

Parazitolojide Hayvan Modelleri

Prof. Dr. Ahmet Özbilgin
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa

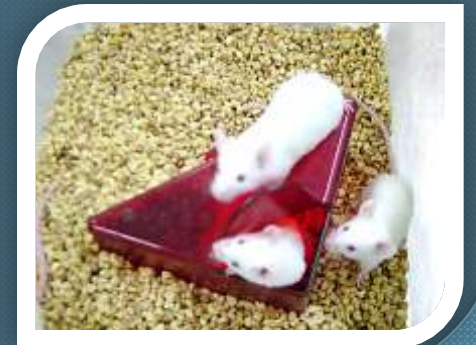
Hayvan çalışmalarında etik

- 1. REDUCTION
(Azaltma)
- 2. REPLACEMENT
(Yerine bir şey koyma)
- 3. REFINEMENT
(Hayvanları rahatının sağlanması)



Hayvan çalışmalarının riskleri

- Fiziksel zararlar
 - Kafes veya kapaklarının batması, kesmesi, çizmesi, hayvanların ısırması, tırmalaması
- Oluřabilecek zoonozlar
- Kullanılan kimyasal maddeler ve onların metabolitleri
- Atıkların yok edilmesi
- Etik problemler



Modelleri ile yapılan çalışmalar

- Kemoterapi
- Aşı geliştirme
- Patogenez
- Hücre Biyolojisi
- Moleküler biyoloji
- Biyokimya
- Gametositogenez
- Genetik
- Transfeksiyon
- Tanı kriterlerini araştırma
- Mitokondri ve plasmid ilişkileri
- Mutant dirençli insan eritrositleri
- Konak hücrede proteinlerin taşınması
- İlaç dirençleri
- **Etken madde taramaları**

Yeni etken madde ve moleküllerin aranması

- **Klinik öncesi değerlendirmede** sentez edilen veya doğal kaynaklardan izole edilen kimyasal maddelerin, insanda hastalıkların tedavisinde kullanılmaları amacıyla klinik denemelere tabi tutulabilmeleri için önce mutlaka **tarama testleri ve toksisite deneyleri** yapılmalıdır.

Yeni etken madde ve moleküllerin aranması

- **Tarama Testleri;**
- **İn vitro tarama testleri**
- **İn vivo tarama testleri** öngörülen etkinin özelliği nedeniyle hastalığı temsil eden hayvan modelleri kullanılmaktadır.
- Bu sayede geliştirilme amacını oluşturan ve sahip olması öngörülen etki ya da etkileri gösteren maddeler belirlenir. Bu özelliği bulunmayan maddeler için deneme artık bu kademedede bitmiştir..

Yeni etken madde ve moleküllerin aranması

- **Toksisite Testleri;** tarama testlerini başarı ile geçen bileşikler ancak Toksisite Testlerine tabi tutulurlar.Bu aşamada fonksiyonel,biokimyasal ve histopatolojik toksik etkileri incelenir.
- **Klinik değerlendirme;** basamağının ise Faz I, FazII, FazIII ve FazIV denemelerinden oluşmaktadır.

Plasmodium Türleri

- *İnsan*

- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malaria*
- *Plasmodium knowlesi*

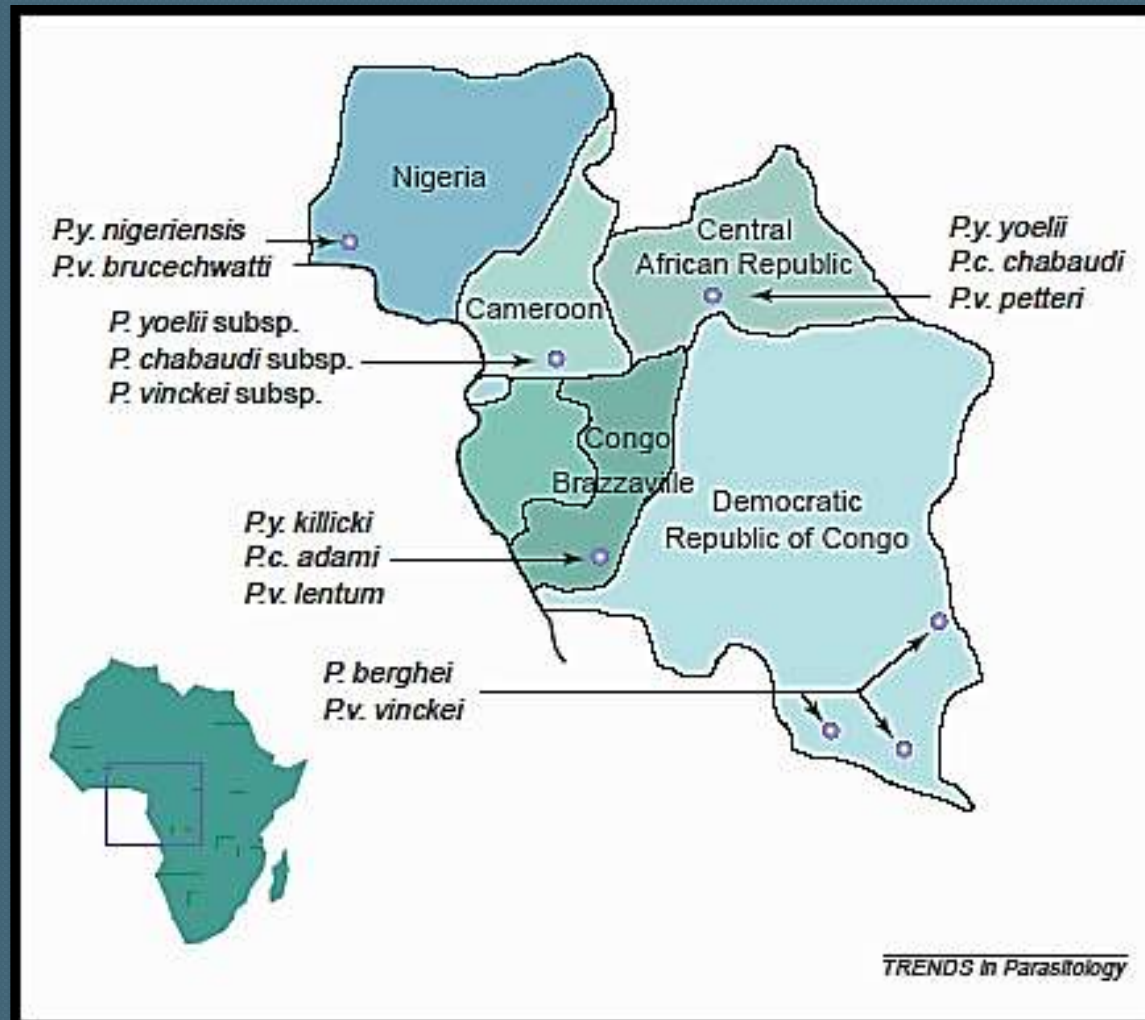
- *Kemirici*

- *Plasmodium yoelii*
- *Plasmodium berghei*
- *Plasmodium chabaudi*
- *Plasmodium vinckei*

Aotus: The Owl Monkey



Kemirici sıtması kaynak noktaları



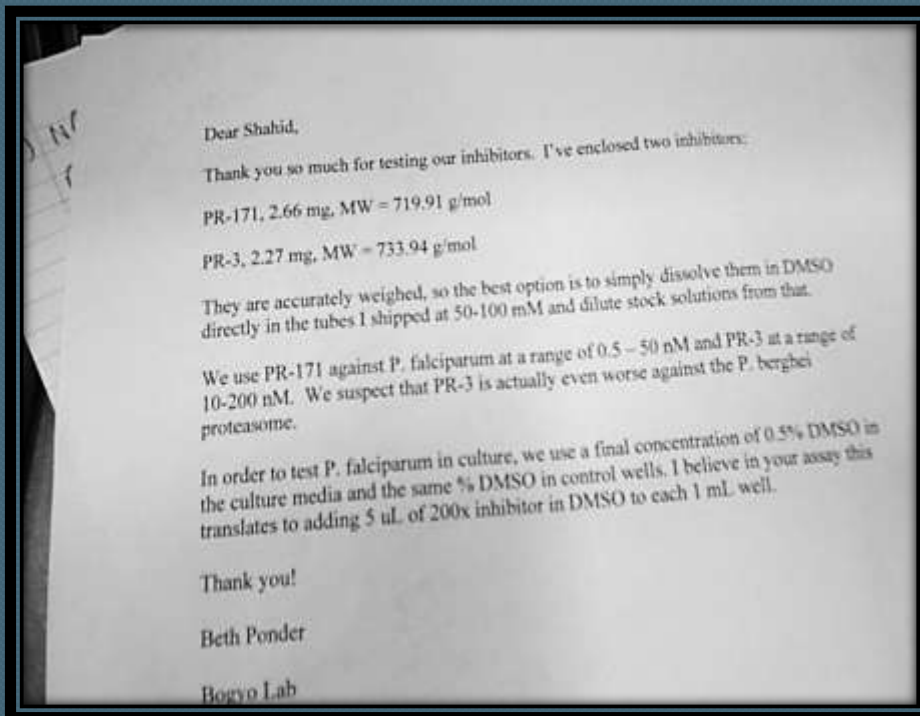
Sıtma

- Enfekte fareden koltuk altı veni kesilerek alınan ve enfeksiyon oranı 10^7 /ml *P. yoelii* olarak seyreltilen kandan her fareye 0.25 ml. ($2,5 \times 10^7$ adet *P. yoelii*) kuyruk veninden intra venöz olarak verilmelidir. *P. berghei* ise aynı miktarda peritondan verilebilir

Sıtma

- . Enjeksiyondan sonra 2 gün ara ile, farelerin kuyruk ucu kesilerek alınan kandan yapılan preparatlarda sıtma enfeksiyon yüzdeleri saptanarak parazitemi izlenmeli ve *P. begheii*'de 7 günde *P. yoelii*'de ise 12 günde bir pasaj yapılarak suşun canlılığı sürdürülmelidir.

Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



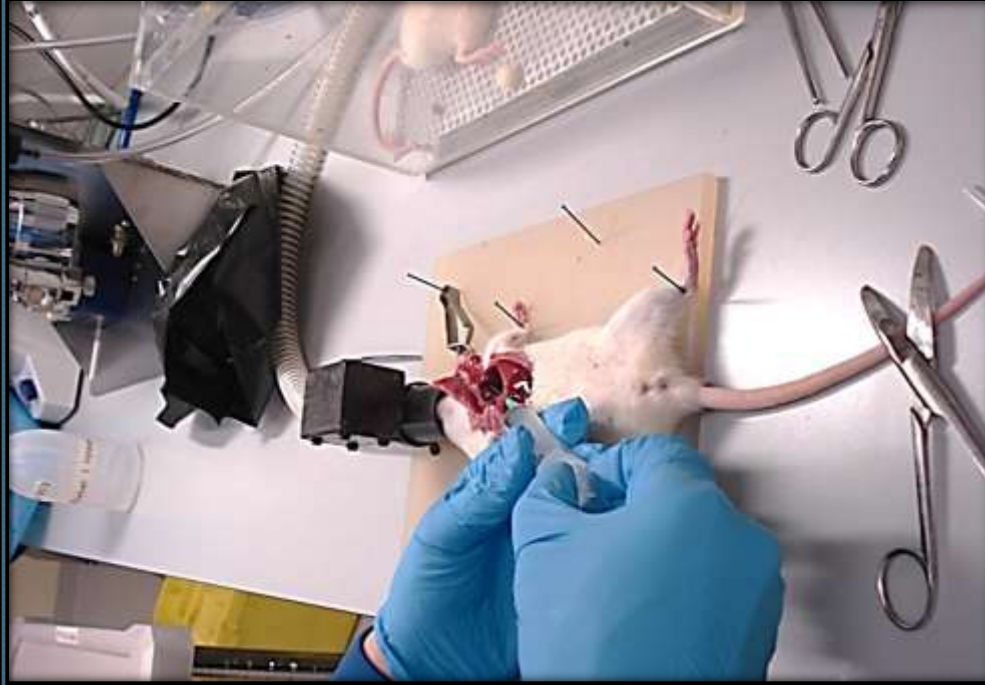
Leiden/Hollanda Deney Hayvanları Merkezi



Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



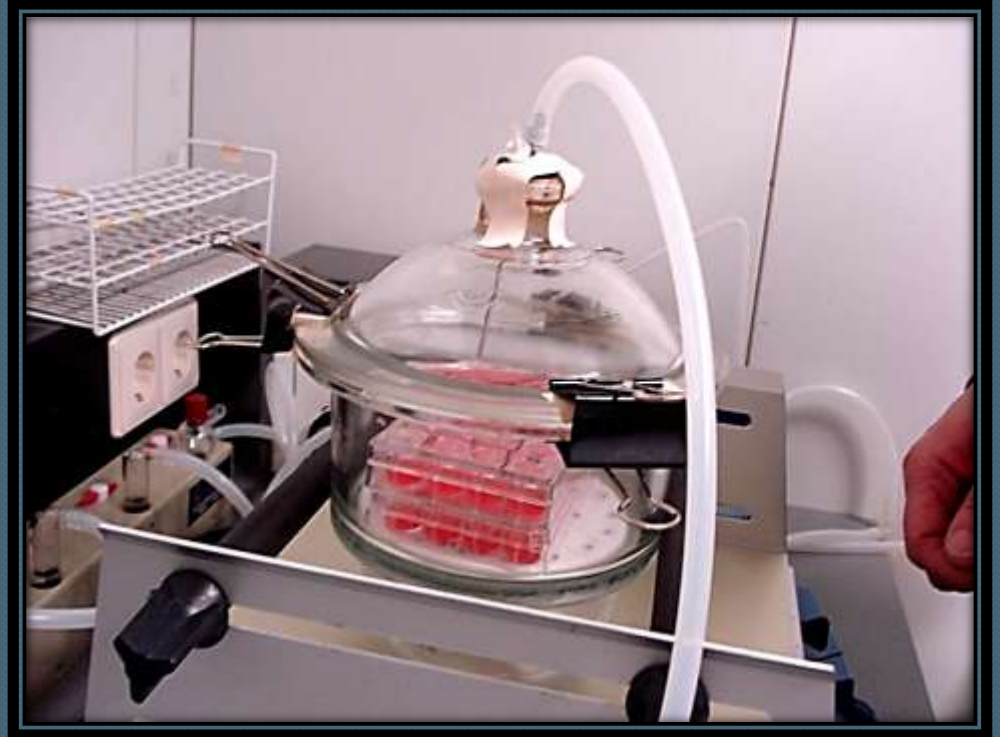
Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



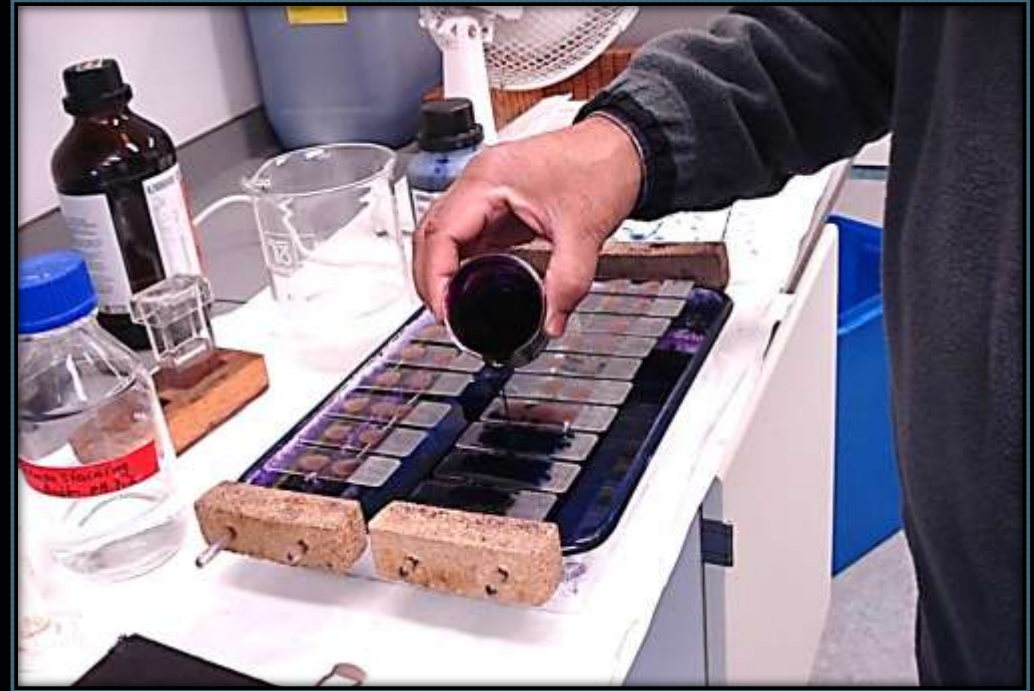
Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması

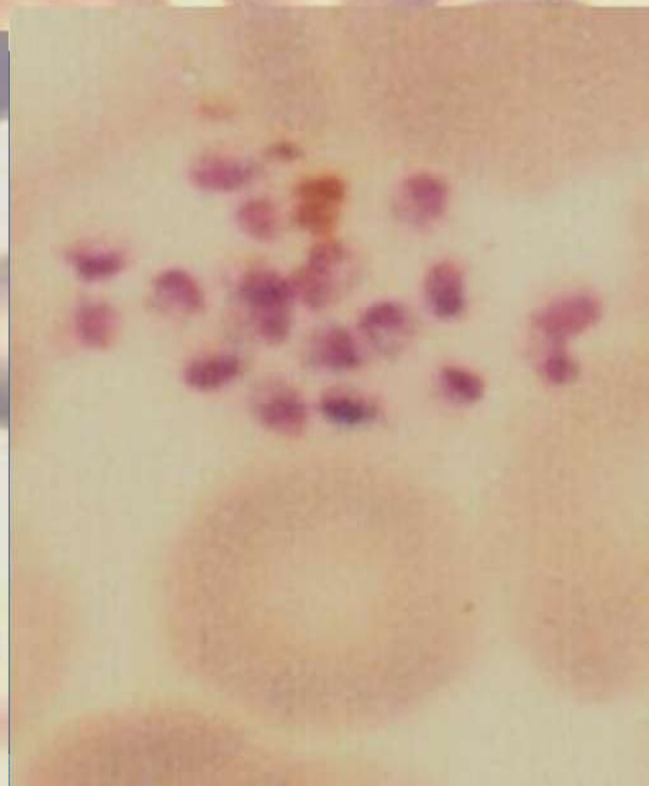
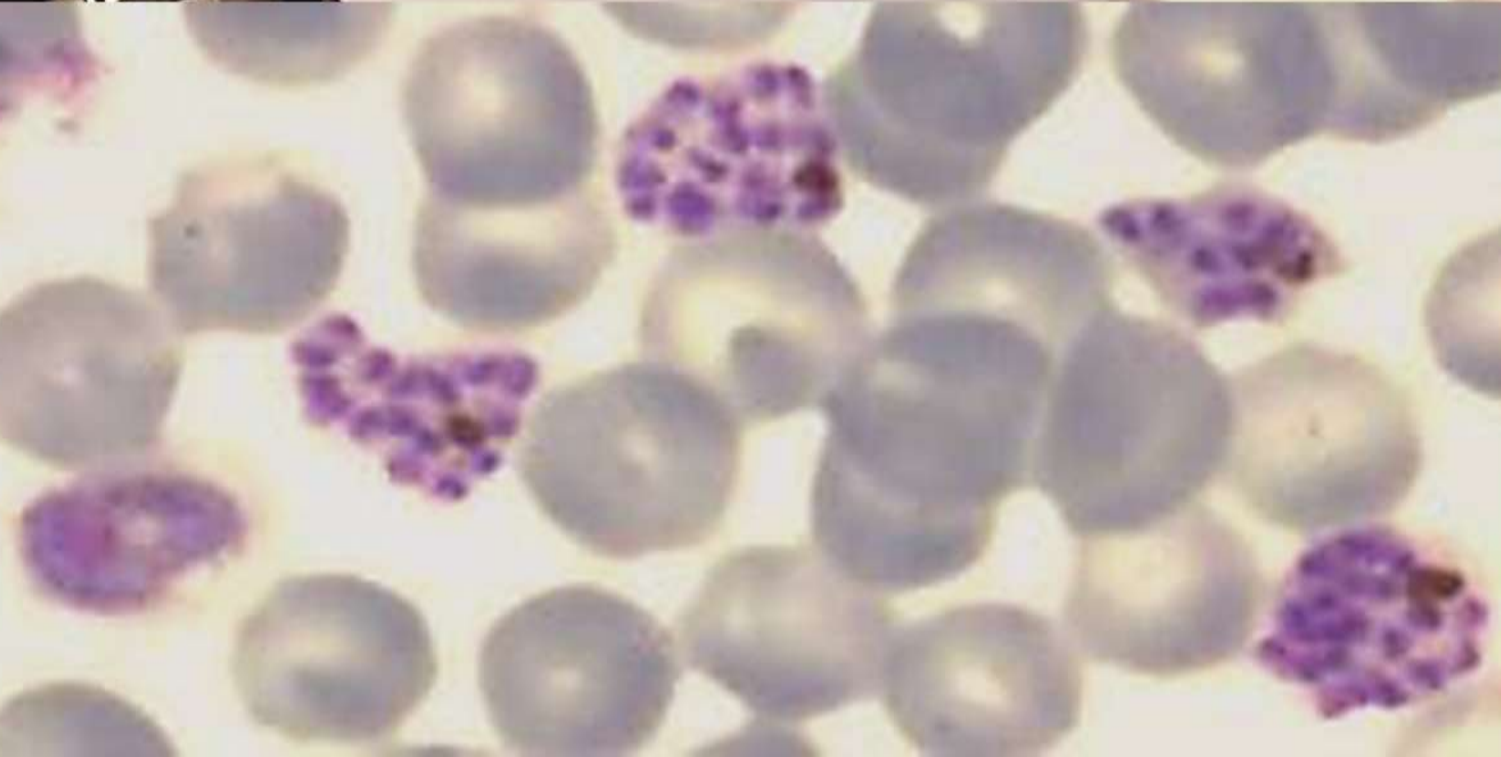
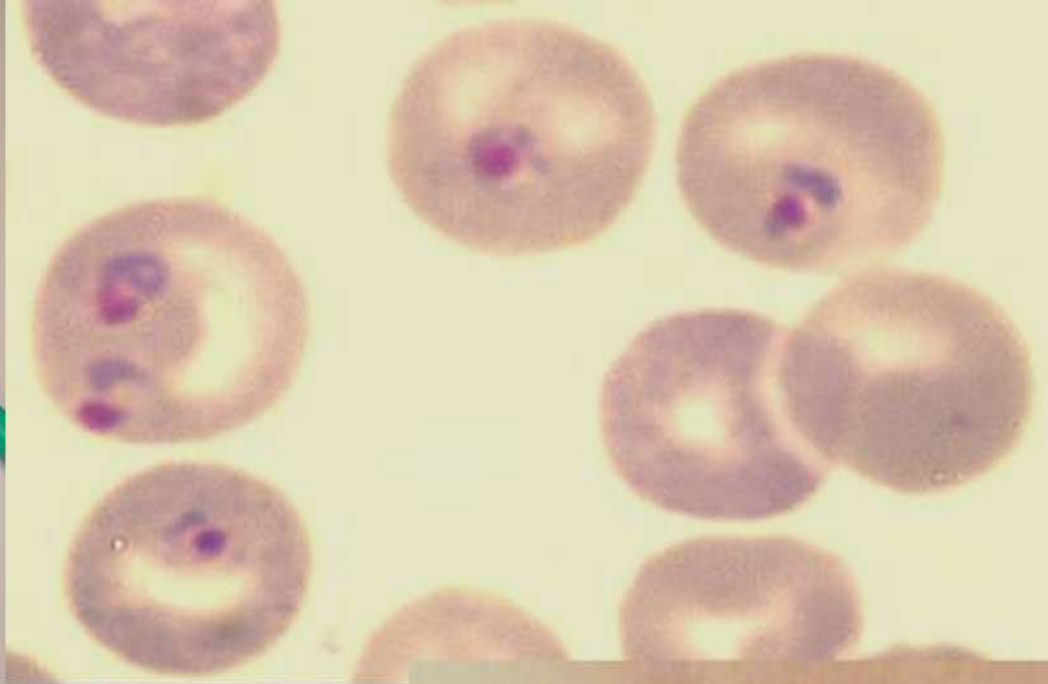


Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması





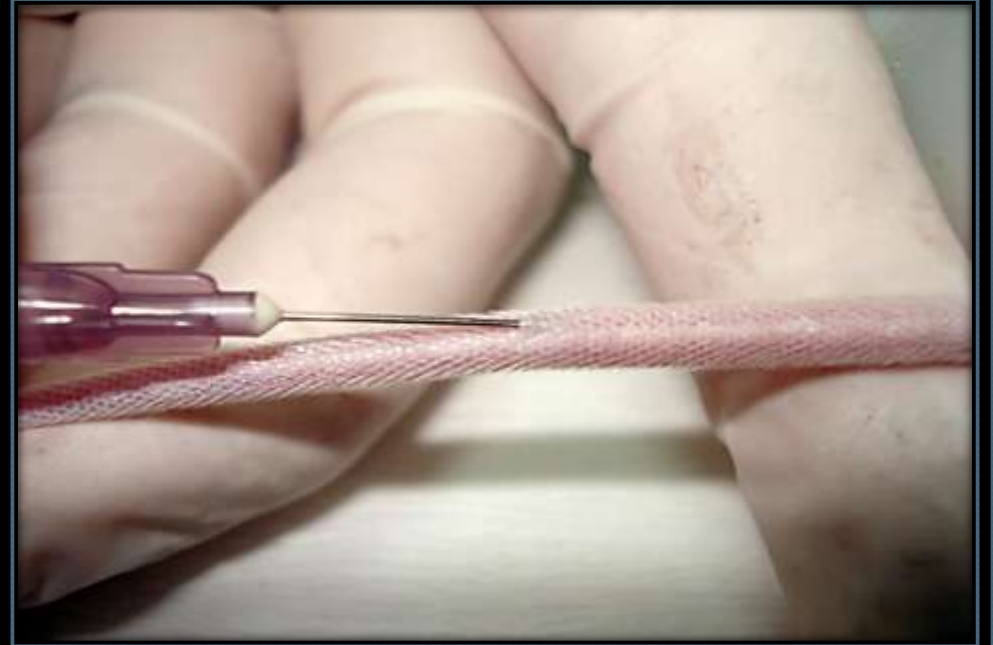
Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



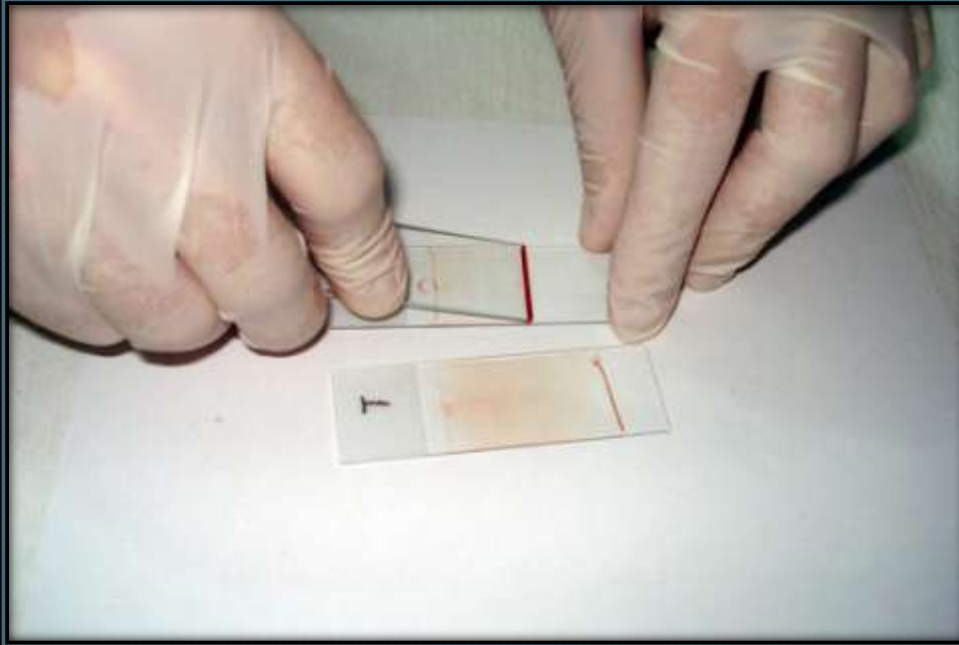
Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



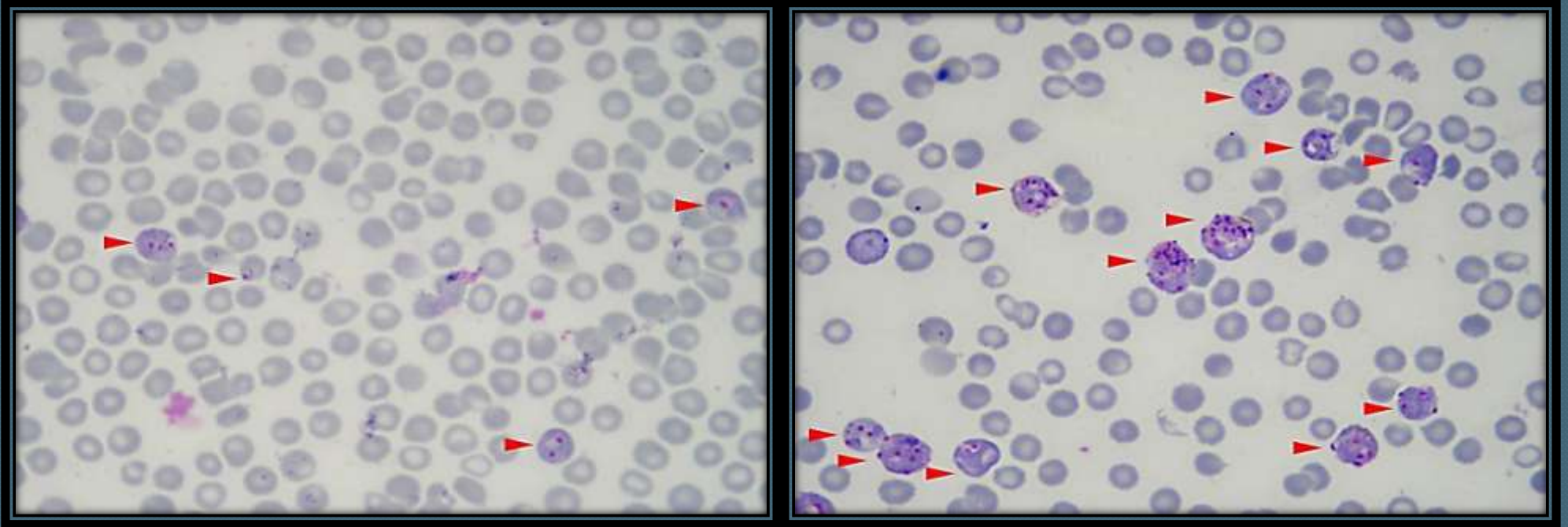
Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



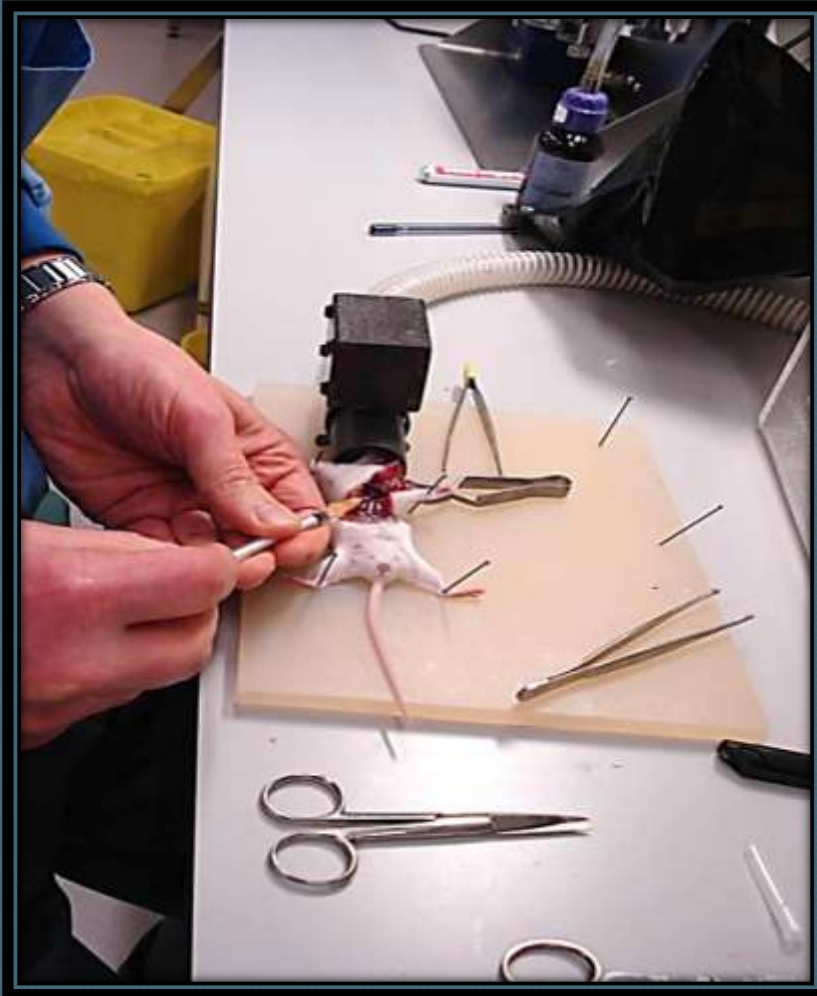
Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



