hücre-bazlı hücresel tedavilerde tümörün düşük NK hücre filtrasyonu ve tümörün etkili kaçış mekanizmaları nedeniyle katı tümörleri hedeflemekte zorluklar yaşanmaktadır. NK hücreleri sitolitik protein ve tümör hedefleyici molekülleri içeriğinde bulunduran EV'ler sağlamaktadır. Bu veziküller çok küçük boyutlarından dolayı tümör dokusu ile daha etkili bir şekilde etkileşime geçebilir. Ayrıca NK kaynaklı EV'ler tümör mikroçevresine karşı daha az duyarlıdır. Bu avantajlar NK kaynaklı EV'lerin onkoloji alanında etkili bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir [92]. Vasküler duvar kaynaklı progenitör hücreler parakrin mekanizmalar ile iskelet onarımını indüklemektedir. Yapılan bir çalışmada perivasküler kök hücrelerinin (PSC) ve PSC EV'lerinin kemik iyileşmesindeki rolü araştırılmıştır. PSC kaynaklı EV'lerin kemik onarımını, iskelet hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve osteodiferansiyasyonu uyardığı gösterilmiştir [93].

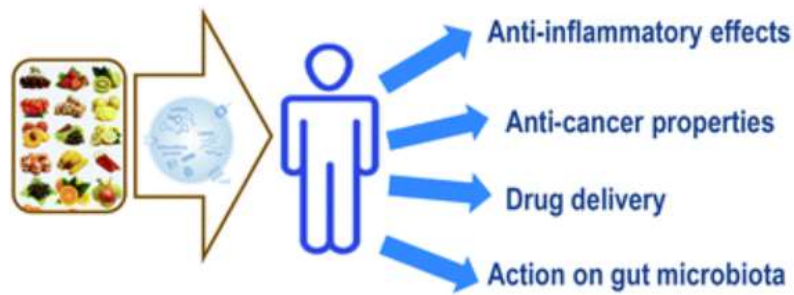
2.2.6.2 Vücut Sıvısı Kaynaklı Ekstraselüler Veziküller

Çok hücreli organizmalarda kan, idrar, tükürük, anne sütü, beyin omurilik sıvısı, amniyon sıvısı gibi vücut sıvıları EV kaynağıdır. Kandan plateletlerin izolasyonu ile elde edilen platelet kaynaklı EV'lerin incelendiği bir araştırmada platelet kaynaklı EV'lerin PRP benzeri etkileri olduğu belirtilmiş ve yara iyileşmesi ve doku onarımında PRP'nin yerini alabileceği öngörülmüştür [94]. Nekrotizan enterokolit (NEC) %20-40 gibi yüksek ölüm oranları ile yenidoğanlar için ciddi bir problemdir. Tedavinin yüksek maliyeti sağ kalan bebeklerde görülen kısa bağırsak sendromu ve gelişimsel gerilikler gibi problemler bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada anne sütü kaynaklı EV'lerin NEC insidansını önemli ölçüde azalttığı bağırsak epitel hücreleri (IEC)'nin proliferasyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve *in vitro* olarak apoptozu azalttığı gösterilmiştir [95]. İnsan tükürüğü birçok yapısal ve biyokimyasal özelliğe sahip partiküller içeren, invaziv olmayan tanı yöntemleri için kullanımı çok uygun olan bir vücut sıvısıdır. Tükürük kaynaklı EV'lerin klinik açıdan önemli bilgiler içerdiği belirtilmektedir. Tükürük kaynaklı EV'lerin premalign lezyonların ve erken evredeki kanserlerin tanısında ve tümörögenезin moleküler temelini anlaşılmada kullanımının ümit verici sonuçları olacağı düşünülmektedir [96].

2.2.6.3 Bitki Kaynaklı Ekstraselüler Veziküller

Uzun yıllardır yapılan çalışmalarda EV'lerin aynı dokuda yakınındaki hücrelerle veya dolaşım yoluyla kargo içeriğini taşıdığı ve hücreler arası iletişimi arttırdığı bilinmektedir. Son yıllarda ise EV'lerin memeli-parazit, memeli-bakteri, bitki-parazit gibi farklı türler arasında da etkinliği olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle de biyolojik olarak önemli olan bitkisel sıvılardan elde edilecek EV'lerin vücutta ciddi işlevleri olabileceği ve homeostaza katkıda bulunabileceği belirtilmiştir [97]. Bu konuda yapılan önemli bir çalışmada, EV'lerin bitkilerde yoğun olarak bulunduğu, bitki kaynaklı EV'lerin memeli hücreleri üzerinde etkinliklerinin olduğu ve çoklu bitki kaynaklı EV'lerin terapötik etkinliklerinin araştırılmasını önemli olduğu belirtilmiştir (Şekil 2.11) [20]. Bitki kaynaklı EV'lerin vücutta ulaştığı ilk bölge gastrointestinal sistem olduğu için EV'lerin bağırsak bariyeri üzerindeki biyolojik fonksiyonları üzerindeki çalışmalara önem verilmektedir. Yapılan bir çalışmada fareler 7 gün boyunca günde 2 mg üzüm kaynaklı EV'ler ile beslenmiş ve sadece PBS verilen kontrol gurubu ile

karşılaştırıldığında EV'lerin bağırsak epitelinde Lgr5- EGFP hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda *in vitro* ortamda Lgr5- EGFP hücrelerine 40 µg/mL verilmiş ve üzüm kaynaklı EV'lerin organoid oluşumunu hızlandırdığı tespit edilmiştir. Üzüm kaynaklı EV'ler ile yapılan bir diğer çalışmada kolit hasarı (DSS- induced) olan fareler oral olarak tedavi edilmiş ve PBS ile tedavi edilen kontrol grubuna nazaran kilo kaybının azaldığı, epitel hücre proliferasyonunun ve epitel oluşumunun arttığı gösterilmiştir [98]. Benzer şekilde kolit hasarı (DSS- induced) olan fareler greyfurt kaynaklı EV'ler ile oral olarak tedavi edilmiş ve Il-6 ve Il-1 beta sitokin gen ekspresyonlarında ve monosit ve T hücrelerinin toplanmasında rolü olan kemokin seviyelerinde azalma görülmüştür. Ayrıca greyfurt kaynaklı EV'ler bağırsaktaki makrofajlara dahil olmuş ve antienflamatuar kapasitelerini uyarmıştır [99]. Brokoli [100], zencefil [101] gibi bitkilerden kaynaklı EV'lerin antienflamatuar rolü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Bitki kaynaklı EV'ler kanser çalışmalarında da sıkça kullanılmaktadır. Limon kaynaklı EV'lerin A549, SW480 and LAMA84 kanser hücreleri üzerinde etkinlikleri incelenmiştir. Çalışmada EV'lerin TRAIL aracılı apoptotik hücre ölümünü aktive ederek *in vivo* kronik miyelojen lösemi(CML) tümörünün büyümüşeni baskıladığı gösterilmiş ve EV'ler kanser tedavisi için yeni bir yaklaşım olarak önerilmiştir [102].



Şekil 2. 11 Bitkisel kaynaklı ekstraselüler veziküllerin tedavide kullanım alanları [97]

2.2.7 Ekstraselüler Veziküllerin Terapötik Uygulamaları

Dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerden salgılanan eksozomlar, MHC sınıf I ve II adezyon ve uyarıcı molekülleri ifade etmekte ve böylece CD8 + ve CD4 +

T hücrelerini aktifleştirerek güçlü bir immünojenik yanıt oluşmasını sağlamaktadır. Tümör kaynaklı eksozomlar dendritik hücreleri aktive eden tümör antijenlerini ifade ettiği ve böylece lizatlara veya çözünür antijenlere göre daha yüksek bir immün yanıt oluşturabileceği belirtilmiştir [103]. Yapılan çalışmalarda yüksek immün yanıtın veziküllerin yapısında bulunan adjuvan özelliğine sahip ısı şoku protein (HSP) varlığı olduğu ve doğal öldürücü hücreleri (NK) ve makrofajları aktive edebileceği belirtilmiştir [104], [105]. Eksozomların içerdiği yüksek miktarda miRNA, doku yenilenmesi, adipojenik farklılaşma ve anjiyogenez gibi önemli süreçlerde rol almasını sağlamıştır [94], [106]. Yapılan bir çalışmada insan göbek kordon kanı endotel hücre kaynaklı eksozomların kronik diyabetik yara iyileşmesinde önemli rolü olan pro-anjiyojenik genlerin ekspresyonunu indüklediği, anjiyogenezle ilişkili olan endotel fibroblast büyüme faktörü 1 (FGF-1), nitrik oksit sentaz (eNOS) ve interlökin-8 (IL-8) üretimini 4 kat arttırdığı; vasküler endotelial büyüme faktörü reseptör 2 (VEGFR-2), kemokin ligand-16 (CXCL-8), anjiyopoietin-1 (ANG-1), E-selektin, vasküler endotelial büyüme faktörü A'yı (VEGFA) önemli derecede up-regüle ettiği rapor edilmiştir [107]. İnsan fibrosit kaynaklı eksozomlar, keratinositlerin göçünü ve çoğalmasını, dermal fibroblastların proliferasyonunu, kolajen I ve III'ün salgılanmasını önemli derece arttırmaktadır. Ayrıca kültür esnasında PKH67 ile etiketlenen eksozomların, endotel hücreler, keratinositler ve dermal fibroblastlar içerisinde çok sayıda varlığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla fibroblast kaynaklı eksozomların yara iyileşmesinde fonksiyonel işlevi olan farklı hücre tiplerine kargo görevi üstlenerek pro-anjiyojenik aktivite göstererek doku yenilenmesinde önemli rol oynadığı saptanmıştır [108]. Eksozomların *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda stabilitesi, organizmada iyi dağılması, kan beyin bariyerini geçebilmesi ve miRNA ve siRNA'yı hedef hücrelere transfer ederek gen ekspresyonunu düzenleyebilmesi terapötik amaçlar için eksozomları uygun bir aday yapmaktadır [65].

3.2 Materyal

3.2.1 Ekipman

- Hava akımlı kabinler (Thermo Scientific Hera safe, Faster BH-EN 2006)
- Ters mikroskop (Olympus CKX41)
- Işık Mikroskopları (Olympus ve Soif / BX51 ve BA2303)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- Ultrasantrifüj (Beckman / Optima L100 XP)
- Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150 37°C)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Pastör fırını (Memmert)
- Buz üretme makinesi (Scotsman AF100)
- Vortex (LMS(laboratuvarı medical supplies) VTX-3000L)
- Su banyosu (GFL (gessellschaft für labortechnik) mbH, Kerman)
- Pipet uçları (1-10, 20-200, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık, AxyGen)
- UV-spektrofotometre (Jasco V-530)
- -197 °C azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- ELISA cihazı (Thermo)
- ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre) (Thermo)
- Saf su ve ultra saf su sistemleri (GFL2104)
- Mikropipetler (10, 100 ve 1000 µl'lik ,Thermo, Pippetman)
- Enjektörler 1, 5, 10 ve 50 cc'lik (Ayset)
- Dondurucular (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C), GFL(-40°C))
- Santrifüj tüpleri 15 ve 50 mL (Eppendorf, IsoLAB)
- ELISA 96 kuyulu plakları (TPP)
- Hücre kültürü plakları (TPP)

- Kriyotüpler (TPP)
- Hücre kültür flakları 25 ve 75 cm² (TPP, Corning)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- Serolojik pipetler 1, 5, 10 ml (Blau Brand Germany)
- Steril pastör pipeti 3 ml (LP ITALIANA SPA)
- Otoklavlanabilir cam şişeler 50-1000ml'lik (ISOLAB, SCHOTT)
- Thoma lamı hücre sayımı için (Menzelsuperior)
- Şırınga filtreleri 0,22 µm ve 0,45 µm'lik (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM)
- Floresans Spektrofotometre (QuantaMaster)
- Sonikasyon Cihazı (Bandelin Sonoplus GM2200)
- Flow Sitometre (Merck/ Guava)
- pH-metre (HANNA instruments)

3.2.2 Kimyasallar

- Glukantim
- Tween-20 (MP Biomedicals LLC)
- Metanol (Merck)
- EX01-25 Exo-spin™ kit, 24 columns buffer CELL GUIDANCE SYSTEMS
- RPMI-1640 (Fenol red içeren ve içermeyen) besiyerleri (GIBCO Invitrogen)
- Tripan mavisi (BiologycalIndustry)
- İmmersiyon yağı (Merck)
- Etanol (Merck)
- EDTA (AppliChem)
- L-Glutamine (PAN Biotech)
- Dipotasyum fosfat, K₂HPO₄ (Sigma)
- Amonyum sülfat, (NH₄)₂SO₄ (merck)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma)
- Sodyum bikarbonat, NaHCO₃ (Merck)
- FBS-fetal bovine serum (GIBCO Invitrogen)
- DMSO (AppliChem)
- Penisillin-streptomisin (PAN Biotech)
- Coomassie Blue G250

- BSA (Bovine Serum Albumin) standart solüsyonu (Sigma)
- Aldehyde/Sulfate Latex Beads, 4% w/v, 4 µm (thermo fisher A37304)
- HEPES (Sigma Aldrich)

3.2.3 Deneylerde Kullanılan Tampon, Besiyerleri ve Kimyasalların

Hazırlanışı

3.2.3.1 Tamponlar

PBS Tamponu

0,2 g KCl, 8 g NaCl, 0,24 g KH₂PO₄ ve 1,44 g Na₂HPO₄ kimyasalları tartılıp 900 ml distile suda çözündürüldü. pH'ı 7,4'e ayarlandı ve son hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı. 1 atm basınç, 121°C sıcaklığa ayarlanmış otoklavda cam şişeler içerisinde 20 dakika steril edildi.

HEPES Tamponu

90 ml distile suyun içine 0,8 g NaCl, 0,027 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 1,2 g HEPES eklendi. 1M NaOH ile pH'ı 7,05'e ayarlandı ve ardından total hacim 100 ml'ye tamamlandı. Son olarak solüsyon 0,22 µm'lik filtreden geçirildi.

3.2.3.2 Kimyasallar

Tripsin Solüsyonu

%0,25 tripsin solüsyonu hazırlamak için 2,5 g tripsin ve 0,2 g EDTA tartılıp 1 ml'ye tamamlanarak manyetik karıştırıcıda çözdürüldü.

MTT Solüsyonu

10 mg/ ml son konsatrasyon olacak şekilde Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tuzu hassas terazide 20 mg tartılıp PBS ile 2 ml'ye tamamlandı. Vortekste çalkalanarak iyice çözündükten sonra steril edilmek üzere 0,22 µm'lik şırınga filtreden geçirildi. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tuzu ışığa karşı hassas olduğu için, bu işlemler karanlıkta yapıldı.

Nitrik Oksit (NO) için Griess Reaktifi

20 ml distile suya 2,5 ml fosforik asit eklendi. Bunun içerisine sırayla 0,1 g N-(1-Naftil)Etilendiamin ve 1 g Sülfanilamit eklenerek karıştırıcıda çözünmesi sağlandı. Son olarak çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

NO için Standart Çözeltileri

Standart madde olarak Sodyum Nitrit kullanıldı. Bunun için 10 ml distile su içinde 0,345 g Sodyum Nitrit çözülerek 500 µM stok çözelti hazırlanmış oldu. Elde edilen stok çözeltiden 0-100 µM aralığında standartlar hazırlandı.

Bradford Reaktifi

50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 hassas terazide tartıldı ve 50 ml metanol içerisinde çözüldü. İçerisine 100 ml 85% (w/v) fosforik asit (H₃PO₄) eklendi. Hazırlanan solüsyon 850 ml distile suya eklendi ve filtre kağıdından geçirilerek reaktif elde edildi.

3.2.3.3 Besiyerleri

Hücre Dondurma Solüsyonu

%80 FBS ve %20 DMSO içeren çözelti kabin içerisinde 15 ml'lik falkonlarda steril bir şekilde hazırlandı ve -20°C'de muhafaza edildi.

DMEM- F12 Medyumu

%10 FBS içeren DMEM- F12 besiyerinin hazırlanması için öncelikle 500 ml DMEM/F12 stok besiyeri içerisine 5 ml penisilin streptomisin ve 5 ml L-glutamin ilave edildi. 50ml'lik falkona hazırlanan besiyerinden 45 ml alınıp 5ml FBS eklenerek tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.

RPMI 1640 Medyumu

%10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması için öncelikle 500 ml RPMI 1640 stok besiyeri içerisine 5 ml penisilin streptomisin ve 5 ml L-glutamin ilave edildi. 50ml'lik falkona hazırlanan besiyerinden 45 ml alınıp 5ml FBS eklenerek tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.4 Deneylerde Kullanılan Hücreler

J774 Makrofaj hücre hattı: Dişi bir BALB/c fare tümöründen elde edilen J774 fare makrofaj hücre hattı toksisite testleri ve *L. major* parazitlerinin promastigot-amastigot döngüsünde konak olarak kullanılmıştır.

L929 Fibroblast hücre hattı: Fare fibroblast hücresi olan bu hücre hattı hazırlanan formülasyonların toksisite testleri için kullanılmıştır.

L. major parazit hattı: Kutanöz ve mukokutanöz Leishmaniasis'in etkeni *L. major* parazitlerinde, hazırlanan formülasyonların parazit ve enfekte makrofaj üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir.

3.3 Metod

3.3.1 Hücre Kültürü Metodları

3.3.1.1 Hücre Hatlarının Kriyobanktan Çıkarılması

Deneylerde Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü "Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği" laboratuvarında bulunan kriyobanktan çıkarılan J774 ve L929 hücre hattı bulunan kriyotüpler 37 oC'deki su banyosunda çözündürüldü. Çözündürülen hücre süspansiyonu 5 ml %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerine eklendi ve 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet içerisinde 5 ml besiyeri bulunan 25 cm²'lik T25'lik flaska ekildi.

3.3.1.2 Hücre Hatlarının Kültürünün Yapılması

Hücrelerin devamlı kültürü %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerinde yapıldı. T25'lik flasklarda 5ml besiyeri içerisinde hücrelerin ekimi gerçekleşti. Kültürün durumu, hücrelerin morfolojisi ve proliferasyonu her gün düzenli olarak ters mikroskopta incelendi. Besiyeri, kültürün proliferasyonuna ve ortamın pH'sına bağlı olarak değiştirildi. Hücreler %90 yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsinizasyon işlemi gerçekleşti.

