

# Kronik Kutanöz Leishmaniasis'te Miltefosin Etkinliğinin *in vitro* Olarak Araştırılması

## Investigation of *in vitro* Efficacy of Miltefosine on Chronic Cutaneous Leishmaniasis

Varol Tunalı<sup>1,2</sup>, Mehmet Harman<sup>3</sup>, İbrahim Çavuş<sup>4</sup>, Orçun Zorbozan<sup>2</sup>, Ahmet Özbilgin<sup>4</sup>,  
Nevin Turgay<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Muğla Üniversitesi Tıp Fakültesi, Acil Tıp Anabilim Dalı, Muğla, Türkiye

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>3</sup>Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

<sup>4</sup>Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Cite this article as: Tunalı V, Harman M, Çavuş İ, Zorbozan O, Özbilgin A, Turgay N. Investigation of *in vitro* Efficacy of Miltefosine on Chronic Cutaneous Leishmaniasis. Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(2):97-101.

### ÖZ

**Amaç:** Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü'nün ihmal edilen hastalıklar sıralamasında sıtmadan sonra dünyada en fazla ölüme sebep olan ikinci paraziter hastalıktır. Kutanöz leishmaniasis (KL), Leishmaniasis'in en yaygın görülen formu olup, çatışma ve çevresel faktörlerden dolayı, insidansı artmakta olan az sayıdaki bulaşıcı hastalıklardan biri olarak bilinmektedir. KL iki ana gruba ayrılabilir: Akut KL (AKL) ve kronik KL (KKL). Bu çalışmada, oral yol ile kullanılan bir alkilfosfolipid analogu olan miltefosinin, standart tedavide kullanılan beş değerli antimon bileşiklerine göre tedavi etkinliğinin *in vitro* olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Çalışmada, daha önce 5 KKL hastasından elde edilen hasta örnekleri kullanılmıştır. Bu izolatlara internal transcribed spacer-1 problu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu testi uygulanarak genotiplenmiştir. Genotiplenme sonrası, meglumin antimoniat (MA) ve miltefosine karşı etkinliklerini değerlendirmek amacıyla *in vitro* ilaç etkinliği testleri uygulanmıştır. MA ve miltefosinden hazırlanan seri sulandırılmalar (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 ve 4 µg/mL) RPMI 1640 besiyeri (%15 FCS eklenmiş) içinde 96'lık düz tabanlı hücre kültürü plaklarında 100 µL olarak hazırlanmış ve 48 saat boyunca 24 °C'lik etüvlerde enkübe edilmiştir. İlaçların *Leishmania* spp. promastigotları üzerindeki etkisi, 24. ve 48. saatlerde, hemositometri lamında sayılarak ve XTT hücre canlılık testi ile değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Tüm örnekler *L. tropica* olarak genotiplenmiştir. İlk 24 saat sonunda yapılan hemositometri ve XTT testleri sonucunda, miltefosin ve MA'nın tam leishmaniasidal etki gösterdiği minimum konsantrasyon sırasıyla 128 µg/mL ve 256 µg/mL olarak saptanmıştır. Kırk sekizinci saatteki incelemede, miltefosin ve MA'nın minimum etkin konsantrasyonu 32 µg/mL ve 64 µg/mL olarak izlenmiştir. Hemositometri ile sayım ve XTT yöntemi sonuçları korelasyon göstermektedir.

**Sonuç:** Literatürde, KKL hasta örneklerinde miltefosin etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu özel hasta grubunda karşılaşılan tedavi zorluklarının giderilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, miltefosinin KKL tedavisinde etkili bir ajan olduğu görülmüş ve miltefosin ile yapılacak klinik çalışmaların değerli veriler sunacağı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Kutanöz leishmaniasis, ilaç direnci, miltefosin, Türkiye

### ABSTRACT

**Objective:** Leishmaniasis is the second deadliest parasitic disease in the World Health Organisation's list of neglected diseases, following malaria. Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form of the disease and it is one of the few communicable diseases with increasing incidence rates owing to factors like armed conflicts and climate change. CL can be divided into two major groups: Acute CL (ACL) and chronic CL (CCL). The aim of this study was to compare the *in vitro* efficacy of miltefosine and pentavalent antimony compounds in the CCL patient samples.