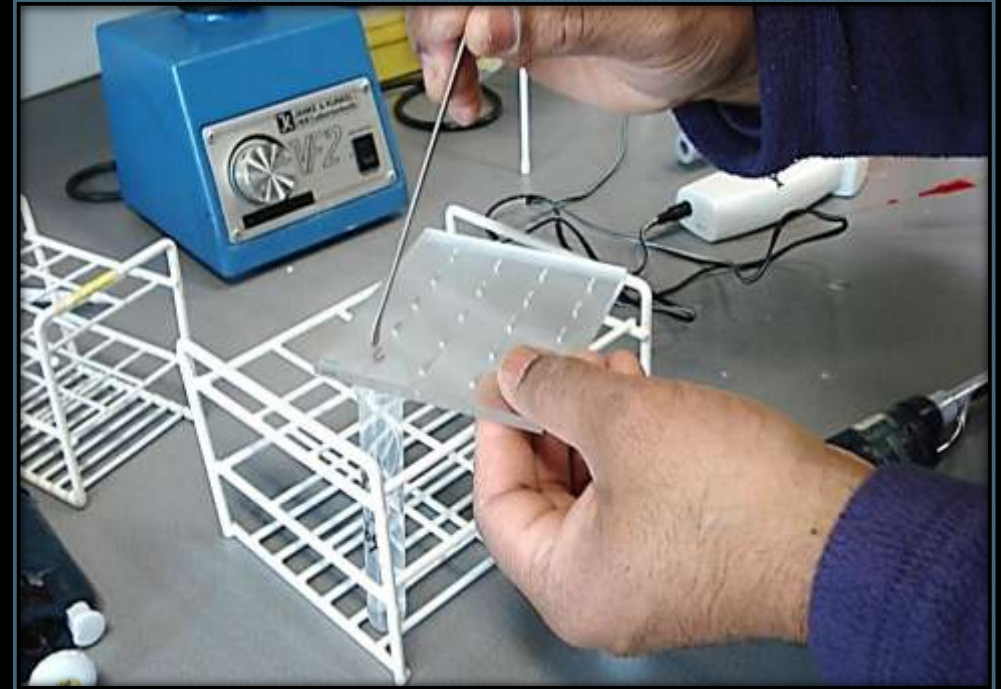
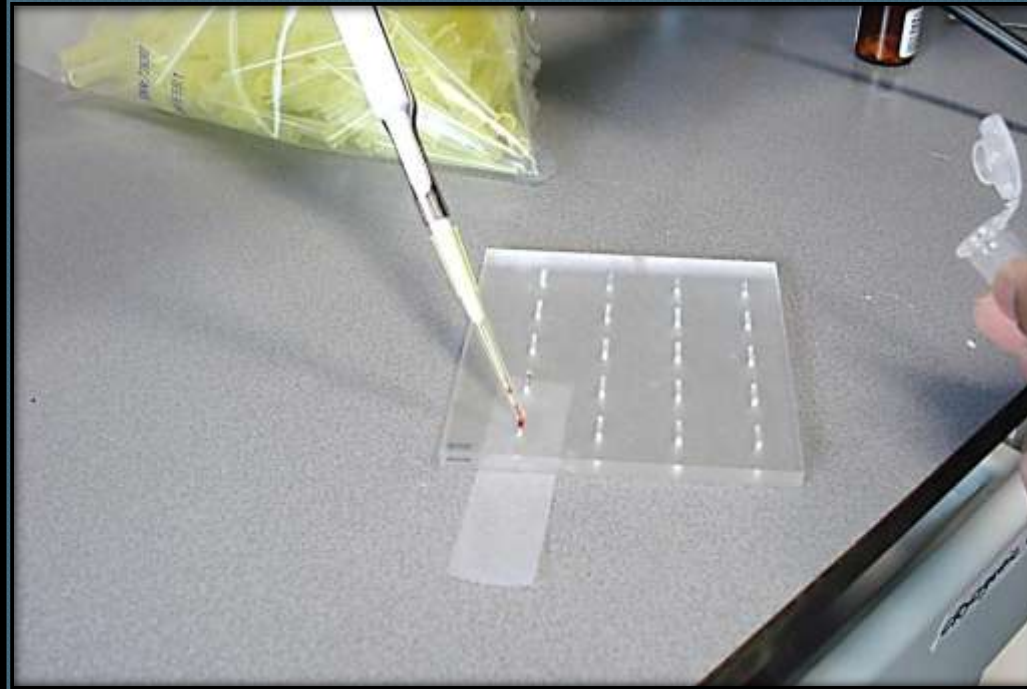
Sıtmada yeni etken madde ve moleküllerin aranması



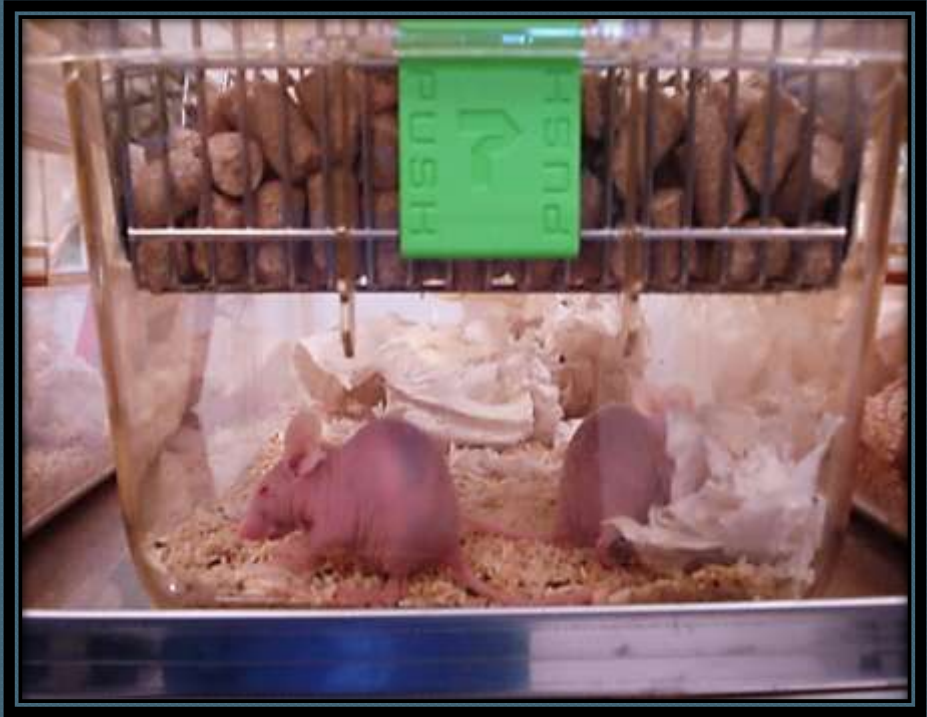
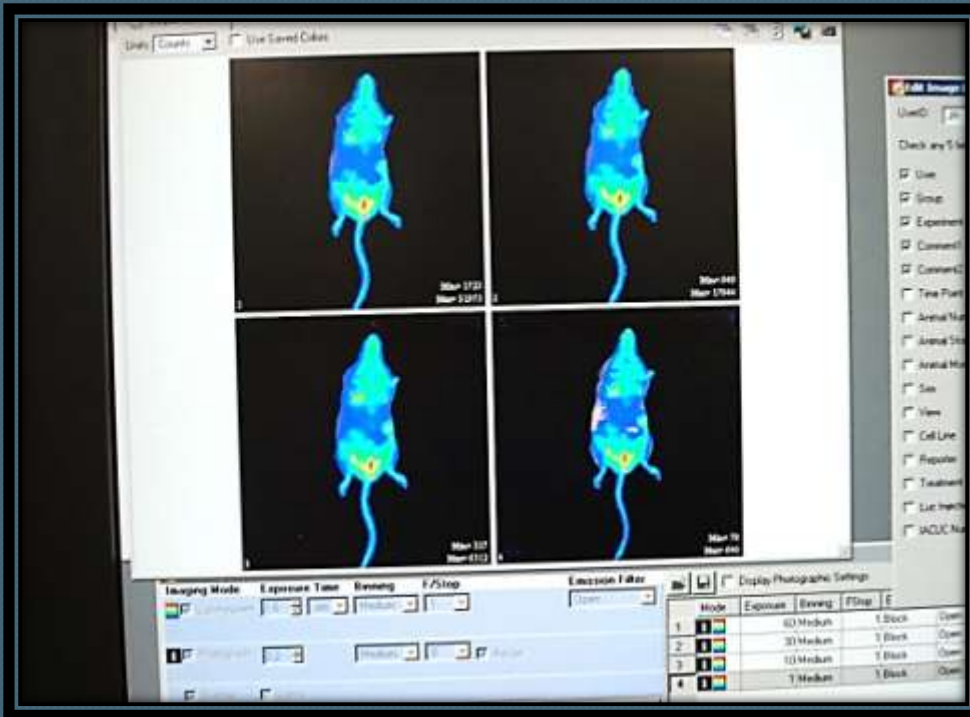
Plasmodiumlardan tek koloni elde etme ve DNA ekstraksiyonu



Plasmodiumlardan tek koloni elde etme ve DNA ekstraksiyonu



Leiden/Hollanda Deney Hayvanları Merkezi



LUMC Leiden/Hollanda



LABORATORIA VOOR
TROPISCHE HYGIENE EN
PARASITOLOGIE

Leishmaniasis (Parazit İzolasyonu)



Leishmaniasis (Parazit İzolasyonu)



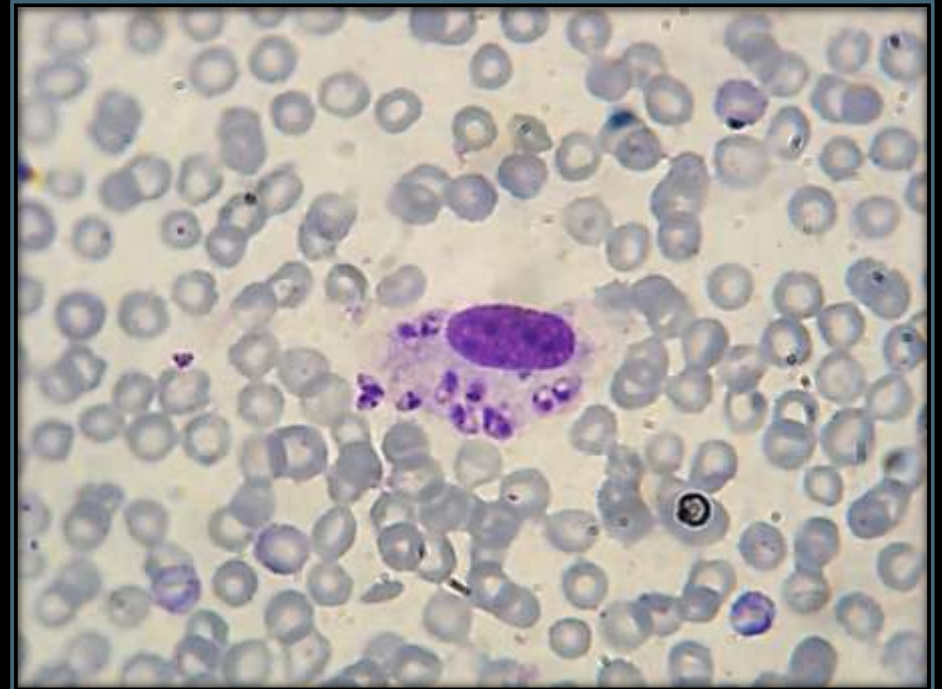
Leishmaniasis (Parazit İzolasyonu)



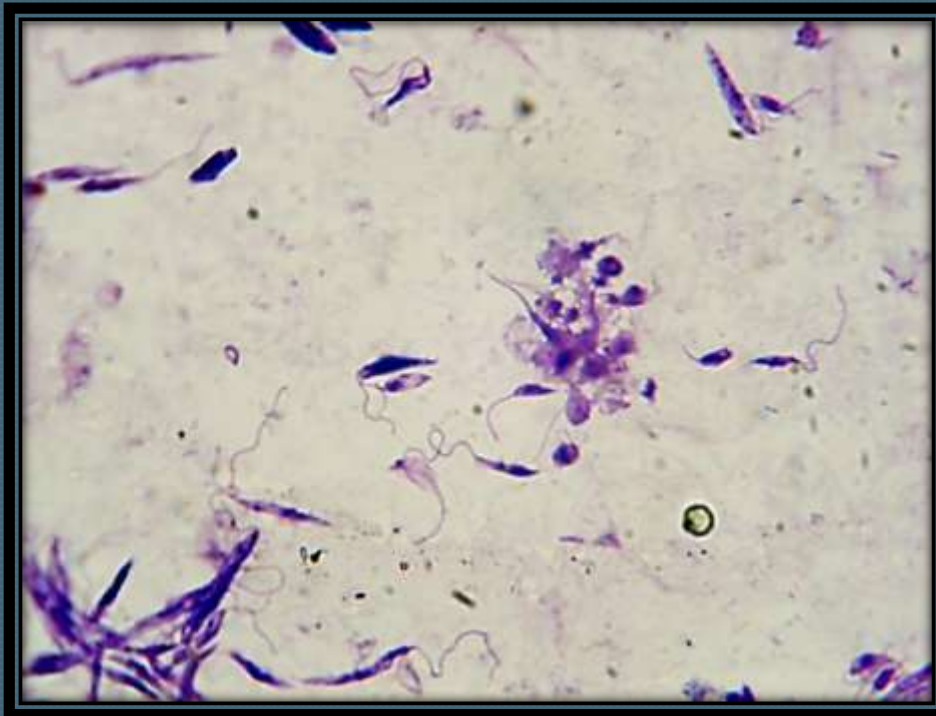
Leishmaniasis (Parazit İzolasyonu)



