

## ***Plasmodium berghei*'nin *In Vitro* Kültürü: Klorokin ve Artesunat İlaç Direnç Testlerinin Uygulanması <sup>[1]</sup>**

İpek ÖSTAN <sup>1</sup>  Özgür KURT <sup>2</sup> Ahmet ÖZBİLGİN <sup>3</sup>

[1] Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (CBÜ-SAĞH Proje No: 2010- 028)

<sup>1</sup> Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, TR-45020 Manisa - TÜRKİYE

<sup>2</sup> Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, TR-45140 Muradiye, Manisa - TÜRKİYE

<sup>3</sup> Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-45020 Manisa - TÜRKİYE

**Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-8470**

### **Özet**

Çalışmamızın amacı *Plasmodium berghei*'nin kısa dönem kültüründe uygulanacak ilaç direnç testlerinin laboratuvarımızda yerleştirilmesi olmuştur. İlk aşamada *P. berghei*'nin genç trofozoitlerini barındıran enfekte fare kanlarının *in vitro* olarak, 24 saatlik eritrosit içi evrim döngüsünün tamamlanması gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada klorokin ve artesunat ilaç konsantrasyonlarının parazitin eritrosit içi gelişimini inhibe etme oranları tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza göre, kısa dönem *in vitro* kültür testlerinde *P. berghei* parazitleri eritrositer şizogoni evrelerini tamamlamış, enfekte eritrositlerde merozoit oluşumları gözlenmiştir. Klorokin ve artesunat ile yapılan ilaç direnç testlerinde ise artesunat ilacının antiplasmodiyal etkisinin daha fazla olduğu saptanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Plasmodium berghei*, *in vitro*, Antiplasmodiyal ilaç direnç testleri

## ***In Vitro* Cultivation of *Plasmodium berghei*: Application of Drug Resistance Tests with Chloroquine and Artesunate**

### **Summary**

The aim of this study is to assess the drug resistance testing of *Plasmodium berghei* after short-term culture *in vitro*. First stage, the life cycle of the malaria parasites was completed in an average of 24 h inside the red blood cells *in vitro*. Second stage, the inhibition rates of Chloroquine and Artesunate on the infected erythrocytes were determined. The results showed that *P. berghei* parasites were completed their erythrocytic schizogony in short term *in vitro* cultivation. In the drug resistance tests with Chloroquine and Artesunate, antiplasmodial resistance did not occur with both drugs and the effect of Artesunate is higher than Chloroquine.

**Keywords:** *Plasmodium berghei*, *in vitro*, Antiplasmodial drug resistance tests

### **GİRİŞ**

Sıtma etkeni *Plasmodium*'ların oluşturduğu ilaç direnci, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda bu parazitler üzerine yeni antimalarial/antiplasmodiyal maddelerin etkisini araştırmaya yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur. İnsanı enfekte etmeyen kemirgen sıtma parazitleriyle *in vitro* ortamda yapılan çalışmalar antiplasmodiyal etki gösteren maddelerin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Yeni ilaç çalışmalarında sentez edilen veya doğal kaynaklardan izole edilen kimyasal maddelerin, klinik denemelere tabi tutulabilmeleri için öncelikle *in vitro*

tarama ve toksisite deneyleri yapılmaktadır <sup>[1]</sup>. Sıtma ilaçlarının etki mekanizmaları arasında farklılıklar olduğu gibi aynı türün suşları arasında da farklılıklar bulunmaktadır <sup>[2]</sup>. Dünyanın bir çok bölgesinde, başta *P. falciparum* olmak üzere sıtma türlerinin ilaçlara karşı direnç gösterdiği bilinmektedir <sup>[3-5]</sup>. Direnç, genellikle ilaç ya da ilaç gruplarının sensitivitelerinin azalmasına neden olan spontan mutasyonların tek nokta ya da çoklu nokta mutasyonları sonucu olarak gelişmektedir <sup>[6,7]</sup>. *Artemisia annua* bitkisinden elde edilen Artemisinin ve türevlerinin



