

# Glia Hücrelerinin Antimona Dirençli *Leishmania tropica* ile Enfekte Edilmesi: Yeni Bir ex-vivo Modeli\*

## Infecting Glial Cells with Antimony Resistant *Leishmania tropica*: A New ex-vivo Model

Orçun ZORBOZAN<sup>1</sup>, Mehmet HARMAN<sup>2</sup>, Vedat EVREN<sup>3</sup>, Mümin Alper ERDOĞAN<sup>3</sup>, Aslı KILAVUZ<sup>4</sup>, Varol TUNALI<sup>1</sup>, İbrahim ÇAVUŞ<sup>5</sup>, Özlem YILMAZ<sup>3</sup>, Ahmet ÖZBİLGİN<sup>5</sup>, Nevin TURGAY<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>1</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Izmir, Turkey.

<sup>2</sup> Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.

<sup>2</sup> Dicle University Faculty of Medicine, Department of Dermatology, Diyarbakir, Turkey.

<sup>3</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>3</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Physiology, Izmir, Turkey

<sup>4</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Geriatri Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>4</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Geriatric, Izmir, Turkey

<sup>5</sup> Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

<sup>5</sup> Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Manisa, Turkey.

\* Bu çalışma, 6. Dünya Leishmania Kongresi (6<sup>th</sup> World Congress on Leishmaniasis) (16-20 Mayıs 2017, Toledo/İSPANYA)'nde bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 28.07.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.12.2017

### ÖZ

Leyşmanyazis; kutanöz, mukokutanöz, viseral ve viserotropik formlar gibi farklı klinik özelliklere sahip vektör kaynaklı zoonotik bir hastalıktır. Leyşmanyazis ilaç tedavisinde kullanılan protokoller toksik etkilere sahiptir ve uygulamalar sırasında birçok kısıtlılık olmaktadır. Tedavi ile ilgili kısıtlılıklardan en önemlisi uygulanan protokollere karşı gelişen dirençtir. Özellikle dirençli hastalar için yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Antimona direnci olan hastalarda yeni ilaç seçeneklerinin değerlendirilmesi için in-vitro ve in-vivo çalışmalara ek olarak, primer hücre kültürlerini kullanan ex-vivo modellerin iyi bir kaynak olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, tedaviye yanıt vermeyen kutanöz leishmanyazisli hastalarda tedavi seçeneklerini değerlendirmek için yeni bir ex-vivo kültür modelinin tanımlanması amaçlanmıştır. Çalışmamızda oluşturulan deneysel ex-vivo enfeksiyon

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Orçun Zorbozan, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye.

