

Türkiye’de Kutanöz Leşmanyazis Etkeni *Leishmania tropica*’da Antimon Direnç Mekanizmasının Belirlenmesi

Determination of Antimony Resistance Mechanism of *Leishmania tropica* Causing Cutaneous Leishmaniasis in Turkey

Ahmet ÖZBİLGİN¹(ID), Fadile Yıldız ZEYREK²(ID), Melda Zeynep GÜRAYS³(ID), Gülnaz ÇULHA⁴(ID), Işın AKYAR⁵(ID), Mehmet HARMAN⁶(ID), Yusuf ÖZBEL⁷(ID), Hatice ERTABAKLAR⁸(ID), İbrahim ÇAVUŞ¹(ID), Cumhuriyet GÜNDÜZ⁹(ID)

¹ Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

¹ Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Turkey.

² Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

² Harran University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sanliurfa, Turkey.

³ İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü, İzmir.

³ Izmir Institute of High Technology, Department of Chemistry, Izmir, Turkey.

⁴ Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay.

⁴ Mustafa Kemal University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Hatay, Turkey.

⁵ Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁵ Acibadem University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

⁶ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.

⁶ Dicle University Faculty of Medicine, Department of Dermatology, Diyarbakir, Turkey.

⁷ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁷ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Izmir, Turkey.

⁸ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

⁸ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Aydin, Turkey.

⁹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁹ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Izmir, Turkey.

* Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje no: 214S239).

Makale Atfı: Özbilgin A, Zeyrek FY, Güray MZ, Çulha G, Akyar I, Harman M ve ark. Türkiye’de kutanöz leşmanyazis etkeni *Leishmania tropica*’da antimon direnç mekanizmasının belirlenmesi. Mikrobiyol Bul 2020;54(3):444-462.

ÖZ

Dünya Sağlık Örgütü, yaklaşık bir milyar insanın endemik bölgelerde risk altında olduğunu, son beş yıl içinde bir milyon kutanöz leşmanyazis (KL) olgusunun ve yılda yaklaşık 300.000 viseral leşmanyazis (VL) olgusunun olduğunu bildirmektedir. Her yıl yaklaşık 20.000 kişinin VL’ye bağlı öldüğü bilinmektedir. Türkiye’de *Leishmania tropica*’nın ve *Leishmania infantum*’un neden olduğu KL’de yılda 2500 civarında olgu bildirilmektedir. Başta Akdeniz ve Ege Bölgesi illerinde olmak üzere diğer birçok ilde son yıllarda ortaya çıkan olgu ve odaklarda önemli oranda artış görülmesi önümüzdeki yıllarda enfeksiyon

İletişim (Correspondence): İbrahim Çavuş, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Dekanlık Binası 2. Kat Uncubozköy-Yunusemre, Manisa, Türkiye.
Tel (Phone): +90 505 318 1491, **E-posta (E-mail):** icvs26@yahoo.com

hızının yükseleceğini göstermektedir. Ülkemizdeki KL'nin ana etkeni *L.tropica* olup tedavide meglumin antimonat kullanılmaktadır. Bu çalışmada, antimona dirençli ve dirençli olmayan *L.tropica* izolatlarının gen ve protein ekspresyonları karşılaştırılarak *L.tropica*'ya özgü antimon direnç genlerinin saptanması amaçlanmıştır. Ülkemizin Ege, Akdeniz ve Güneydoğu bölgelerinden antimonat direnci bulunmayan 3 KL hastasından elde edilmiş *L.tropica* izolatlarında, laboratuvar ortamında meglumin antimonata karşı 3 dirençli izolat geliştirilmiştir. Bu izolatların mikroarray yöntemi ile gen ekspresyon değişimleri, 2 boyutlu jel elektroforezi ile protein profilleri ve MALDI-TOF/TOF MS ile ilgili proteinleri tanımlanarak birbirleriyle karşılaştırma yapılmıştır. Antimon tedavisine yanıt vermemiş 10 KL hastasından elde edilmiş *L.tropica* izolatlarına antimon bileşiklerine yönelik direnç testleri uygulanmış ve direnç gelişiminden sorumlu genlerin ekspresyonlarını saptamak amacıyla kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmıştır. Ayrıca, protein profilleri karşılaştırılarak antimon direnci olan ve olmayan izolatlardaki protein ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar belirlenmiş ve farklılık saptanan proteinlerin tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, *L.tropica* izolatlarının antimon bileşiklerine karşı direnç geliştirilen izolatlarında, direnç geliştirmesinde enolaz, "Elongation factor-2 (EF-2)", "Heat shock protein 70 (HSP 70)", tripanotyon redüktaz, protein kinaz C ve metallo-peptidaz proteinlerinin rol oynadığı saptanmış ve hastalardan alınan doğal dirençli izolatlarda da benzer ekspresyon değişimi gösterilmiştir. Sonuç olarak, ülkemizdeki *L.tropica* izolatlarının deneysel olarak çok kısa sürede meglumin antimonata (Glucantime®) karşı direnç kazandığı saptanmıştır. Ülkemizde yaşayan ve yurt dışından ülkemize giriş yapan KL hastalarının yetersiz ve eksik tedavi görmesi durumunda, dirençli suşların ve olgu sayısının hızla artabileceği ve dirençli leishmaniyazis odaklarının oluşabileceği öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Leishmania tropica*; direnç; Türkiye; direnç genleri; proteomiks.

ABSTRACT

World Health Organization reported that approximately one billion people are at risk in endemic areas, one million cases of cutaneous leishmaniasis (CL) and approximately 300,000 cases of visceral leishmaniasis (VL) were reported per year in the last five years. The number of deaths due to VL is reported to be approximately 20,000 per year. Approximately 2500 cases/year have been reported as CL, caused by *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum*, in Turkey. The significant increase observed in many cities mainly in the provinces of Mediterranean and Aegean regions in cases and foci in recent years, suggests that there may be an increase in this infections in the following years as well. In Turkey, the causative agent of CL is *L.tropica* and meglumine antimoniate is used in the treatment of CL. We aimed to determine antimony resistance genes specific for *L.tropica* by comparing the gene and protein expressions of antimony-resistant and non-resistant *L.tropica* strains. *L.tropica* isolates obtained from 3 CL patients without antimonate resistance from Aegean, Mediterranean and Southeastern regions of Turkey were provided to transform into 3 resistant isolates against meglumine antimony in the laboratory conditions. Gene expression alterations by microarray method; protein profiles by two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) and relevant proteins by MALDI-TOF/TOF MS of these isolates were accomplished and compared. *L.tropica* isolates from 10 CL patients who did not respond to antimony therapy were analyzed for resistance to antimonial compounds and quantitative real-time polymerase chain reaction was performed to detect the expression of genes responsible for resistance development. Moreover, differences in protein expression levels in isolates with and without antimony resistance were determined by comparing protein profiles and identification of proteins with different expression levels was carried out. Enolase, elongation factor-2, heat shock protein 70, tripanthione reductase, protein kinase C and metallo-peptidase proteins have been shown to play roles in *L.tropica* isolates developing resistance to antimonial compounds and similar expression changes have also been demonstrated in naturally resistant isolates from patients. In conclusion, it was revealed that *L.tropica* strains in our country may gain resistance to meglumine antimoniate in a short time. It is foreseen that if the patients living in our country or entering the country are treated inadequately and incompletely, there may be new, resistant leishmaniasis foci that may increase the number of resistant strains and cases rapidly.

Keywords: *Leishmania tropica*; resistance; Turkey; resistance genes; proteomics.

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, bugün 98 ülkede yaklaşık bir milyar insan endemik bölgelerde risk altında yaşamaktadır. Yılda 200.000 kutanöz leşmanyazis (KL) ve yaklaşık olarak 300.000 viseral leşmanyazis (VL) olgusu bildirilmektedir¹.

VL tanısında da KL'de olduğu gibi mikroskopi, kültür yöntemi, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılabilirlerdir².

