

Sıtma Modeli Etkenleri ile Kriyoprezervasyon Çalışmaları ve Kriyobanka Oluşturulması

Cryopreservation of Plasmodia with Malaria Models and Establishment of a Cryobank

Ahmet ÖZBİLGİN¹, İpek ÖSTAN², Tuba TABAK¹, Kamil AŞAR¹

¹Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa

²Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Manisa, Türkiye

ÖZET

Amaç: Kriyoprezervasyon basit olarak dondurarak saklama olup amacı, gerekli olduğunda donmuş hücreleri ısıtarak canlılıklarını, fonksiyonlarını ve antijenik yapılarını bozmadan tekrar elde etmektir.

Yöntemler: Bu çalışmada *Plasmodium yoelii* ve *Plasmodium berghei* ile enfekte farelerden elde edilen ve %20 oranında parasitemisi bulunan eritrositlere koruyucu olarak son konsantrasyonu %15 olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Her iki *Plasmodium* türünün bulunduğu tüpler sırasıyla oda ısısında 10 dakika, +4°C de 30 dakika, -20°C de 90 dakika tutulduktan sonra -80°C de korunmuşlardır. Bir kısmı burada bırakılırken bir kısmı da -80°C de 3 saat bekletildikten sonra -196°C lik sıvı azot tankına kaldırılmıştır. Altı ay boyunca ayda bir her saklama grubundan alınan örnekler 37°C' lik su banyosunda hızla çözündürülmüş ve eritrosit süspansiyonları farelere intravenöz olarak verilerek parazitemi takip edilmiştir.

Bulgular: Enfekte eritrositlerde bulunan *P. yoelii* ve *P. berghei*'nin -80°C ve -196°C'lik sıcaklıklarda. 1. aydan 6. aya kadar aynı oranda canlılıklarını ve virülanslarını koruyarak farelerde enfeksiyon oluşturabildikleri saptanmıştır.

Sonuç: *P. yoelii* ve *P. berghei*'nin eritrosit formlarının dondurularak başarı ile saklanması mümkün olabileceği görülmüştür. Bu da *Plasmodium* ve diğer parazit suşlarının saklanması için kriyobankaların kurulabileceğini ve bunun birçok avantajı beraberinde getirebileceğini düşündürmektedir. (*Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34: 146-51)

Anahtar Sözcükler: Sıtma, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium berghei*, kriyoprezervasyon

Geliş Tarihi: 28.07.2010

Kabul Tarihi: 22.10.2010

ABSTRACT

Objective: Cryopreservation is simply a method of keeping living cells frozen with the chance of regaining cellular viability, functions and antigenic structures whenever required, after heating.

Methods: In the present study, dimethyl sulphoxide (DMSO) was mixed with the red blood cells having 20% of parasitemia obtained from the mice infected with *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei* at a final concentration of 15%. For cryopreservation: both test tubes containing each *Plasmodium* species were kept 10 minutes at room temperature, 30 minutes at +4°C, 90 minutes at -20°C and finally at -80°C. Some were left at this temperature, while some were transferred into the liquid nitrogen tank at -196°C after being left at -80°C for three hours.

Results: Our observations and assessments demonstrated that both *P. yoelii* and *P. berghei* might keep their viability and virulence at -80°C and -196°C between the first and the sixth months of cryopreservation.

Conclusion: It can be concluded that the cryopreservation of *P. yoelii* and *P. berghei* at -80°C and -196°C are successful, indicating the advantage of the establishment of parasite cryobanks in research laboratories. (*Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34: 146-51)

Key Words: Malaria, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium berghei*, cryopreservation

Received: 28.07.2010

Accepted: 22.10.2010

Giriş

Sıtma insanlık tarihinde çok önemli rol oynayan, günümüzde de uluslararası seyahatlerin yaygınlaşması ile hastalığın endemik olduğu bölgelerden diğer bölgelere taşınabilmesi, hastalık etkenlerinin ve vektörlerinin ilaçlara direnç kazanması nedeniyle önemini koruyan bir enfeksiyondur. Anofel cinsi dişi sivrisineklerin bulaştırdığı *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* ve *P. ovale* insan sıtma etkenleri olarak bilinmektedir (1, 2). Son yıllarda Güney-Doğu Asya ülkelerinden *P. knowlesi* ile enfekte insan sıtma olguları bildirilmekte ve bu tür beşinci insan sıtma etkeni olarak değerlendirilmektedir (3). Hastalık Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya' da kontrol altına alınabilmiş, Afrika ve Asya' da ise insektisitlere karşı oluşan direnç, yan etkileri nedeniyle insektisit kullanımının sınırlı kalması ve *Plasmodium*'ların ilaçlara karşı direnç geliştirmesi nedenleri ile büyük insan kitleleri enfeksiyon riski altında bulunmaktadır (4).