Tel (Phone): +90 232 390 4916, E-posta (E-mail): orcun-zorbozan@hotmail.com

modelinde, önceden kutanöz leşmanyazis tanısı almış bir olgudan elde edilen *Leishmania tropica* promastigot formu kullanılmıştır. Ex-vivo modeli için kullanılacak primer astroglial hücre kültürü, steril koşullar altında, 2-3 günlük yeni doğan Sprague Dawley sıçan beyinlerinden McCarthy yöntemi modifiye edilerek hazırlanmıştır. Yeterli yoğunluğa ulaşan astroglia hücreleri antimona dirençli *L.tropica* promastigotları ile enfekte edilmiştir. Yirmi dört saatlik inkübasyondan sonra, hücrelerin üzerinde bulunan üst sıvı toplanmış, hücre kültür plağı oda sıcaklığında kurutulduktan sonra metil alkol ile fikse edilmiş ve Giemsa boyası ile boyanarak *L.tropica* amastigotları tanımlanmıştır. *L.tropica* promastigotları ile enfekte edilen primer hücre kültürlerinde glia hücreleri içerisinde amastigotlar yoğun bir şekilde gözlenmiştir. Enfekte edilen plaklardan elde edilen sıvı besiyerinin santrifüjü sonrası dip çökeltiden hazırlanan yaymaların Giemsa boyası ile hazırlanan preparatlarında parazitin promastigot formu gözlenmemiştir. Bu çalışmada beş değerlikli antimon tedavisine yanıt alınamayan kutanöz leşmanyazisli bir hastadan elde edilen promastigotların sıçan glia hücrelerini enfekte ederek amastigot formuna dönüştüğü gösterilmiştir. Oluşturulan bu amastigot glia hücre modeli bildiğimiz kadarıyla *L.tropica* ile oluşturulan literatürdeki ilk modeldir. Glia hücreleri içerisinde *L.tropica* amastigot şekillerinin görülmesi *Leishmania* türlerinin santral sinir sistemini enfekte edebileceğinin göstergesi olarak düşünülmüştür. Tedaviye yanıt alınamayan leşmanyazis olgularında, santral sinir sistemi *Leishmania* amastigotlarının immün sistemden kaçması için uygun bir alan olarak gözükmektedir. Bu çalışma, glia hücrelerinin *L.tropica* amastigotları ile enfeksiyonunu gösteren ilk çalışma olması nedeniyle önem arz etmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Leishmania tropica*; ex-vivo; glia hücresi; antimona direnç.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a vector-borne zoonotic disease that shows different clinical features like cutaneous, mucocutaneous, visceral and viscerotropic forms. The protocols used in the treatment of leishmaniasis are toxic and have many limitations during administration. One of the limitations of treatment is the resistance against the protocols in practice. There is also a need to define new treatment options especially for resistant patients. Ex-vivo models using primary cell cultures may be a good source for evaluating new drug options in patients with antimony resistance, in addition to in-vitro and in-vivo studies. In this study, it was aimed to define a new ex-vivo culture model to evaluate treatment options in patients with cutaneous leishmaniasis who did not respond to treatment. In our experimental model of ex-vivo infection, *Leishmania tropica* promastigotes isolated from a case previously diagnosed with cutaneous leishmaniasis were used. The primary astroglial cell culture used for the ex-vivo model was prepared from 2-3 days old neonatal Sprague Dawley rat brains under sterile conditions by the modification McCarthy's method. The astroglia cells, which reached sufficient density, were infected with antimony resistant *L.tropica* promastigotes. After 24 hours of incubation, the supernatant on the cells were collected, the cell culture plate was dried at room temperature, then fixed with methyl alcohol and stained with Giemsa to search for *L.tropica* amastigotes. Amastigotes were intensely observed in glia cells in primary cell cultures infected with *L.tropica* promastigotes. No promastigotes were seen on Giemsa stained preparations of the precipitates prepared from the bottom sediment after the centrifugation of the liquid medium removed from the infected plates. In this study, promastigotes from a cutaneous leishmaniasis patient unable to respond to pentavalent antimony therapy were shown to infect rat glia cells and converted to amastigote form. This amastigote glial cell model, as far as we know, is the first model in the literature produced by *L.tropica*. The occurrence of *L.tropica* amastigote forms in glia cells may be indicative of the ability of *Leishmania* species to infect the central nervous system. The central nervous system may be an area for the *Leishmania* amastigotes to escape from the immune system in cases of leishmaniasis without a treatment response. Our study is important because it is the first study to show the infection of glia cells with *L.tropica* amastigotes.

**Keywords:** *Leishmania tropica*; ex-vivo; glial cell; antimony resistance.

## GİRİŞ

Leyşmanyazis; kutanöz, mukokutanöz, viseral ve viserotropik formlar gibi farklı klinik özelliklere sahip vektör kaynaklı zoonotik bir hastalıktır<sup>1</sup>. Tropikal ve subtropikal bölgelerde ve Akdeniz havzasında yaşayan insanlar enfeksiyon açısından risk altındadır<sup>2</sup>. Leyşmanyazis tedavisinde uygulanan protokoller toksik etkilere sahiptir ve uygulamalar sırasında birçok kısıtlılık oluşmaktadır<sup>3</sup>. Tedavi ile ilgili kısıtlılıklardan birisi de uygulamadaki protokollere karşı gelişen dirençtir<sup>4</sup>. Özellikle dirençli hastalar için yeni tedavi seçeneklerinin tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Antimona direnci olan hastalarda yeni ilaç seçeneklerinin değerlendirilmesi için in-vitro ve in-vivo çalışmalara ek olarak, primer hücre kültürlerini kullanan ex-vivo modeller iyi bir kaynak olmaktadır. *Leishmania* türlerine karşı ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde amastigot-makrofaq modeli altın standart yöntem olarak kullanılmaktadır<sup>5,6</sup>. Ancak bu yöntemle yapılan çalışmalarda klinik yanıt ile uyumsuz sonuçlar elde edildiğine dair yayınlar mevcuttur<sup>7</sup>. Bu çalışmada, tedaviye yanıt vermeyen kutanöz leyşmanyazisli hastalarda tedavi seçeneklerini değerlendirmek için yeni bir ex-vivo kültür modelinin tanımlanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Antimona Dirençli Kutanöz Leyşmanyazis Olgusu Deri Kazıntı Örneğinden *Leishmania tropica* Promastigotlarının İzolasyonu

