

# Sıtma Modelinde Cinnamaldehyde, Cannabidiol ve Eravacycline'in Etkinliğinin Araştırılması

## Investigation of the Efficacy of Cinnamaldehyde, Cannabidiol and Eravacycline in a Malaria Model

Yener ÖZEL<sup>1</sup>(ID), İbrahim ÇAVUŞ<sup>2</sup>(ID), Mehmet ÜNLÜ<sup>1</sup>(ID), Ahmet ÖZBİLGİN<sup>3</sup>(ID)

<sup>1</sup> Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.

<sup>1</sup> Balıkesir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Balıkesir, Türkiye.

<sup>2</sup> Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Manisa.

<sup>2</sup> Manisa Celal Bayar University Institute of Health Sciences, Manisa, Türkiye.

<sup>3</sup> Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

<sup>3</sup> Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Türkiye.

\*\*Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP 2021-036 numaralı proje ile desteklenmiştir.

\*\*Bu çalışma, XL. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi (16-20 Kasım 2022, Belek/Antalya)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

**Makale Atfı:** Özel Y, Çavuş İ, Ünlü M, Özbilgin A. Sıtma modelinde cinnamaldehyde, cannabidiol ve eravacycline'in etkinliğinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2023;57(4):608-624.

### ÖZ

Bu çalışmada, güçlü antimikrobiyal etkinliği gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri gösterilmiş olan 'cinnamaldehyde' (CIN) ve 'cannabidiol' (CBD) ile yeni nesil tetrasiklin türeviden olan 'eravacycline' (ERA)'nin antimalaryal etkinliğinin in vivo sıtma modelinde araştırılması amaçlanmıştır. Etkin maddelerin sitotoksik aktivitesi L929 fare fibroblastlarına karşı MTT yöntemiyle, antimalaryal etkinliği ise in vivo fare modelinde dört gün testiyile belirlenmiştir. Bu çalışmada, CIN grubu, CBD grubu, ERA grubu, klorokin grubu (CG) ve tedavi almayan grup (TAG) olmak üzere beş grup oluşturulmuştur. Tüm farelere  $2.5 \times 10^7$  parazit/mL *Plasmodium berghei* ile enfekte eritrosit süspansiyonu intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Belirlenen dozlardaki etkin maddelerin farelere oral gavaj ile dört gün testine uygun olarak verilmiş ve farelerdeki parazitemi, farelerin kuyruk ucundan alınan kandan yapılan yayma preparatları ile 21 gün boyunca kontrol edilmiştir. Etkin maddelerin sitotoksik aktivitesini ifade eden  $IC_{50}$  değerleri CIN, CBD ve ERA için sırasıyla 27.55 µg/mL, 16.40 mikromolar (µM) ve 48.82 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Tedavi almayan farelerdeki ortalama parazitemi oranı dokuzuncu günde %33 olarak saptanmış ve 11. günde tüm fareler ölmüştür. Dokuzuncu günde, TAG grubu ile kıyaslandığında CIN grubunda parazit görülemezken CBD grubunda %0.08 ve ERA grubunda ise %17.8 oranında ortalama parazitemi saptanmıştır. TAG grubundaki fareler ile kıyaslandığında, diğer grupların yaşam süresinin CIN grubunda sekiz gün, CBD grubunda 12 gün ve ERA grubunda ise sekiz gün uzadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada test edilen üç etkin maddenin de in vivo fare modelinde *Plasmodium* parazitlerinin gelişimini baskıladığı ve farelerin yaşam süresinin uzadığı tespit edilmiştir. Çalışmada gösterilen CIN ve CBD'nin güçlü antimalaryal etkinliği ve ERA'nın olası klinik seyre olumlu etkisinin mevcut ve potansiyel antimalaryal moleküllerle kombine edilerek geliştirilebileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Antimalaryal; cinnamaldehyde; cannabidiol; eravacycline; in vivo model; sıtma.

**İletişim (Correspondence):** Dr. Yener Özel, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye. Tel (Phone): +90 544 325 7352, E-posta (E-mail): yener\_ozel@hotmail.com

