

In vitro Cultivation of *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum'un in vitro Kültürü

● Ahmet Özbilgin¹, ● İbrahim Çavuş¹, ● Morteza Haghi¹, ● Yener Özel²

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

²Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

Cite this article as: Özbilgin A, Çavuş İ, Haghi M, Özel Y. In vitro Cultivation of *Plasmodium falciparum*. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(4):226-31 .

ÖZ

Amaç: *Plasmodium falciparum*, dünyada çok sayıda insanın ölümüne sebep olan protozoon bir parazittir. Bu parazitin in vitro kültür ortamında üretilmesi, bilimsel çalışmalara büyük katkı sağlamaktadır. Türkiye'de *P. falciparum*'un in vitro kültürünün yapıldığı bir laboratuvar henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmada, *P. falciparum*'un in vitro olarak üretilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmamızda beş adet *P. falciparum* suşu kullanılmıştır. Dondurulmuş olarak sıvı azotta saklanan parazit suşları 37 °C'lik su banyosunda çözündürüldükten sonra, hazırlanmış olan Albumax Complete besiyerine aktarılmıştır. Daha sonra, petri kapları chamber içerisine yerleştirilmiştir. Chamber içerisine, 30 sn boyunca %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 N₂ gazlarından oluşan özel bir gaz karışımı verilmiştir. Chamber, 37 °C'lik etüve kaldırılmış ve iki gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültür ortamından ince yayma preparatlar hazırlanmış ve giemsa boyası ile boyanmıştır. Sonuçlar immersiyon objektifi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: İnce yayma preparatları incelendiğinde, tüm *P. falciparum* suşlarının trofozoit ve şizont formlarının in vitro kültür ortamında %2 oranında ürediği görülmüştür.

Sonuç: *Plasmodium falciparum* in vitro kültürü başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. *P. falciparum*'un in vitro ortamda üretilmesi; ülkemizde parazitin biyolojik ve kimyasal özelliklerinin, patojenitesinin, fenotipik ve moleküler düzeydeki ilaç duyarlılıklarının araştırıldığı, aşı çalışmaları da dahil olmak üzere birçok projeye katkı sağlanmış olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Plasmodium falciparum*, in vitro kültür, sıtma, Türkiye

ABSTRACT

Objective: *Plasmodium falciparum* is a protozoan parasite that causes many deaths worldwide. It's cultivation in an in vitro culture setting contributes significantly to scientific studies. However, there are no laboratories in Turkey that cultivate *P. falciparum* in vitro. Hence, the purpose of this study was to cultivate *P. falciparum* in vitro.

Methods: Five *P. falciparum* strains were used in our study and were kept frozen in liquid nitrogen tanks. These parasite strains were then thawed in a 37 °C water bath and transferred to the Albumax-complete medium that was previously prepared. After that, the petri dishes were placed in the chamber. For 30 seconds, a special gas mixture containing 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ was added into the chamber which was placed in a 37 °C oven and left for incubation for 2 days. At the end of the incubation period, thin smear preparations were prepared from the medium, stained with Giemsa and examined using an immersion lens.

Results: Examination of the smears revealed that trophozoite and schizont forms of all *P. falciparum* isolates were present at a rate of 2% in in vitro culture medium.

Conclusion: As a result of our study, the in vitro culture of *P. falciparum* was successfully developed. With this, several projects such as biological and chemical characteristics, pathogenicity, phenotypic and molecular-level drug sensitivities and parasite vaccination studies can be carried out more easily in our country.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, in vitro culture, malaria, Turkey

GİRİŞ

Sıtma, küresel öneme sahip paraziter bir enfeksiyondür. Enfeksiyon, enfekte *Anofel* cinsi dişi sivrisinekler aracılığıyla insanlara bulaşır (1). *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* ve *P. knowlesi* olmak

üzere beş *Plasmodium* türü, insanlarda sıtma etkeni olarak bilinmektedir (2).