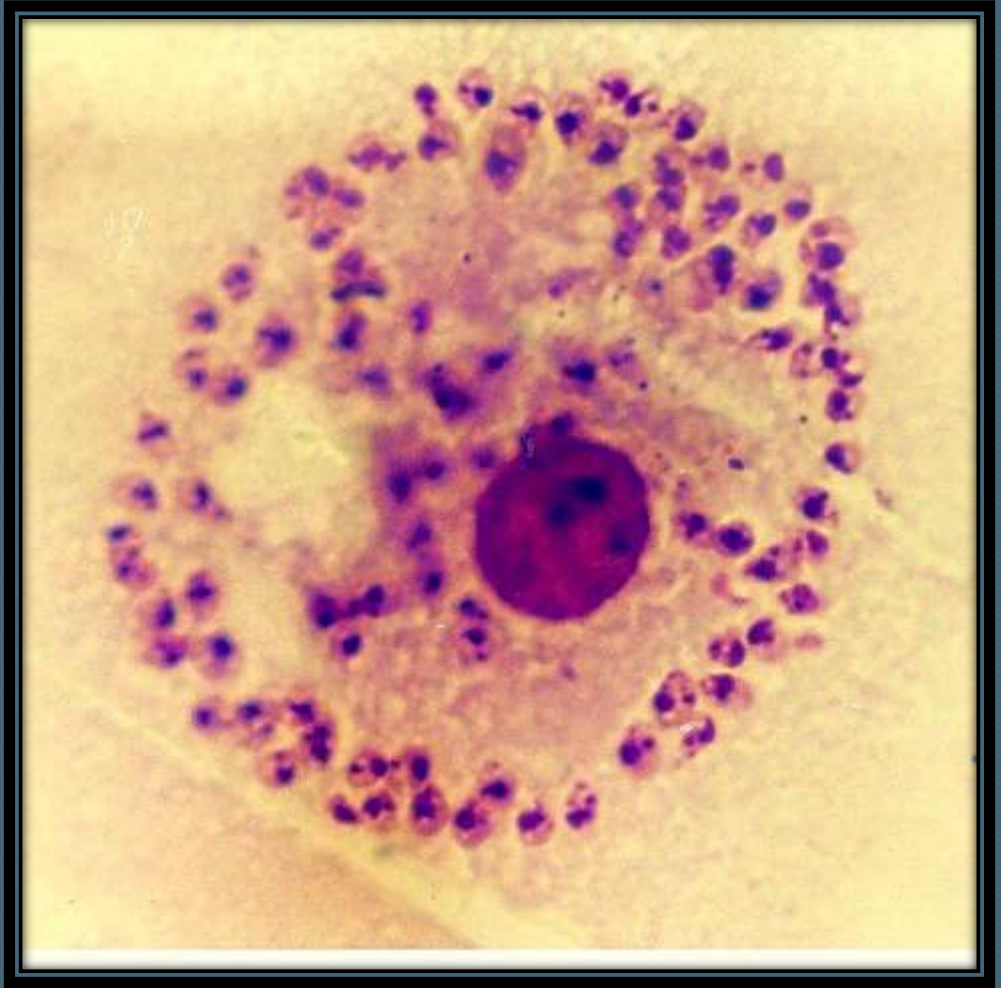
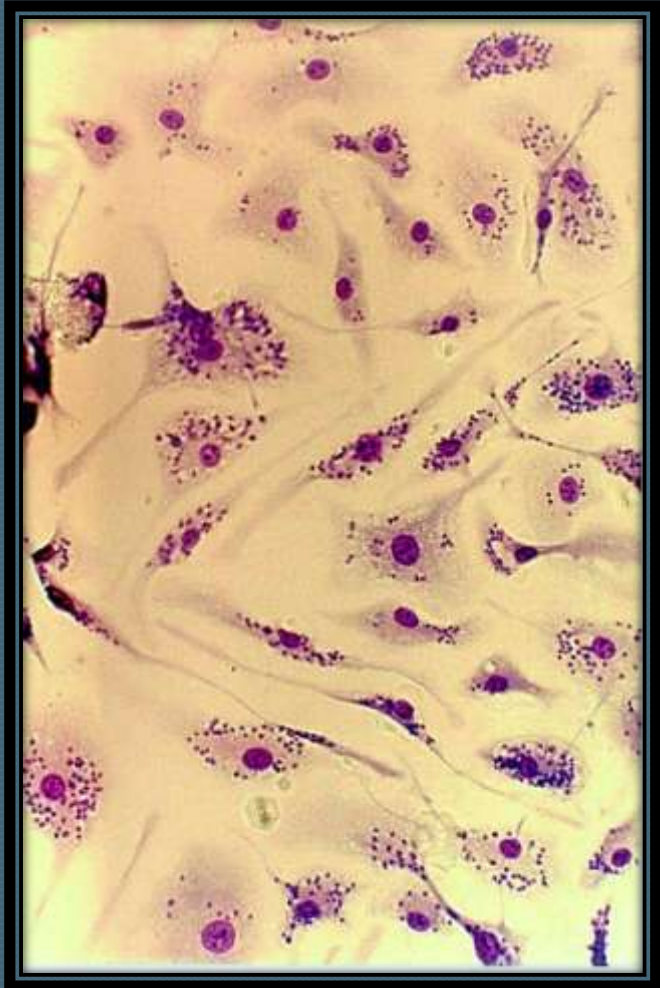
Leishmaniasis (Parazit İzolasyonu)



In Vitro etken madde taramaları



Ex Vivo yeni etken madde ve moleküllerin aranması



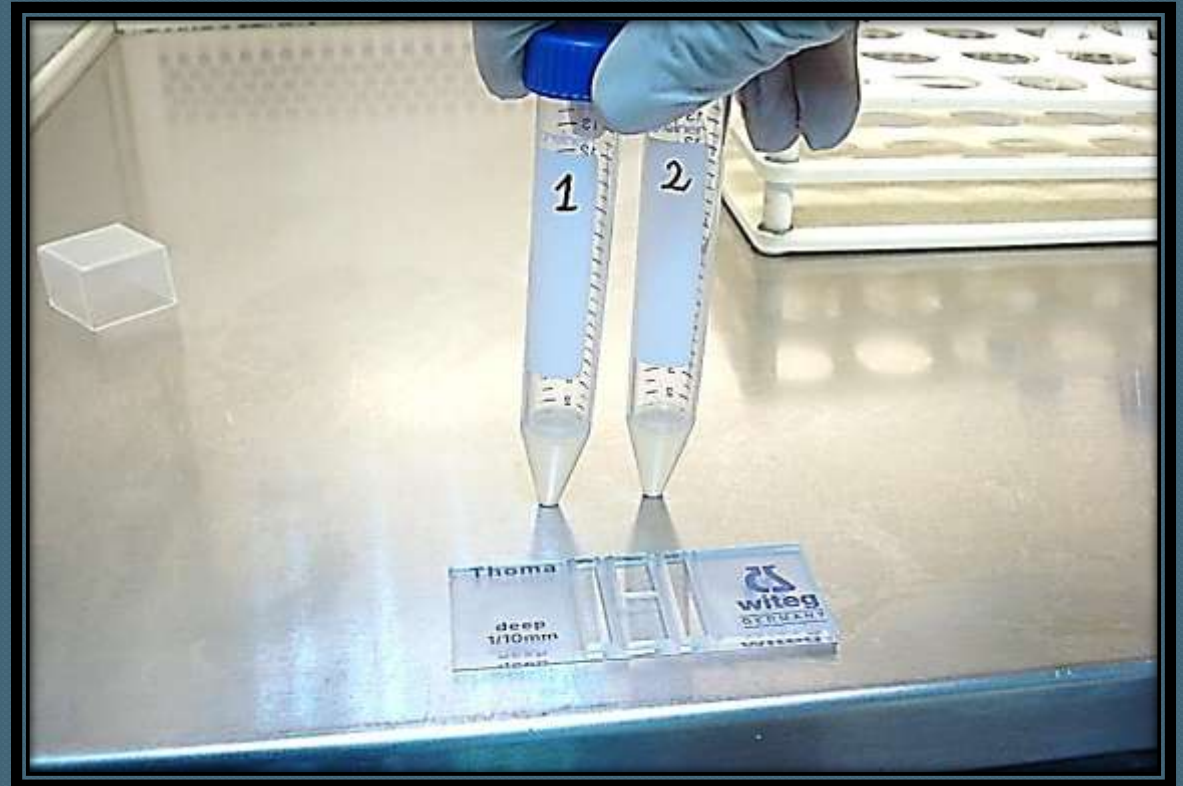
Deney Hayvanlarında Leishmaniasis Modelleri

- Leishmaniasis modeli oluşturmak için kullanılacak promastigotlar, 10 ml kültür sıvısının 1500 devirde 10 dakika santrifüjlenip, dipte kalan çökeltinin steril serum fizyolojik ile 3 kez yıkanması ile elde edilmektedir.
- Mikroskopta sayılarak promastigot süspansiyonunun son konsantrasyonu 1×10^8 promastigot/ml olacak şekilde ayarlanmalıdır.

Deney Hayvanlarında Kutanöz Leishmaniasis Modelleri

- Farelerin sol ayak tabanlarına, derialtına 15 μ l *Leishmania tropica* promastigot solüsyonu enjekte edilmelidir.
- İnokülasyonun 2. haftasında ayak tabanında kızarıklık ve şişme olan sağlam doku sınırından tüberkülin enjeksiyonu ile serum fizyolojik verilip aspire edilerek alınan örneklerden NNN besiyerlerine ekim yapılarak promastigotlar elde edilirken, yayma preparat hazırlanıp Giemsa ile boyanıp incelenerek *Leishmania amastigotları* saptanır.

Farelerde KL modelleri



Farelerde KL modelleri



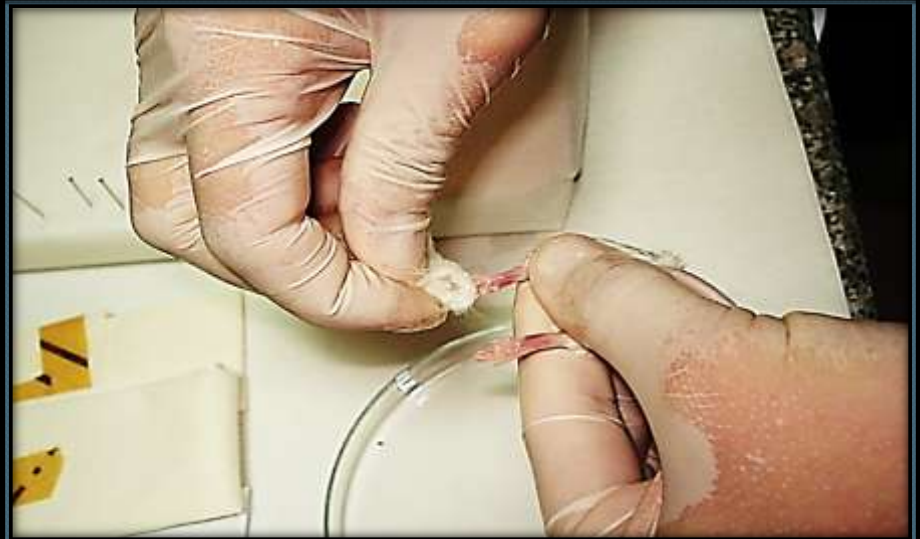
Farelerde KL modelleri



Farelerde KL modelleri



Farelerde KL modelleri



Deney Hayvanlarında Visseral Leishmaniasis Modelleri

- *Leishmania infantum* izolatlarının promastigot solüsyonu 15 μ l intravenöz olarak farenin kuyruk veninden verilir.
- Farelere promastigotların verilmesinden 30 gün sonra otopsi yapılarak karaciğer ile dalakları çıkarılıp örnekler NNN besiyerlerine ekim yapılır
- Promastigotlar elde edilebilir.
- Yayma preparat hazırlanıp Giemsa ile boyanıp incelenerek *Leishmania amastigot*larının varlığı araştırılır.