**ABSTRACT**

In this study, it was aimed to investigate the antimalarial activity of cinnamaldehyde (CIN) and cannabidiol (CBD) which have shown various biological activities such as potent antimicrobial activity and eravacycline (ERA), a new generation tetracycline derivative, in an in vivo malaria model. The cytotoxic activities of the active substances were determined by the MTT method against L929 mouse fibroblasts and their antimalarial activity were determined by the four-day test in an in vivo mouse model. In this study, five groups were formed: the CIN group, the CBD group, the ERA group, the chloroquine group (CQ) and the untreated group (TAG).  $2.5 \times 10^7$  parasites/mL of *P.berghei*-infected erythrocyte suspension was administered IP to all mice. The determined doses of active substances were given to the mice by oral gavage in accordance with the four-day test and the parasitemia status in the mice was controlled for 21 days with smear preparations made from the blood taken from the tail end of the mice. The  $IC_{50}$  values, which express the cytotoxic activity values of the active substances were determined as 27.55 µg/mL, 16.40 µM and 48.82 µg/mL for CIN, CBD and ERA, respectively. The mean parasitemia rate in untreated mice was 33% on day nine and all mice died on day 11. On the ninth day, when compared with the TAG group, no parasites were observed in the CIN group, while the average parasitemia was 0.08% in the CBD group and 17.8% in the ERA group. Compared to the mice in the TAG group, the life expectancy of the other groups was prolonged by eight days in the CIN group, 12 days in the CBD group and eight days in the ERA group. It has been determined that all three active substances tested in this study suppressed the development of *Plasmodium* parasites in an in vivo mouse model and prolonged the life span of the mice. It is thought that the strong antimalarial activity of CIN and CBD shown in the study and the possible positive effect of ERA on the clinical course can be improved by combining them with the existing and potential antimalarial molecules.

**Keywords:** Antimalarial; cinnamaldehyde; cannabidiol; eravacycline; in vivo model; malaria.

**GİRİŞ**

Küresel olarak sıtmanın endemik olduğu 85 ülkede tahminen 3.4 milyar insanın sıtma ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. 2021 Dünya Sıtma Raporu'na göre, 2020 yılında 241 milyon sıtma olgusu ve 627000 sıtma kaynaklı ölüm olduğu hesaplanmıştır. Bu veriler, 2020'de 2019'a kıyasla vaka sayısının 14 milyon ve ölüm sayısının ise 69000 arttığını göstermektedir. Bu ek ölümlerin yaklaşık üçte ikisinin (47000), pandemi sırasında sıtmanın önlenmesi, tanısı ve tedavisinde yaşanan aksaklıklarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sıtma kaynaklı ölümlerin %93'ünün meydana geldiği Afrika Bölgesi'nde, tüm ölümlerin %61'i hala beş yaşın altındaki çocuklarda görülmektedir<sup>1</sup>.

Antimalaryal ilaçlara karşı gelişmekte olan direnç sorunu, küresel sıtma kontrolü için tehdit olmaya devam etmektedir<sup>2</sup>. Mevcut koronavirüs pandemisinin de sıtma kontrolü çalışmalarını olumsuz etkilediği bildirilmiştir<sup>3,4</sup>. Kinin direncine ilişkin ilk raporlar, 1910 yılı gibi erken dönemlerde ortaya çıkmaya başlamıştır<sup>5</sup>. Kinin ve türevleri daha sonra yaygın olarak primakin ve tafenokinin öncülü olan 8-aminokinolinlerle birleştirilmiş ancak kombinasyon tedavisinin yerini, II. Dünya Savaşı sırasında kullanılmaya başlanan klorokin (CQ) monoterapisi almıştır. CQ dirençli ilk *P.falciparum* olguları, Güney Amerika ve Güneydoğu Asya'da bildirilmiştir<sup>6,7</sup>. Yirmi yıl içinde, CQ dirençli *P.falciparum*'un, tropikal ve subtropikal bölgelere hakim olacağı öngörülmektedir<sup>8</sup>. CQ kademeli olarak sülfadoksin-primetamin (SP) ile değiştirilmiş, ancak SP direnci, ilaç piyasaya sürüldükten kısa süre sonra ortaya çıkmaya başlamıştır<sup>9</sup>.

Artemisinin bazlı kombinasyon tedavisinin (ABT) 2000'lerin başlarında uygulanmaya başlanmasıyla Güneydoğu Asya'da ABT direncine ilişkin ilk raporlar bildirilmiş, daha sonra, artesunat-meflokin (AS-MQ) ve dihidroartemisinin-piperakin (DHA-PPQ) kombinasyonlarında hem artemisinin türevlerine hem de kombine ilaçlara karşı fenotipik ve genotipik olarak direnç gelişimi doğrulanmıştır<sup>10,11</sup>. *P.falciparum*'un kelch13 (pfk13), R561H, P574L ve C469Y gibi suşlarının görüldüğü Ruanda'dan bildirilen yakın tarihli bir raporda Sahra Altı Afrika, Güney Asya ve Güney Amerika'da bir veya daha fazla ABT bileşenine karşı direncin genotipik ve fenotipik kanıtları gösterilmiştir<sup>11-13</sup>.