**İletişim (Correspondence)**



+90 236 2371378/122



mavikaraca@gmail.com

özellikle *P. falciparum* tedavisinde uzun süre başarıyla kullanılmasının ardından, bu ilaca karşı da oluşan direnç bulgularından söz edilmeğe başlanmıştır [8,9]. Bu çalışmanın amacı, insan sıtma etkenlerinden en ağır klinik tabloya neden olan *P. falciparum*'a yakın yaşam döngü özellikleri olduğu bilinen kemirgen sıtma etkeni *P. berghei*'nin *in vitro* yaşatılıp çoğaltılmasını sağlamak ve klorokin ve artesunat ilaç direnç testlerini *in vitro* olarak uygulamaktır. Çalışmamız *in vitro* ortamda *P. berghei* üzerine uygulanan ilaç direnç testleri konusunda ülkemizdeki ilk çalışmalardan biridir.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmamızda MR4-ATCC (American Type Culture Collection) Wirginia, USA firmasından temin edilen *P. berghei* MRA-311-Anka suşu kullanılmıştır. İlk aşamada, -80°C'de muhafaza edilen *P. berghei* genç trofozoitli eritrositleri taşıyan fare kan solüsyonu çözdürülüp, santrifüjlenerek elde edilen eritrosit çökeltisi RPMI-1640 besiyeri (%10 FCS eklenmiş) ile %10 oranında sulandırılmıştır. Kültür kapları içindeki eritrosit süspansiyonu mikrobiyolojik jar içine koyulmuş, %5 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub>, %90 N<sub>2</sub> karışımından gaz verilerek çalkalamalı etüve (37°C) yerleştirilmiştir. Cam kavanozun içine yanar mumlar yerleştirilerek, CO<sub>2</sub> oranının artması O<sub>2</sub> seviyesinin düşmesi sağlanmıştır. 24 saat boyunca kültürasyon takip edilmiştir. Kültürün 22-24 saatleri arasında olgun şizont ve merozoitleri taşıyan eritrositler tespit edilmiştir. İkinci aşamada, kültür plaklarına 0.5 ml enfekte eritrosit solüsyonu ile 0.5'er ml klorokin (Sigma-C6628) ve artesunat (Sigma-A3731) ilaçlarının RPMI-1640 besiyeri ile hazırlanmış sulandırılmalarından, son dilüsyonlar; 0.1, 0.4, 0.8, 1.6, 6.4 ve 12.8 µgr/ml olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol için ayrılan çukurlardaki enfekte eritrosit süspansiyonu üzerine RPMI-1640 besiyeri koyulmuştur. Kültür plakları mikrobiyolojik jar içinde çalkalamalı etüve yerleştirilmiş ve kültürasyon başlatılmıştır [10]. İşlemler farklı

zamanlarda 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar; Calcsyn version 2.1 programı ile değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

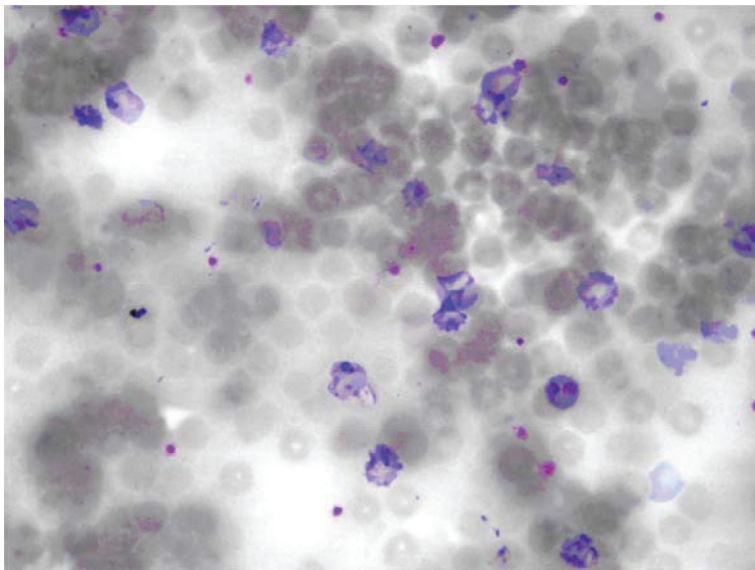
*Plasmodium berghei*'nin kısa dönem *in vitro* kültüründe; inkübasyon süresinin başında enfekte eritrositlerin tamamında trofozoitler bulunurken, 20-22. saatte şizontlar, 24. saatte ise merozoitler tespit edilmiştir (Şekil 1, 2).

İlaç direnç testlerinde, klorokin ve artesunat ilaçlarının her ikisinde de 0.8 µg/ml dozda enfekte eritrositlerin %100'ünde trofozoit evresi bulunmuş, şizont evresine geçiş engellenmiştir. En düşük ilaç dozları olan 0.1 ve 0.4 µg/ml dozlarında, artesunat ile sırasıyla %81 ve %70 oranlarında şizont evresi tespit edilmiş, aynı dozlarda klorokin ile sırasıyla %81 ve %80 oranlarında şizont evresine geçiş olmuştur.