3.3.1.3 Hücre Hatlarının Tripsinizasyonu ve Pasajı

Tripsinizasyon işlemi için flastaki besiyeri döküldü ve hücreler 2 ml PBS ile 2 kez yıkandı. 2 ml Tripsin- EDTA flasklara eklenerek 37°C'de 5 dk inkübe edildi. Hücreler yüzeyden ayrıldığı ters mikroskopla gözlemlendikten sonra 4 ml RPMI 1640 (%10 FBS içeren) besiyeri içerisinde 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelletinden makrofajların sayımı yapılarak ml'deki makrofaj sayısı hesaplandı. Hücre sayısına göre her T25'lik flaskta 400,000 hücre olacak şekilde flask içine homojen bir şekilde dağıtıldı. Flasklar %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatöre bırakıldı.

3.3.1.4 Hücre Sayımı

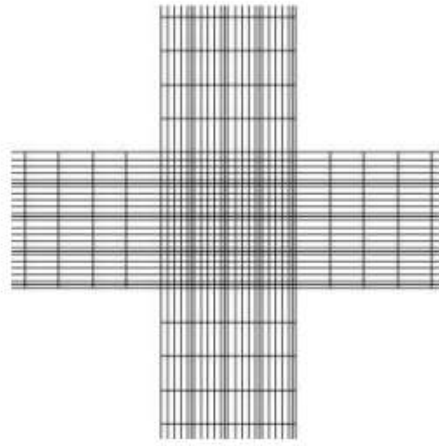
Hücrelerin sayımı, tripan mavisi ile thoma lamında yapıldı. Santrifüj yapılan hücre süspansiyonunun süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellet 1 ml besiyeri ile resüspanse edildi. Hücre süspansiyonundan 2 µl alınarak 1,5 ml'lik steril endorf tüpü içine konuldu. Üzerine 48 µl tripan mavisi solüsyonu ve 50 µl besiyeri eklendi. Thoma lamının alt ve üst kısımlarına lam ile lamel arasına kalacak şekilde 10 µl hücre süspansiyonundan dikkatlice yayıldı. Ters mikroskopta hücre sayımı gerçekleştirildi. Ayrıca pasaj sırasında elde edilen kültürün geri kalan kısmı kriyoprezervasyonu yapılarak kriyobankın oluşturulması için kullanıldı.

Hücre sayısı (1ml) = Ortalama canlı hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı sabiti (10,000)

Ortalama hücre sayısı: Thoma lamının alt ve üst kısımlarında bulunan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalaması

Sulandırma katsayısı: Pelletten alınan hücrelerin sayımı için yapılmış sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10.000



Şekil 3. 1 Thoma lamı görüntüsü

3.3.1.5 Hücre Hatlarının Kriyoprezervasyonu

Hücrelerin kriyoprezervasyonu için pasaj sonrası hücrelerin sayımı yapıldı, 1 ml'lik kriyotüpte 106 hücre, 50:50 oranında hücre/ kriyoprotektan olacak şekilde

alındı. Ardından yavaş dondurma işlemi başlatıldı. Hücreler 1 saat +4°C’de, 2 saat -200C’de ve bir gece -40°C’de tutularak, -196°C’deki kriyobanka aktarıldı.

3.3.1.6 *L. major* Parazit Hattının Kültürü

Deneylerde Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü “Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği” laboratuvarında bulunan kriyobanktan çıkarılan *L. major* promastigotlarını içeren kriyotüpler 37 °C’deki su banyosunda çözündürüldü. Daha sonra içerisinde 5 ml besiyeri bulunan T25’lik flaska ekilerek kültür başlatıldı. Kültür 27 °C sıcaklıkta CO₂ içermeyen etüvde inkübasyona bırakıldı.

Parazitlerin sayımı için Thoma lamı kullanıldı. Hareketli olan parazitlerin sayımı zor olduğu için fikse etmek amacıyla parazit kültürü 1:10 oranında formalinle sulandırıldı. Mikrotüpün içinde 90 µl formaline 10 µl parazit eklenerek solüsyon hazırlandı. Ependorftaki parazit-formalin solüsyonundan thoma lamının alt ve üst kısımlarına lam ile lamel arasına kalacak şekilde 10 µl hücre süspansiyonundan her iki yüzüne de eklendi ve ters mikroskopta sayımı yapıldı. Sayımda 1 ml’deki parazit sayısının bulunabilmesi için aşağıdaki formül kullanıldı.

1 ml’de bulunan toplam parazit sayısı = Thoma lamı sabiti x ortalama hücre sayısı x sulandırma katsayısı

Thoma lamında sayılan ortalama parazit sayısı: Lamın her iki bölmesindeki 16 büyük karenin içerisinde sayılan parazit sayısının aritmetik ortalaması

Sulandırma Katsayısı: Parazitler formalinle 1:10 oranında seyreltildiği için katsayı 10

Thoma Lamı Sabiti: 10000

T25’lik flasklarındaki 3-4 günlük parazitlerin inkübasyonundan sonra, kültürlerdeki promastigotların sayısı 8-10 milyon/ml parazite ulaştı. Hücre sayımı, ters mikroskopta hemasitometre yardımıyla yapıldı. T25’lik flasklardan T75’lik flasklara yaklaşık 4,5 ml kültür ilave edildi ve % 10 FBS ile zenginleştirilmiş 35 ml RPMI 1640, 1 milyon/ml parazit sayısı ile başlayarak daha büyük şişelerde kültürü başlatmak için ilave edildi. 3-4 günlük inkübasyonu takiben T75’lik şişelerinde maksimum parazit sayısı 8-10 milyon/ml’ye ulaştı.

3.3.2 Ekstraselüler Veziküllerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.3.2.1 Ekstraselüler Veziküllerin İzolasyonu için Örneklerin Hazırlanması

Ekstraselüler vezikül elde etmek için taze *Curcuma longa* (zerdeçal) bitkisi distile su ile yıkandı, katı meyve sıkacağı ile suyu sıkıldı ve filtre kâğıdından geçirildi. Elde edilen zerdeçal suyu 50 ml'lik 2 falkona aktarıldı. 300 g hızda 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant yeni tüplere aktarıldı ve 1000 g de 20 dk ve ardından 5000 g de 30 dk, 10000 g de 45 dk ve 20000 g de 1 saat olmak üzere santrifüj edildi. Her santrifüj basamağında süpernatant yeni tüplere aktarıldı ve pellet uzaklaştırıldı. Tüm işlemler +4°C'de gerçekleştirildi. Süpernatant sırasıyla 0.45 µm ve 0.22 µm'lik filtrelerden geçirildi. 1 kg taze zerdeçaldan yaklaşık 100 ml örnek elde edilmiştir.

3.3.2.2 Ekstraselüler Veziküllerin İzolasyonu

60 ml zerdeçal örneğinden Exo-spin™ kiti ile ekstraselüler vezikül izolasyonu yapıldı. Exospin™ tamponu, süpernatanın yarı hacminde tüpe eklendi ve 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Bunun için 50 ml'lik 2 ayrı falkonda bulunan 30 ml örneğin her birine 15 ml kitte hazır bulunan Exo-spin™ tamponu eklendi ve falkon tüp iyice ters düz edilerek karıştırıldı. Daha sonra örnek +40°C'de gece boyunca inkübe edildi. Inkübasyon sonrası örnekler 60 dk süreyle 16000 g'de +4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen pellet kit içerisinde bulunan PBS ile (100 µl) süspanse edildi ve 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Exo-spin™ kolonlarının hazırlanması aşamasında kolonlar kullanılmadan 15 dk önce oda sıcaklığına getirildi. Ardından kolonun altındaki kapak çıkarıldı, kolon atık toplama tüpüne yerleştirildi ve üst kapağı çıkarıldı. Mikropipet kullanılarak, koruyucu tamponu kolonun üzerinden aspire edildi. Kolonun kurumasını önlemek için hemen bir sonraki adıma geçildi. Kolona 200 µl Exo-spin™ PBS eklendi ve kolonlar 50 g'de 10 saniye boyunca santrifüj edildi. 100 µl eksozom örneği kolonlara aktarıldı ve kolonlar 50 g'de 60 saniye boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası atık tüpleri 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri ile değiştirildi. Kolonlara tekrar 200 µl Exo-spin™ PBS eklendi ve kolonlar 50 g'de 60 saniye boyunca santrifüj edildi ve böylece mikrosantrifüj tüplerinde 200 µl ekstraselüler vezikül örneği saf olarak elde edildi. Elde edilen eksozom içeren çözelti -80 °C'de daha sonra kullanılmak üzere depolandı.

3.3.2.3 Ekstraselüler Veziküllerin SEM ile Karakterizasyonu

Görüntüleme yapılabilmesi için örnek öncelikle yüksek vakum altında altın ile kaplandı. Karbon bant üzerine ekstraselüler veziküller yerleştirildi. İzole edilmiş zerdeçal kaynaklı ekstraselüler veziküller ArelPOTKAM'da FEI QUANTA 450 FEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelendi.

3.3.2.4 Ekstraselüler Veziküllerin Dinamik Işın Saçılımı ile Karakterizasyonu

Zerdeçal bitkisinden izole edilen ekstraselüler veziküller 995 µl PBS ve 5 µl olacak şekilde hazırlandı. 0.20 µm filtreden geçirildi. Boyut ve zeta potansiyel ölçümü Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü KMC-306 no.lu laboratuvarında bulunan Malvern Instruments ZetaSizer cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.2.5 Ekstraselüler Veziküllerin Akış Sitometrisi ile Karakterizasyonu

Her bir akış sitometri tüpüne 50 µl hacminde ekstraselüler vezikül eklendi. 1 tüp negatif kontrol diğer tüplere ise 10 µl CD63 PE/CD81APC ve CD9 FITC yüzey antikoru eklendi ve karanlık ortamda, oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 2 ml PBS ile 2200 g'de 5 dk santrifüj edildi. 300 µl PBS ile pellet çözülüp okundu. Flow sitometri deneyleri İstinye Üniversitesi'nde, BD FACS Calibur cihazında, Cell Quest Pro yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.6 Ekstraselüler Veziküller İçin Bradford Protein Tayini

Ekstraselüler veziküllerinin konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlendi. Bovine Serum Albumin (BSA) proteini ile 0, 20, 40, 60, 120 ve 200 µg/ml konsantrasyonları kullanılarak standart solüsyonları hazırlandı. Cam tüplere her bir konsantrasyon için 30 µl standart örneği, 1,5 ml Bradford reaktifi eklendi ve 10 dk inkübasyona bırakıldı. Blank için 30 µl distile su kullanıldı. 595 nm'de UV spektroskopisinde ölçüm alındı ve standart grafiği oluşturuldu. Daha sonra standart solüsyonunun ölçümüne benzer şekilde 30 µl örnek ve 1,5 ml Bradford reaktifi tüplere eklendi. 10 dk inkübasyonun ardından 595 nm'de ölçüm alındı. Standart grafiğinin doğru denklemi kullanılarak örneklerin protein miktarı µg/ml cinsinden belirlendi.

3.3.3 Hazırlanan Formülasyonların Hücre Hatları üzerinde MTT yöntemi ile Toksisitelerinin Tayini ve Toksik Olmayan Konsantrasyonların Belirlenmesi

Tek başlarına ekstraselüler veziküllerin ve Glukantim'in makrofaj hücreleri (J774) ve fibroblast hücreleri (L929) üzerinde toksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi ve buna göre kombinasyonların hazırlanması için MTT yöntemi kullanıldı. Ekstraselüler veziküller ve Glukantim'in tek başlarına toksik olmayan konsantrasyonları seçildi ve kombinasyonların da toksik etkileri MTT yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla ilk olarak her bir kuyucuğa 104 makrofaj ve fibroblast hücresi olacak şekilde 96 kuyulu plaklara ekim yapıldı. 48. ve 96. saatlerde ölçüm almak için 2 hücre için de 2'şer plak ekildi. Hücreler gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından ekstraselüler veziküller ve Glukantim'in 5 farklı konsantrasyonda (10-20-50-100-200 µg/ml) makrofaj ve fibroblast ekilen 96 kuyulu plaklara her bir konsantrasyon için 3 tekrar olacak şekilde eklendi. Ardından 37 °C'lik inkübatörde 48 ve 96 saat boyunca inkübe edildi. MTT testi için, 20 mg/ml tetrazolyum tuzu 2 ml PBS içerisinde çözöldü ve sırasıyla 0.22 µm ve 0.45µm'lik filtrelerden geçirilerek sterilizasyon sağlandı. Her bir kuyuya 10 µl MTT solüsyonu [(3-(4,5-Dimethylthiazol2-yl))-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]] verildi. Plaktaki hücreler 37 °C'lik inkübatörde 3,5 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 3,5 saatin sonunda oluşan formazan kristalleri ters mikroskopta gözlemlendi. Tuzların çözölməsi için kuyulara 100 µL DMSO solüsyonu eklendi ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Her bir kuyunun 570 nm'deki absorbans değeri Elisa Reader'da okundu.

3.3.4 Hazırlanan Formülasyonların *Leishmania major* Amastigot ve Promastigotları Üzerindeki Antileishmanial Etkinliklerinin İncelenmesi

3.3.4.1 Ekstraselüler Veziköl ve Glukantim Kombinasyonlarının *L.major* Promastigotlarının Proliferasyonu Üzerindeki Etkinliklerinin İncelenmesi

Stasyonier fazdaki *L. major* promastigotları, devam eden költürden 1 ml'de 10⁶ hücre olacak şekilde 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Bir gece 27 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, ekstraselüler veziköl ve Glukantim'in toksik olmayan konsantrasyonları tek başlarına ve kombinasyon halinde, bir gece inkübasyona bırakılan promastigotlar üzerinde uygulandı. Ependorflar tekrar 27°C'de inkübasyona bırakıldı. Antileishmanial etkinlik, formülasyonların

uygulamasının ardından 48. ve 96. saatlerde ependorflardaki parazit sayılarının thoma lamı yardımıyla sayılması ile saptandı. Parazit sayımını kolaylaştırmak için ependorftan alınan 10 µl parazit, 90 µl %2'lik formalinle karıştırılarak 5-10 dk bekletildi. Ardından thoma lamında aşağıdaki formül kullanılarak sayım yapıldı:

Parazit sayısı = Ortalama hücre sayısı x sulandırma katsayısı x thoma lamı sabiti

Parazit sayısı: 1 ml'deki parazit 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

3.3.4.2 Ekstraselüler Vezikül ve Glukantim Kombinasyonlarının *L.major* Promastigotlarının Metabolik Aktiviteleri Üzerindeki Etkinliklerinin İncelenmesi

Stasyonier fazdaki *L. major* promastigotları, devam eden kültürden alınarak sayım işlemi gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılan 96 kuyulu plaklarda her bir kuyuya 100 µl'de 100.000 promastigot düşecek şekilde ekim yapıldı. Plak bir gece 27 °C'de inkübasyona bırakıldı.

Daha sonra, ekstraselüler vezikül (100 µg/ml, 200 µg/ml) ve Glukantim'in (20 µg/ml, 50 µg/ml) toksik olmadığı belirlenen konsantrasyonları tek başlarına ve kombinasyon halinde kuyulara 3'er tekrar olacak şekilde eklendi. 48. ve 96. saatlerde ölçüm alabilmek için aynı şekilde 2 farklı plak hazırlandı. Formülasyonların eklenmesinden sonra plaklar 27 °C'de 48 ve 96 saat inkübasyona bırakıldı. 48 ve 96. Saatlerde her bir kuyucuğa, 10'ar µl (10 mg/ml) MTT solüsyonu eklendi. Daha sonra plak tekrar 4 saat 27 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre zarfından parazit kümelerinin içerisinde oluşan ve enzimatik aktiviteye bağlı hücre canlılığının bir göstergesi olan formazan kristallerinin oluşumu mikroskop yardımıyla takip edildi. 4 saatlik inkübasyonda hücre canlılığının bir göstergesi olan formazan kristalleri oluştu. Bu kristallerin çözünmesi için 4. saatin sonunda her bir kuyuya 100'er µl DMSO eklendi ve plak oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 30 dk bekletildi. Son olarak plak 570

nm'de ELISA Reader cihazında okutularak kuyulardaki absorbands değeri tayin edildi.

3.3.4.3 Ekstraselüler Vezikül ve Glukantim Kombinasyonlarının *L.major* Amastigotları Üzerindeki Etkisinin Enfeksiyon İndeksi Tayini ile Belirlenmesi

Ekstraselüler vezikül ve Glukantim kombinasyonlarının *L. major* amastigotları üzerindeki etkisinin enfeksiyon indeksi tayini ile belirlenebilmesi için J774 makrofaj hücreleri kuyu başına 30.000 hücre olacak şekilde 6'lık plaklara aktarıldı ve yüzeye tutunması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. Amastigot formunun oluşturulması için öncelikle makrofajlar *L. major* promastigotları ile enfekte edildi. Bunun için kuyulardaki makrofajlara, stasyonier fazda bulunan *L. major* promastigotları makrofajların sayıca 10 katı olacak şekilde, her bir kuyuya 300.000 parazit verildi. *L. major* verilen makrofajların, parazitlerce enfekte olabilmesi için 6'lık plaklar 4 saat 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 4 saatin sonunda makrofajların enfekte olup olmadığı ters mikroskop ile incelendi. Parazitlerin makrofaj içerisinde amastigot forma dönüştüğü tespit edildikten sonra, ekstraselüler veziküller belirlenen 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda, Glukantim 20 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda ve kombinasyonları olacak şekilde formülasyonlar hazırlandı. Amastigot-makrofaj kültürü bulunan kuyulardan biri formülasyon verilmeden kontrol gurubu olarak belirlendi. Diğer kuyulara hazırlanan formülasyonlar eklendi. Plaklar 37 °C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 48 saatin sonunda verilen formülasyonların enfeksiyon indeksinin hesaplanabilmesi için plaklarda bulunan enfekte makrofajlar Giemsa boya ile boyandı. Öncelikle kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırıldı. Her kuyu 1 kez 500 µl PBS ve 1 kez 500 µl 1:1.5 oranında PBS-metanol ile yıkandı. Daha sonra her kuyuya 250 µl metanol eklendi ve 10 dk bekletildi. Her kuyuya 200 µl Giemsa eklendi ve 3 dk bekletildi. Kuyular boya uzaklaştırılana kadar su ile yıkandı. Boyanmış enfekte makrofajlar ışık mikroskopunda 100 kat büyütme kullanılarak immersiyon yağı ile incelendi. Giemsa boya ile boyandığı tespit edilen kültürde her kuyu için 200 makrofaj sayılarak kaç tanesinin enfekte olduğu ve enfekte makrofaj başına düşen amastigot sayıldı.

