

Sıtmada Etken Madde Taramalarında *in vivo* ve *in vitro* Modeller: Pilot Çalışma

In vivo and *in vitro* Models for Scanning Drug Substances in Malaria: Prestudy

Ahmet Özbilgin, İbrahim Çavuş, Alicem Nuraydın, Tuğba Kaya

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Cite this article as: Özbilgin A, Çavuş İ, Nuraydın A, Kaya T. *In Vivo* and *In Vitro* Models for Scanning Drug Substances in Malaria: Prestudy. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2017; 41: 156-63.

ÖZ

Amaç: Dünya Sağlık Örgütü *Plasmodium* türlerinin "artemisinin" içeren ilaçlara da dirençli suşlarının ortaya çıkmasıyla tüm ülkeleri "Bir Sonraki Artemisinin Avı" sloganıyla bitkisel kaynaklı antimalaryal etken maddeleri araştırmaya teşvik etmektedir. Çalışacak genç araştırmacılara rehber olacak şekilde en temel ve basit olarak sıtmanın *in vivo* ve *in vitro* modellerinin kurularak ilaç araştırmalarında ve etken madde taramalarında yardımcı olması amacıyla planlanmıştır.

Yöntemler: *In vitro* çalışmamızda sıvı azot tankından çıkarılarak uygun koşullarda çözdürülen *Plasmodium berghei* genç trofozoitleri 0.1, 0.4, 0.8, 1.6, 6.4, 12.8 µg/mL konsantrasyonunda klorokin ve tetrasiklin ilaçları ile 24 saat +37°C'de jar içerisinde çalkalamalı etüvde inkübe edilerek takip edilmiştir. *In vivo* çalışmalarda Tetrasiklin grubu (TG) ve Klorokin grubuna (KG) intragastrik lavaj yoluyla 50 mg/kg dozunda tetrasiklin ve klorokin oral yolla, tedavi almamış kontrol grubuna (TAKG) aynı miktarda ve yolla serum fizyolojik verilmiştir. Farelerdeki parazitemi 24 gün boyunca takip edilmiştir.

Bulgular: *In vitro* ilaç çalışmamızda klorokinin 0.8 µg/mL dozda parazitemiyi baskıladığı görülürken, tetrasiklinin 1,6 µg/mL dozda parazitemiyi baskıladığı görülmüştür. *In vivo* ilaç çalışmamızda KG grubunda farelerde parazitemi yok olurken TG grubundaki farelerin hepsi 24. günde, TAKG grubundaki farelerin hepsi 12. günde ölmüştür.

Sonuç: Çalışmamız, klorokin temini geciktiğinde tetrasiklin tedavisi verilmesi ile paraziteminin ilerlemesinin geciktirilebileceği bu sürede klorokinin temin edilmesiyle ve tedaviye klorokin ile devam edilmesi durumunda hastanın ex olmasının önlenebileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Plasmodium*, *in vitro*, *in vivo*, Manisa, Türkiye

Geliş Tarihi: 25.04.2017

Kabul Tarihi: 03.08.2017

ABSTRACT

Objective: The World Health Organization (WHO) encourages all countries to investigate antimalarial drug substances derived from herbal sources with the slogan "Hunt of the Next Artemisinin" due to the emergence of resistant strains of *Plasmodium* species to artemisinin. In the broad and simple sense, it was planned to help guide the young researchers set *in-vitro* and *in-vivo* models of malaria in order to be used in drug research and active ingredient studies.

Methods: *In-vitro* study, young *Plasmodium berghei* trophozoites were removed from the liquid nitrogen tank and resuspended in appropriate conditions, followed by incubation with chloroquine and tetracycline at concentrations of 0.1, 0.4, 0.8, 1.6, 6.4, 12.8 µg/mL for 24 hours at +37°C in a shaking incubator. *In-vivo* studies, Tetracycline group (TG) and Chloroquine group (KG) were administered 50 mg/kg of tetracycline and chloroquine by intragastric lavage and untreated control group (TACG) were administered the same amount of saline via the same route. The suppression of parasitemia in mice was followed for 24 days.

Results: In our *in-vitro* study it was observed that 0.8 µg/mL of chloroquine and 1.6 µg/mL of tetracycline was enough to suppress parasitemia. In our *in-vivo* drug study, all of the mice in the TG group died at day 24, and all of the mice in the TAKG group died at day 12, with no parasitemia observed in the mice in the KG group.

Conclusion: Our study suggests that if tetracycline therapy is administered when the induction of chloroquine therapy is delayed, the exacerbation of the parasitemia may be prevented and when chloroquine is obtained chloroquine therapy can be commenced thus preventing the loss of the patient.

Keywords: *Plasmodium*, *in vitro*, *in vivo*, Manisa, Turkey

Received: 25.04.2017

Accepted: 03.08.2017

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Tuğba Kaya, E.mail: tugbakaya42@yahoo.com

DOI: 10.5152/tpd.2017.5365

©Telif hakkı 2017 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2017 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolog.org

GİRİŞ

İnsanlık tarihinin eski zamanlarından bu yana bilinen sıtma, tarih boyunca tüm dünyanın ve Anadolu'nun en önemli hastalıklardan biri olmuştur. Uygurluk tarihi incelendiğinde, sıtma hastalığının Mezopotamya, Eti ve Yunan uygarlıklarının çöküş nedenleri arasında kabul edildiği görülmektedir.

Her 30 saniyede bir çocuğun sıtma nedeniyle hayatını kaybettiği dünyamızda nüfusun %40'ının sıtma riski altında bulunduğu, her yıl 300 milyon insanın enfekte olduğu ve yaklaşık 1 milyon kişinin sıtma nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmektedir. Bu nedenle 1998 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Birleşmiş Milletler Çocuk Fonu (UNICEF), Birleşmiş Milletler Gelişim Programı (UNDP) ve Dünya Bankası yeni bir mücadele başlatarak "Roll Back Malaria (RBM)" ortaklığını kurmuşlardır. Amacı 2010 yılına kadar tüm dünyada sıtma insidansını düşürmek ve risk altındaki bölgelerde yeni koruyucu önlemler geliştirmek olan bu kuruluşun planında, Türkiye Doğu Akdeniz Grubu Ülkeler içinde orta endemik riskli ülkeler arasında görülmektedir. Bu plan dahilinde WHO ve UNICEF' in yayınladığı 2005 yılı Dünya Sıtma raporunda; sıtma savaşında en büyük zorluğun ilaç direncinden kaynaklandığı ve yeni bulunan antimalaryal ilaç kombinasyonlarının hayat kurtarıcı olabileceği, pek çok ülkenin sıtma ilaç politikalarında değişiklik yaparak yeni tedavi kaynaklarına yöneldiği açıklanmaktadır (1, 2).

