

# *Plasmodium berghei* ANKA suşunun BALB/c Farelerde Kültürü ve Deneysel Serebral Sıtmanın Araştırılması

Kemal ÇEBER<sup>1</sup>, Ahmet Faruk SORAN<sup>2</sup>, İlyas ÖZARDALI<sup>3</sup>

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi <sup>1</sup>Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Nöroloji Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Patoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa

**ÖZET:** BALB/c farelerde yapılan bu çalışmada kemirici sıtması etkeni olan *Plasmodium berghei* ANKA 6653 suşu denenmiştir. Çalışmamızda ağırlığı 17-20 gr. olan eş soylu toplam 97 adet BALB/c fare kullanılmış ve 160.000 parazit/ml. den 0.3 ml alınarak farelerin periton boşluğuna enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası takip eden 3, 6, 9 ve 15. günlerde kayıt edilen % parazitemi değerlerinden süreye bağımlı değişim grafiği elde edilmiştir. Çalışmamızda 3. üncü günden sonra gözlenen nörolojik semptomlar kayıt edilmiştir. 15. gün sonunda ölen farelerin serebral dokuları alınmış ve histolojik bakıları normal bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** *Plasmodium berghei*, serebral sıtma, Balb/c fare.

## **Culture of *Plasmodium berghei* ANKA in BALB/c Mice and Research on Experimental Cerebral Malaria**

**SUMMARY:** *Plasmodium berghei* ANKA 6653 isolates that cause malaria in rodents were cultured in BALB/c mice in this study. Each of the BALB/c mice were injected intraperitoneally with 0.3 ml from a stock solution containing 160.000 parasites/ml. Percentage values of parasitemia at day 3, 6, 9 and 15 after injection were recorded and graphed. The neurological signs after day 3 were recorded in this study. At the end of day 15, cerebral tissues of dead mice were taken and the accumulation of hemorrhages was investigated. A total of 97 inbred BALB/c mice weighing approximately 17-20 gr. were used in this study.

**Key words:** *Plasmodium berghei*, cerebral malaria, BALB/c mice

## **GİRİŞ**

Sıtma dünyada her yıl yaklaşık 2 milyon kişinin ölümünden sorumludur. Tüberkülozun yanısıra ölümlerin başında gelir. *Plasmodium falciparum* sıtma enfeksiyonu serebral semptomlara sebep olmaktadır. Beyin dokusuna parazit invaze olmaz sadece biyokimyasal mekanizmalardaki değişiklikler yolu ile etkiler ve sonuçta serebral sıtma olarak isimlendirilir. (25).

*P. berghei* ile infekte faredeki nörolojik semptomlar insandaki ile benzerlikler gösterir (6). Kemirici sıtması etkeni olarak 4 *Plasmodium* türü (*P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei*, *P. yoelii*) tanımlanmıştır. Kemirici sıtma parazitlerinin güncelliği bunların deneysel memeli sıtma çalışmalarında pratik bir model olmasıdır. Bu parazitlerin insan ve diğer primatların sıtma parazitleri ile yapısal fizyolojik ve yaşam döngüsü bakımından paralellik gösterdiği doğrulanmıştır (21).

İnsan parazitlerinin evrimlerini daha iyi anlamak için *in vitro*

kültür tekniği geliştirilmiştir. Bu konu üzerindeki çalışmalar 1978'de başlamış ve *P. falciparum*'un yakından tanınmasını sağlamıştır. Kültür tekniğindeki gelişmeler çok çeşitli araştırmalarda kullanılmaktadır. *P. vivax*'ın *in vitro* kültürü kullanılarak benzer çalışmalar yapılmıştır (13, 14). Bu da insanda oluşturduğu hastalık için direkt alakalıdır. Deneysel çalışmalar ilaç direncinin moleküller temelleri, antijenik değişiklikler, eritrositlere giriş mekanizması, protein trafiği ve plastid organellerinin araştırılmasında yarar sağlamaktadır. İnsanı enfekte etmeyen sıtma parazitleri bu araştırmalar için en uygundur. Kemirici parazitleri ve bunların konakçıları ile insan parazitleri ve konakçıları birbirinden farklıdır (21).

