

FARELERDE PLASMODIUM YOELII SITMA MODELİNDE AZİTROMİSİN İLE SAĞALTIM

İ. Cüneyt BALCIOĞLU, Ali A. KİLİMÇİOĞLU, Özgür KURT,
Nogay GİRGİNKARDEŞLER, Kenan DEĞERLİ, Ahmet ÖZBİLGİN

ÖZET

Plasmodium yoelii sitma modeli üzerine azalid grubu antibiyotiklerden azitromisinin antimalaryal etkisi araştırılmıştır. Oluşturulan 6 çalışma grubundan ilkine 100 mg/kg klorokin, diğer 5 gruba sırası ile 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg veya 50 mg/kg dozlarında azitromisin üç gün süreyle günde tek doz oral yolla verilmiştir. Tüm grupların ikinci günden itibaren ikişer gün ara ile kuyruk uçlarından alınan kan örneklerinde 22 gün süre ile parazitemi oranları takip edilmiştir.

Azitromisin verilen grplardaki 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozunda ilaç uygulanan farelerde paraziteminin tamamen yok edilemediği, fakat infeksiyonun seyrinin izlendiği hiç ilaç verilmeyen kontrol grubuna göre baskılantı, 30 mg/kg, 40 mg/kg ve 50 mg/kg dozunda ilaç uygulanan farelerde ise sitmanın tamamen sağaltıldığı gözlenmiştir. Klorokin sağaltımı uygulanan fare grubunda da kanda *P.yoelii*'ye rastlanmamıştır.

SUMMARY

Azithromycin treatment in an experimental Plasmodium yoelii malaria model in mice.

The anti-malarial activity of azithromycin, an azalide group antibiotic, was investigated on the malaria model, *Plasmodium yoelii*. Six study groups were organized for this purpose; the first group was given 100 mg/kg chloroquine while the other five groups were given 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg or 50 mg/kg oral azithromycin, respectively, for three days as single dose in a day. The blood samples were obtained from the tails of the mice, were investigated for their parasitemic ratios for 22 days, beginning at the second day of the study, with two days intervals.

In 10 mg/kg and 20 mg/kg azithromycin groups parasitemia was not totally eradicated but was suppressed when compared with control group without any treatment. On the other hand, the malaria infection was treated successfully in the groups that were given 30 mg/kg, 40 mg/kg and 50 mg/kg azithromycin. In addition, no *P.yoelii* was detected in the blood samples of the group that was given chloroquine treatment.

GİRİŞ

Sıtma infeksiyonu günümüzde 32° güney, 64° kuzey paralellerleri arasında, ortalama sıcaklığı 15°C'nin üzerinde olan ve anofellerin bulunduğu her ülkede görülebilmektedir. Günümüzde dünya nüfusunun 1/4'ü sıtma riski altındadır. Sıtma yılda çoğunuğu kadın ve çocuk olmak üzere yaklaşık 800 milyon yeni olgu ve 3 milyon ölü sayısı ile çok önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (16).

Dünyada görülen sıtmaya infeksiyonlarının yaklaşık % 80'ini *P.vivax*, % 10'unu *Pfalciparum* sıtması oluşturmaktadır; ancak, sıtmaya bağlı ölümlerin neredeyse tümünde etken *Pfalciparum*'dur. Türkiye'de görülen sıtmaya infeksiyonlarının büyük bir kısmında etken *P.vivax* iken son yıllarda gerek yurt dışı kaynaklı, gerekse yerli *Pfalciparum* olgularına rastlandığı bildirilmektedir (12). Komşu ülkelerden sıtmalıların Türkiye'ye göçü, iç turizm ve büyük işçi göçlerine sahne olan Çukurova bölgesi dünə kadar sıtmmanın varlığında ve yayılmasında kaynak oluştururken Güneydoğu Anadolu Projesi'nin işlerlik kazanmasıyla sıtmmanın kaynağı bu bölge olmaya başlamış ve Türkiye'de güncelliğini koruyan sıtmaya sorunu daha büyük boyutlara ulaşmıştır. Güneydoğu Anadolu bölgemizde bulunan Diyarbakır, Batman, Şanlıurfa, Şırnak, Muş, Siirt, Mardin gibi illerimizde 1994 yılının ilk 11 ayında toplam 68,261 sıtmaya olgusu bildirilmiştir (3).

