

# *Leishmania tropica* Üzerinde *In vitro* ve *In vivo* İlaç Etkinliğinin Değerlendirilmesi: Pilot Çalışma

## Evaluation of *In vitro* and *In vivo* Drug Efficacy Over *Leishmania tropica*: A Pilot Study

Ahmet Özbilgin<sup>1</sup> , İbrahim Çavuş<sup>1</sup> , Ahmet Yıldırım<sup>1</sup> , Tuğba Kaya<sup>1</sup> , Hatice Ertabaklar<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

**Cite this article as:** Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Kaya T, Ertabaklar H. Evaluation of *In vitro* and *In vivo* Drug Efficacy Over *Leishmania tropica*: A Pilot Study. Türkiye Parazit Derg 2018; 42:11-9.

### ÖZ

**Amaç:** Kutanöz leishmaniasis (KL) tedavisinde ülkemizde antimon bileşiklerinden meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) kullanılmaktadır. Çalışmamız, bu konuda çalışmalar planlayan genç araştırmacılara rehber olacak şekilde, *in vitro* ve *in vivo* modellerde ilaç direnç testlerinin ve etken madde taramalarının yapılmasına temel ve kaynak oluşturması amacıyla planlanmıştır.

**Yöntemler:** Bir KL izolatu sıvı nitrojenden çıkarıldıktan sonra internal transcribed spacer 1 (ITS1) problu gerçek-zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu (PZR) testi uygulanarak genotiplendirilmiştir. Meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat'a karşı ilaç direncini belirlemek için *in vitro* ve *in vivo* direnç testleri uygulanmıştır. *In vitro* ilaç direncini araştırmak için hemositometre ve XTT (sodium 3,39-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sülfonik asit hidrat) yöntemleri, *in vivo* ilaç direncini araştırmak için ise farelerde KL modelleri kullanılmıştır.

**Bulgular:** Kullanılan izolatu PZR ile ITS1 bölgesine göre yapılan genotiplendirmeye *Leishmania tropica* olduğu saptanmıştır. *In vitro* ilaç direnç testlerinde meglumin antimonat'a göre sodyum stiboglukonat'ın daha etkili olduğu görülmüş fakat istatistiksel olarak belirgin bir fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ). *In vivo* çalışmalarda ise meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat tedavisinin ayakta lezyonları enfeksiyonun 5. haftadan sonra küçültmeye başladığı ve 3 ay sonunda her iki ilacın uygulandığı gruplarda klinik ve parazitolojik iyileşme olduğu görülmüştür.

**Sonuç:** Çalışacak genç araştırmacılar için rehber niteliğinde olacak şekilde *in vitro* ve *in vivo* modelde ilaç direnç testleri ve etken madde tarama yöntemleri temel ve basit olarak verilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Leishmaniasis, *in vitro*, *in vivo*, ilaç direnç testleri, Türkiye

**Geliş Tarihi:** 15.09.2017

**Kabul Tarihi:** 05.01.2018

### ABSTRACT

**Objective:** Two pentavalent antimonials, meglumine antimoniate (Glucantime®, France) and sodium stibogluconate (Pentostam®, England), are used to treat cutaneous leishmaniasis (CL) in Turkey. The present study, serving as a guidebook for young researchers, aims to provide basis for conducting drug resistance tests and active ingredient scanning in *in vitro* and *in vivo* models.

**Methods:** A CL isolate kept in liquid nitrogen was initially thawed and genotyped by real-time polymerase chain reaction (PCR) using ITS1 prob. *In vitro* and *in vivo* tests were conducted to determine drug resistance against meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. Hemocytometry and XTT (sodium 3,39-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sülfonik asit hidrat) methods were used to investigate *in vitro* drug resistance. CL mouse models were used to analyze *in vivo* drug resistance.

**Results:** The isolate was determined as *Leishmania tropica* by genotyping by PCR on the internal transcribed spacer 1 (ITS1) gene region. In *in vitro* drug resistance tests, sodium stibogluconate was observed to be more effective than meglumine antimoniate, but there was no statistically significant difference between the two ( $p>0,05$ ). It was observed that the footpad lesions of the animals started to shrink afterward the 5th week of infection following treatment with these agents, and parasitologic recovery was observed at the end of 3 months.

**Conclusions:** With an aim to be used as a guidebook for young researchers, active ingredient scanning and drug resistance tests in both *in vitro* and *in vivo* models were presented in the current study.

**Keywords:** Leishmaniasis, *in vitro*, *in vivo*, drug resistance tests, Turkey

**Received:** 15.09.2017

**Accepted:** 05.01.2018

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Ahmet Yıldırım E.posta: ahmetyildirim.par@yahoo.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5554

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org

## GİRİŞ

Leishmaniasis'in Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, beş kıtada 98 ülkede yaklaşık 12 milyon insanı enfekte ettiği ve 350 milyon kişinin ise risk altında olduğu bilinmektedir. Her yıl bu rakamlara iki milyon yeni olgunun eklendiği, bu olguların yaklaşık bir buçuk milyonunun kutanöz leishmaniasis (KL), yarım milyonunun ise visseral leishmaniasis (VL) olduğu tahmin edilmektedir. Leishmaniasis'e bağlı yıllık ölüm sayısının 50.000 olduğu belirtilmektedir. Kutanöz leishmaniasis olgularının %90'ı Afganistan, Cezayir, Brezilya, İran, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'de bulunmaktadır. KL'nin son 10 yılda görülme sıklığında artış gözlenmekte, yaklaşık her 20 saniyede bir kişinin KL'ye yakalandığı hesaplanmaktadır (1).

Leishmaniasis olgularının artma nedenleri arasında kırsal bölgelerden kentlere göç, enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde iş sahalarının açılması, malnütrisyon, sosyoekonomik düzeyin düşüklüğü ve HIV/Leishmania koenfeksiyonunda artış sayılabilir. Leishmaniasis'in yol açtığı ekonomik kayıp tıbbi bakım ve tedaviler ile birlikte iş gücü bakımından değerlendirildiğinde oldukça büyüktür; bu nedenle gelişmekte olan ülkelerin ekonomileri için leishmaniasis ciddi bir sorundur. Gelişmiş ülkelerde ise HIV/Leishmania koenfeksiyonunda görülen artış nedeniyle leishmaniasis'e ilgi artmaktadır (2-4).