Niçin kemirici sıtması: Kemirici ve insan parazitlerinin temel biyolojileri, genom organizasyonu ve biyokimyasal oluşumları benzerdir. İlaçlara hassaslığı ve direncinin moleküler temeli benzer karakteristik özellikler gösterir. Aday aşılarda yapı ve fonksiyonlarının hedefindeki antijenler, kemirici ve insan parazitlerinde benzerdir. Bu uygulamalar kemirici parazitinin tüm yaşam döngüsündeki (farede ve sinekte) araştırmalar için basit ve güvenlidir. *In vitro* kültür tekniğinin geniş üretim ve uygulama sahası vardır. Farklı yaşam döngülerindeki parazit-

Geliş tarihi/Submission date: 04 Kasım/04 November 2004  
Düzeltilme tarihi/Revision date: 14 Şubat/14 February 2005  
Kabul tarihi/Accepted date: 06 Nisan/06 April 2005

Yazışma /Corresponding Author: Kemal Çeber  
Tel: (+90) (414) 312 84 56 / 2320 Fax: (+90) (414) 313 96 15  
E-mail: kceber@harran.edu.tr

ler için kullanılırdır. Genetik modifikasyonlar için metod uygundur. *In vivo* olarak parazit-konakçı arasındaki ilişki, immünolojik çalışmalar ve ilaç testleri için uygundur (21).

Niçin *P. berghei*: *P. berghei* sıtma parazitinin gelişimsel biyolojisini araştırmak için mükemmel bir model olup *in vitro* üretim teknolojisi ile yaşam döngülerinin çeşitli evreleri fazla miktarda üretilip saflaştırılmaktadır. Genom dizisi ve organizasyonu hakkında bilgi ve genetik modifikasyonları için yöntemler çalışılabilir. Bu özelliklerden dolayı *P. berghei* diğer kemirici parazitleri içerisinde en değerlisidir. Farklı türlerin farklı araştırma alanları vardır. Örneğin: *P. chabaudi* genellikle ilaç direnci ve antijenik varyasyona karşı kullanılan bir modeldir.

Sıçanların laboratuvarındaki enfeksiyonlarında antijenik değişiklik esnasında uzun dayanıklılık ve geç ölümler bu parazitte görülmüştür (21). Antijenik varyasyon çalışmaları ve *in vivo* generasyon denemelerinde *P. berghei* enfeksiyonu genellikle laboratuvar sıçanlarında hızlı ölümlere sebep olduğundan bu gibi çalışmalarda engel teşkil etmektedir. Diğer bir örnek *P. yoelii* ki bu geniş bir şekilde kullanılır. Bunların kan ve karaciğerdeki biyolojileri ile immünite ve aşı geliştirme çalışmalarında rolleri vardır (21).

*P. falciparum*'la oluşan enfeksiyon esnasında birçok ölümler gerçekleşmektedir. Bu konunun patolojik mekanizması hala tam olarak anlaşılabilmiştir. Bu yüzden biz de araştırmalarımızda BALB/c farelerini kullanarak serebral sıtmayı ve parazitemi gelişimlerini araştırmayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kemirici sıtması etkeni *Plasmodium berghei* ANKA 6653 suşu kullanılmıştır. Denemelerimizde ağırlığı 17-20 gr. olan eş soylu toplam 97 adet (50 dişi 47 erkek) 6-8 haftalık fareler kullanıldı. Bu farelerin karışık olarak 80 adetinde *P. berghei* ANKA 6653 suşunun kültürü yapıldı. *P. berghei*'nin 160.000 parazit/ml. olan süspansiyonundan 0.3 ml. alınarak her bir farenin periton boşluğuna enjekte edildi. Bunu takip eden 3, 6, 9 ve 15 . günde (60 adetinde) kuyruk venasından kan alınarak ince yayma preparatları yapıldı. Giemsa ile boyanan preparatlarda parazitemi sayılarak kayıt edilmiştir.