Sıtmada kemoterapi alanında yapılan çalışmalar hastalığın yayılmasının önlenmesinde ve kontrol altına alınmasında önemli rol oynamaktadır.

İnsanda en önemli sıtmaya etkenleri olan *Pfalciparum* ve *P.vivax*'ın her geçen gün sıtmaya ilaçlarına dirençli suşlarının gelişmesi, etkin sıtmaya sağaltımında en çok kullanılan klorokine alternatif ilaç gereksinimini doğurmuş ve bu yönde çalışmalar başlatılmıştır (5,15).

Sıtmaya araştırmalarında laboratuvarlarda insanda yerleşen türler olan *Pfalciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* ve *P.malariae*'nın bulundurulmasının, geliştirilip devam ettirilmesinin ve bu etkenlerle çalışılmasının birtakım zorlukları vardır. Laboratuvar çalışmalarında insan sıtmasına en uygun ve en yakın model kemirgenlerde kolayca üreyebilen *P.yoelii* ve *P.berghei* türlerinin oluşturduğu sıtmadır (11).

Sıtmaya sağaltımında in-vivo ve in-vitro olarak çeşitli antibiyotik sağaltımları denemektedir. Azitromisinin yarılanma ömrünün verilen doza bağımlı olarak 5-11 saat arası değiştiği ve oral yolla alındıktan sonra 1.5-3.3 saatlik sürede en yüksek konsantrasyonlara ulaştığı bildirilmektedir. Ayrıca ilaçın serumda düşük konsantrasyonda bulunmasına rağmen dokularda yüksek konsantrasyonlara ulaştığı, tek doz alındıktan 7-14 gün sonra bile idrarda tespit edildiği bildirilmiştir (8,10).

Azitromisinin mide asidine dayanıklı olduğu, Gram negatif organizmalara ve protozoonlara karşı başarılı sağaltım sağladığı bildirilmiştir (7).

İn-vitro olarak azitromisinin klorokine dirençli ve klorokine dirensiz *Pfalciparum* suşlarına karşı etkili olduğu bildirilmiştir (4,6).

Azitromisinin sıtmaya sağaltımında potansiyel bir antimalyaryal ilaç olabileceği düşünülderek *P.yoelii* ile oluşturulan sıtmaya modeli üzerine sıtmaya sağaltımındaki etkinliği araştırılmış ve bu etkinlik klorokin ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 25 g ağırlığında 70 adet Balb/c cinsi beyaz fare kullanılmıştır. Her birinde 10 adet fare bulunan 7 grup oluşturulmuştur. Her fare 10^4 adet *P.yoelii* eritositer formu verilecek şekilde kuyruk veninden intravenöz enjeksiyonla infekte edilmiştir. Daha sonra birinci gruptaki fareler kontrol grubu olarak ayrılmış, herhangi bir ilaç verilmemiş ve infeksiyonun doğal seyri izlenmiştir.

İkinci gruptaki farelere inokülasyondan 24 saat sonra klasik sıtmaya sağaltımında kullanılan klorokin, gavaj yardımıyla, günde 100 mg/kg tek doz olarak üç gün boyunca oral yolla verilmiştir. Böylece susun klorokin direnci olup olmadığı araştırılmıştır (13).

İnokülasyondan 24 saat sonra, diğer beş çalışma grubuna sırası ile 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarında azitromisin üç gün süreyle günde tek doz olarak gavaj yardımıyla oral yolla verilmiştir (7,9).

Parazitemiyi kontrol için inokülasyonun ikinci gününden itibaren tüm grplardaki farelerin kuyruk uçlarından kan alınarak her fare için 5 ayrı ince yayma preparat hazırlanmış ve Giemsa ile boyanarak her preparattan 20 farklı alandan 100 eritrosit içindeki infekte eritrosit sayıları saptanıp ortalamaları alınmıştır. Bu işlem her grup için yapılmış, böylece gruptaki farelerin *P.yoelii* ile infekte eritrosit sayılarının ortalamaları alınarak parazitemi oranları değerlendirilmiştir. Tüm grplar 22 gün süre ile izlenmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda kontrol grplarında bulunan farelerde ikinci günden itibaren kuyruk uçlarından alınan kandan *P.yoelii* saptanmaya başlamış ve 18. gün en yüksek seviyesine ulaşmıştır.