Enfeksiyon indeksi = (Enfekte makrofaj sayısı / toplam makrofaj sayısı) x makrofaj başına düşen toplam amastigot sayısı

3.3.4.4 Ekstraselüler Vezikül ve Glukantim Kombinasyonlarının *L.major* Amastigotlarının Metabolik Aktiviteleri Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi

Ekstraselüler vezikül ve Glukantim kombinasyonlarının *L. major* amastigotları üzerindeki etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi için 6'lık plakalara 30.000 makrofaj ekildi ve 1 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından her bir kuyuya 300.000 *L. major* promastigotu verildi. Makrofajların parazitler ile enfekte olması için 4 saat 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda, Glukantim 20 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda ve kombinasyonları olacak şekilde formülasyonlar kuyulara verildi. 1 kuyu kontrol grubu olacak şekilde bırakıldı. Plaklar bu formülasyonlarla birlikte 48 saat 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 48 saatin sonunda formülasyonları içeren besiyeri uzaklaştırdı ve yeni besiyeri eklendi. Daha sonra plaklar 72 saat daha 27 °C'de inkübasyona bırakıldı. 27 °C'de makrofajlar parçalandı ve içerisindeki amastigotların dışarı çıkması sağlandı. Toplanan besiyerleri 96'lık plağa aktarıldı. Her bir kuyucuğa, 10'ar µl (10 mg/ml) MTT solüsyonu eklendi. Daha sonra plak tekrar 4 saat 27 °C'de inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonda hücre canlılığının bir göstergesi olan formazan kristalleri oluştu. Bu kristallerin çözünmesi için 4. saatin sonunda her bir kuyuya 100'er µl DMSO eklendi ve plak oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 30 dk bekletildi. Son olarak plak 570 nm'de ELISA Reader cihazında okutularak kuyulardaki absorbans değerleri tayin edildi.

3.3.4.5 Ekstraselüler Vezikül ve Glukantim Kombinasyonlarının *L.major* Amastigotlarının Proliferasyonu Üzerindeki Etkinliğinin Mikro Kültür Yöntemiyle İncelenmesi

Ekstraselüler vezikül ve Glukantim kombinasyonlarının *L.major* amastigotlarının proliferasyonu üzerindeki etkinliğinin mikro kültür yöntemiyle incelenmesi için, kuyu başına 30.000 makrofaj 6'lık plaklara ekildi ve tutunması için bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından makrofaj başına 10 parazit gelecek şekilde *L. major* promastigotları ile enfekte edildi ve amastigot dönüşümü için 4 saat 37 °C'de inkübe edildi. Her bir kuyuya belirlenen formüsyonlar eklendi. 48

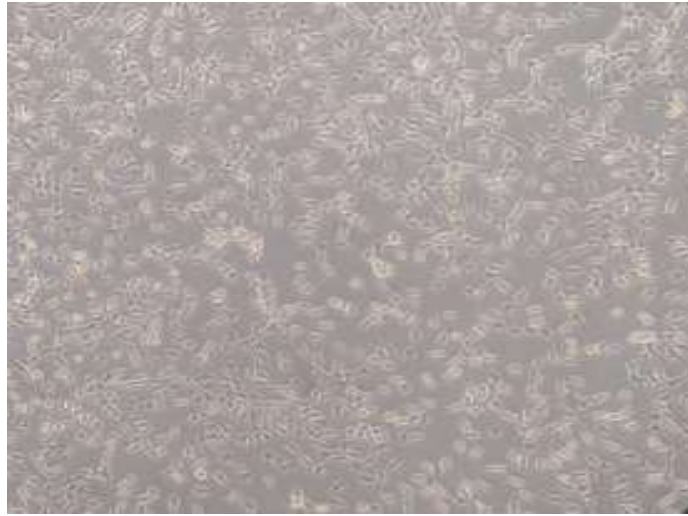
saat 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra plaklar 72 saat daha 27 °C'de inkübasyona bırakıldı. 27 °C'de makrofajlar parçalandı ve içerisindeki amastigotların dışarı çıkması sağlandı. Her bir kuyudaki besiyeri mikrokapiler tüp içerisine aktarıldı. Bir gece mikrokapiler tüp içerisinde inkübasyona bırakıldı. Mikro kültür yöntemi ile amastigot-promastigot dönüşümü sağlandı. Inkübasyonun ardından kapiler tüpler içerisindeki promastigotlar ters mikroskop altında gözlemlendi. Promastigot yoğunluğu, gözlenen alanda 20'nin üzerinde parazit için 6+, 20 parazit için 5+, 15 parazit için 4+, 10 parazit için 3+, 5 parazit için 2+ ve 1 ile 5 arasında parazit için + olarak belirlendi.

3.3.4.6 Ekstraselüler Vezikül ve Glukantim Kombinasyonlarına Maruz Bırakılan Makrofaj Hücrelerinin Ürettikleri Nitrik Oksit Miktarının Tayin Edilmesi

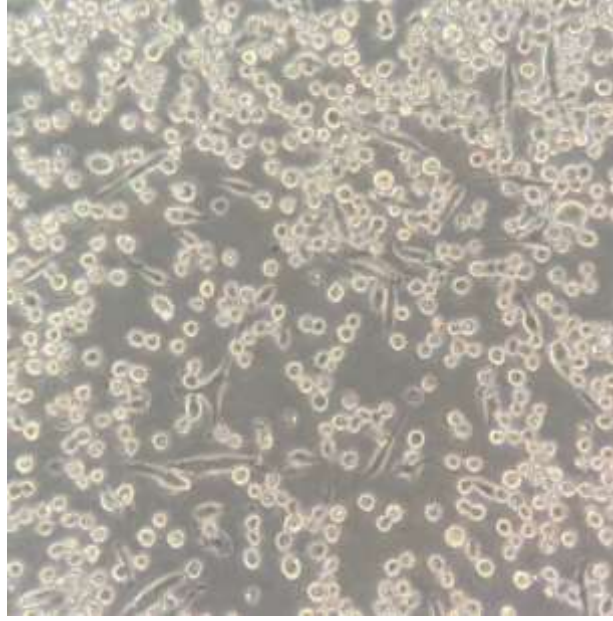
J774 makrofaj hücreleri kuyu başına 30.000 hücre olacak şekilde 96'lık plaklara aktarıldı ve yüzeye tutunması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda, Glukantim 20 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda ve kombinasyonları olacak şekilde formülasyonlar kuyulara verildi ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saatin ardından kuyulardaki besiyerleri toplandı. Ekstraselüler vezikül ve Glukantim kombinasyonlarının, makrofajların nitrik oksit üretmeleri üzerindeki etkinlikleri Griess reaksiyonu ile kalorimetrik ölçüm ile belirlenmiştir. İlk olarak standart solüsyonların hazırlanması için 0,345 g sodyum nitrit 10 ml distile su ile çözüldü ve stok çözelti oluşturuldu. Bu stok çözeltiden sırasıyla 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 ve 0.5 µM'lık standartlar hazırlandı. Toplanan besiyerleri ve standart çözeltilerinden 50 µl alınarak 96'lık plakalara eklendi ve üzerlerine 50 µl Griess reaktifi eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 540 nm'de ölçüm yapıldı.

4.1 J774 Makrofaj ve L929 Fibroblast Hücrelerinin Kültürü

Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Doku Mühendisliği ve Hücre Kültürü Laboratuvarında bulunan kriyobanktan çıkarılan J774 makrofaj ve L929 fibroblast hücrelerinin kültürü için %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri hazırlandı. Kriyobanktan çıkarılan J774 ve L929 hücreleri 37 °C'de su banyosunda çözündürüldü ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet filtreli T25'lik flaska 5 ml besiyeri ile ekildi. Hücrelerin proliferasyonu ve morfolojisi düzenli olarak ters mikroskop ile incelendi. Kültürün 7. gününde hücrelerin normal şekilde proliferasyon gösterdiği, homojen yayılma gösterdiği, parlak ve canlı olduğu belirlendi.



Şekil 4. 1 L929 Fibroblast hücrelerinin görüntüsü (10X)



Şekil 4. 2 J774 Makrofaj hücrelerinin görüntüsü (10X)

4.2 Leishmania Kültürü

L. major parazit kültürü için %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri hazırlandı. Kriyobanktan çıkarılan *L. major* parazitleri 37 °C'de su banyosunda çözdürüldü ve filtresiz T25'lik flaska 5 ml besiyeri ile ekildi. Hücrelerin proliferasyonu düzenli olarak ters mikroskop ile incelendi. Kültürün 5. gününde parazitlerin normal şekilde proliferasyon olduğu belirlendi.



Şekil 4. 3 *Leishmania* kültürü T25 ve T75'lik flasklar



Şekil 4. 4 *Leishmania* parazitlerinin görüntüsü (10X)

4.3 Ekstraselüler Veziküllerin İzolasyonu

Curcuma longa bitkisinin suyundan ekstraselüler veziküllerin izolasyonu için Exo-spin™ eksozom izolasyon kiti kullanıldı. Ön santrifüj basamaklarının ardından süpernatant yarı hacimde Exo-spin™ buffer 50 ml'lik falkonda karıştırıldı ve gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 60 dk, 16.000 g'de +4 °C'de santrifüj edildi. Oluşan pellet 100 µl Exo-spin™ PBS ile resüspanse edilerek kitti mevcut olan kolondan geçirilerek -40 °C'de saklandı.

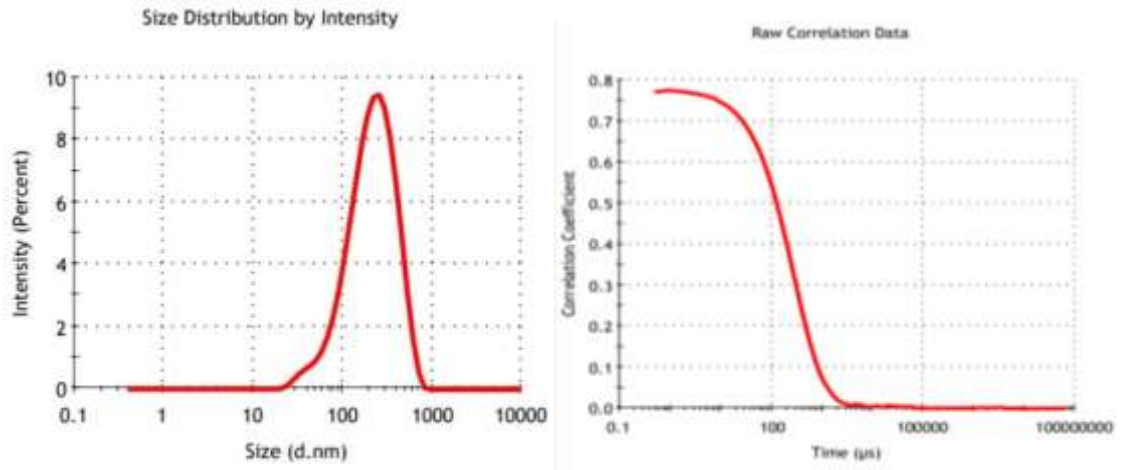


Şekil 4. 5 *Curcuma longa* bitkisinin izolasyon adımları

4.4 Ekstraselüler Veziküllerin Karakterizasyonu

4.4.1 Ekstraselüler Veziküllerin Boyut Analizi

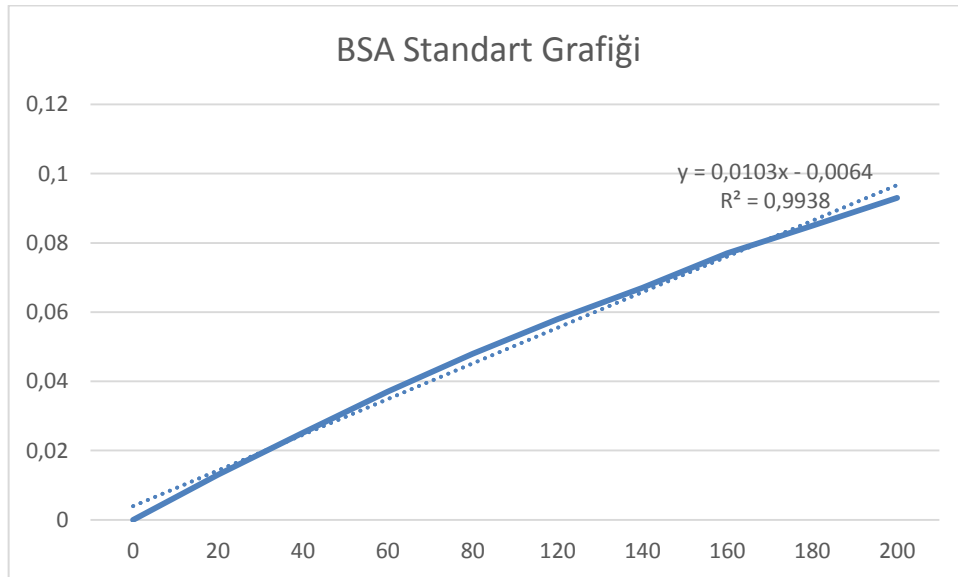
Curcuma longa kaynaklı ekstraselüler veziküllerin dinamik ışık saçılması yöntemi ile ölçülen boyut analiz grafikleri Şekil 4.6' da verildi. İzole edilen ekstraselüler veziküllerin ortalama boyutu 198,3 nm, çoklu dağılım indisi(PDI) 0,376 olarak ölçüldü.



Şekil 4. 6 *Curcuma longa* kaynaklı ekstraselüler veziküllerin Zeta- Sizer boyut dağılım grafikleri

4.4.2 Ekstraselüler Veziküllerin Protein Miktarının Belirlenmesi

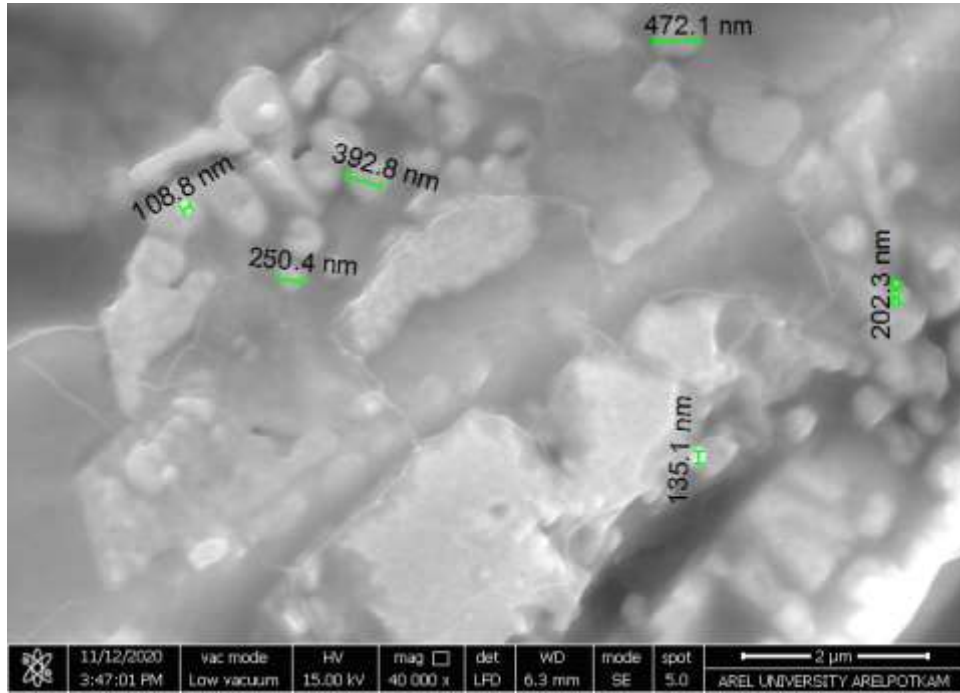
EV'lerin Bradford Assay ile protein tayini için hazırlanan BSA standart grafiği Şekil 4.7'de verildi. BSA ile hazırlanan standart grafiğinin denklemi $y=0,0103x-0,0064x$, R^2 değeri 0,99 olarak hesaplandı. BSA standart grafiğinin denklemine göre ekstraselüler vezikül örneklerinin protein konsantrasyonu 241 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi.



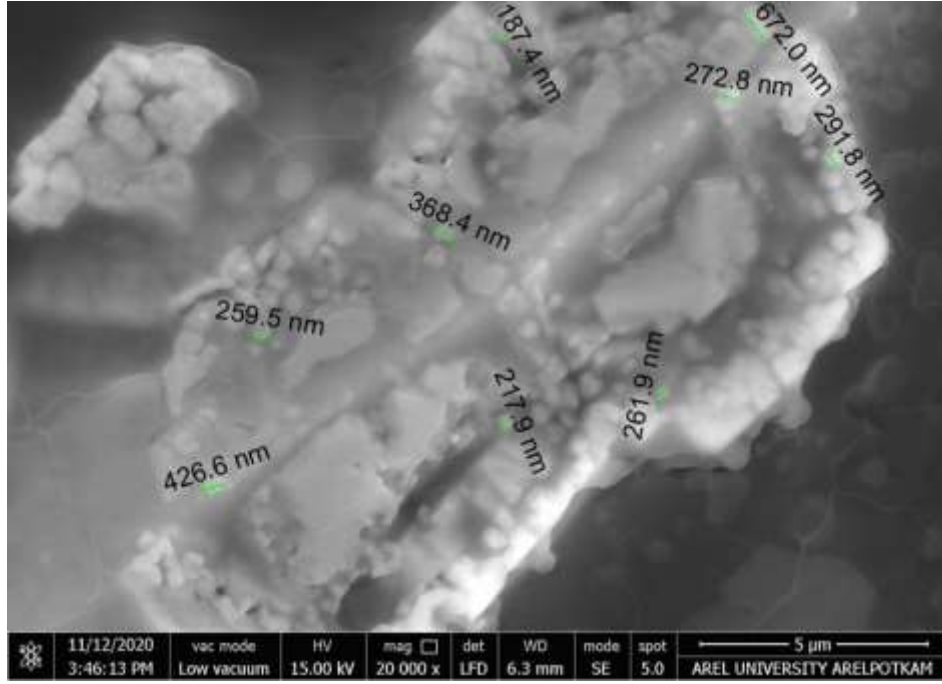
Şekil 4. 7 BSA Standart Grafiği

4.4.3 Ekstraselüler Veziküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu

Ekstraselüler veziküllerin taramalı elektron mikroskobu ile farklı büyütme oranlarındaki görüntüleri Şekil 4.8 ve 4.9’da verilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu ile yüzey morfolojilerinin küresel ve ‘cup’ şeklinde olduğu gösterilmiştir. Görüntü zetasizer boyut ölçümünü destekler niteliktedir.