Nörolojik bozuklukların görüldüğü 3. günden itibaren fareler dikkatli olarak gözlemlenmiştir. 15. gün sonunda alınan serebraller dokular histolojik değerlendirme için %10 luk formolde bir gün bekletildikten sonra rutin doku takibine alındı. Elde edilen bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler lam üzerinde hazırlanarak hemotoksilen-eosin ile boyandı ve lamalar ışık mikroskopisinde değerlendirildi.

İstatistik: Bulgulardan parazitemi sonuçlarının istatistiksel önemi Student's t testi ile değerlendirildi.

## BULGULAR

Çalışmamızın ilk kısmında *P. berghei* ANKA 6653 suşunun kültürü yapılmıştır elde edilen verilerden Şekil 1'deki grafik hazırlandı. Kültür boyunca farelerden 15 tanesi öldü (3. gün 5 5. gün 4 6. gün 6 adet ) bunlar düşük parazitemi değerlerine sahip olduğundan istatistik hesaplamasında kullanılmadı ve 5 tanesinde ise parazitemi gelişmedi. Ölen farelerin muhtemel bir bakteri kontaminasyonu ile infekte olduğu kanatindeyiz.

Parazitemi yüzdeleri 3. gün % 0,09 6. gün %3,42 9. gün % 8. 18 12. gün %15,86 15. gün %33,46 olarak saptanmıştır. Bu veriler doğrultusunda **Şekil 1 buraya gelmeli** gösterilen grafik elde edilmiştir. Serebral dokuların histolojik değerlendirmesinde farklı herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. Kanatimizce *P. berghei*'nin serebral dokuya etkisi biyokimyasal yollardan olmuştur ve dokunun fonksiyonlarını bozmuştur. Enfeksiyonun 3. üncü gününden itibaren farelerde gözlediğimiz nörolojik değişiklikler kol-bacak gibi eklemelerde felçler (mono, hemi, para veya tetrapleji tarzında) kaslarda istem dışı kasılmalar (ataksi, konvülsiyon ve sonunda koma hali), dalgınlık, başın yana düşmesi, sendeleyip düşme, kilo kaybı ve dalak büyümesidir.

## TARTIŞMA

Saptanan verilerin bu konuda yapılacak çalışmalarda güne bağlı paraziteminin bilinmesinin önemli bir kaynak olacağı düşüncesindeyiz. Serebral sıtma modeli oluşturmak ve dokudaki histolojik değişiklikleri gözlemek için BALB/c fareler uygun bir model değildir. *P. berghei* ancak bu farelerin serebral dokularında biyokimyasal bir takım değişikliğe yol açarak nörolojik semptomların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu konuda yapılacak biyokimyasal çalışmalara yukarıdaki bulguların iyi bir kaynak olacağını ümit etmekteyiz.

Benzer nörolojik bulgular CBA/J ve C57BL/6 fareler üzerinde yapılan denemelerde de tesbit edilmiştir (6, 16, 19).

Yapılan bir araştırmada ise *P. berghei* ANKA suşu ile CBA/J fareler infekte edilmiş bunlardaki ölümler %80-90'ını 6-9. uncu günlerde gerçekleştirmiştir. Bu sonuç yapılacak çalışmalarda konakçı seçiminin ne kadar önemli olduğunun göstergesidir.