Ülkemizde resmi rakamlara göre 2005-2012 yılları arasında 14.587 KL olgusu ve 207 VL olgusu bildirilmiştir. Son yıllarda, başta Akdeniz ve Ege Bölgesi illerimizde olmak üzere toplam 39 ilimizden sporadik olgular bildirilmiş, ayrıca enfeksiyon odağı olarak bilinen yörelerdeki leishmaniasis olgularında önemli oranda artış görülmüştür. Kutanöz leishmaniasis başta Güney Doğu Anadolu Bölgesi olmak üzere Akdeniz, Orta Anadolu ve Ege bölgelerinden bildirilmektedir. Şimdiye dek yapılan çalışmalarla hastalığın etkeninin *Leishmania tropica*'nın farklı zimodemleri olduğu aynı zamanda *Leishmania infantum*'un da KL'ye sebep olabileceği gösterilmiştir (5).

Farklı türlere bağlı olarak oluşan KL'deki lezyonlar tedaviye yanıt verme açısından değişkenlik gösterebilmektedir. KL tedavisinde uzun yıllardır daha yüksek dozların kullanımına ve daha kısa süreli tedavilere olanak sağladığından dolayı 5 değerli antimon bileşiklerinin organik tuzları tercih edilmektedir. *Leishmania* parazitinin glikoliz ve diğer metabolik yollardaki enzimlerini inhibe ederek etki gösterdiği düşünülen antimoniyallerin ticari olarak iki farklı 5 değerli antimon bileşiği bulunmaktadır. Bunlar Sodyum stiboglukonat ve Meglumin antimonyattır. Türkiye'de sodyum stiboglukonatın "pentostam" markalı ticari formu bulunurken meglumin antimonatın ticari ürünü "glucantime" dir. Sodyum stiboglukonat %10 antimon içerirken meglumin antimonyat ise %8,5 antimon içermektedir. Eşit dozlarda kullanıldığında iki ilacında aynı etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. KL hastalarında bulunan lezyonun tek ve papulonodüler olduğu ve intralezyoner tedaviye uygun lokalizasyonda yer alan lezyonlarda intralezyoner (IL) tedavi uygun görülmektedir. Tedavinin 1-2 ml pentavalan antimoniyollerin IL olarak haftada 3 kez uygulanarak 4 ya da 5 hafta devam edilerek uygulanması tavsiye edilmektedir. Bununla birlikte, lezyona uygulanan ilacın miktarı lezyonun durumuna göre farklılık arz edebilmektedir. Hastada birden fazla lezyon bulunduğu durumlarda, IL uygulamaya uygun olmayan lezyonlar-

da ve tedaviye cevap alınamayan kronik olgularda ise sistemik tedavi uygulanmaktadır. Bu durumda ise 20 mg Sb/kg 20 gün süre ile IM olarak kür uygulanması tavsiye edilmektedir. Birinci kürden sonuç alınamayan olgularda ikinci hatta üçüncü kürün uygulanması önerilmektedir (6, 7).

Leishmaniasis kontrolü tedaviye dirençli parazitlerin ortaya çıkmasıyla çok daha karmaşık bir hal almıştır. Klinikte 5 değerli antimon bileşiklerine direnç önem kazanmakta olup Güney Amerika (8-10), Avrupa (11, 12), Orta Doğu (13, 14) ve özellikle Hindistan'da (15-18) bu direnç görülmeye başlanmıştır. Hatta Hindistan'da endemik bir bölge olan Bihar'da 5 değerli antimon bileşikleriyle tedavinin %60 başarısız olduğu görülmekte ve dirençli parazitler ile enfekte olguların tedaviye yanıt vermediği bildirilmektedir. Alternatif olarak kullanılacak az sayıda ilaç vardır; bunlar arasında amphotericin B, pentamidine ve oral kullanılan, Hindistan'da VL için 4. faz, İran'da ise KL için 3. faz klinik çalışmaları yürütülmekte olan miltefosin yer almaktadır. Miltefosin'e karşı parazitlerin etkinliğinde azalma görüldüğü bildirilmiştir (10, 19, 20). Bu nedenle Leishmaniasis konusunda yeni ilaç araştırmalarına gereksinim vardır.

Yeni ilaçların geliştirilmesi ve değerlendirilmesi süreci iki ana değerlendirme basamağından oluşmaktadır. Klinik öncesi değerlendirmede; sentez edilen veya doğal kaynaklardan izole edilen kimyasal maddelerin, önce mutlaka *in vitro* ve *in vivo* olarak etkinliklerinin araştırılması gerekmektedir.

Mikroorganizmalara karşı geliştirilen yeni maddeler, genellikle toksisite deneylerine tabi tutulmadan önce tarama testlerine tabi tutulurlar. *In vitro* ortamlarda tarama testleri yapılabilmekte ancak öngörülen etkinin özelliği nedeniyle bazı tarama testlerinin sadece *in vitro* ortamda yapılması uygun olmamaktadır. Tarama testlerinde hastalığı temsil eden hayvan modelleri kullanılmaktadır. Çünkü etken maddenin biyokinetik özellikleri, metabolizma hızları ve organlar arası etkileşim özellikleri sadece oluşturulan bu modellerle saptanabilmektedir. Bu sayede geliştirilme amacını oluşturan ve sahip olması öngörülen etki ya da etkileri gösteren maddeler belirlenmektedir. Bu özelliği bulunmayan maddeler için deneme artık bu kademedede bitmiş olarak kabul edilmektedir.

Deneyler sonrası yalnızca tarama testlerini başarı ile geçen bileşikler toksisite testlerine tabi tutulmaktadır. Bu aşamada fonksiyonel, biyokimyasal ve histopatolojik toksik etkiler incelenmektedir. Klinik değerlendirme basamağının ise Faz I, Faz II, Faz III ve Faz IV denemelerinden oluştuğu bildirilmektedir (21).

Bu çalışmada ülkemizde bir olgudan izole edilen ve sıvı azot içinde suş bankasında saklanan bir *Leishmania tropica* izolatu üzerine yine Türkiye'de KL tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan ilaçların (meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa)'ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere)' etkinlik ve direnç varlığı *in vitro* ve *in vivo* model üzerinde çalışılmış olup kullanılan yöntemin bu konuda çalışacak araştırmacılara yol göstermesi ve kaynak oluşturması amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

### NNN Besiyerinin Hazırlanması

**Katı faz:** Agar 5 gr, pepton 2 gr, NaCl 1 gr ve 200 mL distile su bir balona konularak 121°C'de 20 dk. otoklavlanmıştır. Aseptik

koşullarda tavşan kalbinden 30 mL kan alınmış ve defibrinize edilerek küçük steril bir balona aktarılmıştır. 1,3 mL (%1) gentamisin ve 2,3 mL penisilin/streptomisin (%1) solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. Agar yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulup kan agarın üzerine eklenerek karışması sağlanmış ve hemen steril tüplere 3-4 mL dağıtılmıştır. Tüplere belli bir eğim verilerek katılaşıncaya kadar oda ısısında tutulup ardından +4°C'de saklanmıştır.