Klasik sıtmaya sağıltımında kullanılan klorokinin verildiği gruptaki farelerin kanlarında parazitemiye rastlanmamıştır. Azitromisin sağıltımı verilen grplardan 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozunda ilaç kullanan grplarda paraziteminin devam ettiği, fakat 15. güne kadar baskılantı gözlenmiştir. 30 mg/kg ve daha yüksek dozlarda azitromisin sağıltımı verilen grplardaki farelerin kanında *P.yoelii*'ye rastlanmamıştır. Tüm grplardaki parazitemi oranlarının günlere göre dağılımı tabloda gösterilmiştir.

Tablo. Kontrol, klorokin ve azitromisin verilen grplardaki farelerde parazitemi oranlarının günlere göre dağılımı.

Gün	Kontrol	Klorokin		Azitromisin	
		100 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	30, 40, 50 mg/kg
2. gün	% 1	% 0	% 0.5	% 0.2	% 0
4. gün	% 3	% 0	% 0.6	% 0.5	% 0
6. gün	% 8	% 0	% 0.5	% 0.5	% 0
8. gün	% 10	% 0	% 1	% 0.8	% 0
10. gün	% 13	% 0	% 1	% 1	% 0
12. gün	% 15	% 0	% 5	% 4	% 0
14. gün	% 15	% 0	% 8	% 8	% 0
16. gün	% 17	% 0	% 12	% 11	% 0
18. gün	% 18	% 0	% 16	% 16	% 0
20. gün	% 18	% 0	% 18	% 18	% 0
22. gün	% 18	% 0	% 18	% 18	% 0

TARTIŞMA

Günümüzde çeşitli sıtmaya ilaçlarına dirençli *P.falciparum* ve *P.vivax* suşlarının geliştiği ve sitmanın en iyi modelinin laboratuvarlarda farelerde geliştirilen *P.berghei* ve *P.yoelii* gibi *Plasmodium* türlerinin olduğu belirtilmektedir (7,11).

Azitromisinin mitokondrial ribozomların 70S'lik birimlerini etkilediği ve *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. gibi protozoonlara etkili olduğu bildirilmiştir (1,2,14).

İn-vitro olarak yapılan çalışmalarla *Plasmodium* türlerine karşı azitromisinin etkili ol-

duğu belirtilmiştir (6). Bu nedenle makrolid grubu antibiyotiklerden azitromisinle sitmanın sağaltımı üzerine çalışmalar ağırlık kazanmıştır.

Azitromisinin *P.berghei*'ye karşı antimalaryal etkisinin araştırıldığı çalışmalarında belli dozlarda başarılı olduğu bildirilmektedir. Gingras ve Jensen (7) tarafından yapılan bir çalışmada *P.berghei* suçu için azitromisin, eritromisin, CP-63,956 ve klorokinin % 50 inhibitör konsantrasyon değerleri araştırılmış ve sırasıyla 17.4, 442, 18.0 ve 1.5 mg olarak saptandığı bildirilmiştir.

Ülkemizde de Kuman ve Özbilgin (9) tarafından azitromisinin *P.berghei* üzerine etkisi etkisi araştırılmış ve bu çalışmada 20 mg/kg dozundaki azitromisinin parazitemiyi inhibe ettiği, fakat tam bir sağaltımın sağlanamadığı, 25 mg/kg dozundaki azitromisinin ise tam sağaltım sağladığı bildirilmiştir.

Özbilgin (13)'in *P.berghei*'ye karşı klorokinin in-vivo etkisini araştırdığı çalışmasında 50 mg/kg, 75 mg/kg ve 100 mg/kg dozunda klorokinin 4 içinde, 125 mg/kg dozunda 2 içinde, 150 mg/kg dozunda 1 içinde infeksiyonu önlediği bildirilmiştir.

