

Pentavalent Antimonial Bileşiklere Dirençli Vahşi *Leishmania* İzolatlarının Leishmaniasis Tedavisinde Kullanılan İlaçlara Karşı *in vitro* Dirençlerinin Karşılaştırılması

Comparison of in vitro Resistance of Wild Leishmania Isolates, Which are Resistant to Pentavalent Antimonial Compounds, Against Drugs Used in the Treatment of Leishmaniasis

✉ Ahmet Özbilgin¹, ✉ İbrahim Çavuş¹, ✉ Tuğba Kaya², ✉ Ahmet Yıldırım¹, ✉ Mehmet Harman³

¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

³Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

Cite this article as: Özbilgin A, Çavuş İ, Kaya T, Yıldırım A, Harman M. Pentavalent Antimonial Bileşiklere Dirençli Vahşi *Leishmania* İzolatlarının Leishmaniasis Tedavisinde Kullanılan İlaçlara Karşı *in vitro* Dirençlerinin Karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):12-6.

ÖZ

Amaç: Türkiye’de, Kutanöz leishmaniasis (KL) tedavisinde meglumin antimonat (Glucantime®) ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®) kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda bu ilaçlara direnç olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada; dirençli *Leishmania* suşlarının Amfoterisin B, Miltefosin, Meglumine Antimonat, Paromomisin ve Sodyum Stiboglukonat etkenlerine karşı duyarlılığının *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Meglumine Antimonat tedavisi iki kür uygulanan, ancak klinik iyileşme gözlenmeyen hastalardan elde edilen ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası’nda saklanan 5 *Leishmania* izolatu seçilmiştir. Seçilen izolatlar ITS1 bölgesine özgü primer ve probler kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi ile tiplendirilmiştir. Her izolatın; Amfoterisin B, Miltefosin, Meglumine Antimonat, Paromomisin ve Sodyum Stiboglukonat etken maddelerine karşı, 500, 250, 125, 50, 25 µg/mL konsantrasyonlarında, ilaç direnç düzeyleri XTT ve hemositometre yöntemiyle çalışılmıştır.

Bulgular: Ülkemizde KL etkeni olan ve iki kez meglumin antimonat tedavisine rağmen klinik ve paraziter iyileşme göstermeyen hasta lezyonlarından elde edilen dirençli *Leishmania tropica* izolatlarının Amfoterisin B’ye hiç direnç göstermedikleri ve sırası ile Miltefosin, Sodyum Stiboglukonat, Paromomisin ve Meglumine Antimonat’a karşı duyarlı oldukları gözlenmiştir. Kontrol grubu *Leishmania tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) izolatının ise beş etken maddenin ilaç konsantrasyonlarının hiçbirinde canlılığını sürdüremediği görülmüştür.

Sonuç: Seçilen dirençli *L. tropica* izolatlarının hiç birinin Amfoterisin B’ye direnç göstermediği çalışmada saptanmış ve istatistiksel olarak da ortaya konulmuştur (p<0,05). Elde edilen verilerin, ilaç çalışmaları yapan ve yeni ilaç molekülleri araştıran klinisyen ve araştırmacılara yol göstermesi açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kutanöz leishmaniasis, direnç, tedavi, direnç testleri, Türkiye

ABSTRACT

Objective: Meglumine antimoniate (Glucantime®) and Sodium stibogluconate (Pentostam®) are used for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. There is a reported resistance to these drugs in recent years. The aim of the present study was to compare the *in vitro* sensitivities of resistant *Leishmania* isolates against Amphotericin B, Miltefosine, Meglumine Antimoniate, Paromomycin and Sodium Stibogluconate.

Methods: Five *Leishmania* isolates of patients with cutaneous leishmaniasis, who showed no clinical recovery despite two consecutive meglumine antimoniate treatments, which were stored in the Parasite Bank in Manisa Celal Bayar University Medical Faculty were selected. They were genotyped with Real-Time PCR using specific primers and probes to ITS1 region. Drug resistance levels of each *Leishmania* isolate were analysed for Amphotericin B, Miltefosine, Meglumine Antimoniate, Paromomycin, and Sodium Stibogluconate at concentrations of 500, 250, 125, 50, 25 µg/mL with XTT method and hemocytometer.