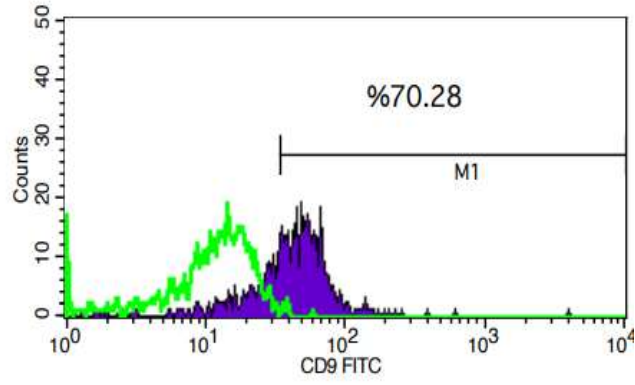
Şekil 4. 8 *Curcuma longa* kaynaklı ekstraselüler veziküllerin SEM görüntüsü (40.000X)



Şekil 4. 9 *Curcuma longa* kaynaklı ekstraselüler veziküllerin SEM görüntüsü (20.000X)

4.4.4 Ekstraselüler Veziküllerin Yüzey Belirteçlerinin Akış Sitometrik Analizi

Ekstraselüler veziküllerin CD9-FITC, CD63-PE ve CD81-APC yüzey belirteçleriyle gerçekleştirilen analiz sonuçları Şekil 4.10- 4.11- 4.12’de verilmiştir. Analiz ekstraselüler veziküllerin CD63 ve CD81 belirteçlerine çok yüksek oranda spesifik olduğu ancak CD9 belirteğine spesifikliğin nispeten daha düşük olduğu belirlendi.

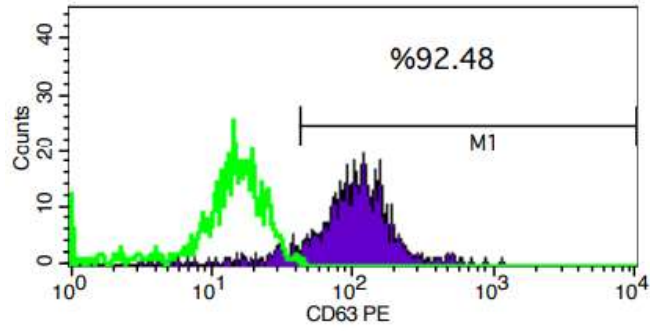


File: Kurkumin Manuel /14.11.19.004

Total Events: 10000

Marker	% Gated
All	100.00
M1	70.28

Şekil 4. 10 Ekstraselüler Veziküllerin CD9 Yüzey Belirtecinin Akış Sitometrik Analizi

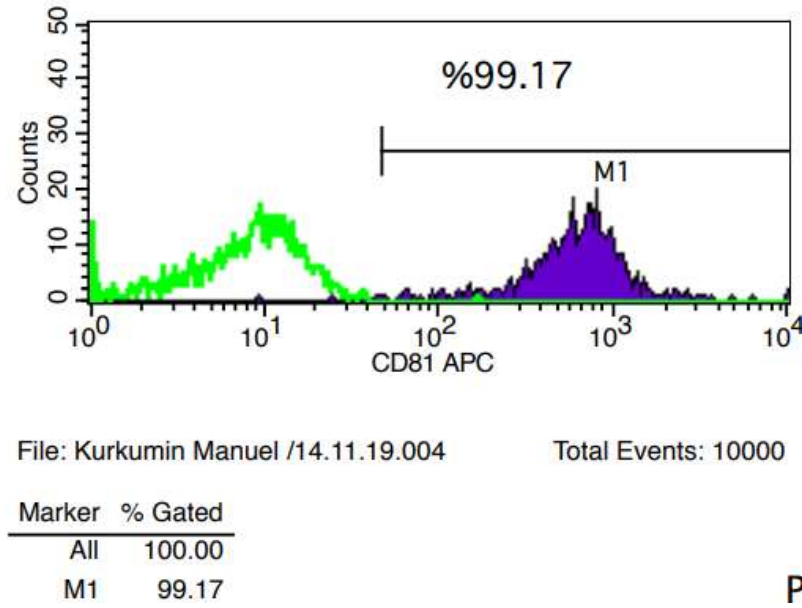


File: Kurkumin Manuel /14.11.19.004

Total Events: 10000

Marker	% Gated
All	100.00
M1	92.48

Şekil 4. 11 Ekstraselüler Veziküllerin CD63 Yüzey Belirtecinin Akış Sitometrik Analizi

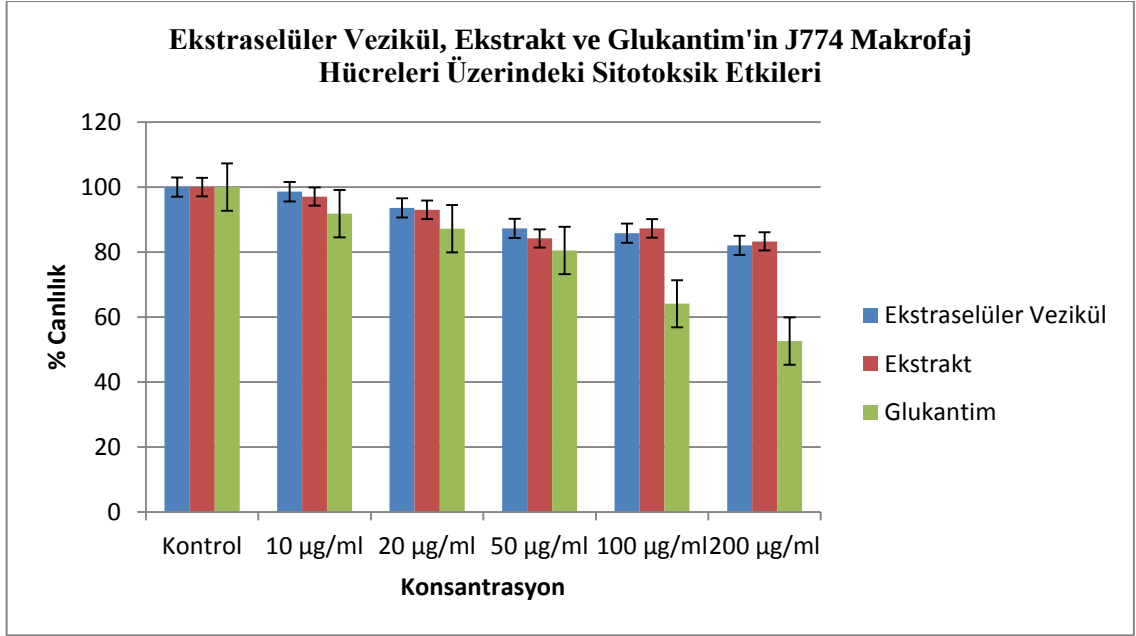


Şekil 4. 12 Ekstraselüler Veziküllerin CD81 Yüzey Belirtecinin Akış Sitometrik Analizi

4.5 Hazırlanan Ekstraselüler Veziküllerin Hücre Hatları Üzerinde Etkinliğinin *in vitro* İncelenmesi

4.5.1 Ekstraselüler Veziküller, Ekstrakt ve Glukantim'in J774 Makrofaj Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

Şekil 4.13' de ekstraselüler veziküllerin, ekstraktın ve Glukantim'in 10, 20, 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında J774 makrofaj hücre hattı üzerinde 48 saat inkübasyonunun ardından toksisite değerleri verilmiştir. Burada amaç ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının oluşturulabilmesi için toksik olmayan konsantrasyonların belirlenmesidir. Grafikte görüldüğü gibi ekstraselüler veziküllerin ve ekstraktın artan konsantrasyonlarda sitotoksik etkisinin arttığı ancak bu hücre hattı üzerinde önemli derecede toksisiteye sahip olmadıkları ve IC50 değerlerinin >200 µg/ml olduğu belirlendi. Kontrole kıyasla, Glukantim'in 10, 20 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında makrofajlarda daha yüksek canlılık görüldü. Glukantim için IC50 değeri yaklaşık 200 µg/ml olarak hesaplandı. Bu sonuçlardan yola çıkılarak kombinasyonlar için ekstraselüler veziküller için 100 ve 200 µg/ml, Glukantim için 20 ve 50 µg/ml non- toksik konsantrasyonların kullanılmasına karar verildi.

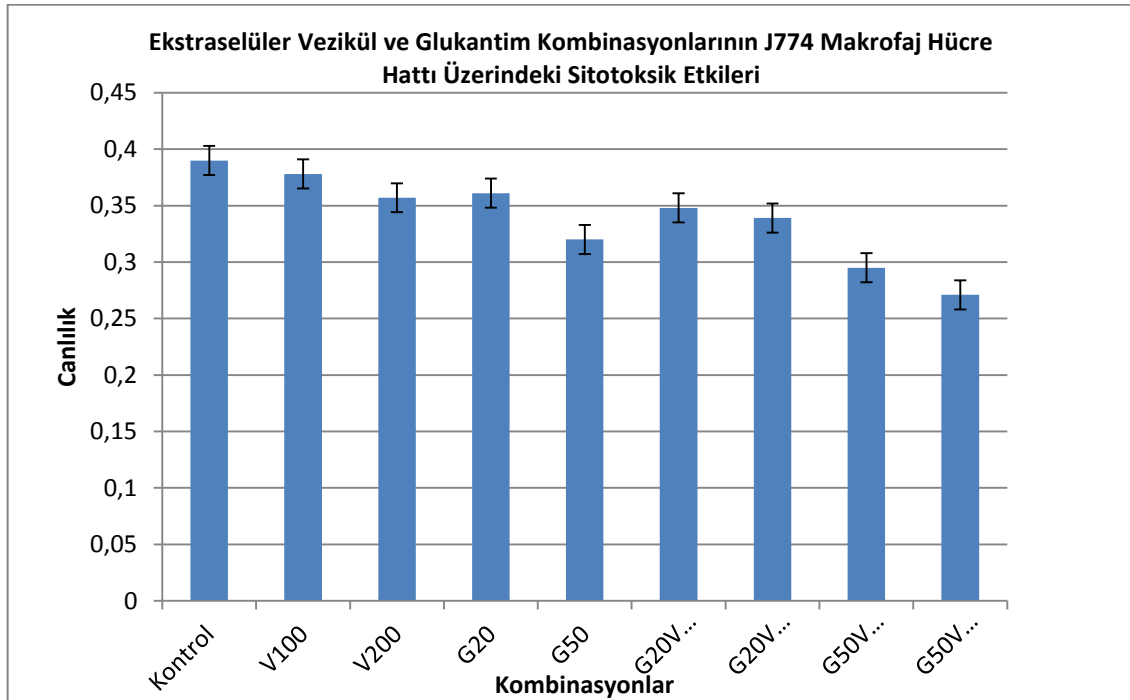


Şekil 4. 13 Ekstraselüler vezikül, ekstrakt ve Glukantim'in J774 makrofaj hücre hattı üzerindeki sitotoksikite analizi

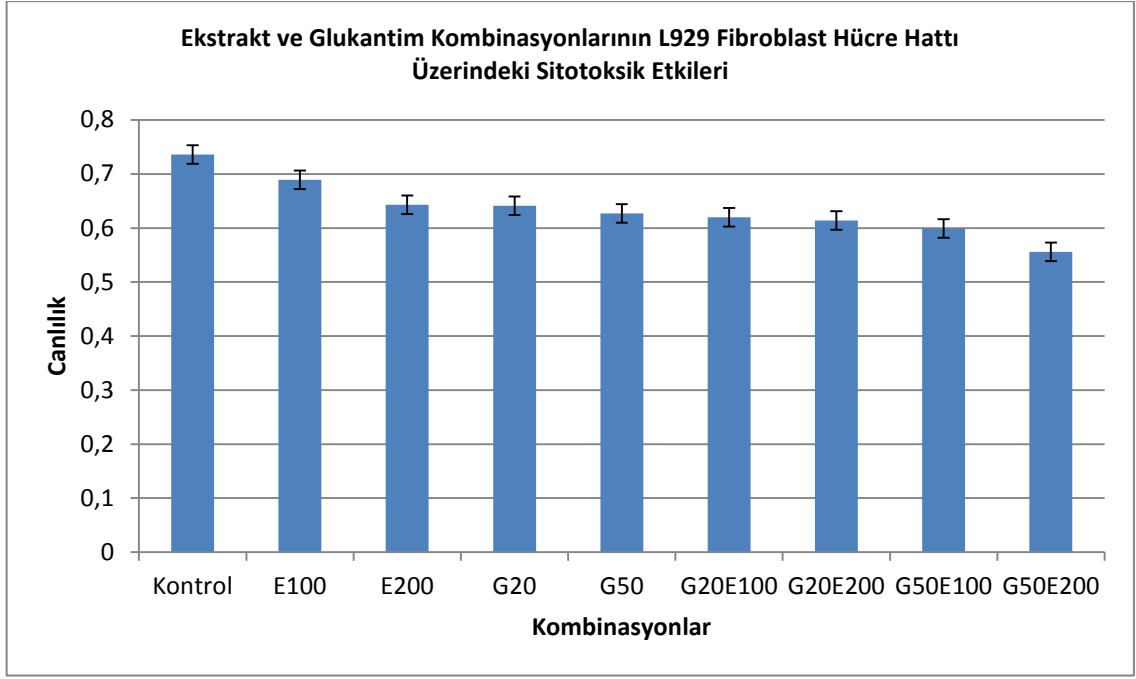
Tablo 4.1'de belirtilen kombinasyonlar hazırlandı ve J774 makrofaj ve L929 fibroblast hücre hatları üzerinde hazırlanan kombinasyonların sitotoksik etkileri Şekil 4.14 – 4.15 'de verildi. Hazırlanan formülasyonların tek başlarına olduğu şekilde kombinasyon halinde de J774 makrofaj ve L929 fibroblast hücre hatları üzerinde sitotoksik olmadığı gösterildi.

Tablo 4. 1 Ekstraselüler vezikül ve Glukantim kombinasyonları

Ekstraselüler Vezikül 100 µg/ml	V100
Ekstraselüler Vezikül 200 µg/ml	V200
Ekstrakt 100 µg/ml	E100
Ekstrakt 200 µg/ml	E200
Glukantim 20 µg/ml	G20
Glukantim 50 µg/ml	G50
Ekstraselüler Vezikül 100 µg/ml+ Glukantim 20 µg/ml	G20V100
Ekstraselüler Vezikül 100 µg/ml+ Glukantim 50 µg/ml	G50V100
Ekstraselüler Vezikül 200 µg/ml+ Glukantim 20 µg/ml	G20V200
Ekstraselüler Vezikül 200 µg/ml+ Glukantim 50 µg/ml	G50V200



Şekil 4. 14 Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının J774 makrofaj hücre hattı üzerindeki sitotoksikite analizi



Şekil 4. 15 Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının L929 fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksikite analizi

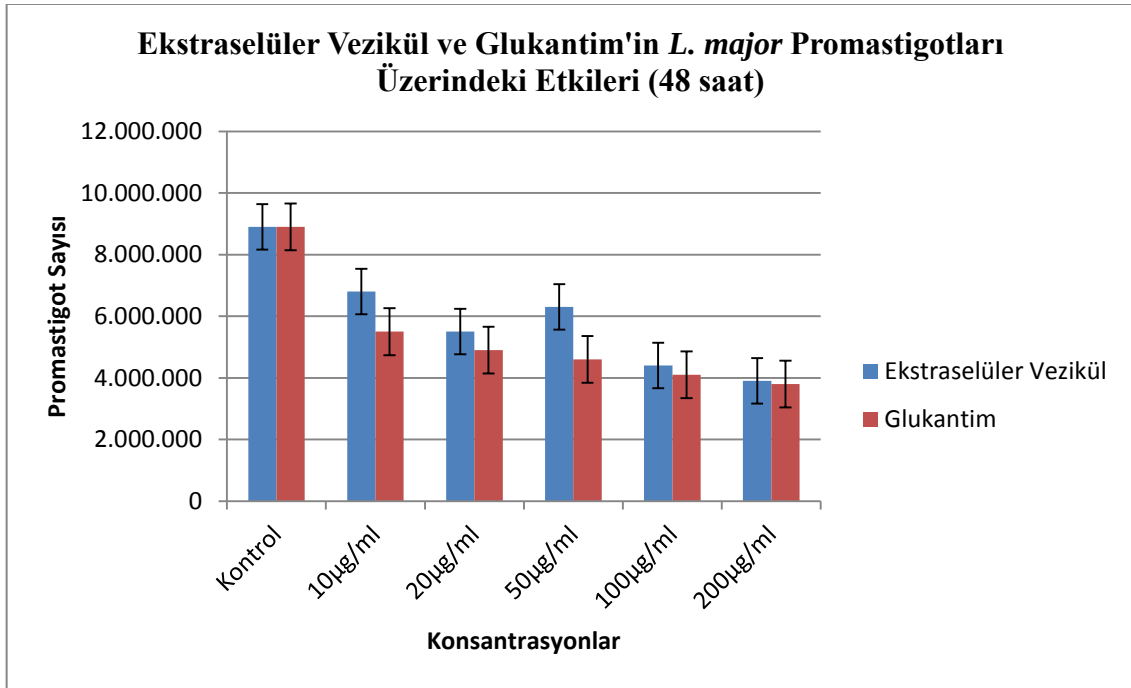
4.5.2 Ekstraselüler Vezikül -Glukantim Kombinasyonlarının *L. major* Promastigotlarının Proliferasyonu Üzerindeki Antileishmanial Etkisi

Şekil 4.16'da kontrol grubu ve G50V200 kombinasyonuna maruz kalmış tüp içerisindeki parazitlerin 48 saat inkübasyon sonucunda görüntüleri verilmiştir. Kontrol grubunda görülen sarı renk G50V200 kombinasyonuna maruz kalan parazitlere oranla, kontrol grubunda çok yüksek oranda proliferasyon olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 16 Formülasyonların *L. major* promastigot kültüründe pH' a olan etkisi (Kontrol ve G50V200)