**Methods:** Five isolates previously isolated from 5 CCL patients were included in this study. Genotyping is performed using internal transcribed spacer 1 (ITS 1) gene region real-time PCR. *In vitro* drug efficacy tests were applied to determine their activity against meglumine antimoniate (MA) and miltefosine. Serial dilutions (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 and 4 µg/mL)



Geliş Tarihi/Received: 04.08.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 21.01.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Varol Tunalı, Muğla Üniversitesi Tıp Fakültesi, Acil Tıp Anabilim Dalı, Muğla; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Tel/Phone: +90 555 630 32 31 E-Posta/E-mail: varoltunalı@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-1799-2539

prepared from MA and miltefosine were prepared in 96-well flat-bottom cell culture plates and incubated at 24 °C for 48 hours. The efficacy of the drug on *Leishmania* spp. promastigotes after 24 and 48 hours was evaluated by hemocytometer slide and XTT cell viability test.

**Results:** All of the samples were genotyped as *L. tropica*. Evaluation of 24 and 48 hours showed, 128 µg/mL and 256 µg/mL and 32 µg/mL and 64 µg/mL concentrations of miltefosine and MA were enough to kill all the promastigotes respectively. The results of the hemocytometer slide and XTT were consistent.

**Conclusion:** There are no studies investigating the *in vitro* efficacy of miltefosine with the CCL patient group. To overcome the treatment challenges experienced in this special patient group, more studies are needed. According to our results, it is concluded that miltefosine is efficient for the treatment of CCL and further clinical studies with miltefosine will reveal valuable data.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis, drug resistance, miltefosine, Turkey

## GİRİŞ

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü'nün ihmal edilen hastalıklar listesinde yer alan ve iklim değişikliği nedeniyle özellikle Avrupa'da kuzeye yayılım trendi gösteren farklı *Leishmania* türleri tarafından oluşturulan vektör kaynaklı bir protozoon hastalığıdır. Dünya'da milyonlarca kişide enfeksiyona neden olan leishmaniasisin üç temel klinik formu bulunmaktadır; iç organları tutarak karakterize olan formu visseral leishmaniasis (VL), deri tutulumu ile lezyonlara sebep olan formu kutanöz leishmaniasis (KL), mukoza ve deriyi beraber etkileyen ve daha çok Güney Amerika'da görülen formu muko-kutanöz leishmaniasis (MKL) (1). KL, mortaliteden çok morbiditeye sebep olan bir enfeksiyon hastalığıdır. Ateş veya genel semptomlara neden olmadan, genellikle bir veya birden fazla uzun süreli deri lezyonu ile seyreden KL, temelde iki büyük gruba ayrılabilir: Akut KL (AKL) ve kronik KL (KKL) (2). KL lezyonları 2 yıl içinde tedavi ile veya kendiliğinden iyileşmez ise KKL olarak adlandırılmaktadır.

KL, Türkiye'de 1980'li yıllardan beri bildirimi zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2005-2014 yılları arasında 14.587 KL olgusu bildirilmiştir (1). Bu olgular arasında KKL hasta sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte, bu tanının konması uzun süreli takip gerektirdiği ve oluşumunun multifaktöriyel bir tablo olduğu göz önüne alındığında, hastalığın seyri ve tedavisinde yaşanabilecek zorluklar daha iyi anlaşılabilir.

Leishmaniasis tedavisi açısından da ihmal edilmiş hastalıklardan biridir. Halen tedavinin temelini oluşturan beş değerli antimon bileşikler 1940'lı yıllarda geliştirilen ajanlardır (3). Leishmaniasis tedavisi, kullanılan beş değerli antimon bileşiklerinin ciddi toksik yan etkileri olması, tedavinin uzun sürmesi, gelişen direnç ve hastanın tedavi uyumsuzluğu gibi sebeplerle başarısızlığa uğrayabilmektedir (4). KL'nin alt tiplerinden olan KKL olgularında ise güncel tedavi yöntemleriyle tedavi başarısızlığı oranı daha yüksek olmaktadır. Bu durum alternatif tedavi seçeneklerini gündeme getirmektedir. VL tedavisinde etkinliği kanıtlanmış ve oral yol ile kullanılan miltefosin, antineoplastik bir ajan olarak geliştirilmiş bir alkil fosfolipid analogudur (5).