Paraziter hastalıkların tedavisinde şifalı otların kullanımı antik çağlardan beri bilinmektedir<sup>14</sup>. *Cinchona calisaya* ve *Artemisia annua*'dan en etkili antimalaryal ilaçlar olan kinin ve artemisinin izole edilmiştir. Ayrıca, CQ, meflokin, primetamin, primakin, artemisinin, artemeter, artesunat ve dihidroartemisinin gibi klinik kullanımda olan ilaçlar ya bitki kaynaklarından izole edilmiştir ya da bunların modifiye türevleridir. Özellikle artan direnç sorununa karşın alternatif ilaç adayı moleküllerin belirlenmesi, tek başına veya kombine antimalaryal etkinliklerinin araştırılması umut verici görünmektedir. Bu çalışmada, güçlü antimikrobiyal etkinliği gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri gösterilmiş olan 'cinnamaldehyde' (CIN) ve 'cannabidiol' (CBD) ile yeni nesil tetrasiklin türeviden olan 'eravacycline' (ERA)'in sitotoksik aktivitesinin ex vivo, parazit supresyon oranı ve antimalaryal etkinliğinin ise, *P.berghei* ile oluşturulmuş in vivo sıtma modelinde araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 02.03.2021 ve Karar no: 77.637.435).

### Etken Maddelerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan cinnamaldehyde (C80687) ve cannabidiol (PHL85705) Sigma (Merck, Almanya)'dan, eravacycline (A13887/TP-434) ise Adooq (ABD ve Kanada)'tan temin edildi. Sitotoksikite çalışmalarında CIN ve ERA için 5000 µg/mL, CBD için ise 993 mikromolar (µM) konsantrasyonda çalışma çözeltileri hazırlandı. Çözücü olarak CIN ve CBD için RPMI-1640 besiyeri, ERA için ise %0.9'luk serum fizyolojik kullanıldı.

### Sitotoksik Aktivitenin Saptanması

Etken maddelerin sitotoksik aktivitesi L929 fare fibroblast hücre hattı (American Type Culture Collection, ABD) kullanılarak saptandı. Steril, düz tabanlı ve 96 kuyucuklu mikrop-lakların her bir kuyucuğuna 100 µl hücre süspansiyonu (10<sup>5</sup>/mL) eklendi. Mikrop-laklar 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat inkübasyona alındı. CIN ve ERA çözeltilerinin 2500-1.22 µg/mL, CBD için ise 496.5-0.2 µM aralığında seri dilüsyonları ikinci bir mikrop-lakta yapıp 100 µl alınarak ilk mikrop-lağa aktarıldı. Mikrop-laklar, 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 48 saat inkübasyona alındı.

Hücre canlılığı, MTT (3-(4.5-dimetiltiyazol-2-yl)-2.5-difeniltetrazolyum bromit) yöntemiyle belirlendi. İnkübasyon süresi sonunda, etken madde içeren ve içermeyen mikrop-lakların tüm besiyerleri boşaltıldı, her bir kuyucuğa 100 µl MTT süspansiyonu pipetlendi ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37 °C'de dört saat inkübe edildi. Süre sonunda mikrop-laklardaki tüm kuyucuklar boşaltılarak her bir kuyucuğa, 100 µl DMSO (formazan kristallerinin çözünmesi için) pipetlendi ve 30 dakika aynı şartlarda inkübe edildi. Absorbans ölçümleri 570 nm'de spektrofotometrede (Biotek 800TS, ABD) yapıldı ve IC<sub>50</sub> değerleri Graphpad Prism 8.4.2 programıyla belirlendi.

### **Deney Hayvanları ve Parazit Suşu**

Çalışmada, deney hayvanı olarak 25 adet, 2-3 aylık, 20-25 g ağırlığında Balb/C cinsi erkek fareler kullanıldı. Tüm fareler tip II kafeslerde ve 20 °C oda sıcaklığındaki 12:12 saatlik aydınlık/karanlık döngülü, klimalı odalarda her kafeste beş fare olacak şekilde barındırıldı. Bağıl nem %60-70'te tutuldu ve fareler, ticari kemirgen yemi ve ad libidum su ile beslendi. Çalışmada, kemirgen sıtma etkeni olan ve insandaki *P.falciparum* sıtmasına benzer klinik oluşturan *P.berghei* (ATCC, Virginia, ABD) suşu seçildi.

