

# Dışa Atım Pompa İnhibitörleri ve Antilayşmanyal İlaç Kombinasyonlarının *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum* İzolatlarına Etkisi

## Effects of Efflux Pump Inhibitors and Antileishmanial Drug Combinations on *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* Isolates

Yener ÖZEL<sup>1</sup>(ID), İbrahim ÇAVUŞ<sup>2</sup>(ID), Varol TUNALI<sup>2</sup>(ID), Tülay AKSOY<sup>2</sup>(ID), Mehmet ÜNLÜ<sup>1</sup>(ID), Ahmet ÖZBİLGİN<sup>2</sup>(ID)

<sup>1</sup> Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.

<sup>1</sup> Balıkesir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Balıkesir, Türkiye.

<sup>2</sup> Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

<sup>2</sup> Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Türkiye.

\*Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2023/079 numaralı BAP projesi ile desteklenmiştir.

\*\*Bu çalışma, XLI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (13-17 Kasım 2024, Antalya)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

**Makale Atfı:** Özel Y, Çavuş İ, Tunalı V, Aksoy T, Ünlü M, Özbilgin A. Dışa atım pompa inhibitörleri ve antilayşmanyal ilaç kombinasyonlarının *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum* izolatlarına etkisi. Mikrobiyol Bul 2025;59(1):71-89.

### ÖZ

İnsanlığın karşı karşıya kaldığı en önemli halk sağlığı sorunlarından biri olan ilaç direnci, antilayşmanyal ajan geliştirmede yeni stratejileri ve yaklaşımları zorunlu kılmaktadır. Dışa atım pompa inhibitörleri (DAPI) ve diğer aday ajanlar ile ilgili gelişmeler umut verici olmakla birlikte, mevcut antilayşmanyallerin kullanım sürelerini ve etkinliklerini artırabilme arayışları da devam etmektedir. Bu çalışmada rezperin (REZ), berberin (BER) ve verapamil (VER) olmak üzere üç adet DAPI'nin antilayşmanyallere etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. DAPI'ler, pentostam (PEN) ve miltefosin (MİL)'in, *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum* suşlarına karşı, antilayşmanyal etkinliği sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Minimum parazitisit konsantrasyon (MPK) değerleri invert mikroskopla, IC<sub>50</sub> değerleri ise MTT canlılık tayin yöntemiyle saptanmıştır. Antilayşmanyal etkinlikleri belirlenen DAPI'lerin MİL ve PEN üzerine etkileri dama tahtası (checkerboard) yöntemiyle araştırılmıştır. Antilayşmanyal ilaçlardan MİL ve PEN'in *L.tropica* ve *L.infantum* için MPK değerleri sırasıyla 24 ve 48. saatlerde 64 ve 196 µg/mL olarak saptanmıştır. DAPI'lerden REZ ve BER için MPK değerleri, aynı inkübasyon süreleri için sırasıyla 314 ve 64 µg/mL, VER için 24. saatte 80 µg/mL, 48. saatte ise 40 µg/mL olarak belirlenmiştir. Antilayşmanyallerden MİL'in IC<sub>50</sub> değerleri *L.tropica* ve *L.infantum* için 24 ve 48. saatlerde sırasıyla, 4.91/3.47 ve 4.05/2.91 µg/mL, PEN'in ise aynı inkübasyon sürelerinde sırasıyla, 34.58/59.86 ve 18.48/40.63 µg/mL olarak hesaplanmıştır. DAPI'lerden REZ, BER ve VER'in IC<sub>50</sub> değerleri *L.tropica* için 24/48. saatlerde sırasıyla, 74.05/50.61, 7.27/6.1 ve 12.52/4.53 µg/mL, *L.infantum* için ise 64.52/51.72, 8.21/8.01 ve 11.59/7.69 µg/mL olarak hesaplanmıştır. MİL'in; REZ, BER ve VER ile kombinasyonunda, 24 ve 48 saatlik inkübasyon koşullarında sinerjik etkileşim görülmüştür. PEN'in, REZ ile kombinasyonunda 24. saatte kısmi sinerji, 48. saatte ise sinerji görülürken, BER ve VER

ile kombinasyonunda her iki inkübasyon koşulunda da sinerjik etkileşimler saptanmıştır. Sinerji sonuçları hem *L.tropica* hem de *L.infantum* suşlarında aynı bulunmuştur. Son yıllarda yeni antimikrobiyallerin keşfi-ne yönelik araştırmaların hızının önemli ölçüde azalmasıyla direnç mekanizmalarına etki edebilecek yeni moleküllerin araştırılması zorunlu hale gelmiştir. DAPI'lerin, ilaç direnciyle mücadelede antilayşmanyal ajanların klinik performansını arttırabilecek ve yan etki düzeyini azaltabilecek umut verici bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Antilayşmanyal ilaç direnci; efluks pompası; kutanöz layşmanyaz; viseral layşmanyaz; sinerji.*

## ABSTRACT

Drug resistance, one of the most important public health problems facing humanity, necessitates new strategies and approaches in the development of antileishmanial agents. Although developments regarding efflux pump inhibitors (EPIs) and other candidate agents are promising, the search continues to increase the duration of use and efficacy of existing antileishmanials. The aim of this study was to investigate the antileishmanial effects of three EPIs, namely reserpine, berberine and verapamil. The antileishmanial activities of EPIs, pentostam and miltefosine against *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* strains were determined by broth microdilution method. Minimum parasitocidal concentration (MPC) values were determined by inverted microscope and  $IC_{50}$  values were determined by MTT viability assay method. The effects of EPIs with determined antileishmanial activities on miltefosine and pentostam were investigated by checkerboard method. The MPC values of antileishmanial drugs miltefosine and pentostam for *L.tropica* and *L.infantum* were determined as 64 and 196 µg/mL at 24 and 48 hours, respectively. The MPC values of EPIs reserpine and berberine were determined as 314 and 64 µg/mL for the same incubation times and for verapamil, they were determined as 80 µg/mL at 24 hours and 40 µg/mL at 48 hours. Among anti-leishmanials, the  $IC_{50}$  values of miltefosine were calculated as 4.91/3.47 and 4.05/2.91 µg/mL for *L.tropica* and *L.infantum* at 24 and 48 hours, respectively and that of pentostam were calculated as 34.58/59.86 and 18.48/40.63 µg/mL at the same incubation times, respectively. The  $IC_{50}$  values of EPIs, reserpine, berberine, and verapamil were calculated as 74.05/50.61, 7.27/6.1, and 12.52/4.53 µg/mL for *L.tropica* at 24/48 hours, respectively and 64.52/51.72, 8.21/8.01, and 11.59/7.69 µg/mL for *L.infantum*. When miltefosine was combined with reserpine, berberine or verapamil, synergistic interactions were observed at 24 and 48 hours of incubation. When pentostam was combined with reserpine, partial synergy was observed at 24 hours and synergy was observed at 48 hours. When pentostam was combined with berberine or verapamil, synergistic interactions were observed at both incubation conditions. Synergy results were found to be the same in both *L.tropica* and *L.infantum* strains. In recent years, the speed of research on the discovery of new antimicrobials has significantly decreased and it has become necessary to investigate new molecules that can affect resistance mechanisms. It is thought that EPIs may be a promising approach that can increase the clinical performance of antileishmanial agents and reduce the level of side effects in the fight against drug resistance.

**Keywords:** *Antileishmanial drug resistance; efflux pump; cutaneous leishmaniasis, visceral leishmaniasis; synergy.*

## GİRİŞ

Layşmanyaz, enfekte kum sineklerinin vektörlüğüyle bulaşan *Leishmania* parazitlerinin neden olduğu paraziter hastalıktır. İnsanlarda, kutanöz layşmanyaz (KL), mukozal layşmanyaz (MKL) ve viseral layşmanyaz (VL) olmak üzere birkaç farklı klinik sunum görülmektedir<sup>1</sup>. Layşmanyaz, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından "İhmal Edilen Tropikal Hastalıklar" grubunda sınıflandırılmaktadır. Dünya genelinde 12-15 milyon kişinin enfekte olduğu ve yılda 0.7-1 milyon yeni vakanın görüldüğü tahmin edilmektedir<sup>2</sup>. Asya,

Afrika, Orta Doğu, Orta ve Güney Amerika ve Akdeniz bölgesinde yaklaşık 100 ülke layşmanyaz için endemik kabul edilmektedir<sup>3</sup>. Bununla birlikte, layşmanyaz salgınları, özellikle silahlı çatışmaların yaşandığı bölgelerde, göç ve kentleşmenin bir sonucu olarak endemik ülkelerin içinde ve dışında binlerce insanı etkilemeye devam etmektedir<sup>4</sup>.

Beş değerli antimoniyaller, sodyum stiboglukonat (Pentostam®) veya meglumin antimonat (Glucantime®), KL ve MKL tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlar olup, kardiyak toksisite ve hepatik enzim düzeylerinde yükselme gibi ciddi yan etkilere neden olabilmektedir<sup>5</sup>. Miltefosin (MİL), 1980'lerde kanser önleyici bir madde olarak geliştirilen, fosfolipid yapıda, geniş spektrumlu antimikrobiyal ve antilayşmanyal bir ilaçtır. MİL, ilk olarak *Leishmania donovani*'ye karşı in vitro ortamda etkili bir ilaç olarak keşfedilmiş ve viseral layşmanyaz için önerilmiştir<sup>6</sup>.

