

Leishmania tropica'nın Yeşil Floresan Protein (*gfp*) Geni ile Transfeksiyonu ve In Vitro İlaç Etkisinin Araştırılması

Transfection of *Leishmania tropica* with Green Fluorescent Protein (*gfp*) Gene and Investigation of the In Vitro Drug Effect

Hatice ERTABAKLAR¹, Serçin Özlem ÇALIŞKAN², Bala KOLLI³, Sema ERTUĞ¹, Ahmet ÖZBİLGİN⁴, Erdoğan MALATYALI¹, Kwang Poo CHANG³

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

¹ Adnan Menderes University, Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Aydın, Turkey.

² Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Uşak.

² Uşak University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Uşak, Turkey.

³ Rosalind Franklind Üniversitesi, Chicago Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve İmmünoloji Anabilim Dalı, Illinois.

³ Rosalind Franklind University, Chicago Medical School, Department of Microbiology and Immunology, Illinois, USA.

⁴ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

⁴ Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Manisa, Turkey.

* Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje no: TPF-14002) desteklenmiştir.

Makale Atfı: Ertabaklar H, Çalışkan SÖ, Kollı B, Ertuğ S, Özbilgin A, Malatyali E, Chang KP. *Leishmania tropica*'nın yeşil floresan protein (*gfp*) geni ile transfeksiyonu ve in vitro ilaç etkisinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2019;53(2):213-223.

ÖZ

Kutanöz leishmaniyazis (KL) vektör kum sinekleri (*Phlebotomus*, *Lutzomyia*) tarafından bulaştırılan, deride uzun süre geçmeyen yaralar ile karakterize, etkeni *Leishmania* türleri olan bir protozoon parazit hastalığıdır. Türkiye'de Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yaygın görülen enfeksiyon etkeninin sıklıkla *Leishmania tropica* olduğu bilinmektedir. Ülkemizde göçler, artan seyahatler, sosyoekonomik düzeyin düşüklüğü ve ekolojik değişikliklerle birlikte olgu sayıları da gün geçtikçe artmaktadır. Tedavide sıklıkla beş değerli antimon bileşikler intralezyoner olarak kullanılmakta ve son yıllarda dirençli olguların arttığı bildirilmektedir. Mevcut ilaçların yan etkileri, direnç gelişimi, toksik reaksiyonlar gibi nedenlerle yeni tedavi yöntemleri ve anti-leishmanyal etkinliği olan yeni ilaçlar araştırılmaktadır. Bu araştırmalar öncelikle in vitro daha sonra in vivo deneysel modeller üzerinde yapılmaktadır. Raportör gen teknolojisinin son yıllarda mikroorganizmalarda biyolojik olayları irdelemek, ilaçların etkinlik ve direnç araştırmaları olmak üzere değişik amaçlarla kullanıldıkları bilinmektedir. Yeşil floresan proteinin (*gfp*) önemli kullanım alanları, farklı genlerin içerisinde eklenerek bu genlerin farklı organizmalardaki ekspresyonlarının miktarının tayininde ve canlı hücreler içerisinde işaretleyici olarak kullanılabilmesidir. Bu proteini kodlayan *gfp* geni günümüzde oldukça sık kullanılmaktadır. Gen tabanlı analizlerin izlem kolaylığı, düşük maliyet ve gelişmiş biyogüvenlik dahil olmak üzere çeşitli avantajlarının olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada, *L.tropica*'nın "enhanced *gfp* (*egfp*)" ile transfeksiyonu ve konvansiyonel yöntemlere kıyasla bir ilaç tarama modeli

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Hatice Ertabaklar, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye. Tel (Phone): +90 505 605 5541, E-posta (E-mail): ertabaklarhatice@gmail.com