Ülkemizde görülmekte olan sıtma türü *P. vivax*' ın neden olduğu tersiyana sıtmasıdır. Bu sıtma türü, genelde öldürücü olmaması, nöksler yaparak hastalarda uzun süre devam etmesi, kilo ve enerji kaybına neden olarak hastaları çalışamaz ve üretmez duruma getirmesi nedeniyle Anadolu insanının geri kalmışlığında önemli bir etken olarak görülmektedir. Diğer sıtma çeşitleri ise zaman zaman yurt dışından gelen olgular şeklinde görülmekte, ancak *P. falciparum* ve *P. malariae*' nin yerli bulaş yapma riskinin her zaman var olduğu belirtilmektedir (1, 2). Sıtma ülkemiz için bir halk sağlığı sorunu olması yanında, büyük ekonomik kayıplara neden olan ve kalkınma seferberliğinde mutlaka kontrol altına alınması gereken bir hastalık olma özelliğini korumaktadır (3). Bu nedenle tedavideki yeni seçenekleri araştırmak, aşı çalışmalarını hızlandırmak ve parazitin direnç mekanizmasını aydınlatmak amaçlarıyla sıtmanın çok yönlü araştırılması uygun bulunmaktadır.

Laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda insan sıtması etkeni olan *Plasmodium* türleri ile çalışmak oldukça güçtür. Bugün sıtma konusundaki laboratuvar araştırmalarının birçoğunda, sıtmanın moleküler biyolojisini, biyokimyasını, immünolojisini ve genetiğini incelemek için kemirgen sıtma türleri kullanılmaktadır (6, 7). Tüm kemirgen sıtma türleri laboratuvar fareleri ve genç sıçanlarda üretilmektedir. 1948 yılında kemirgen canlılardan ilk izole edilen tür *P. berghei* olmuş, daha sonra *P. yoelii*, *P. inckei* ve *P. chabaudi* türleri izole edilerek sıtma araştırmalarında model olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu türlerin her biri ayrı biyolojik

özellikleri ile farklı amaçlar için kullanılmaktadırlar. *P. berghei* diğer türlerden önce izole edildiği için en geniş kullanım alanı bulan tür olmuştur ve ekzojen gen transfeksiyonu için stabil bir model olarak çalışmalarda yer almaktadır. *P. yoelii* yeni ilaç ve aşıların geliştirilmesi çalışmalarında değerli bir tür olarak bilinmektedir (8-10).

Kriyoprezervasyon yöntemi ile pek çok protozoon dondurularak uzun süre saklanmakta ve canlılıklarını, antijenik yapılarını, fonksiyonlarını kaybetmeden gerektiği zaman kullanılmaktadırlar. Sıtmanın laboratuvar çalışmalarında kemirgen sıtma türlerinin kriyoprezervasyonu sıklıkla kullanılmakta ve pek çok açıdan yarar sağlamaktadır. Bu yöntem ile uzun süreli suş aktarım yöntemlerinin ve deney hayvanları kullanımının zorlukları aşıldığı gibi parazitin biyolojik karakterlerinin değişimi de önenebilmektedir (9).

Bu çalışmada, laboratuvar araştırmalarında en çok kullanılan kemirgen sıtma türlerinden olan *P. berghei* ve *P. yoelii*'nin iki farklı ısı derecesinde karşılaştırmalı kriyoprezervasyonunu gerçekleştirmek ve kriyoprezervasyon sonrası belli aralıklarla çözdürülen parazitler ile oluşturulan sıtma modellerinde *Plasmodium*'ların infektivitelerinin takibi amaçlanmıştır. Çalışma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında kurulması hedeflenen parazit kriyobankasının, sıtma parazitleri ile ilgili bölümünün ön çalışması niteliğindedir.