Dışa atım pompaları (DAP), antibiyotik gibi maddelerin hücre dışına atımını sağlayan, sıklıkla ilaç direncinden sorumlu olan ve plazma zarına entegre olan proteinlerdir. P-glikoprotein, 1970'lerin ortalarında memeli kanser hücrelerinde görülen ve ilaç direncinde rol oynayan ilk DAP örneğidir. DAP'lardan MATE, SMR ve RND aileleri prokaryotlarda bulunurken MFS ve ATP-binding cassette (ABC) aileleri hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yer almaktadır<sup>7</sup>.

Dışa atım pompa inhibitörleri (DAPI), geleneksel tarama yöntemleriyle rastgele keşfedilen, doğal veya sentetik kökenli olabilen, bir veya birden fazla mekanizmayla antimikrobiyallerin hücre dışına atımını inhibe etme yeteneğinde olan moleküllerdir. Aynı zamanda DAPI'ler, antibiyotiklerle birlikte uygulandıklarında antibiyotiğin dışa atımını önleyerek veya azaltarak ilacın hücre içinde yüksek konsantrasyonda kalmasını sağlamaktadır<sup>8</sup>.

Rezerpin (REZ), lipofilik yapılu bir indol alkaloid olup ilk kez Schlittler ve arkadaşları tarafından *Rauwolfia serpentina* bitkisinin kökünden izole edilmiştir. Antihipertansif ve antipsikotik özellikleri bilinmekle birlikte günümüzde yaygın olarak kullanılmamaktadır. Genel olarak MFS ve RND ailesi pompalarına özgü bir DAPI olarak kabul edilmektedir. Ayrıca ABC pompalarını da inhibe edebilmektedir<sup>9</sup>. İzokinolin alkaloid bileşikler arasında yer alan berberin (BER), insanlar için güvenli olması nedeniyle umut vericidir. BER'in MFS DAP Mdr1p'yi inhibe ettiği ve etkili bir DAPI olarak potansiyel gösterdiği bildirilmiştir<sup>10</sup>. Kalsiyum kanal blokörü olarak bilinen verapamil (VER), fenilalkilamin türevi bir bileşik olup hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. VER'in, kalsiyumun yanı sıra sodyumun taşınmasında da rol aldığı bilinmektedir. Bakterilerde yapılan çalışmalarda, VER'in MATE pompalarının aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir<sup>8</sup>.

Son yıllarda yeni antimikrobiyallerin keşfine yönelik araştırmaların hızının, önemli ölçüde azalmasıyla direnç mekanizmalarına etki edebilecek yeni moleküllerin araştırılması zorunlu hale gelmiştir. DAPI'lerin, ilaç direnciyle mücadelede antilayşmanyal ajanların klinik performansını artırabilecek umut verici bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, layşmanyaz tedavisinde ilk tercih edilen beş değerli antimon bileşiklerinden biri olan pentostam (PEN) ve diğer bir antilayşmanyal olan MİL ile VER, REZ ve BER gibi

DAPI'lerin, *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum* izolatlarına karşı etkinliklerinin in vitro sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle, sinerjik etkileşimlerinin ise dama tahtası (checkerboard) yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, insana ve hayvana ait materyal kullanılmamış olup sıvı azotta muhafaza edilen parazit suşları ile deneyler yürütülmüştür. Bu nedenle etik kurul onayı gerekli değildir.

### *Leishmania* İzolatları

Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası bünyesinde bulunan *L.tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) ve *L.infantum* (MHOM/TN/1980/IPT-1) referans suşları kullanıldı. Alınan suşlar ITS1 ve hsp70 bölgesine özgü primer ve problemlerle genotiplendirildi.

### Antilayşmanyaller

Çalışmada kullanılan antilayşmanyal etken maddelerden PEN (16037-91-5) ve MİL (B2693-072166)' in saf ve analitik formu BOCScience (Amerika Birleşik Devletleri) firmasından sağlandı.

### Dışa Atım Pompa İnhibitörleri

Çalışmada kullanılan DAPI'lerden REZ (R0875), BER (B3251) ve VER (V4629)'in saf ve analitik formları Sigma-Aldrich (ABD) firmasından sağlandı.

### NNN Besiyerinin Hazırlanması

1.4 g agar ve 0.6 g NaCl, 90 ml distile suda çözdürüldü ve otoklavda (121 °C'de 15 dakika) steril edildi. Besiyerine, 50-55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 10 ml defibrine tavşan kanı ve 0.2 ml penisilin/streptomisin solüsyonu eklendi. Steril vidalı kapaklı tüplere, hazırlanan besiyerinden dörder ml dökülerek 10° eğimde besiyerinin katılaşması sağlandı. Besiyerleri kullanılacağı zamana kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

### RPMI-1640 Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen RPMI-1640 besiyeri içine %10 fetal calf serum (FCS), %1 penisilin/streptomisin ve %1 gentamisin eklenerek sıvı besiyeri hazırlandı ve besiyeri kullanılacağı zamana kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

### *Leishmania* Suşlarının Canlandırılması

Sıvı azottan çıkarılan suşlar, 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda çözdürüldü ve üremeleri için NNN besiyerine ekildi. NNN besiyerleri 26 °C'de inkübasyona kaldırıldı ve her gün promastigot üremeleri kontrol edildi. Yeterli üreme görülen besiyerlerinden, antilayşmanyal etkinlik ve sinerji çalışmalarında kullanılmak üzere, RPMI-1640 sıvı besiyerine pasaj yapıldı. Sıvı besiyerindeki promastigotlar logaritmik faza ulaşıncaya kadar 26 °C'de takip edildi.

### ***Leishmania* Suşlarının NNN Besiyerine Ekimi**

NNN besiyerleri oda sıcaklığına getirildi ve üzerlerine 1 ml RPMI-1640 stok sıvı besiyeri eklendi. Sıvı azottan çıkarılarak su banyosunda eritilen *Leishmania* promastigotları steril cam pastör pipeti yardımıyla NNN besiyerine inoküle edildi. Promastigot eklenmiş NNN besiyerleri 26 °C'lik etüvde beş gün bekletildi. Beş günlük inkübasyondan sonra besiyerinin sıvı kısmından cam pastör pipeti kullanılarak örnek alındı ve direk preparat hazırlanarak promastigot üremesi ve yoğunluğu ışık mikroskopunda 40x'lik objektif kullanılarak kontrol edildi.

### ***Leishmania* Suşlarının Sıvı Besiyerinde Çoğaltılması**

NNN besiyerinde yeterli üreme yoğunluğuna ulaşan promastigotlar ilaç duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere NNN besiyerinden stok RPMI-1640 sıvı besiyerine pasajlandı ve 26 °C'de inkübasyona bırakıldı. Promastigot inoküle edilmiş RPMI-1640 sıvı besiyeri bulunan flasklara 2-3 günde bir taze besiyeri eklenerek yeterli miktarda promastigot elde edildi. İlaç duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere yoğunluğu 10<sup>6</sup> promastigot/ml olacak şekilde parazit süspansiyonu hazırlandı.

### **Antilayşmanyaller ve DAPI'lerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması**

Etken maddelerin uygun çözücü/sulandırıcı çeşidi ve potens değeri belirlendi. Stok konsantrasyonları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing kriterleri doğrultusunda hesaplandı. Hassas terazide tartılan antilayşmanyal etken maddeler ve DAPI'lerin uygun çözücülerle, Tablo 1'de belirtilen konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler 1 ml'lik miktarlarda test edilecekleri zamana kadar -20 °C'de saklandı.

### **In vitro Mikrodilüsyon Yöntemi**

Antilayşmanyal ilaçlar ve DAPI'lerin antilayşmanyal aktiviteleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle in vitro olarak belirlendi. İlaç duyarlılık testlerinde; steril, düz tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültür plağındaki 12 sıranın biri pozitif kontrol, biri negatif kontrol, geri kalan kuyucuklar da ikili sıralar halinde etken maddeler için kullanıldı. Her bir kuyucuğa stok RPMI-1640 sıvı besiyerinden (%10 FCS + %1 penisilin/streptomisin + %1 gentamisin) 100 µl dağıtıldı. Mikroplakanın etken maddeler için ayrılmış bölümlerinin ilk kuyucuklarına,

**Tablo 1.** Etken Maddelerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Etken Maddeler	Çözücü	Sulandırıcı	Çalışma Konsantrasyonu
PEN	Su	RPMI-1640	12560 µg/ml
MİL	Su	RPMI-1640	1024 µg/ml
VER	Su	RPMI-1640	2560 µg/ml
REZ	Su	RPMI-1640	5024 µg/ml
BER	Etanol	RPMI-1640	4096 µg/ml

PEN: Pentostam, MİL: Miltefosin, VER: Verapamil, REZ: Rezerpin, BER: Berberin.

etken madde süspansiyonundan 100 µl pipetlenerek seri dilüsyon yapıldı. Seri dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra 10<sup>7</sup> promastigot/ml yoğunluğundaki parazit süspansiyonundan negatif kontrol hariç tüm kuyucuklara 100 µl eklendi. Mikroplakanın kapağı kapatılarak etrafı parafilm ile kaplandı ve 26 °C'de inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyonun 24 ve 48. saatlerinde etken maddelerin minimum parazitisit konsantrasyon (MPK) değerleri invert mikroskopta yapılan incelemeyle belirlendi.