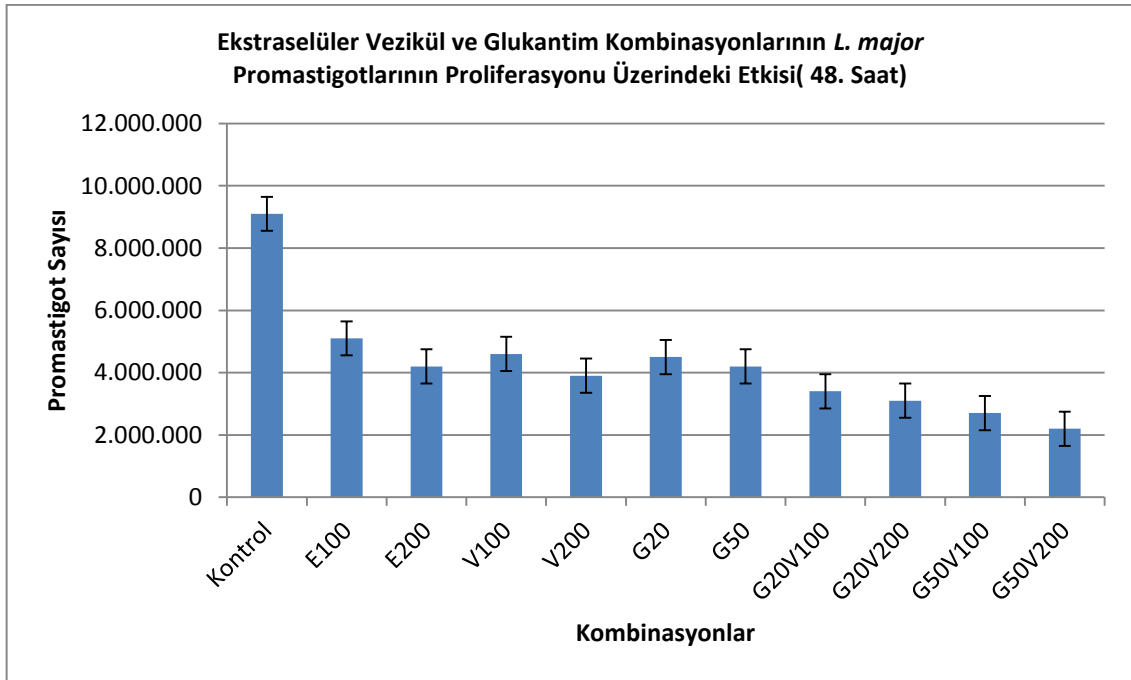
Şekil 4.17'de ekstraselüler vezikül ve Glukantim'in tek başlarına 10- 200 µg/ml konsantrasyonlarda *L. major* promastigotları üzerindeki etkileri verilmiştir. Artan konsantrasyonlarla orantılı olarak inhibisyon etkisinin arttığı ancak tek başlarına uygulanan en yüksek konsantrasyonda bile yarı yarıya azalma olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 17 Ekstraselüler vezikül ve Glukantim'in *L. major* promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki etkisi

L. major promastigotları 48 ve 96 saat süre ile Tablo 4.1'de belirtilen formülasyonlara maruz bırakılmıştır.

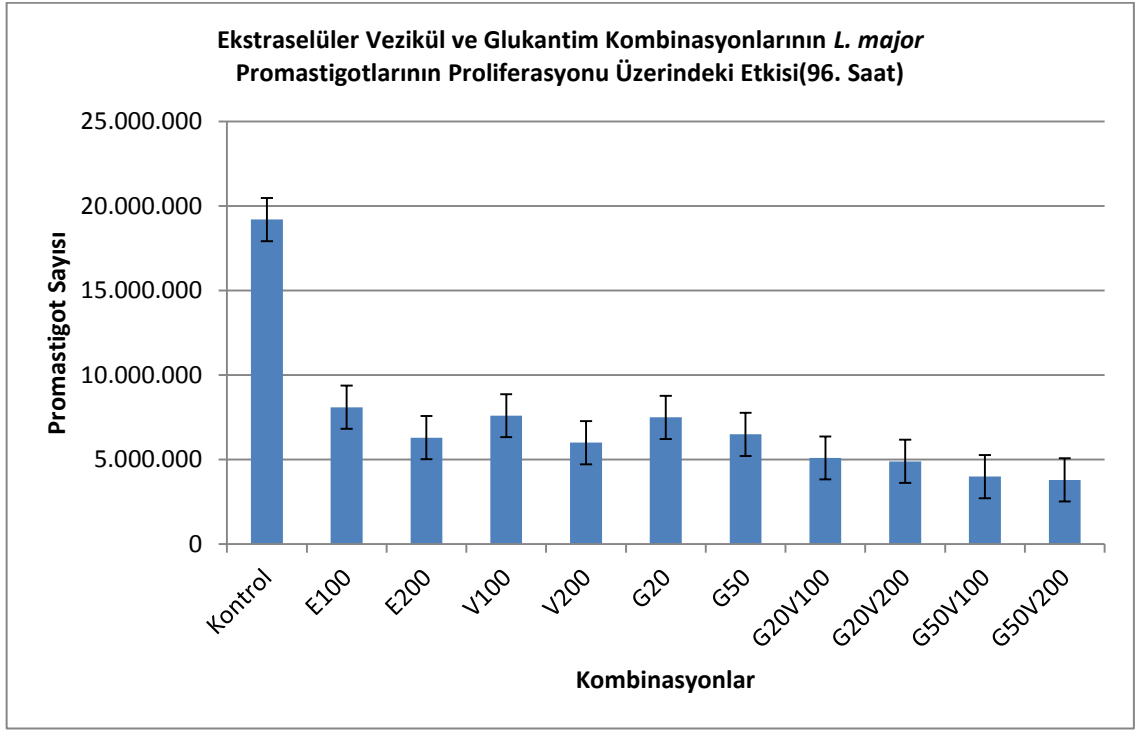
48. saatte formülasyonların *L. majör* promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki etkinlikleri Şekil 4.18'de verilmiştir. Ekstraselüler veziküllerin 200 µg/ml konsantrasyonunda promastigot proliferasyonunu yarı yarıya azalttığı ve promastigotlar üzerinde ekstrakta olduğu kadar antileishmanial etkinliği olduğu görüldü. Tek başlarına Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonunda veziküllere benzer şekilde yaklaşık yarı yarıya inhibisyon görüldü. Kombinasyonları şekilde verilen formülasyonlarda ise etkinliklerinin arttığı gözlemlenmiştir. Proliferasyon G50V200 kombinasyonunda kontrole göre yaklaşık 4 kat Glukantim'in tek başına 50 µg/ml konsantrasyonuna göre ise yarı yarıya azalma görülmüştür. Glukantim'in kombinasyonun etkinliğini gösterebilmesi için 200 µg/ml'den daha yüksek bir toksik konsantrasyonda uygulanması gerekmektedir.



Şekil 4. 18 Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının *L. major* promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki 48. saatteki etkinliği

96. saatte formülasyonların *L. major* promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki etkinlikleri şekil 4.19'da verilmiştir. Tek başlarına ekstraselüler veziküllerin 48. saate göre etkinliğinin daha yüksek olduğu ve kontrole kıyasla ekstrakta benzer şekilde 200 µg/ml konsantrasyonunda yaklaşık 3 kat azalma sağladı

görülmektedir. Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonunda promastigot proliferasyonu 3 kat azalmışken kombinasyonları şekilde verilen formülasyonlarda etkinliklerinin arttığı gözlemlenmiştir. Proliferasyon, G50V200 kombinasyonunda kontrole göre 5 kat, Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonuna kıyasla yarı yarıya azalma göstermiştir. Glukantim'in bu etkinliği tek başına göstermesi için toksik konsantrasyonlara çıkılması gerekmektedir.



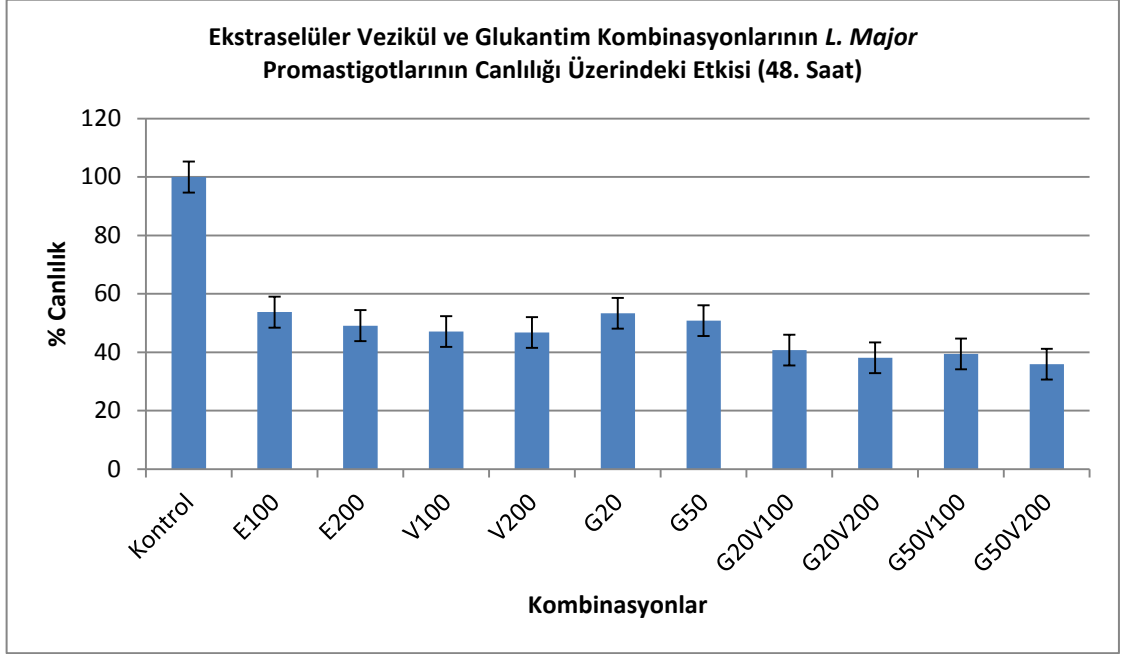
Şekil 4. 19 Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının *L. major* promastigotlarının proliferasyonu üzerindeki 96. saatteki etkinliği

4.5.3 Ekstraselüler Vezikül -Glukantim Kombinasyonlarının *L.major* Promastigotlarının Canlılığı Üzerindeki Antileishmanial Etkisi

Şekil 4.20 ve 4.21'de, tablo 4.1'de verilen formülasyonların *L.major* promastigotlarının canlılığı üzerindeki 48 ve 96. saatlerdeki antileishmanial etkisi verilmiştir.

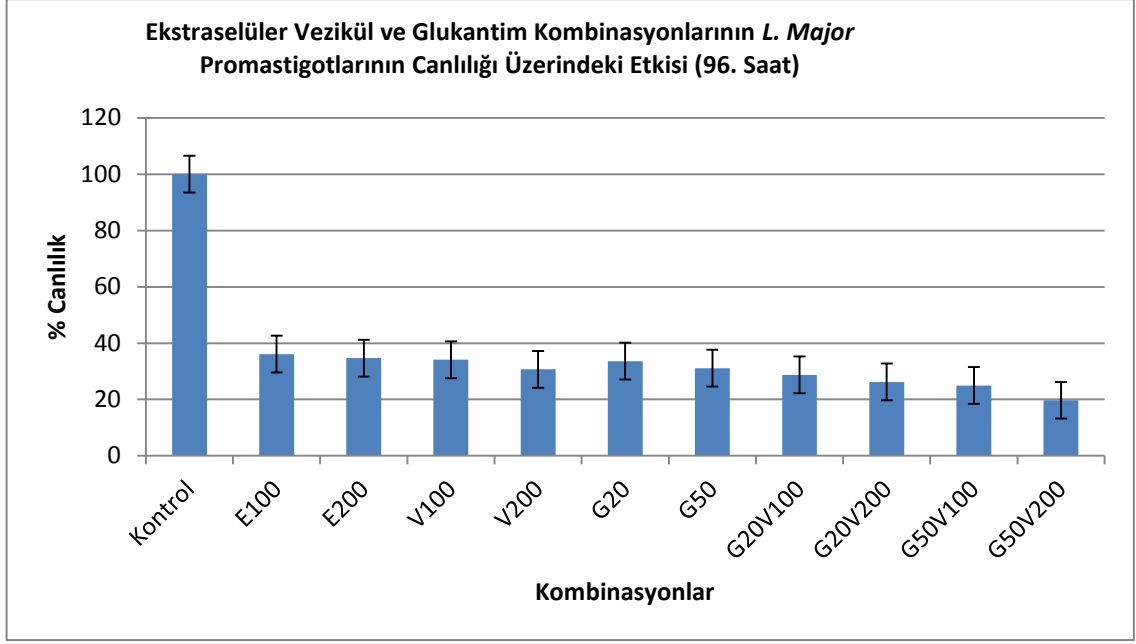
48. saatte ekstraselüler veziküllerin 200 µg/ml konsantrasyonunda promastigotların canlılığının %50 değerine düştüğü ve promastigotlar üzerinde ekstrakta benzer şekilde antileishmanial etkinliği olduğu görüldü. Tek başına Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonunda veziküllere benzer şekilde %50 canlılık

görüldü. Kombinasyonları şekilde verilen formülasyonlarda ise G50V200 kombinasyonunda %35'e düşmüştür.



Şekil 4. 20 Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının *L. major* promastigotlarının canlılığı üzerindeki 48. saatteki etkinliği

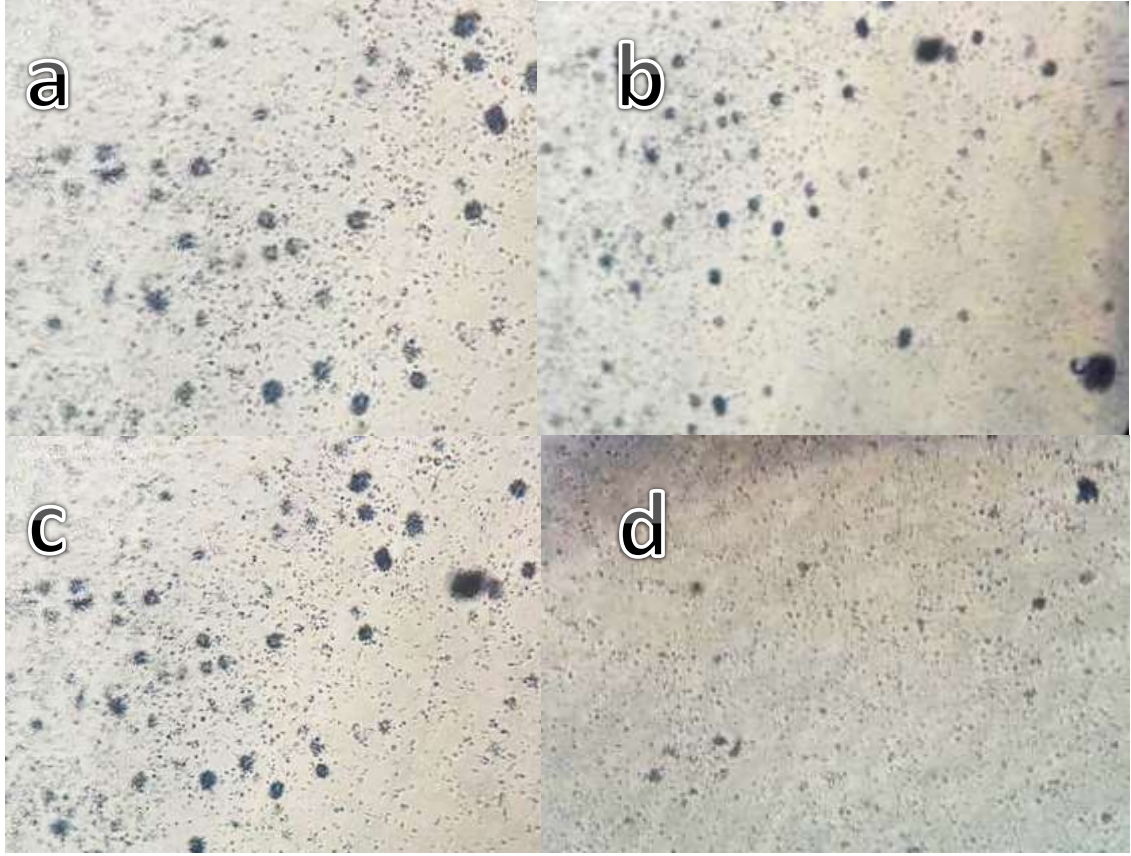
96. saatte 200 µg/ml konsantrasyonunda ekstrakt ve ekstraselüler vezikül promastigot canlılığını %30'lara kadar düşürmüştür. Glukantim 50 µg/ml konsantrasyonunda benzer bir canlılık yüzdesi sağlamıştır. G20V200 kombinasyonu olarak verildiğinde ise canlılık %20ye kadar düşmüştür.



Şekil 4. 21 Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının *L. major* promastigotlarının canlılığı üzerindeki 96. saatteki etkinliği

Ekstraselüler Vezikül-Glukantim kombinasyonları, hem *L. majör* promastigotlarının proliferasyonunda hem de canlılığı üzerinde tek başına Glukantim uygulamasına göre daha yüksek oranda antileishmanial etki göstermektedir.

Şekil 4.22’de MTT reaktanının etkisiyle metabolik aktivitenin ve canlılığın göstergesi olarak oluşan *L. major* parazitlerindeki formazan kristallerinin mikroskop görüntüleri verilmiştir. Kontrol grubuna nazaran formülasyonların verildiği parazitlerde formazan kristali oluşumunda ciddi bir azalma görülmüştür.



Şekil 4. 22 Farklı formülasyonların *L. major* promastigotları üzerindeki etkileri

(a) Kontrol grubu (b) 50 µg/ml Glukantim'e maruz kalan promastigotlarda oluşan formazan kristalleri (c) 200 µg/ml ekstraselüler veziküle maruz kalan promastigotlarda oluşan formazan kristalleri (d) G50V200 kombinasyonuna maruz kalan promastigotlarda oluşan formazan kristalleri

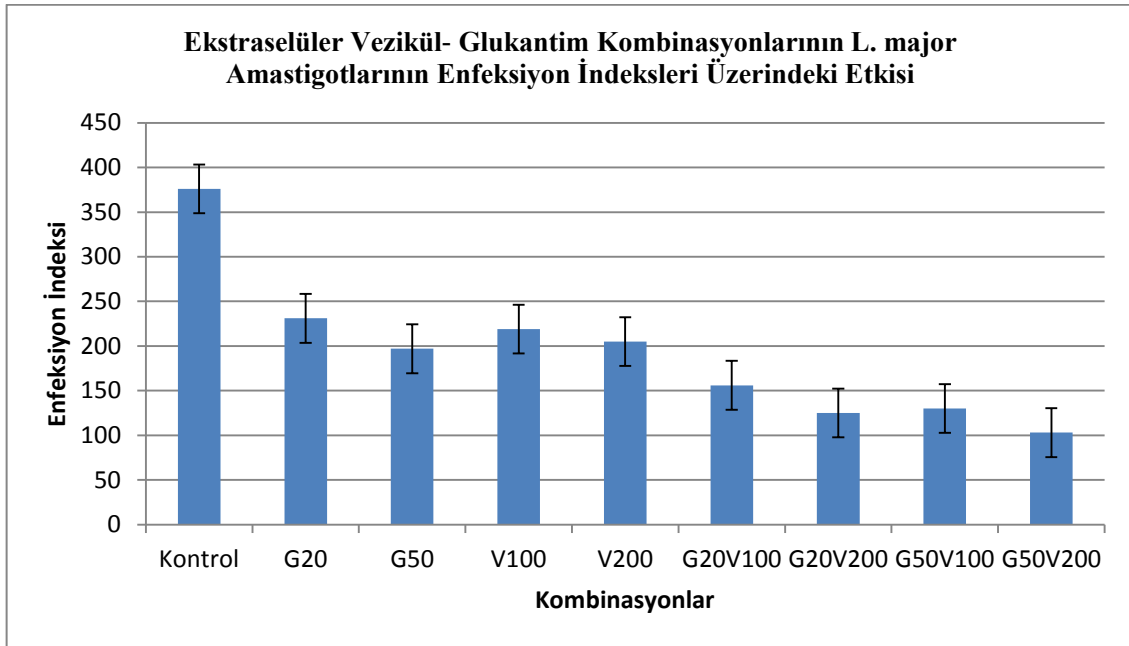
4.5.4 Ekstraselüler Vezikül- Glukantim Kombinasyonlarının *L.major* Amastigotlarının Enfeksiyon İndeksi Üzerindeki Etkisi

Tablo 4.2'de tek başlarına Glukantim'in 20 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarının, ekstraselüler veziküllerin 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının *L. major* ile enfekte olmuş makrofajlar üzerindeki enfeksiyon indeksi değerleri verilmiştir.