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünya çapında 2018 yılında 228 milyon sıtma olgusu rapor edilmiştir. Küresel olarak sıtmadan kaynaklanan tahmini 405.000 ölüm olduğu bildirilmiştir. Bildirilen



Geliş Tarihi/Received: 15.10.2020 Kabul Tarihi/Accepted: 20.10.2020

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Yener Özel, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye
Tel/Phone: +90 544 325 73 52 E-Posta/E-mail: yener_ozel@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0001-6618-8251

olguların %93'ü Afrika Bölgesi, %3,4'ü Güneydoğu Asya Bölgesi ve %2,1 Doğu Akdeniz Bölgesi ülkelerinde görüldüğü rapor edilmiştir. Dünyada görülen sıtma olgularının etkenleri incelendiğinde Güneydoğu Asya Bölgesi olgularının %53'ü, Amerika Bölgesi olgularının %75'i *P. vivax* kaynaklıdır. *P. falciparum* açısından bakıldığında Afrika Bölgesi'nde rapor edilen sıtma olgularının tahmini %99,7'si, Güneydoğu Asya Bölgesi'nin %50'si, Doğu Akdeniz Bölgesi'nin %71'i ve Pasifik Bölgesi'nin %65'i *P. falciparum* kaynaklığı olduğu bildirilmiştir (3).

Binlerce insanın ölümüne sebep olan en önemli tür *P. falciparum*'dur. Bu parazitin *in vitro* kültür ortamında üretilmesi, tanı ve tedavisi başta olmak üzere çeşitli bilimsel çalışmalara büyük katkı sağlayacaktır. Dünyada ilk kez 1976 yılında Trager ve Jensen (4) tarafından *P. falciparum*'un *in vitro* sürekliliği yapılmıştır. *In vitro* sürekli kültürün yapılması hayvan modellerine duyulan ihtiyacı ortadan kaldırmakla birlikte aynı zamanda moleküler seviyede parazit fizyolojisinin açıklanmasına da katkı sağlamıştır. Türkiye'de *P. falciparum*'un *in vitro* olarak üretildiği bir laboratuvar bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, Türkiye'de ilk kez *P. falciparum in vitro* kültürü bir laboratuvara adapte edilmiştir. Çok sayıda *P. falciparum* elde edilmesi ile parazitin virülansı, fizyopatolojisi, tanı, tedavi ve korunma yöntemleri, ilaç denemeleri, biyokimyasal özelliklerinin araştırılması, immünolojik ve serolojik alanda birçok konunun aydınlatılmasını sağlayacak çalışmalarda, bu parazitler kullanılabilir.

YÖNTEMLER

Plasmodium falciparum Suşları

Çalışmamızda kullanılan 3D7A, MRA-159 (K1), MRA-154 (7G8), ATCC 30932 (FCR-3/FMG) ve ATCC 30930 (FCR1/FVO) suşları, American Type Culture Collection'dan (ATCC) temin edilmiştir.

Kültür Besiyerinin Hazırlanması

Albumax complete medium (ACM) besiyeri için gerekli olan maddeler uygun miktarlarda tartılarak [(23 g Roswell Park Memorial Institute (RPMI) powder, 13 g hepes, 110 g hypoxanthine, 50 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmış 20 mL neomycin sülfat, 100 mL %5 hazırlanmış albumax ve 42 mL %5 hazırlanmış NaHCO₃] 2 litre distile ile balon jomede karıştırıldı ve 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edildi.

Eritrosit (ERT) Süspansiyonunun Hazırlanması

ERT süspansiyonu (O Rh pozitif) kan bankasından temin edildi. ERT süspansiyonu 50 mL'lik steril falcon tüplerine 25 mL olacak şekilde dağıtıldı ve 3,600 rpm da 3 dakika santrifüj edildi. ERT süspansiyonunun rengi açılana kadar işlem tekrar edildi. Son santrifüj aşamasından sonra pellet üzerine eşit oranda ACM besiyeri eklenerek ERT süspansiyonu hazırlandı.

Plasmodium falciparum Suşlarının Azottan Çıkarılması

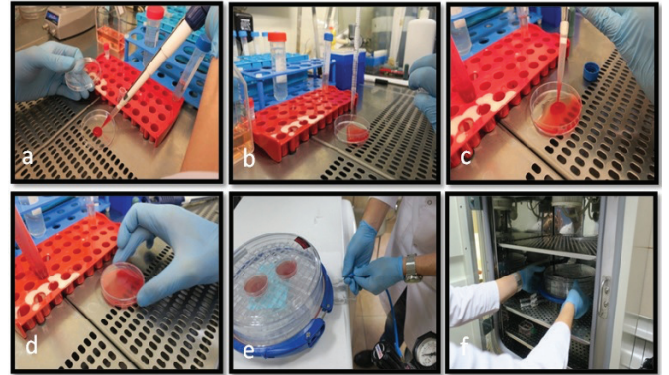
Sıvı azot tankında bulunan *P. falciparum* suşları 37 °C'lik su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek eritildi. İki mL'lik tüplere aktarılan suşlar 2,000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine eşit miktarda yıkama solüsyonu eklenerek işlem iki kez tekrar edildi. Pellet üzerine 1 mL ACM besiyeri eklenerek kültür için hazır hale getirildi (Şekil 1).