Çalışmamızda oral yol ile kullanılan miltefosinin, leishmaniasisin standart tedavisinde kullanılan meglumin antimoniata (MA) kıyasla, tedavi etkinliklerinin *in vitro* olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

Diyarbakır ve Şanlıurfa'da yaşayan 5 KKL hastasından daha önce izole edilen ve kriyoprezervasyon ile sıvı nitrojende saklanan 5 izolat, R1-R5 şeklinde kodlanarak çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 77.637.435-55-27.09.2016 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

## Örneklerin Zenginleştirilmiş NNN Besiyerine İnokülasyonu ve *Leishmania* spp. Suşlarının Kültivasyonu

Dondurulmuş *Leishmania* spp. promastigotlarının yüksek miktarlarda çoğaltılması için; sıvı azottan çıkarılan promastigotlar hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra örnekler klasik Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerinde üretilmediğinden dolayı, zenginleştirilmiş NNN (Z-NNN) besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiştir. Z-NNN besiyerinin bileşiminde klasik NNN besiyerine ek olarak, dana karaciğer ekstraktı vb. zenginleştirici maddeler bulunmaktadır (6). Z-NNN besiyerinde ilk üreme gerçekleşikten sonra fazla miktarda üretmek amacıyla RPMI-1640 besiyerinde kültüre alınmıştır. Ticari olarak temin edilen besiyerine kullanmadan önce %10 FCS, 200 U penisilin/mL ve 0,2 mg/mL streptomisin eklenip, 25 mL'lik hücre kültürü flasklarına 5'er mL dağıtılmıştır. Ekim yapılan flasklar 25 °C'lik etüvde inkübe edilmişlerdir. Parazitlerin çoğalması takip edilerek, 2-3 günde bir taze besiyerinin eklenmesiyle, 1x10<sup>6</sup>/mL yoğunluğunda promastigot ihtiva edecek şekilde, 10 mL promastigot içeren besiyeri elde edilmiştir.

## Genotiplendirme

Çalışmada, izolatların genotiplendirilmesi amacıyla internal transcribed spacer 1 (ITS-1) problu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testi uygulanmıştır (7). *Leishmania* parazitlerinin ssu rRNA ve 5.8S rRNA'yı kodlayan genleri ayıran ribozomal ITS-1 bölgesi, Forward primer; 5'-CTGGATCATTTTCCGATG -3', Reverse Primer; 5'- GAAGCCAAGTCATCCATCGC -3' primerleri, LightCycler-FastStart DNA Master karışımı (Roche Life Sciences) ile birlikte aşağıdaki özgün problemler kullanılarak çoğaltılmıştır (7).

**Probe 1:** CCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTT—FL

**Probe 2:** LC640-GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG—PH

Gerçek zamanlı PZR testi amacıyla hazırlanan toplam 25 µL'lik reaksiyon karışımında; 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 GmbH, Hilden, Germany) ve 5 µL genomik DNA örneği kullanılmıştır.

*Leishmania* tür ayrımı (*L. tropica*, *L. infantum* ve *L. major* ayrımı) saptanması için belirlenen termal profil; denatürasyon, çoğaltma, erime eğrisi analizi ve soğutma basamaklarından oluşur ve Rotor-Gene (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) cihazının programında çalışma protokolleri olarak önceden kayıtlı olarak bulunmaktadır. Rotor-Gene'de melting analizi yapılarak sonuçlar elde edilmiştir.

## İn vitro Miltefosin Etkinlik Testleri

Bu beş izolata, MA ve miltefosine karşı etkinliklerinin saptanması için iki ayrı yöntem ile *in vitro* ilaç etkinliği testleri uygulanmıştır. MA ve miltefosinden hazırlanan seri sulandırılmalar (4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 ve 512 µg/mL) RPMI 1640 besiyeri (%15 FCS

eklenmiş) içinde 96'lık düz tabanlı hücre kültürü plaklarında 100 µL olarak hazırlanmıştır. Logaritmik fazdaki *Leishmania* spp. promastigotları ( $1 \times 10^6$ /mL) 100 µL olacak şekilde her bir çukura eklenmiştir. Plaklar 48 saat 24 °C'de inkübe edilmiştir. Yirmi dört ve kırk sekiz saat sonra ilacın *Leishmania* spp. promastigotları üzerindeki etkisi:

A. Deneysel ve kontrol grubu için hazırlanmış besiyerlerindeki parazit sayıları hemositometre lamında sayılarak belirlenmiş, B. XTT (sodium 3,3',5,5'-tetrazolium-2,2'-diyotrolat) bis(4-metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat) hücre proliferasyon kiti ile canlılıkları değerlendirilmiştir. XTT yöntemi 3 aşamadan oluşmakta olup, birinci aşamada hücreler olası toksik maddeye maruz bırakılmış, ikinci aşamada ortamdaki toksik madde uzaklaştırıldıktan sonra XTT eklenir ve 1-4 saat boyunca inkübe edilir ve son aşamada da renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek viabilite ölçümü yapılmıştır (8). Deneyler üç kez tekrarlanmış olup, kontrol grubu olarak ilaç eklenmemiş besiyerleri kullanılmıştır (9).

### İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde GraphPad Prism 7 (Chicago, ABD) paket programı kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan ölçümsel değişkenlerin arasındaki farkın anlamlılığı, tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile belirlenmiştir. Bunu takiben Sidak'ın çoklu değişken karşılaştırma testi, GraphPad Prism 7 rehberine uygun olarak uygulanmıştır (10).

## BULGULAR

### KKL İzolatlarının Genotipleri

KKL olarak sınıflandırmış olduğumuz rezidivan ve lupoid tipteki KL lezyonlarından elde edilmiş 5 adet izolatın tamamının *L. tropica* olduğu saptanmıştır (Şekil 1).

### İn vitro MA ve Miltefosin Etkinlik Testi Sonuçları

İlk 24 saat sonunda yapılan hemositometri ve XTT testleri sonucunda, miltefosin ve MA'nın tam leishmaniasidal etki gösterdiği minimum konsantrasyon sırasıyla 128 µg/mL ve 256 µg/mL olarak saptanmıştır (Şekil 2). Kırk sekizinci saatteki

incelemede, miltefosin ve MA'nın sırasıyla minimum etkin konsantrasyonu 32 µg/mL ve 64 µg/mL olarak izlenmiştir (Şekil 3). Hemositometri ile sayım ve XTT yöntemi sonuçları korelasyon göstermektedir. Kontrol grubundaki promastigotların ise yüksek miktarlarda canlılıklarını sürdürdükleri görülmüştür.

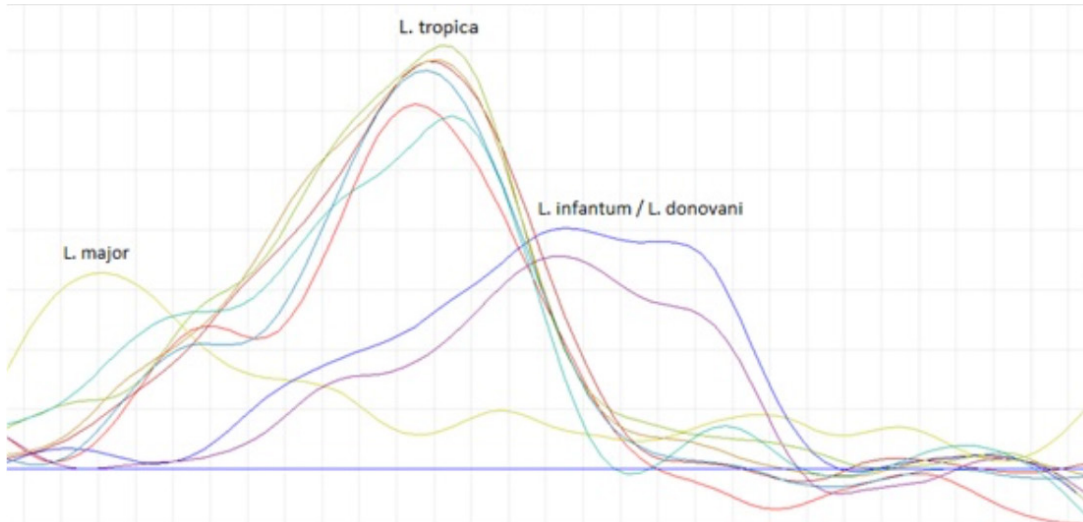
### İstatistiksel Analiz

İn vitro test sonuçlarının yapılan istatistiksel analizinde; miltefosin ve MA'nın doz ve zamandan bağımsız olarak, ilaçsız kontrole kıyasla anlamlı etkinliği olduğu saptanmıştır (p-değeri <0,0001). Buna karşın miltefosin ve MA arasında, tüm konsantrasyonlar ve tüm saatler göz önüne alındığında, etkinlik açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p-değeri >0,05).