Sıtma ilaçlarına karşı gelişen parazit direnci günümüzde önemli sağlık sorunlarından biri olan sıtma ile savaşta başarı oranını düşürmektedir. Klorokin'e dirençli *P. falciparum* (KDPF) enfeksiyonları ilk olarak Güneydoğu Asya'da Tayland Kamboçya sınırındaki bölgede 1957 yılında görülmüş ve hızla Tayland'a yayılmıştır (3). Güney Amerika'da 1960 ve 1976 yıllarında Papua Yeni Gine'de KDPF enfeksiyonları bildirilmiştir (4, 5). Afrika'da 1978 yılında Kenya ve Tanzanya'ya seyahat eden kişilerde KDPF enfeksiyonları bildirilmiştir (6, 7). Direnç, 1983 yılından itibaren Afrika kıyı bölgelerinden içlere, Sudan, Uganda, Zambiya ve Malavi'ye yayılmıştır (8, 9). KDPF enfeksiyonlarının yayılması sonucu Tayland ve bazı Asya ve Güney Amerika ülkeleri 1973'te, Güney Afrika ülkelerinin bazıları 1988 ve bazıları da 1993 yıllarında birinci basamak ilaç seçeneği olan klorokini değiştirmişlerdir (10, 11). Klorokine dirençli *P. vivax* (KDPV) özellikle klorokin yaygın olarak kullanıldığı bölgelerde görülmüştür. KDPV enfeksiyonları 1989 yılında Kolombiya'da, 1996 yılında Güney Amerika'da bildirilmiştir. Primakin, Kinin, Proguanil ve Primetamine karşı dirençli *P. vivax* olguları ise 1987 yılında Avustralya'dan bildirilmiştir (12, 13).

Daha sonra sıtma tedavisinde *Plasmodium*'ların dihidrofolat redüktaz ve dihidropteroat sentaz enzimlerini kodlayan genlerdeki özgül gen mutasyonlarının, antifolat kombinasyon ilaçlarına karşı gelişen direnci oluşturduğu gösterilmiştir (14). Tek başına kullanıldığında Atovakon'a karşı hızla direnç gelişebilmesine karşın, Proguanil Malaron™ kombinasyonunda veya Tetrasiklin gibi ikinci bir ilaçla kombine edildiğinde direnç çok daha yavaş gelişmektedir. Direncin sitokrom b genindeki nokta mutasyon sonucu geliştiği bildirilmiştir (15). Birçok ülkede hem *P. vivax* sıtmasında hem de *P. falciparum* sıtmasında hastalığın referans ilacı olan klorokine karşı direnç geliştiği belirlenmiştir. Dirençli *Plasmodium* türleri ile enfekte hastalarda *Artemisia annua* bitkisinden elde edilen "artemisinin" adlı etken maddenin sağaltımda oldukça etkili olduğu görülmüş ve dirençli olgularda bu maddeyi içeren

ilaçlar kullanılmaya başlanmıştır. Fakat 2009 yılında *Plasmodium* türlerinin "artemisinin" içeren ilaçlara da dirençli suşlarının ortaya çıkmaya başladığı bildirilmiştir. Bu nedenle sıtmanın tedavisinde yeni ilaçlara ve yeni ilaç kombinasyonlarının araştırılmasına ihtiyaç doğmuştur. Dünya Sağlık Örgütü günümüzde tüm ülkeleri "Bir Sonraki Artemisinin Avı" sloganıyla bitkisel kaynaklı antimalaryal etken maddeleri araştırmaya teşvik etmektedir. Bu nedenle sıtmanın tedavisinde yeni ilaçlara ve yeni ilaç kombinasyonlarının araştırılmasına ihtiyaç doğmuştur (16-19).

Yeni ilaçların geliştirilmesi ve değerlendirmesi süreci iki ana değerlendirme basamağından oluşmaktadır. Klinik öncesi değerlendirmede sentez edilen veya doğal kaynaklardan izole edilen kimyasal maddelerin, insanda hastalıkların tedavisinde kullanılmaları amacıyla klinik denemelere tabi tutulabilmeleri için önce mutlaka tarama testleri ve toksisite deneyleri yapılmalıdır. Tarama Testleri; yeni sentez edilen maddeler, genellikle toksisite deneylerine tabi tutulmadan önce tarama testlerine tabi tutulurlar. İn vitro ortamlarda tarama testleri yapılabilir ancak öngörülen etkinin özelliği nedeniyle bazı tarama testlerinin in vitro ortamda yapılması doğru olmayabilir. Eğer var ise tarama testlerinde hastalığı temsil eden hayvan modelleri mutlaka kullanılmalıdır. Bu sayede geliştirilme amacını oluşturan ve sahip olması öngörülen etki ya da etkileri gösteren maddeler belirlenir. Bu özelliği bulunmayan maddeler için deneme artık bu kademededir bitmiştir. Toksikite Testleri; ancak tarama testlerini başarı ile geçen bileşikler Toksikite Testlerine tabi tutulurlar. Bu aşamada fonksiyonel, biyokimyasal ve histopatolojik toksik etkileri incelenir. Klinik değerlendirme; basamağının ise Faz I, Faz II, Faz III ve Faz IV denemelerinden oluştuğu bildirilmektedir (20).

Çalışma sıtmanın tedavisinde yeni ilaç, ilaç kombinasyonları araştırılması ve etken madde taramaları konularında çalışacak genç araştırmacılara rehber olacak şekilde yardımcı olması amacıyla temel ve basit olarak planlanmıştır.

YÖNTEMLER

Çalışmamızda *P. berghei* MRA-311 suşu kullanılmıştır. Kemiricilerin sıtma etkeni olan bu suş MR4-ATCC (American Type Culture Collection) Virginia, USA firmasından alınmıştır ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarlarında farelere 10 günde bir intravenöz pasajlar yapılarak canlılığı devam ettirilmiş ve daha sonra dereceli dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyonu yapılarak saklanmıştır. Suş kullanılacağı zaman sıvı nitrojenden çıkarılarak hızlı bir şekilde +37°C'de çözülerek in vitro ve in vivo çalışmalarda bu suş kullanılmıştır. Çalışmalarımızda etken madde ve ilaç araştırma geliştirme çalışmalarına sıtmanın tedavisinde kullanılan klorokin (Sigma C6628; Saint Louis, USA) ve tetrasiklin (Sigma T3258; Saint Louis, USA) kullanılmıştır. Etik kurul onayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu / 11.04.2017 tarafından alınmıştır.