Farelerde VL modelleri



Farelerde VL modelleri



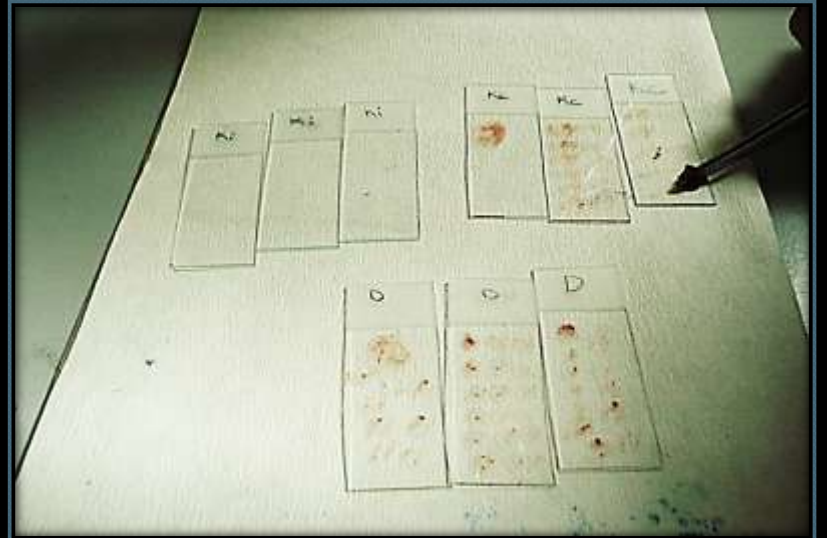
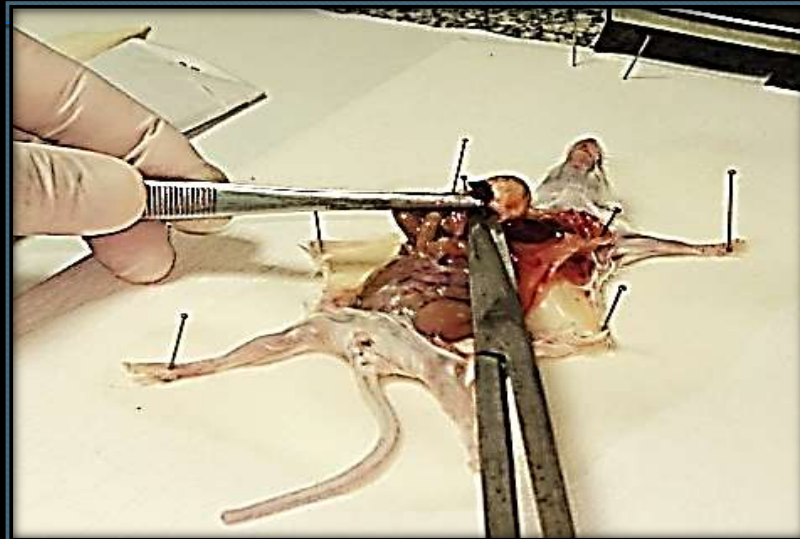
Farelerde VL modelleri



Farelerde VL modelleri



Farelerde VL modelleri



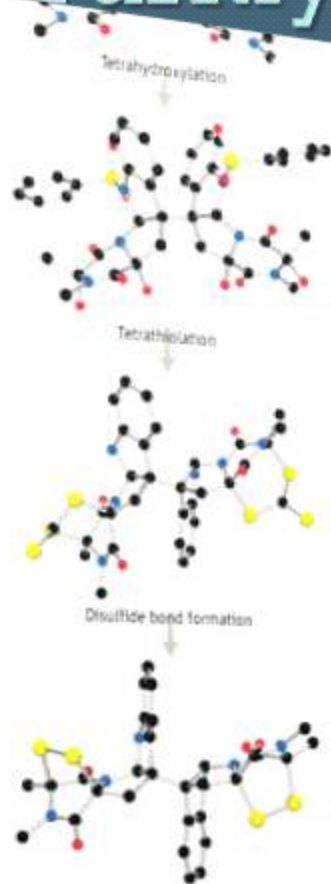
Etken madde taraması



Türkiye' de hibrid *L. tropica* türleri ?

izolatlar	Hayvan infeksiyonları Sonuçları	Notlar
6 CL (Urfa)	Fare Ayak Tabanında CL Lezyonlar	
3 CL (Aydın)	Fare Ayak Tabanında CL Lezyonlar	
2 CL (Antakya)*	Fare Ayak Tabanında CL Lezyonlar ve iç Organlarda VL	* Elektroforezi ile <i>L. tropica</i>
1 CL (Muş)	Fare Ayak Tabanında CL Lezyonlar ve iç Organlarda VL	
1 CL (Manisa)	Fare Ayak Tabanında CL Lezyonlar ve iç Organlarda VL	
2 VL (Manisa)	Farelerde iç Organlarda VL	

Türkiye' de Hibrid *L. tropica* türleri?



Rising to the challenge. Kim *et al.* report a striking total synthesis of the highly complex natural product (±)-11,11'-dideoxyverticillin A.

lined detailed thinking about the biosynthetic pathway and the biosynthetic genes. In this way, complex molecule synthesis and com-

GENETICS

Leishmania Exploit Sex

Michael A. Miles, Matthew Yeo, Isabel L. Mauricio

Leishmania are the last of the three major groups of trypanosomatid parasites to give up their secret—a healthy capacity for genetic exchange.

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) cause widespread and devastating human diseases. Visceral leishmaniasis is responsible for overwhelming fatal epidemics, and cutaneous leishmaniasis can lead to destructive and life-threatening mucocutaneous lesions (1). Since the discovery of these disease agents more than a century ago, there has been debate as to whether they reproduce entirely clonally or undergo genetic exchange, although naturally occurring putative hybrids have been described (2). That debate is now over. On page 265 of this issue, Akopyants *et al.* (3) provide evidence for genetic exchange in *Leishmania*. This represents the latest in a series of discoveries of sexual cycles operat-

ing in eukaryotic pathogens. *Leishmania* in their mammalian hosts as tiny, ovoid oocysts and a kinetoplast, a network of circular mitochondrial DNA, feature of *Trypanosoma* (a related parasite). In *Leishmania*, morphologically diverse forms (pinpoint male and female) have been described. Despite the apparent complexity of *Leishmania* parasites, they have been a model for the study of infection. S

Pathogen Molecular Biology Unit, Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC2E 7HT, UK. E-mail: michael.miles@lshtm.ac.uk

www.sciencemag.org **SCIENCE** VOL 324 10 APRIL 2009

Published by AAAS

www.sciencemag.org

www.sciencemag.org **SCIENCE** VOL 324 10 APRIL 2009



NIH Public Access

Author Manuscript

Science. Author manuscript; available in PMC 2009 August 19.

Published in final edited form as:

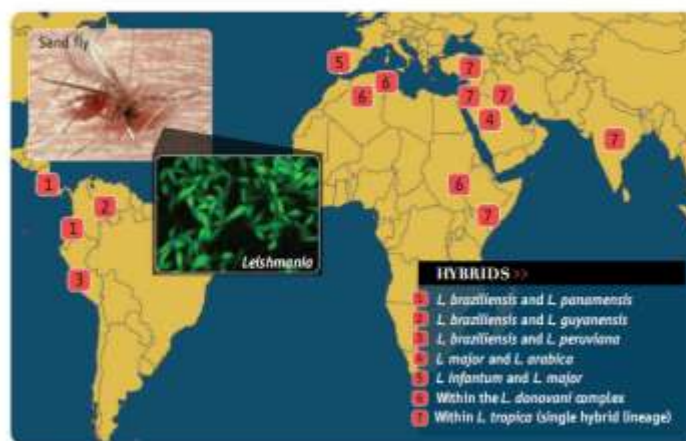
Science. 2009 April 10; 324(5924): 265–268. doi:10.1126/science.1169464.

Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector

Natalia S. Akopyants^{1,*}, Nicola Kimblin^{2,*}, Nagila Secundino², Rachel Patrick², Nathan Peters², Phillip Lawyer², Deborah E. Dobson¹, Stephen M. Beverley^{1,*}, and David L. Sacks^{2,*}

¹Dept. of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis MO 63110 USA

²Laboratory of Parasitic Diseases, NIAID, NIH, Bethesda MD, 20892



Mapping hybrids. The geographical distribution of interspecific and intraspecific *Leishmania* hybrids is shown. (Inset) A green fluorescent transgenic strain of *L. donovani* and a sand fly vector of *Leishmania*.

scient of parasexual processes in fungi (4).

The fact that *Leishmania* can undergo genetic exchange is of epidemiological importance. Nolder *et al.* (9) found evidence of the emergence and spread of multiple *L. braziliensis*-*L. peruviana* hybrids in Peru. Volf *et al.* (10) demonstrated that *L. infantum*-*L. major* hybrids could be transmitted efficiently by the otherwise *L. major*-specific vector, implying heterosis (hybrid vigor). Further, a widespread lineage of *L. tropica* appears to be disseminated from a recent hybridization event (11). By analogy, hybrid lineages of *T. cruzi* (Tc1d and Tc1e) predominate in domestic transmission cycles in the vast Gran Chaco region of South America, where severe human Chagas disease occurs (12). Genetic exchange has led to the emergence and spread of virulent *Toxoplasma gondii* (13), and meiotic recombination has recently been discovered in *Glandia*, in line with its extensive