## TARTIŞMA

*Leishmania* türlerinin çeşitli kimyasal sınıflardan bir dizi ilaç molekülüne tepkilerini vurgulayan deneysel kanıtlar giderek artmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan farklı test koşulları mevcut olsa da, bazı *Leishmania* türleri arasında ilaç hassasiyetinde farklılıklar olduğu açıktır ve bu insan hastalığının tedavi rejimlerinin sonucunu etkileyebilir (11). İlaç direnci, *Leishmania* parazitinin ilaca duyarlı olmasından, ilaca cevap verilmemesine kadar gelişebilecek tüm süreçleri ifade eder. İnsan enfeksiyonlarında bu durum, hastanın tedaviye yanıtızsızlığı veya tedaviden sonra relapsların ortaya çıkması veya KKL'de olduğu gibi farklı klinik şekiller olarak kendini gösterebilir. Tedavi başarısı; bağışıklık durumu, beslenme, yaş ve cinsiyet gibi konak faktörlerinden ve aynı zamanda ilgili ilaçların farmakokinetik özelliklerinden de etkilenir (12,13).

Günümüzde yoksulluğun bir hastalığı olarak tanımlanan KL'de kronikleşen hastalık tablosu, uzayan tedavi sürelerine, direnç gelişimi endişesiyle çoklu ilaç kullanımı seçeneklerinin gündeme gelmesine, neredeyse tamamı parenteral olarak uygulanan ilaçlar dolayısıyla hastane yatışı gereksinimine ve relapsların önlenmesi açısından, uzun dönem hasta takibine sebebiyet verebilmektedir (14). Bu durum, uzayan tedavi süreleri ve birim maliyetleri son derece yüksek olan ilaçların kombine kullanımı gerekçeleriyle çok yüksek tedavi giderlerine sebep olmaktadır. Bununla beraber,

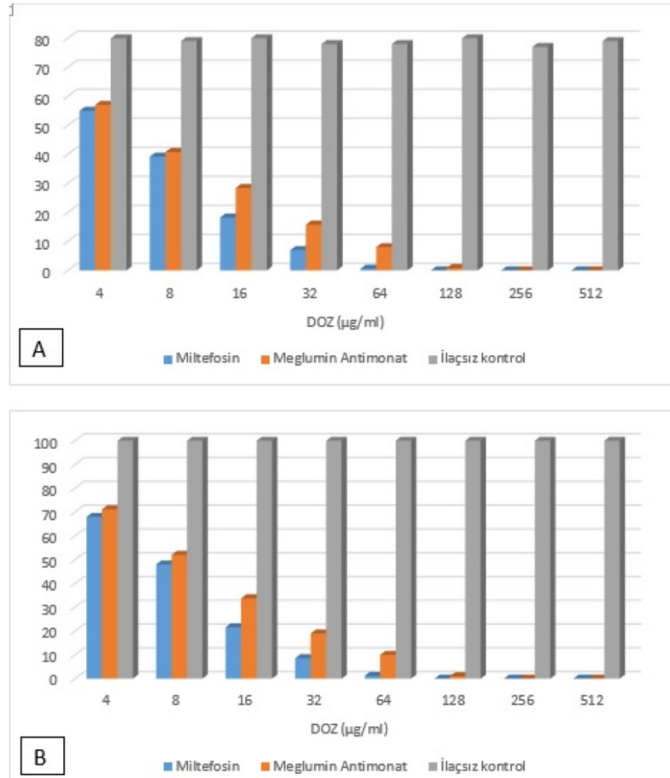


**Şekil 1.** Beş KKL izolatından yapılan genotiplendirme sonuçları. *L. tropica* referans suşu dışında 5 adet pik olduğu izlenmektedir  
KKL: Kronik kutanöz leishmaniasis

hastane yatışı gerekçesiyle gelişebilecek hastane enfeksiyonları gibi risklerin yanı sıra, uzun dönemli hasta takibinin beraberinde getireceği lojistik birçok soruna yol açabilmektedir. Tüm bu sebeplerden ötürü, hastalığın endemik olarak görüldüğü, neredeyse tamamı gelişmekte olan ülkeler listesinde bulunan bölgelerde hastalık kısır bir döngüye girmektedir (15).