Geliş Tarihi/Received: 14.11.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 30.11.2019

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Tuğba Kaya, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Tel/Phone: +90 507 490 26 07 **E-Posta/E-mail:** tugbakaya42@yahoo.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-7612-5414

Results: It was observed that the resistant *Leishmania tropica* isolates showed no resistance to Amphotericin B, and were sensitive to Miltefosine, Sodium Stibogluconate, Paromomycin and Meglumine Antimonate, respectively. In addition, *Leishmania tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) isolate of the control group could stay viable in none of the drug concentrations of five agents in the study.

Conclusion: It was determined that none of the selected resistant *L. tropica* isolates showed resistance to Amphotericin B and that was also shown statistically ($p < 0.05$). The results of this study are important in guiding clinicians and researchers who conduct studies on drugs and search for new drug molecules.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, resistance, treatment, resistance tests, Turkey

GİRİŞ

Ülkemizde Urfa çıbanı, Antep çıbanı, Şark çıbanı, güzellik yarası gibi çeşitli isimler ile bilinen kutanöz leishmaniasis (KL), günümüzde hala önemini koruyan bir paraziter hastalıktır (1,2). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl 1,5 milyon yeni KL olgusunun olduğu ve önemli bir kısmının Afganistan, Cezayir, Suudi Arabistan ve Suriye gibi ülkelerde görüldüğü bildirilmiştir (3).

Türkiye’de 1990-2010 yılları arasında toplam 46,003, 2011-2017 yılları arasında ise toplam 21,370 KL olgusu olduğu Sağlık Bakanlığı tarafından bildirilmiştir (1,4). Ülkemizde Güney Doğu Anadolu Bölgesi başta olmak üzere günümüzde tüm bölgelerde KL olguları görülmeye başlanmıştır (5).

KL lezyonları, kişinin immünite durumuna bağlı olarak bazı olgularda kalıcı skar bırakarak kendiliğinden iyileşebilmektedir. Ancak hastaların hem estetik kaygılarının önlenmesi hem de enfeksiyon kaynağı olmalarından dolayı bütün hastaların tedavi edilmesi önerilmektedir (1,6). KL tedavisinde, ilk seçenek olarak beş değerli antimon bileşikler [meglumin antimonat (Glucantime®) ve sodium stibogluconate (Pentostam®)] tercih edilmektedir. Beş değerli antimon bileşiklerinin kontrendikasyon olduğu zamanlarda ise amfoterisin, miltefosin, pentamidin gibi çeşitli alternatif ilaçlardan faydalanılmaktadır (6,7).

Ülkemizde KL tedavisinde, 1940’lı yıllarda klinik etkinliği tanımlanan beş değerli antimon (SbV) bileşikler ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Meglumin antimonat (Glucantime®) ve sodyum stibogluconat (Pentostam®) bu grup içerisinde yer almaktadır. KL tedavisinde yaklaşık %90 bir etkinliği olduğu bildirilmiştir. *Leishmania* amastigotları üzerinde glikolitik enzimleri, yağ asidi oksidasyonunu, DNA ve RNA sentezini inhibe ederek etki etmektedirler. Ancak bu grup ilaçlar ağır metaldir ve son yıllarda dirençli suşların ortaya çıkmasına bağlı olarak alternatif ilaçlara gereksinin duyulmaya başlanmıştır (8,9).

Beş değerli antimon bileşiğinde yer alan ilaçlar ile tedaviye yanıt alınamayan hastalarda miltefosinin kullanılabilmesi yapılan araştırmalarda bildirilmiştir. Ancak miltefosinin pahalı bir ilaç olmasının yanı sıra organizmadaki yarılanma ömrünün uzun olması, hastalarda şiddetli bulantı benzeri yan etkilerinin olması ve ülkemizde miltefosin preparatının bulunmaması gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır (6,8).

Tedaviye cevap alınmayan KL olguların tedavisinde antifungal bir ilaç olan amfoterisin B’den de yararlanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, KL tedavisinde klinik olarak direncin rastlanmadığı tek ilacın amfoterisin B olduğu bildirilmiştir (6). Ancak miltefosin gibi maliyeti yüksek bir ilaçtır ve hastanın tedavi süresince gözleminin yapılması gerekmektedir (7).