### Antilayşmanyaller ve DAPİ'lerin IC<sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi

Antilayşmanyal ilaçların ve DAPİ'lerin IC<sub>50</sub> değerleri, MTT [3-(4.5-dimetiltiazol-2-yl)-2.5-difeniltetrazolyum bromür] (Sigma) canlılık tespit kitiyle in vitro olarak değerlendirildi. *Leishmania* suşları, %10 fetal sıgır serumu, 4.5 mg/mL glikoz ve 292 µg/mL L-glutamin içeren RPMI-1640 sıvı besiyerinde çoğaltıldı. Antilayşmanyal etkinliğin belirlenmesi için 96 kuyucuklu mikroplakların her bir kuyucuğuna 100 µl RPMI-1640 sıvı besiyeri pipetlendi. Etken maddelerin çalışma konsantrasyonları ayarlanarak seri dilüsyon yapıldı. Konsantrasyonu 10<sup>7</sup> promastigot/ml olarak ayarlanan promastigot süspansiyonu, 100 µl olarak kuyucuklara dağıtıldı. Mikroplaklar üzerinde kör (blank) ve pozitif kontrol için kuyucuklar ayrıldı. Mikroplakalar 24 ve 48 saat boyunca 26 ± 1 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, mikroplaklardaki her bir kuyucuktan 100 µl alınarak yeni mikroplaklara aktarıldı ve üzerine MTT reaktifinden eşit hacimde eklendi. Mikroplakalar dört saat aynı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda mikroplaka kuyucuklarında oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için 100 µl DMSO eklendi ve 30 dakika oda ısısında karanlık ortamda bekletildi. Varioskan marka (Thermo Labssystem, Franklin, ABD) okuyucuda okutularak *Leishmania* suşlarına karşı absorbans değerleri elde edildi. Absorbans verileri, Graphpad Prism 8.4.2 programıyla analiz edilerek IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

### Sinerjik Etkileşimlerin Belirlenmesi

Antilayşmanyaller ile DAPİ'lerin arasındaki etkileşim dama tahtası yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla her bir kombinasyon için iki adet 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikroplaka kullanıldı. Birinci mikroplakanın her bir kuyucuğuna RPMI-1640 sıvı besiyerinden 50 µl dağıtıldı. IC<sub>50</sub> değerinin üç sulandırım üstünden başlayıp beş sulandırım altına kadar, antilayşmanyal ilaçların dikey düzlemde seri dilüsyonları yapıldı. İkinci mikroplakanın sekizinci sütununa kadar tüm kuyucuklarına 70 µl RPMI-1640 besiyeri dağıtıldı. Sekizinci sütundaki kuyucuklara 70 µl DAPİ solüsyonu eklenerek, yatay düzlemde sağdan sola doğru seri dilüsyon yapıldı. İkinci mikroplakada yapılan dilüsyonlar, birinci mikroplakaya birebir aynı kuyucuğa olmak üzere 50 µl aktarıldı, her kuyucukta her iki etken maddenin farklı kombinasyonları elde edildi<sup>11</sup>.

Logaritmik faza girip yeterli yoğunlukta üreyen *Leishmania* promastigotlarından hazırlanan 10<sup>7</sup> promastigot/ml yoğunluktaki parazit süspansiyonundan 100 µl, birinci mikroplakanın besiyeri ve sterilite kontrol kuyucukları hariç tüm kuyucuklarına eklendi. Üreme kontrolü (RPMI 1640 + promastigot), besiyeri kontrolü (RPMI 1640) ve sterilite kontrolü (RPMI 1640 + antilayşmanyal/DAPİ) için dörder kuyucuk kullanıldı. Mikroplakalar 26 °C'de 18-24 saat inkübe edildi.

Antilayşmanyaller ile DAPİ'ler arasındaki etkileşim, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FİKİ) hesaplanarak belirlendi. Bu hesaplama için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$FİKİ = FİK AL + FİK DAPİ$$

$$FİKİ = \frac{\text{Kombinasyondaki AL MPK}}{\text{AL MPK}} + \frac{\text{Kombinasyondaki DAPİ MPK}}{\text{DAPİ MPK}}$$

AL: Antilayşmanyal.

Hesaplanan FİKİ değerleri, aşağıdaki sınır değerlere göre yorumlandı.

Etkileşimler: FİKİ ≤ 0.5 sinerji, FİKİ = 0.50-075 kısmi sinerji, FİKİ = 0.75-1 aditif, FİKİ = 1.00-4.00 etkisiz (indifferent), FİKİ = ≥4.00 antagonizma olarak değerlendirilmeye alındı<sup>12</sup>.

### İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada, 24 ve 48. saatlerde saptanan IC<sub>50</sub> değerleri bağımlı gruplar olarak ele alındı. Verilerin normal dağılım göstermesi durumunda eşleştirilmiş t testi (paired t-test), dağılımın normallikten sapması halinde ise Wilcoxon işaretli sıra testi uygulandı. Aynı zamanda, IC<sub>50</sub> değerlerinin etken maddeler arasında genel olarak farklılık gösterip göstermediğini değerlendirmek amacıyla tek yönlü varyans analizi [analysis of variance (ANOVA)] testi, gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar için ise Tukey'in HSD post-hoc testi uygulandı. Analizlerde elde edilen p değerlerine göre istatistiksel anlamlılık düzeyi p < 0.05 olarak kabul edildi.

### BULGULAR

Antilayşmanyallerin ve DAPİ'lerin *L. tropica* ve *L. infantum* suşlarına karşı MPK değerleri 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskopta incelenerek belirlenmiştir. Bu aşamada invert mikroskop altında promastigotların hareketliliğinin durduğu, morfolojik yapılarının bozulduğu ve promastigotların tümünün öldüğü en düşük ilaç konsantrasyonunu MPK olarak değerlendirilmiştir. Her iki *Leishmania* türü için antilayşmanyal ilaçlardan PEN ve MİL'in MPK değerleri sırasıyla 24 ve 48. saatlerde 64 ve 196 µg/ml olarak saptanmıştır. DAPİ'lerden REZ ve BER için MPK değerleri aynı inkübasyon süreleri için sırasıyla 314 ve 64 µg/mL, VER için 24. saatte 80 µg/mL, 48. saatte ise 40 µg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo II,III). Antilayşmanyaller ve DAPİ'lerin *L. tropica* suşuna karşı IC<sub>50</sub> değerleri, MTT yöntemi ile elde edilen absorbans değerlerinin Graphpad Prism 8.4.2 programı ile analiz edilmesiyle belirlenmiştir (Şekil 1,2). Antilayşmanyallerden MİL'in IC<sub>50</sub> değerleri 24 ve 48. saatlerde sırasıyla, 4.91 ve 4.05 µg/mL, PEN'in ise aynı inkübasyon sürelerinde sırasıyla, 34.58 ve 18.48 µg/mL olarak hesaplanmıştır. DAPİ'lerden REZ, BER ve VER'in IC<sub>50</sub> değerleri ise 24/48. saatlerde sırasıyla, 74.05/50.61, 7.27/6.1 ve 12.52/4.53 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 3,4).

**Tablo II.** Etken Maddelerin *L. tropica* Suşuna Karşı  $IC_{50}$  ve MPK Değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ )

Etken Maddeler	24. Saat		48. Saat	
	$IC_{50}$	MPK	$IC_{50}$	MPK
MİL	4.91	64	4.05	64
PEN	34.58	196	18.48	196
REZ	74.05	314	50.61	314
BER	7.27	64	6.1	64
VER	12.52	80	4.53	40

$IC_{50}$ : %50 inhibisyon konsantrasyonu, MPK: Minimum parazitisit konsantrasyon, MİL: Miltefosin, PEN: Pentostam, REZ: Rezerpin, BER: Berberin, VER: Verapamil.