Son 50 yıldır pentavalan antimon bileşikler olan sodyum stiboglukonat (Pentostam®) ve meglumin antimonat (Glucantime®) tedavide ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların uzun süre damar yoluyla verilmesi gerekmekte, toksik etkiler de gösterdikleri gibi etkileri de değişken olabilmektedir. Son yıllarda bu ilaçlara karşı özellikle Hindistan'ın kuzeyinde direncin arttığı bildirilmektedir. Tedavide ikinci seçenek olan amfoterisin B'de damar yoluyla verilmektedir ve böbrekler üzerine belirgin toksisite göstermektedir. Hindistan'daki VL'ye 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 bir ajan olan miltefosin ise oral yolla kullanılmaktadır ancak teratojen etki gösterebilmektedir³.

Antimoniyallerin *Leishmania* parazitlerinin glikozomunda gerçekleşen glikoliz ve yağ asidi reaksiyonlarının metabolik yollarını engellediği düşünülmektedir. Antimonlar ATP ve GTP oluşumunu da engellemektedir. Pentavalan antimonlar konak hücreye (makro-faj) ve hücre içinde bulunan amastigotlara fagolizozom veya sitosol yoluyla girmektedir. Antimona duyarlı hücrelerin içinde tripanotiyon redüktaz artmakta ve hücre içindeki artan metale bağlanmaktadır. Metal tiyol birleşimi MRPA tarafından hücre dışına atılmaktadır. Metale dirençli *Leishmania* izolatlarında total tiyolün (sistein, glutatyon ve tripanotiyon) arttığı bulunmuştur. Büyüme fazında dirençli izolatlarda glikoz taşıyıcı geninin baskılanarak hücrenin glikoz kullanımını azaltabildiği de bildirilmektedir. *Leishmania donovani* üzerine yapılan bir çalışmada tripanotiyon redüktaz enziminin arttığı bu enzimin de metallere bağlanıp bileşik şeklinde hücre dışına atılmasını sağladığı bulunmuştur. *Leishmania amazonensis* üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise, hipotetik protein olan LmjF26.2680'in düşük bulunduğu belirtilmiştir. Bu proteinin dirençte indirekt bir rol oynayarak hücre metabolizmasını yavaşlattığı düşünülmektedir. Sonuç olarak parazit, bazı genlerini baskılayarak veya daha fazla çalışmasını sağlayarak, bazı enzimleri daha az veya daha çok üreterek ilaçlara karşı direnç geliştirmeye çalışmaktadır^{4,5}.

Duyarlı ve dirençli sahadan toplanan *L.tropica* izolatlarından elde edilen mRNA kullanılarak "komplementer DNA-amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP)" ve kantitatif gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yaklaşımı kullanılmış ve iki bilinen genin, protein yıkımında rol oynayan ubiquitin ve aminoasit alımında rol oynayan aminoasit permeazın (AAP3) dirençte rol oynadığı bildirilmiştir. qRT-PCR ile dirençli izolatlarda ubiquitinde 2.54 kat, AAP3'te ise 2.86 kat artış olduğu

üzerinde durulmuştur. Bu sonuçlar, bu iki genin daha fazla indüklenmesinin potansiyel olarak doğal antimona direncinde rol oynayabileceklerine işaret etmektedir. Aynı grup tarafından gerçekleştirilen ve aynı yaklaşımla *L.tropica*'nın sahadan toplanmış izolatları ile yapılan diğer çalışmada ise dirençte rol oynayabilecek beş gen aquaglyceroporin; ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı; fosfogliserat kinaz mitojen aktif edilmiş protein kinaz ve protein tirozin fosfotaz olabileceği üzerinde durulmuştur. Farklı coğrafyalarda yaşayan parazitlerin farklı direnç mekanizması geliştirebileceği bildirilmiştir^{6,7}.

Bu çalışmada, ülkemizdeki KL ana etkeni olan yerli *L.tropica* izolatlarında antimona karşı direnç genlerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, antimona dirençli ve dirençli olmayan *L.tropica* izolatlarının gen ve protein ekspresyonları karşılaştırılarak *L.tropica*'ya özgü antimona karşı direnç genleri saptanmaya çalışılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 31.07.2013 ve Karar no: 20.478.486/213).

Hastalardan İzolatların Elde Edilmesi ve Genotiplendirilmesi

İki kür antimona tedavisi ile iyileşmemiş olan Şanlıurfa (n= 3), Mardin (n= 1), Diyarbakır (n= 1), Hatay (n= 3), Osmaniye (n= 1) ve Aydın (n= 1) illerinden toplam 10 KL hastasının derisinden alınan klinik örnek NNN ve zenginleştirilmiş besiyerlerine (Z besiyeri) (süt ve karaciğer ekstresi eklenerek zenginleştirilmiş NNN besiyeri) ekim yapılarak dirençli 10 adet *L.tropica* suşu elde edildi (Tablo I). Ayrıca tür tayini için moleküler yöntemlerde çalışılmak üzere hastalardan alınan lezyon örneklerinin "High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Almanya)" ile DNA izolasyonu yapıldı. Klinik örnekten yapılan izolasyonun yanı sıra üretilen promastigotlardan da DNA izolasyonları yapıldı. Örnekler ITS1 problu gerçek zamanlı qRT-PCR testi uygulandı⁸. Genotiplendirme yapılan 10 izolat, ilk üreme gerçekleştikten sonra daha fazla miktarda üretmek amacıyla RPMI-1640 besiyerinde üretildi. Ekim yapılan flaskler 25°C'lik etüvde inkübe edildi ve parazitlerin çoğalması takip edilerek 2-3 günde bir besiyerinin eklenmesiyle 10 ml promastigot içeren besiyerleri elde edilerek çalışmalarda kullanıldı⁹.

Leishmania tropica İzolatlarının Meglumün Antimonat Dirençli Hale Getirilmesi

Tek meglumün antimonat tedavisi ile iyileşmiş olan ve yukarıdaki bölümde anlatılan yöntemle de genotiplendirilip *L.tropica* oldukları teyit edilen üç örnek direnç geliştirilmek üzere öncelikle tek düşürülerek klonal çoğaltıldı. Çoğaltılan tek koloni parazitlerden üretilen bu 3 izolata "Dirençsiz Normal İzolat (DNI)" ismi verildi. Ayrıca, bu 3 izolatın in vitro olarak besiyerlerine meglumün antimonat bileşiğinin haftada 10 mg/ml beş hafta bunu takiben haftada 50 mg/ml beş hafta artan konsantrasyonlarda eklenmesiyle 300 mg/ml ilaç konsantrasyonlarında yaşayan dirençli suşları [Dirençli İzolat (DI)] geliştirildi^{10,11}. Bu 3 DI ve 3 DNI çalışmalarımızda kullanılmak üzere sıvı azotta saklandı (Tablo II, III).

Tablo 1. Antimona Dirençli Kutanöz Leşmanyazis Hastaları

D 1 (Şanlıurfa)	Dört yaşında kız hasta, sağ yanağında 3 cm çapında 6 aydır bir adet lezyonu vardı. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerinde promastigotlar üretildi. Hasta 2 kez tedavi aldı.
D 2 (Osmaniye)	21 yaşında erkek hasta, sol kolunda 1 cm çapında 1.5 yıldır lezyonu vardı. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerlerinde promastigotlar üretildi. Hasta 3 kez tedavi aldı.
D 3 (Hatay)	13 yaşında kız hasta, sol kulağında 2 cm büyüklüğünde sekiz aydır devam eden lezyonu vardı. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerlerinde promastigotlar üretildi. Hasta 2 kez tedavi aldı.
D 4 (Aydın)	Dört yaşında kız hasta, alın bölgesinde 1 cm çapında beş yıldır olan lezyonu vardı. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerlerinde promastigotlar üretildi. Hasta 2 kez tedavi aldı.
D 5 (Mardin)	15 yaşında kız hasta, burun ucunda 2 cm çapında 10 aydır pembemsi kırmızı plaklı lezyonu vardı. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerinde promastigotlar üretildi. Hasta 3 kez tedavi aldı.
D 6 (Hatay)	Üç yaşında erkek hasta, yanağında 1 cm çapında 12 aydır devam eden lezyonu vardı. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerinde promastigotlar üretildi. Hasta 2 kez tedavi aldı.
D 7 (Şanlıurfa)	26 yaşında erkek hasta, elinde ve bileğinde ortası kabuklu kızamık kabartılarla karakterize 0.5 ve 2 cm çaplarda sekiz aydır devam eden lezyonlar vardı. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerinde promastigotlar üretildi. Hasta 2 kez tedavi aldı.
D 8 (Hatay)	33 yaşında kadın hasta, kollarında ve ellerinde çok sayıda lezyon vardı. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerinde promastigotlar üretildi. Hasta 2 kez tedavi aldı.
D 9 (Diyarbakır)	11 yaşında kız hasta, burun sırtında atrofik skarın alt periferinde kurutlu papüler lezyon, üç aydır 1 cm çapında lezyonu vardı. İki yıl önce primer lezyon oluşmuş bir yılda iyileşmiş. Skar dokusunun kenarında üç ay önce yeni lezyon gelişmiş. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerinde promastigotlar üretildi. Hasta 3 kez tedavi aldı.
D 10 (Şanlıurfa)	Dokuz yaşında erkek hasta, burnunda beş yıldır 2 cm çapında lezyonu vardı. İnce yayma preparatlarında amastigot görüldü. Z besiyerinde promastigotlar üretildi. Hasta 2 kez tedavi aldı.