Sıtma in vitro model;

İn vitro ilaç çalışmaları için *Plasmodium*'ların genç trofozoit formlarına ihtiyaç vardır. Önceden in vitro kültürü yapılmış ve 24 saat sonunda 10⁷ olgun şizont ve merozoit formu bulunan süspansiyondan farelere yaklaşık 0,25 mL intravenöz olarak verilmiştir. Bu fareler 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık periyodu bulunan ortamda bırakıldıklarında 4. günde kabin içerisinde farenin göğüs kafe-

si açılarak intrakardiyak olarak steril şekilde yaklaşık %3'lük genç trofozoitleri bulunduran kan enjektör yardımı ile elde edilmiştir. Kan 8 dakika 1500 rpm'da çevrilerek çökeleğin üst tarafında oluşan *Plasmodium*'lar tarafından enfekte edilmiş eritrositleri içeren koyu halka dikkatlice alınmıştır. Alınan eritrositler %10'luk FCS içeren RPMI-1640'da dondurularak sıvı nitrojende saklanmıştır. İn vitro çalışmalarımızda bu dondurulan eritrositler kullanılmıştır.

İN vitro çalışmalarımız için genç trofozoitli eritrositleri içeren fare eritrosit solüsyonu santrifüjlenerek eritrosit çökeltisi elde edilmiştir. Elde edilen çökeltiye %10 FCS eklenmiş RPMI-1640 besiyeri ile %10 oranında sulandırılmıştır. Ardından kültür plaklarına 0,5 mL enfekte eritrosit solüsyonu ilave edilmiştir (Figür 1). Üzerlerine son dilüsyonları 0,1, 0,4, 0,8, 1,6, 6,4 ve 12,8 µgr/mL olacak şekilde RPMI-1640 besiyeri ile sulandırılmış 0,5'er mL klorokin (Sigma C6628; Saint Louis, USA) ve tetrasiklin (Sigma T3258; Saint Louis, USA) eklenmiştir. Ayrıca kontrol grubu için enfekte eritrosit süspansiyonu eklenmiş çukurlara sadece RPMI-1640 besiyeri de eklenmiştir. Eritrosit süspansiyonu mikrobiyolojik jar içine yerleştirilerek %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ ortamı olan +37°C'lik çalkalamalı etüve kaldırılmıştır. CO₂ seviyesini artırmak ve O₂ seviyesini daha da azaltmak amacıyla kültür kaplarını koyduğumuz cam jar içine mumlar yerleştirilerek yakılmış ve ağzı kapatılmıştır (Figür 2). Kültivasyon 24 saat süre ile takip edilmiştir. Bu işlemler 3 kez tekrar edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir (21).

Sıtmada *in vivo* Model

İN vivo çalışmalarımız için 3-4 aylık Balb/C cinsi erkek fareler kullanılarak 3 grup oluşturulmuştur. Tüm gruplardaki fareler 20-25 gr ağırlığında olup beslenmesinde standart hayvan yemi ve içme suyu olarak da çeşme suyu kullanılmıştır.

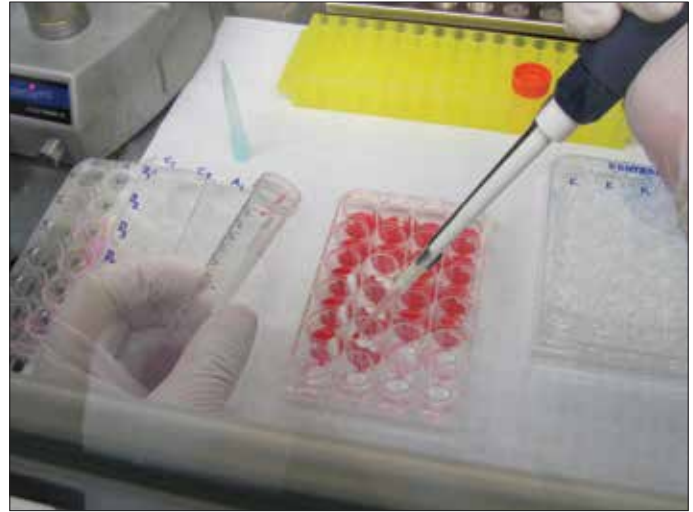
Yaklaşık %30 oranında parazitemisi bulunan enfeksiyonlu fareden alınmış ve fizyolojik su ile sulandırılarak 10⁸/mL *P. berghei* yoğunluğuna ayarlanan eritrosit solüsyonu her fareye kuyruk veninden 0,2 mL (2x10⁷ adet *P. berghei*) verilmiştir.

Çalışmamızda tetrasiklin grubu (TG), sıtma referans ilacı olan klorokin grubu (KG) ve tedavi almamış kontrol grubu (TAKG) olmak üzere 3 çalışma grubu oluşturulmuştur ve her grupta 6 adet fare olacak şekilde kafeslere alınmış etiketlenerek üzerlerine gerekli bilgiler yazılmıştır (22).

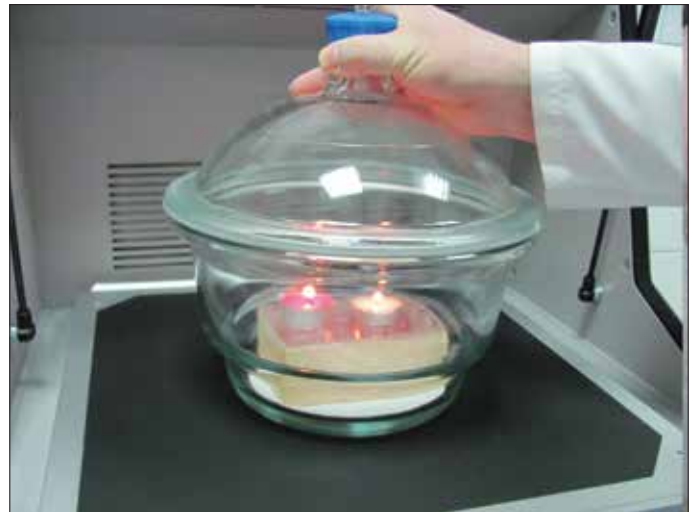
Farelere enfeksiyon verildikten 4, 24, 48, 72 saat sonra her gruba kendine özgü olan tedavi uygulanmaya başlanmıştır. TG ve KG gruplarına tedavi intragastrik lavaj yoluyla 50 mg/kg dozunda oral olarak uygulanmıştır. TAKG'na ise aynı miktarda serum fizyolojik verilmiştir (23, 24,25).