	MİL	MİL	PEN	PEN	REZ	REZ	BER	BER	VER	VER	POZ	KÖR		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	ABSORBANS
B	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380	
C	0,380	0,380	0,380	0,380	0,394	0,387	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380	0,380	
D	0,381	0,380	0,381	0,381	0,423	0,436	0,380	0,380	0,395	0,391	0,601	0,380	0,380	
E	0,388	0,391	0,385	0,383	0,480	0,487	0,395	0,390	0,423	0,428	0,605	0,380	0,380	
F	0,451	0,463	0,436	0,463	0,524	0,555	0,412	0,435	0,484	0,479	0,610	0,380	0,380	
G	0,496	0,502	0,468	0,465	0,546	0,548	0,450	0,456	0,492	0,490	0,601	0,380	0,380	
H	0,564	0,574	0,501	0,499	0,580	0,583	0,490	0,498	0,536	0,535	0,601	0,380	0,380	
I	0,586	0,584	0,586	0,559	0,590	0,599	0,521	0,526	0,576	0,588	0,601	0,380	0,380	
İ	0,598	0,597	0,600	0,590	0,600	0,601	0,574	0,567	0,596	0,599	0,601	0,380	0,380	
J	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,599	0,598	0,600	0,601	0,601	0,380	0,380	
K	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,380	0,380	
	MİL	MİL	PEN	PEN	REZ	REZ	BER	BER	VER	VER	POZ	KÖR	% ÇANLILIK	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	90,9	0,0		0,0
B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0		0,0
C	0,0	0,0	0,0	0,0	6,2	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0		0,0
D	0,4	0,0	0,4	0,3	19,4	25,4	0,0	0,0	6,7	4,9	100,0	0,0		0,0
E	3,5	4,9	2,1	1,2	45,4	48,6	6,7	4,4	19,4	21,7	100,0	0,0		0,0
F	32,3	37,4	25,4	37,4	65,4	79,5	14,4	24,9	47,2	44,9	100,0	0,0		0,0
G	52,6	55,6	39,9	38,6	75,4	76,3	31,7	34,5	50,9	49,9	100,0	0,0		0,0
H	83,7	88,4	55,0	54,0	90,9	92,3	49,9	53,6	70,9	70,4	100,0	0,0		0,0
I	93,6	92,7	93,6	81,4	95,5	99,6	64,1	66,3	89,1	94,6	100,0	0,0		0,0
İ	99,1	98,7	100,0	95,5	100,0	100,0	88,2	85,0	98,2	99,6	100,0	0,0		0,0
J	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,6	99,1	100,0	100,0	100,0	0,0		0,0
K	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0	

**Şekil 1.** Etken maddelerin *L. tropica* suşuna karşı 24. saatteki absorbans ve % canlılık değerleri.

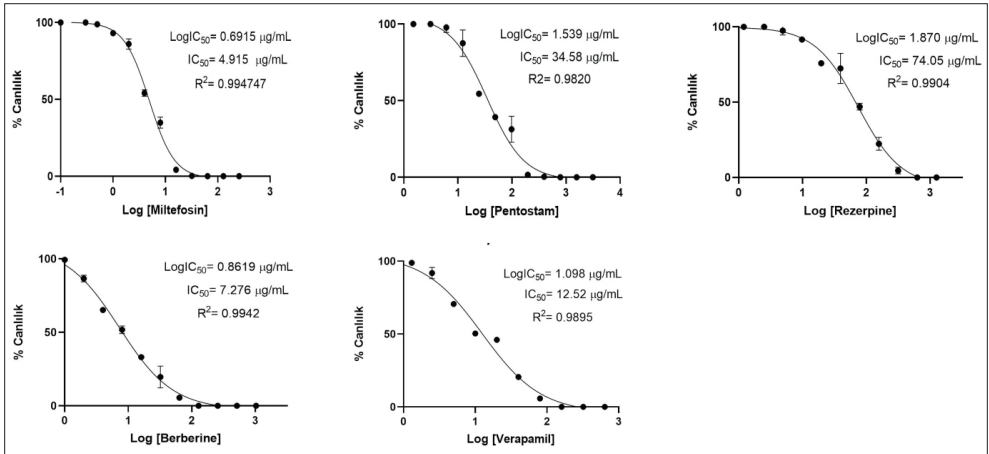
Antilayşmanyaller ve DAPI'lerin *L. infantum* suşuna karşı  $IC_{50}$  değerleri, MTT yöntemi ile elde edilen absorbans değerlerinin Graphpad Prism 8.4.2 programı ile analiz edilmesiyle belirlenmiştir (Şekil 5 ve 6). Antilayşmanyallerden MİL'in  $IC_{50}$  değerleri 24 ve 48. saatlerde sırasıyla, 3.47 ve 2.91  $\mu\text{g/mL}$ ; PEN'in ise aynı inkübasyon sürelerinde sırasıyla, 59.86 ve 40.63  $\mu\text{g/mL}$  olarak hesaplanmıştır. DAPI'lerden REZ, BER ve VER'in  $IC_{50}$

	MİL	MİL	PEN	PEN	REZ	REZ	BER	BER	VER	VER	POZ	KÖR
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,580	0,380
B	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380
C	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380
D	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380
E	0,382	0,383	0,380	0,380	0,450	0,452	0,388	0,384	0,395	0,392	0,605	0,380
F	0,420	0,417	0,410	0,423	0,510	0,530	0,401	0,410	0,421	0,425	0,610	0,380
G	0,489	0,485	0,440	0,435	0,530	0,531	0,440	0,442	0,458	0,468	0,601	0,380
H	0,558	0,560	0,485	0,480	0,562	0,567	0,467	0,475	0,480	0,485	0,601	0,380
I	0,579	0,575	0,510	0,500	0,574	0,581	0,514	0,525	0,520	0,515	0,601	0,380
İ	0,589	0,580	0,589	0,580	0,586	0,588	0,564	0,558	0,550	0,550	0,601	0,380
J	0,596	0,595	0,594	0,590	0,594	0,592	0,588	0,574	0,580	0,579	0,601	0,380
K	0,600	0,599	0,600	0,600	0,601	0,601	0,598	0,597	0,595	0,590	0,601	0,380

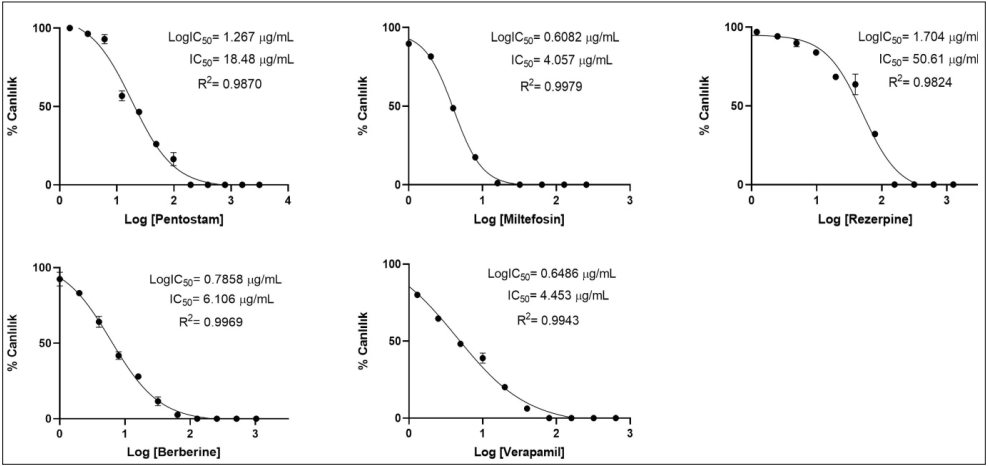
  

	MİL	MİL	PEN	PEN	REZ	REZ	BER	BER	VER	VER	POZ	KÖR
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	90,9	0,0
B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
D	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
E	0,8	1,2	0,0	0,0	31,7	32,6	3,5	1,7	6,7	5,3	100,0	0,0
F	18,1	16,7	13,5	19,4	59,0	68,2	9,4	13,5	18,5	20,4	100,0	0,0
G	49,5	47,7	27,2	24,9	68,2	68,6	27,2	28,1	35,4	39,9	100,0	0,0
H	80,9	81,8	47,7	45,4	82,7	85,0	39,5	43,1	45,4	47,7	100,0	0,0
I	90,5	88,6	59,0	54,5	88,2	91,4	60,9	65,9	63,6	61,3	100,0	0,0
İ	95,0	90,9	95,0	90,9	93,6	94,6	83,6	80,9	77,3	77,3	100,0	0,0
J	98,2	97,7	97,3	95,5	97,3	96,4	94,6	88,2	90,9	90,5	100,0	0,0
K	100,0	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0	99,1	98,7	97,7	95,5	100,0	0,0

Şekil 2. Etken maddelerin *L.tropica* suşuna karşı 48. saatteki absorbands ve % canlılık değerleri.



Şekil 3. Etken maddelerin *L.tropica* suşuna karşı 24. saatteki  $\text{IC}_{50}$  değerleri.



Şekil 4. Etken maddelerin *L.tropica* suşuna karşı 48. saatteki  $IC_{50}$  değerleri.

Tablo III. Etken Maddelerin *L. infantum* Suşuna Karşı  $IC_{50}$  ve MPK Değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ )

Etken Maddeler	24. Saat		48. Saat	
	$IC_{50}$	MPK	$IC_{50}$	MPK
MİL	3.47	64	2.91	64
PEN	59.86	196	40.63	196
REZ	64.52	314	51.72	314
BER	8.21	64	8.01	64
VER	11.59	80	7.69	40

$IC_{50}$ : %50 inhibisyon konsantrasyonu, MPK: Minimum parazitisit konsantrasyon, MİL: Miltefosin, PEN: Pentostam, REZ: Rezerpin, BER: Berberin, VER: Verapamil.

değerleri ise 24/48. saatlerde sırasıyla, 64.52/51.72, 8.21/8.01 ve 11.59/7.69  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 7,8).

Antilayşmanyaller ve DAPI kombinasyonlarının *L.tropica* ve *L.infantum* suşlarına karşı etkileşimleri dama tahtası yöntemiyle araştırılmıştır. MİL'in; REZ, BER ve VER ile kombinasyonlarında, 24 ve 48 saatlik inkübasyon koşullarında sinerjik etkileşim görülmüştür. PEN'in, REZ ile kombinasyonunda 24. saatte kısmi sinerji, 48. saatte ise sinerji görülürken, BER ve VER ile kombinasyonunda her iki inkübasyon koşulunda da sinerjik etkileşimler saptanmıştır. Etkileşim sonuçları hem *L.tropica* hem de *L.infantum* suşlarında aynı bulunmuştur (Tablo IV).