Paromomisin, 1960’lı yıllarda anti-leishmanial etkisi bildirilen, genel olarak bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılan aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir (10). %12 metilbenzetyum içeren %15’lik paromomisin kombinasyonlarının özellikle *L. major* enfeksiyonlarında etkili olduğu ancak yan etkilerinin de bulunduğu yapılan araştırmalarda bildirilmektedir (9).

KL tedavisinde ülkemizde, meglumin antimonat (Glucantime®) ve sodyum stibogluconat (Pentostam®) ilaçları kullanılmaktadır. Son yıllarda bu ilaçlara karşı direnç olduğu bildirilmektedir. Dirençli bu olguların tedavisinde hangi ilaçların hangi dozlarda etkili olduğunun araştırılarak klinisyenlerin bu konuda bilgilendirilmesi hastaların tedavileri açısından büyük önem kazanmaktadır. Çalışmamızda amfoterisin B, miltefosin, meglumin antimonat, paromomisin ve sodyum stibogluconatlara karşı duyarlılığının *Leishmania tropica* izolatlarında *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Toplam 10 doz intralezyoner olarak 2 kez meglumin antimonat (Glucantime®) tedavisi almış ancak hem klinik olarak hem de parazitolojik olarak iyileşme gözlenmeyen toplam 5 KL hastasının lezyonundan NNN besiyerine ekimi yapılarak elde edilmiş ve kriyoprezervasyonu yapılarak sıvı azot tankında saklanmakta olan izolatlar kullanılmıştır (Tablo 1).

Sıvı azot tankında bulunan beş izolat uygun koşullarda sıvı azot tankından çıkarılarak çözdürülmüş ve NNN besiyerlerine ekilmeleri yapılmıştır. NNN besiyerleri 25 °C’de inkübasyona bırakılmış ve izolatların üreme durumu gūnaşırı kontrol edilmiştir. NNN besiyerinde üreyen promastigotlar içerisinde RPMI 1640 (RPMI 1640+ %10 fetal bovine serum) besiyeri bulunan flakslere aktarılmış ve tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Flakslere gūnaşırı üreme yoğunluğu açısından kontrol edilmiştir. Flakslerdeki üreme yoğunluğu 10⁷ promastigot/mL olunca genotiplendirilmesi ve *in vitro* ilaç direnç çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 1. Dirençli izolatların özellikleri

	Geldiği yer	Cinsiyet	Yaş	Lezyon yeri	Lezyon süresi	Lezyon genişliği	Lezyon tipi
İzolat 1	Dicle/Diyarbakır	E	11	Alın	1 yıl	3 cm	Kuru
İzolat 2	Merkez/Diyarbakır	E	14	Burun üstü	6 ay	3 mm	Rezidivan
İzolat 3	Bağlar/Diyarbakır	K	9	Sağ yanak	5 ay	1 cm	Kuru
İzolat 4	Dicle/Diyarbakır	K	13	Burun üstü	2 hafta	1-2 mm	Rezidivan
İzolat 5	Mazıdağı/ Mardin	K	15	Burun ucu	10 ay	2 cm	Kuru

İzolatların genotiplendirilmesi *leishmania ITS-1* gen bölgesine özgü primer ve proplar kullanılarak gerçek zaman-polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PRZ) yöntemi ile yapılmıştır (5,11,12). Bu çalışma, T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Yerel Etik Kurulu'nun 07/12/2016 tarih ve 20.478.486-399 sayılı kararı ile alınan etik kurul onayı ile gerçekleştirilmiştir.