### **Deney Gruplarının Oluşturulması**

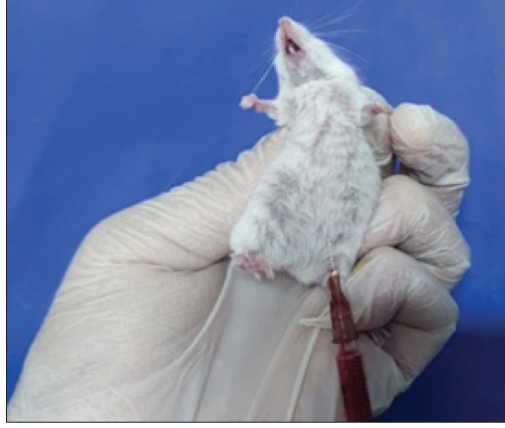
Çalışmada, her grupta beşer fare olan toplam beş adet deney grubu oluşturuldu.

- I. Grup : CIN grubu (50 mg/kg)
- II. Grup : CBD grubu (20 mg/kg)
- III. Grup : ERA grubu (50 mg/kg)
- IV. Grup : CQ grubu (50 mg/kg)
- V. Grup : TAG grubu (Serum fizyolojik)

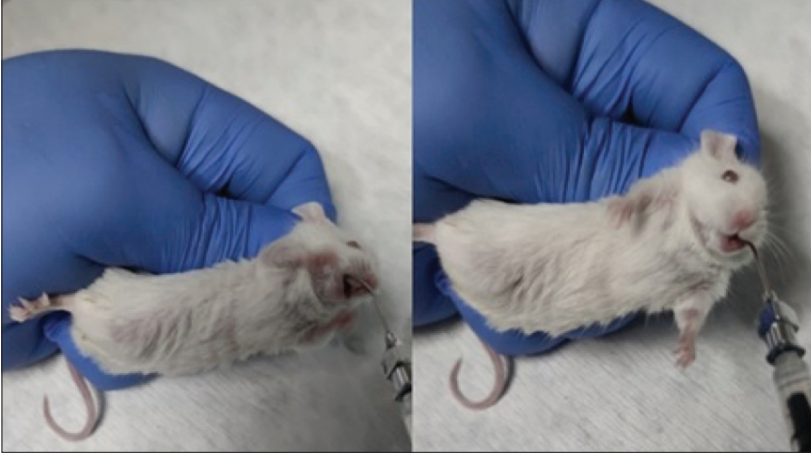
### **Deney Gruplarının *P.berghei* ile Enfekte Edilmesi**

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasında saklanan *P.berghei* suşu, sıvı azottan çıkarılarak 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda kısa süre tutuldu ve DMSO'dan arındırmak için RPMI-1640 besiyeri ile yıkandı. Yıkama işlemi sonunda hazırlanan *P.berghei* süspansiyonu, iki adet donör fareye 0.1 ml hacimde IP olarak verildi. Her iki günde bir farelerin kuyruk ucundan alınan kan örneğinden ince yayma yapılarak parazitemi takip edildi. Farelerdeki parazitemi oranı %30'a ulaştığında, sınıf II biyogüvenlik kabini içinde ve steril şartlara uyularak enfekte farenin koltuk altı veni kesilip %0.5 trisodyum sitrat içeren tüp içerisine 0.5 ml kan alınarak enfekte eritrosit konsantrasyonu, SF ile 2.5 x 10<sup>7</sup> parazit/mL olacak şekilde ayarlandı<sup>15</sup>. Deney grubundaki tüm farelere 0.1 ml hacimde IP olarak verildi (Şekil 1).

Etken maddelerin in vivo antimalaryal etkinliği, Porter ve Peters (1976) tarafından önerilen "dört gün testi" protokolüne göre değerlendirildi<sup>16</sup>. Etken madde çözeltileri, CQ tarama dozuna eşdeğer olan 50 mg/kg dozlarında ayarlanarak, 0.2 ml oral gavaj uygulamasıyla farelere verildi<sup>17</sup>. CBD grubundaki farelerde komplikasyon gelişmesi üzerine



Şekil 1. *P.berghei* ile enfekte eritrosit süspansiyonunun farelere IP enjeksiyonu.