Klorokin ve artesunat ilaç direnç test sonuçları değerlendirildiğinde, her iki ilaç ile doz ve etki ilişkisi anlamlı bulunmuş (P<0.05), ED<sub>50</sub> (%50'sini etkileyen doz) değerleri klorokin için 0.68431, artesunat için 0.45582 olarak hesaplanmıştır. Klorokin ve artesunat ilaç direnç testlerindeki doz etki eğrileri Calcsyn version 2.1 programı ile değerlendirilmiştir (Şekil 3).

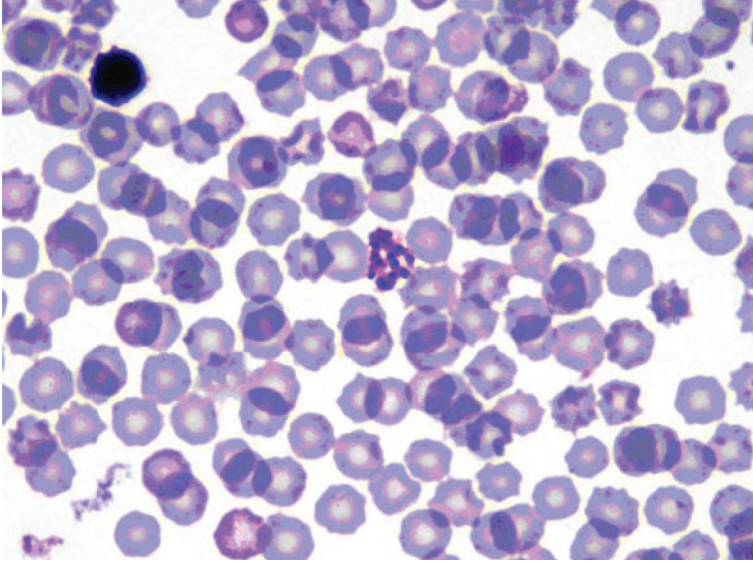
## TARTIŞMA ve SONUÇ

Parazitin eritrositer dönemlerinin *in vitro* kültürleri Trager ve Jensen'in çalışmalarıyla başlamış ve sıtmanın çok yönlü araştırmalarındaki önemi sıklıkla vurgulanmıştır [11,12]. Kısa dönem *in vitro Plasmodium* kültürleri, ilaç direnci geliştirmiş suşların ayırt edilmesi amacıyla klinik izolatları uygulanabilme kolaylığı sağlamaktadır. *In vitro* yöntemler ile yapılan *Plasmodium* çalışmaları; farklı bölgelerden izole edilen suşların aynı ilaçlara farklı direnç seviyeleri



**Şekil 1.** Kısa dönem *in vitro* kültürün başlangıcında (0. saat) *P. berghei* ile enfekte eritrositlerde trofozoit evrelerinin görünümü

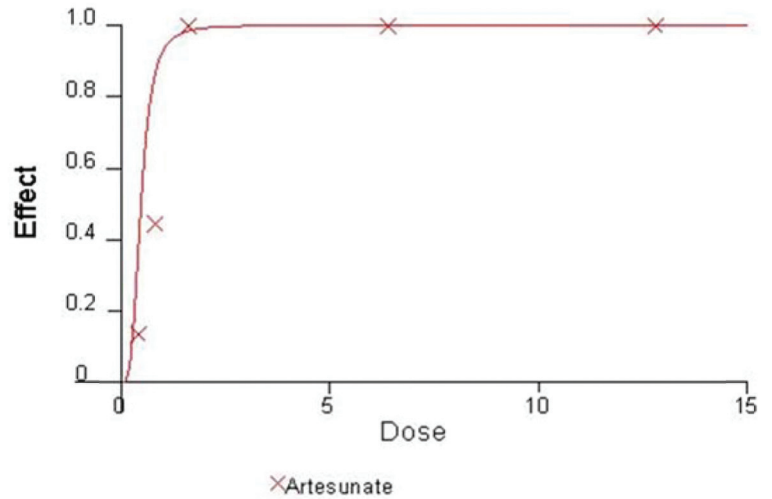
**Fig 1.** Appearance of trophozoite stages in erythrocytes infected with *P. berghei* at the beginning of the short-term cultivation (0. h)



Şekil 2. Kısa dönem *in vitro* kültürün 24. saatinde *P. berghei* ile enfekte eritrositlerde merozoit evresinin görünümü