Şekil 1. *Plasmodium falciparum* suşlarının sıvı azot tankından çıkarılması ve çözündürülmesi

Plasmodium falciparum Suşlarının Kültivasyonu

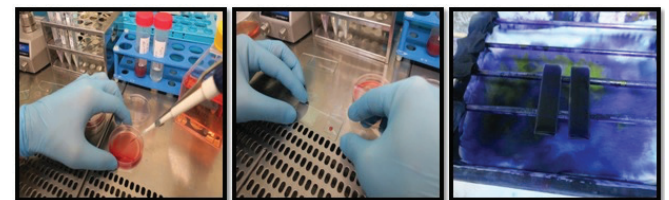
Azottan çıkarılarak hazırlanan parazit süspansiyonundan 1 mL petri kabına aktarıldı. Aynı petri kabına 5 mL ACM besiyeri ve 100 µL ERT süspansiyonu eklenerek petri kabı Chamber'a yerleştirildi. Chamber içine özel gaz karışımından (%5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂) verilerek 37 °C'lik etüve yerleştirildi ve 48 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 2).



Şekil 2. *P. falciparum* suşlarının *in vitro* kültür aşamaları, a) Parazit süspansiyonunun petri kabına aktarılması, b) ACM besiyerinin eklenmesi, c) ERT süspansiyonunun eklenmesi, d) Petri kabının dairesel hareketlerle çalkalanması, e) Petri kabının chamber içine yerleştirilmesi ve gaz karışımının verilmesi, f) Chamber'ın etüve kaldırılması ve inkübasyonu
ERT: Eritrosit, ACM: Albumax complete medium

Plasmodium falciparum Üremesinin Değerlendirilmesi

İnkübasyon sonunda kültür ortamındaki parazit üremesi ve yoğunluğunun belirlenmesi için ince yayma preparatları hazırlandı. Hazırlanan ince yayma preparatları giemsa ile boyanarak 100x büyütmede incelendi (Şekil 3).



Şekil 3. Parazit üremelerinin ince yayma yapılarak belirlenmesi

Plasmodium falciparum Kültürünün Sürdürülmesi

Kontrollerimiz esnasında kültürdeki parazit yoğunluğu %1'in altında ise petri kaplarındaki besiyeri alınarak üzerine 5 mL taze ACM besiyeri ve 100 µL ERT süspansiyonu eklenerek tekrar özel gaz karışımı içeren chamber ile inkübasyona kaldırıldı ve günlük olarak parazitemi oranı kontrol edildi. Parazit yoğunluğu %1'in üzerinde olduğunda ise kültür ortamı 15 mL falcon tüplere aktararak 2,000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet 1 mL taze ACM besiyeri ile süspansiyon edildi. Süspansiyondan 200 µL alınarak yeni petri kabına aktarıldı. Petri kabına 5 mL taze ACM besiyeri ve 100 µL ERT süspansiyonu eklenerek tekrar özel gaz karışımı içeren chamber ile inkübasyona kaldırıldı. Kalan parazit süspansiyonu kriyoprezervasyon işlemi için kullanıldı.

Plasmodium falciparum Suşlarının Kriyoprezervasyonu

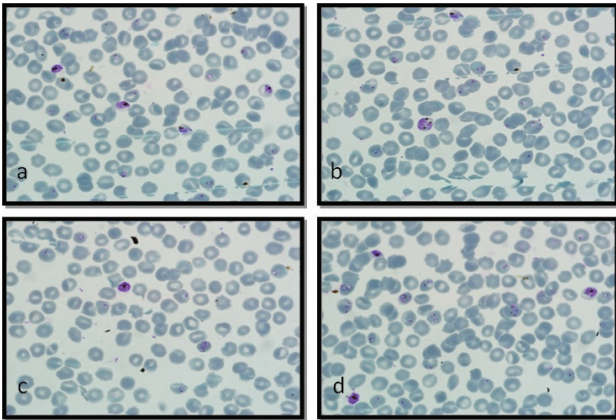
Kriyoprezervasyon için ayrılan parazit süspansiyonu 3,600 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst kısım atılarak pellet üzerine 1 mL dondurma solüsyonu (4,2 g D-sorbitol+0,9 g NaCl+ 28 mL gliserol, 100 mL distile suya tamamlanır) eklendi. Süspansiyon homojen hale getirildikten sonra kriyo tüplerine aktarıldı ve -86 °C'lik derin dondurucu içerisine kondu. Burada bir gece bekledikten sonra sıvı azot tankına aktarıldı (5-8).