İn vitro İlaç Direnç Testleri

Çalışmada, 96'lık düztabanlı hücre kültürü plağının kuyucukları 3'ü blank (kör kuyucuk), 3'ü ilaçsız parazit kontrol, 3'ü meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) ve 3'ü sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) olacak şekilde gruplara ayrılmış ve her kuyucuğa 100 µL RPMI 1640 besiyerinden (%10 FCS+%1 penisilin/streptomisin +%1 gentamisin) ilave edilmiştir. Direnç testi uygulanacak olan meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat olarak işaretlenen bölmelerin her birinin ilk kuyucuğuna her bir ilaçtan 100 µL kendi bölmelerine eklenmiştir. İlk kuyucuktan 100 µL alınarak seri sulandırması 500, 250, 125, 50 ve 25 µg/mL olacak şekilde aktarılmış ve blank bölmeleri hariç tüm kuyucuklara 100 µL promastigot süspansiyonundan (10⁶ promastigot/mL) konulmuştur. Doksan altılık düz tabanlı hücre kültürü plağının etrafı parafinle kaplanarak 48 saat süre ile 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hemositometre yöntemi ve XTT direnç testi ile *in vitro* direnç düzeyleri saptanmıştır.

Hemositometre Yöntemi

Etüvdeki plaklar çıkarılmış ve Neubauer'in Thoma lamı yardımı ile *leishmania* promastigotları sayısı belirlenmiştir. Her bir kuyucuktan ayrı ayrı örnek alınarak 40X'lik büyütmede sayım yapılmıştır. Bu amaçla Thoma lamının köşelerinde bulunan toplam dört kare ve orta kısımda bulunan kare içerisindeki promastigotlar sayılmıştır. Sayılan toplam promastigot sayısı 10,000 ile çarpılmış ve elde edilen rakam sayılan kare sayısına bölünerek mL'deki promastigot sayısı tespit edilmiştir.

XTT (Sodium 3,3',4,4'-tetrakis[1-(phenyl amino carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) Benzene Sülfonik Asit Hidrat) Direnç Testi

XTT direnç testi çalışması için, etüvden yeni bir 96'lık düztabanlı hücre kültürü plağı çıkarılmıştır. Plağın her bir kolonunda bulunan kuyucuklardaki solüsyondan 100 µL alınmış ve yeni bir hücre kültürü plağına aktarılmıştır.

Kit içerisinde bulunan reagent solüsyonundan 5 mL, electron coupling solüsyonundan ise 0,1 mL alınarak karıştırılmıştır. Yeni hücre kültürü plağının her bir kuyucuğuna hazırlanan bu karışımdan 50 µL ilave edilmiş ve 25 °C'lik etüve konularak 4 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda spektrofotometrede 450 nm'de absorbans değeri ölçülerek canlılık hesaplaması yapılmıştır. Yapılan deneyler üç defa tekrar edilmiştir (5) (Şekil 1-2).

Elde edilen verilerin, Sidak's multiple comparisons testi uygulanarak istatistiksel analizi yapılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

İzolatların GZ-PRZ yöntemi ile genotiplendirilmesi sonucu beş izolatında *L. tropica* ile uyumlu pik verdiği gözlenmiştir.

Dirençli KL olgularına ait *Leishmania tropica* izolatlarının *in vitro* duyarlılık çalışmalarında 500 µg/mL ilaç konsantrasyonunda beş etken madde arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Tüm ilaçlar parazitleri öldürmüştür (p>0,05). *In vitro* testlerde 250

µg/mL ilaç konsantrasyonunda ise amfoterisin B tüm ilaçlardan daha etkili bulunurken daha sonra sırası ile miltefosine, sodyum stiboglukonat, paromomycin ve meglumin antimonatın kontrol grubuna göre etkili olduğu görülmüştür (p<0,05). Kontrol grubu ile karşılaştığımızda 125 µg/mL ve 50 µg/mL ilaç konsantrasyonlarında amfoterisin B, miltefosin ve sodyum stiboglukonatın etkili olduğu (p<0,05), paromomycin ve meglumin antimonatın etkisiz olduğu (p>0,05), 25 µg/mL ilaç konsantrasyonunda amfoterisin B (p<0,05) nin etkili olduğu diğer tüm ilaçların etkisiz olduğu ve amfoterisin B dışında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür (p>0,05). Kontrol grubu (referans izolat) *L. tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) izolatının ise beş etken maddenin ilaç konsantrasyonlarının hiçbirinde canlılığını sürdüremediği görülmüştür.