Çalışmamızda oluşturulan "deneysel ex-vivo enfeksiyon modelinde, önceden kutanöz leyşmanyazis tanısı almış bir olgudan elde edilen *Leishmania tropica* promastigotları kullanıldı.

Promastigotlar 2013 yılında burun sırtında atrofik skarın alt periferinde kabuklu papüler lezyonla Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Polikliniğine annesi tarafından getirilen ve iki ay önce toplu iğne başı büyüklüğünde bir kabartı şeklinde başlayıp büyüyen, 11 yaşında kız çocuğu olgusuna ait lezyondan elde edildi (Resim 1). Lezyondan yapılan dermal kazıntı yaymalarında *Leishmania* spp. amastigotları görüldü. Lezyondan



Resim 1. Burun sırtındaki atrofik skarın alt periferinde kurutlu papüler kutanöz leyşmanyazis lezyonu.

alınan klinik örneğin ekildiği zenginleştirilmiş Novy-Nicolle-McNeal (NNN) besiyerinde promastigotlar saptandı. Elde edilen promastigotlar %10 fetal sıgır serumu ve RPMI 1640 içeren besiyerine ekilerek  $10^8$  promastigot/ml sayısına ulaştığında kriyoprezervasyonu yapılarak sıvı azotta saklandı. Klinik örnekten ve üretilen promastigotlardan elde edilen DNA'lar ile parazitin ITS-1 bölgesine özgü tasarladığımız primer ve probler ile gerçek zamanlı PCR ile yapılan genotiplendirme çalışmalarında etken türün *L.tropica* olduğu saptandı. Hastaya 11 gün boyunca 5 ml/gün meglumine-antimoniate (Glucantime® enjektabl, Sanofi-Aventis, Fransa) intralezyonel olarak uygulandı. Üç ay sonra yapılan kontrol muayenesinde lezyonda belirgin iyileşme olmadığının gözlenmesi üzerine 11 gün boyunca tekrar 7 ml/gün Glucantime intralezyonel olarak uygulandı. 2014'te lezyonunun iyileşmemesi nedeniyle tekrar başvuran hastaya bu kez 17 gün 4 ml/gün sodium stibogluconate (Pentostam® enjektabl, GlaxoSmithKline, Birleşik Krallık) intravenöz yoldan uygulandı. Tedavi bitiminden 6 ay sonra yapılan değerlendirmede lezyonda belirgin iyileşme olmadığı görüldü. Beş değerlikli antimon tedavisine cevap alınamaması nedeniyle hasta "antimona dirençli olgu" olarak kabul edildi.

### Primer Hücre Kültürü

Primer hücre kültürü, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında, Helsinki bildirgesinin deney hayvanı kullanım ilkelerine uygun şekilde yapıldı. Hücre kültüründe kullanılan tüm malzemeler steril şekilde kullanıldı.