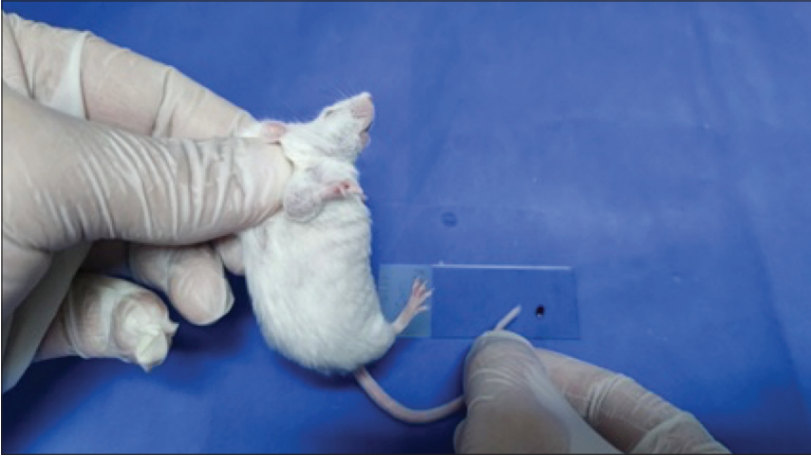


Şekil 2. Etken maddelerin farelere oral gavaj ile verilmesi.

bu etken maddenin dozu 20 mg/kg'a kadar düşürüldü (Şekil 2). Etken madde ve CQ uygulaması, enfeksiyonun verildiği andan iki saat sonra birinci doz, 24 saat sonra ikinci doz, 48 saat sonra üçüncü doz ve 72 saat sonra dördüncü doz olarak verildi.

### Enfeksiyon Takibi ve Parazitemi Oranının Belirlenmesi

Deney gruplarındaki farelerin parazitemi oranı, iki gün arayla farelerin kuyruk ucu ve- ninden alınan kandan hazırlanan ince yayma preparatı ile değerlendirildi (Şekil 3). Enfek- siyonun üçüncü gününden itibaren alınmaya başlanan ince yayma preparatları Giemsa ile boyandı ve parazitemi ışık mikroskopu altında immersiyon objektifi ile incelendi. Para- zitemi takibi, 21 gün boyunca tarif edildiği şekilde hesaplanarak her gruptaki her bir fare için ayrı ayrı kaydedildi. Her bir ince yayma preparatında en az 10 farklı alanda enfekte eritrositler sayılarak parazitemi ve supresyon oranları aşağıdaki formüller ile hesaplandı<sup>18</sup>.



Şekil 3. Farelerin kuyruk ucu veninden yayma preparatların yapılması.

$$\text{Parazitemi (\%)} = \frac{\text{Enfekte ERT Sayısı}}{\text{Enfekte ERT Sayısı + Enfekte Olmayan ERT Sayısı}} \times 100$$

$$\text{Parazit Supresyonu (\%)} = \frac{\text{Kontrol Grubundaki \%p} - \text{Tedavi Grubundaki \%p}}{\text{Kontrol Grubundaki \%p}} \times 100$$

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Sidak's Multiple Comparisons yöntemi ile yapıldı. Anlamlılık değeri %5 kabul edilerek veriler Graphpad Prism 8.4.2 programıyla analiz edildi.

### BULGULAR

Sitotoksik aktivite çalışmalarında kullanılan etken maddelerin çalışma dilüsyon aralıkları, CIN ve ERA için 2500-1.2 µg/mL, CBD için ise 496.5-0.2 µM olacak şekilde ayarlanmıştır. CIN için hücre canlılığı 625 µg/mL, CBD için ise 248.3 µM konsantrasyonda başlarken ERA için 2500 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığı tespit edilmiştir (Tablo I, Şekil 4).

Etken maddelerin fibroblastlara karşı sitotoksik aktivitesini tanımlayan IC<sub>50</sub> değeri, Graphpad Prism 8.4.2 programıyla hesaplanarak CIN için 27.55 µg/mL, CBD için 16.40 µM ve ERA için 48.82 µg/mL olarak saptanmıştır (Tablo II).

**Tablo I.** CIN, CBD ve ERA Kullanılan L929 Fibroblastlarda Canlılık Oranları (%)

Kons (µg/mL)	2500	1250	625	312.5	156.3	78.1	39.1	19.5	9.8	4.9	2.4	1.2
CIN	0.0	0.0	1.2	3.7	8.7	12.7	45.6	57.7	73.2	91.9	100	100
ERA	2.7	3.4	5.1	10.0	17.3	42.7	59.6	72.6	77.0	100	100	100
Kons (µM)	496.5	248.3	124.1	62.1	31.0	15.5	7.8	3.9	1.9	1.0	0.5	0.2
CBD	0.0	2.5	4.6	9.6	24.8	55.5	75.4	88.7	98.4	100	100	100

**Şekil 4.** CIN, CBD ve ERA kullanılan L929 fibroblastlarda canlılık oranları (%).**Tablo II.** Etkin Maddelerin IC<sub>50</sub> ve LC Değerleri