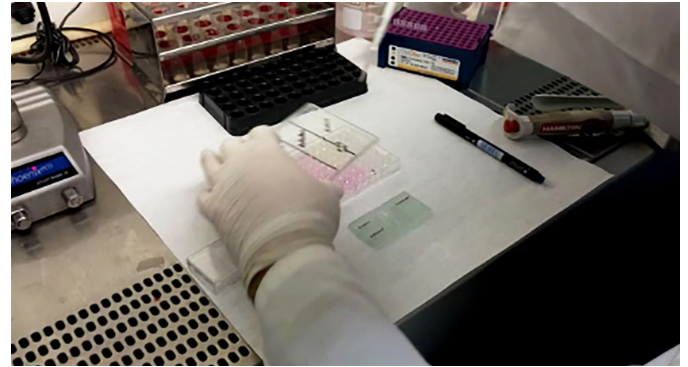
Ülkemizde KL etkeni olan ve iki kez glukantime tedavisine rağmen klinik ve parazitler iyileşme göstermeyen hasta lezyonlarından elde edilen dirençli *Leishmania tropica* izolatlarında parazitlerin amfoterisin B'ye hiç direnç göstermedikleri ve sırası ile miltefosine, sodyum stiboglukonat, paromomycin ve meglumin antimonata karşı duyarlı oldukları görülmüştür (Şekil 3).

İstatistiksel Analiz

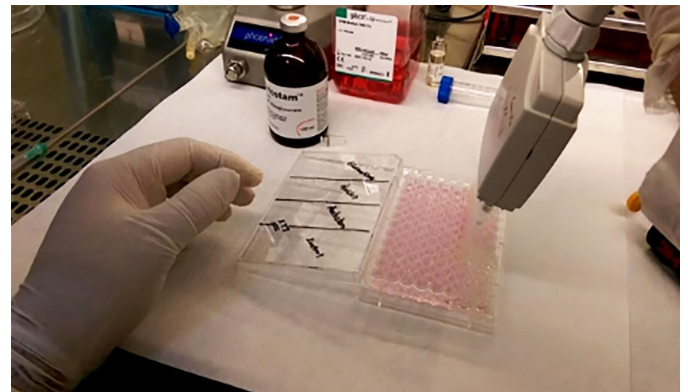
Elde edilen verilerin, Sidak's multiple comparisons testi uygulanarak istatistiksel analizi yapılarak değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

KL lezyonlarının birçoğu kendiliğinden iyileşebilmekte ancak tedavi edilmediğinde kalıcı iz bırakabilmektedir. KL lezyonlarının



Şekil 1. Hemositometre yöntemi



Şekil 2. XTT direnç testi

kendiliğinden iyileşme süresi *L. tropica* ile *L. infantum*'da 6-20 ay ve *L. major*'da ise 2-6 ay arasında değişmektedir ancak bu süre kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Hastaların KL için kaynak olabileceğinden tanı konulan tüm hastaların tedavi edilmesi gerekmektedir (1,6,13).

KL tedavisinde beş değerli antimon bileşikleri kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda KL'nin endemik olduğu birçok ülkede, tedaviden alınan sonuçlardaki başarısızlıkların artmakta olduğu bildirilmektedir (14). KL'de bu grup ilaçlara direnç gelişmekte olduğu ve bu nedenle tedaviye yanıt alınmayan KL olgularında miltefosin, amfoterisin B, paromomisin gibi çeşitli alternatif ilaçlar kullanılmaktadır (1,6).

İntravenöz olarak uygulanan amfoterisin B'nin böbrekler üzerinde ciddi yan etkileri bulunmaktadır (15,16). Oral olarak kullanılan miltefosin, pahalı bir preparat olmasının yanı sıra teratojen etki gösterebilmektedir (16). Topikal yolla uygulanan Paromomisin ise nadirde olsa renal ve sekizinci kranial sinir toksisitetlerine neden olmaktadır. Bunun yanı sıra topikal sağaltımla birlikte beş değerli antimon bileşiklerinin birlikte kullanılması sonucu %90 başarı elde edildiği bildirilmiştir (17,18).

Ateş ve ark. (8) ülkemizde KL tedavisinde kullanılan beş değerli antimon bileşikleriyle sonuç alınmadığı zamanlar miltefosin preparatının tercih edilmesinin tedavideki başarı oranını artıracığı görüşünde olduklarını bildirmişlerdir. García Bustos ve ark. (19) 2014'de, deney farelerinin ayak tabanlarında oluşturdukları leishmania enfeksiyonunda meglumin antimonat ile miltefosini karşılaştırarak incelemişler ve miltefosinin etkili ve güvenli bir alternatif tedavi seçeneği olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca miltefosinin, meglumin antimonat'dan daha etkili bir preparat olduğu da vurgulamışlardır.