olarak *gfp*-transfektanların in vitro olarak yararlılığını göstermek amaçlanmıştır. *L.tropica* promastigotları, elektroporasyon yöntemiyle p6.5/*egfp* ile transfekte edilmiş ve tunikamisin direnci ile seçilmiştir. Elde edilen *gfp* transfekte *L.tropica* promastigotları ile in vitro meglumin animoniat etkisi floresan mikroskopisi, florometre ve XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid) testi ile farklı yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Potansiyel anti-leyşmanyal etkinin değerlendirilmesi için *Leishmania* izolatının *gfp* ile transfekte edilerek floresan mikroskopisi ve florometri kullanılmasının geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve hassas olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, *gfp*-transfekte *Leishmania* türlerinin kullanımı in vitro ve in vivo anti-leyşmanyal ilaç araştırmaları ve aşı geliştirilmesi gibi hücresel düzeyde konak-parazit etkileşiminin biyolojisini anlamaya yardımcı olacaktır. Bu çalışma ile ülkemizde izole edilen *L.tropica* izolatları için daha sonra yapılacak araştırmalarda kullanılacak *gfp* transfekte modeli oluşturulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Leishmania tropica*; yeşil floresans protein; gen klonlama; meglumin animoniat.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a parasitic disease transmitted by vector sand flies *Phlebotomus* and *Lutzomyia*. This disease is characterized by long time non-healing skin lesions, and caused by *Leishmania* species. CL is the most common infection in Eastern and Southeastern Anatolia in Turkey and *L.tropica* is known as the main agent of the disease. Number of cases is increasing in our country in time because of malnutrition, migration, travel, low socioeconomic level and ecological changes. For the treatment, the pentavalent antimonials are often used as intralesionally for many years, and it was reported that resistant cases have increased in recent years. New treatment methods and anti-Leishmanial activity of new agents have been investigated because of side effects, resistance development and toxic reactions of the present drugs. These studies are first carried out in vitro and afterwards with in vivo experimental animal models. Reporter gene technology has been used to investigate a variety of purposes like biological events in microorganisms and the efficacy and resistance of drugs in recent years. The major areas that green fluorescent protein (*gfp*) used are that they can be incorporated into different genes to determine the amount of expression of these genes in different organisms and can be used as markers in living cells. Especially *gfp* gene, which encodes the green fluorescent protein, is widely used nowadays. Gene-based assays have several advantages like being easy to follow-up, inexpensive and have improved biosecurity. The aim of the present study was to perform the transfection of *L.tropica* with "enhanced *gfp* (*egfp*)" and in vitro usefulness of *gfp*-transfectants as a drug screening model in comparison to the conventional methods. Promastigotes of *L.tropica* were transfected with p6.5/*egfp* by electroporation and selected for tunicamycin-resistance as previously described. *L.tropica* promastigotes transfected with *gfp* and in vitro effect of meglumine animoniate was assessed using different methods such as fluorescence microscopy, fluorometer and XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide) assay. The use of *gfp*-transfected *Leishmania* strains was found more rapid and more sensitive by fluorescent microscopy and fluorometry than conventional assays for the evaluation of potential anti-leishmanial agents. Consequently, stable *gfp*-transfected *Leishmania* species will be used in vitro and in vivo for screening of anti-leishmanial drugs and vaccine development as well as for understanding the biology of the host-parasite interactions at the cellular level. As a result of this study, *gfp* transfected model using a Turkish *L.tropica* isolate was established to be used in further studies.

Keywords: *Leishmania tropica*; green fluorescent protein; gene cloning; meglumine animoniate.

GİRİŞ

Leişmanyazis, vektör kum sinekleri (*Phlebotomus*, *Lutzomyia*) tarafından bulaştırılan memeli konakta hücre içinde bulunan *Leishmania* türlerinin oluşturduğu bir grup protozoon hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporlarına göre leişmanyazis en ciddi enfeksiyon hastalıkları sıralamasında dokuzuncu sırada yer almakta ve her yıl *Leishmania* türleri ile enfekte iki milyon yeni olgunun ortaya çıktığı bildirilmektedir^{1,2}. Klinik tablo,

enfeksiyona neden olan *Leishmania*'nın türüne, kişinin bağışıklık durumuna göre değişmekte, deri, mukozalar ve iç organ tutulumu görülebilmektedir. Türkiye'de kala-azar (viseral leşmanyazis, VL) ve kutanöz leşmanyazis (KL) olmak üzere iki klinik form görülmektedir. Halk arasında "Şark çıbanı" olarak bilinen KL özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, batıda ise Aydın'da endemik olarak görülmektedir. Ülkemizdeki en sık KL etkeni *Leishmania tropica* olup nadiren *Leishmania major* ve *Leishmania infantum*'un da etken olabildiği bildirilmektedir^{3,4}.

Leşmanyazisin günümüzde insanlarda etkin aşısı bulunmamakta ve tedavisinde birincil olarak pentavalan antimon bileşikleri ve miltefosin, ikincil olarak ise amfoterisin B ve pentamidin önerilmektedir⁵. Bu ilaçların sistemik olarak uygulandığında toksik ve ciddi yan etkilere yol açtıkları bilinmektedir. Ayrıca, son yıllarda bu ilaçlara karşı dirençli olgularda artış olduğu da bildirilmektedir⁶. Günümüzde bu nedenlerle standart ilaçlara alternatif olabilecek yeni kimyasal, bitkisel maddelerin anti-leşmanyal etkinlikleri araştırılmaktadır.