Gereç Ve Yöntem

Deney hayvanları: 2-4 aylık, ortalama 20 gr ağırlıkta Balb/C cinsi erkek fareler kullanılmıştır. Fareler Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Her grup fare üzerine tülbent gerilmiş ayrı kafeslerde muhafaza edilmiş, standart hayvan yemi ile ve kafeslere yerleştirilen şişelerdeki şehir suyu ile beslenmişlerdir.

Parazit suşu: Çalışmada kullanılan *Plasmodium* suşları: "American Type Culture Collection" (ATCC) firmasının "Malaria Research and Reference Reagent Resource Center" (MR4) merkezinden temin edilen *P. yoelii* 17x (MRA-267) ve *P. berghei* anka (MRA-311) suşlarıdır.

***P. yoelii* ve *P. berghei* ile fare enfeksiyonları:** Donör fareleri oluşturmak üzere 5 fareye, fare başına 10⁷ enfekte eritrosit/0.25 ml kan kuyruk veninden enjekte edilmiştir. Eldeki suşun farelerdeki etkisi, enfekte eritrositlerin enjeksiyonundan 2 gün sonra başlayarak 2 günde bir, 30 gün boyunca, farelerin kuyruk ucundan



Resim 1. Donör farelerde enfeksiyon oluşturmak için kuyruk veninden *P. berghei* ile enfekte eritrositlerin verilme işlemi

kesilerek alınan kandan hazırlanan ince yayma preparatların incelenmesiyle belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak iki farklı sıcaklık derecesinde kullanılmak üzere her *Plasmodium* türü için 5'er fareli 2'şer grup oluşturulmuştur. Bu fareler, *P. berghei* ve *P. yoelii* ile enfekte edilmiş donör farelerin koltukaltı venlerinden (*vena axillaris*) toplanan kanlar ile enfekte edilmişlerdir (Resim 1-2) (11-13).

P. yoelii ve P. berghei içeren eritrositlerin dondurularak saklanması: *P. yoelii* ve *P. berghei*'nin eritrosit formları; donör farelerin koltukaltı veninden toplanan kanın 1/3 oranında heparin içeren serum fizyolojik içinde süspansiyon edilmesiyile elde edilmiştir. Eritrositlerdeki enfeksiyon oranı, hazırlanan ince yayma kan preparatlarının Giemsa ile boyanması ve 10 ayrı sahada 100'er eritrositin sayılmasıyla saptanmıştır. Antikoagülan solüsyon içindeki *P. yoelii* ve *P. berghei* ile enfekte eritrosit süspansiyonları ayrı ayrı 1500 devirde 10 dakika santrifüj edilerek, üst kısımları atılmıştır. Dipte toplanan eritrositler fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile 1500 devirde 10 dakika süreyle iki kez yıkanmıştır. Yıkama sonucu dipte kalan kısımdan alınan 2 ml eritrosit çökelmesine 8 ml PBS eklenerek %20 oranında *P. yoelii* ve *P. berghei* ile enfekte eritrosit süspansiyonları elde edilmiştir. Bu süspansiyonların 8,5 ml.sine 1,5 ml dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek, son konsantrasyonu %15 olan DMSO içeren eritrosit süspansiyonu elde edilmiş ve kriyoprezervasyon tüplerine 1'er ml olarak paylaştırılmıştır.

Tüpler sırasıyla oda ısısında 10 dakika, +4°C de 30 dakika, -20°C de 90 dakika tutulduktan sonra -80°C ye aktarılmıştır. Bir kısmı burada bırakılırken, bir kısmı da -80°C de 3 saat bekletildikten sonra -196°C'lik sıvı azot tankına kaldırılmıştır. Ayda bir her saklama grubundan alınan örnekler +37°C' lik su banyosunda hızla çözündürülmüş, eritrosit süspansiyonları 10 adet farenin kuyruk venlerinden 0.2 ml verilmiş ve gün aşırı, ince yayma kan preparatlarında enfeksiyonun gelişimi kontrol edilmiştir. Her ay bu işlem tekrarlanarak kriyoprezervasyon yapılan suşların canlılıkları ve virülansları takip edilmiştir (Resim 3) (11-13).