Yeşilova ve ark. (7) intralezyonal ve sistemik meglumin antimonat tedavisine bağlı lokal yan etki gelişmiş bir KL olgusunu sistemik amfoterisin B ile tedavi etmişler ve özellikle beş değerli antimon bileşiklerine dirençli olgularda amfoterisin B'nin, tedavide alternatif bir ilaç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Mushtaq ve ark. (20) ise haftada bir intralezyonal amfoterisin B

(2,5 mg / mL) enjeksiyonu uyguladıkları beş KL tanılı hastanın hepsinin tedaviye iyi yanıt verdiğini ve intralezyonal amfoterisin B'nin Eski Dünya KL suşları üzerinde güvenli ve etkili bir tedavi sunduğu sonucuna varmışlardır. Ancak ilaç etkinlik değerlerini belirlemek için kontrol çalışmalarının yapılması gerektiğini de vurgulamışlardır. Hollanda'da 2017 yılında KL tanılı 2 askerde günde 3 kez 28 gün boyunca oral olarak miltefosin (50 mg) tedavi protokolü uygulamışlardır. Her iki hastanın da miltefosine yanıtının iyi olduğunu ve ilacın yan etkilerinin ise az olduğunu belirtmişlerdir (21).

Hamzavi ve ark. (22) İran'ın Fars eyaletinde, vücudunda birden fazla sayıda KL lezyonu bulunan sekiz yaşındaki bir kız çocuğuna meglumin antimonat ve amfoterisin B ile uygulanan birçok tedaviden sonuç alınmadığını ancak miltefosin ve amfoterisin B'nin birlikte kullanımı sonucunda başarılı bir şekilde hastayı tedavi ettiklerini bildirmişlerdir.

Etkeni *L. major* olan KL lezyonların tedavisinde, topikal Paromomisin'in kullanımı ile tedavide başarılı sonuçlar alındığı bildirilmektedir (23). El-on ve ark. (24) 1986 yılında yaptıkları bir çalışmada *L. major*'un etkeni olduğu 67 KL olgusunun tedavisinde Paromomisin kullanmışlar ve hastaların %87'sinin tedavisinde başarılı sonuç almışlardır. Mussi ve ark. (9) %10 Paromomisin içeren hidrofilik merhemi deneysel olarak enfekte Balb/c fareler üzerinde değerlendirmişler ve KL'nin topikal tedavisinde alternatif bir seçenek olabileceğini belirtmişlerdir. Chacko ve ark. (25) Kanada Toronto'da üç buçuk yaşındaki KL pozitif bir erkek hastanın tedavisinde topikal olarak Paromomisin kullanmışlardır. Yaklaşık üç aylık bir sürede çok iyi bir sonuç aldıklarını ve bir yıl sonra yapılan kontrolde nüks olmadığını bildirmişlerdir.

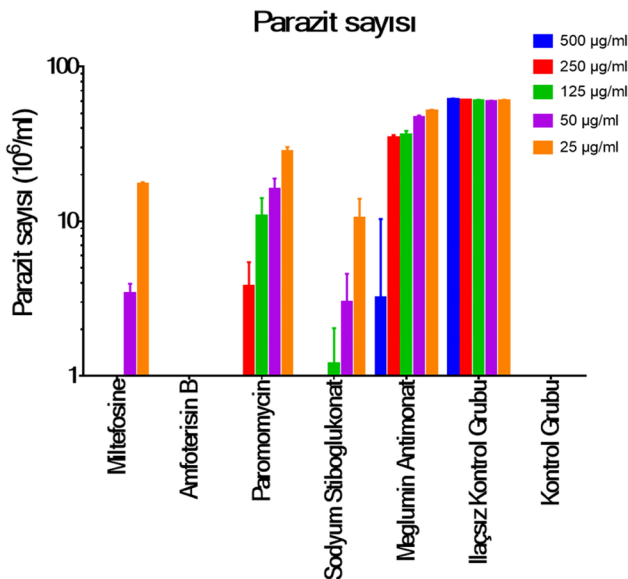
KL'nin endemik olarak görüldüğü ülkelerden biri olan İran'da, KL tedavisinde beş değerli antimon bileşikleriyle ilk tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır ancak son yıllarda ülkede bu ilaçlara karşı direnç geliştiği bildirilmiştir. Bu dirençli izolatların aynı zamanda pentostam ile amfoterisin B'ye de dirençli olduğu ancak miltefosine ile Paromomisine ise duyarlı olduğu gösterilmiş ve İran'da leishmaniasis tedavisinde miltefosin ve paromomisin'in kullanılmasının yararlı olabileceğini saptamışlardır (26).