Farelere tedavi uygulandıktan sonra 2 günde bir kuyruk veninden kan alınmaya başlanmıştır. Alınan kan ile ince yama kan preparatları hazırlanmıştır. Preparatlar metil alkolle 2-3 dakika tespit edildikten sonra Giemsa boyama yöntemi ile boyanmıştır ve ışık mikroskobu ile 10 farklı sahadaki enfekte eritrositler sayılarak parazitemi oranı hesaplanmıştır (Figür 3-8). Bu işlemlere 2 günde bir kan alınmak üzere 24 gün boyunca devam edilmiştir.

Farelerdeki parazitemi hesaplanmasında; her bir alanda 100 enfekte eritrosit sayılıp yüzdeleri alınarak toplanmıştır. Elde edilen değer 10 sahanın ortalamasını almak için 10'a bölünmüştür. Bu şekilde farelerdeki ortalama parazitemi yüzdesi hesaplanmıştır (26).



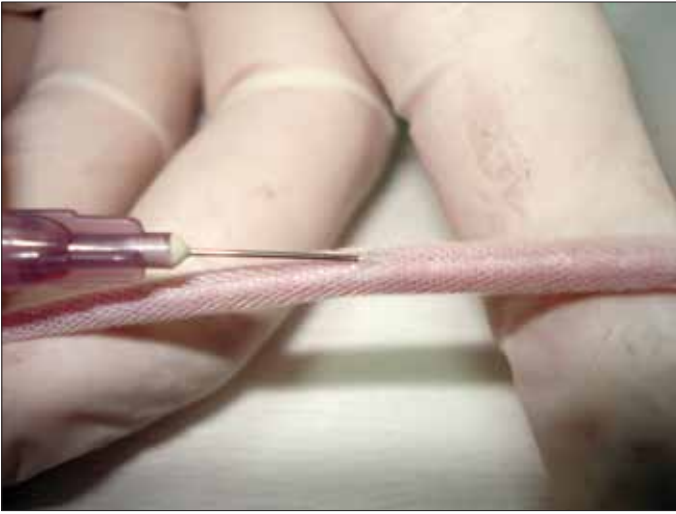
Figür 1. İn vitro direnç testleri



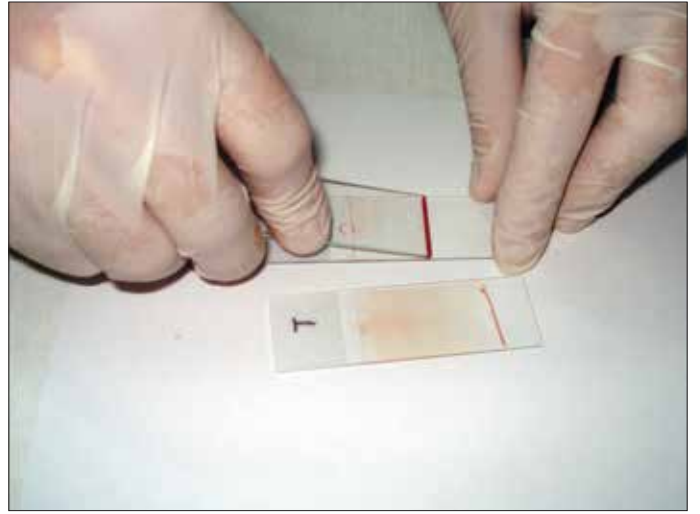
Figür 2. Mikrobiyolojik jar içinde *in vitro* kültürasyon



Figür 3. *P.berghei*'nin I.V. enfeksiyonunun enjeksiyonu için hayvanın zapturapt altına alma



Figür 4. *P.berghei*'nin I.V. enfeksiyonunun enjeksiyonu



Figür 7. Farelerin kan yaymalarının yapılması



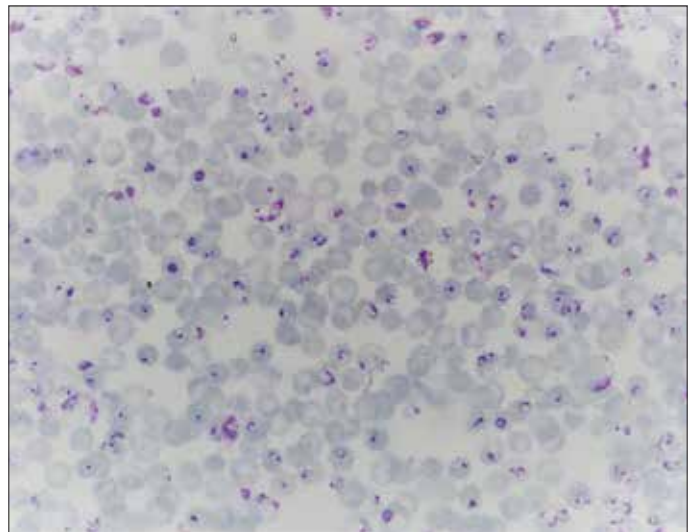
Figür 5. Farelere intragastrik gavaj yoluyla oral olarak ilaç uygulaması



Figür 8. Preparatların boyanması



Figür 6. Farelerden kan alınması



Figür 9. Kültür başlangıç ortamındaki *P. berghei*'nin genç trofozoitler (2. Saat)

BULGULAR

Plasmodium berghei'nin 24 saatlik kültüründe; kontrol grubunda inkübasyon süresinin başında enfekte eritrositlerin tamamında trofozoitler görülürken, 8-12 saatten itibaren olgun trofozoitler ve şizontlar, 22-24. saatte ise olgun şizontlar ve merozoitler saptanmıştır (Figür 9-12; Tablo 1).

İn vitro ilaç direnç testlerinde, klorokin içeren çukurcukların 0,8 µg/mL dozda klorokin içeren kısımlarında enfekte eritrositlerin tamamında trofozoit evresi bulunmuş, ancak şizont evresine geçişin engellendiği tespit edilmiştir. Tetrasiklin içeren gruplarda ise % 21 şizont evresine geçiş olduğu belirlenmiştir. 0,1 ve 0,4 olan ilaç dozlarında tetrasiklin çukurcuklarında sırasıyla %12, %0,5 oranlarında şizont evresi belirlenmiş, klorokin çukurcuklarında ise eritrositlerin tamamında trofozoit formları belirlenmiştir. İlaç dozu 1,6, 6,4 ve 12,8 µg/mL olan çukurcuklarda ise hem tetrasiklin hem de klorokin çukurcuklarında 24 saat sonunda enfekte eritrositlerin tamamında trofozoit formları belirlenmiştir.