Paraziteminin takibi: Farelerdeki parazitemi oranının takibi enfekte eritrositlerin enjeksiyonundan 2 gün sonra başlayarak iki günde bir, 30 gün boyunca farelerin kuyruk veninden alınan kan ile hazırlanan ince yayma kan preparatlarının Giemsa ile boyanması ve ışık mikroskopunda incelenmesiyle yapılmıştır. Enfeksiyon oranları x10 büyütme oküler ve x100 büyütme immersiyon objektifli ışık mikroskopunda 10 ayrı sahada 100'er eritrosit sayılarak belirlenmiştir (Resim 4).

Araştırmanın etik kurul onay raporu, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AKUHADYEK)' ndan alınmıştır.

Bulgular

P. berghei ve *P. yoelii* suşlarının, kriyoprezervasyon sonrası çözündürülerek kullanılan parazitlerle oluşturulan fare modellerinde virülanslarının devam ettiği gözlenmiştir. *P. berghei* ve *P. yoelii*'nin -80°C ve -196°C de depolanan örneklerinin 1., 2., 3., 4., 5., ve 6. ayların sonunda enfeksiyon oluşturabildikleri, her iki saklama sıcaklığında ve saklama sürelerinde benzer ve birbiri ile paralel seyreden parazitemi yüzdeleri gösterdikleri saptanmıştır. Yapılan tek tönü varyans analizinde kontrol grupları ile diğer grupların ve aynı günlerdeki 2 tür parazitin enfeksiyon yüzdeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 1 ve Tablo 2'de iki farklı saklama sıcaklığına ve aylara göre sıvı azotta saklanan suşların eritrositlerdeki enfeksiyon yüzdeleri verilmiştir.

Tartışma

Kriyoprezervasyon basit olarak dondurarak saklama olup amacı, gerekli olduğunda donmuş hücreleri ısıtarak canlılıklarını, fonksiyonlarını ve antijenik yapılarını bozmadan tekrar elde etmektir. Dondurma ve ısıtma işlemleri sırasındaki sıcaklık düşüş ve yükselişleri, ortama bazı koruyucu maddelerin eklenmesiyle kontrol altında tutulmaktadır. Koruyucular (dimetilsülfoksit, glise-

Tablo 1. -196°C'de saklanan *P. berghei* ve *P. yoelii*'nin aylara göre eritrositlerdeki enfeksiyon yüzdeleri

	Kan alma günleri:	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.	18.	20.	22.	24.	26.	28.	30.
KONTROL	<i>P. berghei</i>	0.5	2	6	12	25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.3	1	5	10	20	24	16	12	6	3	1	0	0	0	0
1. Ay	<i>P. berghei</i>	0.5	2	6	11	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.3	1	4	12	21	25	17	11	7	4	2	0	0	0	0
2. Ay	<i>P. berghei</i>	0.4	2	7	11	25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.3	1	5	11	21	25	17	12	7	4	2	0	0	0	0
3. Ay	<i>P. berghei</i>	0.5	2	5	10	23	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.2	1	4	10	20	23	16	12	6	4	1	0	0	0	0
4. Ay	<i>P. berghei</i>	0.5	2	5	10	23	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.2	1	4	9	20	25	16	13	7	5	2	0	0	0	0
5. ay	<i>P. berghei</i>	0.4	2	6	11	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.3	1	5	10	21	26	18	13	7	5	2	0	0	0	0
6. ay	<i>P. berghei</i>	0.4	2	6	12	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.2	1	5	9	19	24	16	12	6	3	1	0	0	0	0

*Farelerin tamamı öldü

Tablo 2. -80°C'de saklanan *P. berghei* ve *P. yoelii*'nin aylara göre eritrositlerdeki enfeksiyon yüzdeleri

	Kan alma günleri:	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.	18.	20.	22.	24.	26.	28.	30.
KONTROL	<i>P. berghei</i>	0.4	2	6	12	25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.3	1	5	10	21	24	17	12	5	3	2	0	0	0	0
1. Ay	<i>P. berghei</i>	0.4	2	6	11	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.3	1	4	12	21	25	17	11	7	4	2	0	0	0	0
2. Ay	<i>P. berghei</i>	0.5	3	7	12	25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.3	1	5	11	21	25	17	12	7	4	2	0	0	0	0
3. Ay	<i>P. berghei</i>	0.5	2	5	10	23	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.2	1	5	11	20	24	16	11	6	4	1	0	0	0	0
4. Ay	<i>P. berghei</i>	0.5	2	5	10	23	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.2	1	4	9	20	25	16	13	7	5	2	0	0	0	0
5. ay	<i>P. berghei</i>	0.5	2	6	11	25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.3	1	5	10	21	26	17	13	7	6	2	0	0	0	0
6. ay	<i>P. berghei</i>	0.4	2	6	12	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>P. yoelii</i>	0.2	1	5	11	19	25	16	13	6	3	1	0	0	0	0