Çalışmamızda dirençli KL izolatlarının öncelikle GZ-PZR analizi ile tür tayini yapılmış ve iki kez tedavi olmuş ancak tekrarlayan lezyonları bulunan beş KL olgusundan izole edilmiş *L. tropica* suşların amfoterisin B, miltefosine, meglumin antimonat, paromomycin ve sodyum stiboglukonatlara karşı duyarlılığının *in vitro* araştırılması yapılmıştır.

Bizim de bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlarda, ülkemizde KL etkeni olan ve iki kez meglumin antimonat (Glucantime®) tedavisine rağmen klinik ve paraziter iyileşme göstermeyen, hasta lezyonlarından elde edilen dirençli *L. tropica* izolatlarında parazitlerin amfoterisin B'ye direnç göstermedikleri daha sonra ise sırası ile miltefosine, sodyum stiboglukonat, paromomycin ve meglumin antimonata karşı duyarlı oldukları görülmüştür.

SONUÇ

Türkiye'de son yıllarda görülen iklim değişikliğine bağlı olarak sıcaklığın artması bu parazitin Türkiye'de var olan vektörlerinin sayısının artmasına sebep olmuştur. Ayrıca son yıllarda ülkemize gelen mültecilerin sayısının artması ve gelen mültecilerin de endemik bölgelerden gelmesi bu sayının artmasına katkı sağlamıştır. Bu gibi sebeplerden dolayı ülkemizdeki parazitlerin vektörlerinin dağılımlarının artmasına bağlı olarak hastalık



Şekil 3. İlaç konsantrasyonlarına göre parazit sayısının değişimi

yaygınlaşmakta ve leishmaniasise karşı direnç gelişmektedir. Bu çalışma ile dirençli olguların tedavisinde alternatif olabilecek ilaçların belirlenmesi, kullanılan ilaçların dozlarının tedavi edilebilirlik açısından incelenmesi sonucunda elde edilecek bu verilerin klinisyenlerle paylaşarak klinisyenler açısından yol gösterici olması ve hastaların tedavilerinin sorunsuz çözümlenmesi açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Yerel Etik Kurulu'nun 07/12/2016 tarih ve 20.478.486-399 sayılı kararı ile alınan etik kurul onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Hasta Onayı: Çalışmada kullanılan parazitler insan hücresi olmadığı ve sıvı azottan çıkarılarak kullanıldığı için çalışmaya etik kurul eklenmiştir. Hasta onay bilgisine gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu içinde olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Konsept: A.Ö., M.H., İ.Ç., T.K., A.Y., Dizayn: A.Ö., M.H., Veri Toplama veya İşleme: A.Ö., M.H., İ.Ç., T.K., A.Y., Analiz veya Yorumlama: A.Ö., İ.Ç., T.K., A.Y., Literatür Arama: İ.Ç., T.K., A.Y., Yazan: A.Ö., İ.Ç., T.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması olmadığı bildirilmiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2017-025).