Fig 2. Appearance of merozoite stages in erythrocytes infected with *P. berghei* at 24. h of the short-term cultivation

Dose-effect curve



Şekil 3. Artesunat ilaç direnç testinde doz etki eğrisi (Calculusyn version 2.1)

Fig 3. The dose-effect curve of Artesunate drug resistance testing (Calculusyn version 2.1)

gösterebildiğini ve bölgesel tedavi protokollerinin belirlenmesinde bu yöntemle uygulanan ilaç direnç testlerinin önemli rol oynadığını göstermektedir [13,14]. Çalışmamızda *P. berghei* parazitleri *in vitro* kısa dönem kültürde eritrositler şizogoni geliştirerek 24 saatlik inkübasyon dönemi sonunda enfekte eritrositlerde %80 oranında şizont evresi oluşturmuştur. Klorokin ve artesunat ilaç direnç testleri sonucunda ise elimizdeki *P. berghei* suşunun her iki ilaca karşı direncinin olmadığı tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz ED<sub>50</sub> değerleri artesunat ile 0.45582, klorokin ile 0.68431'dir. Bu sonuçlar kullandığımız *P. berghei* suşu üzerinde artesunat'ın *in vitro* ortamda antiplasmodiyal etkisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu çalışma *in vitro* üretilen *Plasmodium* parazitlerinde uygulanan ilaç direnç testleri konusunda ülkemizde yapılan ilk çalışmalardan biridir.

## KAYNAKLAR

1. Kayaalp OS: İlaçların Klinik-Öncesi Değerlendirme Testleri. In,

Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler. s.29-46, Faryal Matbaacılık, Ankara, 2009.

2. Akısü Ç: Sıtma Tedavisi. In, Akısü Ç, Korkmaz M (Eds): Tıbbi Parazitolojide Tedavi. 1. Baskı, s.65-87, Meta Basım, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 20, İzmir, 2005.

3. Witkowski B, Berry A, Benoit - Vical F: Resistance to anti-malarial compound: Methods and applications. *D Resist Update*, 12, 42-50, 2009.

4. Legrand E, Volney B, Meynard JB, Puijalón OM, Estere P: *In vitro* monitoring of *Plasmodium falciparum* drug resistance in French guiana: A synopsis of continuous assessment from 1994 to 2005. *Antimicro Agents Chemother*, 52 (1): 288-298, 2008.

5. Carlton JMR, Hayton K, Cravo PVL, Walliker D: Of mice and malaria mutants: unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models. *Trends Parasitol*, 17 (5): 236-242, 2001.

6. Ergüven S, Yılmaz YA, Boral ÖB: Antiparaziter İlaçlara Direnç. In, Özcel MA (Ed): Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 1. Baskı, s.69-75, Meta Basım, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 22, İzmir, 2007.

7. Le Bras J, Durand R: The mechanisms of resistance to anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharm*, 17, 147-153, 2003.

8. Maude RJ, Pontavornpinyo W, Saralamba S, Aguas R, Yeung S,

- 
- Dondorp AM, Day NPJ, White NJ, White JW:** The last man standing is the most resistant: eliminating artemisinin-resistant malaria in Cambodia. *Malaria Journal*, 8 (31): 1-7, 2009.
- 9. Plowe CV:** The evolution of drug-resistance malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103 (1): 11-14, 2009.
- 10. Janse CJ, Ramesar J, Waters AP:** *Plasmodium berghei*: General Parasitological Methods. Laboratory Guide Book. pp.1-14, Leiden University Medical Center (LUMC) Press, Netherland, 2004.
- 11. Trager W, Jensen JB:** Cultivation of erythrocytic stages. *B World Health Organ*, 55 (2-3): 363-365, 1977.
- 12. Trager W, Jensen JB:** Continuos of *Plasmodium falciparum*: Its impact on malaria research. *Int J Parasitol*, 27 (9): 989-1006, 1997.
- 13. Suwandittakul N, Chaijaroenkul W, Harnyuttanakorn P, Mungthin M, Bangchang KN:** Drug resistance and *in vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* in Thailand during 1988-2003. *Korean J Parasitol*, 47 (2): 139-144, 2009.
- 14. Jambou R, El-Assaad F, Combes V, Grau GE:** *In vitro* culture of *Plasmodium berghei*-Anka maintains infectivity of mouse erythrocytes inducing cerebral malaria. *Malaria J*, 10, 346, 2011, <http://www.malariajournal.com/content/10/1/346>. Accessed: 03.04.2012.