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada, Türkiye için yeni bir yöntem olan *P. falciparum*'un *in vitro* kültürünün ülkemizde ilk defa gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle istatistiksel analize gerek yoktur.

BULGULAR

Çalışmamızda kullandığımız 3D7A, MRA-159 (K1), MRA-154 (7G8), ATCC 30932 (FCR-3/FMG) ve ATCC 30930 (FCR1/FVO) suşlarının başarılı bir şekilde *in vitro* kültürü yapılarak parazitlerin laboratuvar ortamında üretilmesi sağlanmıştır. Kültürasyon sonunda ince yapma preparatları değerlendirildiğinde, tüm *P. falciparum* suşlarının trofozoit ve şizont formlarının %2 oranında ürediği görülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. *In vitro* kültür sonrası *P. falciparum*'un farklı formları. a) *P. falciparum*'un kültürdeki genç trofozoitler ve olgun trofozoit formları (X100), b) *P. falciparum*'un kültürdeki genç trofozoitler ve şizont formları (X100), c) *P. falciparum*'un kültürdeki genç trofozoitler ve olgun şizont formları (X100), d) *P. falciparum*'un kültürdeki genç trofozoitler, olgun trofozoit ve şizont formları (X100)

TARTIŞMA

Plasmodium falciparum'un *in vitro* kültür ortamına adapte edilebilmesi ve üretilmesi, geleneksel ilaçlar ile artemisinin ve türevlerine karşı gelişen direncin anlaşılmasında çok değerli bilgiler sağlayabilmektedir (9,10). Bunun yanında, *in vitro* ortamda üretilen parazitler, gen ekspresyonlarının, hastalık mekanizmalarının ve koruyucu antikorların etki biçimlerinin anlaşılması için sıklıkla kullanılmaktadır (11-14).

Bass'ın (15), kısa süreli *in vitro* kültür ortamında *P. falciparum*'u bir veya iki yaşam döngüsü sürecek şekilde üretmesinden bu yana uzun süreli kültür ortamının geliştirilmesi için 60 yıldan fazla süredir araştırmalar yapılmaktadır (16). İlk kez 1976'da iki bağımsız araştırma ekibi *P. falciparum*'un uzun süreli *in vitro* kültürü için zorunlu olan bazı maddeleri keşfetmiştir (4,17). Bu temel maddeler; çeşitli tamponlar ve serumlar ile desteklenmiş besiyerleri, gaz değişimine izin verecek (şişe, mikropalaklar, petri kaplar vb.) statik kültür kapları ve atmosfer koşulları olarak belirlenmiştir. Bunun yanında uygun inkübasyon sıcaklığının (37-38 °C) ve nem oranının belirlenmesi ile enfekte olmamış insan ERT'lerin kullanılması da önemli diğer kültür gereksinimleri olarak bildirilmiştir (18,19).

Plasmodium falciparum'un uzun dönemli *in vitro* üretilmesinin öncüsü olan Trager ve Jensen (4), 1976 yılında yaptıkları çalışmada, *P. falciparum*'u iki farklı kültür sistemi ile üretmiş ve bu yöntemlerin performansını karşılaştırmışlardır. Besiyeri ortamı olarak, 25 mM hepes ve %0,2 NaHCO₃, AB rh (+) taze insan ERT süspansiyonu içeren RPMI 1,640 ve %10 AB rh (+) insan serumu kullanmışlardır. Birinci kültür sisteminde, peristaltik bir pompaya bağlı, sürekli besiyeri ve gaz karışımı (%7 CO₂, %5 O₂ ve %88 N₂) girişi sağlayan ve toplama şişeleri içeren düzenek kullanılmıştır. İkincisinde ise sabit petri kaplarında belirli aralıklarda ortam değişimi gerektiren ve uygun atmosfer ortamının mumlu kavanoz ile sağlandığı sistemi kullanmışlardır. Birinci sistemde 28 gün boyunca üretilen *P. falciparum* genç trofozoit formları, 35 mm petri kaplarına taze besiyeri kullanılarak inoküle edilmiş ve mumlu kavanozda 38 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her iki yöntemde de aseksüel formlarının tümü görülmüş ve morfolojik olarak bozukluk gözlemlenmemiştir (4).