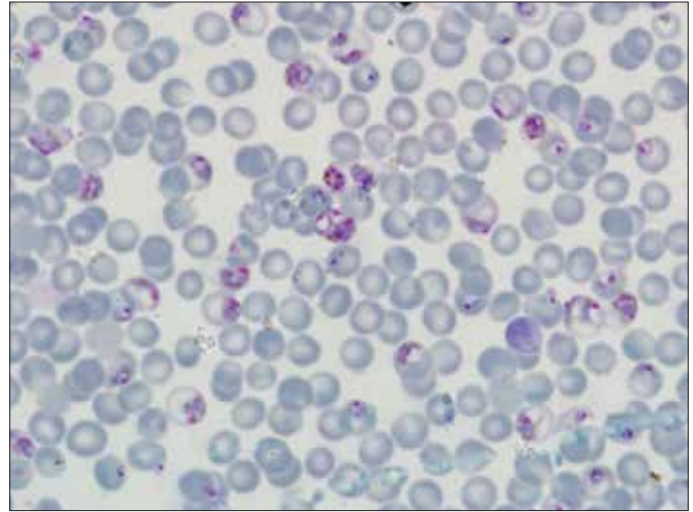
İn vivo ilaç çalışmalarımız sonucu ise tabloda görüldüğü üzere klorokin grubunda 4. günden itibaren parazitemi oranı azalmaya başlamış, 8. günde parazitemi oranı 0,26'ya kadar düşmüş ve 10. gün enfeksiyon tamamen ortadan kalkmıştır (Figür 13-16; Tablo 2). TAKG'unda parazitemi oranı devamlı olarak artarak 10.günde parazitemi oranı 28,92'ye ulaşmıştır ve 12. günde gruptaki tüm fareler ölmüştür. TG' unda ise 22. günde parazitemi oranı 29,82'ye yükselmiş ve 24. günde fareler ölmüştür. Aslında TG' unda TAKG' una paralel olarak parazitemi oranı devamlı olarak artmış ancak bu oran aşamalı ve yavaş bir şekilde arttığı için bu gruptaki farelerin yaşam ömrü uzamıştır. Ki-kare (χ^2) testi ile klorokin ve tetrasiklin

Tablo 1. Kültür başlangıcından itibaren zamana göre *P. berghei*'nin eritrositler formlarının gelişimi

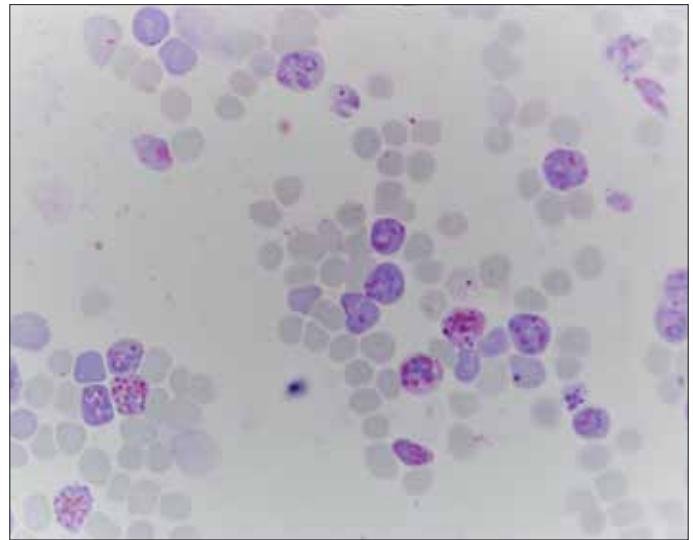
Genç Trofozoitler	Kültürün başlangıcından sonraki 6-7 saat
Olgun Trofozoitler	Kültürün başlangıcından sonraki 8-11 saat
Genç Şizontlar	Kültürün başlangıcından sonraki 12-16 saat
Olgun Şizontlar ve Merozoitler	Kültürün başlangıcından sonraki 22-24 saat

Tablo 2. İn vivo çalışma gruplarındaki parazitemi Oranları

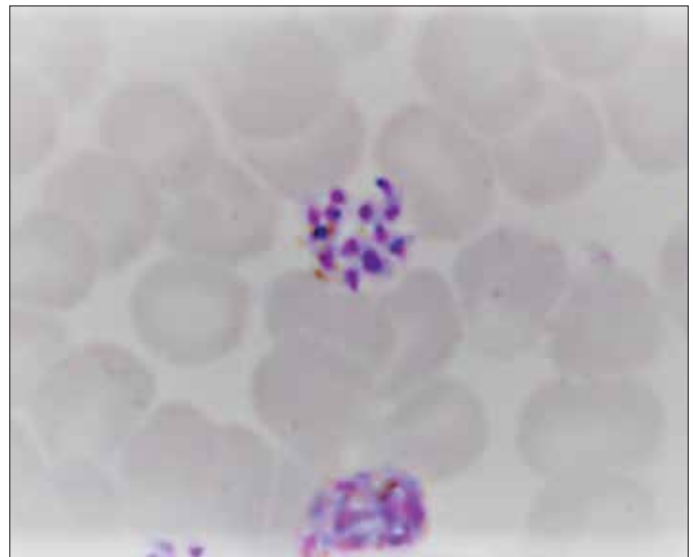
GÜN	TG	KG	TAKG
2	1,06	1,03	1,32
4	2,18	2,22	3,43
6	2,70	1,69	7,00
8	3,10	0,26	14,18
10	4,12	0,00	28,92
12	8,31	-	Ex
14	12,10	-	-
16	18,90	-	-
18	22,21	-	-
20	25,43	-	-
22	29,82	-	-
24	Ex	-	-



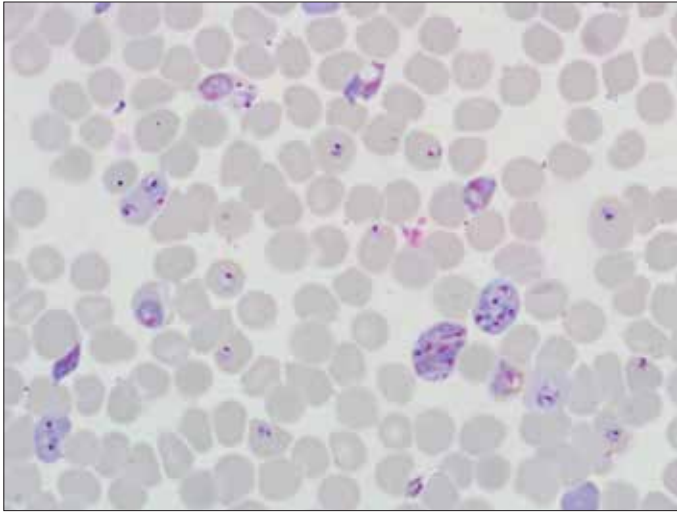
Figür 10. Kültür ortamındaki *P. berghei*'nin şizontlar (12. Saat)