*Farelerin tamamı öldü



Resim 2. Donör farelerin koltuk altı veninden enfekte kanın toplanması

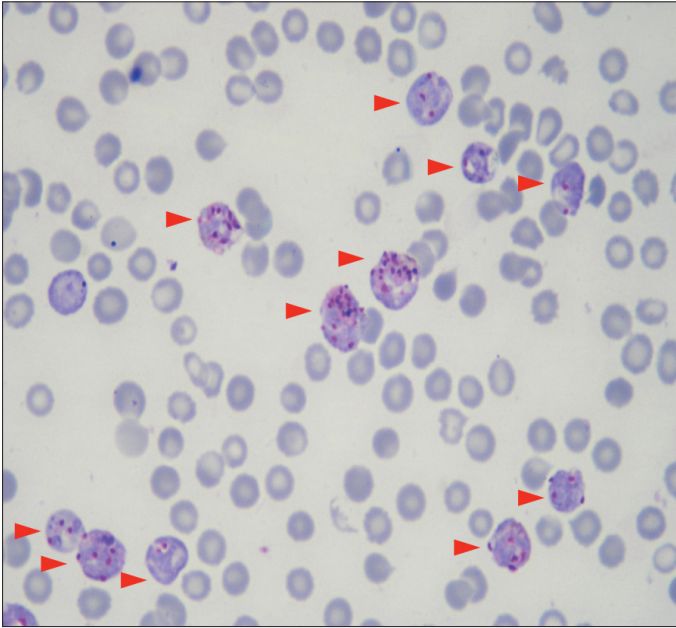
rin) hücre membran geçirgenliğini artırarak, intramembranöz partikülleri yeniden düzenleyerek veya hücre içeriğinin viskozitesini artırarak dondurma sırasında hücreleri koruyabilmektedir (14-16).

Donma hızlarından farklı olarak eritme hızlarıyla ilgili olarak yapılmış az sayıdaki çalışmada çoğunlukla 35-40°C su banyosunu kullanan hızlı eritme tekniği uygulanmış ve daha hızlı eritmenin daha iyi infektivite ve motilite sağladığı belirtilmiştir (17, 18). Çalışmamızın tüm aşamalarında, benzer çalışmalarda eritme hızı olarak en çok tercih edilen derece olan 37°C kullanılmıştır.



Resim 3. Kriyoprezervasyon işlemi tamamlanmış kanların sıvı azot tankına yerleştirilmesi

Sıtma parazitlerinin kan şekillerinin dondurularak saklanması için koruyucu ortam olarak gliserol ve dimetilsülfoksit kullanıldığı bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (17, 19, 20). Farklı çalışmaların sonuçlarına göre; *P. vivax* ve *P. falciparum*'un değişik suşlarının kan şekillerinin dondurularak saklanması için %7.5'lük alseverli gliserol solüsyonu kullanılmış ve dondurmadan sonra her iki türün de uzun süre sıvı nitrojende canlı kalabildikleri belirtilmiştir (21). *P. berghei* ve *P. gallinaceum*'un kan şekillerinin %50 gliserinli PBS içinde -70°C'de, 488 gün canlı kalabildikleri bildirilmiştir (22). Çalışmamızda %15'lik DMSO çözeltisi ile başarılı kriyopre-



Resim 4. *P. yoelii* ile enfekte eritrositlerin mikroskopik görüntüsü

zervasyon sağlanmış, *P. berghei* ve *P. yoelii* parazitleri kriyoprezervasyon sonrası +37°C' de hızla çözündürülüp, farelere verildiğinde virülanslarının devam ettiği gözlenmiştir.