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

#### **Kutanöz Leishmaniasis'li Olgudan Örnek Alınması**

Örnek alınırken lezyonun çevresindeki doku %70 alkol ile temizlenip kurumaya bırakılmıştır. Lezyon baş ve işaret parmağı arasında tutularak yara ile sağlam dokunun birleşme sınırından 1 mL'lik insülin enjektörü ile 0,2-0,5 mL serum fizyolojik verilip tekrar geri çekilerek aspirasyon sıvısı alınmıştır. Lezyondan elde edilen aspirasyon sıvısından NNN besiyerlerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri 25°C'de saklanmış ve promastigotların varlığı açısından bir ay süreyle gün aşırı kontrol edilmiştir. İlk üremenin gerçekleştiği besiyerlerinden örnekler alınmıştır. Alınan örnekler fazla miktarda üretmek amacıyla RPMI-1640 besiyerinde (%10 FCS + %1 penisilin/streptomisin + %1 gentamisin) kültüre alınmıştır. RPMI 1640 besiyerinde logaritmik faza ulaşan promastigotlara %15 oranında DMSO eklenerek kriyoprezervasyon işlemi uygulanmış ve sıvı azotta saklanmıştır. Çalışmamızda sıvı azotta saklanan bu izolatlar kullanılmıştır.

#### **Leishmania İzolatının Kültürü**

Sıvı azotta kriyoprezervasyon uygulanarak saklanan promastigotlar sıvı azottan çıkarılıp sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra NNN besiyerine ekilmiştir. İlk üreme gerçekleştikten sonra fazla miktarda üretmek amacıyla RPMI-1640 besiyerinde kültüre alınmıştır. Ticari olarak temin edilen besiyeri içerisine kullanmadan önce %10 FCS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 gentamisin eklenmiştir. 25 mL'lik flasklere 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve üreyen promastigotlardan 50 µL üzerine ilave edilerek ekim yapılmıştır. Ekim yapılan flaskler 25°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Parazitlerin çoğalması takip edilerek 2-3 günde bir besiyerinin eklenmesiyle 10<sup>8</sup> promastigot/mL içeren besiyeri elde edilmiştir. Daha sonra promastigot sayısı 10<sup>6</sup> promastigot/mL olacak şekilde Thoma lamı ile sayılarak promastigot içeren süspansiyon hazırlanmıştır.

#### **Leishmania Promastigotlarının PZR Yöntemi İle**

##### **Genotiplendirilmesi**

**DNA izolasyonu:** *Leishmania* izolatının genotiplendirilmesi için genetik materyalin elde edilmesinde uygulanmıştır. DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kit ile yapılmıştır.

**Genotiplendirme:** Çalışmalarda, ITS1 problu gerçek zamanlı PZR testi uygulanmıştır (22, 23). *Leishmania* parazitlerinin ssu rRNA ve 5.8S rRNA'yı kodlayan genleri ayıran ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) bölgesi, Forward primer; 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3', Reverse Primer; 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3' primerleri QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı ile birlikte aşağıda yazılı özgün proplar kullanılarak çoğaltılmıştır.

**Probe 1:** 5'- CCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTT-Fluo-3'

**Probe 2:** 5'-LCRed-640-GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG-Pho-3'

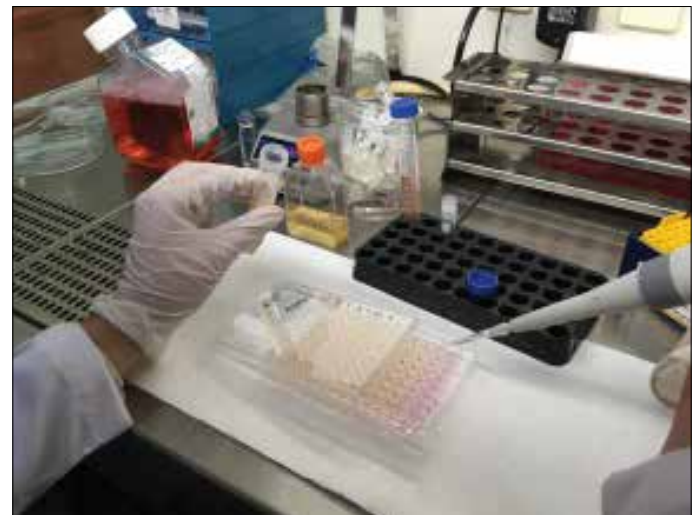
Gerçek zamanlı PZR analizi için hazırlanan toplam 25 µL'lik reaksiyon karışımı; 1,5 µL H<sub>2</sub>O (PCR grade water), 1 µL Forward Primer, 1 µL Reverse Primer, 0,5 µL Probe1, 0,5 µL Probe2, 12,5 µL QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı (Qiagen) ve 5 µL genomik DNA içermektedir. Rotor-Gene'de melting analizi yapılarak sonuçlar elde edilmiştir.