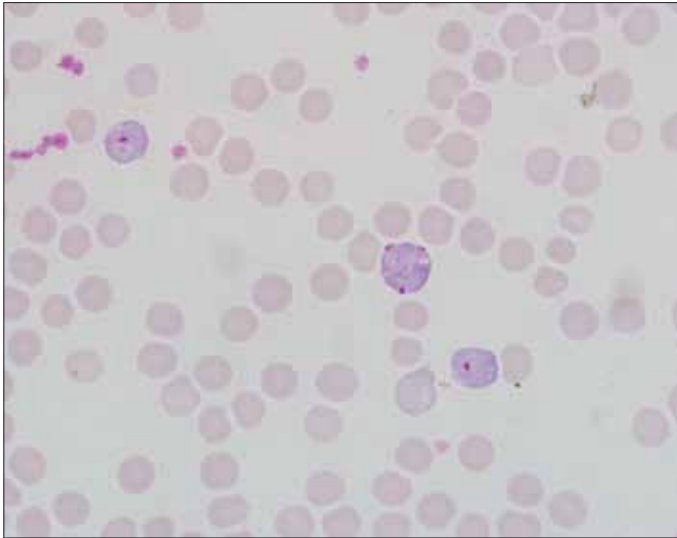
Figür 11. Kültür ortamındaki *P. berghei*'nin olgun şizontlar (22. Saat)



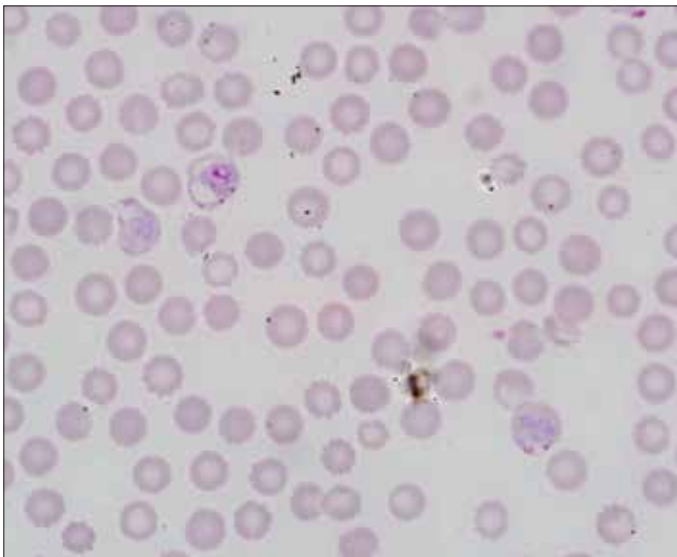
Figür 12. Kültür ortamındaki *P. berghei*'nin merozoitler (24. Saat)



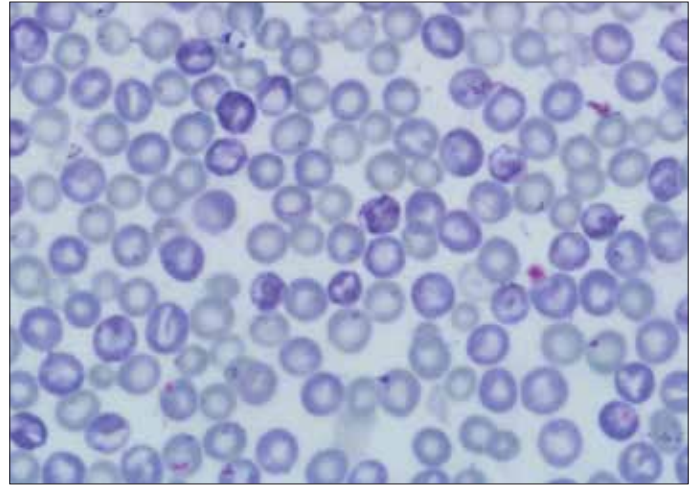
Figür 13. Tedavi Almamış Kontrol Grubu



Figür 14. Klorokin Grubu 4. gün kandaki parazitemi



Figür 15. Klorokin Grubu 6. gün kandaki parazitemi



Figür 16. Klorokin Grubu 10. günde kandaki paraziteminin kayboluşu

lin ilaç grupları arasında kandaki parazitemi açısından değerlendirildiğinde 6. güne kadar anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$) 8. günden sonra ise anlamlı ($p<0,05$) bir fark bulunmuştur.

TARTIŞMA

Geniş spektrumlu antibiyotiklerden birisi olan ve 1940'ların başında keşfedilmiş olan tetrasiklinlerin, *Plasmodium* da dahil olmak üzere bir çok protozoa üzerine etkili olduğu belirtilmiştir. Ancak tetrasiklinlerin parazitler üzerine etkileri ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. (27).

Klorokin kandaki eritrositer şizogoni şekillerine hızlı bir şekilde etkili olan, güvenli ve uygun dozlarda verildiğinde hasta tarafından iyi tolere edilebilen kan şizontosidi olarak değerlendirilmektedir (28, 29, 30, 31).

Biz bu çalışma da sıtma tedavisinde başarı ile kullanılan klorokini ve *Plasmodium*'lara karşı etkili olduğu bilinen tetrasiklini antimalarial etkisinden dolayı seçilmiştir. Seçilen bu iki ilacın *P. berghei* üzerine *in vivo* ve *in vitro* modellerdeki etkinliğini çalışarak Türkiye'de sıtma konusunda yapılacak olan *in vitro* ve *in vivo* modellerdeki ilaç çalışmaları ve etken madde taramaları için birçok araştırmacıya rehber olması amaçlanmıştır.

In vitro olarak 22-24 saatlik bir sürede parazitlerin halka formlarından olgun şizontlara dönüştüğü ve sadece bir gelişimsel döngü geçirdiği bildirilmiştir. Kültür ortamında, *P. berghei* olgun şizontlarının kendiliğinden patlayamadığı ve kültürde retikülosit miktarının az olduğundan merozoitlerin başka hücrelere girişinin sınırlı olduğu saptanmıştır. Parazitlerin gelişim oranı sıcaklığa bağlı olduğundan dolayı kültür ortamının sıcaklığının kritik öneme sahip olduğu rapor edilmiştir. Parazitlerin; 38.5°C'nin üzerinde dejenerasyonu olduğu ve 37°C'nin altında ise parazitlerin canlı olgun şizontlara dönüştüğü, ancak gelişim süresinin uzadığı bildirilmektedir. Parazitlerin 30°C sıcaklıkta bile olgun şizontlara dönüştüğü ancak bunun 48 saatten daha fazla sürdüğü belirtilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda genç trofoziterin kültür başlangıcından itibaren 6.-7. saatte kültürde görüldüğü bildirilirken, bu süre olgun trofoziter için kültür başlangıcından sonraki 12.-13. saatte, genç şizontların kültür başlangıcında sonraki 16.-17. saatte, olgun şizontların

ise kültür başlangıcından sonraki 21.-22. saatte görüldüğü belirtilmektedir (32, 21).