Çalışmada,  $IC_{50}$  değerlerinin normal dağılıma uygunlukları görselleştirme ve Shapiro-Wilk testiyle incelenmiş, sonuçlara göre her iki zaman dilimi arasındaki anlamlılık eşleştirilmiş t testi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları,  $IC_{50}$  değerlerinin 24 saat ve 48 saat arasında anlamlı bir fark göstermediğini ortaya koymuştur ( $t = 2.26$ ,

	MİL	MİL	PEN	PEN	REZ	REZ	BER	BER	VER	VER	POZ	KÖR
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,580	0,380
B	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380
C	0,380	0,380	0,380	0,380	0,391	0,385	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380
D	0,380	0,380	0,380	0,380	0,420	0,436	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380
E	0,380	0,391	0,421	0,425	0,478	0,482	0,380	0,380	0,410	0,429	0,605	0,380
F	0,411	0,421	0,487	0,480	0,511	0,517	0,425	0,418	0,475	0,468	0,610	0,380
G	0,459	0,478	0,499	0,498	0,575	0,562	0,468	0,432	0,487	0,480	0,601	0,380
H	0,541	0,571	0,521	0,532	0,594	0,590	0,492	0,493	0,550	0,541	0,601	0,380
I	0,592	0,599	0,556	0,560	0,600	0,600	0,538	0,540	0,589	0,577	0,601	0,380
İ	0,600	0,600	0,599	0,599	0,600	0,601	0,587	0,587	0,599	0,599	0,601	0,380
J	0,601	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,600	0,601	0,601	0,380
K	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,380

ABSORBANS

	MİL	MİL	PEN	PEN	REZ	REZ	BER	BER	VER	VER	POZ	KÖR
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	90,9	0,0
B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
C	0,0	0,0	0,0	0,0	4,9	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
D	0,0	0,0	0,0	0,0	18,1	25,4	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
E	0,0	4,9	18,5	20,4	44,5	46,3	0,0	0,0	13,5	22,2	100,0	0,0
F	14,0	18,5	48,6	45,4	59,5	62,2	20,4	17,2	43,1	39,9	100,0	0,0
G	35,8	44,5	54,0	53,6	88,6	82,7	39,9	23,5	48,6	45,4	100,0	0,0
H	73,2	86,8	64,1	69,1	97,3	95,5	50,9	51,3	77,3	73,2	100,0	0,0
I	96,4	99,6	80,0	81,8	100,0	100,0	71,8	72,7	95,0	89,6	100,0	0,0
İ	100,0	100,0	99,6	99,6	100,0	100,0	94,1	94,1	99,6	99,6	100,0	0,0
J	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
K	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0

% ÇANLILIK

Şekil 5. Etken maddelerin *L.infantum* suşuna karşı 24. saatteki absorbands ve % canlılık değerleri.

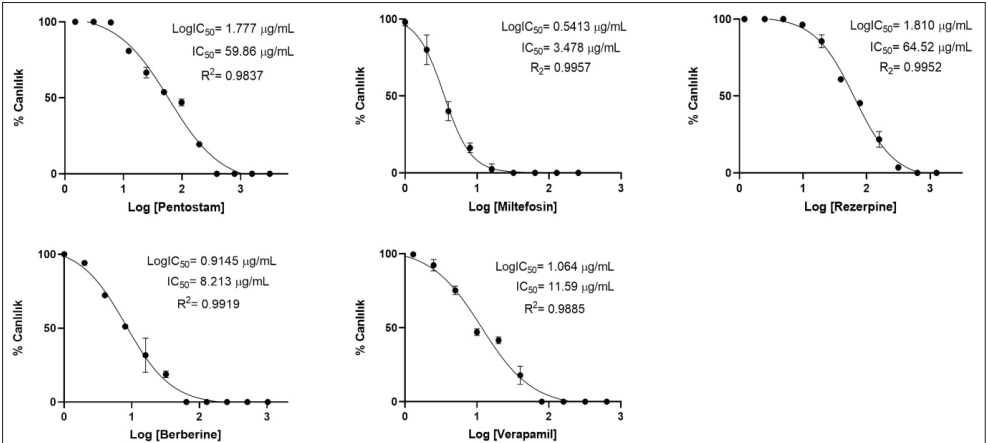
p= 0.086). Alternatif olarak uygulanan Wilcoxon işaretli sıra testi sonuçları da benzer şekilde anlamlı bir fark bulunmadığını göstermiştir (W= 0, p= 0.0625). IC<sub>50</sub> değerlerinin etken maddeler arasında genel olarak farklılık gösterip göstermediğini değerlendirmek amacıyla tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. ANOVA sonuçları p= 0.0068 olarak bulunmuş ve bu sonuç, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmaları daha ayrıntılı incelemek amacıyla Tukey'in HSD post-hoc testi uygulanmıştır. Bu test sonuçlarına göre, yalnızca BER ve REZ grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir (p= 0.0100), diğer çiftler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

## TARTIŞMA

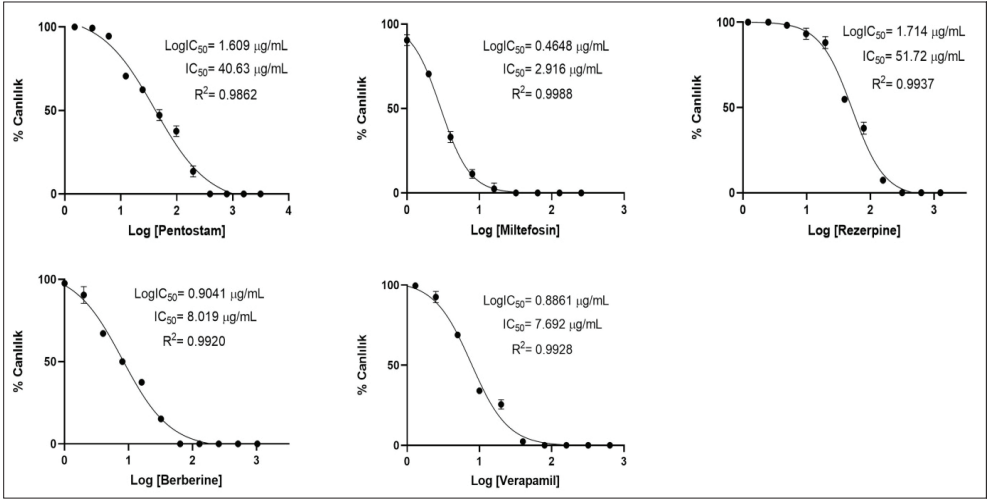
Beş değerli antimoniyaller 20. yüzyılın ilk yarısından bu yana layşmanyaz tedavisinde dünya çapında başarıyla kullanılmakta olup son 20 yılda klinik dirençte bir artış görülmeye başlanmıştır. Beş değerli antimon (SbV) bileşiklerinin antilayşmanyal aktivite göstermesi için hücre içinde üç değerli forma (SbIII) indirgenmesi gerekmektedir. Bu süreç makrofajın içinde gerçekleşmekte ve ortaya çıkan SbIII, AQP1 membran taşıyıcısı yoluyla

	MİL	MİL	PEN	PEN	REZ	REZ	BER	BER	VER	VER	POZ	KÖR	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,580	0,380	ABSORBANS
B	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380	
C	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380	
D	0,380	0,380	0,380	0,380	0,395	0,398	0,380	0,380	0,380	0,380	0,601	0,380	
E	0,380	0,391	0,415	0,405	0,458	0,469	0,380	0,380	0,387	0,384	0,605	0,380	
F	0,409	0,401	0,468	0,458	0,501	0,500	0,410	0,415	0,441	0,432	0,610	0,380	
G	0,448	0,458	0,479	0,489	0,579	0,568	0,458	0,461	0,452	0,458	0,601	0,380	
H	0,532	0,538	0,515	0,520	0,580	0,590	0,487	0,485	0,532	0,531	0,601	0,380	
I	0,574	0,584	0,536	0,535	0,594	0,598	0,521	0,523	0,578	0,589	0,601	0,380	
İ	0,600	0,600	0,587	0,589	0,600	0,600	0,579	0,564	0,599	0,599	0,601	0,380	
J	0,601	0,600	0,599	0,598	0,600	0,600	0,584	0,589	0,600	0,600	0,601	0,380	
K	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,601	0,589	0,594	0,600	0,600	0,601	0,380	
	MİL	MİL	PEN	PEN	REZ	REZ	BER	BER	VER	VER	POZ	KÖR	% ÇANLILIK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	90,9	0,0	
B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	
C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	
D	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	8,1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	
E	0,0	4,9	15,8	11,2	35,4	40,4	0,0	0,0	3,1	1,7	100,0	0,0	
F	13,1	9,4	39,9	35,4	55,0	54,5	13,5	15,8	27,6	23,5	100,0	0,0	
G	30,8	35,4	44,9	49,5	90,5	85,5	35,4	36,7	32,6	35,4	100,0	0,0	
H	69,1	71,8	61,3	63,6	90,9	95,5	48,6	47,7	69,1	68,6	100,0	0,0	
I	88,2	92,7	70,9	70,4	97,3	99,1	64,1	65,0	90,0	95,0	100,0	0,0	
İ	100,0	100,0	94,1	95,0	100,0	100,0	90,5	83,6	99,6	99,6	100,0	0,0	
J	100,0	100,0	99,6	99,1	100,0	100,0	92,7	95,0	100,0	100,0	100,0	0,0	
K	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	95,0	97,3	100,0	100,0	100,0	0,0	

Şekil 6. Etken maddelerin *L.infantum* suşuna karşı 48. saatteki absorbans ve % canlılık değerleri.