#### **In vitro İlaç Direnç Testleri**

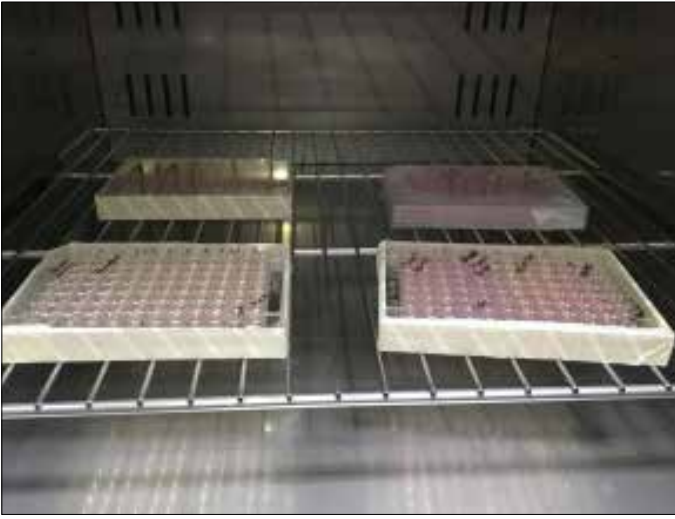
Çalışmamızda mikropalak dilüsyon yöntemi kullanılarak ilaçların *Leishmania* promastigotları üzerindeki antiparaziter etkinlikleri in vitro olarak test edilmiştir. Çalışmamızda sağaltımı tamamlanan hastalardan geriye kalan ilaçlar kullanılmıştır. Düz tabanlı 96'lık hücre kültürü plağı yatay olarak kullanılmış ve 12 sıranın 3'ü blank (Kör kuyucuk), 3'ü ilaçsız parazit kontrol, 3'ü meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) ve 3'ü sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) için olacak şekilde işaretlenmiştir. Her bir kuyucuğa RPMI 1640 besiyerinden (%10 FCS + %1 penisilin/streptomisin + %1 gentamisin) 100 µL dağıtılmıştır. Meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) için ayrılmış olan 3 bölmenin her birinin ilk kuyucuğuna istenilen ilaç konsantrasyonunun iki katı olacak şekilde standart besiyerine ilaçlar eklenerek 100 µL hazırlanmıştır. (Bu çalışmamızda ilk doz 300 µg/mL bu nedenle 600 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır) Hazırlanan bu ilaçlı besiyeri ilk kuyucuklara eklenmiştir. Çoklu pipet ile ilk kuyucuktan diğerlerine 100 µL aktarım yapılarak ilaç konsantrasyonları hazırlanmıştır (300, 200, 100, 50, 25 ve 12,5, 6,25 µg/mL) (Resim 1). Son kalan 100 µL atılmıştır. Daha sonra hazırlanan promastigot süspansiyonundan 100 µL olacak şekilde bütün kuyucuklara eklenmiştir. Blank bölmelerine parazit ilave edilmemiştir. Hücre kültürü plağının kapağı kapatılarak etrafı parafinle kaplanmıştır. Etüvde 25°C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Resim 2). Bu işlemlerin ardından aşağıda tarif edilen iki yöntem kullanılarak in vitro etkinlik düzeyleri belirlenmiş ve çalışma grupları diskriminant analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (24).

#### **Hemositometre yöntemi**

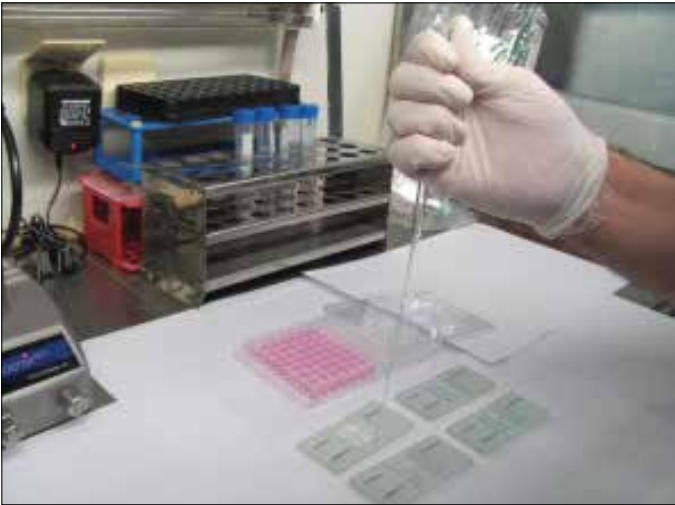
Neubauer'in Thoma lamı üzerinde iki yanda bulunan çıkıntılar hafifçe ıslatılmıştır. Lamel bunların arasını kapatacak şekilde yer-



**Resim 1.** Hücre kültürü plağında ilaçların seri sulandırılmalarının hazırlanması



**Resim 2.** Hücre kültürü plağının 25°C'de 48 saat inkübe edilmesi



**Resim 3.** *In vitro* çalışma sonuçlarının hemositometre yöntemi ile değerlendirilmesi

leştirilmiştir. İki elin başparmakları ile konsantrik Newton halkaları belirinceye kadar bastırılmıştır. Daha sonra etüvden plak çıkarılıp her bir kuyucuktan ayrı ayrı örnek alınarak lam-lamel arasına sayım kamaralarının olduğu kenardan damlatılmıştır. Bu sıvı kapillarite nedeni ile lam üzerinde bulunan sayım alanına yayılmış ve aktarılan sıvının hareketsizleşmesi için 1-2 dakika beklenilmiştir. Önce mikroskobun diyaframı kapatılıp küçük büyütmesinde (10x) sayım yapılacak olan çizgili alan bulunmuş ardından karelere düşen *Leishmania* promastigotlarını saymak amacı ile büyük büyütme (40x) ile bakılmıştır. Thoma lamının her bir köşesinde bulunan toplam dört kare ve orta alandaki kare içerisinde bulunan promastigotlar sayılmıştır. Toplam promastigot sayısı 10.000 ile çarpılıp sayılan kareye bölünerek mL'deki promastigot sayısı bulunmuştur (Resim 3).

#### **XTT (sodium 3,39-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sülfonik asit hidrat) direnç testi**

Yeni bir 96'lık düztabanlı hücre kültürü plağı alınıp süre sonunda plak etüvden çıkarılarak ve her bir kuyucukdan 100 µL alınarak yeni plağa aktarılmıştır. Ayrı bir yerde 5 mL reagent ve 0,1 mL



**Resim 4.** XTT testinde spektrofotometrede hücre kültürü plağının okutulması

“electron coupling” karıştırılmıştır. Yeni plağımızın her bir bölmesine 50 µL eklenerek 25°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plak spektrofotometrede 450 nm'de okuma yapılmıştır (Resim 4). Okuma sonunda çıkan absorbans değerleri not edilerek canlılık hesaplaması için aşağıda belirtilen formüle göre hesaplama yapılmıştır.

$$\text{Canlılık yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Çalışma örneği absorbansı} - \text{Blank absorbansı}}{\text{Kontrol örneği absorbansı} - \text{Blank absorbansı}} \times 100$$

Çalışmalar üç kez tekrarlanmıştır (25).