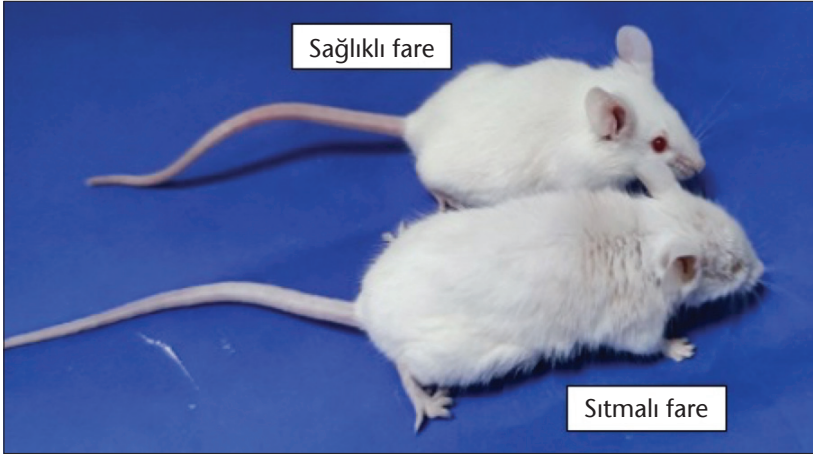
Etkin Maddeler	IC <sub>50</sub>	LC
CIN (µg/mL)	27.55	1250
CBD (µM)	16.40	496.5
ERA (µg/mL)	48.82	> 2500

IC: İnhibisyon konsantrasyonu, LC: Letal konsantrasyon.

Etkin maddelerin antimalaryal etkinlikleri, son tedavi dozunun verildiği üçüncü günden itibaren tüm farelerin kuyruk veni kanından hazırlanan ince yayma preparatlarının incelenmesiyle değerlendirilmiştir. Tedavi almayan gruptaki (TAG) farelerin yapılan ince yayma preparatlarında, üçüncü günde ortalama %5, beşinci günde %7.4, yedinci günde %14.6 ve dokuzuncu günde %33 oranında parazitemi saptanmıştır. TAG grubunda yer alan farelerin dokuzuncu günde fiziksel durumlarının kötü olduğu gözlenmiş, tüylerinin dikensi ve kirli, kuyruk ve kulaklarının anemik, solunumlarının hızlı ve hareketlerinin yavaş olduğu görülmüştür (Şekil 5). Dokuzuncu günün akşamında farelerin dördü, 10. günde ise son fare ölmüştür. TAG grubunda yer alan farelerin parazitemi oranları Tablo III'te verilmiştir.

Klorokin tedavisi alan ilaç kontrol grubunda üçüncü ve 21. gün arasında yapılan incelemelerde enfekte eritrosit görülmemiştir. Bu gruptaki fareler deney süresi boyunca canlı kalmıştır. Deney süreci sonunda fareler etik kurallara uygun şekilde kurban edilmiştir.





Şekil 5. Sağlıklı ve sıtmalı farenin fiziksel görünümü.

Tablo III. TAG'ta Ayrıntılı Parazitemi Oranları (%)

Gün	Tedavi Almayan Grup (TAG)					Ortalama
	Fare 1	Fare 2	Fare 3	Fare 4	Fare 5	
3. gün	5.0	5.0	6.0	4.0	5.0	5.0
5. gün	8.0	7.0	7.0	8.0	7.0	7.4
7. gün	14.0	15.0	14.0	15.0	15.0	14.6
9. gün	31.0	34.0	33.0	34.0	33.0	33.0
11. gün	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex

TAG: Tedavi almayan grup, Ex: Eksitus (ölüm).

CIN grubunda yer alan farelerde, dokuzuncu güne kadar enfekte eritrosit görülmezken 11. gün yapılan yaymalarda %0.05-0.1 arasında değişen oranda parazitemi tespit edilmiştir. Takip eden günlerde parazitemi oranı artmaya başlamış ve 13. günde ortalama %5.8, 15. günde %7.8 ve 17. günde %25.4 oranında parazitemi saptanmıştır (Tablo IV ve Şekil 6). Artan parazitemi ve gözlenen eritrosit sayısında düşmeye ek olarak farelerin fiziksel görünümünün de kötüleştiği görülmüştür. Bu grupta yer alan farelerin ikisi 17. günün akşamında, diğer üçü ise 18. günde ölmüştür. CIN grubundaki farelerin yaşam süresinin, TAG grubundaki farelere kıyasla sekiz gün daha uzun olduğu görülmüştür.