Tablo 4. 2 *L. major* amastigotları ile enfekte makrofajlarda enfeksiyon indekslerinin hücrelere uygulanan formülasyonlara göre değişimi

Formülasyonlar	Enfeksiyon İndeksi
Kontrol	376
G20	231
G50	197
V100	219
V200	205
G20V100	156
G20V200	125
G50V100	130
G50V200	103

Şekil 4.23’de görüldüğü üzere tek başlarına Glukantim’in 50 µg/ml konsantrasyonunda ve ekstraselüler veziküllerin 200 µg/ml konsantrasyonunda amastigotların enfeksiyon indeksleri yarı yarıya düşüş göstermiştir. Ancak kombinasyonları şeklinde uygulandıklarında antileishmanial etkinliklerinin arttığı görülmüştür. Enfeksiyon indeksi değerlerinde G20V200 kombinasyonunda kontrole göre yaklaşık 3 kat, G50V200 kombinasyonunda ise yaklaşık 4 kat düşüş görülmüştür. Glukantim’in 50 µg/ml konsantrasyonuna kıyasla G50V200 kombinasyonunda enfeksiyon indeksinde 2 kat daha fazla azalma görülmektedir.



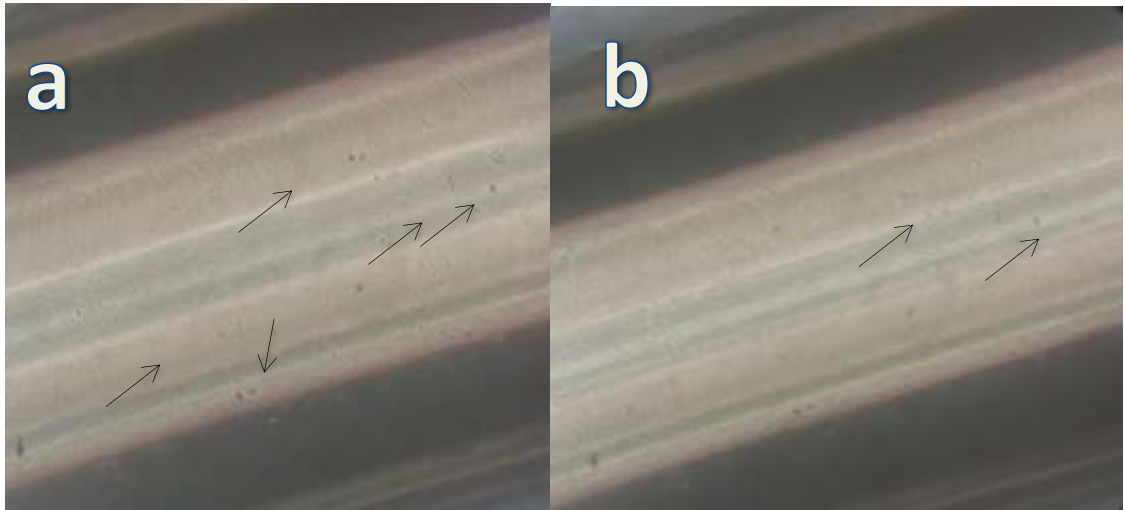
Şekil 4. 23 Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının *L. major* amastigotlarının enfeksiyon indeksi üzerindeki etkisi

4.5.5 Ekstraselüler Vezikül- Glukantim Kombinasyonlarının *L.major* Amastigotlarının Proliferasyonu Üzerindeki Antileishmanial Etkinliğinin Mikro Kültür Yöntemiyle Gösterilmesi

Tablo 4.3’de her bir formülasyon için parazit yoğunluğu verilmiştir. Glukantim ve ekstraselüler veziküllerin tek başlarına konsantrasyonları promastigot yoğunluğunda kısmi bir düşüşe neden olmakla birlikte kombinasyonlara maruz kalan gruplarda parazit yoğunluğu anlamlı bir şekilde düşmüştür.

Tablo 4. 2 Formülasyonların *L. majör* promastigot yoğunluğuna etkisi

Formülasyonlar	Promastigot Yoğunluğu
Kontrol	6+
G20	5+
G50	5+
V100	5+
V200	5+
G20V100	4+
G20V200	3+
G50V100	4+
G50V200	3+

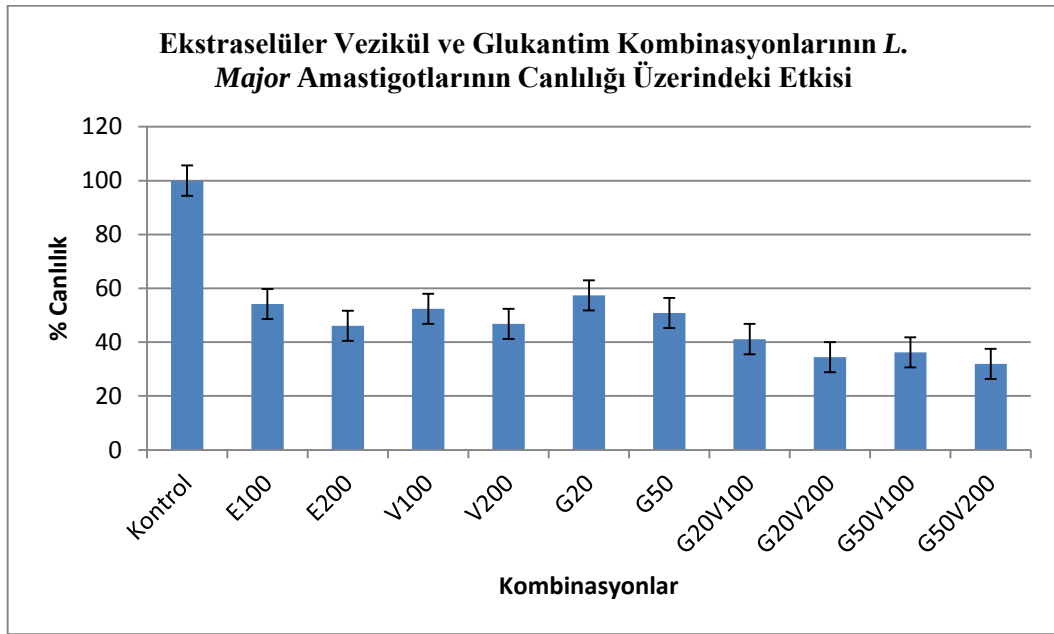


Şekil 4. 24 Ekstraselüler Vezikül- Glukantim Kombinasyonlarının *L.major* amastigotlarının proliferasyonu üzerindeki antileishmanial etkinliğinin mikropapiller tüpte görüntüsü

(a) kontrol (b) G50V200 kombinasyonu

4.5.6 Glukantim ve Ekstraselüler Vezikül Kombinasyonlarının *L.major* Amastigotlarının Metabolik Aktivitesi Üzerindeki Antileishmanial Etkisi

Şekil 4.25’de Glukantim ve ekstraselüler vezikül kombinasyonlarının *L.major* amastigotlarının metabolik aktivitesi üzerindeki antileishmanial etkisi verilmiştir. Tek başlarına Glukantim’in 20 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında ve ekstraselüler veziküllerin 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında amastigotların canlılığı yaklaşık %50 değerlerindedir. Ancak kombinasyonları şeklinde uygulandıklarında antileishmanial etkinliklerinin arttığı ve amastigot canlılığın azaldığı görülmüştür. G20V200 kombinasyonunda canlılık %34, G50V200 kombinasyonunda ise %30 değerindedir. Bu sonuçlar *L. major* promastigotlarında olduğu gibi amastigot formunda da kombinasyon formülasyonların daha yüksek antileishmanial etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.

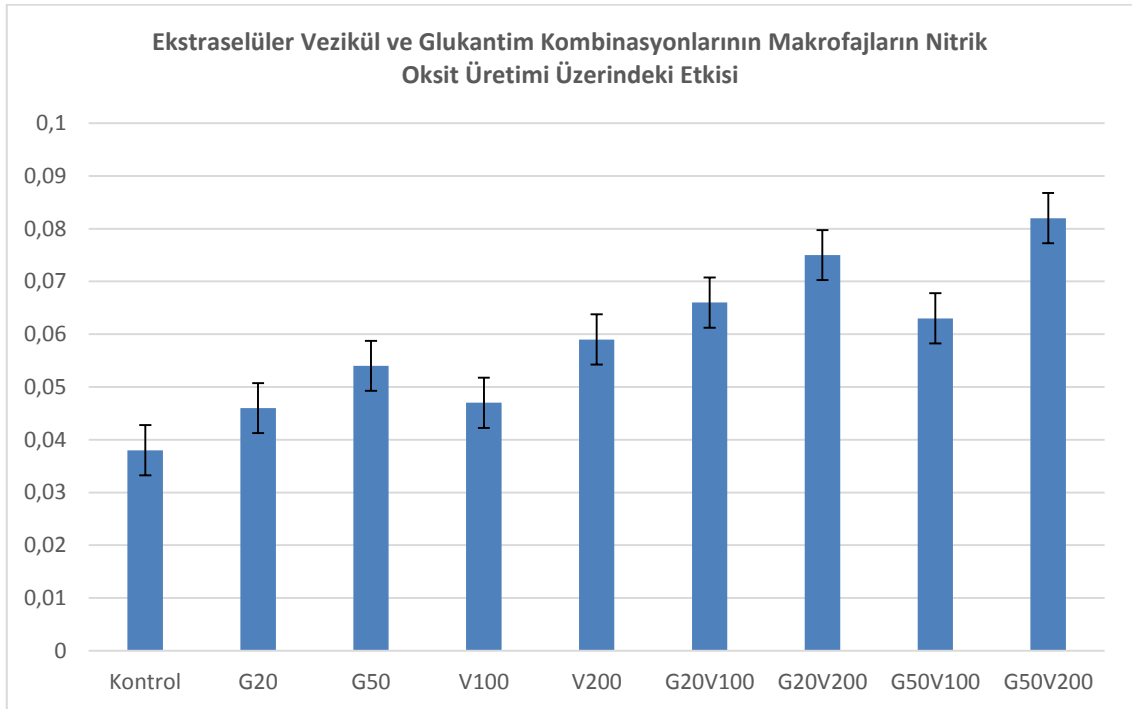


Şekil 4. 25 Ekstraselüler vezikül ve Glukantim kombinasyonlarının *L. major* amastigotlarının canlılığı üzerindeki etkisi

4.5.7 Nanopartikül-Glukantim Kombinasyonlarının Makrofajların Nitrik Oksit Üretimleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Nitrik oksit makrofaj, monosit gibi fagotsitlerin enfeksiyona sebep olan bir ajanla karşılaştıkları zaman ortama salınan bir antimikrobiyal bileşiktir. Nitrik oksitin

önemli ölçüde antileishmanial özelliği bulunmaktadır. Verilen formülasyonların makrofajların nitrik oksit üretimini arttırmaları beklenmektedir. Şekil 4.26'de Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının makrofajların Nitrik Oksit üretimleri üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Kontrol grubuna ve tek başlarına Glukantim'in 20 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında ve ekstraselüler veziküllerin 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarına kıyasla kombinasyonlara maruz bırakılan makrofajların nitrik oksit üretimini arttırdığı görülmüştür. G50V200 kombinasyonu kontrole kıyasla nitrik oksit üretimini 2 kat arttırmıştır.



Şekil 4. 26 Ekstraselüler vezikül ve Glukantim kombinasyonlarının J774 makrofaj hücre hattının NO üretimi üzerindeki etkisi

Leishmaniasis, çoğunlukla gelişmekte olan, fakir ülkelerde endemik olarak görülen birçok türe sahip *Leishmania* protozoanlarının sebep olduğu bir hastalık grubudur. Hastalık, parazitin kamçılı promastigot formunun kum sineğinden insanlara bulaşması ile yayılmaktadır. Promastigotlar kum sineğinde 10 günlük süre sonunda bulaşıcı fazı olan metasiklik forma dönüşür. Metasiklik promastigotlar konakçı makrofajlarını enfekte ederek kamçısız amastigot forma dönüşür [18]. Kum sineğinin ısırığının haricinde, hastalık kan transfüzyonu, anneden bebeğe, organ ve kök hücre nakilleri sırasında bulaşabilir. Hastalığın Kutanöz, Visseral ve Mukokütanoz olmak üzere 3 temel klinik formu vardır. Hastalığın klinik formunu, konağın genetik yapısı, parazit suşu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Hastalığın en yaygın görülen ve üzerine en çok çalışılan formu olan CL cilt lezyonlarına sebep olur. Lezyonlar klinik cilt ülserlerine sebep olabilir ve genellikle yüz, boyun, kollar gibi sinek ısırığına maruz kalan görünür bölgelerde oluşur. Mukokutanöz formu burun, ağız, yutak gibi vücudun mukozal bölgelerinde görülür. Kala- azar olarak da bilinen Visseral Leishmaniasis hastalığın en ölümcül formudur. Hastalık retiküloendotelial sistemdeki iç organları etkiler. Leishmaniasis tedavisinin ilk basamağını pentavalent antimonialler oluşturur. Antimoniallerin yanında pentamidin, amfoterisin b, miltefosin gibi ilaçların da Leishmaniasis tedavisi için kullanım onayı bulunmaktadır. Ancak mevcut ilaçlara direnç gelişmesi, aşının bulunmaması, uzun tedavi rejimleri gerekmesi ve toksik etkilerinin yüksek olması gibi tedaviyi sınırlandıran nedenlerden dolayı, mevcut ilaçların yerini alacak ya da etkinliklerini arttıracak ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır [5]. Bu nedenle günümüzde yapılan çalışmalarda bu tez çalışmasında olduğu gibi, kullanılan ajanların toksik etkilerini azaltacak ve antileishmanial etkinliklerini arttıracak alternatif tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Mevcut ajanların toksik etkilerini azaltmak için kullanılan yöntemlerden biri de kombinasyon terapi yaklaşımlarıdır. Literatürde mevcut antileishmanial ilaçların, antileishmanial etkinliği bilinen ajanlar ile kombinasyonuna yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. *L.tropica* üzerinde TiAg nanopartiküllerinin meglumin antimonial ile kombinasyonlarının

antileishmanial etkinliği *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmiştir. Bu alışmada Glukantim'in 100µg/ ml konsantrasyonda makrofajlar üzerinde toksisite göstermeye başladığı ve 1000 µg/ ml konsantrasyonda neredeyse makrofajların tamamını inhibe ettiği grlmştir. Sonuçlar tek başına meglumin antimonial uygulamasına kıyasla kombinasyon tedavinin promastigot proliferasyonunu konsantrasyonlara bağlı olarak 2-5 kat azalttığını göstermiştir. Kombinasyonlar amastigot formu üzerinde %80-95 etkili olmuştur. *In vivo* sonuçlarda ise kombinasyon tedavinin tek başına MA'ya kıyasla parazit yükünü önemli ölçüde azalttığı grlmştir. [109].

L. amazonensis üzerinde yapılan bir çalışmada meglumin antimonial ile epoksi--lapachone (LAP) veya epoksimetil-lawone (LAW) oksiranlarının etkinlikleri incelenmiştir. Sonuçlar bu kombinasyonların (3: 1; 1: 1 ve 1: 3) hücre içi parazit sayısı, endositik indeks gibi incelenen her parametrede yüksek antileishmanial etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. En etkili kombinasyonlar 3: 1 oranında % 98,3 endositik indeks ile MA / LAP ve % 93,6 endositik indeks ile MA / LAW olarak belirtilmiştir [110]. Bir diğer çalışmada ise Amfoterisin B, gallik asit (GA) ve ellagik asit (EA) ile birlikte kombinasyonlar halinde *L. majör* ile enfekte edilen BALB/ c fareleri üzerinde denenmiştir. 6 grup fare 21 gün boyunca günde 2 kez olmak üzere tek başlarına Amfoterisin B, gallik asit, ellagik asit ve kombinasyon halinde AmfB ve GA, AmfB ve EA ile tedavi edilmiştir. Fareler lezyon büyüklüğü ve parazit yükü gibi parametrelere göre incelenmiş ve GA ve EA nın Amf B ile kombinasyonlarının sinerjik etki gösterdiği belirtilmiştir [111]. Bu durumda normalde kullanılan daha düşük dozda antimonial kullanılarak hem ilaç toksisitesinin hem de ilaca karşı gelişen direnç sebebiyle düşük verimliliğin önüne geçileceği düşünülmektedir. Mevcut kullanılan antimonialler, miltefosin gibi ilaçlarla aynı zamanda bitkisel ekstraktlar, yağlar ve bitkilerden elde edilen ürünlerle de kombinasyon halinde kullanılmaktadır. İlgili bir çalışmada, sarımsak ve Glukantim kombinasyonundan oluşan formülasyonları ile tedavi edilen *L. majör* ile enfekte BALB/ c farelerinde Th1/ Th2 sitokin modelleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar kombinasyon tedavisinin tek başına Glukantim uygulamasından daha yüksek Th1 tepkisine yol açtığını göstermiştir [112]. *Curcuma longa*, zencefil ailesine ait bir bitki türüdür. Yüzyıllardır enfeksiyon ve dermatolojik hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Zerdealın hastalıklar üzerindeki etkinliği

bitkinin rizomlarından elde edilen ve lipofilik bir polifenol olan kurkuminden kaynaklanır. Kurkuminin antiinflamatuvar, antioksidan, antifungal, antibakteriyel, antiviral özellikleri olduğuna yönelik binlerce çalışma mevcuttur [113]. Kurkuminin *L. major* promastigotları üzerinde etkinliğinin incelendiği bir çalışmada 5 µM konsantrasyonun üzerindeki değerlerde kurkuminin promastigotlar üzerinde inhibe edici etkisi bulunduğu görülmüştür. [18]. Ancak literatürde *Curcuma longa* kaynaklı ekstraselüler veziküllerin tek başına ve Glukantim ile kombinasyonunun antileishmanial etkinliğinin incelendiği bir çalışmaya rastlamadık. Ayrıca literatürde *Curcuma longa* bitkisinden izole edilen ekstraselüler veziküllerin olduğu bir çalışma da bulunmamaktadır. Buna göre bu tez çalışmasının amacını, Leishmaniasis'in birinci basamak tedavisini oluşturan Glukantim'in toksisitesini azaltmak, gelişen ilaç direncinin önüne geçmek ve tedavinin etkinliğini arttırmak amacıyla, antileishmanial etkinliği bilinen *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen ekstraselüler veziküllerin izole ve karakterize edilmesi, tek başlarına veziküllerin ve Glukantim ile kombinasyonlarının *L. major* promastigotları ve amastigotları üzerinde antileishmanial etkinliklerinin ve J774 makrofaj ve L929 fibroblast hücreleri üzerinde toksisitelerinin incelenmesi oluşturmaktadır.