Özellikle yeni moleküllerin etkinliğinin araştırılması amacıyla in vitro çalışmalarda parazitlerin promastigot formları tercih edilebilmektedir. Deneylerde özellikle antiparaziter etkinliğin araştırıldığı çalışmalarda parazitler sayılarak, değişik hücre canlılığı ölçen kitler, boyalar kullanılarak etkinlik deneyleri yapılmaktadır. Son yıllarda floresan protein kodlayan genler kullanılarak elde edilen transgenik mikroorganizmaların deneysel çalışmalarda kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu organizmalar ile çalışmanın canlı hücre ve organizmalardaki dinamik değişimleri anında gözleme olanağı sağlaması, dışarıdan bir substrata ihtiyaç göstermemesi, hücre ve dokuyu tahrip edici olmaması, in vivo ortamda gözlem yapmanın sürekli ve kolay olması gibi avantajları olduğu bildirilmektedir. Bunlardan yeşil floresan protein (*gfp*) raportör geni son yıllarda özellikle tercih edilmektedir. Rekombinant *gfp* gen transfeksiyonu günümüze kadar bakteriler, nematodlar, böcekler ve memeli hücreleri gibi birçok canlıda eksprese edilebilmiştir^{7,8}.

Leishmania türlerinin in vitro ilaç araştırmalarında *gfp* transfekte parazitlerin son yıllarda artan bir şekilde tercih edildiği görülmektedir. Transfekte parazitlerin konak parazit etkileşiminin anlaşılmasında, ilaç etki değerlendirilmesinde veya yeni moleküllerin etkinliğinin araştırılmasında kullanıldığı bildirilmektedir. Etkinlik değerlendirmelerinde floresan yayan parazitler akım sitometri, göz ile veya florometre ile değerlendirilebilmektedir^{9,10}.

Bu çalışmada, *gfp* genini içeren plazmid vektörünün ilk kez ülkemizde görülen KL etkeni olan *L. tropica* promastigotlarına aktararak *gfp* transfekte promastigotların elde edilmesi ve bu parazitlerin in vitro olarak meglumin antimoniat etkisinin değerlendirmesi deneyinde kullanılarak ilaç etkinliğinin floresan mikroskopisi, florometre ve XTT testi gibi farklı yöntemler kullanılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Parazitin Üretilmesi

Çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına *Leishmania* şüphesi ile başvuran ve tanı alan bir hastadan izole edilen ve DNA dizi analizi sonucu *L.tropica* olduğu belirlenen bir *Leishmania* paraziti kullanıldı. Sıvı azotta saklanan bu parazitler çalışma öncesi 56°C'de bir iki dakika çözüldükten sonra %10 fetal dana serumu (FCS) eklenmiş RPMI 1640 besiyerine aktarıldı ve 26°C'de logaritmik faza giren parazit çoğaltılarak çalışma için kullanıldı.

Leishmania'nın Elektroporasyon Yöntemi ile Plazmid Aktarılması

Transfeksiyon için, geç-logaritmik fazda üretilen parazitler, +4°C'de, 4500 xg'da 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra iki kez soğutulmuş elektroporasyon tamponu (21 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 150 µM CaCl₂, 120 mM KCl, 0.7 mM NaH₂PO₄, 6 mM glukoz) ile yıkandı. Parazit süspansiyonundan 300 µl (~3 x 10⁷ hücre) alınarak 0.2 cm'lik BioRad elektroporasyon küvetinde pipetleme yapılarak her küvete 10-20 µg p6.5-*egfp* eklendikten sonra 0.45 kW ve 500 µF'da GenePulser (BioRad, ABD) cihazı ile elektroporasyon gerçekleştirildi. Elektroporasyondan hemen sonra hücreler 3 ml taze besiyerine alınıp 6-9 saat inkübe edildi. Plazmidin aktarılmış olduğu hücrelerin seçilmesi için üç farklı konsantrasyonda tunikamisin (1.25 µg; 2.5 µg; 5.0 µg) içeren besiyerine ekim yapıldı. Hücreler canlılık ve üreme için her gün mikroskopik olarak takip edildi.