İn Vitro Meglumin Antimonata Karşı Direnç Testleri

KL hastalarından elde edilmiş dirençli 10 izolat ile in vitro olarak direnç geliştirilen 3 izolat ve bu 3 izolatin dirençsiz orijinal halleri olmak üzere toplamda 16 *L.tropica* izolatinin meglumin antimonata olan duyarlılıklarını belirlemek için in vitro olarak XTT hücre proliferasyon analizi testleri uygulandı^{12,13}. Deneyler 3 kez tekrarlanarak sonuçların or-

Tablo II. Antimona Dirençsiz Kutanöz Leşmanyazis Hastaları

DNI-1 (Manisa)	18 yaşında kadın hasta, burun sağ yanında 6 aydır lezyonu vardı. İnce yayma preparatta amastigotlar görüldü. NNN besiyerinde promastigotlar görüldü. Hasta ilk kez şark çıbanı tedavisi aldı.
DNI-2 (Şanlıurfa)	23 yaşında kadın hasta, elinde 6 adet 5 mm büyüklüğünde beş aydır lezyonu vardı. İnce yayma preparatta amastigotlar görüldü. NNN besiyerinde promastigotlar görüldü. Hasta ilk kez şark çıbanı tedavisi aldı.
DNI-3 (Hatay)	48 yaşında erkek hasta, sağ kolda bir yıldır lezyonu vardı. Çiftçilikle uğraşıyordu. İnce yayma preparatta amastigotlar ve NNN besiyerinde promastigotlar görüldü. Hasta ilk kez şark çıbanı tedavisi aldı.

DNI: Dirençsiz normal izolat.

Tablo III. İn Vitro Direnç Geliştirilen İzolatlar

DI-1	DI-1, DI-2 ve DI-3 meglumin antimonat bileşiminin haftada 10 mg/ml beş hafta
DI-2	bunu takiben haftada 50 mg/ml beş hafta artan konsantrasyonlarda eklenmesiyle
DI-3	300 mg/ml ilaç konsantrasyonlarında yaşayan dirençli suşlardır.

DI: Dirençli izolat.

talaması alındı. Pozitif ve negatif kontrol grupları olarak ise ilaç eklenmemiş ve eklenmiş besiyerlerinde referans izolat olan MHOM/AZ/1974/SAF-K27'nin üreme yoğunlukları kullanıldı. XTT analizinde sigmoid doz respons analizi ile meglumin antimonatın etkisi belirlendi. Gruplar arası karşılaştırması ortalama değerlerin Students' t testi analizi ile gerçekleştirildi ve FDR düzeltilmesi uygulandı. Anlamlılık derecesi olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

İzolatlarda Meglumin Antimonata Karşı Dirençte Etkili Olan Genlerin Araştırılması

mRNA profillemesi için antimona duyarlı olan DNI-1, DNI-2, DNI-3 ve aynı izolatların laboratuvarında in vitro olarak dirençli hale getirilmiş suşlar DI-1, DI-2, DI-3 ile referans izolat olan MHOM/AZ/1974/SAF-K27'nin parental total RNA'ları, "RNeasy mini kiti (Qiagen, Almanya)" kullanılarak saflaştırıldı ve transkriptom mikroarray analizi yapıldı. Referans suş temel alınarak gen ekspresyonlarının kat değişimleri Students' t testi analizi gerçekleştirildi; p değerleri hesaplandı ve "false discovery rate (FDR)" düzeltilmesi yapıldı. Referans suşa göre anlamlı ve ekspresyon kat değişimleri ± 4 log olan genlerin direnç gelişiminde rol oynadığı kabul edildi.

Leishmania İzolatlarında Proteomik Araştırmalar

Antimona duyarlı olan DNI-1, DNI-2, DNI-3 ve bunların dirençli suşları DI-1, DI-2, DI-3 ile sahada hastalardan elde edilen doğal dirençli izolatlar D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9 ve D10'un proteinleri izole edilerek 2D-PAGE ile ayrıştırıldı. Yürütme işlemi sonucunda protein spotları Coomassie Brilliant Blue boyama tekniği ile görünür hale getirildi ve bu şekilde her bir örneğe ait protein profili oluşturuldu. Örneklerin jel görüntüleri karşılaştırıldı ve ifadenme düzeyinde farklılık belirlenen protein spotları ilgili jellerden kesildi. DI-1 ve DNI-1, DI-2 ve DNI-2, DI-3 ve DNI-3 ile doğal dirençli izolatların kesilen

protein spotları tripsin enzimi ile muamele edildikten sonra ilgili proteinlere ait peptitler elde edildi ve bu peptitler MALDI-TOF/TOF MS ile analizlendi. Kütle spektrometresi analizi sonucunda elde edilen veriler Mascot tarama programı (V2.4, Matrix Science) yardımı ile NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) protein veri tabanı taranarak tanımlandı.

Direnç Gelişiminde Etkili Gen İfadelerinin Doğrulanması

Direnç gelişiminden sorumlu olduğu belirlenen 6 genin 10 klinik örnek izolataındaki gen ifadeleri gerçek zamanlı kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile belirlendi. Klinik örneklerden elde edilen *L.tropica* izolataından total RNA izolasyonu RNeasy Mini Kiti kullanılarak kit manüeline göre gerçekleştirildi. Total RNA'ları elde edilen klinik izolatlardan 2 µg/ml olacak şekilde cDNA Sentez Kiti kullanılarak cDNA sentezleri gerçekleştirildi.

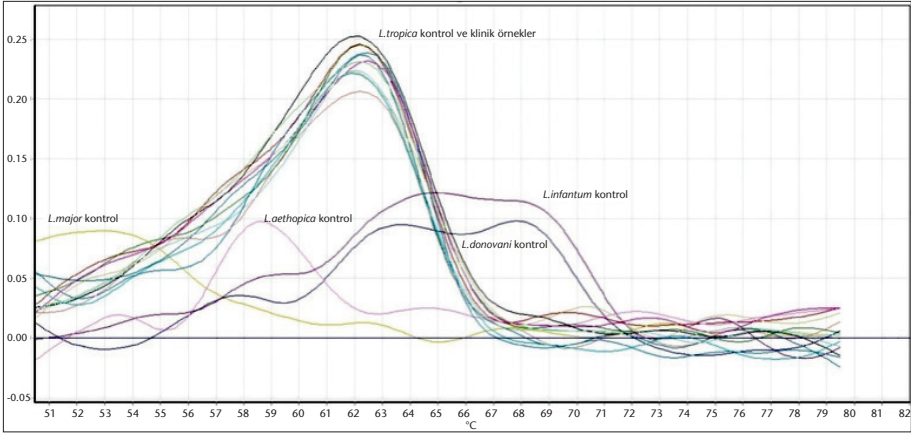
2 µl cDNA, PCR karışımından 7 µl ve ilgili gene özgü tarafımızdan tasarlanan 2 ileri ve geri primerler SYBR Green I floresan boyası kullanarak gen ifadesi qRT-PCR yöntemi ile amplifiye edildi. *L.tropica*'ya özgü housekeeping genler olan 18S ribozomal RNA (18S rRNA) ve Cyclophilin A (CYPA) gen ifadeleri de aynı yöntem ile çoğaltıldı^{14,15}. Klinik örneklerdeki gen ifadelerinin karşılaştırılması $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile gerçekleştirildi ve klinik örneklerdeki gen ifadesindeki değişimler belirlendi.