Şekil 7. Etken maddelerin *L.infantum* suşuna karşı 24. saatteki  $\text{IC}_{50}$  değerleri.



Şekil 8. Etken maddelerin *L.infantum* suşuna karşı 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri.

Tablo IV. Antilayşmanyaller ve DAPi Kombinasyonlarının Etkileşim Sonuçları

Kombinasyon	24. Saat	Etkileşim	48. Saat	Etkileşim
MİL-REZ	0.375	Sinerji	0.375	Sinerji
MİL-BER	0.187	Sinerji	0.187	Sinerji
MİL-VER	0.25	Sinerji	0.187	Sinerji
PEN-REZ	0.748	Kısmi sinerji	0.498	Sinerji
PEN-BER	0.25	Sinerji	0.375	Sinerji
PEN-VER	0.5	Sinerji	0.375	Sinerji

MİL: Miltefosin, REZ: Rezerpin, BER: Berberin, PEN: Pentostam, VER: Verapamil.

hücreye girmektedir. PRP1, pentamidine karşı dirençten sorumlu tutulan ABC taşıyıcı sınıfına ait bir DAP proteinidir. Lokalizasyonu ve direnç mekanizması henüz belirlenmemiş olmasına rağmen antimona karşı da direnç sağlayabileceği varsayılmıştır<sup>13,14</sup>.

MİL, layşmanyaza karşı mevcut ilk ve tek oral ilaçtır. Hezadekanolün bir fosforilkolin esteri olan MİL, başlangıçta bir kanser ilacı olarak geliştirilmiştir. MİL'in etki şekli tam olarak anlaşılamamıştır ancak fosfolipidlerin biyosentezine ve alkil-lipidlerin metabolizmasına müdahale ederek, mitokondriyal sitokrom c oksidazları etkileyerek, mitokondriyal depolarizasyona ve hücre içi ATP seviyelerinin düşmesine ve apoptoz benzeri bir hücre ölümüne neden olarak parazitler üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür<sup>15</sup>.

Birçok durumda, parazitin direnci ABC tipi DAP'lardan kaynaklanmaktadır. *Leishmania*'da farklı ABC tipi DAP'lar antimonyalleri, azoller ve folatları hücre dışına atarak ilaca dirençli fenotiplere yol açmaktadır<sup>16</sup>. *Leishmania* parazitlerinde üç farklı ABC tipi

DAP tanımlanmıştır: İlk sınıf, insan çok ilaca dirençli protein [multidrug resistance protein (MRP)] taşıyıcı alt ailesiyle homolog olup, antimon ve diğer bileşiklere karşı ilaç direnciyle bağlantılıdır. Yakın zamanda, üç farklı vahşi tip *Leishmania* türünde MRP benzeri bir taşıyıcı tespit edilmiştir. *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* ve *Leishmania mexicana*'da tanımlanan taşıma sistemi, memeli MRP1 ile çeşitli özellikleri paylaşmaktadır. *Leishmania* parazitlerinde tanımlanan ikinci ABC protein sınıfı, kanser hücrelerinde gözlenen benzer bir MDR fenotipi sergileyen, memeli P-glikoproteinlerine daha fazla benzerlik gösteren taşıyıcılardır. ABC taşıyıcılarının üçüncü sınıfı, memeli ABCA alt ailesinin üyeleriyle yüksek homoloji göstermektedir. *L.tropica* parazitlerinde ABCA benzeri genler tanımlanmıştır. MİL'e karşı direncin, kanser hücrelerinin yanı sıra *L.tropica* kültürlerinde de gözleendiği ve parazitin Pgp benzeri bir taşıyıcı bulundurduğu bildirilmiştir<sup>17</sup>.

Kalsiyum kanal inhibitörleri, kalmodulin antagonistleri, hidrofobik peptitler, protein kinaz inhibitörleri, antibiyotikler, hormon türevleri ve flavonoidler gibi bir dizi modülatörün memeli hücrelerinde in vitro ilaç direncini tersine çevirebildiği daha önce tanımlanmıştır. Bununla birlikte, flavonoidler ve seskiterpenler gibi doğal bileşiklerin, Pgp benzeri bir taşıyıcıyı aşırı eksprese eden *L.tropica* kültür hattında direnç fenotiplerini tersine çevirmek için umut vadettiği ifade edilmiştir<sup>18</sup>.

Bu bileşik sınıflarının her biri *Leishmania* parazitlerine karşı potansiyel kullanıma sahip olabilir. Bir zamanlar nöropsikiyatrik tedavide kullanılan rezerpin, 1952 yılında Rauwolfia bitkisinin köklerinden "saf kristal formda" izole edilmesinin ardından, "Sarpasil" adıyla ticari olarak satışa sunulmuştur. Rezerpin, nöral iletim ve depolama sırasında veziküler monoamin taşıyıcılarını bloke eden, ayrıca monoamin oksidaz yoluyla dopamin otoksidasyonunu ve oksidatif katabolizmayı teşvik ederek oksidatif strese neden olan bir ilaçtır. Ancak REZ aynı zamanda toksik maddelerin hücre dışına atılmasını sağlayan DAP'ların inhibitörü olarak da biyolojik aktivite göstermektedir<sup>19,20</sup>.

Rezerpin, güçlü DAPİ aktivitesine sahip iyi bilinen doğal bir alkaloiddir. Antibiyotiklerin, rezerpinle birlikte uygulandıklarında *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ve *Micrococcus* spp. dahil olmak üzere çok çeşitli bakteri türlerinde, duyarlılıklarının arttığı gösterilmiştir<sup>21</sup>. Başka bir çalışmada, DAP'ın dirençli *Stenotrophomonas maltophilia*'da florokinolonlara karşı ana direnç mekanizması olduğu, rezerpin ilavesinin ise antibiyotik direncini azalttığı belirtilmiştir<sup>22</sup>.

REZ kanser hücrelerinde DAP'ları inhibe edebilmektedir. Özellikle Pgp ve diğer ABC taşıyıcıları gibi DAP'lar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir<sup>18</sup>. Benzer özelliklerinden dolayı REZ, *Leishmania* parazitlerinde bulunan DAP'ları inhibe ederek ilacın daha etkili olmasını sağlayabilir. Bu çalışmada DAPİ olarak tercih edilen REZ, *L.tropica* için 24 ve 48. saatlerde sırasıyla, 74.05 ve 50.61 µg/mL, *L.infantum* için ise aynı inkübasyon sürelerinde sırasıyla 64.52 ve 51.72 µg/mL IC<sub>50</sub> değerleriyle güçlü antilayşmanyal etkinlik göstermiştir. Ayrıca hem MİL'in hem de PEN'in REZ ile kombinasyonunda her iki *Leishmania* suşuna karşı da sinerjik etkileşim saptanmıştır. REZ'in DAP'ları inhibe etmesi büyük olasılıkla sinerjik

etkileşimin temelini oluşturmaktadır. Ancak bu etkileşimin REZ'in, parazit üzerinde farklı bölgeleri etkilemesinden de kaynaklanması olasıdır. Çünkü çalışmada, REZ'in tek başına kullanıldığında da her iki tür *Leishmania* suşuna karşı güçlü antilayşmanyal etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Bulgularımızı destekleyen bir çalışmada, Staerk ve arkadaşları<sup>23</sup>, REZ'in antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC<sub>50</sub> değerini 9.98 µg/mL olarak saptamış ve REZ'in, özellikle promastigot formundaki *Leishmania* parazitlerinin çoğalmasını önemli ölçüde baskıladığını bildirmiştir. REZ'in DAPİ olarak iş gördüğünün ifade edilebilmesi için daha ileri çalışmalara gerek vardır. Buna rağmen bu çalışmada da saptandığı gibi REZ'in PEN ve MİL ile sinerjik etkileşim içinde olması, tedavi etkinliği açısından REZ'in önemli bir kombinasyon adayı olduğunu göstermektedir.