Leishmania tropica Promastigotları Üzerinde İn Vitro Meglumün Antimonat Etkisinin Araştırılması

Meglumün antimonatın seri dilüsyonları (200, 100, 50, 25 ve 12.5 µg/ml) *Leishmania* besiyeri (RPMI 1640, %15 FCS) içinde 24 çukurlu düz tabanlı hücre kültürü plaklarında her bir dilüsyondan üç adet olacak şekilde hazırlandı. Logaritmik fazdaki *L.tropica* promastigotları (1 x 10⁶/ml) her bir çukura 1 ml olacak şekilde eklenerek 26°C'de 72 saat inkübe edildi. Süre sonunda ilaçların *L.tropica* promastigotları üzerine etkisi; parazit sayısı ışık mikroskopunda hemositometre ile sayılarak floresan mikroskopunda belirli aralıklarla analiz edilmek suretiyle değerlendirildi. Deney üç kez tekrarlandı. Kontrol olarak ilaç eklenmemiş besiyeri kullanıldı.

XTT (2,3,-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-kaboksanilit tuzu) Testi

Canlı hücre mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimi ile parçalanması durumunda çözülebilir formazana dönüşen XTT, suda çözünen bir tetrazolyum tuzudur. Formazanın oluşturduğu turuncu renk yoğunluğu metabolik olarak canlı hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Örnekler 96'lık plaklarda XTT (2,3,-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-kaboksanilit tuzu) çözeltisi kullanılarak spektrofotometrik olarak "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" yöntemi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı yüz-

desi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılmasıyla hesaplandı.

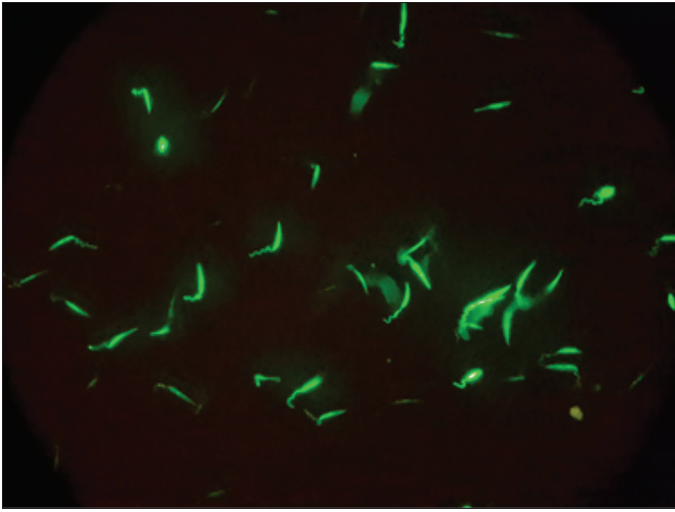
Florometre ile Meglumin Antimonatın Etkisinin Değerlendirilmesi

Meglumin antimonatın seri dilüsyonlarını içeren 24 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plakları inkübasyon sonrası florometre cihazı (Thermo Fischer Scientific, ABD) ile değerlendirildi. Meglumin antimonatın etkinliği canlı hücrelerin 26-26.5°C'deki yoğunluğunun cihazda belirecek olan ışımaya bağlı olarak değerlendirildi.

BULGULAR

L.tropica promastigotlarının *gfp* geni ile transfekte işleminin başarıyla gerçekleştiği floresan mikroskobunda gösterilmiştir (Resim 1).

Uygulanan in vitro ilaç direnç testlerinin 72 saatteki sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda ilaçsız kontrol grubundaki *L.tropica* promastigotların sağlıklı olduğu ve üremelerine devam ettiği görülürken, meglumin antimonatın 25 µg/ml ve



Resim 1. Klonlanan *Leishmania tropica* promastigotların floresan mikroskobunda görünüşü.