Leishmaniasis Modelleri İzolatları

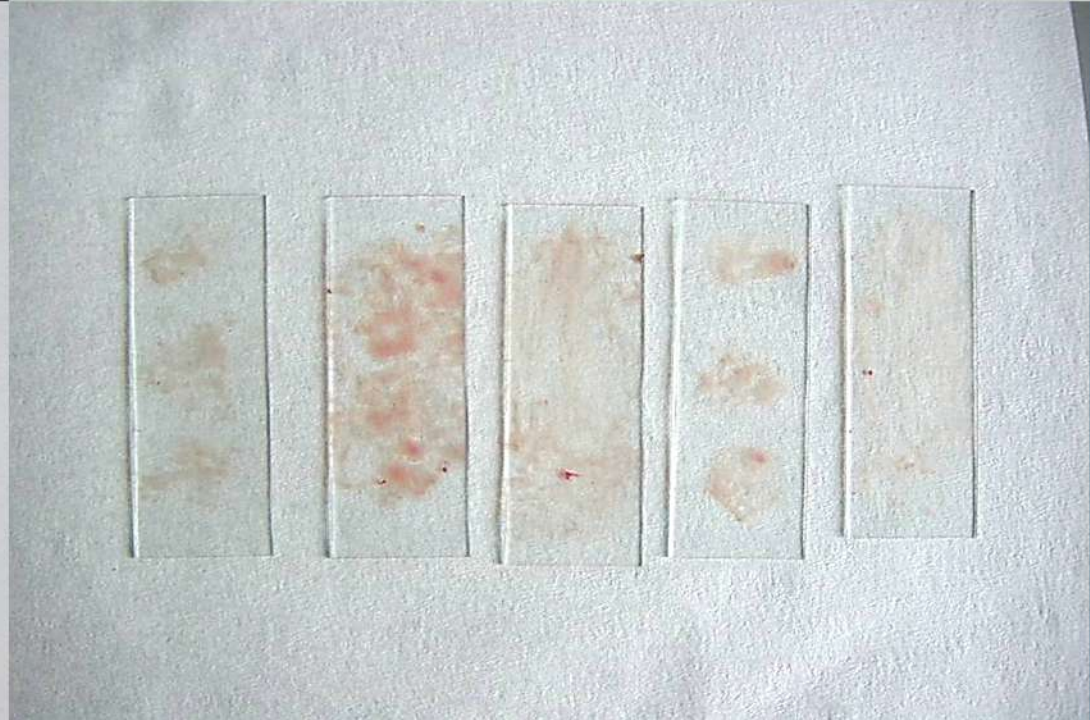
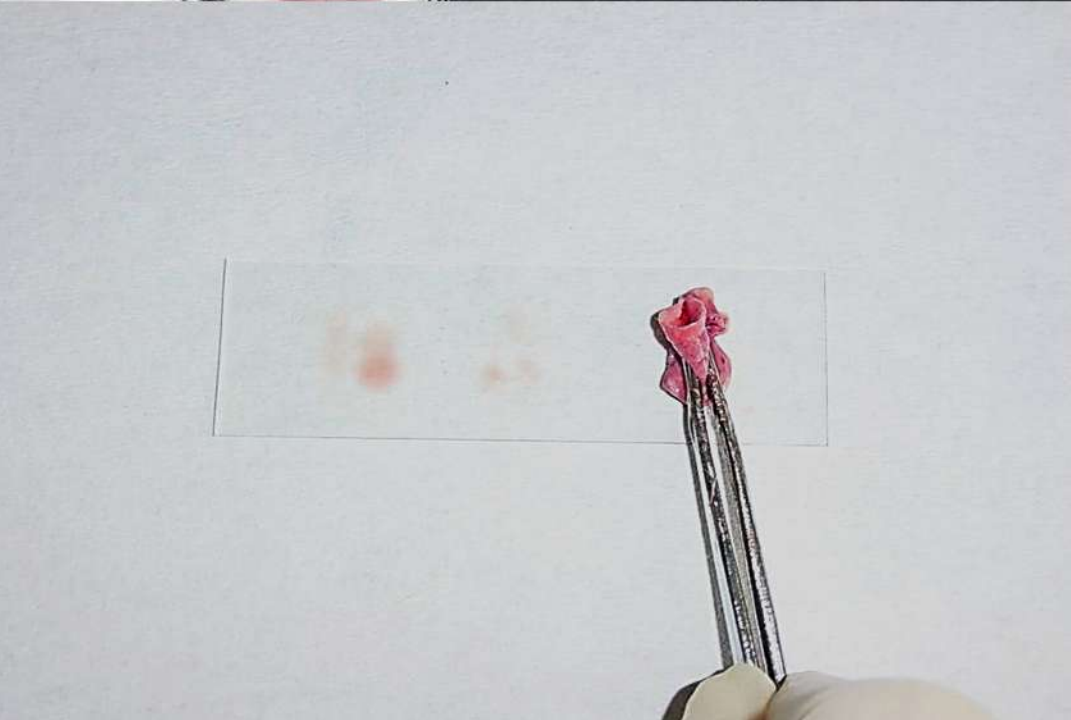
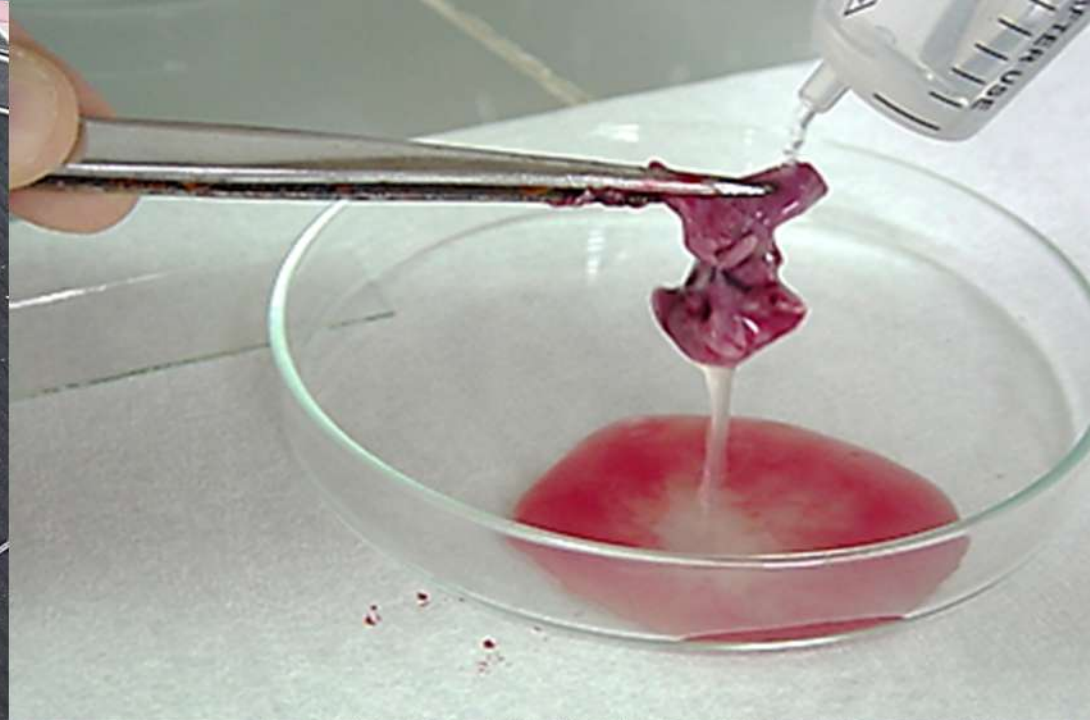
- **MHOM/TR/2007/CBU02**
- **MHOM/TR/2010/CBU10**
- **MHOM/TR/2010/CBU07**
- **MHOM/TR/2009/EP 172**
- **MHOM/TR/2009/MK01**
- **MHOM/TR/2010/MK02**
- **MCAN/TR/2010/CBU09**

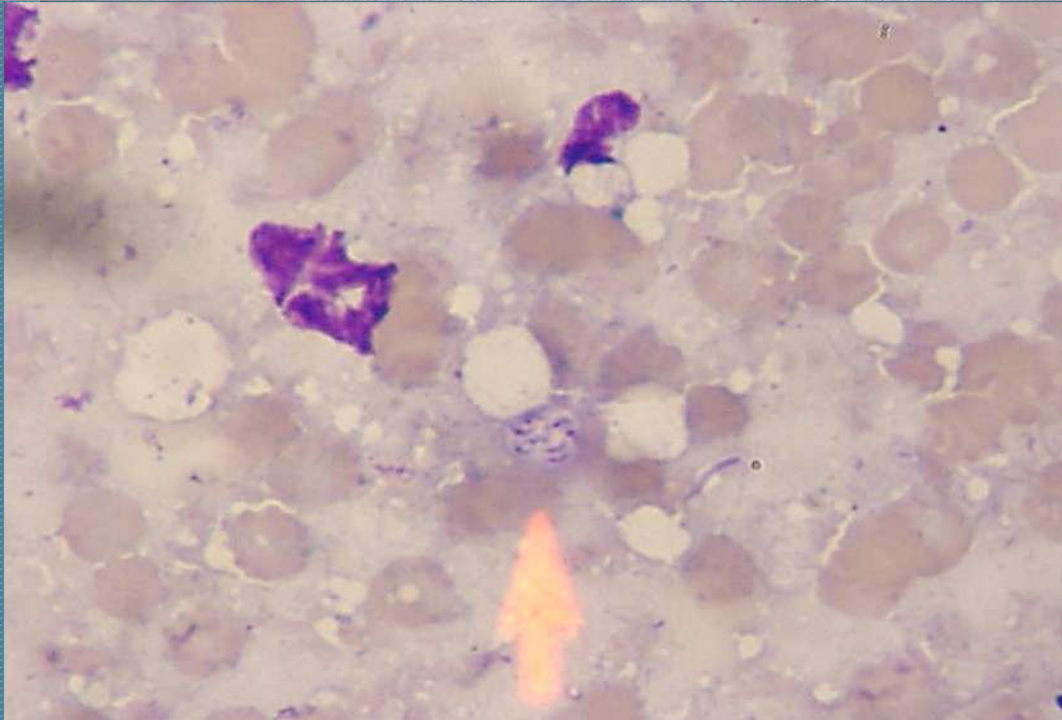
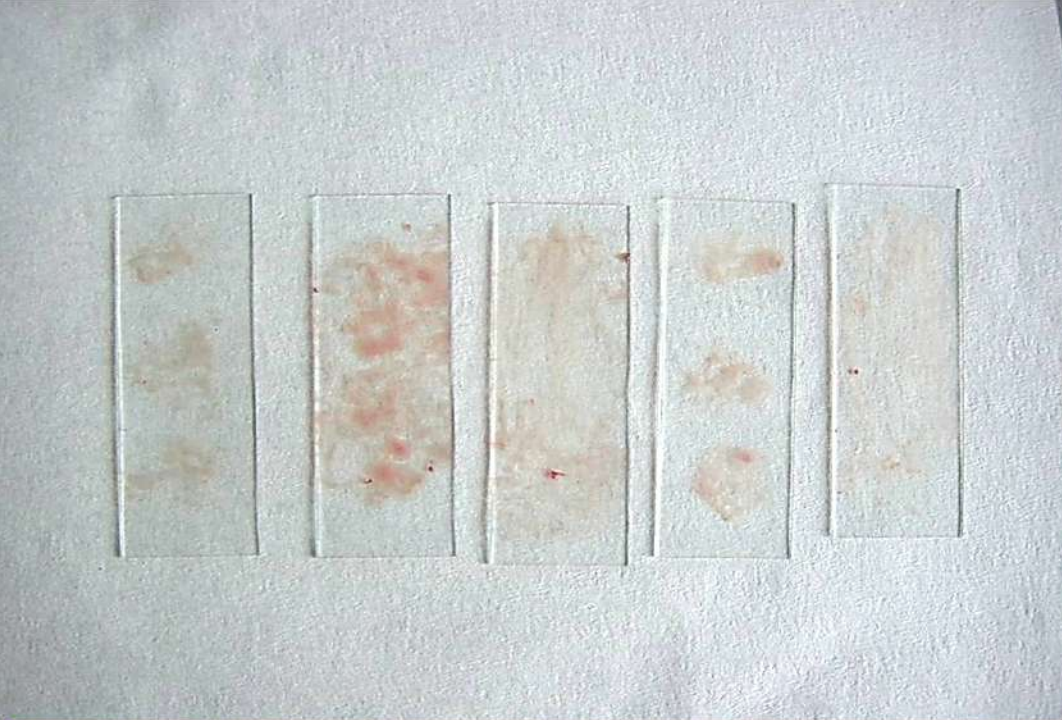


Pneumocystosis

- SC haftada 2 x 2 mg deksametazon
- İçme sularına artan miktarlarda Tetrasiklin
- 3 - 12. hafta – infeksiyon