Primer astroglial hücre kültürü, steril koşullar altında, 2-3 günlük yeni doğan Sprague Dawley sıçan beyinlerinden hazırlandı. McCarthy yöntemi modifiye edilerek kullanıldı<sup>8,9</sup>. Kısaca; yeni doğan sıçanların kafatasları açıldı serebral korteksleri çıkarılıp buz üzerinde, içerisinde DMEM besiyeri (Biological Industries, ABD) bulunan steril petri kaplarına alındı. Beyin zar ve damarları stereo zoom mikroskop altında uzaklaştırıldı. Elde edilen doku önce 1-2 mm<sup>3</sup> boyutlarında küçük parçalara kesilerek ayrıldı; daha sonra ise bağ dokusunun parçalanması için %5 oranında %0.25'lik Tripsin-Edta (Sigma-Aldrich, ABD) çözeltisi ile enzimatik reaksiyona maruz bırakıldı. DMEM + %10 FCS (Fetal Calf Serum, Biological Industries, ABD) + antibiyotik içeren (Penisilin-Streptomisin, Sigma-Aldrich, ABD) glia kültür besiyeri eklenerek tripsin nötralize edildi ve ardından oda sıcaklığında 200 x g'de 6 dakika süreyle santrifüj edildi. Çökelti sulandırılarak hemositometrede hücre sayımı yapıldı,  $2 \times 10^5$  yoğunlukta olacak şekilde tekrar sulandırıldı. Trypan blue ile boyanarak canlı hücre oranı belirlendi ve 6 kuyulu steril hücre kültürü plağına ekim yapıldı. Hücreler yukarıda belirtilen glia kültür besiyeri içinde, %5 CO<sub>2</sub> ve %96 nemli hava içeren ortamda çoğaltıldı. Hücre hatları canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak izlendi ve 2-3 günde bir besiyerleri değiştirildi. Yaklaşık 7 günde tüm zemi ni kaplayacak kadar çoğalarak deney için uygun hale geldi.

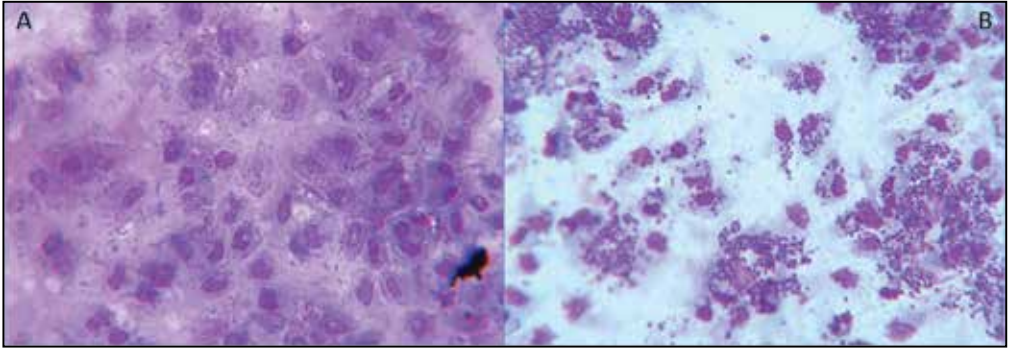
### Primer Hücre Kültürünün *Leishmania tropica* Promastigotları ile Enfeksiyonu

Yeterli yoğunluğa ulaşan astroglia hücreleri antimona dirençli *L.tropica* promastigotları ile enfekte edildi. Altı çukurlu steril hücre kültürü plağında her bir çukurun tabanını kaplamış olan glia hücreleri üzerine  $2 \times 10^6$ /çukur sayıda olacak şekilde promastigotlar

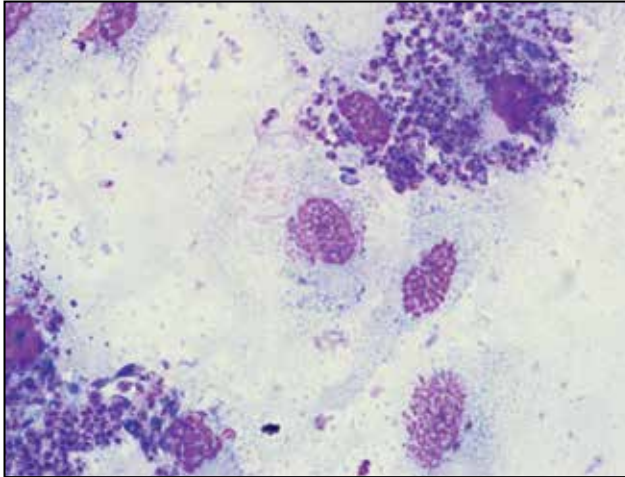
eklendi. Yirmi dört saat inkübasyondan sonra, hücrelerin üzerinde bulunan üst sıvı toplandı, 1500 rpm'de santrifüj edilerek dipteki çökeltiden yayma preparatlar hazırlanarak metil alkol ile fikse edildi ve Giemsa boyası ile boyanarak parazitin promastigot formu arandı. Hücre kültür plağı oda sıcaklığında kurutulduktan sonra metil alkol ile fikse edildi ve Giemsa boyası ile boyanarak parazitin amastigot formu arandı.