Bizde çalışmamızda kontrol kuyucuklarında genç trofozitolere kültür başlangıcından 6-7 saat sonra rastlarken, olgun trofozitolere, genç şizontlara, olgun şizontlara ve merozoitlere sırasıyla kültür başlangıcından sonraki 8-11, 12-16, 22-24 saat sonra rastladık.

İlaçsız kontrol grubu olarak *P. berghei*'lerin evrimini izlediğimiz kuyucukların tamamında kültürün tamamlandığı 24. saatin sonunda olgun şizont ve merozoitler görülmüştür.

İn vitro ilaç direnç testlerinde, klorokin içeren çukurcuklarda 24 saatin sonuna kadar 0,8 µg/mL dozda klorokin içeren kısımlarında enfekte eritrositlerin tamamında trofozoit evresi bulunmuş, ancak şizont evresine geçişin engellendiği tespit edilmiştir. Tetrasiklin içeren gruplarda ise % 21 şizont evresine geçiş olduğu belirlenmiştir. 0,1 ve 0,4 olan ilaç dozlarında ise, tetrasiklin çukurcuklarında sırayla %12, %0,5 oranlarında şizont evresi belirlenmiş, klorokin çukurcuklarında ise eritrositlerin tamamında trofozoit formları belirlenmiştir. İlaç dozu 1,6, 6,4 ve 12,8 µgr/mL olan çukurcuklarda ise hem tetrasiklin hem de klorokin çukurcuklarında 24 saat sonunda enfekte eritrositlerin tamamında trofozoit formları belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada *P. berghei* tedavisi için farelere 4 gün boyunca 50 mg/kg dozunda tetrasiklin verildiğinde güçlü antimalarial etki gösterdiği bildirilmiştir (25).

Yapılan diğer bir çalışmada ise 50 mg/kg oral dozla 3 gün boyunca klorokin verilen farelerde *Plasmodium*'un eritrosit formlarının 10. günde kanda tamamen temizlendiğinin görüldüğü bildirilmiştir (33).

Klorokin gruplarında tedavi dozu olarak günde tek doz 50 mg/kg olarak oral yolla 3 gün boyunca farelere klorokin verilen başka araştırmacıların yaptığı çalışmalarda da benzer sonuçların alındığı rapor edilmiştir (24, 34).

Klorokinin tedavi dozu olarak günde tek doz 50 mg/kg olarak oral yoldan 3 gün boyunca verilen çalışmalarda paraziteminin 10. günde tamamen kaybolduğu saptanmış ve klorokinin kemirgen sıtma türleri ile oluşturulan fare modellerinde gösterdiği bu etki farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda bu çalışmalara paralel olarak 50 mg/kg dozlarda oral olarak ilaç verilen gruplarda 10. gün paraziteminin tamamen kaybolduğu görülmüştür.

Tetrasiklin dozu olarak ise diğer araştırmacılar da kanda parazitemiyi sınırladığını bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada ise ilk gün günde 2 kez, 2. ve 3. gün ise tek doz olarak 50 mg/kg tetrasiklin uygulandığında; tetrasiklinin parazitemiyi enfeksiyon başlangıcından 96. saate kadar sınırladığı, 96. saatten sonra bu baskılamanın azalmaya başladığı ve paraziteminin artarak 22. günde 29,82'ye ulaştığı, 24. gün ise gruptaki tüm farelerin öldüğü görülmüştür. Tetrasiklin grubunun klorokin grubuna göre parazitemiyi azaltmamış, tetrasiklin grubunda sadece parazitemiyi baskılamış, klorokin grubunda parazitemi 10. günde tamamen kaybolduğu görülmüştür. Kontrol grubunda ise parazitemi diğer iki gruba göre daha hızlı artarak 10. gün 29,82 ye ulaşmış ve 12. gün de gruptaki tüm farelerin öldüğü görülmüştür.

SONUÇ

Çalışacak genç araştırmacılara rehber olacak şekilde en temel ve basit olarak sıtmanın *in vivo* ve *in vitro* modelleri kurularak ilaç araştırmalarında ve etken madde taramalarında yardımcı olması amacıyla planlanan çalışmamızda aldığımız sonuçların literatür bilgileri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca klinisyenlerin klorokin temininin gecikmesi durumunda hasta kaybının önlenmesi için tetrasiklin tedavisi verilmesinin parazitemiyi baskılayarak hastanın ölmesinin de ertelenebileceğini düşündürmüştür.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınmıştır.

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.Ö., T.; Tasarım - A.Ö., T.K., İ.Ç.; Denetleme - T.K., İ.Ç., A.N.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - A.Ö., İ.Ç., A.N.; Analiz ve/veya Yorum - A.Ö., T.K., A.N.; Literatür Taraması - T.K., İ.Ç., A.N.; Yazıyı Yazan - A.Ö., T.K.; Eleştirel İnceleme - A.N., İ.Ç.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine Local Ethics Committee for Animal Experiments.

Informed Consent: Not required in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - A.Ö., T.K.; Design - A.Ö., T.K., İ.Ç.; Supervision - T.K., İ.Ç., A.N.; Data Collection and/or Processing - A.Ö., İ.Ç., A.N.; Analysis and/or Interpretation - A.Ö., T.K., A.N.; Literature Review - T.K., İ.Ç., A.N.; Writing - A.Ö., T.K.; Critical Review - A.N., İ.Ç.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Who. World Malaria Report. Who And Unicef, (Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241593199/en/>)
2. World Malaria Report 2012. Available From: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/
3. Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C. Chloroquine-Resistant *Falciparum* Malaria In Thailand. *Lancet* 1965; 2: 657-60. [CrossRef]
4. Moore DV, Lanier JE. Observations on Two *Plasmodium falciparum* Infections With an Abnormal Responce To Chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 1961; 10: 5-9. [CrossRef]
5. Grimond TR, Donovan KO, Riley ID. Chloroquine Resistant Malaria In Papua New Guinea. *P N G Med J* 1976; 19: 184-5.
6. Campbell CC, Chin W, Collins WE, Teutsch SM, Moss DM. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* from East Africa: cultivation and drug sensitivity of the Tanzanian I/CDC strain from an American tourist. *Lancet* 1979; 2: 1151-4. [CrossRef]
7. Fogh S, Jepsen S, Effersoe P. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* Malaria in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hgy* 1979; 73: 228-9. [CrossRef]