Direnç gelişimine etkili olan genlerin gen ekspresyon Ct değerleri saptamak için 6 genin ve 2 "housekeeping" genin primerleri tasarlanarak çalışıldı.

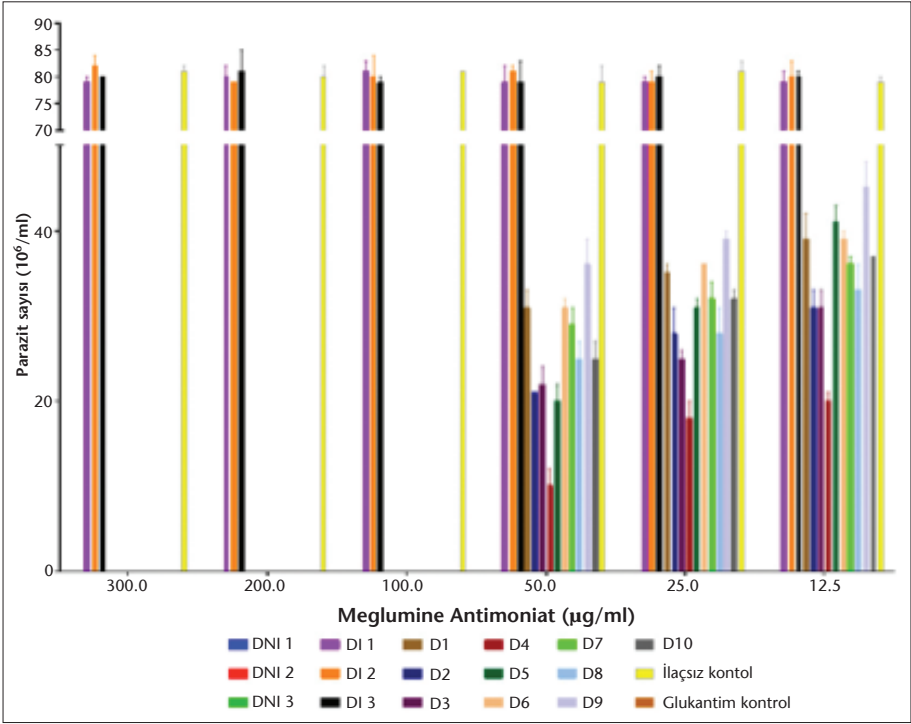
BULGULAR

Çalışmaya alınan iki kür antimon tedavisi ile iyileşmemiş olan 10 doğal dirençli izolataın hem klinik örnekteki amastigotlarından elde edilen DNA'ları hem de besiyerlerinde üretilen promastigotlardan elde edilen DNA'ları ile *Leishmania* parazitinin ITS1 bölgesine özgü tasarladığımız primer ve probalar ile gerçek zamanlı PCR tür tanımlamasına yönelik çalışmalar sonucunda *L.tropica*'ya uygun erime eğrisi gösterdiği saptanmış ve *L.tropica* olduğu teyit edilmiştir (Şekil 1).

Meglumin antimonata karşı yapılan iki direnç testi olan hemositometre ile sayılarak direncin belirlenmesi ve XTT hücre proliferasyon analizi testlerinin çalışmaya alınan 3 dirençli olmayan DNI-1,DNI-2, DNI-3 ve bunların dirençli hale getirilmiş olan 3 izolata DI-1,DI-2, DI-3 ile en az iki kür antimon tedavisi ile iyileşmemiş olan 10 doğal dirençli D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10 izolatalarının in vitro meglumin antimonata karşı yapılan iki direnç testinin de paralel sonuç verdiği görülmüştür. DNI suşlarında ve meglumin antimonat kontrol gruplarında 12.5 µg/ml dozda canlılık saptanmamıştır (p> 0.05). DI suşlarında ise 300 µg/ml dozda ilaçsız kontrole benzer canlılık gözlenmiştir (p< 0.05). Doğal dirençli izolatlarda ise 50 µg/ml ve daha düşük dozlarda anlamlı canlılık saptanmıştır (p< 0.05). Meglumin antimonata in vitro olarak direnç geliştirilen izolatlarda bu direncin geliştiği hastalardan elde edilen 10 doğal dirençli klinik sušta dirençsiz suşlara göre antimona anlamlı olarak dirençli (p< 0.05) oldukları saptanmıştır (Şekil 2-4).

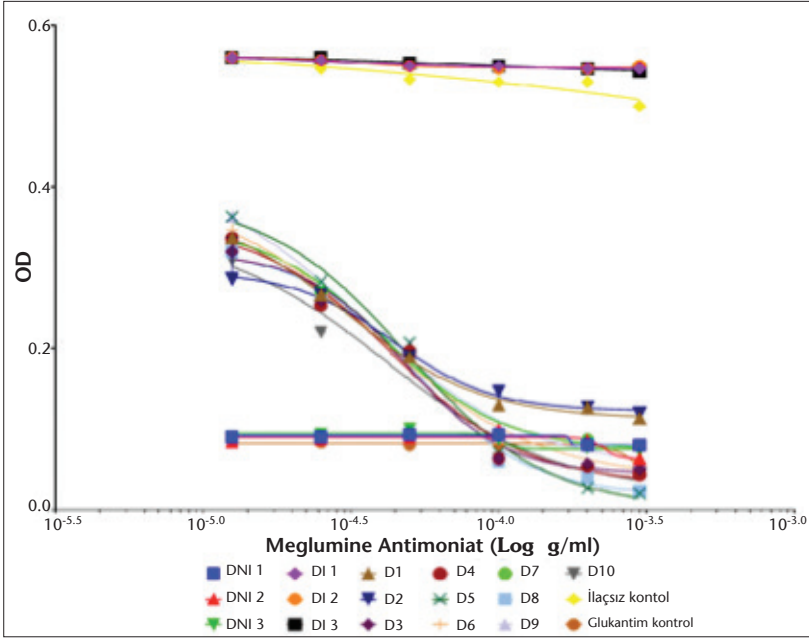


Şekil 1. İzolatların promastigotlarından elde edilen DNA'ların PCR erime eğrileri.

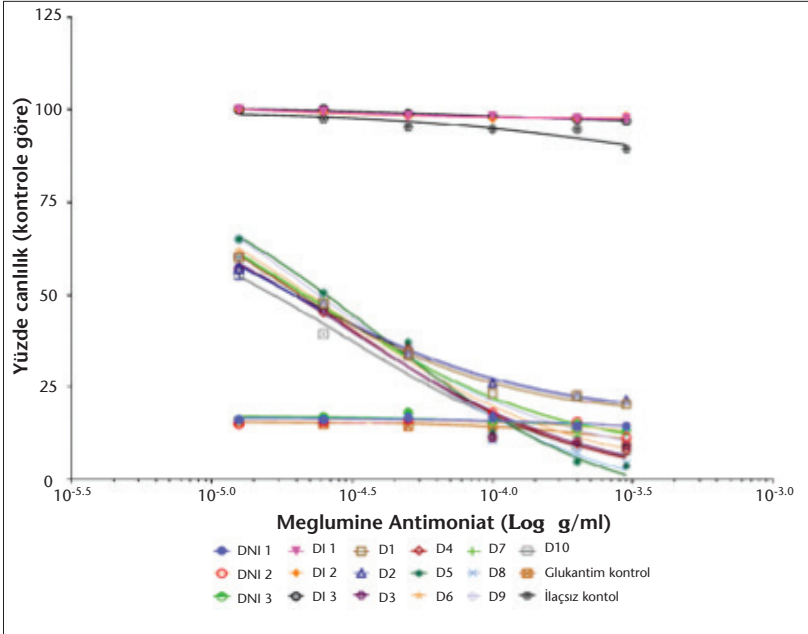


Şekil 2. Işık mikroskopunda hemositometre lamı 48 saatteki parazit sayısı ($10^6/ml$).