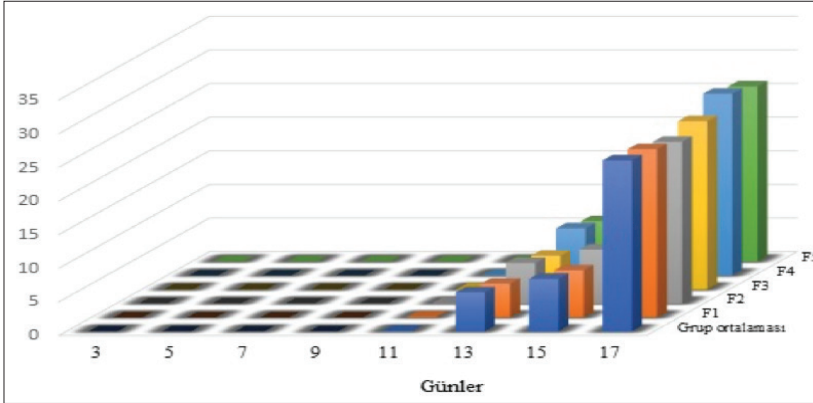
CBD grubunda yer alan farelerde, yedinci güne kadar enfekte eritrosit görülmezken dokuzuncu gün yapılan yaymalarda %0.05-0.1 arasında değişen parazitemi oranı, 11. günden itibaren artarak %3.2'ye ulaşmış ve 13., 15., 17., 19., ve 21. günlerde sırasıyla, %15.6, %20.8, %23.20, %27.60 ve %29.60 olarak saptanmıştır (Tablo V ve Şekil 7). Bu grupta yer alan farelerin üçü 21. günün gecesinde, diğer ikisi ise 22. günde ölmüştür. CBD grubundaki farelerin yaşam süresinin, TAG grubundaki farelere kıyasla 12 gün daha uzun olduğu görülmüştür.



**Tablo IV. CIN Grubunda Ayrıntılı Parazitemi Oranları (%)**

Gün	Cinnamaldehyde (CIN)					Ortalama
	Fare 1	Fare 2	Fare 3	Fare 4	Fare 5	
3. gün	0	0	0	0	0	0
5. gün	0	0	0	0	0	0
7. gün	0	0	0	0	0	0
9. gün	0	0	0	0	0	0
11. gün	0.1	0.05	0.1	0.05	0.05	0.07
13. gün	5.0	6.0	5.0	7.0	6.0	5.8
15. gün	7.0	8.0	7.0	9.0	8.0	7.8
17. gün	25.0	24.0	25.0	27.0	26.0	25.4
19. gün	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex

CIN: Cinnamaldehyde, Ex: Eksitus (ölüm).

**Şekil 6. CIN grubunda ayrıntılı parazitemi oranları (%).**

ERA grubunda yer alan farelerden yapılan yayma preparatlarda parazitemi üçüncü günde ortalama %1.8, beşinci günde %2.4, yedinci günde %9.4 ve dokuzuncu günde %17.8, 11. günde %26.8, 13. günde %30.2, 15. günde %31.8 ve 17. günde %33.6 olarak saptanmıştır (Tablo VI ve Şekil 8).

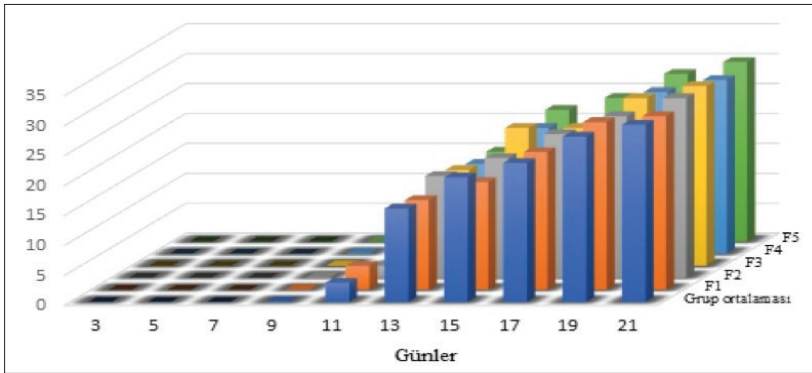
Bu grupta yer alan farelerin üçü 17. günün akşamında, diğer ikisi ise 18. günde ölmüştür. ERA grubundaki farelerin yaşam süresinin, TAG grubundaki farelere kıyasla sekiz gün daha uzun olduğu tespit edilmiştir.

TAG grubunda yer alan fareler enfeksiyondan sonra dokuzuncu güne kadar yaşamış ve 11. günde tümü ölmüştür. Tüm grupların ortalama parazitemi oranları birbiriyle kıyaslandığında dokuzuncu günde yapılan yaymalarda, CIN ve CQ grubunda enfekte eritrosit görülmezken CBD grubunda %0.08, ERA grubunda %17.8 ve TAG grubunda ise %33 oranında parazitemi saptanmıştır (Tablo VII ve Şekil 9).