Devam eden araştırmalar, ökaryotik hücre kültürü, hayvan serumları ve serum yerine alternatif olabilecek çeşitli standart ortamların [örneğin, lipit açısından zenginleştirilmiş sıgır albümini (Albumax®; Gibco, Grand Island, NY)] uzun dönemli *in vitro* kültür ortamında *P. falciparum*'un büyümesini desteklediğini göstermiştir (19). *In vitro* kültür ortamında *P. falciparum*'un optimum büyüme kinetiği göstermesi ortamda insan serumunun varlığını gerektirmektedir. Ancak kültür ortamında insan kaynaklı serum kullanımı, kompleman varlığı, kan grubu uyumsuzluğu ve bulaşıcı hastalık riski gibi çeşitli dezavantajları da beraberinde getirmektedir.

Cranmer ve ark. (20) 1997 yılında yayınladığı kısa bildiride, 10 farklı *P. falciparum* suşunun üreme kinetiklerini, insan serumu ve Albumax II eklenmiş, 25 mM hepes, 20 µg/mL gentamisin, 1 mM glukoz, 2 mM glutamin, 200 mM hipoksantin içeren RPMI-1,640 besiyerinde değerlendirilmiştir. Kültürler doku kültür flasklarında ve %3 O₂, %6 CO₂ ve %91 N₂ oranında ayarlanmış atmosfer ortamında 37 °C'de dört gün inkübasyona alınmıştır. Kültür besiyeri günlük olarak değiştirilmiş ve parazitemi ince yapma yapılarak kontrol edilmiştir. Parazitlerin üreme kinetikleri değerlendirildiğinde, Albumax II eklenmiş besiyeri

ortamının insan serumu eklenen besiyeri ortamı ile uyumlu olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca pürin kaynağı olarak hipoksantin varlığının parazit üremesinde oldukça önemli olduğunu da rapor etmişlerdir (20).

Çalışmamızda *P. falciparum*'un *in vitro* üretimi için insan serumu yerine Albumax II içeren besiyeri kullanılmıştır. Hazırladığımız besiyerinin temel bileşenlerini, RPMI 1640, hepes, hypoxanthine, %5 NaHCO₃, 50 µg/mL neomycin Sülfat ve ERT süspansiyonu oluşturmuştur. Bu kültür ortamı ile yaptığımız deneylerde *P. falciparum* suşlarının *in vitro* üreme performansı diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Bu açıdan albumax II'nin insan serumuna karşılık oldukça iyi bir alternatif olduğu düşünülmüştür.

Plasmodium falciparum'un *in vitro* araştırmalarında sıklıkla kültüre adapte suşlar kullanılmaktadır. Bu suşların başında *P. falciparum* 3D7 suşu gelmektedir. Ancak hastalardan izole edilen yabancı tip suşların kültür ortamında yapılan bazı modifikasyonlar ile kültüre adapte edilmesi mümkündür. Bu modifikasyonların başında insan serumu yerine albumax kullanımı ve hematokrit oranlarının değiştirilmesi gelmektedir. White ve ark.'nın (21) 2016 yılında yaptığı bir çalışmada, *P. falciparum* ile enfekte 33 hastadan alınan kan örneklerini farklı değişkenler içeren besiyeri ortamında kültüre adapte etmeye çalışmışlardır. Araştırmacılar, farklı hematokrit oranları içeren besiyerlerine yüksek ve düşük oranda albumax ya da inaktif insan serumu ekleyerek yabancı tip suşların adaptasyon yeteneklerini belirlemişlerdir. Buna göre besiyeri bileşimi, yıkanmış ERT kullanılarak, %1 hematokrit ve %0,5 albumax II içerecek şekilde hazırlandığında, bazı parazit suşlarının sekiz günde kültüre adapte olduğu bildirilmiştir. Ancak yazarlar, yabancı tip suşlarının farklı intirinsik özelliklerinden dolayı adaptasyon süresinin 30 güne kadar sürebileceğini ifade etmişlerdir (21).