KL tedavisinde uzun yıllardır altın standart tedavi seçeneği olarak kullanılan antimon bileşikleri, parenteral yolla sistemik veya intra-lezyoner enjeksiyon şeklinde uygulanabilmektedir. Giderek artan sayıdaki dirençli olgular, amfoterisin-B gibi alternatif tedavi yöntemlerinin önünü açmış olsa da, amfoterisin-B tedavisinde, ciddi hepatotoksisite gelişme riski, hastane yatış gerekliliği ve çok yüksek maliyetler gibi sebepler, tedavi alternatiflerinin aranmasına yol açmıştır. Bu noktada, VL hastalarında uzun süre boyunca güvenle kullanılan ve başarılı sonuçlar elde edilen miltefosin, tedavi zorluklarının en belirgin şekilde ortaya çıktığı KKL hasta grubunda önemli ve değerli bir tedavi alternatifi olarak göze çarpmaktadır. Oral yolla kullanım hasta uyumunu artırırken, amfoterisin-B'ye kıyasla düşük yan etki profili de bir diğer önemli avantaj olarak kendini ortaya koymaktadır. Uzun yarılanma ömrü direnç gelişimi açısından endişe yaratabilecek bir husus olmasına rağmen uygun bir ilaçla kısa süreli kombinasyonları bu sorunu ortadan kaldırmaktadır (16).

Yaptığımız bu çalışmada, KKL hastalarından elde edilen *Leishmania* izolatlarında, *in vitro* olarak ilaç etkinliği değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla ülkemizde ve dünyada en sık kullanılan anti-leishmanial ilaç olan antimon bileşiklerinden MA ve düşük yan etki profili, kolay kullanım avantajı ve maliyet açısından göze çarpan yeni bir anti-leishmanial ajan olan miltefosin etkinliği karşılaştırılmıştır.



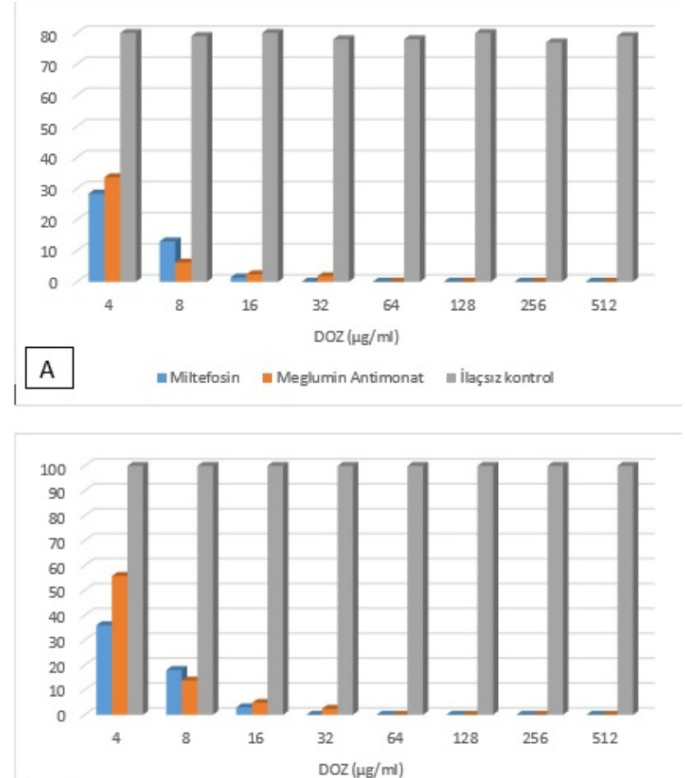
**Şekil 2.** Yirmi dört saat sonunda hemositometri lamı ve XTT testi sonuçları. A. Işık mikroskopunda hemositometre lamı 24 saatteki parazit sayısı ( $10^6$ /mL), B. XTT yöntemi ile 24 saatteki kolormetrik olarak parazitlerin % canlılık değerleri ( $10^6$ /mL)