Araştırmamızda *P. berghei* ve *P. yoelii*' nin -80°C ve -196°C de depolanan örneklerinin 1., 2., 3., 4., 5., ve 6. ayların sonunda enfeksiyon oluşturabildikleri, her iki saklama sıcaklığında ve saklama sürelerinde benzer ve birbiri ile paralel seyreden parazitemi yüzdeleri gösterdikleri saptanmıştır. Her iki parazit suşunun deneysel enfeksiyonlarda ilk 24 saatte oluşan merozoitlerinin parazitemi hızlarının yüksek olduğu, ayrıca eritrosit içindeki sıtma parazitlerinin dondurularak saklandığında canlılık ve virülanslarını büyük ölçüde koruyabildikleri bilinmektedir (12, 13, 23, 24). Kriyoprezervasyon gruplarının, dondurma işlemleri sonucunda kontrol grubu ile benzer parazitemi ve virülans göstermelerini bu nedenlere bağlamaktayız. Deneysel sıtma modellerinde oluşturulan enfeksiyonun seyri kullanılan tür ve suşun özelliğine bağlı olarak değişebilmekte, bazı suşlar beyin sıtmasına neden olarak öldürücü olurken, diğer bazı tür ve suşlar hafif seyreden enfeksiyonlar oluşturabilmektedir (23). Çalışmamızda kullanılan *P. berghei* letal özelliği bilinen bir suştur ve oluşturduğu beyin sıtması ile ölümcül olabilmektedir. Kullandığımız diğer suş olan *P. yoelii* 17x ise non-letal bir suştur ve oluşturduğu enfeksiyonlar farenin immün sistemi tarafından sınırlanıp sonra da enfeksiyonun doğal seyri olarak parazitemi yok edilebilmektedir (25).

Sonuç olarak; gerek *P. yoelii* ve *P. berghei*'nin eritrosit formlarının ve gerekse diğer parazit veya mikroorganizmaların dondurularak saklanması birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Kriyoprezervasyon işleminin uzun süreli suş aktarımını ortadan kaldırması, çeşitli deney hayvanlarının kullanımını ve besiyeri sarfiyatını azaltması, metodu maddi açıdan cazip hale getirmektedir. Dondurularak saklama, suş kaybı tehlikesini ve pasajlar sırasında meydana gelebilecek parazitin biyolojik karakterlerinin değişmesi olasılığını da azaltmaktadır. Laboratuvarlarda ekonomik iş gücü kullanımıyla daha az sayıda personelle daha fazla bilimsel çalışma yapma fırsatı sağlamaktadır.

Bu çalışmada *P. berghei* ve *P. yoelii* parazitlerinin eritrosit formlarının dondurularak saklanması yoluyla virülanslarının başarıyla korunduğu gözlenmiş ve kurulması planlanan parazit kriyobankalarının parazitolojik araştırmalarda bir çok avantajı beraberinde getireceği öngörülmüştür. Ülkemizde başta insan sıtma etkeni olan *Plasmodium*'lar olmak üzere tüm parazit türlerinin dondurularak saklanacağı bir kriyobank merkezinin oluşturulması ve böylece Türkiye'nin parazit hafızasının kayıt ve izolat koleksiyonlarının bu merkezde toplanması gerektiğini düşünmekteyiz. Anabilim Dalımızda önümüzdeki yıllarda kurmayı hedeflediğimiz parazit kriyobankasının ön çalışması niteliğindeki bu araştırmamız sonucunda öncelikle sıtma paraziti türlerinin yapılabiliği değerlendirilmiştir.