Teşekkür: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'na çalışmadaki suşların temin edilmesinde sağladığı katkılardan ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgen MK, Özbel Y. Türkiye'de kutanöz leishmaniasisin durumu. Türkiye Parazit Derg 2012;36:121-9.
- Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniasis. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, editors. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları Kitabı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No: 22; 2007. p.197-244.
- WHO Technical Report Series-949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.
- <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoontikvektorel-sarkicibani/istatistik>
- Özbilgin, A, Çavuş İ, Yıldırım A, Kaya T, Ertabaklar H. Leishmania tropica Üzerinde In vitro ve In vivo İlaç Etkinliğinin Değerlendirilmesi: Pilot Çalışma. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2018;42:11-19.
- Uzun S, Gürel MS, Harman M. Kutanöz Layşmanyazis Tanı ve Tedavi Rehberi. Türk Dermatoloji Derneği, Haziran 2017. Galenos Yayınevi, İstanbul, Türkiye. Available from: URL: <http://cms.galenos.com.tr/SolvePark/Uploads/files/573ed560a9ec42ed8c04c39ec743e34e.pdf>
- Yeşilova Y, Turan E, Sürücü H A, Aksoy M, Özbilgin A. (2014). Sistemik lipozomal amfoterisin B tedavisine cevap veren kutanöz leishmaniasis olgusu. Türkiye Parazit Derg 2015;39:63-65.
- Ateş F, Or E, Körpınar M A, Gönül R, Bahçeci T. Leishmaniasis tedavisinde antimon bileşiklerinin kullanımı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2011;22:53-57.
- Mussi SV, Fernandes AP, Ferreira LA. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for

topical treatment of infections by Leishmania (Leishmania) major and Leishmania (Leishmania) amazonensis. Parasitol Res 2007;100:1221-6.

- Scott JA, Davidson RN, Moody AH, Grant HR, Felmingham D, Scott GM, et al. Aminosidine (paromomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1992;86:617-9.
- El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2000;94:575-9.
- Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarlı AT, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of Leishmania parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS neglected tropical diseases 2013;7:e2205.
- Uzun S, Gürel MS, Durdu M, Akyol M, Fettahhoğlu Karaman B, Aksoy M, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. International journal of dermatology 2018;57:973-982.
- Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng TC, Najjar E, Alvarez E, et al. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. Clinical infectious diseases 2001;33:1847-51.
- Berman JD, Goad LJ, Beach DH, Holz GG. Effects of ketakonazole on sterol biosynthesis by Leishmania mexicana mexicana amastigotes in murine macrophage tumor cells. Mol Biochem Parasito 1986;20:85-92.
- Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2003;16:397-401.
- Berman JD. Human leishmaniasis: Clinical, diagnosis and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997;24:684-703.
- Scott JA, Davidson RN, Moddy AH, Grant HR, Felmingham D, Scott GM, et al. Aminosidine (paromomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992;86:617-9.
- García Bustos MF, Barrio A, Prieto GG, de Raspi EM, Cimino RO, Cardozo RM, et al. In vivo antileishmanial efficacy of miltefosine against Leishmania (Leishmania) amazonensis. J Parasitol 2014;100:840-7.
- Mushtaq S, Dogra D, Dogra N. Clinical Response with intralesional Amphotericin B in the treatment of old world cutaneous leishmaniasis: a preliminary report. Dermatol Ther 2016;29:398-405.
- van der Snoek EM, Couwenberg SM, Stijnis C, Kortbeek LM, Schadd EM. Two cases of cutaneous leishmaniasis in Dutch military personnel treated with oral miltefosine. Journal of the Royal Army Medical Corps 2017;163:68-70.
- Hamzavi SS, Sanaei Dashti A, Kadivar MR, Pouladfar G, Pourabbas B. Successful treatment of disseminated cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B and miltefosine in an eight-year-old girl. The Pediatric infectious disease journal 2018;37:275-277.
- Harman M. Kutanöz Leishmaniasis. Turkish Journal of Dermatology/Türk Dermatoloji Dergisi 2015;9:168-76.
- El-On J, Livshin R, Even-Paz Z, Hamburger D, Weinrauch L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. J Invest Dermatol 1986;87:284-8.
- Chacko A, Joseph M, Feltis T, Morris S K. Successful Treatment of Cutaneous Leishmaniasis with Topical Paramomycin in a Child After Treatment Failure with Systemic Fluconazole. The American journal of tropical medicine and hygiene 2016;95:793-794.
- Hadighi R, Boucher P, Khamesipour A, Meamar AR, Roy G, Ouellette M, et al. Glucantime-resistant Leishmania tropica isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs. Parasitol Res 2007;101:1319-22.