## BULGULAR

*L.tropica* promastigotları ile enfekte edilen primer hücre kültürlerinde glia hücreleri içerisinde amastigotlar yoğun şekilde tespit edilmiştir (Resim 2,3). Enfekte edilen plaklardan uzaklaştırılan sıvı besiyerinin santrifüjü sonrası dip çökeltiden hazırlanan yaymaların Giemsa boyalı preparatlarında promastigot forma rastlanmamıştır.



**Resim 2.** A) Enfekte edilmemiş plakta glia hücreleri, B) Enfekte edilmiş plakta glia hücreleri içerisinde *L.tropica* amastigotları (Giemsa boyası, 400x büyütme).



**Resim 3.** Enfekte edilmiş plakta glia hücreleri içerisinde *L.tropica* amastigotları (Giemsa boyası, 1000x büyütme).

## TARTIŞMA

Leşmanyazisin konvansiyonel tedavisinde beş değerlikli antimon bileşikleri, pentamidin ve amfoterisin B olmak üzere üç seçenek bulunmaktadır. Beş değerlikli antimon bileşikleri düşük maliyet ve yüksek kür oranları nedeniyle ciddi kardiyak, hepatik, pankreatik ve renal toksisitelere rağmen halen tercih edilmektedirler. En az üç hafta süreyle her gün uygulanma gerekliliği ve kas içi enjeksiyonlarında lokal ağrı, bulantı-kusma, ishal, halsizlik, kas ağrıları, deri döküntüleri gibi yan etkilerin görülmesi beş değerlikli antimon bileşiklerinin uygulanmasında sorunlar oluşturmaktadır<sup>10</sup>. Beş değerlikli antimonların yaygın kullanıldığı Hindistan, İran ve Peru gibi leşmanyazisin endemik olduğu bölgelerde dirençli izolatların giderek daha çok görüldüğü bildirilmektedir<sup>11,12</sup>. Belirtilen nedenlerle leşmanyazis tedavisinde yeni ajanların geliştirilmesi gerekmektedir.

Yeni tedavi seçenekleri in-vitro ortamda üretilen promastigotlar üzerinde, enfekte edilen deney hayvanlarında in-vivo ortamdaki amastigotlar üzerinde ve ex-vivo ortamda primer hücre serilerinde oluşturulan amastigotlar üzerinde değerlendirilmektedir. İn-vitro yöntem; parazitin promastigot formunun kullanılıyor olması nedeniyle insanda oluşan enfeksiyonu yansıtmada yetersiz kalmaktadır. İn-vivo yöntemde parazitin amastigot formu kullanılmakla birlikte, konak faktörü ile ilişkili olarak uyumsuz sonuçlar alınabilmektedir. Farelerde ve insanlarda *Leishmania* türleri ile oluşan enfeksiyonlara karşı duyarlılık farklı genetik mekanizmalar ile düzenlenmektedir<sup>13</sup>. Dolayısıyla fare modelleri ile kurgulanan modellerde farenin genetik alt yapısı deney sonuçlarını etkileyebilmektedir.