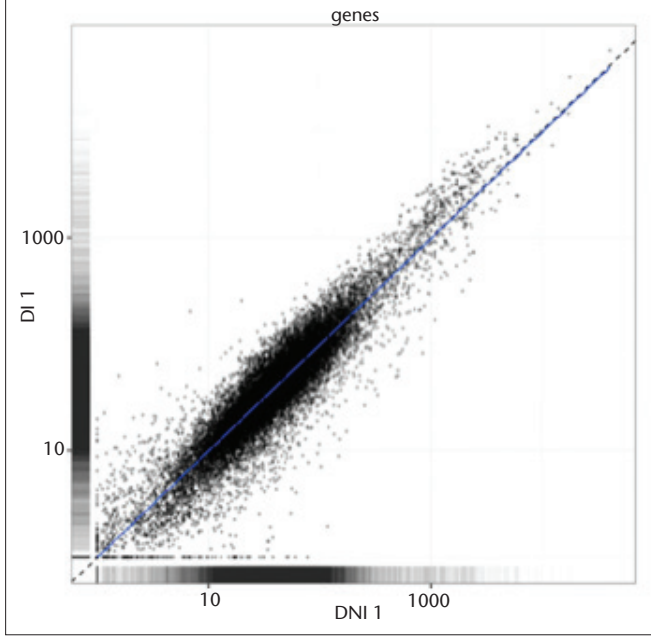
Referans izolat olan MHOM/AZ/1974/SAF-K27 temel alınarak DNI-1, DNI-2 ve DNI-3 ve bunların dirençli olan suşları DI-1, DI-2 ve DI-3'te tüm gen ekspresyonları saptanmıştır ve direnç geliştirilen suşlarda genel olarak ekspresyon artışı gözlenmiştir (Şekil 5-7).



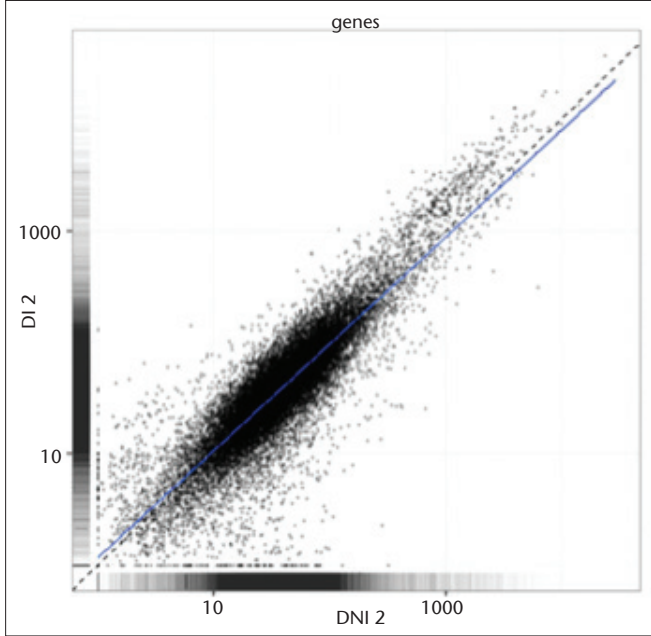
Şekil 3. XTT yöntemi ile 48 saatteki kolometrik olarak parazitlerin canlılık testlerinin absorbans değerleri (10⁶/ml).



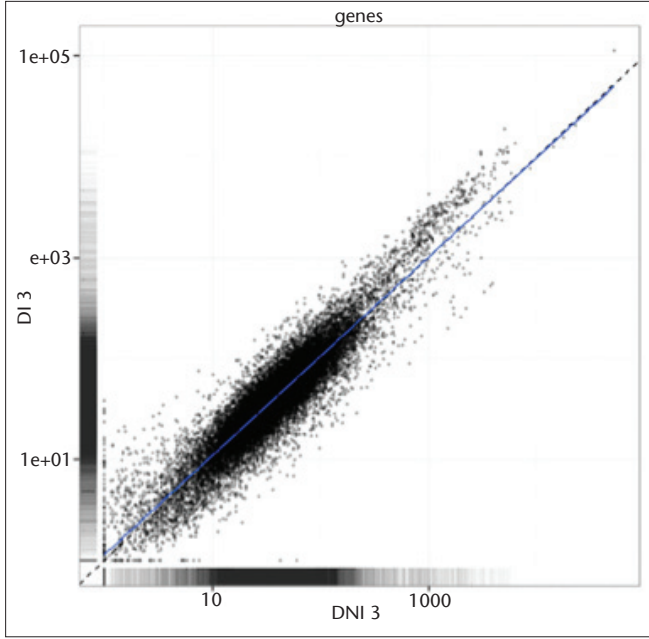
Şekil 4. XTT yöntemi ile 48 saatteki kolometrik olarak parazitlerin % canlılık değerleri (10⁶/ml).



Şekil 5. DNI-1 ve dirençli suşu D1-1'in gen ekspresyonları karşılaştırılması.



Şekil 6. DNI-2 ve dirençli suşu D1-2'nin gen ekspresyonları karşılaştırılması.



Şekil 7. DNI-3 ve dirençli suşu DI-3'ün gen ekspresyonları karşılaştırılması.

DI-1 ve DNI-1, DI-2 ve DNI-2, DI-3 ve DNI-3 örneklerinin 2D-PAGE ile oluşturulan protein profillerinin karşılaştırılması sonucu ifadenme düzeyinde farklılık belirlenen protein spotları MALDI-TOF/TOF MS ile analizlenerek ilgili proteinler tanımlanmıştır (Şekil 8). Ayrıca KL hastalarından elde edilmiş doğal dirençli 10 *L.tropica* izolatında da ifadenme düzeyinde farklılık gözlenen proteinler MALDI-TOF/TOF MS ile tanımlanmıştır.

Direnç gelişimi ile ilgili olarak yapılan tüm çalışmaların sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; karşılaştırma yapılan jeller arasındaki ilgili spotların renk şiddeti, doğal dirençli izolatların dirençsiz izolatlara göre protein ifadenmelerindeki değişim, protein veritabanı taraması sonucu tanımlanan protein skor değerleri ve kontrole göre anlamlı gen ifadenme değişimleri ile 6 genin direnç gelişiminde önemli rol oynadığı ve etkili olduğu şeklinde değerlendirilmiştir (Tablo IV).

Tablo IV. Direnç Gelişiminde Etkili Olan Genler ve Biyolojik İşlevleri

	Direnç gelişiminde etkili olan genler	Biyolojik işlev
1.	Enolaz	Metabolik enzim
2.	Elongasyon faktör 2	Protein biyosentezi
3.	Heat shock protein 70	Şaperon (protein katlanması)
4.	Tripanotyon redüktaz	Antioksidan/Detoksifikasyon
5.	Aktif protein kinaz C reseptörü (LACK)	Metabolik enzim
6.	Metalo-peptidaz	Metabolik enzim

Tablo V. Direnç Gelişiminde Etkili Olan Genlerin Gen Ekspresyon Ct Değerleri

	18SRNA	CYPA	Enolaz	EF-2	Tripanotyon redüktaz	Protein kinaz C	Metalo-peptidaz	HSP70
RF-1	16.08	14.66	20.00	18.74	20.50	20.00	22.50	20.00
DNI-1	16.18	14.35	19.99	18.62	20.79	19.50	23.10	19.35
DNI-2	16.14	14.53	20.01	18.68	20.60	19.45	22.60	19.45
DNI-3	16.22	14.51	19.96	18.75	20.72	19.48	23.20	19.40
DI-1	16.22	14.45	17.03	14.20	18.01	17.20	20.10	17.50
DI-2	16.32	14.56	17.02	14.25	18.12	17.25	20.11	17.62
DI-3	16.27	14.31	17.02	14.23	18.07	17.23	20.15	17.40
D1	16.13	14.87	17.10	14.90	18.11	17.26	20.20	17.45
D2	16.23	14.55	17.09	14.83	18.09	17.20	20.30	17.36
D3	16.19	14.50	17.23	14.82	18.10	17.35	20.28	17.55
D4	16.23	15.57	17.22	14.97	18.10	17.33	20.40	17.60
D5	16.38	15.03	17.13	14.93	18.17	17.40	20.35	17.49
D6	16.49	14.55	17.17	14.99	18.25	17.39	20.33	17.49
D7	16.60	14.13	17.18	14.98	18.22	17.35	20.37	17.60
D8	16.54	14.46	17.25	14.87	18.21	17.42	20.48	17.70
D9	16.63	14.48	17.12	14.88	18.25	17.40	20.29	17.50
D10	16.53	14.39	17.40	15.00	18.28	17.55	20.25	17.85

Direnç gelişiminde etkili olduğunu belirlediğimiz 6 genin ve 2 “housekeeping” genin ekspresyonunun Ct değerleri, $2^{-\Delta Ct}$ Ct ve kat değişim değerleri DNI, DI ve doğal dirençli izolat gruplarında tarafımızdan belirlenen primerler kullanarak saptanmış ve kat değişimi değerleri referans izolata (RF-1) göre belirlenmiştir (Tablo V-VII).