Teşekkür

Araştırmada kullanılan *P.berghei* ve *P.yoelii* suşlarını gönderen "American Type Culture Collection" (ATCC) firmasının "Malaria Research and Reference Reagent Resource Center" (MR4) merkezi yetkililerine ve araştırmanın finansal desteğini sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Merkezine teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Bu Araştırma Celal Bayar Üniversitesi tarafından Tıp-2008/041 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Özcel MA. Sıtma Epidemiyolojisi. Ed: Özcel MA. Tıbbi Parazit Hastalıkları . Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 22. Bölüm II; Kan ve Dokularda Görülen Protozoon Hastalıkları. İzmir, 2007; 79-140.
2. Saygi G. Paraziter Hastalıklar ve Parazitler. Bölüm II: Protozoerler. Apicomplexa ve İnsan Sağlığı. 2009; 117-39.
3. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, et al. Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. Clin Infect Dis, 2009; 15: 49: 852-60.
4. World Malaria Report. World Health Organization. Switzerland: WHO Pres. <http://www.who.int/malaria/publications>; Erişim tarihi:10.07.2010.
5. T. C. Sağlık Bakanlığı Sıtma Savaş Daire Başkanlığı. Türkiye'de Sıtma Çalışmaları. <http://www.saglik.gov.tr/SSDB/Default.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF4376734BED947CDE>. Erişim tarihi:10. 07. 2010.
6. Cox FEG. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors.Review. Cox Parasites and Vectors. 2010; 3: 5.
7. Sarfo BY, Armah HB, Irupe I, Adjei AA, Olver CS, Singh S, et al. Plasmodium yoelii 17XL infection up-regulates RANTES, CCR1,CCR3 and CCR5 expression, and induces ultrastructural changes in the cerebellum. Malaria Journal, 2005; 16: 4: 63.
8. Çeber K, Soran AF, Ozardali I. Culture of Plasmodium berghei Anka in Balb/c mice and research on experimental cerebral malariae. Türkiye Parazit Derg. 2005; 29: 154-6
9. Özbilgin A, Kuman AH. P.berghei'nin eritrositer formlarına karşı Chloroquine'in in vivo ve in vitro etkisi. T Parazit Derg. 1992; 16: 6-15.
10. Tamay T, Sağlam H, Girginkardeşler N, Özbilgin A. Türkiye'de Elde Edilen Bazı Bitki Ekstrelerinin Plasmodium yoelii'ye, karşı atimalaryal etkinliği, ANKEM Derg, 2004; 18: 1.
11. Helmsby H, De Souza B. Animal Models. Experimental malaria: using bloodstage infections of rodent malaria. Methods in Malaria Research. 2008. Fifth Edition. Page: 147-148. Eds: Moll K, Ljungström I, Perlman H, Scherf A, Wahlgren M. MR4 /ATCC Manassas Virginia and BioMalar Paris, France.
12. Janse C, Ramesar J, Waters A. Plasmodium berghei: General Parasitological Methods. Laboratory guide book Leiden University Medical Center (LUMC). The Netherlands. Last update: 2004 18: 05.

13. Moll K, Normark J, Bloqvist K. Freezing and thawing of asexual *Plasmodium* spp. *Methods in Malaria Research*. Fifth Edition. Page: 12-16. Eds: Moll K, Ljungström I, Perlman H, Scherf A, Wahlgren M. MR4 /ATCC Manassas Virginia and BioMalar Paris, France, 2008.
14. James ER. Parasite cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*. 2004; 49: 201-10.
15. Leef JL, Holligdale MR, Beaudoin RL. Principles of cryopreservation of protozoan parasites and erythrocytes. *WHO. Document Mal*. 1981; 81: 940
16. Miyake Y, Karanis P, Uga S. Cryopreservation of protozoan parasites. *Cryobiology*. 2004; 48: 1-7.
17. Boss HJ, Mas Bakal P, Van der Eijik AA. Cryopreservation of parasitic protozoa. *Acta Leidensia*. 1980; 47: 17-30.
18. Dalgliesh RJ. Theoretical and practical aspects of freezing parasitic protozoa, *Aust. Vet. J.* 1972; 48: 233-9.
19. Diggs CL, Joseph K, Flemmings B, Snodgrass R, Hines F. Protein synthesis in vitro by cryopreserved *P. falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 1975; 760-3.
20. Valeri CR, Runck AH, Brodine CE. Recent advances in freeze preservation of red blood cells. *Jama* 1969; 208: 489-92.
21. Rossan NR. Cryopreservation of the blood stages of *P. falciparum* and *P. vivax* for in vitro studies. *Am J Trop Med Hyg*. 1985; 34: 207-8.
22. Jeffrey JM. Survival of trophozoites of *P. berghei* and *P. gallinaceum* in glycerolized whole blood at low temperatures. *J Parasitol*. 1963; 48: 601-6.
23. Reis PA, Comim CM, Hermani F, Silva B, Barichello T, Portella AC, et al. Cognitive Dysfunction is sustained after rescue Therapy in experimental Cerebral Malaria and reduced by additive antioxidant therapy. *Plos Pathogens*. Volume:6/11. 2010; 24: e10000963. www.plospathogens.org.
24. Üner A, Özbel Y. Cryopreservation Prensipleri ve Parazitolojideki Uygulamaları. *T Parazitoloji Dergisi* XIV 1990; 2: 91-110.
25. Culleton R, Kaneko O. Erythrocyte binding ligands in malaria parasites: Intracellular trafficking and parasite virulence. *Acta Tropica* 2010; 114: 131-7.