#### **In vivo İlaç Direnç Testleri**

Leishmaniasis modeli oluşturmak için kullanılan promastigotlar, 10 mL kültür sıvısının 1500 devirde 10 dakika santrifüjlenip, dipte kalan çökeltinin steril serum fizyolojik ile 3 kez yıkanması ile elde edilmiştir. Promastigot süspansiyonunun son konsantrasyonu 10<sup>8</sup> promastigot/mL olacak şekilde mikroskopta sayılarak ayarlanmıştır. Hayvan modellerinin geliştirilmesinde Balb/C cinsi fareler kullanılmıştır. Fareler dişi, 7-8 haftalık ve 20-25 gr ağırlığında olup, *ad libitum* olarak beslenmişlerdir. Deney hayvanlarının sağ ayak tabanlarına, derialtına 100 µL promastigot solüsyonu enjekte edilmiştir (Resim 5, 6). Enfeksiyonun oluşturulduğu tarihi takip eden 5. haftadan itibaren sağaltımı tamamlanan hastalardan geriye kalan ilaçlar kullanılarak aşağıdaki tedavi şeması uygulanmıştır;

**1.Deney Hayvanı Grubu:** Enfekte tedavi almayan grup.

**2.Deney Hayvanı Grubu:** Meglumün antimonat tedavisi alan (Beş değerlikli antimon olan meglumün antimonat 20 mg/kg/gün, 21 gün süreyle her gün intra-muskuler olarak verilmiştir).

**3.Deney Hayvanı Grubu:** Sodyum stiboglukonat tedavisi alan (Beş değerlikli antimon olan sodyum stiboglukonat 20 mg/kg/gün, 21 gün süreyle her gün intra-muskuler olarak verilmiştir).

İnokülasyonun 2. haftasından sonra ayak tabanında kızarıklık ve şişme görülebilir (Resim 7). Farelerin lezyonlarının genişliği ve deriden yüksekliği milimetrik ölçüm aleti ile haftada bir ölçülmüştür (Resim 8). Ölçüme 3 ay boyunca devam edilmiştir. İnokülasyondan



**Resim 5.** Farelerin ayak tabanına intradermal enjeksiyon uygulaması

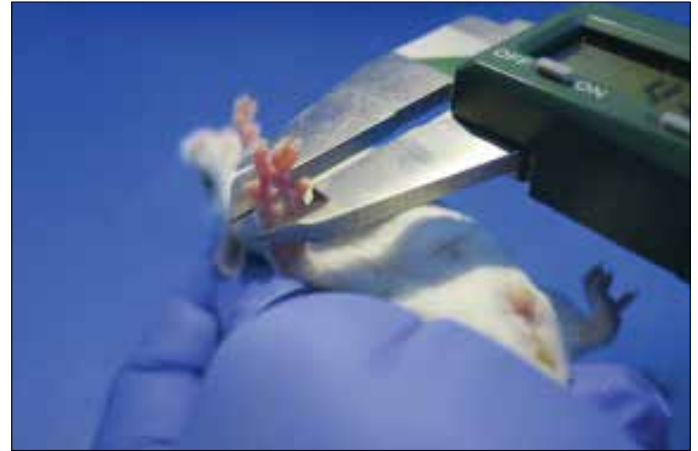


**Resim 6.** Farelerin ayak tabanından *L. tropica* promastigotlarının verilmesi



**Resim 7.** Farelerin ayak tabanında gelişen lezyonların görünümü

3 ay sonra hayvanlar sakrifiye edilmiş ve ayak tabanlarında oluşan lezyonlardan klinik örnek alınarak NNN besiyerlerine ekim yapılmış, yayma preparat hazırlanıp Giemsa ile boyanarak incelenmiş ve *Leishmania* amastigotlarının varlığı araştırılmıştır. *In vivo* ilaç etkinliği; ayak ölçümleri, yayma preparatlar ve besiyeri ekimlerinin sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir (26, 27).



**Resim 8.** Farelerin ayak tabanı çapının ölçülmesi

**Tablo 1.** Işık mikroskopunda hemositometre yöntemine göre 48 saatteki parazit sayısı ( $10^6$ /mL)

İzolatlar	Doz ( $\mu$ g/mL)					
	300	200	100	50	25	12,5
İlaçsız kontrol	81,00	81,00	79,00	81,00	80,00	82,00
Glucantime®	0,00	0,00	0,00	0,00	8,00	10,00
Pentostam®	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

**Tablo 2.** XTT yöntemi ile 48 saatteki parazitlerin canlılık yüzdeleri ( $10^6$ /mL)

İzolatlar	Doz ( $\mu$ g/mL)					
	300	200	100	50	25	12,5
İlaçsız kontrol	100	100	100	100	100	100
Glucantime®	0	0	0	0	10,8	15,9
Pentostam®	0	0	0	0	0	0

Bu çalışma, T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.04.2017 tarih ve 18931 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirilmiştir.

## BULGULAR

Uygulanan *in vitro* ilaç direnç testlerinin 48 saatteki sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 1, 2). Yapılan çalışmalarda ilaçsız kontrol grubundaki promastigotların sağlıklı ve üremelerine devam ettiği görülürken, meglumın antimonat (Glucantime®, Fransa)'ta 25  $\mu$ g/mL ve 12,5  $\mu$ g/mL dozda canlı parazitlere rastlandığı ancak sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere)'ta ise hiç canlı parazit görülmediği saptanmıştır (Tablo 1). Canlılık yüzdelerinin ise meglumın antimonat (Glucantime®, Fransa)'ta 25  $\mu$ g/mL dozda 10,8 ve 12,5  $\mu$ g/mL dozda 15,9 olduğu görülmüştür (Tablo 2).

Oluşturulan kutanöz leishmaniasis deney hayvanı modellerinde yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda meglumın antimonat (Glucantime®, Fransa) tedavisi alan ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) tedavisi alan deney hayvanı gruplarında enfeksiyonun verilmesinden sonraki 5. haftadan sonra ayak taba-

**Tablo 3.** Deney hayvanı gruplarında haftalık milimetrik ayak tabanı ölçümlerinin ortalamaları

Kod	Haftalar											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrol (ilaçsız)	1,42	2,15	2,95	3,15	3,78	4,00	4,37	4,53	4,85	5,15	5,85	6,33
Meglumin antimonat (Glucantime®)	1,45	2,18	2,91	3,13	3,68	3,48	3,28	3,00	2,85	2,25	1,68	1,50
Sodyum stiboglukonat (Pentostam®)	1,43	2,13	2,90	3,10	3,72	3,55	3,35	3,10	2,94	2,39	1,79	1,59