*P. falciparum* ile enfekte kişilerde serebral sıtma küçük oranda gelişebilir ve ölüm oranlarını belirtmek çok değerlidir. Bu konunun patojenik mekanizması henüz az anlaşılabilmiştir (10). Deneysel insan araştırmaları da etik olmadığından araştırmacılar tarafından plasmodiumların *in vitro* ve *in vivo* kültür modelleri geliştirilmektedir. Bu yöndeki çalışmalardan biri Çukurova bölgesinden izole edilen *P. vivax* suşunun eritrositer dönem formunun *in vitro* kültürü yapılmış ve parazitlerin biyolojik özellikleri incelenmiştir (22). Benzer bir çalışmada Bakü 1. 2. ve 3 nolu izolatların *in vitro* kültürleri yapılarak biyolojik özellikleri karşılaştırılmıştır (13). Benzer bir çalışmada *P. vivax*'ın *in vitro* kültüründen yararlanarak sıtmanın tanısının değerlendirmesi araştırılmıştır (14). Başka bir çalış-

mada Bakü'den getirilen *P. berghei* ile enfekte kanın bir laboratuvarından başka bir laboratuvara *in vitro* koşullarda taşınması çalışılmıştır (2). *P. berghei*'nin kriyokonservasyonu, rekriyokonservasyonu ve *in vivo* kültürü çalışılmıştır (15). *P. berghei* modeli kullanılarak anti-malarial ve anti-fungal ilaçların tesiri araştırılmıştır (20). *P. berghei* modeli kullanılarak fare makrofajlarından nitrik oksit salgılanması araştırılmıştır (4). *P. berghei* antijen lizati kullanılarak Natural Killer hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır (5).