Direnç gelişiminde etkili olduğunu belirlediğimiz 6 proteine ait genlerin gen ekspresyonu DNI’larda referans izolata (RF-1) göre benzer bir ekspresyon göstermiştir. DI ve doğal dirençli izolatlarda ise enolaz gen ekspresyonunun ortalama 8.0 kat (6.57-10.09), EF-2 gen ekspresyonunun ortalama 17.32 kat (13.44-23.49), tripanotyon redüktaz gen ekspresyonunun ortalama 6.29 kat (5.49-8.64), protein kinaz C reseptörü (LACK) gen ekspresyonunun ortalama 5.35 kat (4.50-7.11), metalo-peptidaz gen ekspresyonunun ortalama 6.47 kat (5.56-7.89) ve HSP70 gen ekspresyonunun ortalama 4.43 kat (3.50-5.64) anlamlı artış ($p < 0.05$) gösterdiği saptanmıştır.

TARTIŞMA

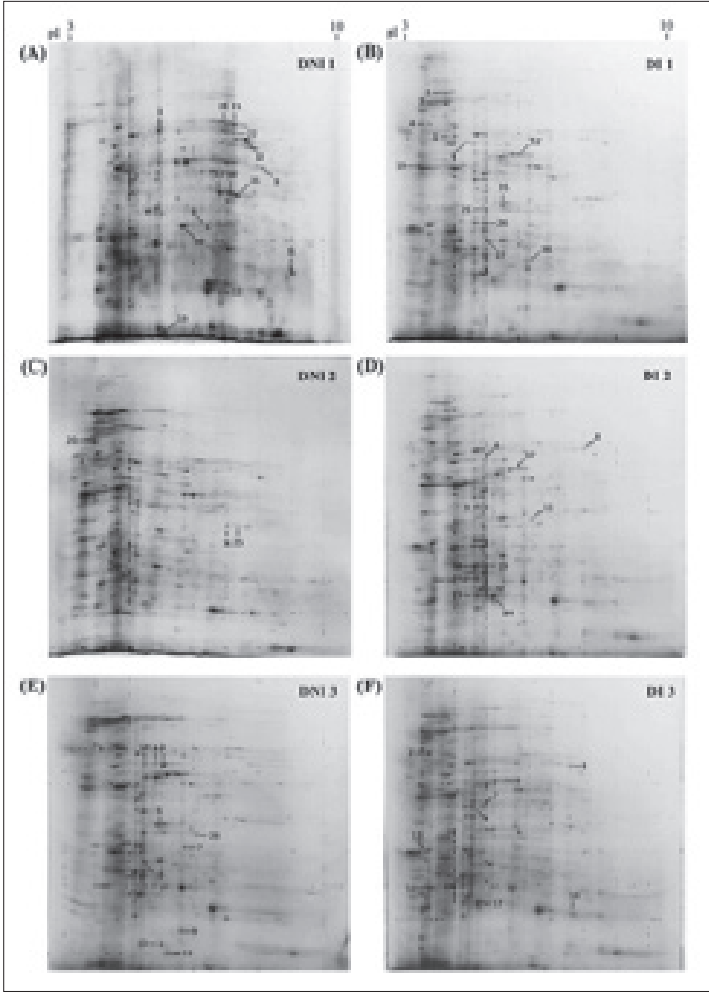
Leyşmanyaziste 50 yıldan fazla bir süredir beş değerlikli antimon bileşikleri olan sodyum stiboglukonat (Pentostam®) ve meglumin antimonat tedavide ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda bu ilaçlara karşı tüm dünyada direnç görülmeye başlanmıştır¹⁶.

Tablo VI. Direnç Gelişimine Etkili Olan Genlerin Gen Ekspresyon $2^{-\Delta Ct}$ Ct Değerleri

	Enolaz	EF-2	Tripanotyon redüktaz	Protein kinaz C	Metalo-peptidaz	HSP70
RF-1	0.04	0.10	0.03	0.04	0.01	0.04
DNI-1	0.04	0.10	0.02	0.05	0.00	0.06
DNI-2	0.04	0.10	0.03	0.06	0.01	0.06
DNI-3	0.04	0.10	0.02	0.06	0.00	0.06
DI-1	0.31	2.20	0.16	0.27	0.04	0.22
DI-2	0.33	2.28	0.16	0.29	0.04	0.22
DI-3	0.30	2.08	0.15	0.26	0.03	0.23
D1	0.33	1.52	0.16	0.30	0.04	0.26
D2	0.31	1.47	0.15	0.29	0.03	0.26
D3	0.27	1.44	0.15	0.25	0.03	0.22
D4	0.40	1.91	0.22	0.37	0.04	0.31
D5	0.37	1.71	0.18	0.31	0.04	0.29
D6	0.32	1.44	0.15	0.27	0.04	0.26
D7	0.28	1.31	0.14	0.25	0.03	0.21
D8	0.30	1.55	0.15	0.26	0.03	0.22
D9	0.34	1.60	0.15	0.28	0.04	0.26
D10	0.26	1.38	0.14	0.23	0.04	0.19

Tablo VII. Direnç Gelişimine Etkili Olan Genlerin Gen Ekspresyon RF-1'e Göre Kat Değişimi Değerleri

	Enolaz	EF-2	Tripanotyon redüktaz	Protein kinaz C	Metalo-peptidaz	HSP70
DI-1	7.78	22.61	6.22	5.26	6.57	4.09
DI-2	8.43	23.49	6.20	5.46	7.01	4.05
DI-3	7.60	21.46	5.78	4.99	6.15	4.25
D1	8.31	15.60	6.51	5.65	6.87	4.75
D2	7.76	15.18	6.11	5.46	5.94	4.69
D3	6.82	14.81	5.88	4.77	5.84	3.98
D4	10.09	19.61	8.64	7.11	7.89	5.64
D5	9.39	17.61	7.19	5.91	7.14	5.32
D6	8.03	14.86	5.99	5.24	6.37	4.68
D7	7.16	13.44	5.49	4.84	5.56	3.90
D8	7.49	15.93	6.07	5.06	5.66	3.99
D9	8.52	16.43	6.13	5.33	6.71	4.76
D10	6.57	14.16	5.62	4.50	6.45	3.50



Şekil 8. Dirençli izolatlar ile dirençsiz izolatların 2D-PAGE ile oluşturulan protein profillerinin karşılaştırılması.

Antimonun *Leishmania* türlerinin amastigot ve promastigot formları üzerinde etkili olabilmesi için üç değerlikli antimon (SbIII) formuna indirgenmesi gerekmektedir. Bu indirgenmenin enzimatik ve enzimatik olmayan tepkime ile iki şekilde olduğu varsayılmaktadır. Enzimatik olmayan reaksiyonda, spermidin, sistein, glutatyon ve tripanotyon gibi parazit tiyollerini rol oynamaktadır. Enzimatik reaksiyonda ise, indirgeyici madde olarak glutatyonla gerek duyan tiyol bağımlı redüktaz 1 ve arsenat redüktaz enzimleri tanımlanmıştır. Antimonun üç değerlikli hale indirgenme reaksiyonu hem parazit hem de makrofaj hücrelerinde gerçekleşmektedir. Glutatyon, antimonun indirgenmesinde birincil olarak rol alan tiyoldür ve bu indirgenme tepkimesi, makrofajın endozom, lizozom ve fagolizozom gibi asidik pH'ya sahip bölgelerinde daha yüksek hız ile gerçekleşmektedir¹⁷.