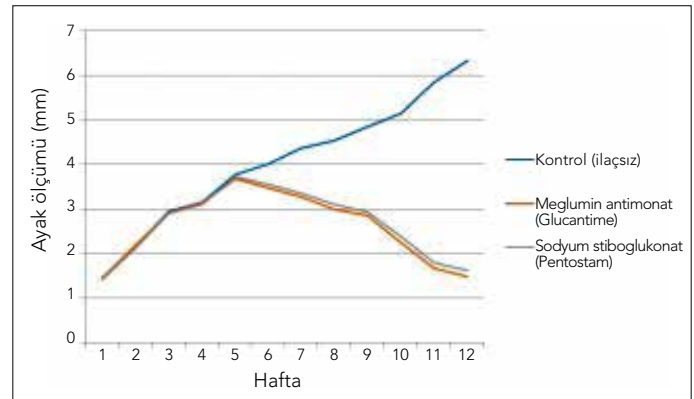
nındaki lezyonların küçülmeye başladığı ve 3 aylık süreç sonunda başarılı bir şekilde iyileştiği görülmüştür (Şekil 1). Meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) tedavisi alan deney hayvanı grubunda ayak tabanı çapı 3,68 mm'den 1,50 mm'ye, sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) tedavisi alan deney hayvanı grubunda ise ayak tabanı çapı 3,72 mm'den 1,59 mm'ye gerilemiştir. Giemsa ile boyalı preparatlarda amastigotlar görülmemiştir. Klinik örneklerin ekildiği NNN besiyerlerinde promastigotlara rastlanmamıştır. İlaçsız kontrol grubunda ise lezyon gelişimi devam etmiş ve ayak tabanı çapı milimetrik ölçümlere göre düzenli olarak daima artmıştır (Tablo 3). Yayma preparatlarda amastigotlar görülmüş ve NNN besiyerinde promastigotlara rastlanmıştır.

## TARTIŞMA

Leishmaniasis tedavisinde beş değerlikli antimon bileşikleri olan sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) ve meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) 50 yılı aşkın bir süredir ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda bu ilaçlara karşı tüm dünyada ve özellikle de Hindistan'ın kuzeyinde direncin arttığı bildirilmektedir (28).

Tedavide ikinci seçenek olan Amfoterisin B de damar yoluyla verilmektedir ve böbrekler üzerine belirgin toksisite göstermektedir. Hindistan'daki visseral leishmaniasis'e etkili olduğu gösterilen yeni ajanlar arasında yer alan lipozomal Amfoterisin B ise damar yoluyla kullanılmakta, ancak daha az sayıda enjeksiyon gerektirmekte ve daha iyi tolere edilmektedir, ancak tedavisi oldukça pahalıdır. Diğer yeni ajan olan Miltefosin ise oral yolla kullanılmaktadır, ancak teratojen etki gösterebilmektedir (29). Daha etkili ve sağlıklı ilaçlara ihtiyaç duyulduğundan leishmaniasis konusunda yeni ilaç araştırmalarına gereksinim vardır. Yukarıdaki nedenlerden dolayı, birçok makalede leishmaniasis tedavisinde kullanılma potansiyeli olan doğal bitki ekstraktlarının ve bileşenlerinin anti-leishmanial biyolojik aktivite yönünden tarama programlarının başlaması gerektiği ve yeni tedavi ürünlerinin bulunması gerektiği vurgulanmıştır (30-32).

Yapılan bir çalışmada endemik bir bitki olan *Haplophyllum myrtifolium*'un *in vitro* ve *in vivo* antileishmanial etkinliği değerlendirilmiştir. Bu çalışmada bulunan tüm ekstraktların ve saf bileşiklerin *L. tropica*'nın promastigotlarına karşı *in vitro* inhibitör aktivite gösterdiği bulunmuştur. Promastigotlara karşı  $\gamma$ -fagarin, asitlendirilmiş ekstrat, etanol ekstrat, skimmianin ve alkaloid ekstraktın *in vitro* %50 inhibisyon konsantrasyonları sırasıyla 8,7, 9,4, 10,9, 25,7 ve 25,8  $\mu\text{g/mL}$  olarak bulunmuş ve *Haplophyllum myrtifolium*'un asitleştirilmiş ekstraktının *in vivo* sonuçlarının ise bu bitkinin *Leishmania tropica* ile enfekte deney farelerinde bulunan lezyon boyutunu azaltmada sınırlı bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir (33).

**Şekil 1.** Deney hayvanı gruplarında haftalık ayak tabanı ölçümleri

Yapılan başka bir çalışmada endemik bitkilerden *Centaurea calolepis*, *Phlomis lycia*, *Eryngium thorifolium*, *Origanum sipyleum* ve *Galium incanum ssp. centrale*'den elde edilen ekstraktların *in vitro* ve *in vivo* anti-leishmanial aktiviteleri üzerine bir araştırma yapılmış olup *Galium incanum ssp. centrale*'nin IC50 değeri  $0,0316 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$  ile en yüksek sitoksisiteyi gösterdiği, *Eryngium thorifolium*'un metanol ekstraktının, 25  $\mu\text{g/mL}$ 'de %100 inhibisyon ile *L. tropica* promastigotları üzerinde en yüksek aktiviteye sahip olduğu, *C. calolepis*'in su ve kloroform ekstraktları ile *E. thorifolium*'un su ve metanol ekstraktlarının 100 mg/kg'lık bir dozda *L. tropica* ile enfekte olan farelerdeki parazitemiyi azalttığı saptanmıştır. Bu sonuçlara bağlı olarak parazit canlılığı, sitotoksik olmadığı düşünülen *Eryngium thorifolium*'un metanol ekstraktının *L. tropica* enfeksiyonunun tedavisinde umut verici bir aday ilaç olduğu kanısına varılmıştır (34).

Yapılan bir diğer çalışmada ise *Leishmania tropica* üzerine moksifloksasin ve linezolid ile kaspofunginin, potansiyel anti-leishmanial etkileri *in vitro* olarak araştırılmış olup moksifloksasin, linezolid ve kaspofunginin 4096  $\mu\text{g/mL}$ -0,008  $\mu\text{g/mL}$  arasındaki konsantrasyonlarda seri dilüsyonları yapılarak ajanların %50 inhibitör konsantrasyonları (IK50) kontrollerle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Moksifloksasinin, *L. tropica* promastigotlarına karşı çalışılan diğer ajanlara göre daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (35).

Son yıllarda *Leishmania* türlerinin bilinen ilaçların kullanıldığı sağıltıma dirençli suşlarının ortaya çıkmaya başlaması yeni ilaçlar ve yeni ilaç kombinasyonlarının araştırılmasına ihtiyaç doğurmuştur. Dünya Sağlık Örgütü ve birçok araştırmacı, öncelikle halkın yöresel tedavide kullandığı bitkilerin araştırılması gerektiğini vurgulamış, bu sayede doğal bazı bileşiklerin sentetiklerinin de hızla yapılarak leishmaniasis'e karşı kullanılabileceğini belirtmişlerdir (36-38).