Geleneksel olarak kullanılan birçok tıbbi bitkinin aktif bir bileşeni olan BER'in, antimikrobiyal, antikanser, antidiyabetik ve antiprotozoal etkileri içeren geniş bir farmakolojik aktivite spektrumuna sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, BER ve türevleri deneysel layşmanyaz modellerinde de etkinlik göstermiştir<sup>24,25</sup>. BER'in antikanser potansiyeli, kapsamlı bir şekilde tanımlanmış ve insan prostat kansinomu hücre hatlarında, ROS üretiminin artmasına, mitokondriyal membran potansiyelinin değişmesine ve apoptoza yol açan sitokrom c salınımının artmasına bağlanmıştır<sup>24</sup>. *Leishmania* gibi makrofaj içi yerleşen bir patojen için BER önemlidir. Literatürde yer alan birkaç çalışmada, BER'in IC<sub>50</sub> değerleri, *L.tropica* ve *L.donovani* için 0.5 mM, *L.infantum* için ise 0.75 mM olarak bulunurken; diğer bir çalışmada *L.infantum* suşuna karşı 2.7 µg/mL ve benzer bir çalışmada da *Leishmania* majör suşuna karşı 13 µg/mL olarak saptanmıştır<sup>26-28</sup>. De Sarkar ve arkadaşları tarafından<sup>29</sup>, BER'in *Leishmania* parazitinin mitokondrileri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, BER'in 48 saatlik inkübasyon sonunda *Leishmania* promastigotlarında doza bağlı bir inhibisyon görüldüğü ve IC<sub>50</sub> değerinin 4.80 µM olduğu bildirilmiştir. Alamzeb ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada<sup>30</sup>, BER'in *Leishmania* izolatına karşı IC<sub>50</sub> değeri 1.5 µM olarak tespit edilmiş ve BER'in güçlü antilayşmanyal etkinlik ve düşük sitotoksitesite gösterdiği ifade edilmiştir. Calvo ve arkadaşları<sup>31</sup> fare KL modelinde BER'in in vivo etkisini incelemiş ve kontrol grubuna kıyasla tedavi edilen farelerde parazit yükünün %99.9 oranında azaldığını bildirmiştir. Çalışmada BER, *L.tropica* için 24 ve 48. saatlerde sırasıyla, 7.27 ve 6.1 µg/mL, *L.infantum* için ise aynı inkübasyon sürelerinde sırasıyla 8.21 ve 8.01 µg/mL IC<sub>50</sub> değerleriyle güçlü antilayşmanyal etkinlik göstermiştir.

Literatürde BER ve DAP'lar arasındaki ilişki gösterilmiştir. BER'in MFS tipi bir DAP olan Mdr1p'yi inhibe ettiği ve *Candida albicans*'in antibiyotik duyarlılığını geri kazandırdığı ifade edilmiştir<sup>32</sup>. Bu çalışmada hem MİL'in hem de PEN'in BER ile kombinasyonunda her iki *Leishmania* suşuna karşı da sinerjik etkileşim saptanmıştır. Sinerjik etkileşimin görülmesinde benzer bir mekanizma yer almış olması mümkündür. Ancak aynı etkileşimin BER'in farklı bölgeleri hedeflemesinden de kaynaklanması olasıdır. Bu konuda net bir yorumun yapılması için çok daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmada BER'in güçlü bir antilayşmanyal etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Literatür verileri de bu sonucu desteklemektedir. Buna ek olarak literatürde BER'in DAPİ özelliğinin olduğunu

gösteren çalışmalar da bulunmaktadır<sup>33</sup>. Çok yönlü biyolojik aktiviteye sahip olan BER'in antilayşmanyal ilaçlarla birlikte kombine edilerek kullanılması, tedavi başarısına olumlu katkılar sunabileceği gibi direnç gelişim hızını da yavaşlatabilir.

DAP'iler, mikrobiyal dirençle mücadele için önemli bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Çalışmalar, VER gibi plazma membranında lokalize olan bazı ilaçların DAP'leri inhibe etmek için kullanılabileceğini göstermiştir. VER, fenilalkilamin sınıfından bir kalsiyum kanal blokeri olup hipertansiyon ve anjina pectoris tedavisinde kullanılmaktadır<sup>34</sup>. VER'in antiparazitik aktivitesine yönelik çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Klorokin ile birlikte kullanıldığında VER'in, parazit içinde klorokin birikimini arttırdığı, onu kendi kendini detoksifiye edemez hale getirdiği ve ölüme daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir<sup>35</sup>. Valiathan ve arkadaşları<sup>36</sup> *L.donovani*'nin izolatlarının (hem promastigot hem de amastigot evreleri) sodyum stiboglukonata karşı in vitro ilaç duyarlılığını ve VER'in antimon direncini tersine çevirmedeki etkisini incelemiştir. Yazarlar VER varlığında, sodyum stiboglukonatin IC<sub>50</sub> değerinde azalma olduğunu ve VER'in *L.donovani* klinik izolatlarının sodyum stiboglukonata karşı in vitro ilaç direncini tersine çevirebileceğini ifade etmişlerdir<sup>36</sup>. Benzer bir çalışmada, Shokri ve arkadaşları<sup>37</sup> VER'in, meglumin antimoniata [glucantime (MA)] *L.tropica*'nın promastigot ve amastigot evrelerine karşı duyarlılığındaki değişimi in vitro ve ex vivo makrofaj modelinde değerlendirmiştir. Promastigot formda, VER içeren veya içermeyen çeşitli MA konsantrasyonlarıyla yürütülen deneylerde, MA + VER kombinasyonunun IC<sub>50</sub> değerinin 116.03 µg/mL, MA'nın tek başına IC<sub>50</sub> değerinin ise 225.14 µg/mL olarak saptandığı bildirilmiştir. Benzer şekilde amastigot formlarında da MA + VER etkinliğinin sadece MA etkinliğinden daha güçlü olduğu belirtilmiş ve MA ile VER arasında sinerjik bir etkileşimin olabileceği ifade edilmiştir<sup>37</sup>. Bu çalışmada VER'in antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC<sub>50</sub> değeri 24 ve 48. saatlerde *L.tropica* için sırasıyla, 12.52 µg/mL ve 4.53 µg/mL olarak saptanırken; *L.infantum* için ise, 11.59 µg/mL ve 7.69 µg/mL olarak bulunmuştur. Yukarıdaki çalışmalarda, farklı antilayşmanyal ilaç konsantrasyonlarının VER içeren veya içermeyen ortamlarda *Leishmania* parazite karşı etkinliği değerlendirilmiş ve VER içeren ortamlarda çok daha güçlü etkinlik tespit edildiği bildirilmiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada VER ile MİL ve PEN arasındaki etkileşim dama tahtası yöntemiyle *L.tropica* ve *L.infantum* suşlarına karşı araştırılmış ve her iki suş için de sinerjik etkileşim gözlenmiştir. Yukarıdaki çalışmalarda elde edilen veriler bu çalışmanın verilerini de desteklemektedir. VER halihazırda klinik kullanımda olan bir ilaç olduğu için yeni nesil antilayşmanyal kombinasyon tedavilerinin oluşturulmasında önemli bir aday ilaç olarak düşünülebilir. Bu sinerjik etkinin hayvan modeli veya gönüllü insan denekler üzerinde değerlendirilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Ülkemizde de layşmanyaza karşı çeşitli ilaç adayı maddelerin belirlenmesi ve direnç mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik güncel çalışmalar yapılmaktadır. Özbilgin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada<sup>38</sup>, antimon direnci gösteren *L.tropica* izolatlarında enolaz, elongasyon faktör-2, HSP 70, tripanotyon redüktaz, protein kinaz C ve metallopeptidaz gibi proteinlerin fazla ifade edildiği bildirilmiştir. Yine İstanbullu ve arkadaşları

tarafından<sup>39</sup> yapılan kapsamlı bir antilayşmanyal ilaç geliştirme çalışmasında bir dizi tiyazolopirimidin türevi tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bu bileşiklerden ikisinin yüksek seçicilik gösterdiği ve hem in vitro hem de in vivo ortamlarda KL ve VL'ye karşı güçlü antilayşmanyal etkinlik sergilediği gösterilmiştir. Tıp alanında kullanımı her geçen gün artan nanopartiküllerin antilayşmanyal etkinliğinin araştırıldığı geçmiş çalışmamızda ise hibrit gümüş nanopartiküllerin hem referans hem de klinik *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.donovani* izolatlarına karşı güçlü antilayşmanyal etkinlik ve düşük sitotoksosite gösterdiği saptanmıştır<sup>40</sup>.