Çalışmamızda dirençli izolatlarda yükseldiği saptanan enolaz (metabolik enzim-glikoliz), EF-2 (protein biyosentezi), HSP 70 (şaperon-protein katlanması), tripanotyon redüktaz (antioksidan/detoksifikasyon), aktif protein kinaz C reseptörü (metabolik enzim-sinyal iletimi), metalo-peptidaz (metabolik enzim-peptit yıkımı)'ın *Leishmania* metabolizmasındaki yerleri düşünülerek ülkemizdeki KL etkeni *L.tropica* izolatlarının antimon bileşiklerine karşı olası direnç mekanizmasının gelişmesini aşağıdaki şekilde açıklayabiliriz.

Enolaz, glikolizle ilişkili bir enzimdir. *Leishmania* türlerinde enerji üretimi temel olarak glikoliz ve aminoasit metabolizmasıyla gerçekleşmektedir. Enolaz, hücresel işlev için hayati önem taşıyan glikoliz ve glikoneogenezis aşamalarında D-2-fosfogliserat (2PGA) ve fosfoenolpirüvatın (PEP), tersinir dönüştürülmesinden sorumlu enzimdir¹⁸. Hücre içi yerleşen *Leishmania* amastigotları, amino şekerleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılırken bu enzimden yararlanmaktadır¹⁹. Yapılan çalışmalarda da, antimona dirençli *Leishmania* türlerinde enolazın fazla miktarda salgılandığı bildirilmiştir²⁰. Çalışmamızda enolazın, antimon duyarlı izolatlar göre antimon dirençli izolatlarda ve doğal dirençli 10 *L.tropica* izolatının oluşturduğu klinik izolatlar grubunda ekspresyonun arttığı saptanmıştır.

Elongasyon faktör 2 (EF-2), translasyon mekanizmasında görev alan bir proteindir. Bu protein, ribozom içerisinde oluşmaya başlayan polipeptit zincirinin translokasyonunu arttırmaktadır. EF-2'nin farklı *Leishmania* türlerinde direnç fenotipine etki ettiği vurgulanmıştır. EF-2 protein ekspresyonu, antimon (SbV) dirençli *L.donovani* suşlarında ve dirençli *L.panamensis* ve *L.infantum* suşlarında dirençsiz suşlara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir^{20,21}. Çalışmamızda, *L.tropica*'nın dirençsiz izolatlarına göre dirençli izolatlarda belirgin olarak EF-2'nin hem protein hem de gen ekspresyonlarının arttığını saptadık. Antimon ile karşılaşan dirençli parazitler, protein sentezini ve buna bağlı olarak antimona karşı savunma mekanizmalarında rol alan proteinlerin miktarını artırarak, ilacın kendisine verdiği zararlı etkilerini azaltmaya çalıştığı düşünülmüştür.

Hücreler, ısı ya da ilaç gibi stres koşullarına maruz kaldıklarında, HSP'ler hücreyi zararlı çevresel etkilerden korumaktadır. Antimon dirençli hale getirilen *Leishmania* türlerinde ve klinik izolatlarında HSP70 ve/veya HSP83 gibi HSP'lerin normalden fazla eksprese edildiği bildirilmiş ve ilaç direnciyle ilişkilendirilmiştir²². Isı, radyasyon, enfeksiyon, kimyasal ve biyokimyasal stres dahil çeşitli stres faktörleri altında HSP70 proteinlerinin yapımı muhtemelen hatalı katlanmış proteinlere bağlanarak stres koşullarında hücre korumasını sağlayabilmektedir²³. Çalışmamızda, *L.tropica*'nın dirençsiz izolatlarına göre gerek dirençli izolatlarda gerekse dirençli klinik izolatlarda HSP-70'in hem protein hem de gen ekspresyonlarının arttığını saptadık. Dirençli olmayan *L.tropica* suşları HSP70 gen ekspresyonu ve protein translasyonunu yeterli oranda sağlayamazken dirençli *L.tropica* suşları sağkalam amacıyla HSP70 gen ekspresyonu ve protein translasyon oranını artırmakta olduğu düşünülmüştür. HSP70 enzimini fazla üreterek bu ilaçtan kaynaklanan oksidatif stresten etkilenmesini en az seviyeye indirmeye çalışmakta olduğu kanısına varılmıştır.

Yüzey ve/veya serbest metalo-peptidazlar hücre dışı büyük polipeptitlerin daha küçük peptitlere ve aminoasitlere hidrolize edilmesine yardımcı olabileceği, böylece parazitler

tarafından kolayca emilebileceği bildirilmiş olup protein kinaz C reseptörü sinyal iletimi ile ilişkili bir proteindir. Antimon dirençli *L.tropica* klinik izolatlarında artmış protein kinaz C reseptörü düzeyi saptanmıřtır²⁴. Bu nedenle, yüzey ve hücre dışı proteolitik enzimlerin, depolimerize edici aktiviteye bağlı olarak enfeksiyon döneminde *Leishmania*'ların beslenmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir²⁵. Bizim çalışmamızda da literatüre uyumlu olarak antimona doğal dirençli klinik izolatlarında oldukça artmış düzeylerde saptanmıştır.

Leishmania redoks metabolizmasını muhafaza etmede çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Antimonların *Leishmania*'lar üzerinde oluşturduğu oksidatif stresin nötralizasyonunda glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) ve tripanotyon redüktaz arasında oluşturulan metabolik yolda indirgenmiş tiyol miktarı yeniden artırarak paraziti, metalloid kaynaklı oksidatif stresten ve apopitozdan korunduğu bildirilmiřtir²⁶. Prokaryotlar ile ökaryotlarda oksidatif strese karşı savunmada rol oynayan tripanotyon redüktaz oldukça önemli bir proteindir. Yapılan çalışmalarda dirençli izolatlarda tripanotyon redüktaz seviyesinin duyarlı izolatlara göre hücre içinde dört kat daha fazla arttığı görülmüřtür²⁷. Komşumuz olan İran'da, sahada antimon tedavisi ile iyileşmeyen KL'li hastalardan elde edilen *L.tropica* izolatlarında tripanotyon redüktazın arttığı görülmüřtür²⁸. Bizim çalışmamızda da özellikle bu gen ile ilgili protein ekspresyonlarında önemli bir artış gözlenmiştir. Dirençli *L.tropica* suşlarının bünyesinde antimon ile yok olan tripanotyon redüktaz enziminin daha fazla miktarda sağkalım amacıyla üretilmektedir. Ayrıca, tripanotyon redüktaz enzimi bu ilaçtan kaynaklanan redoks metabolizmasını dengede tutmakta, oksidatif stresi nötralize etmekte, metalloid kaynaklı oksidatif stresten ve apopitozdan korunduğunu düşündürmektedir.

Peptidazlar, tüm ökaryotik hücrelerin fizyolojisinde önemli yer tutan bir enzim sınıfıdır: örneğin; anormal proteinler, metabolik yolaklar için düzenleyici proteinlerin bozunuğu ve hücre döngüsü ilerlemesi, ayrıca proteinlerin enerji üretimi için parçalanması ve antijen sunumu, proteoliz ayrıca hücreyel farklılaşmasında ve ölümünde rol oynar²⁹. Metalopeptidaz enzimlerinin, *Leishmania* için hayatta kalma ve uyum sağlama araçları olduğu bildirilmektedir³⁰. Yüzey ve/veya serbest metalopeptidazlar, hücre dışı büyük polipeptitlerin daha küçük peptitler ve aminoasitlere hidrolize edilmesini sağlarlar ve böylece *Leishmania* tarafından bu maddelerin emiliminin kolaylaştırıldığı bildirilmiş olup, antimona dirençli *L.donovani* izolatlarında metalopeptidazların arttığı saptanmıřtır²¹. Bu nedenle, yüzey ve ekstraselüler proteolitik enzimlerin antimon ile karşılaşmaları esnasında *Leishmania*'nın daha iyi besin almasında ve hücrenin hayatta kalmasında önemli rol oynayabileceği bildirilmiřtir²⁵. Glikoz metabolizması ve ATP sentezinde rol alan enzimlerinin miktarlarındaki artışın, ilaç etkisi altındaki parazitin çoğalması ve hayatta kalması için enerjiye gereksinim duyması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Proteolizle ilişkili metalopeptidaz proteinlerinin, antimona doğal dirençli klinik izolatlar ve antimon dirençli izolatlarda antimon duyarlı izolatlarla kıyasla çok daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak dirençli izolatlarda ve doğal dirençli izolatlarda, enolaz gen ekspresyonunun ortalama 8.00 kat (6.57-10.09), EF-2 gen ekspresyonunun ortalama 17.32 kat (13.44-23.49), tripanotyon redüktaz gen ekspresyonunun ortalama 6.29 kat (5.49-8.64), protein kinaz C reseptörü gen ekspresyonunun ortalama 5.35 kat (4.50-7.11), metalo-peptidaz gen ekspresyonunun ortalama 6.47 kat (5.56-7.89) ve HSP70 gen ekspresyonunun ortalama 4.43 kat (3.50-5.64) anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.05$).