Çalışmamız ülkemizde *P. falciparum*'un *in vitro* üretildiği ilk çalışma niteliğindedir. Bu amaçla özellikle *P. falciparum*'un kültüre adapte suşları olan 3D7A, MRA-159 (K1), MRA-154 (7G8), ATCC 30932 (FCR-3/FMG) ve ATCC 30930 (FCR1/FVO) suşları kullanılmış ve başarılı bir şekilde üretilmiştir. Bu suşları kullanarak yaptığımız çalışmalar ile standart kültür koşulları oluşturulmuş ve gerekli yöntemler valide edilmiştir. Devam niteliğinde olan ve planlaması yapılan çalışmalarımız ile parazit bankamızda muhafaza edilen yabancı tip suşların da laboratuvar ortamında üretilmesi ve kültüre adapte edilmesi düşünülmektedir.

Plasmodium falciparum'un *in vitro* kültür ortamında üretilmesi, besiyerine eklenen ERT'lerin durumu ile yakından ilişkilidir. Uygun donörden ve uygun şartlarda alınmayan ERT hücreleri parazit üremesini olumsuz etkilemektedir. Günümüzde mevcut kan bankası standartlarına göre donörlerden alınan ERT hücreleri SAGM (tuz, adenine, manitol ve glukoz içeren bir çözelti) çözeltisi ya da eşdeğer bir çözelti içeren kan torbalarında, 4 °C'de 42 gün saklanabilmektedir (22). Goheen ve ark. (23) tarafından 2018 yılında yapılan bir çalışmada, ERT koruyucu farklı çözeltilerin ve saklama sürelerinin *in vitro* kültür ortamında *P. falciparum*'un üreme ve gelişmesine etkileri araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada dört farklı ERT koruyucu çözelti (asit-citrat-dextroz, citrat-fosfat-dextroz-adenine, Alsever's çözeltisi ve red blood cell buffer) içeren kan torbalarına alınan donör ERT'leri, iki haftalık aralıklar ile *P. falciparum*'un kültür ortamına eklenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; iki hafta muhafaza edilen ERT süspansiyonu parazitin üreme kinetiğini değiştirmezken, dört haftalık sürede %42, altı haftalık sürede ise %90 oranında azalma görülmüştür. Yazarlar ayrıca iki haftadan daha uzun süre bekletilen ERT

süspansiyonlarının hangi koruyucu çözeltide olursa olsun parazitin üremesine olumsuz etki ettiğini bildirmiştir. İki hafta süreyle koruyucu çözelti içinde muhafaza edilen ERT'lerin *P. falciparum in vitro* kültürü için kullanışlı olduğunu belirtmişlerdir (23).

Çalışmamızda, O rh (+) grubu ERT süspansiyonu kullanılmıştır. ERT süspansiyonları hazırlandıkları günden itibaren kayıt altına alınarak 4 °C'de muhafaza edilmiştir. On günü geçen hücreler çalışmamızda kullanılmayarak imha edilmiştir.

Besiyeri ortamında kullanılan ERT'lerin sağlıklı donörlerden alınması oldukça önemlidir. Hemoglobino patili donörlerden alınan ERT'ler defektli olacağı için parazit üremesi baskılanabilmektedir. Pathak ve ark. (24) tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada, çeşitli hemoglobino patilere sahip 40 hastadan alınan ERT süspansiyonları ile *in vitro* kültür ortamında *P. falciparum*'un üreme kinetikleri araştırılmıştır. *P. falciparum*'un invazyon ve üreme oranlarının, anormal ERT'lerin kullanıldığı *in vitro* kültür ortamında, normal ERT'lere göre oldukça azaldığı belirtilmiştir (24).

Kültür sürecinin süreklilik arz etmesi için parazitin bulunduğu besiyeri ortamının belirli aralıklarla değiştirilmesi ve tazelenmesi gerekmektedir. Günlük besiyeri değişimi statik kültürlerde zorunluluk oluşturmaktadır. Ancak bazı araştırmacılar çeşitli teknikler geliştirerek besiyeri değişim süresini uzatabildiklerini belirtmişlerdir. Fairlamb ve ark.'nın (25) 1985 yılında yayınladıkları bir çalışmada, %1 ERT süspansiyonu içeren izotonik özellikteki modifiye besiyeri kullanarak ve günlük değişim yapmadan, dört gün sonunda %20-30 arası parazitemi oranına ulaştıklarını bildirmişlerdir. Farklı bir çalışmada, Chavalitshewinkoon ve Wilairat (26) isimli araştırmacıların 1991 yılında besiyeri değişimi gerektirmeden daha fazla miktarda parazit elde etmek için Fairlamb ve ark. (25) kullandığı besiyerini, insan serumu yerine insan plazması kullanarak modifiye etmişlerdir. Kültürasyonu, %0,5-2 parazitemi ile başlatılmış ve dört gün sonunda parazitemi oranının %25-54,8'e ulaştığı rapor edilmiştir (26).