Yapılan birçok çalışmada, değişik bitkilerden elde edilen yeni etken madde taramalarında ve yeni ilaç çalışmalarında meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) kontrol ilacı (pozitif kontrol) olarak kullanılıp etken maddenin veya ilacın etkinliğinin karşılaştırılmasında altın standart olarak baz alınmıştır.

*In vitro* bir çalışmada MTT testi uygulanarak kalsiyum kanal blokkörü olan verapamil ve meglumine antimoniate kombinasyonunun meglumine antimonate'a göre promastigot ve amastigotlar üzerine daha etkili olduğu gösterilmiştir (39).

Sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere)'in *in vitro* ve *in vivo* ilaç direnci ile ilgili yapılan bir çalışmada ikisi sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) tedavisine yanıt vermeyen ve biri bu tedaviye yanıt veren 3 olgudan elde edilen klinik izolatların enfektivitesi ve kemoterapötik yanıtları *in vitro* olarak makrofaj-amastigot sisteminde ve *in vivo* olarak hamsterlerde değerlendirilmiştir. Sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) direncinin sürekliliği de tekrarlı pasajlarla *in vivo* ve *in vitro* olarak kontrol edilmiştir. Sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) tedavisine yanıt vermeyen izolatların Amfoterisin-B ve Miltefosin tedavisine makrofajlarda ve hamsterlerde yanıt verdiği bildirilmiştir (40).

Fare modellerinde yapılan bir çalışmada 100 mg/kg/gün intra-peritoneal olarak Glucantime® ve susam yağı içerisinde hazırlanan thalidomine 30 mg/kg/gün oral olarak 12 gün süreyle tedavi amacıyla verilmiş ve bu kombinasyonun hastalık sürecinde önemli oranda (üç ay) azalmaya neden olduğu saptanmıştır (41). Diğer bir çalışmada enfeksiyonun verilmesinden bir ay sonra 3 fare grubu oluşturulmuş, birinci gruba sodyum selenit (0,35 mg/kg 30 gün), ikinci gruba çinko sülfat (2 mg/kg 30 gün), üçüncü gruba kontrol amaçlı distile su (0,01 mL/gr vücut ağırlığı 30 gün) ve aynı zamanda tüm gruplara intra-peritoneal olarak (60 mg/kg) Glucantime® 14 gün boyunca tedavi amaçlı verilmiştir. Sodyum selenit *in vitro* çalışmalarda kutanöz leishmaniasis üzerine etkili olsa da *in vivo* modelde etkisiz olduğu bulunmuştur. Çinko sülfat ise düşük dozlarda uzun süre kullanıldığında etkisiz olduğu saptanmıştır (42). Bir başka çalışmada lipozomal antimon formülasyonlarının (günde 2 kez 4 hafta süreyle 50 mg topikal olarak) deri içerisindeki makrofajlara ilacın nüfus etmesinde başarılı olduğu, lipozomların meglumin antimonat gibi suda çözünen maddelerin tutulmasını sağladığı, uygun boyutlardaki formülasyonların geliştirilmesi ile ilacın etkili bir şekilde dermis ve epidermise ulaştığı ve lipozomların düşük toksisiteli güvenli bileşikler olduğu gösterilmiştir (43).

Yukarıdaki literatürlerde görüldüğü üzere tedavide altın standart olarak meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere)'in baz alındığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda da Türkiye'de KL hastasından elde edilen *L. tropica* suşu üzerine bu iki ilacın da *in vitro* olarak etkili olduğu görülmüştür. Meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa)'ta parazitlerin canlılık yüzdelerinin 25 µg/mL dozda 10,8 ve 12,5 µg/mL dozda 15,9 olduğu görülürken, sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere)'ta canlı parazite rastlanmamıştır. Bu nedenle *in vitro* çalışmada sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere)'in daha etkili olduğu görülmüş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). *In vivo* çalış-

mada ise her iki ilacın da verilmesinden sonra deney hayvanlarının ayak tabanındaki lezyonların küçülmeye başladığı, meglumin antimonat (Glucantime®, Fransa) tedavisi alan deney hayvanı grubunda ayak taban çapının 3,68 mm'den 1,50 mm'ye, sodyum stiboglukonat (Pentostam®, İngiltere) tedavisi alan deney hayvanı grubunda ise 3,72 mm'den 1,59 mm'ye gerilemiş olduğu ve 3 aylık süreç sonunda başarılı bir şekilde iyileştiği görülmüştür. Giemsa ile boyalı preparatlarda amastigotlar görülmemiştir. Klinik örneklerin ekildiği NNN besiyerlerinde promastigotlara rastlanmamıştır. Bu nedenle iki ilacın da Türkiye'de KL olgusundan izole edilen *L. tropica* promastigotları ile oluşturulan *in vivo* modellerde de etkili olduğu saptanmıştır.

## SONUÇ

Bu çalışma, bu konularda araştırma yapmayı planlayan araştırmacılara rehber olacak şekilde kutanöz leishmaniasisin *in vitro* ve *in vivo* modelleri oluşturularak ilaç araştırmalarında ve etken madde taramalarında kullanımları ayrıntılarıyla sunularak araştırmacılara yardımcı olması için planlanmıştır. Aldığımız sonuçlar Türkiye'den elde edilecek izolatlarda bu iki ilacın hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda altın standart olarak başarı ile kullanılabileceği görülmüştür.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyle Yel Etik Kurulu'ndan (Tarih: 26.04.2017) alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – A.Y., T.K.; Tasarım – A.Ö., H.E., A.Y.; Denetleme – H.E., İ.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – A.Ö.; Analiz ve/veya Yorum – A.Ö., H.E., İ.Ç.; Literatür Taraması – A.Y., İ.Ç., T.K.; Yazıyı Yazan – A.Y., T.K., A.Ö.; Eleştirel İnceleme – A.Ö., H.E.

**Teşekkür:** Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na ve Air Liquide şirketine sağladıkları katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

**Ethics Committee Approval:** Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Manisa Celal Bayar University (Date: 26.04.2017).

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – A.Y., T.K.; Design – A.Ö., H.E., A.Y.; Supervision – H.E., İ.Ç.; Data Collection and/or Processing – A.Ö.; Analysis and/or Interpretation – A.Ö., H.E., İ.Ç.; Literature Search – A.Y., İ.Ç., T.K.; Writing Manuscript – A.Y., T.K., A.Ö.; Critical Review – A.Ö., H.E.