Türkiye'den elde edilen izolatlarla yapılan gen ekspresyon değişimi, protein profilleri ve gen ekspresyon ifadeleri validasyonu çalışmalarında ülkemizde *L.tropica* izolatlarının antimon bileşiklerine karşı direnç geliştirmesinde enolaz, "elongation factor-2 (EF-2)", "heat shock protein 70 (HSP-70)", tripanotyon redüktaz, protein kinaz C reseptörü ve metalo-peptidaz genlerinin rol oynadığı saptanmış ve hastalardan alınan doğal dirençli izolatlarda da benzer ekspresyon değişimi gösterilmiştir. Çalışmamız esnasında *L.tropica* izolatlarının laboratuvar ortamında çok kısa sürede direnç kazandıkları (mevlumin antimonata karşı 10 haftada 30 kat) saptanmıştır. Bu veriler ışığı altında ülkemizdeki *L.tropica* suşlarının deneysel olarak çok kısa sürede meglumin antimonata karşı direnç kazandığı ve dirençli *L.tropica* suşlarının KL hastalarında yaygın olarak bulunabileceği düşünülmüştür. Ülkemizde yaşayan veya yurt dışından ülkemize giriş yapan KL hastalarının yetersiz ve eksik tedavi görmesi durumunda dirençli suşların ve olgu sayısının hızla artabileceği, ülkemizde dirençli leishmaniyazis odakların oluşabileceği öngörülmektedir. *L.tropica*'nın antimon direnç gen ve proteinleri kullanarak ilaç, aşı, tanı kiti, dirençli izolat saptama kiti ve *Leishmania* tür analizleri kiti konusunda projelere hazırlanabilecek ve patent alabilecek ürünler tasarlamayı planlamaktayız.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya 214S239 nolu proje ile destek vererek gerçekleşmesini sağlayan TÜBİTAK'a, çalışma esnasında desteklerini esirgemeyen Talat Yalçın, Zühtü Tanıl Kocagöz, Yavuz Yeşilova, Seray Töz, İpek Östan Ural, Onur Karatuna, Burak Batır'a ve katkılarından dolayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasına teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 31.07.2013 ve Karar no: 20.478.486/213).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Global leishmaniasis update, 2006-2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. Wkly Epidemiol Rec 2017; 92(38): 557-65.
2. Ertağlar H, Çalışkan SO, Boduç E, Ertuğ S. Kutanöz leishmaniyazis tanısında direkt mikroskopi, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2015; 49(1): 77-8.

3. Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 6(5): 397-401.
4. do Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Legare D, Corbell J, Melo MN, et al. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(5): e11167.
5. Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, El Fadili A, Peytavi R, et al. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(20): 5886-96.
6. Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Khadem-Erfan MB, Hajjaran H, Hadighi R, Khamesipour A, et al. Over expression of ubiquitin and amino acid permease genes in association with antimony resistance in *Leishmania tropica* field isolates. *Korean J Parasitol* 2013; 51(4): 413-9.
7. Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Khadem-Erfan MB, Saffari M, Raoofian R, Hajjaran H, et al. Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP approach. *Exp Parasitol* 2013; 135(2): 344-9.
8. 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(5): 1-8.
9. Özbilgin A, Taşçı S, Atambay M, Alkan MZ, Özbel Y. *Leishmania infantum* promastigotlarının in vitro kültüvyasyonunda sıvı ve bifafik besiyerlerinin karşılaştırılması. *Türkiye Parazit Derg* 1995; 19(1): 1-5.
10. Kumar D, Singh R, Bhandari V, Kulshrestha A, Negi NS, Salotra P. Biomarkers of antimony resistance: need for expression analysis of multiple genes to distinguish resistance phenotype in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Parasitol Res* 2012; 111(1): 223-30.
11. Singh R, Kumar D, Duncan RC, Nakhasi HL, Salotra P. Over expression of histone H2A modulates drug susceptibility in *Leishmania* parasites. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(1): 50-7.
12. Williams C, Espinosa OA, 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(3): 813-6.
13. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Kaya T, Ertabaklar H. *Leishmania tropica* üzerinde in vitro ve in vivo ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi: pilot çalışma. *Türkiye Parazit Derg* 2018; 42(1): 11-9.
14. Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004; 59(6): 566-73.
15. Yin R, Tian F, Frankenberger B, de Angelis MH, Stoeger T. Selection and evaluation of stable housekeeping genes for gene expression normalization in carbon nanoparticle-induced acute pulmonary inflammation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399(4): 531-6.
16. 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(5): 1319-22.
17. Frezard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MAP. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(4): 913-6.
18. Panchoi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(7): 902-20.
19. Avilan L, Gualdron-Lopez M, Quinones W, Gonzalez-Gonzalez L, Hannaert V, Michels PAM, et al. Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme Res* 2011; 2011: 932549.
20. Matrangolo FSV, Liarte DB, Andrade LC, de Melo MF, Andrade JM, Ferreira RF, et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* chagasi lines. *Mol Biochem Parasitol* 2013; 190(2): 63-75.
21. Biyani N, Singh AK, Mandal S, Chawla B, Madhubala R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 179(2): 91-9.

22. Brotherton MC, Bourassa S, Leprohon P, Legare D, Poirier GG, Droit A, et al. Proteomic and genomic analyses of antimony resistant *Leishmania infantum* mutant. PLoS One 2013; 8(11): e81899.
23. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Protein folding. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. Science 2002; 295(5561): 1852-8.
24. Hajjarian H, Azarian B, Mohebbali M, Hadighi R, Assareh D, Vaziri B. Comparative proteomics study on meglumine antimoniate sensitive and resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian anthroponotic cutaneous leishmaniasis patients. East Mediterr Health J 2012; 18(2): 165-71.
25. Santos ALS, Soares RM, Alviano CS, Kneipp LF. Heterogeneous production of metallo-type peptidases in parasites belonging to the family trypanosomatidae. Eur J Protistol 2008; 44(2): 103-13.
26. Ruiz-Santaquiteria M, Sanchez-Murcia PA, Toro MA, de Lucio H, Gutierrez KJ, de Castro S, et al. First example of peptides targeting the dimer interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with potent in vitro anti-leishmanial activity. Eur J Med Chem 2017; 135: 49-59.
27. Gomez Perez V, Garcia-Hernandez R, Corpas-Lopez V, Tomas AM, Martin-Sanchez J, Castanys S, et al. Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of *Leishmania infantum*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2016; 6(2): 133-9.
28. Oliae RT, Sharifi I, Afgar A, Kareshk AT, Asadi A, Heshmatkhan A, et al. Unresponsiveness to meglumine antimoniate in anthroponotic cutaneous leishmaniasis field isolates: analysis of resistance biomarkers by gene expression profiling. Trop Med Int Heal 2018; 23(6): 622-33.
29. Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA. The MEROPS database as a protease information system. J Struct Biol 2001; 134(2-3): 95-102.
30. Silva-Almeida M, Souza-Silva F, Pereira BA, Ribeiro-Guimaraes M, Alves C. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. Parasit Vectors 2014; 7: 387.