Güncel literatür ve protokoller sıklıkla *P. falciparum*'un *in vitro* kültüründe günlük besiyeri değişimini önermektedir (7,8,27). Çalışmamızda iki gün sonunda parazitemi oranı %2 olarak tespit edilmiştir. Bu süre boyunca günlük besiyeri değişimi yapılmıştır.

In vitro *P. falciparum* kültüründe bir diğer önemli değişkende ortam atmosferini oluşturan gazlar ve bunların miktarıdır. Aseksüel formların en iyi görüldüğü koşullar düşük oksijen ve %5 CO₂ bulunan besiyeri ortamıdır. En basit olarak söz konusu ortam şartları mumlu kavanoz yöntemi ile de oluşturulabilmektedir (28). Ancak pek çok çalışmada mumlu kavanoz yönteminin optimal oksijen şartlarını sağlamadığı ve yüksek oksijen miktarı (%15-17) ile parazitin üremesini engellediği belirtilmiştir. Günümüzde yaygın olarak, %1-5 O₂, %5 CO₂ ve %90-94 N₂ olacak şekilde hazırlanan özel gaz karışımının belirli bir süre kültür ortamına uygulanması tercih edilmektedir.

Çalışmamızda bileşimi %5 CO₂, 5% O₂, %90 N₂ olacak şekilde hazırlanmış özel bir gaz karışımı kullanılmıştır. *P. falciparum* suşu besiyerine inoküle edildikten sonra, kültür ortamının konulduğu özel chamber'a yaklaşık 30 sn süre ile 1,5-2 bar basınç altında gaz karışımı verilmiştir. Sonrasında chamber'ın gaz giriş ve çıkışları kapatılarak inkübasyona alınmıştır. Özel gaz karışımı kullanılarak yapılan kültürasyonu sonunda yeterli miktarda *P. falciparum* aseksüel formları *in vitro* olarak üretilmiştir.

SONUÇ

Dünya'da oldukça fazla insanı etkileyen ve milyonlarca çocuğun ölümüne neden olan *P. falciparum*'un *in vitro* ortamda üretilmesi, bilimsel olarak pek çok araştırmacının yapılmasına katkı sağlamıştır. Bir parazitin yok edilmesi ya da neden olduğu hastalığın iyileştirilebilmesi için öncelikle parazitin laboratuvar koşullarında üretilmesi ve biyolojisinin anlaşılması gereklidir. Ancak bu şekilde *P. falciparum*'un hastalık oluşturma mekanizması ve ilaçlara karşı direnç yetenekleri çözümlenebilir. Ayrıca *P. falciparum*'un *in vitro* üretilmesi, pek çok ilaç adayını molekül ya da doğal bileşenin kısa sürede taranmasına imkan sağlayacaktır. Bu çalışma ülkemizde, *P. falciparum in vitro* olarak laboratuvar şartlarında üretildiği ilk çalışmadır. *P. falciparum*'un *in vitro* üretilmesi için gerekli yöntemlerin ve standartların validasyonu yapılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı, 2019-092 numaralı proje ile desteklediği için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz. Projenin gerçekleşmesinde destek olan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na teşekkür ederiz.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Araştırma öncesi Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'ndan 10.05.2019 tarih ve E.39899 sayılı karar ile izin alınmıştır.

Hasta Onayı: Çalışmada kullanılan parazit suşları, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'nda sıvı nitrojende saklanan parazit suşlarıdır. Hastadan izole edilmemiştir, bu nedenle hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Konsept: A.Ö., Dizayn: A.Ö., İ.Ç., Y.Ö., Veri Toplama veya İşleme: A.Ö., İ.Ç., M.H., Y.Ö., Analiz veya Yorumlama: A.Ö., İ.Ç., Y.Ö., Literatür Arama: A.Ö., İ.Ç., M.H., Y.Ö., Yazan: İ.Ç., Y.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından 2019-092 no'lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. Can Med Assoc J 2004; 170: 1693-702.
2. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. Malar J 2014; 13: 68.
3. WHO. Global Malaria Programme. Available from: URL: <https://www.who.int/malaria>
4. Trager W, Jensen J. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976; 193: 673-5.
5. Moll K, Kaneko A, Scherf A, Wahlgren M. Methods in Malaria Research. 6th edition. Glasgow: EVIMalar; 2013. Available from: URL: https://www.beiresources.org/portals/2/MR4/Methods_In_Malaria_Research-6th_edition.pdf