**Acknowledgements:** We would like to thank Parasite Bank of Medical School of Manisa Celal Bayar University and Air Liquide Company for all their support.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## KAYNAKLAR

1. WHO Technical Report Series-949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microb* 2004; 27: 305-18. [CrossRef]
3. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus co-infection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 298-319.
4. WHO Web Sayfası. Available from: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default>.
5. Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniosis. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, editörler. *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği; 2007. s. 197-241.
6. Bayram Delibaş S, Akisü Ç. Diğer Kan ve Doku Protozoon Hastalıklarının Tedavisi. Akisü Ç, Korkmaz M, editörler. *Tıbbi Parazitolojide Tedavi*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 20; 2005. s. 87-110.
7. Özensoy Töz S. Pentavalan antimoniyaller. Akisü Ç, Korkmaz M, editörler. *Tıbbi Parazitolojide Tedavi*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 20; 2005. s. 209-18.
8. Jackson JE, Tally JD, Ellis WY, Mebrahtu YB, Lawyer PG, Were JB, et al. Quantitative *in vitro* drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* spp. From patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *Am J Trop Med Hyg* 1990, 43: 464-80.
9. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (viannia) infection. *J Infect Dis* 2006; 193: 1375-83. [CrossRef]
10. Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, et al. American tegumentary leishmaniasis: is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis* 2006; 194: 1168-75.
11. Carrio J, Riera C, Gallego M, Ribera E, Portus M. *In vitro* susceptibility of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate in isolates from repeated leishmaniasis episodes in HIVcoinfected patients. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 120-1. [CrossRef]
12. Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michael G, et al. *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41: 827-30.
13. Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glukantim treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med* 2006; 3: e162.
14. Hadighi R, Boucher P, Khamesipour A, Meamar AR, Roy G, Ouellette M, et al. Glukantim-resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs. *Parasitol Res* 2007; 101: 1319-22. [CrossRef]
15. Das VN, Ranjan A, Bimal S, Siddique NA, Pandey K, Kumar N, et al. Magnitude of unresponsiveness to sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar. *Natl Med J India* 2005; 18: 131-3.
16. Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, et al. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* 1999; 180: 564-7. [CrossRef]
17. Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the Center of the Indian Epidemic. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1104-7. [CrossRef]
18. Thakur CP, Narayan S, Ranjan A. Epidemiological, clinical pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res* 2004; 120: 166-72.
19. Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 763-74. [CrossRef]
20. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 111-26. [CrossRef]
21. Kayaalp OS. Klinik öncesi değerlendirilmesi. *Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler*. 4.Baskı. Ankara: Faryal Matbaacılık; 2008. s. 29-46.
22. Özbilgin A, Durmuskahya C, Kayalar H, Ertabaklar H, Gunduz C, Ostan Ural I, et al. Antileishmanial Activity of Selected Turkish Medicinal. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2014; 13: 1319-26.
23. El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *L. donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 575-9. [CrossRef]
24. 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 Negl Trop Dis* 2013; 7: e2205.
25. Williams C, Espinosa O, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barria E, et al. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for Leishmania. *J Microbiol Methods* 2003; 55: 813-6. [CrossRef]
26. Yardley V, Croft SL. Animal Models of Cutaneous Leishmaniasis, *Handbook of Animal Models of Infection*. Zak O, Sande AM, editors. Newyork: Acedemic Pres; 1999. s. 775-81.
27. Girginkardeşler N, Balcıoğlu C, Yereli K, Özbilgin A, Özbel Y. Cutaneous leishmaniasis infection in Balb/c mice using a *Leishmania tropica* strain isolated from Turkey. *J Parasitol* 2001; 87: 1177-8. [CrossRef]
28. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 319-42. [CrossRef]
29. Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 397-401. [CrossRef]
30. Östan I, Sağlam H, Limoncu ME, Ertabaklar H, Özensoy Toz S, Özbel Y, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of *Haplophyllum myrtifolium* against *Leishmania tropica*. *New Microbiologica* 2007; 30: 439-45.
31. Özbilgin A, Durmuskahya C, Kayalar H, Ertabaklar H, Gunduz C, Ostan Ural I, et al. Antileishmanial Activity of Selected Turkish Medicinal Plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2014; 13: 1319-26.
32. Limoncu ME, Eraç B, Gürpınar T, Özbilgin A, Balcıoğlu İC, Hoşgör-Limoncu M. Investigation of *in vitro* Antileishmanial Activity of Moxifloxacin, Linezolid and Caspofungin on *Leishmania tropica* Promastigotes. *Türkiye Parazit Derg* 2013; 37: 1-3. [CrossRef]
33. Carvalho PB, Ferreira EI. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-review. *Fitoterapia* 2001; 72: 599-618. [CrossRef]
34. Kayser O, Kiderlen AF. *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytother Res* 2001; 15: 148-52. [CrossRef]
35. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 2005; 12: 514-35.
36. Bhadra R. Antileishmanial agents. *Drugs Future* 1993; 18: 451-63.
37. Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragon R, Munoz V, et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol* 2001; 78: 193-200. [CrossRef]
38. Carvalho PB, Arribas MAG, Ferreira EI. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Rev Bras Ci Farm* 2000; 36: 69-96.



39. Shokri A, Sharifi I, Khamesipour A, Nakhaee N, Fasihi Harandi M, Nosratabadi J, et al. The effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of *Leishmania tropica* to meglumine antimoniate. *Parasitol Res* 2012; 110: 1113-7. [\[CrossRef\]](#)
40. Dube A, Singh N, Sundar S, Singh N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in in vitro and in vivo experimental models. *Parasitol Res* 2005; 96: 216-23. [\[CrossRef\]](#)
41. Solgi G, Kariminia A, Abdi K, Darabi M, Ghareghozloo B. Effects of combined therapy with thalidomide and glucantime on leishmaniasis induced by *Leishmania major* in BALB/c mice. *Korean J Parasitol* 2006; 44: 55-61. [\[CrossRef\]](#)
42. Zamani Sorkhroodi F, Alavi Naeini AM, Zahraei Ramazani AR, Aghaye Ghazvini MR, Mohebbali M, Keshavarz SA. Therapeutic Effect of Sodium Selenite and Zinc Sulphate as Supplementary with Meglumine Antimoniate (Glucantime®) Against Cutaneous Leishmaniasis In BALB/C Mice. *Iranian J Parasitol* 2010; 5: 11-9.
43. Kalat SA, Khamesipour A, Bavarsad N, Fallah M, Khashayarmanesh Z, Feizi E, et al. Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of *L. major* lesion in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 2014; 143: 5-10.