VL için Hindistan'da ilk seçenek ilaç durumuna gelen miltefosinin KL için kullanımı da yaygınlaşmaktadır. Mart 2014'te Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi, gebe veya emzirmeyen erişkinlerde ve ergenlerde KL'nin tedavisinde oral ajan miltefosini onaylamıştır (17). Her ne kadar, VL'de miltefosin kullanımını yaygın da olsa, tüm *Leishmania* türlerine bağlı KL olgularında kanıta dayalı faz IV çalışmaları yeterli miktarda değildir. Farklı *Leishmania* türlerini kapsayan *in vitro* ve *in vivo* modeller oluşturulmuş ve umut verici sonuçlar alınmıştır (18).

HIV ile birlikte visseral ve kutanöz tutulumlu leishmaniasisi olan hastalarda yapılan bir çalışmada, antimonlar ve lipozomal amfoterisin-B'ye karşı direnç gelişimi veya relapsların görüldüğü bir hasta grubunda, oral miltefosin kullanılmış ve gerek ilaç etkinliği gerekse de hastaların ilaç toleransı açısından etkili sonuçlar alınmıştır (19). Hollanda'da *L. major* ve *L. infantum* ile enfekte iki KL olgusunda yapılan klinik bir çalışmada, oral miltefosin'in lezyon üzerindeki parazit sayısında hızlı bir gerileme sağladığı ve uzun süreli takiplerinde de, yarılanma ömrü uzun olmasından dolayı kalıcı bir sağaltım sağladığı izlenmiştir (20).

Miltefosinin KL hastalarında kullanıldığı örnekler, genel olarak Güney Amerika kıtasından ve *L. braziliensis* ile enfekte olgular ile yapılan çalışmalarda ortaya konmaktadır (21).

Bizim çalışmamızda, tüm KKL izolatlarının *L. tropica* olduğu yapılan genotiplendirme ile gösterilmiştir. Antroponotik KL etkeni olan *L. tropica* ile enfekte hastalarda miltefosin etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır. Kanada'da, Afganistan'dan dönen altı KL hastası asker ile yapılan bir çalışmada, tüm hastaların lezyonları kuru tip olarak sınıflandırılmış ve iki hastada da genotiplendirme ile *L. tropica* ile enfekte oldukları gösterilmiştir. Tüm hastalara çeşitli



**Şekil 3.** Kırk sekiz saat sonunda hemositometri lamı ve XTT testi sonuçları. A. Işık mikroskopunda hemositometre lamı 48 saatteki parazit sayısı ( $10^6$ /mL), B. XTT yöntemi ile 48 saatteki kolormetrik olarak parazitlerin % canlılık değerleri ( $10^6$ /mL)

sebeplerle oral miltefosin tedavisi verilmiş ve şifa sağlanmıştır (22). İngiltere'de, *L. tropica* ile enfekte iki KL hastası Afgan mülteci ile yapılan bir çalışmada, oral miltefosin tedavisi uygulanmış ve hastaların tam iyileşme gösterdiği ve relaps gelişmediği bildirilmiştir (23).

## SONUÇ

*In vitro* çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında, miltefosin ve MA gruplarının kontrol gruplarına kıyasla belirgin tedavi edici etkisi olduğu gözlenmiştir. Buna rağmen miltefosin ve MA gruplarının tedavi etkinliği açısından, gerek hemositometri ile sayım sonuçları, gerekse de XTT testi sonuçları arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Tüm örneklerde her iki ilacın da yeterli leishmaniasidal etki gösterdiği görülmüştür. R1 izolatı, tüm örnekler arasında özellikle MA'ya karşı en yüksek *in vitro* direnci gösteren izolat olarak dikkati çekmektedir.