Tablo 1. İvert Mikroskop ile Elde Edilen Sonuçlar

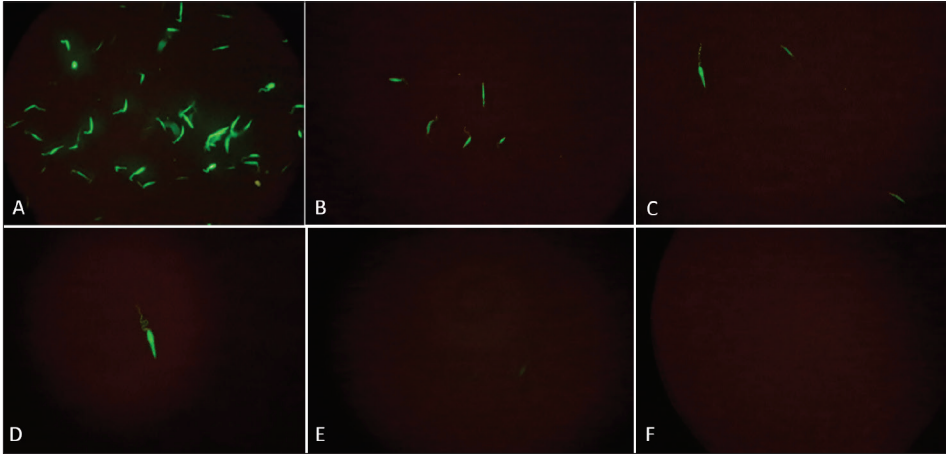
	Meglumin antimonat konsantrasyonları (µg/ml)					Parazit kontrol
	200	100	50	25	12.5	
Parazit sayısı	-	-	±	+	++	+++
Hareket	-	-	*	**	***	***

Parazit sayısı; -: Parazit yok, ±: Tüm sahada 1-2 parazit, +: Az yoğun, ++: Orta yoğun, +++: Çok yoğun.
Hareket; -: Hareketsiz, *: Çok yavaş hareketli, **: Yavaş hareketli, ***: Hareketli.

12.5 µg/ml dozunda canlı parazitlere rastlandığı, ancak konsantrasyon arttıkça hiç canlı parazitin görülmediği izlenmiştir.

Floresans mikroskopu sonuçlarına göre ilaçsız kontrol grubunda canlı ve hareketli parazitler tespit edilirken, 100 ve 200 µg/ml gibi meglumin antimonatın yüksek konsantrasyonlarında hiç canlı parazite rastlanmamıştır ve bu bulgular invert mikroskop sonuçlarıyla desteklenmiştir (Resim 2).

L. tropica promastigotları üzerinde meglumin antimonatın 72 saat sonundaki XTT sonuçları Tablo II, III'te gösterilmiştir. Canlılık yüzdelerinin meglumin antimonat konsantrasyonu arttıkça düştüğü tespit edilmiştir.



Resim 2. Farklı konsantrasyonlardaki meglumin antimonatın etkileri. A. Kontrol grubu, B. 12.5 µg/ml, C. 25 µg/ml, D. 50 µg/ml, E. 100 µg/ml, F. 200 µg/ml meglumin antimonat konsantrasyonları (µg/ml).

Tablo II. XTT Testi Sonrası Absorbans Değerleri (OD)

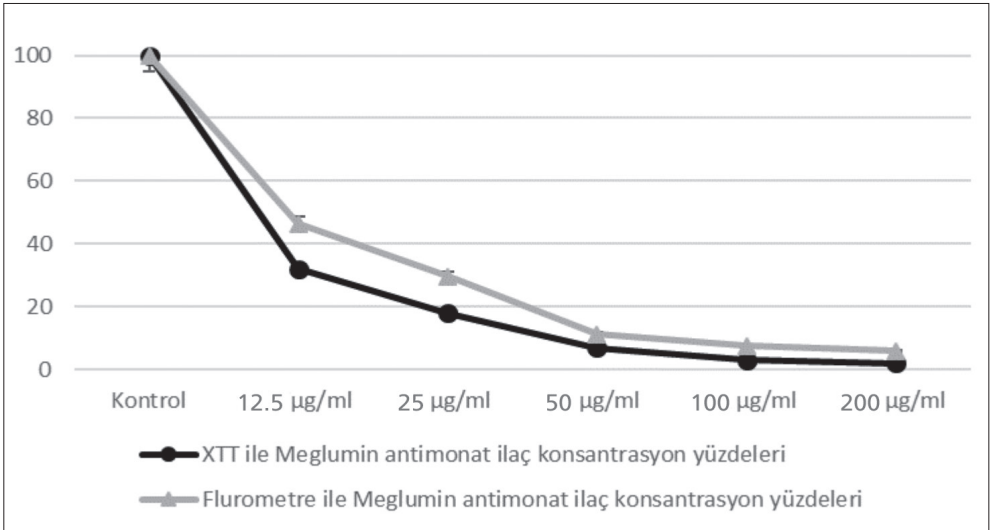
	Kontrol	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
	1.512	0.476	0.265	0.108	0.051	0.037
	1.534	0.498	0.279	0.102	0.048	0.035
	1.509	0.472	0.265	0.095	0.054	0.039
Ortalama OD değerleri	1.518	0.482	0.270	0.102	0.051	0.037
Sds değerleri	0.013	0.014	0.008	0.006	0.003	0.002