6. Duffy S, Avery VM. Plasmodium falciparum in vitro continuous culture conditions: A comparison of parasite susceptibility and tolerance to antimalarial drugs throughout the asexual intra-erythrocytic life cycle. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2017; 7: 295-302.
7. Duffy S, Avery VM. Plasmodium falciparum In Vitro Culture-The Highs and Lows. Trends Parasitol 2018; 34: 812-3.
8. Duffy S, Avery VM. Routine In Vitro Culture of Plasmodium falciparum: Experimental Consequences? Trends Parasitol 2018; 34: 564-75.
9. Oduola AMJ, Alexander BM, Weatherly NF, Bowdre JH, Desjardins RE. Use of non-human plasma for in vitro cultivation and antimalarial drug susceptibility testing of Plasmodium falciparum. Am J Trop Med Hyg 1985; 34: 209-15.
10. Looareesuwan S, Viravan C, Webster HK, Kyle DE, Hutchinson DB, Canfield CJ. Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1996; 54: 62-6.
11. Miotto O, Amato R, Ashley EA, Macnns B, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, et al. Genetic architecture of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum. Nat Genet 2015; 47: 226-34.
12. Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, do Rosario VE, Gwadz RW, Walker-Jonah A, et al. Chloroquine resistance not linked to mdr-like genes in a Plasmodium falciparum cross. Nature 1990; 345: 253-5.
13. Persson KEM, Fowkes FJL, McCallum FJ, Gicheru N, Reiling L, Richards JS, et al. Erythrocyte-Binding Antigens of Plasmodium falciparum Are Targets of Human Inhibitory Antibodies and Function To Evade Naturally Acquired Immunity. J Immunol 2013; 191: 785-94.
14. Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, Tsuboi T. Antibodies against a Plasmodium falciparum antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. Vaccine 2012; 30: 1972-80.
15. Bass CC. A new conception of immunity: Its application to the cultivation of protozoa and bacteria from the blood and to therapeutic measures. JAMA 1911; 57: 1534-5.
16. Bass CC, Johns FM. The cultivation of malarial plasmodia (Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum) in vitro. J Exp Med 1912; 16: 567-79.
17. Haynes JD, Diggs CL, Hines FA, Desjardins RE. Culture of human malaria parasites Plasmodium falciparum. Nature 1976; 263: 767-9.
18. Grun JL, Weidanz WP. Cultivation of Plasmodium falciparum in commercially available sera depleted of natural antibodies reactive with human erythrocytes. J Parasitol 1987; 73: 384-8.
19. Basco LK. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XV. Experimental studies on serum substitutes and supplements and alternative culture media for in vitro drug sensitivity assays using fresh isolates of Plasmodium falciparum. Am J Trop Med Hyg 2003; 69: 168-73.
20. Cranmer SL, Magowan C, Liang J, Coppel RL, Cooke BM. An alternative to serum for cultivation of Plasmodium falciparum in vitro. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91: 363-5.
21. White J, Mascarenhas A, Pereira L, Dash R, Walke JT, Gawas P, et al. In vitro adaptation of Plasmodium falciparum reveal variations in cultivability. Malar J 2016; 15: 33.
22. Sparrow RL. Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: A role for 'omics' analyses. Blood Transfus 2012; 10(Suppl 2): s7-11.
23. Goheen MM, Clark MA, Kasthuri RS, Cerami C. Biopreservation of RBCs for in vitro Plasmodium falciparum culture. Br J Haematol 2016; 175: 741-4.
24. Pathak V, Colah R, Ghosh K. Effect of inherited red cell defects on growth of Plasmodium falciparum: An in vitro study. Indian J Med Res 2018; 147: 102-9.
25. Fairlamb AH, Warhurst DC, Peters W. An improved technique for the cultivation of Plasmodium falciparum in vitro without daily medium change. Ann Trop Med Parasitol 1985; 79: 379-84.
26. Chavalitshewinkoon P, Wilairat P. A simple technique for large scale in vitro culture of Plasmodium falciparum. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991; 22: 544-7.

27. Duffy S, Loganathan S, Holleran JP, Avery VM. Large-scale production of *Plasmodium falciparum* gametocytes for malaria drug discovery. Nat Protoc 2016; 11: 976-92.
28. Jensen JB, Trager W. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. J Parasitol 1977; 63: 883-6.