8. Ekue J, Ulrich Am. Chloroquine Resistant Malaria İn Zambia. Br Med J Clin Res Ed 1983; 286: 1315-6. [CrossRef]
9. Who. Onori, E. *Plasmodium Falciparum* Drug Resistance İn Africa. 60, Pp: 899-906, Geneva, Switzerland (1984).
10. Boland PB, Kazembe PN, Oloo AJ, Himonga B, Barat LM, Ruebush TK. Chloroquine İn Africa. Trop Med Int Health 1998; 3: 543-52. [CrossRef]
11. Boland PB, Ettling M. Making Malaria Treatment Policy İn The Face Of Drug Resistance. Ann Trop Med Parasitol 1999; 93: 5-23. [CrossRef]
12. Kshirsagar NA, Gogtay NJ, Rajgor D, Dalvi SS, Wakde M. An unusual case of multidrug-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Mumbai (Bombay), India. Ann Trop Med Parasitol 2000; 94: 189-90. [CrossRef]
13. Boland PB. Drug Resistance İn Malaria. Who, Cdc Monograph 2001; Pp: 2-25.
14. Plowe CV, Kublin JG, Duombo OK. P. *Falciparum* Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase Mutations: Epidemiology and Role in Clinical Resistance to Antifolates. Drug Resistance Updates 1998; 1: 389-96. [CrossRef]
15. Makler MT, Palmer CJ, Ager AL. A Review of Practical Techniques for the Diagnosis of Malaria. Ann Trop Med Parasitol 1998; 92: 419-33. [CrossRef]
16. Who. Monograph On Good Agricultural Collection Practices For *Artemisia Annua*. Who Library Cataloguing-In Publication Data, (2006).
17. Who. The Hunt For The Next Artemisinin, Tdr News, No.79, Dec. (2007).
18. Who. World Malaria Report, Who Library Cataloguing-In-Publication Data, Isbn 978 92 4 156390, (2009a).
19. Who. Containment Of Artemisinin Tolerant Parasites İn South-East Asia Version 1, 28 April, Pp: 1-11, (2010b).
20. Kayaalp OS. Klinik-Öncesi Değerlendirmesi. Klinik Farmakolojinin Esasları Ve Temel Düzenlemeler. S.29-46. 4. Baskı, Faryal Matbaacılık, Ankara, (2008).
21. Östan İ, Kurt Ö, Özbişgin A. *Plasmodium berghei*'nin *In vitro* Kültürü: Klorokin Ve Artesunat İlaç Direnç Testlerinin Uygulanması. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19: 909-12. [CrossRef]
22. Muregi FW, Ishih A, Miyase T, Suzuki T, Kino H, Amanod T, Mkoji GM, Terada M. Antimalarial Activity Of Methanolic Extracts From Plants Used İn Kenyan Ethnomedicine And Their İnteractions With Chloroquine (Cq) Against A Cq-Tolerant Rodent Parasite, İn Mice. J Ethnopharmacol 2007; 111: 190-5. [CrossRef]
23. Ural İO, Kayalar H, Durmuskahya C, Cavuş İ, Özbişgin A. *In vivo* Antimalarial Activity Of Methanol And Water Extracts Of *Eryngium Thorifolium* Boiss (Apiaceae Family) Against *P. berghei* in Infected Mice. Tropical Journal Of Pharmaceutical Research August 2014; 13: 1313-7. [CrossRef]
24. Elufioye TO, Agbedahunsi JM. Antimalarial Activities Of *Tithonia Diversifolia* (Asteraceae) And *Crossopteryx Febrifuga* (Rubiaceae) On Mice *in Vivo*. J Ethnopharmacol 2004; 93: 167-71. [CrossRef]
25. Draper MP, Bhatia B, Assefa H, Honeyman L, Garrity-Ryan LK, Verma AK, et al. *In vitro* And *In vivo* Antimalarial Efficacies Of Optimized Tetracyclines. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 3131-6. [CrossRef]
26. Girginkardeşler N, Balcıoğlu İC, Deęerli K, Limoncu ME, Ok ÜZ, Özbişgin A. Trimetoprim-Sülfametaksazol, Eritromisin Ve Klorokinin Farellerdeki *Plasmodium yoelii* Enfeksiyonuna Karşı İn Vivo Etkilerinin Karşılaştırılması. türkiye parazitoloj derg 1997; 21: 233-6.
27. Gaillard T, Madamet M, Pradines B. Tetracyclines İn Malaria. Malar J 2015; 14: 445. [CrossRef]
28. Kuman HA. Sıtma (Malaria). Ed. Özcel, M. A. Gap'ı Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. S: 31-55. T Paraz Dern Yayın No:13, 19959, (1993).
29. Özcel MA. Sıtma Epidemiyolojisi. Tıbbi Parazit Hastalıkları Kitabı. Editör: Özcel MA. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 22. Bölüm; Kan Ve Dokularda Görülen Protozoon Hastalıkları. S:79-140, İzmir, (2007).
30. Who. Guidelines For The Treatment Of Malaria. Second Edition, Geneva, Switzerland, Pp:13-56 (2009b).
31. Özbişgin A, Topluođlu S, EsS, İşlek E, Mollahalilolođlu S, Erkoç Y. Sağlıkta Dönüşüm Programı Kapsamında Sıtmayla Savaş Programının Detaylı Analiz Ve Değerlendirme Çalışması Ed: Prof. Dr. Recep Akdağ T.C. Sağlık Bakanlığı Analiz Raporu 2-40, Ankara (2010).
32. Janse CJ, Ramesar J, Waters AP. *Plasmodium berghei*: General Parasitological Methods. Laboratory Guide Book, 2004; Pp.1-14, Leiden University Medical Center (Lumc) Press, Netherland, 2004.
33. Özbişgin A, Kayalar H, Östan İ, Durmuşkahya C, Tabak T, Yakın V, Aşar K, Muslu H. Türkiye'de Yayılış Gösteren Bazı Endemik Bitki Türlerinin Sıtma Modellerinde Antimalaryal Etkisinin Araştırılması: Klinik Öncesi Tarama Testleri. Tübitak Projesi, Tübitak Proje No: 108S168, 2011.
34. Girginkardeşler N, Balcıoğlu İC, Deęerli K, Limoncu ME, Ok ÜZ, Özbişgin A. Trimetoprim-Sülfametaksazol, Eritromisin Ve Klorokinin Farellerdeki *Plasmodium yoelii* Enfeksiyonuna Karşı İn Vivo Etkilerinin Karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg 1997; 21(3), S. 233-6.