Tablo III. XTT Testi Sonrası Hücre Canlılığı

	Kontrol	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
% Hücre canlılığı	100	32	18	7	3	2

Tablo IV. Florometre ile Okunan *gfp* Absorbans Değerleri (OD)

	Kontrol	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	Blank
	1.312	0.576	0.365	0.168	0.090	0.067	0.000
	1.234	0.598	0.379	0.132	0.102	0.075	0.000
	1.209	0.572	0.365	0.125	0.089	0.081	0.000
Ortalama OD değerleri	1.252	0.582	0.370	0.142	0.094	0.074	0.000
Sds değerleri	0.053	0.014	0.008	0.023	0.007	0.007	0.000

**Şekil 1.** XTT ve florometrede okunan hücre canlılığı yüzdeleri.

Florometre ile tespit edilen sonuçlar Tablo IV'te ve Şekil 1'de gösterilmiştir. Tablo IV ve Şekil 1'de görüldüğü gibi *gfp* geni içermeyen blank parametresinde ölçüm boyunca ışığa vermemiştir. Meglumine antimonat konsantrasyonu arttıkça ışığa miktarı azalmıştır.

TARTIŞMA

L.tropica'nın deride lokalize KL etkeni olmakla birlikte zaman zaman viseral hale geçerek iç organ tutulumu yapabildiği de bilinmektedir. KL'nin tedavisinde lezyonun yeri, şiddeti, sayısı ve kişinin immün durumuna bağlı olarak, intralezyoner tedavi, topikal tedavi, sistemik ilaç tedavisi veya fiziksel yöntemlerden herhangi biri ya da birkaçı birlikte uygulanmaktadır^{5,11}.

Günümüzde kullanılan yöntemlere alternatif tedavi arayışları devam etmekte ve bu amaçla yeni kimyasal, bitkisel ajanlar ile pek çok araştırma yapılmaktadır. Leyşmanyazisin kontrolü amacıyla gerekli olan yeni terapötiklerin geliştirilmesi için araştırmalar öncelikle

deneysel olarak hem in vitro hem de in vivo modeller üzerinde yapılmaktadır. İn vivo çalışmalar, hücre içi amastigotlar ve hayvan modelleri gerektirdiğinden daha zor ve zahmetlidir. Çok sayıda ilacın veya etken maddenin hızlı bir şekilde test edilmesini kolaylaştırmak için tasarlanan çalışmalar, parazitin promastigot formlarında denetlenmektedir. Bu amaçla kültürde üretilen promastigotlar veya son yıllarda laboratuvarında oluşturulan lusiferaz veya *gfp* gibi transgenik hale getirilen *Leishmania* türleri kullanılmaktadır¹²⁻¹⁴.

Raportör gen teknolojisi, in vitro kültür sistemleri altında hücre büyüme çoğalmasını, gen ekspresyonu ve sinyal iletimi ile bağlantılı hücresel olayları izlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, *gfp* kullanılarak yapılan analizlerin diğer raportör olmayan veya raportör gen tabanlı analizlere göre daha basit, daha kolay kinetik izleme, düşük maliyet ve gelişmiş biyogüvenlik dahil olmak üzere çeşitli avantajları olduğu belirtilmektedir¹⁵⁻¹⁷. Birçok hücre içi mikroorganizmada *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi* ve *Toxoplasma gondii*'ye ait raportör genlerin kullanımının, antimikrobiyal ilaç testlerinin keşfini kolaylaştırdığı bilinmektedir¹⁸⁻²⁰. Aynı strateji ile *Leishmania* türlerinde de *gfp* transfekte suşlar ilaç etkinliği araştırmalarında son yıllarda pek çok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir^{21,22}.