*Leishmania* türlerine karşı ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde bir ex-vivo yöntem olan amastigot-makrofaj modeli altın standart olarak kabul edilmektedir<sup>5,6</sup>. Ancak bu yöntemle yapılan çalışmalarda klinik yanıt ile uyumsuz sonuçlar elde edildiğine dair yayınlar mevcuttur. Soleimanifard ve arkadaşları<sup>7</sup> tedaviye yanıtız 10 olgudan elde edilen amastigotlar ile yaptıkları çalışmada olguların tümünde ex-vivo olarak tedaviye yanıt alındığını bildirmiş ve bu durumun olgularda tedavinin uygulanması sırasında meydana gelen eksikliklerden kaynaklandığını saptamıştır.

Klinik yanıt ile amastigot-makrofaj modeli arasındaki uyumsuzluk *Leishmania* türlerinin konak vücudunda makrofaj dışında bir yerleşme alanının olabileceğini akla getirmektedir. Bu çalışmada beş değerlikli antimon tedavisine yanıt alınamayan bir kutanöz leşmanyazisli hastadan elde edilen promastigotların sıçan glia hücrelerini enfekte ederek amastigot formuna dönüştüğü gösterilmiştir. Oluşturulan bu amastigot-glia hücre modeli bildiğimiz kadarıyla *L.tropica* ile ilgili literatürdeki ilk modeldir. Glia hücreleri içerisinde *L.tropica* amastigot formunun oluşabiliyor olması *Leishmania* türlerinin santral sinir sistemini enfekte edebileceğinin göstergesi olabilir. Abreu-Silva ve arkadaşları<sup>14</sup> yaptıkları çalışmada *Leishmania amazonensis* ile enfekte farelerin beyin parankimlerinde amastigot içeren makrofajları göstermiştir. Oliviera ve arkadaşları<sup>15</sup> doğal olarak enfekte köpeklerde yaptıkları nekropsis çalışmasında santral sinir sisteminde *Leishmania infantum* varlığını tespit etmiştir. Bu çalışmalarda da kanıtlandığı gibi tedaviye yanıt alınamayan leşmanyazis olgularında, santral sinir sistemi *Leishmania* amastigotlarının immün sistemden kaçması

için uygun bir alan olarak gözükmektedir. Bu çalışma, glia hücrelerinin *L.tropica* amastigotları ile enfeksiyonunu gösteren ilk çalışma olması nedeniyle önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Von Stebut E. Leishmaniasis. J Dtsch Dermatol Ges 2015; 13(3): 191-200.
2. Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. Asian Pac J Trop Med 2016; 9(10): 925-32.
3. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries 2015; 9(6): 588-96.
4. Copeland NK, Aronson NE. *Leishmaniasis*: treatment updates and clinical practice guidelines review. Curr Opin Infect Dis 2015; 28(5): 426-37.
5. Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. PLoS Med 2006; 3: e162.
6. Berman JD, Chulay JD, Hendricks LD, Oster CN. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony in vitro. Am J Trop Med Hyg 1982; 31: 459-65.
7. Soleimanifard S, Arjmand R, Saberi S, Salehi M, Hejazi SH. Treatment outcome of the drug-resistant zoonotic cutaneous leishmaniasis by glucantime. Adv Biomed Res 2017; 6: 17.
8. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. J Cell Biol 1980; 85 (3): 890-902.
9. Yılmaz ÖA, Taşkıran D, Aydar S. Cytotoxicity in cytokine stimulated astrocyte cultures: role of IL-6 and nitric oxide. Neurosci Res Commun 2004; 34(2): 82-91.
10. Zucca M, Scutera S, Savoia D. New chemotherapeutic strategies against malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. Curr Med Chem 2013; 20(4): 502-26.
11. Sundar S, More DK, Singh MK, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. Clin Infect Dis 2000; 31(4): 1104-7.
12. Le Pape P. Development of new antileishmanial drugs--current knowledge and future prospects. J Enzyme Inhib Med Chem 2008; 23(5): 708-18.
13. Loeuillet C, Banuls AL, Hide M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. Parasit Vectors 2016; 9: 144.
14. Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Tedesco RC, Mortara RA, Gonçalves Da Costa SC. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Am J Trop Med Hyg 2003; 68(6): 661-5.
15. Oliveira VdC, Boechat VC, Mendes Junior AAV, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. PLoS ONE 2017; 12(4): e0175588.