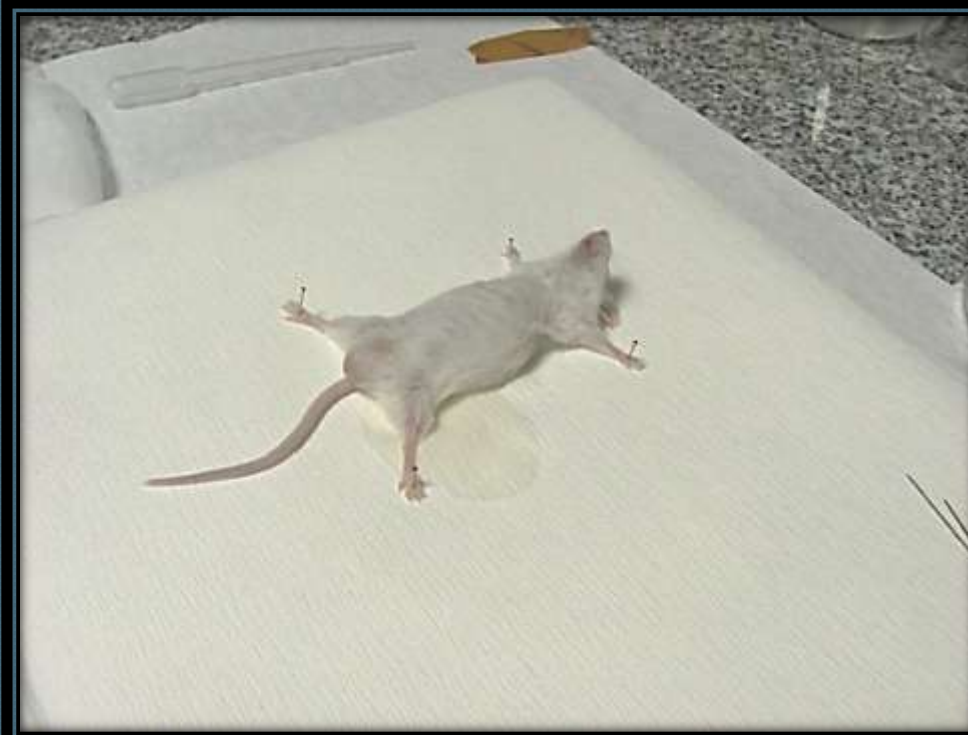




Toxoplasmosis

- Genellikle fareler kullanılır.
- İnfeksiyon için her 40 büyütme objektif sahasında 4-5 adet takizoit görülen süspansiyondan 22 G bir iğne ile 0.2-1.0 ml arasında peritona verilir.
- Her 3-4 günde bir periton sıvısı alınıp takizoitler kontrol edilip farelere yeni pasajlar yapılmalıdır.

Farelerde Toxoplasmosis Modelleri



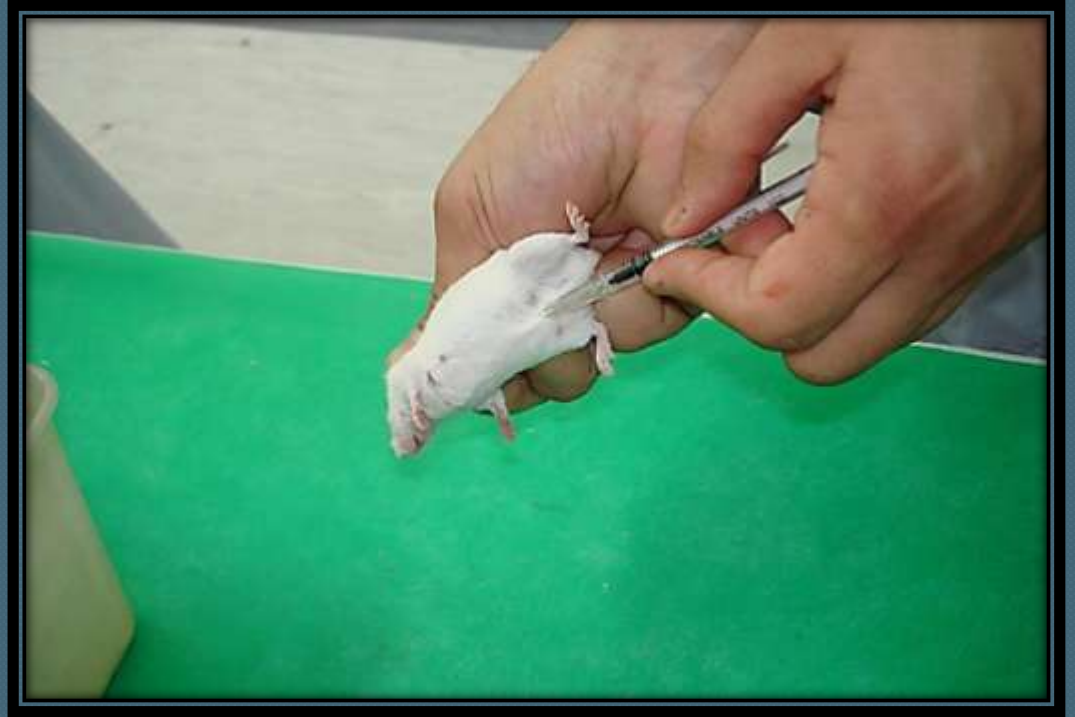
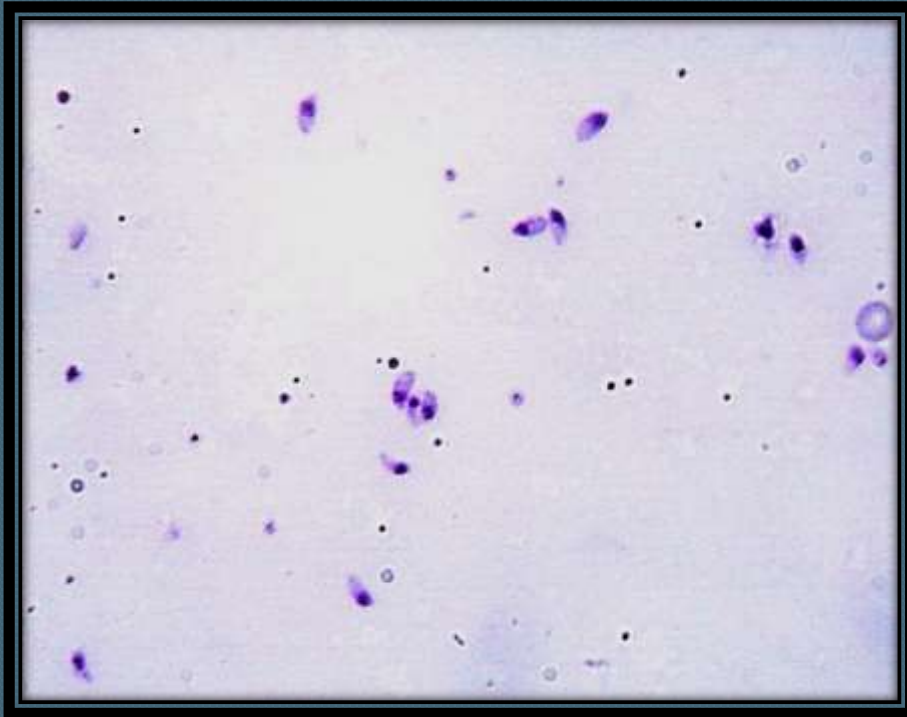
Farelerde Toxoplasmosis Modelleri



Farelerde Toxoplasmosis Modelleri

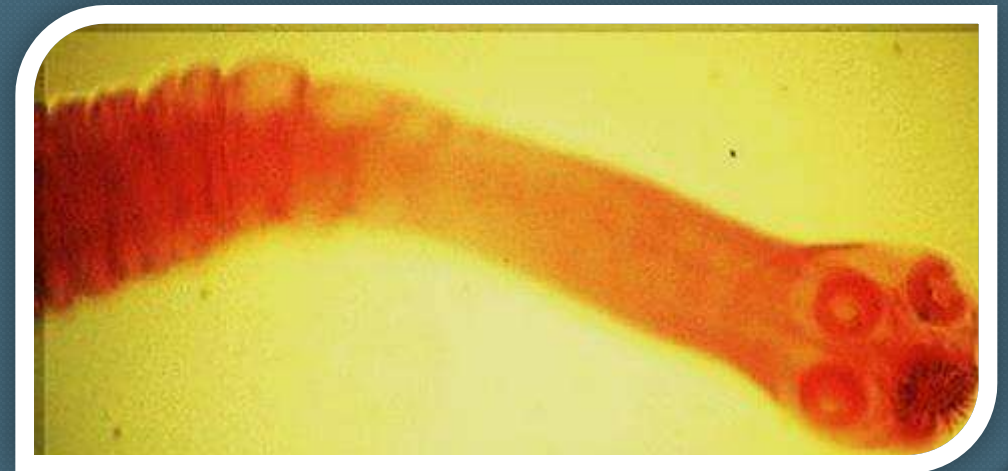


Farelerde Toxoplasmosis Modelleri



Hymenolepiasis

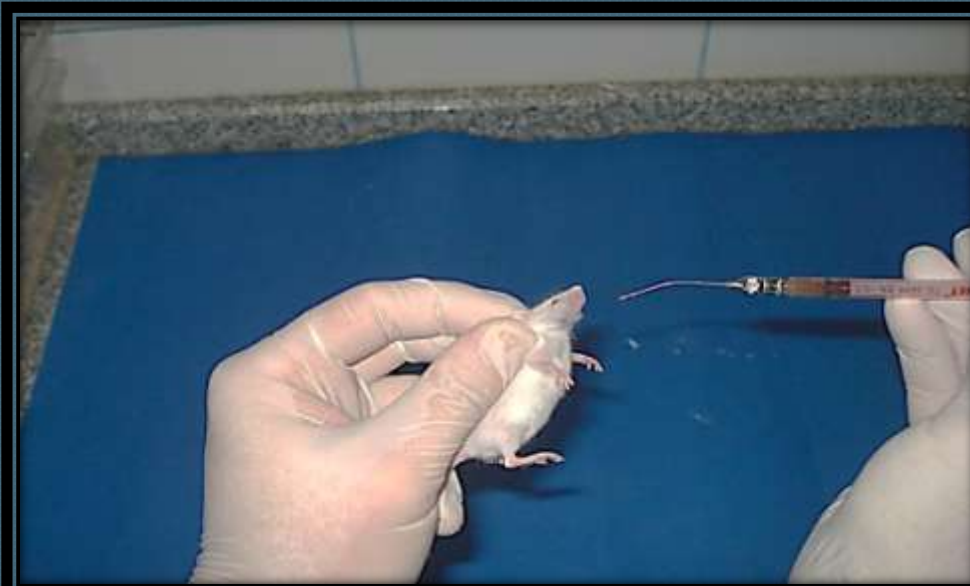
- Farelere 500-9000 arasında yumurta oral yolla verilerek enfeksiyon oluşturulabilir.
- 30-45 gün sonra yumurtalar ve barsakta erişkinlere rastlanır.



Hymenolepiasis



Hymenolepiasis



Hymenolepiasis



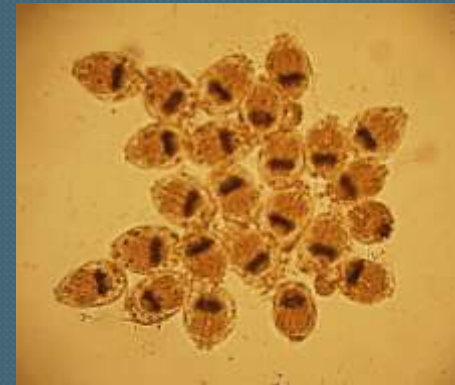
Trichinellosis

- Ratlar kullanılarak enfeksiyon modelleri oluşturulabilir
- Enfekte Rat'ın dil kası ve diyaframı mikroskopta kontrol edilip *Trichinella spiralis* saptanır
- Sağlam Rat'a yedirilerek enfeksiyon modelleri oluşturulabilir.
- Pasajlar 20-30 günde bir tekrarlanır



Echinococcosis

- Rat ve Farede infeksiyon gelişebilir
- Köpek dışkılarından elde edilen yumurtaların oral olarak yutturulması ile infeksiyon oluşturulabilir
- Peritona 2000-5000 protoskoleks enjekte edilmelidir



Kriyoprezervasyon



Sonuç olarak

- Etik ve bilimsel kurallara uygun olarak planlanan ve uygulanan hayvan modellerinin, başta tanı ve tedavi olmak üzere, parazitoloji ve mikrobiyolojinin bir çok alanına büyük katkıları olmaktadır



Teşekkür ederim...