Antilayşmanyallere karşı dirence neden olan moleküler mekanizmaları anlamaya ve mevcut ilaçların etkinliğini artıracak alternatif moleküllerin arayışına gereksinim duyulmaya başlanmıştır. Son yıllarda yeni antimikrobiyallerin keşfine yönelik araştırmaların hızının önemli ölçüde azalmasıyla direnç mekanizmalarına etki edebilecek yeni moleküllerin araştırılması zorunlu hale gelmiştir. DAPI'lerin, ilaç direnciyle mücadelede antilayşmanyal ajanların klinik performansını artırabilecek umut verici bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2023-079 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışmada, insana ve hayvana ait materyal kullanılmamış olup sıvı azotta muhafaza edilen parazit suşları ile deneyler yürütülmüştür. Bu nedenle etik kurul onayı gerekli değildir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Leishmaniasis. Available from: <https://www.cdc.gov/leishmaniasis/about/index.html> (Accessed date: 12.06.2024)
- World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Key facts. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Accessed date: 12.06.2024).
- World Health Organization (WHO). Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap. Weekly epidemiological record.
- Muhjazi G, Gabrielli AF, Ruiz-Postigo JA, Atta H, Osman M, Bashour H, et al. Cutaneous leishmaniasis in Syria: A review of available data during the war years: 2011-2018. PLoS Negl Trop Dis 2019; 13(12): e0007827. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007827>
- Berbert TRN, de Mello TFP, Wolf Nassif P, Mota CA, Silveira AV, Duarte GC, et al. Pentavalent antimonials combined with other therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review. Dermatol Res Pract 2018; 9014726. <https://doi.org/10.1155/2018/9014726>
- Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. Clin Infect Dis 2012; 55(4): 543-50. <https://doi.org/10.1093/cid/cis474>

7. Shriram V, Khare T, Bhagwat R, Shukla R, Kumar V. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phytotherapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. *Front Microbiol* 2018; 9: 2990. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02990>
8. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res* 2019; 149(2): 129. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_2079\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17)
9. Chen FE, Huang J. Reserpine: A challenge for total synthesis of natural products. *Chem Rev* 2005; 105(12): 4671-706. <https://doi.org/10.1021/cr050521a>
10. Tong Y, Zhang J, Sun N, Wang XM, Wei Q, Zhang Y, et al. Berberine reverses multidrug resistance in *Candida albicans* by hijacking the drug efflux pump Mdr1p. *Sci Bull (Beijing)* 2021; 66(18): 1895-905. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.12.035>
11. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations, In: Lorian V (eds), *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2005: pp. 365-439.
12. Li Yj, Pan CZ, Zhao ZW, Zhao ZX, Chen HL, Lu WB. Effects of a combination of amlodipine and imipenem on 42 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from a teaching hospital in Guangzhou, China. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 548. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-548>
13. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barret MP, Lopez-Velez R, Garcia-Hernandez R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11(12): e0006052. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
14. Boozhmehrani MJ, Eslami G, Khamesipour A, Jafari AA, Vakili M, Hosseini SS, et al. The role of ATP-binding cassette transporter genes expression in treatment failure cutaneous leishmaniasis. *AMB Expr* 2022; 12: 78. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01419-5>
15. Benaim G, Paniz-Mondolfi A. Unmasking the mechanism behind miltefosine: Revealing the disruption of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis as a rational therapeutic target in leishmaniasis and chagas disease. *Biomolecules* 2024; 14(4): 406. <https://doi.org/10.3390/biom14040406>
16. Coelho AC, Cotrim PC. The role of ABC transporters in drug-resistant *Leishmania*, In *Drug resistance in Leishmania parasites*. Springer 2018: 247-72. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74186-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74186-4_11)
17. Bharadava K, Upadhyay TK, Kaushal RS, Ahmad I, Alraey Y, Siddiqui S, et al. Genomic insight of *leishmania* parasite: In-depth review of drug resistance mechanisms and genetic mutations. *ACS Omega* 2024; 9(11): 12500-14. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09400>
18. Perez-Victoria JM, Perez-Victoria FJ, Conseil G, Maitrejean M, Comte G, Barron D, et al. High affinity binding of silybin derivatives to the nucleotide-binding domain of a *Leishmania tropica* P-glycoprotein-like transporter and chemosensitization of a multidrug-resistant parasite to daunomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(2): 439-46. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.439-446.2001>
19. Shaheen A, Afridi WA, Mahboob S, Sana M, Ismat F, Mirza O, et al. Reserpine is the new addition into the repertoire of AcrB efflux pump inhibitors. *Mol Biol (Mosk)* 2019; 53: 596-605. <https://doi.org/10.1134/S0026893319040113>
20. Strawbridge R, Javed RR, Cave J, Jauhar S, Young AH. The effects of reserpine on depression: A systematic review. *J Psychopharmacol* 2023; 37(3): 248-60. <https://doi.org/10.1177/02698811221115762>
21. Sridevi D, Shankar C, Prakash P, Park JH, Thamaraiselvi K. Inhibitory effects of reserpine against efflux pump activity of antibiotic resistance bacteria. *Chem Biol Lett* 2017; 4(2): 69-72.
22. Jia W, Wang J, Xu H, Li G. Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* to fluoroquinolones: Prevalence in a university hospital and possible mechanisms. *Int j Environ Res Public Health* 2015; 12(5): 5177-95. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505177>
23. Stærk D, Lemmich E, Christensen J, Kharazmi A, Olsen CE, Jaroszewski JW. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from corynanthe pachyceras. *Planta Medica* 2000; 66(6): 531-6. <https://doi.org/10.1055/s-2000-8661>
24. Och A, Podgórski R, Nowak R. Biological activity of berberine-a summary update. *Toxins* 2020; 12(11): 713. <https://doi.org/10.3390/toxins12110713>
25. Ahuja A, Purohit SK, Yadav JS, Netra PR. Cutaneous leishmaniasis in domestic dogs. *Indian J Public Health* 1993; 37: 29-31.

26. Hassan HF, Najim ZK. Antileishmanial effect of berberine and extracts of *Berberis vulgaris* on the growth of leishmanial species. *Int J Pharm Qual Assur* 2020; 11(2): 237-41. <https://doi.org/10.25258/ijpqa.11.2.8>
27. Ropivia J, Derbré S, Rouger C, Pagniez F, Le Pape P, Richomme P. Isoquinolines from the roots of *Thalictrum flavum* L. and their evaluation as antiparasitic compounds. *Molecules* 2010; 15(9): 6476-84. <https://doi.org/10.3390/molecules15096476>
28. Mahmoudvand H, Shariffar F, Sharifi I, Ezatpour B, Harandi MF, Makki MS, et al. In vitro inhibitory effect of *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) and its main component, berberine against different *Leishmania* species. *Iran J Parasitol* 2014; 9(1): 28. <https://doi.org/10.1155/2014/602436>
29. De Sarkar S, Sarkar D, Sarkar A, Dighal A, Staniek K, Gille L, et al. Berberine chloride mediates its antileishmanial activity by inhibiting *Leishmania mitochondria*. *Parasitol Res* 2019; 118(1): 335-45. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6157-3>
30. Alamzeb M, Ali S, Rashid M, Khan B, Ihsanullah A. Antileishmanial potential of berberine alkaloids from berberis glaucocarpa roots: Molecular docking suggests relevant *leishmania* protein targets. *Nat Prod Commun* 2021; 16(9). <https://doi.org/10.1177/1934578X211031148>
31. Calvo A, Moreno E, Aldalur I, Sanmartín C, Larrea E, González-Peñas E, et al. Effect of topical berberine in murine cutaneous leishmaniasis lesions. *J Antimicrob Chem* 2022; 77(4): 1072-81. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac007>
32. Tong Y, Zhang J, Sun N, Wang X-M, Wei Q, Zhang Y, et al. Berberine reverses multidrug resistance in *Candida albicans* by hijacking the drug efflux pump Mdr1p. *Sci Bull* 2021; 66: 1895-905. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.12.035>
33. Li Y, Ge X. Role of berberine as a potential efflux pump inhibitor against MdfA from *Escherichia coli*: In vitro and in silico studies. *Microbiol Spectr* 2023; 11(2): e0332422.
34. Zack KM, Sorenson T, Joshi SG. Types and mechanisms of efflux pump systems and the potential of efflux pump inhibitors in the restoration of antimicrobial susceptibility, with a special reference to *Acinetobacter baumannii*. *Pathogens* 2024; 13(3): 197. <https://doi.org/10.3390/pathogens13030197>
35. Martin SK, Oduola AM, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* 1987; 235: 899-901. <https://doi.org/10.1126/science.3544220>
36. Valiathan R, Dubey ML, Mahajan RC, Malla N. *Leishmania donovani*: Effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. *Exp Parasitol* 2006; 114: 103-8. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.02.015>
37. Shokri A, Sharifi I, Khamesipour A, Nakhaee N, Fasihi Harandi M, Nosratabadi J, et al. The effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of *Leishmania tropica* to meglumine antimoniate. *Parasitol Res* 2012; 110(3): 1113-7. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2599-6>
38. 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): 444-62. <https://doi.org/10.5578/mb.69702>
39. Istanbul H, Bayraktar G, Karakaya G, Akbaba H, Perk NE, Cavus I, et al. Design, synthesis, in vitro - In vivo biological evaluation of novel thiazolopyrimidine compounds as antileishmanial agent with PTR1 inhibition. *Eur J Med Chem* 2023; 247: 115049. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.115049>
40. Özel Y, Çavuş İ, Yılmaz U, Tokay F, Bağdat S, Özbilgin A ve ark. Hibrit gümüş nanoparçacık komplekslerinin sitotoksik ve antileşmanyal aktivitesinin araştırılması: *Leishmania* türlerine karşı potansiyel ilaç adayları. *Mikrobiyol Bul* 2024; 58(2): 182-95. <https://doi.org/10.5578/mb.202498184>



Bu eser CC BY-NC Atıf-GayriTicari Türev Eser Yaratma 4.0 Uluslararası Lisansı kapsamında lisanslanmıştır.

Veri Paylaşım Beyanı: Bu çalışmanın bulgularını destekleyen veriler, makul talepler doğrultusunda sorumlu yazardan temin edilebilir.

©Telif Hakkı 2025 Mikrobiyoloji Bülteni’ne aittir. Makale metnine [www.mikrobiyolbul.org](http://www.mikrobiyolbul.org) web sayfasından ulaşılabilir.