Sing ve Dube¹⁵, 2004 yılında *gfp* geni ile transfekte *Leishmania donovani* promastigotlarıyla yaptıkları çalışmada literatürde belirtilen miltefosin etkinliğinin standart yöntemle göre daha hızlı, daha kolay, daha güvenli bir şekilde değerlendirilebildiğini göstermişlerdir. Vareola ve arkadaşlarının²³ 2009 yılında *gfp* geni ile transfekte edilmiş *L.panamensis* promastigotları ile yaptıkları bir başka çalışmada ise anti-leyşmanyal ilaçlardan olan amfoterisin B ve meglumin antimonatın artan ilaç konsantrasyonları uygulandıktan sonra *gfp* ışımalarının her iki ilaç için de hücrelerde azaldığı bildirilmiştir. Latorre-Estevés ve arkadaşlarının²⁴ 2010 yılında yaptıkları çalışmada, *gfp* geni ile transfekte *L.major* ile farelerin kulaklarında geliştirilen deneysel KL lezyonlarında tedavi sürecinin floresans miktarındaki azalmayla sonuçlandığı görülmüştür. Tedavi sonrası parazit yükü azaldıkça floresans miktarında azalma saptanmıştır. Bastose Silva ve arkadaşlarının¹⁷ 2017 yılında *L.braziliensis* ile yaptıkları çalışmada ise, *gfp* geni ile transfekte *L.braziliensis* promastigotlarının leşmanyazise karşı potansiyel olarak etkili olan ilaçları taramak için kullanılmasının ekonomik yönden alternatif olduğu ve standart yöntemlere göre daha duyarlı ve hızlı olduğu bildirilmiştir.

Literatürde *gfp* genini eksprese eden *L.tropica* ile geliştirilmiş in vitro ve in vivo meglumin antimonat ilaç etkinlik çalışmasına rastlanmamıştır ancak *L.tropica* ve *Leishmania*'nın diğer türlerinde (*L.major*, *Leishmania amazonensis*, *L.donovani* ve *L.infantum*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania mexicana*) *gfp* geni ile farklı ilaçlara (amfoterisin B ve miltefosin) ait tarama testleri ve farklı fiziksel yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar bulunmaktadır^{15,16,25-27}.

Leyşmanyazise tedavisi için anti-leyşmanyal aktivitesi olan güçlü ve basit yöntemlerin geliştirilmesi, potansiyel etkin maddelerin değerlendirilmesi ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Parazitin hücre içi formlarının görüntülenmesi için florometreye dayanan yöntemlerin kullanılması raportör bir gen olarak *gfp*'yi tanımlayan genetik olarak dönüştürülmüş parazitlerin bileşenlerini göstermede en iyi sonuç veren yöntemlerden biridir. Yapılan literatür araştırmasında *gfp* eksprese eden *L.tropica* ile geliştirilmiş in vivo çalışma bulunamamakla birlikte, bu çalışma *L.tropica*'da *gfp* kullanılarak yapılan deneysel model çalışmalarının yapılmasına imkan sağlayacaktır.

Florometre sonuçları XTT testi ile karşılaştırıldığında canlılık yüzdelerinin birbiriyle uyumlu olduğu, florometrenin daha özgül, hassas ve hızlı değerlendirme imkanı sağladığı gösterilmiştir. Canlılık testi olan XTT ile işlem sonrası en az dört saatlik bir bekleme süresi gerekli iken florometre ve floresan mikroskopisi için bu süreler gereksinim bulunmamaktadır. Buna karşın, XTT ve florometre ile sayısal değerler elde edilmesi çalışmada değerlendirme ve karşılaştırma olanağı sunmaktadır. Böylece *gfp* transfekte parazitler kullanılarak yapılan etkinlik çalışmalarında, canlılık testlerine ihtiyaç duyulmadan, doğrudan florometre veya floresan mikroskopisi ile hızlı, kolay ve güvenilir bir değerlendirme olanağı sunmakta olan bu yöntemlerden birisi veya birkaçının olanaklar ölçüsünde kullanılabilmesi düşünülmüştür.

Leishmania türlerinin morfolojik olarak aynı görünmelerine, genetik ve ekspresyon profillerinin düşük değişkenlik göstermesine rağmen, türe özgü özellikleri konaktaki virülansını ve patojenitesini oldukça yüksek bir düzeyde etkilemektedir²⁸. Ayrıca türler ve suşlar arasında bile ilaç ve aşı çalışmalarında farklılıklar olduğu bildirilmektedir⁶. Bu çalışmanın özellikle ülkemizden izole edilen bir *L.tropica* izolatu ile gerçekleştirilmesi oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışma ile, Türkiye'den izole edilen *L.tropica* izolatu *gfp* transgenik hale getirilmiş ve in vitro ve in vivo çalışmalarda kullanım olanağı sağlanmıştır. Bu model ile ülkemizde bulunan laboratuvarlarda tedavide yer alabilecek yeni moleküllerin anti-leişmanyal etkinlik araştırmalarında kullanılması ve parazitin immünolojisi, patogenezi gibi alanlarda çalışılması mümkün olacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Hotez N, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of neglected tropical diseases. N Engl J Med 2007;357(10):1018-27.
2. Meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis, WHO Technical Reports Series 949, Geneva: WHO, March (2010).
3. Gürel MS, Yeşilova Y, Olgen MK, Ozbel Y. Cutaneous leishmaniasis in Turkey. Turkiye Parazit Derg 2012;36(2):121-9.
4. Ertabaklar H, Ertuğ S, Çalışkan SÖ, Bozdoğan B. Determination of *Leishmania* species by PCR-RFLP in the smear samples taken from the lesions of cutaneous leishmaniasis cases. Mikrobiyol Bul 2016;50(2):300-6.
5. Zucca M, Savoia D. Current developments in the therapy of protozoan infections. Open Med Chem J 2011;5(1):4-10.

6. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002;8(4):319-42.
7. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994;263(5148):802-5.
8. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* 2010;90(3):1103-63.
9. Bolhassani A, Taheri T, Taslimi Y, Zamanilui S, Zahedifard F, Seyed N, et al. Fluorescent *Leishmania* species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Experimental Parasitol* 2011;127(3):637-45.
10. Lang T, Lecoer H, Prina E. Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends Parasitol* 2009;25(10):64-73.
11. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2000;25(5):363-70.
12. Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaisi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 2007;56(1):3-7.
13. Sadeghi S, Seyed N, Etemadzadeh MH, Abediankenari S, Rafati S, Taheri T. In vitro infectivity assessment by drug susceptibility comparison of recombinant *Leishmania major* expressing enhanced green fluorescent protein or EGFP-luciferase fused genes with wild-type parasite. *Korean J Parasitol* 2015;53(4):385-94.
14. Berry SL, Hameed H, Thomason A, Maciej-Hulme ML, Saif Abou-Akkada S, Horrocks P, et al. Development of NanoLuc-PEST expressing *Leishmania mexicana* as a new drug discovery tool for axenic-and intramacrophage-based assays. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12(7):1-20.
15. Singh N, Dube A. Fluorescent *Leishmania*: application to anti-leishmanial drug testing. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71(4):400-2.
16. Singh N, Gupta R, Jaiswal AK, Sundar S, Dube A. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable ex vivo drug screening. *J Antimicrob Chemother* 2009;64(2):370-4.
17. Bastos MS, Souza LÂ, Onofre TS, Silva A Júnior, Almeida MR, Bressan GC, et al. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp *Leishmania braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017;112(2):155-9.
18. Collins LA, Torrero MN, Fravizblau SG. Green fluorescence protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(2):344-7.
19. Buckner FS, Verlinde CL, LaFlamme AC, VonVoorhis WL. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasite expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(11):2592-7.
20. McFadden DC, Seeber F, Boothroyd JC. Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(9):1849-53.
21. Monte-Alegre A, Ouaisi A, Sereno D. *Leishmania* amastigotes as targets for drug screening. *Kinetoplastid Biol Dis* 2006;5:6.
22. Vacchina P, Morales MA. In vitro screening test using *Leishmania* promastigotes stably expressing mCherry protein. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(3):1825-28.
23. Varela MRE, Muñoz DL, Robledo SM, Kolli BK, Dutta S, Chang KP, et al. *Leishmania (Viannia) panamensis*: an in vitro assay using the expression of GFP for screening of antiLeishmanial drug. *Exp Parasitol* 2009;122(2):134-9.
24. Latorre-Esteves E, Akilov OE, Rai P, Beverley SM, Hasan T. Monitoring the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in a murine model of cutaneous *Leishmaniasis* using *L.major* expressing GFP. *J Biophotonics* 2010;3(5-6):328-35.
25. Kamau SW, Grimm F, Hehl AB. Expression of green fluorescent protein as a marker for effects of anti-leishmanial compounds in vitro. *Antimicrob Agent Chemother* 2001;45(12):3654-6.

26. Okuno T, Goto Y, Matsumoto Y, Otsuka H, Matsumoto Y. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing *egfp* or the beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. *Exp Animals* 2003;52(2):109-18.
27. Patel AP, Deacon A, Getti G. Development and validation of four *Leishmania* species constitutively expressing GFP protein. A model for drug discovery and disease pathogenesis studies. *Parasitology* 2014;141(4):501-10.
28. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res* 2001;21(12):2129-42.