KKL olgularında *in vitro* olarak miltefosin etkinliğinin değerlendirildiği çalışmamızın sonuçları incelendiğinde, miltefosin'in KKL tedavisinde etkin bir ilaç olduğu yönünde güçlü kanıtlar görülmektedir. Tedavisinde zorluklar yaşanan KKL'nin tedavisi amacıyla, miltefosinin etkili ve kullanım kolaylığı olan bir ajan olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Bu bilgilerin ışığında, KKL hastalarında miltefosinin ilk tercih olarak akla gelmesi gereken ajanlardan biri olabileceği ve KKL tedavisinde önemli fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca *in vitro* sonuçların *in vivo* hayvan modelleri ile desteklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

### \*Etik

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 77.637.435-55-27.09.2016 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

**Hasta Onayı:** Gerek yoktur.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

### \*Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: V.T., İ.Ç., N.T., Konsept: V.T., M.H., A.Ö., N.T., Dizayn: V.T., M.H., İ.Ç., O.Z., A.Ö., N.T., Veri Toplama veya İşleme: V.T., M.H., İ.Ç., N.T., Analiz veya Yorumlama: V.T., M.H., O.Z., A.Ö., N.T., Literatür Arama: V.T., O.Z., Yazan: V.T., A.Ö., N.T.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'nın 2017/TIP/017 numaralı projesince desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Gürel MS, Yeşilova Y, Olgen MK, Ozbel Y. [Cutaneous leishmaniasis in Turkey]. Türkiye Parazitolojisi 2012; 36: 121-9.
- Douba MD, Abbas O, Wali A, Nassany J, Aouf A, Tibbi MS, et al. Chronic cutaneous leishmaniasis, a great mimicker with various clinical presentations: 12 years experience from Aleppo. J Eur Acad Dermatol Venereol 2012; 26: 1224-9.
- Brito NC, Rabello A, Cota GF. Efficacy of pentavalent antimoniate intralésional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. PLoS ONE 2017; 12: e0184777.

- Vanaerschot M, Dumetz F, Roy S, Ponte-Sucre A, Arevalo J, Dujardin JC. Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype? Expert Rev Anti Infect Ther 2014; 12: 937-46.
- Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. Ther Clin Risk Manag 2007; 3: 733-40.
- Özbilgin A, Çulha G, Uzun S, Harman M, Topal SG, Okudan F, et al. Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of Leishmania major from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. Trop Med Int Heal 2016; 21: 783-91.
- 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.
- Tokur O, Aksoy A. In Vitro Sitotoksikite Testleri. Harran Üniv Vet Fak Derg 2017; 6: 112-8.
- Williams C, Espinosa OA, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barría E, et al. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for Leishmania. J Microbiol Methods 2003; 55: 813-6.
- Motulsky HJ. No Title [Internet]. GraphPad Statistics Guide. [cited 2020 Apr 29]. Available from: <http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm>
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge PLoS Negl Trop Dis 2017; 11: e0006052.
- Loiseau P, Bories C. Mechanisms of drug action and drug resistance in Leishmania as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. Curr Top Med Chem 2006; 6: 539-50.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 111-26.
- Singh OP, Singh B, Chakravarty J, Sundar S. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. Infect Dis Poverty 2016; 5: 19.
- Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. Parasitology 2018; 145: 464-80.
- Rahman R, Goyal V, Haque R, Jamil K, Faiz A, Samad R, et al. Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11: e0005635.
- Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). Clin Infect Dis 2016; 63: e202-64.
- Escobar P, Yardley V, Croft SL. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against Leishmania donovani in immunodeficient scid mice. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1872-5.
- Sindermann H, Engel KR, Fischer C, Bommer W. Oral miltefosine for Leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. Clin Infect Dis 2004; 39: 1520-3.
- Dorlo TPC, van Thiel PPAM, Schoone GJ, Stienstra Y, van Vugt M, Beijnen JH, et al. Dynamics of parasite clearance in cutaneous leishmaniasis patients treated with miltefosine. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5: e1436.
- Soto J, Arana BA, Tolado J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis 2004; 38: 1266-72.
- Keynan Y, Larios OE, Wiseman MC, Plourde M, Ouellette M, Rubinstein E. Use of oral miltefosine for cutaneous leishmaniasis in Canadian soldiers returning from Afghanistan. Can J Infect Dis Med 2008; 19: 394-6.
- Killingly B, Lamb LEM, Davidson RN. Miltefosine to treat cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania tropica. Ann Trop Med Parasitol 2009; 103: 171-5.