Çalışmamızda sitma modelinde azitromisin 3 gün süre ile oral yolla verilmiş, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg dozlarında azitromisin tedavisi uygulanan gruptarda parazitemiye rastlanmamış ve tam bir sağaltım elde edilmiştir.

Aynı yöntemle verilen 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozunda azitromisin sağaltımı uygulanan gruptarda paraziteminin oluştuğu, ancak kontrol grubuna oranla paraziteminin düşük olduğu görülmüştür.

Klasik sitma sağaltımında kullanılan klorokinin verildiği grupta da tam bir sağaltım gözlenmiştir.

P.vivax ve *P.falciparum* olgularında günümüzde kullanılan sitma ilaçlarına karşı oluşan direnci göz önüne alarak yaptığımız bu ön çalışmada, sitma sağaltımında azitromisinin diğer ilaçlara alternatif potansiyel bir antimalaryal olabileceği ve bu konuda ileri çalışmalar yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Teşekkür: Bu çalışmada literatür ve ilaç desteği sağlayan Pfizer İlaçları A.Ş.'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1- Araujo FG, Guptill DR, Remington JS: Azithromycin, a macrolide antibiotic with potent activity against *Toxoplasma gondii*, *Antimicrob Agents Chemother* 32:755 (1988).
- 2- Crouch AA, Seow WK, Whitman LM, Thong YH: Sensitivity in vitro of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84:246 (1990).
- 3- Çetin ET, Anğ Ö, Töreci K: *Tibbi Parazitoloji*, 5. baskı, s. 185, İÜ Tıp Fak. Yayın No: 146, İstanbul (1995).
- 4- Divo AA, Geary TG, Jensen JB: Oxygen and time dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on *Plasmodium falciparum* in culture, *Antimicrob Agents Chemother* 27:21 (1985).
- 5- Geary TG, Dive AA, Jensen JB: An in vitro system for identification of potential anti-malarial drugs, *J Parasitol* 69:577 (1983).
- 6- Gingras BA, Jensen JB: Activity of azithromycin and erythromycin against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* in vitro, *Am J Trop Med Hyg* 47:378 (1992).

- 7- Gingras BA, Jensen JB: Antimalarial activity of azithromycin and erythromycin against Plasmodium berghei, *Am J Trop Med Hyg* 49:101 (1993).
- 8- Girard AE, Girard P, English AR, Gootz TD, Cimochowski CR, Faiella JA, Haskell SL, Retsema JA: Pharmacokinetic and in vivo studies with azithromycin (CP-62,993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution, *Antimicrob Agents Chemother* 31:1948 (1987).
- 9- Kuman HA, Özbilgin A: Azitromisin'in Pberghei'ye karşı antimalyaryal etkisinin araştırılması, *Türk Parazitol Derg* 19:364 (1995).
- 10- Lode H: The pharmacokinetics of azithromycin and their clinical significance, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10:807 (1991).
- 11- Mc Cutchan TF, Dane JB, Miller LH, Barnell J: Evolutionary relatedness of Plasmodium spp. as determined by the structure of DNA, *Science* 225:808 (1984).
- 12- Ok ÜZ, Vurgun N, Limoncu ME, Ceylan H, Kuman HA: Türkiye'de son yıllarda ilk yerli falciparum ve vivax miks sitma olgusu, *Türk Parazitol Derg* 20:211 (1996).
- 13- Özbilgin A: Plasmodium berghei olgularında chloroquine'in in vivo, in vitro etkileri, chloroquine ile atenuer parazitlerle immunizasyon çalışmaları, *Doktora Tezi*, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir (1991).
- 14- Ravdin JI, Skilogiannis J: In vitro susceptibilities of Entamoeba histolytica to azithromycin, CP-63,956, erythromycin, and metronidazole, *Antimicrob Agents Chemother* 33:960 (1989).
- 15- Rieckmann KH: Antibiotics, "Peter W, Richards WGH (eds): *Antimicrobial Drugs II. Current Antimalarials and New Drug Developments*" kitabında s. 443, Springer-Verlag, New York (1984).
- 16- Struchler D: How much malaria is there?, *Parasite Today* 5:39 (1989).