Bu amaçlara ulaşmak için aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

- *Curcuma longa* bitkisinde ekstraselüler veziküllerin kit kullanılarak izolasyonu
- Veziküllerin DLS, Bradford protein assay, flow sitometri ve SEM analizleri ile karakterizasyonu
- Veziküllerin ve Glukantim'in toksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi
- Veziküllerin Glukantim ile kombinasyonlarının oluşturulması
- Kombinasyonların J774 makrofaj ve L929 fibroblast hücreleri üzerinde toksik etkinliklerinin incelenmesi
- Veziküllerin tek başına ve kombinasyon halinde *L. major* promastigotları üzerinde MTT, sayım yöntemleri ile amastigotlar üzerinde de MTT, enfeksiyon indeksi, mikrokültür yöntemleri ile antileishmanial etkinliklerinin incelenmesi.

Polimerik çöktürme yöntemini temel alan kit ile izolasyonu gerçekleştirilen *Curcuma longa* kaynaklı ekstraselüler veziküllerin DLS yöntemiyle analizi sonucunda ortalama boyut 198 nm olarak ölçülmüştür. Literatürde greylift ve zencefil kaynaklı veziküllerin ortalama boyutları 250 nm olarak belirtilmiştir. Buna

göre elde ettiğimiz vezikül boyutu literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermektedir [114]. Veziküllerin PDI değeri 0,376 olarak ölçülmüştür. Literatürde izole edilen ekstraselüler veziküllerin PBS ile resüspanse edildiği zaman polidispers dağılım gösterdiği belirtilmektedir [97]. Aynı zamanda veziküllerin boyutları ve morfolojileri SEM ile karakterize edilmiştir. SEM analizi zeta sonuçlarını destekler boyut ve polidispers görüntüler vermiştir. Aynı zamanda veziküllerin morfolojilerini tanımlamak için kullanılan cup şekli ifadesi SEM analizinde görülmüş ve doğrulanmıştır [85]. Yapılan flow stometri analizinde literatürde ekstraselüler veziküllerin karakterizasyonu için sıkça kullanılan , CD81, CD63 ve CD9 markırlarına veziküllerin spesifiklikleri sırasıyla %99.17, %92.48 ve %70.28 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen ekstraselüler veziküllerin protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlenmiş ve 241 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar için konsatrasyon hesaplamaları protein miktarına göre yapılmıştır.

İzolasyonu gerçekleştirilen ekstraselüler veziküllerin ve Glukantim'in toksik olmayan konsatrasyonlarını tespit edilmesi ve kombinasyonların belirlenmesi için J774 makrofaj hücreleri üzerinde 2 ajanın da 10- 200 µg/ml arasında değişen konsatrasyonlarda sitotoksiteleri MTT yöntemiyle ölçülmüştür. Ekstraselüler veziküllerin artan konsatrasyonlarda sitotoksik etkisinin arttığı ancak bu hücre hattı üzerinde önemli derecede toksisiteye sahip olmadığı ve IC₅₀ değerinin >200 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Glukantim'in 10, 20 ve 50 µg/ml konsatrasyonlarında makrofajlarda daha yüksek canlılık görülmüş ve IC₅₀ değeri yaklaşık 200 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak kombinasyonlar için ekstraselüler veziküller için 100 ve 200 µg/ml, Glukantim için 20 ve 50 µg/ml non-toksik konsatrasyonların kullanılmasına karar verilmiştir. Hazırlanan kombinasyonların J774 makrofaj ve L929 fibroblast hücreleri üzerinde gerçekleştirilen toksisite deneylerinde bu hücre hatları üzerinde toksik olmadığı tespit edilmiştir.

Deneylere toksik olmayan konsantrasyonlar ile hazırlanan kombinasyon formülasyonlar ile devam edilmiştir. İlk olarak hazırlanan formülasyonların *L. major* promastigotları üzerindeki antileishmanial etkinlikleri araştırılmıştır. Bu amaçlar promastigot proliferasyonu sayım yöntemi ile, parazit canlılıkları ise MTT

yöntemi ile tespit edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda alınan ölçümlerde ekstraselüler veziküllerin 200 µg/ml konsantrasyonunun promastigot proliferasyonunu yarı yarıya azalttığı ve promastigotlar üzerinde ekstrakta olduğu kadar antileishmanial etkinliği olduğu görülmüştür. Ekstraktın içerisinde antileishmanial etkinliği bilinen kurkumin etkin maddesi bulunmaktadır. Bu nedenle ekstrakt ile benzer sonuçlar gösteren ekstraselüler veziküllerin de antileishmanial etkinliği olduğu görülmüştür. Tek başlarına Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonunda veziküllere benzer şekilde yaklaşık yarı yarıya inhibisyon görülmüştür. Kombinasyon şeklinde verilen formülasyonlarda ise antileishmanial etkinliklerin artışı gözlemlenmiştir. G50-V200 kombinasyonuna maruz kalan promastigotların proliferasyonunda kontrole göre yaklaşık 4 kat, tek başına Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonuna göre ise 2 katlık bir azalma görülmüştür. Glukantim'in kombinasyonun etkinliğini gösterebilmesi için 200 µg/ml'den daha yüksek bir toksik konsantrasyonda uygulanması gerekmektedir. Ekstraselüler veziküllerin 200 µg/ml konsantrasyonunda promastigotların canlılığının %50 değerine düştüğü ve promastigotlar üzerinde ekstrakta benzer şekilde antileishmanial etkinliği olduğu görülmüştür. Tek başına Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonunda veziküllere benzer şekilde %50 canlılık görülmüştür. Kombinasyon şeklinde verilen formülasyonlarda ise G50V200 kombinasyonunda %35'e düşmüştür. 96. saatte ise tek başlarına ekstraselüler veziküllerin 48. saate göre etkinliğinin daha yüksek olduğu ve kontrole kıyasla ekstrakta benzer şekilde 200 µg/ml konsantrasyonunda yaklaşık 3 kat azalma sağladığı görülmektedir. Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonunda promastigot proliferasyonu 3 kat azalmışken kombinasyonları şeklinde verilen formülasyonlarda etkinliklerinin artışı gözlemlenmiştir. Proliferasyon, G50V200 kombinasyonunda kontrole göre 5 kat, Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonuna kıyasla yarı yarıya azalma göstermiştir. Glukantim'in bu etkinliği tek başına göstermesi için toksik konsantrasyonlara çıkılması gerekmektedir. 200 µg/ml konsantrasyonunda ekstrakt ve ekstraselüler vezikül promastigot canlılığını %30'lara kadar düşürmüştür. Glukantim 50 µg/ml konsantrasyonunda benzer bir canlılık yüzdesi sağlamıştır. G20V200 kombinasyonu olarak verildiğinde ise canlılık %20ye kadar düşmüştür. MTT deneyinde promastigotlarda oluşan formazan kristalleri invert mikroskop ile gözlenmiştir. Formazan kristalleri enzimatik aktiviteye bağlı olarak hücre canlılığının göstergesi

olarak oluşur. Mikroskopik inceleme sonucunda kontrol grubunda yüksek sayıda formazan kristali görülürken G50V200 kombinasyonunda çok kısıtlı formazan kristali görüntüsü mevcuttur. Formazan kristalinin kombinasyon uygulanan kuyuda görülmemesi burada yüksek inhibisyon olduğunu göstermektedir. Bu görüntü Elisa okuyucu ile alınan MTT sonuçlarını destekler niteliktedir. Kontrol grubunda canlılık değeri %100'dür. Bu nedenle yoğun formazan kristali görüntüsü bulunmaktadır. G50V200 kombinasyonunda ise canlılık oldukça düşük olduğu için formazan oluşumu çok düşük seviyededir.

Hazırlanan formülasyonların *L. majör* amastigotları üzerindeki etkinlikleri enfeksiyon indeksi, mikrokültür yöntemi ve MTT yöntemleriyle incelenmiştir. Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonunda ve ekstraselüler veziküllerin 200 µg/ml konsantrasyonunda amastigotların enfeksiyon indeksleri kontrol grubuna göre yarı yarıya düşüş göstermiştir. Kombinasyon şeklinde uygulandıklarında ise antileishmanial etkinliklerinin daha da arttığı görülmüştür. Enfeksiyon indeksi değerlerinde G20V200 kombinasyonunda kontrole göre yaklaşık 3 kat, G50V200 kombinasyonunda ise yaklaşık 4 kat düşüş görülmüştür. Glukantim'in 50 µg/ml konsantrasyonuna kıyasla G50V200 kombinasyonunda enfeksiyon indeksinde 2 kat daha fazla azalma görülmektedir. Bu sonuçlar kombinasyon uygulamalarının tek başına ilaç uygulamasına nazaran amastigotlar üzerinde çok daha etkin olduğunu göstermektedir. Ekstraselüler vezikül ve Glukantim kombinasyonlarının *L. major* amastigotlarının proliferasyonu üzerindeki etkinliği ayrıca mikro kültür yöntemiyle de incelenmiştir. MTT uygulaması yapılacak olan ve içerisinde formülasyonlara maruz kalan amastigotların bulunduğu besiyerlerinden mikropiler tüp içerisine bir miktar eklenmiş ve bu hematokrit tüpler inkübasyona bırakılmıştır. Böylece mikroaerofilik ortamda amastigotların promastigotlara dönüşümü sağlanmıştır. Inkübasyonun ardından kapiler tüpler içerisindeki promastigotlar ters mikroskop altında gözlemlenmiştir. Promastigot yoğunluğu, gözlenen alanda 20'nin üzerinde parazit için 6+, 20 parazit için 5+, 15 parazit için 4+, 10 parazit için 3+, 5 parazit için 2+ ve 1 ile 5 arasında parazit için + olarak belirlenmiştir. Glukantim ve ekstraselüler veziküllerin tek başlarına konsantrasyonları promastigot yoğunluğunda kısmi bir düşüşe neden olmakla birlikte kombinasyonlara maruz kalan gruplarda parazit yoğunluğu anlamlı bir şekilde düşmüştür. Ekstraselüler vezikül ve antileishmanial ilaç

kombinasyonlarının *L.major* amastigotlarının canlılığı üzerindeki aktivitesi MTT yöntemiyle de incelenmiştir. Yapılan MTT testine göre, tek başlarına Glukantim'in 20 µg/ml ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarına ve ekstraselüler veziküllerin 100 µg/ml ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarına maruz kalan amastigotların canlılığı yaklaşık %50 değerindedir. Ancak kombinasyon uygulamalarının amastigot canlılığını azaltma hususunda tek başına ilaç içeren formülasyona göre daha başarılı olduğu anlaşılmıştır. G20V200 kombinasyonuna maruz kalan amastigotlarda hücre canlılık oranı %34, G50V200 kombinasyonuna maruz kalan gruplarda ise %30 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar *L. major* promastigotlarında olduğu gibi amastigot formunda da kombinasyon formülasyonların daha yüksek antileishmanial etkinlik gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır. Nitrik oksit makrofaj, monosit gibi fagositlerin enfeksiyona sebep olan bir ajanla karşılaştıkları zaman ortama saldıkları antimikrobiyal bir bileşiktir. Nitrik oksitin önemli ölçüde antileishmanial özelliği bulunmaktadır. Verilen formülasyonların makrofajların nitrik oksit üretimini arttırmaları beklenmektedir. Kontrol grubuna ve tek başlarına Glukantim'in 20 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında ve ekstraselüler veziküllerin 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarına kıyasla kombinasyonlara maruz bırakılan makrofajların nitrik oksit üretimini arttırdığı görülmüştür. G50V200 kombinasyonu kontrole kıyasla nitrik oksit üretimini 2 kat arttırmıştır.

Böylece izole edilen ekstraselüler veziküllerin J774 makrofaj ve L929 fibroblast hücreleri üzerinde yüksek oranda toksisite göstermediği belirlendi. Hazırlanan kombinasyonların tek başına Glukantim'e kıyasla *L. majör* promastigot ve amastigotları üzerinde yaklaşık 2 kat daha fazla antileishmanial etkinliği olduğu sayım, MTT, enfeksiyon indeksi, mikrokültür yöntemleriyle tespit edildi. Elde edilen sonuçlar, mevcut tedavi yöntemlerine göre daha düşük toksisiteye sahip olan, mevcut ilaçların kullanımını sınırlayan dezavantajları barındırmayan ve yüksek antileishmanial özelliğe sahip bitkisel kaynaklı ekstraselüler vezikül temelli yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinin mümkün olduğunu ortaya çıkardı.

Öneriler

1. Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının prelinik çalışmalarının gerçekleştirilmesi

2. Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının çeşitli leishmanial suşları üzerinde etkinliklerinin incelenmesi
3. Ekstraselüler vezikül- Glukantim kombinasyonlarının, leishmaniasisin farklı klinik formları üzerinde etkinliklerinin incelenmesi

- [1] Burza, S. Croft, S.L. ve Boelaert, M., (2018). "Leishmaniasis", *The Lancet*, 392: 951-970.
- [2] Alvar, J. Vélez, I.D. Bern, C. Herrero, M. Desjeux, P. Cano, J. Jannin, J. den Boer, M. ve Team, W.L.C., (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence", *PLoS ONE*, 7: e35671.
- [3] Handler, M.Z. Patel, P.A. Kapila, R. Al-Qubati, Y. ve Schwartz, R.A., (2015). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management", *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73: 911-926.
- [4] Pace, D., (2014). "Leishmaniasis", *J Infect*, 69: S10-18.
- [5] Allahverdiyev, A.M. Kocagoz, T. Bagirova, M. Abamor, E.S. Okullu, S.O. Unubol, N.A. Koc, R.C. Ates, S.C. Miraloglu, M. ve Elcicek, S., (2013). "Basis of Anti-Infective Therapy against Leishmaniasis and Future Perspectives", *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery*, 3: 194.
- [6] Allahverdiyev, A. Bağırova, M. Koç, R. Öztel, O.N. Elçiçek, S. Ateş, S. ve Karaca, T.D., (2010). "Approaches and problems in vaccine development against leishmaniasis", *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34: 122-130.
- [7] Elmahallawy, E.K. Martínez, A.S. Rodriguez-Granger, J. Hoyos-Mallecot, Y. Agil, A. Mari, J.M.N. ve Fernández, J.G., (2014). "Diagnosis of leishmaniasis", *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8: 961-972.
- [8] Herwaldt, B.L., (1999). "Leishmaniasis", *Lancet*, 354: 1191-1199.
- [9] Bennis, I. Thys, S. Filali, H. De Brouwere, V. Sahibi, H. ve Boelaert, M., (2017). "Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco", *Infectious diseases of poverty*, 6: 46.
- [10] van Griensven, J. Gadisa, E. Aseffa, A. Hailu, A. Beshah, A.M. ve Diro, E., (2016). "Treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica*: a systematic review", *PLoS neglected tropical diseases*, 10: e0004495.
- [11] Aronson, N.E. ve Joya, C.A., (2019). "Cutaneous leishmaniasis: updates in diagnosis and management", *Infectious Disease Clinics*, 33: 101-117.
- [12] Reithinger, R. Dujardin, J.-C. Louzir, H. Pirmez, C. Alexander, B. ve Brooker, S., (2007). "Cutaneous leishmaniasis", *The Lancet infectious diseases*, 7: 581-596.
- [13] Mitropoulos, P. Konidas, P. ve Durkin-Konidas, M., (2010). "New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment", *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63: 309-322.
- [14] Roberts, C. McLeod, R. Rice, D. Ginger, M. Chance, M. ve Goad, L., (2003). "Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in

apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa", *Molecular and biochemical parasitology*, 126: 129-142.

- [15] Croft, S.L. ve Coombs, G.H., (2003). "Leishmaniasis–current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs", *Trends in parasitology*, 19: 502-508.
- [16] Minodier, P. ve Parola, P., (2007). "Cutaneous leishmaniasis treatment", *Travel medicine and infectious disease*, 5: 150-158.
- [17] Melaku, Y. Collin, S.M. Keus, K. Gatluak, F. Ritmeijer, K. ve Davidson, R.N., (2007). "Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77: 89-94.
- [18] Aqelee, G. Shayan, P. Ebrahimzadeh, E. Mohebbi, M. ve Khalili, S., (2019). "Determination of the Effective Dose of Curcumin alone and in Combination with Antimicrobial Peptide CM11 on Promastigote Forms of Iranian Strain of *L. major* (MRHO/IR/75/ER)", *Archives of Razi Institute*, 74: 413-422.
- [19] Qin, J. ve Xu, Q., (2014). "Functions and application of exosomes", *Acta Pol Pharm*, 71: 537-543.
- [20] Mu, J. Zhuang, X. Wang, Q. Jiang, H. Deng, Z.B. Wang, B. Zhang, L. Kakar, S. Jun, Y. ve Miller, D., (2014). "Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles", *Molecular nutrition & food research*, 58: 1561-1573.
- [21] De Almeida, M. Vilhena, V. Barral, A. ve Barral-Netto, M., (2003). "Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review", *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 861-870.
- [22] Staff, P.N.T.D., (2016). "Correction: A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies", *PLoS neglected tropical diseases*, 10: e0004770.
- [23] Claborn, D.M., (2010). "The biology and control of leishmaniasis vectors", *Journal of global infectious diseases*, 2: 127.
- [24] Sunter, J. ve Gull, K., (2017). "Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding", *Open biology*, 7: 170165.
- [25] Petropolis, D.B. Rodrigues, J.C. Viana, N.B. Pontes, B. Pereira, C.F. ve Silva-Filho, F.C., (2014). "Leishmania amazonensis promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions", *PeerJ*, 2: e317.
- [26] Mougneau, E. Bihl, F. ve Glaichenhaus, N., (2011). "Cell biology and immunology of Leishmania", *Immunological reviews*, 240: 286-296.
- [27] mondiale de la Santé, O. ve Organization, W.H., (2020). "Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators–Surveillance mondiale de la leishmaniose, 2017-2018, et premier rapport sur 5 indicateurs supplémentaires", *Weekly*

Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire, 95: 265-279.