Sonuç olarak serabral sıtma modeli oluşturmak üzere yapılacak araştırmalar için *P. berghei* en uygundur (1, 3, 7-9, 11, 12, 16-18, 23, 24). Aynı zamanda konakçı seçiminde *in vivo* çalışmalarda ne kadar önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Adachi M, Yuda M, Ando K, Sakurai M, Chinzei Y, 2000. Scant parasitemia in BALB/C Mice with congenital malaria infection. *J Parasitol*, 86 (5), 1030-1034.
2. Alptekin D, Kasap M, Allahverdiyev A, Çeber K, Pazarbaşı A, 1966. Değişik *in vitro* ortamların *Plasmodium berghei*'nin *in vitro* gelişimine etkisi. *Ç.U. Tıp Fak Derg*, 6: 27-33.
3. Amani V, Boubou MI, Pied S, Marussing M, Walliker D, Maizer D, Reina L, 1998. Cloned lines of *Plasmodium berghei* ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. *Infect Immun*, 66(9): 4093-4099.
4. Aybay C, Çağlar K, Çeber K, İmir T, 1998. *Plasmodium berghei* antijen lizatının fare makrofajlarından nitrik oksit salınması üzerine etkisinin araştırılması. *T Parazitol Derg*, (22): 116-121.
5. Aybay C, Yücel A, Çeber K, İmir T, 1999. The *in vitro* effect of *Plasmodium berghei* antijen lysate natural killer (NK) cell cytotoxicactivity. *Turkish J Med Sci*, 29: 253-258.
6. Bagot S, Boubou MI, Campino S, Behrschmidt C, Gorgette O, Guenet L, Penha-Gonçalves C, Maizer D, Pied S, Cazenave A, 2002. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. *Infect Immun*, 70(4): 2049-2056.
7. Belnoue E, Costa FTM, Vigarío AM, Voza T, Gonnet F, Landau I, Rooijen N, Mack M, Kuziel WA, Renia L, 2003. Chemokine receptor CCR2 is not essential for the development of experimental cerebral malaria. *Infect Immun*, 71(6): 3648-3651
8. Belnoue E, Kayibanda M, Vigarío AM, Deschemin J, Rooijen N, Viguier M, Snounou G, Renia L, 2002. On the pathogenic of brain-sequestered  $\alpha\beta$  CD8 + T cell in experimental cerebral malaria. *J Immunol*, 169: 6369-6375.
9. Boubou MI, Collette A, Voegtler D, Mazier D, Cazenave PA, Pied S, 1999. T cell response in malaria pathogenesis selective increase in T cell carrying the TCR V<sub>B</sub> 8 during experimental cerebral malaria. *Int Immunol*, 11(9): 1553-1562.
10. Carvalho LJM, Lenzi HL, Pelajo-Machado M, Oliveria DN, Daniel-Ribeiro CT, 2000. *Plasmodium berghei*: cerebral malaria in CBA mice is not clearly related to plasma TNF levels or intensity of histopathological changes. *Exp Parasitol*, 95: 1-7.
11. Chang WL, Li J, Sun G, Chen HL, Specian RD, Berney SM, Granger DN, Henri C, 2003. P-Selectin contributes to severe experimental malaria but is not required for leukocyte adhesion to brain microvasculature. *Infect Immun*, 71(4): 1911-1918.
12. Chang WL, Jones SP, Lefer DJ, Welbourne T, Sun G, Yin L, Suzuki H, Huang J, Granger DN, Henri C, 2001. CD8+ -T-cell depletion ameliorates circulatory shock in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Infect Immun*, 69(12): 7341-7348.
13. Çeber K, Allahverdiyev A, İbrahimov H, 2001. *Plasmodium vivax*'ın *in vitro* kültürünün araştırılması. *T Parazitol Derg*, 25(3): 223-225.
14. Çeber K, İbrahimov H, 2002. Sıtmanın serolojik tanısı için *Plasmodium vivax*'ın *in vitro* kültüründen antijen hazırlanması ve IFAT ile değerlendirilmesi. *T Parazitol Derg*, 26(3): 224-227.
15. Çeber K, İbrahimov H, 1996. *Plasmodium berghei*'nin yeni kurulan araştırma laboratuvarlarında kriyokonservasyonu ve *in vivo* kültürü. *Azerbaycan Respublikası Sağlık İlimi-Tıbbi Pratik Jurnalı*, (4): 32-33.
16. Engwerda CR, Mynott TL, Sawhney S, Souza BD, Bickle QD, Kaye PM, 2002. Locally Up-regulated lymphotoxin  $\alpha$  Is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med*, 195(10): 1371-1377.
17. Finney RW, Mackey LJ, Lambert PH, 1982. Virulent *Pl. berghei* malaria: prolonged survival and decreased pathology in cell-dependent nude mice. *J Immunol*, 129(5): 2213-2218.
18. Franz DR, Lee M, Seng LT, Young GD, Baze WB, Lewis GE Jr, 1987. Peripheral vascular pathophysiology of *Plasmodium berghei* infection: a comparative study in the cheek pouch and brain the golden hamster. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36 (3):474-80.
19. Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR, Souza B, 2000. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun*, 68(9): 5364-5376.
20. İbrahimov H, Çeber K, 1996. *Plasmodium berghei* ve *Aspergilla nigri* ile infekte olmuş farelerde beklenen paraziteminin gelişmesine anti-malarial ve anti-fungal ilaçların tesiri. *Azerbaycan Respublikası Sağlık İlimi-Tıbbi Pratik Jurnalı*, (6): 44-46.
21. Janse C, Waters A, 2002. The *Plasmodium berghei* research model of malaria Leiden University Medical Center Press. Chapter 1. p. 1-4.
22. Pazarbaşı A, Çeber K, Kasap M, Allahverdiyev A, Kasap H, 1995. Çukurova bölgesinden elde edilen çeşitli *Pl. vivax* suşlarının *in vitro* şartlarda gelişimi. *T Parazitol Derg*, 19(4): 449-459.
23. Piguet PF, Kan CD, Vesin C, Rochat A, Donati Y, Barazzone C, 2001 Role of CD40-CD40L in mouse severe malaria. *Am J Pathol*, 159: 733-742.
24. Rudin W, Eugster HP, Bordmann G, Bonato J, Muller M, Yamage M, Ryffel B, 1997. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor-alpha/beta -deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *Am J Pathol*, 150: 257-266.
25. Sanni LA, Rae C, Maitland AM, Stocker R, Hunt NH, 2001. Is ischaemia involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? *Am J Pathol*, 159: 1105-1112.