- [28] Hussain, M. Munir, S. Jamal, M.A. Ayaz, S. Akhoundi, M. ve Mohamed, K., (2017). "Epidemic outbreak of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kohat District, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan", *Acta Tropica*, 172: 147-155.
- [29] Ghorbani, M. ve Farhoudi, R., (2018). "Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?", *Drug design, development and therapy*, 12: 25.
- [30] Kobets, T. Grekov, I. ve Lipoldova, M., (2012). "Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment", *Current medicinal chemistry*, 19: 1443-1474.
- [31] Martínez-Salazar, B. Carregaro Pereira, V. Hauyon-La-Torre, Y. Khamesipour, A. ve Tacchini-Cottier, F., (2020). "Evaluation of a New Topical Treatment for the Control of Cutaneous Leishmaniasis", *Microorganisms*, 8: 1803.
- [32] Mokni, M., (2019). "Leishmanioses cutanées": Elsevier.
- [33] Marsden, P., (1990). "Mucocutaneous leishmaniasis", *BMJ: British Medical Journal*, 301: 656.
- [34] Safavi, M. Eshaghi, H. ve Hajihassani, Z., (2020). "Visceral Leishmaniasis: Kala-azar", *Diagnostic Cytopathology*.
- [35] Alamin, A.A., (2020). "Visceral Leishmaniasis in a Non-endemic Region of Eritrea", *Cureus*, 12.
- [36] Leta, S. Dao, T.H.T. Mesele, F. ve Alemayehu, G., (2014). "Visceral leishmaniasis in Ethiopia: an evolving disease", *PLoS Negl Trop Dis*, 8: e3131.
- [37] Gize, A. Workineh, A. ve Hailu, T., (2020). "A trend prevalence of visceral Leishmaniasis in West Armachiho District, Amhara Region, Northwest Ethiopia", *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, 6: 1-5.
- [38] van Griensven, J. ve Diro, E., (2012). "Visceral leishmaniasis", *Infectious Disease Clinics*, 26: 309-322.
- [39] Kotb Abd Elghany Elmahallawy, E. Sampedro Martínez, A. Rodríguez Granger, J. Hoyos Mallecot, Y. Agil Abdalla, M.A. Navarro-Marí, J.M. ve Gutiérrez Fernández, J., (2014). "Diagnosis of leishmaniasis".
- [40] Allahverdiyev, A.M. Uzun, S. Bagirova, M. Durdu, M. ve Memisoglu, H.R., (2004). "A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70: 294-297.
- [41] Frézard, F. ve Demicheli, C., (2010). "New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs", *Expert opinion on drug delivery*, 7: 1343-1358.
- [42] Adler-Moore, J.P. Gangneux, J.-P. ve Pappas, P.G., (2016). "Comparison between liposomal formulations of amphotericin B", *Sabouraudia*, 54: 223-231.

- [43] Hamill, R.J., (2013). "Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity", *Drugs*, 73: 919-934.
- [44] Berman, J., (2019). "Liposomal Amphotericin B Treatment and the Leishmaniasis", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 101: 727.
- [45] Abraham, D.J., (2015). *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (Vol I: drug discovery)*: Wiley-Interscience.
- [46] Alkhawajah, A., (1998). "Recent trends in the treatment of cutaneous leishmaniasis", *Annals of Saudi medicine*, 18: 412-416.
- [47] Vakil, N.H. Fujinami, N. ve Shah, P.J., (2015). "Pharmacotherapy for leishmaniasis in the United States: focus on miltefosine", *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35: 536-545.
- [48] Machado, P.R. ve Penna, G., (2012). "Miltefosine and cutaneous leishmaniasis", *Current opinion in infectious diseases*, 25: 141-144.
- [49] Uzun, S. Gürel, M.S. Durdu, M. Akyol, M. Fettahlioğlu Karaman, B. Aksoy, M. Aytekin, S. Borlu, M. İnan Doğan, E. ve Doğramacı, Ç.A., (2018). "Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey", *International journal of dermatology*, 57: 973-982.
- [50] Panagiotopoulos, A. Stavropoulos, P.G. Hasapi, V. Papakonstantinou, A.M. Petridis, A. ve Katsambas, A., (2005). "Treatment of cutaneous leishmaniasis with cryosurgery", *International journal of dermatology*, 44: 749-752.
- [51] Bassiouny, A. El Meshad, M. Talaat, M. Kutty, K. ve Metawaa, B., (1982). "Cryosurgery in cutaneous leishmaniasis", *British journal of dermatology*, 107: 467-474.
- [52] Leibovici, V. ve Aram, H., (1986). "Cryotherapy in acute cutaneous leishmaniasis", *International journal of dermatology*, 25: 473-475.
- [53] Gonçalves, S.V.C.B. ve Costa, C.H.N., (2018). "Treatment of cutaneous leishmaniasis with thermotherapy in Brazil: an efficacy and safety study", *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 93: 347-355.
- [54] Velasco-Castrejon, O. Walton, B. Rivas-Sanchez, B. Garcia, M. Lazaro, G. Hobart, O. Roldan, S. Floriani-Verdugo, J. Munguia-Saldana, A. ve Berzaluze, R., (1997). "Treatment of cutaneous leishmaniasis with localized current field (radio frequency) in Tabasco, Mexico", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 57: 309-312.
- [55] Asilian, A. Sharif, A. Faghihi, G. Enshaeieh, S. Shariati, F. ve Siadat, A., (2004). "Evaluation of CO2 laser efficacy in the treatment of cutaneous leishmaniasis", *International journal of dermatology*, 43: 736-738.
- [56] Araujo, C. Alegrio, L. ve Leon, L., (1998). "Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*", *Phytochemistry*, 49: 751-754.

- [57] Tahir, A.E. Ibrahim, A.M. Satti, G.M. Theander, T.G. Kharazmi, A. ve Khalid, S.A., (1998). "The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants", *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12: 576-579.
- [58] Zhou, H. S Beevers, C. ve Huang, S., (2011). "The targets of curcumin", *Current drug targets*, 12: 332-347.
- [59] Koide, T. Nose, M. Ogihara, Y. Yabu, Y. ve Ohta, N., (2002). "Leishmanicidal effect of curcumin in vitro", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25: 131-133.
- [60] Hong, E.J. Choi, D.G. ve Shim, M.S., (2016). "Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials", *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6: 297-307.
- [61] Kalra, H. Drummen, G.P. ve Mathivanan, S., (2016). "Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing", *International journal of molecular sciences*, 17: 170.
- [62] Valadi, H. Ekström, K. Bossios, A. Sjöstrand, M. Lee, J.J. ve Lötvall, J.O., (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells", *Nature cell biology*, 9: 654-659.
- [63] Colombo, M. Raposo, G. ve Théry, C., (2014). "Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles", *Annual review of cell and developmental biology*, 30: 255-289.
- [64] Théry, C. Duban, L. Segura, E. Véron, P. Lantz, O. ve Amigorena, S., (2002). "Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes", *Nature immunology*, 3: 1156-1162.
- [65] De Toro, J. Herschlik, L. Waldner, C. ve Mongini, C., (2015). "Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications", *Frontiers in immunology*, 6: 203.
- [66] Heijnen, H.F. Schiel, A.E. Fijnheer, R. Geuze, H.J. ve Sixma, J.J., (1999). "Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules", *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 94: 3791-3799.
- [67] Skog, J. Würdinger, T. Van Rijn, S. Meijer, D.H. Gainche, L. Curry, W.T. Carter, B.S. Krichevsky, A.M. ve Breakefield, X.O., (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers", *Nature cell biology*, 10: 1470-1476.
- [68] Zha, Q.B. Yao, Y.F. Ren, Z.J. Li, X.J. ve Tang, J.H., (2017). "Extracellular vesicles: An overview of biogenesis, function, and role in breast cancer", *Tumor Biology*, 39: 1010428317691182.
- [69] Al-Nedawi, K. Meehan, B. Micallef, J. Lhotak, V. May, L. Guha, A. ve Rak, J., (2008). "Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells", *Nature cell biology*, 10: 619-624.

- [70] Bernimoulin, M. Waters, E. Foy, M. Steele, B. Sullivan, M. Falet, H. Walsh, M. Barteneva, N. GENG, J.G. ve Hartwig, J., (2009). "Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7: 1019-1028.
- [71] Hauser, P. Wang, S. ve Didenko, V.V., (2017). Apoptotic bodies: selective detection in extracellular vesicles, ed. *Signal Transduction Immunohistochemistry*. Springer, 193-200.
- [72] Gould, S.J. ve Raposo, G., (2013). "As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles", *Journal of extracellular vesicles*, 2: 20389.
- [73] Witwer, K.W. Buzás, E.I. Bemis, L.T. Bora, A. Lässer, C. Lötval, J. Nolte-‘t Hoen, E.N. Piper, M.G. Sivaraman, S. ve Skog, J., (2013). "Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research", *Journal of extracellular vesicles*, 2: 20360.
- [74] Théry, C. Amigorena, S. Raposo, G. ve Clayton, A., (2006). "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids", *Current protocols in cell biology*, 30: 3.22. 21-23.22. 29.
- [75] Konoshenko, M.Y. Lekchnov, E.A. Vlassov, A.V. ve Laktionov, P.P., (2018). "Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends", *BioMed research international*, 2018.
- [76] Cheruvanky, A. Zhou, H. Pisitkun, T. Kopp, J.B. Knepper, M.A. Yuen, P.S. ve Star, R.A., (2007). "Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator", *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292: F1657-F1661.
- [77] Rood, I.M. Deegens, J.K. Merchant, M.L. Tamboer, W.P. Wilkey, D.W. Wetzels, J.F. ve Klein, J.B., (2010). "Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome", *Kidney international*, 78: 810-816.
- [78] Heinemann, M.L. Ilmer, M. Silva, L.P. Hawke, D.H. Recio, A. Vorontsova, M.A. Alt, E. ve Vykoukal, J., (2014). "Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration", *Journal of Chromatography A*, 1371: 125-135.
- [79] Pisarello, M.J.L. Loarca, L. Ivanics, T. Morton, L. ve LaRusso, N., (2015). "MicroRNAs in the cholangiopathies: pathogenesis, diagnosis, and treatment", *Journal of clinical medicine*, 4: 1688-1712.
- [80] Taylor, D.D. Gerçel-Taylor, Ç. Lyons, K.S. Stanson, J. ve Whiteside, T.L., (2003). "T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3- ζ by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors", *Clinical cancer research*, 9: 5113-5119.
- [81] Kim, J.W. Wieckowski, E. Taylor, D.D. Reichert, T.E. Watkins, S. ve Whiteside, T.L., (2005). "Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes", *Clinical cancer research*, 11: 1010-1020.

- [82] Christianson, H.C. Svensson, K.J. van Kuppevelt, T.H. Li, J.-P. ve Belting, M., (2013). "Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 17380-17385.
- [83] Guo, L. ve He, B., (2017). "Extracellular vesicles and their diagnostic and prognostic potential in cancer", *Transl Cancer Res*, 6: 599-612.
- [84] Kim, J. Shin, H. Kim, J. Kim, J. ve Park, J., (2015). "Isolation of high-purity extracellular vesicles by extracting proteins using aqueous two-phase system", *PLoS ONE*, 10: e0129760.
- [85] Hartjes, T.A. Mytnyk, S. Jenster, G.W. van Steijn, V. ve van Royen, M.E., (2019). "Extracellular vesicle quantification and characterization: common methods and emerging approaches", *Bioengineering*, 6: 7.
- [86] Allison, D.P. Mortensen, N.P. Sullivan, C.J. ve Doktycz, M.J., (2010). "Atomic force microscopy of biological samples", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2: 618-634.
- [87] Berne, B.J. ve Pecora, R., (2000). *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*: Courier Corporation.
- [88] Stoner, S.A. Duggan, E. Condello, D. Guerrero, A. Turk, J.R. Narayanan, P.K. ve Nolan, J.P., (2016). "High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles", *Cytometry Part A*, 89: 196-206.
- [89] Rani, S. Ryan, A.E. Griffin, M.D. ve Ritter, T., (2015). "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications", *Molecular Therapy*, 23: 812-823.
- [90] Grange, C. Skovronova, R. Marabese, F. ve Bussolati, B., (2019). "Stem cell-derived extracellular vesicles and kidney regeneration", *Cells*, 8: 1240.
- [91] Hood, J.L., (2019). "Natural melanoma-derived extracellular vesicles": Elsevier.
- [92] Farcas, M. ve Inngjerdigen, M., (2020). "Natural killer cell-derived extracellular vesicles in cancer therapy", *Scandinavian Journal of Immunology*, 92: e12938.
- [93] Xu, J. Wang, Y. Hsu, C.-Y. Gao, Y. Meyers, C.A. Chang, L. Zhang, L. Broderick, K. Ding, C. ve Peault, B., (2019). "Human perivascular stem cell-derived extracellular vesicles mediate bone repair", *Elife*, 8: e48191.
- [94] Tao, S.-C. Guo, S.-C. ve Zhang, C.-Q., (2017). "Platelet-derived extracellular vesicles: an emerging therapeutic approach", *International journal of biological sciences*, 13: 828.
- [95] Pisano, C. Galley, J. Elbahrawy, M. Wang, Y. Farrell, A. Brigstock, D. ve Besner, G.E., (2020). "Human breast milk-derived extracellular vesicles in the protection against experimental necrotizing enterocolitis", *Journal of Pediatric Surgery*, 55: 54-58.
- [96] Nonaka, T. ve Wong, D.T., (2017). *Saliva-exosomics in cancer: molecular characterization of cancer-derived exosomes in saliva*, ed. The Enzymes. Elsevier, 125-151.

- [97] Rome, S., (2019). "Biological properties of plant-derived extracellular vesicles", *Food & function*, 10: 529-538.
- [98] Ju, S. Mu, J. Dokland, T. Zhuang, X. Wang, Q. Jiang, H. Xiang, X. Deng, Z.-B. Wang, B. ve Zhang, L., (2013). "Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis", *Molecular Therapy*, 21: 1345-1357.
- [99] Wang, B. Zhuang, X. Deng, Z.-B. Jiang, H. Mu, J. Wang, Q. Xiang, X. Guo, H. Zhang, L. ve Dryden, G., (2014). "Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit", *Molecular Therapy*, 22: 522-534.
- [100] Deng, Z. Rong, Y. Teng, Y. Mu, J. Zhuang, X. Tseng, M. Samykutty, A. Zhang, L. Yan, J. ve Miller, D., (2017). "Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell AMP-activated protein kinase", *Molecular Therapy*, 25: 1641-1654.
- [101] Zhang, M. Viennois, E. Prasad, M. Zhang, Y. Wang, L. Zhang, Z. Han, M.K. Xiao, B. Xu, C. ve Srinivasan, S., (2016). "Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer", *Biomaterials*, 101: 321-340.
- [102] Raimondo, S. Naselli, F. Fontana, S. Monteleone, F. Dico, A.L. Saieva, L. Zito, G. Flugy, A. Manno, M. ve Di Bella, M.A., (2015). "Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death", *Oncotarget*, 6: 19514.
- [103] Wolfers, J. Lozier, A. Raposo, G. Regnault, A. Théry, C. Masurier, C. Flament, C. Pouzieux, S. Faure, F. ve Tursz, T., (2001). "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming", *Nature medicine*, 7: 297-303.
- [104] Vega, V.L. Rodríguez-Silva, M. Frey, T. Gehrman, M. Diaz, J.C. Steinem, C. Multhoff, G. Arispe, N. ve De Maio, A., (2008). "Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages", *The Journal of Immunology*, 180: 4299-4307.
- [105] Lancaster, G.I. ve Febbraio, M.A., (2005). "Exosome-dependent trafficking of HSP70 A novel secretory pathway for cellular stress proteins", *Journal of Biological Chemistry*, 280: 23349-23355.
- [106] Anand, S. ve Cheres, D.A., (2011). "Emerging role of micro-RNAs in the regulation of angiogenesis", *Genes & cancer*, 2: 1134-1138.
- [107] Li, X. Jiang, C. ve Zhao, J., (2016). "Human endothelial progenitor cells-derived exosomes accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats by promoting endothelial function", *Journal of Diabetes and its Complications*, 30: 986-992.
- [108] Geiger, A. Walker, A. ve Nissen, E., (2015). "Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice", *Biochemical and biophysical research communications*, 467: 303-309.

- [109] Abamor, E.S. Allahverdiyev, A.M. Bagirova, M. ve Rafailovich, M., (2017). "Meglumine antimoniate-TiO₂@ Ag nanoparticle combinations reduce toxicity of the drug while enhancing its antileishmanial effect", *Acta Tropica*, 169: 30-42.
- [110] Gonçalves-Oliveira, L.F. Souza-Silva, F. de Castro Côrtes, L.M. Veloso, L.B. Pereira, B.A.S. Cysne-Finkelstein, L. Lechuga, G.C. Bourguignon, S.C. Almeida-Souza, F. ve da Silva Calabrese, K., (2019). "The combination therapy of meglumine antimoniate and oxiranes (epoxy- α -lapachone and epoxymethyl-lawsone) enhance the leishmanicidal effect in mice infected by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*", *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10: 101-108.
- [111] de Moraes Alves, M.M. Arcanjo, D.D.R. Figueiredo, K.A. Oliveira, J.S.d.S.M. Viana, F.J.C. de Sousa Coelho, E. Lopes, G.L.N. Gonçalves, J.C.R. Carvalho, A.L.M. ve dos Santos Rizzo, M., (2020). "Gallic and Ellagic Acids Are Promising Adjuvants to Conventional Amphotericin B for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64.
- [112] Ghazonfari, T. Hassani, Z. Ebtekar, M. Ahmadiani, A. Naderi, G. ve Azar, A., (2000). "Garlic induces a shift in a *Leishmania* major-infected balby mice", *Scandinavian Journal of Immunology*, 52: 491-495.
- [113] Kocaadam, B. ve Şanlier, N., (2017). "Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health", *Critical reviews in food science and nutrition*, 57: 2889-2895.
- [114] Zhang, M. Viennois, E. Xu, C. ve Merlin, D., (2016). "Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases", *Tissue barriers*, 4: e1134415.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: kubra_unal@hotmail.com

Konferans Bildirileri

1. K. Ünal* , A.M. Allahverdiyev, M. Bağirova, S. Dinparvar, E. Ş. Abamor, "Antileishmanial activities of curcumin derived extracellular vesicles on L. tropica promastigotes and amastigotes, in vitro," 3 rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), Abstract Book, p. 732, 2020.