Tablo V. CBD Grubunda Ayrıntılı Parazitemi Oranları (%)

Gün	Cannabidiol (CBD)					Ortalama
	Fare 1	Fare 2	Fare 3	Fare 4	Fare 5	
0. gün	0	0	0	0	0	0
1. gün	0	0	0	0	0	0
2. gün	0	0	0	0	0	0
3. gün	0	0	0	0	0	0
5. gün	0	0	0	0	0	0
7. gün	0	0	0	0	0	0
9. gün	0.1	0.1	0.05	0.1	0.05	0.08
11. gün	4.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3.2
13. gün	15.0	17.0	16.0	15.0	15.0	15.6
15. gün	18.0	20.0	23.0	21.0	22.0	20.8
17. gün	23.0	24.0	23.0	22.0	24.0	23.2
19. gün	28.0	27.0	28.0	27.0	28.0	27.6
21. gün	29.0	30.0	30.0	29.0	30.0	29.6

CBD: Cannabidiol.



Şekil 7. CBD grubunda ayrıntılı parazitemi oranları (%).

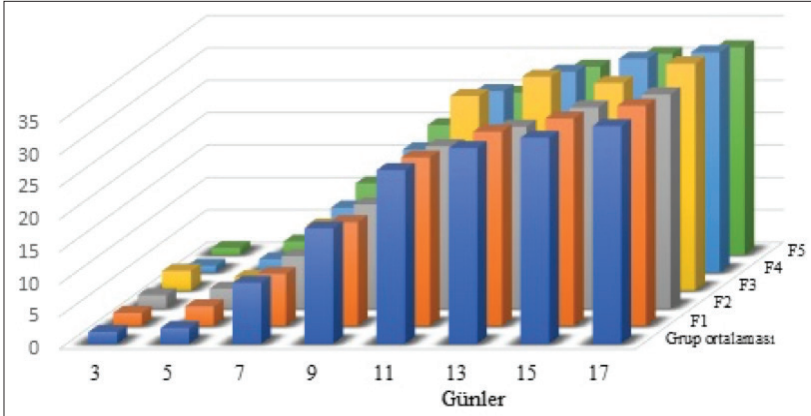
Çalışmada denenen etken maddelerin parazit üzerindeki supresyon oranı, gruplardaki farelerin ortalama parazitemi değerleri baz alınarak belirlenmiştir. Bu amaçla, tedavi uygulamasının bittiği beşinci gün ve TAG grubunda paraziteminin en yüksek seviyeye ulaştığı dokuzuncu gün kıyaslanmıştır. Parazit supresyon oranı CIN için beşinci ve dokuzuncu günde %100, CBD için beşinci gün %100, dokuzuncu günde %99.7, diğer gruplara kıyasla antimalaryal etkinliğin nispeten düşük bulunduğu ERA için beşinci gün %67.3, dokuzuncu gün %43.3 olarak tespit edilmiştir (Tablo VIII).

Etken madde (CIN, CBD, ERA) grupları ile ilaç kontrol grubunun (CQ) grubunun parazitemi oranları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. CQ grubundaki farelerde deney süreci boyunca parazitemi görülmemiştir. CQ grubu ile CIN ve CBD grupları arasında

**Tablo VI. ERA Grubunda Ayrıntılı Parazitemi Oranları (%)**

Gün	Eravacycline (ERA)					Ortalama
	Fare 1	Fare 2	Fare 3	Fare 4	Fare 5	
3. gün	2	2	3	1	1	1.8
5. gün	3	3	2	2	2	2.4
7. gün	8	8	10	10	11	9.4
9. gün	16	16	18	19	20	17.8
11. gün	26.0	25.0	30.0	28.0	25.0	26.8
13. gün	30.0	28.0	33.0	31.0	29.0	30.2
15. gün	32.0	31.0	32.0	33.0	31.0	31.8
17. gün	34.0	33.0	35.0	34.0	32.0	33.6
19. gün	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex

ERA: Eravacycline, Ex: Eksitus (ölüm).

**Şekil 8. ERA grubunun ayrıntılı parazitemi oranları (%).**

sırasıyla, paraziteminin görülmediği dokuzuncu ve yedinci günlere kadar istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmezken ( $p > 0.05$ ) 11. günden itibaren ve CQ grubu ile ERA grubu arasında beşinci günden itibaren parazitemi oranındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) bulunmuştur.

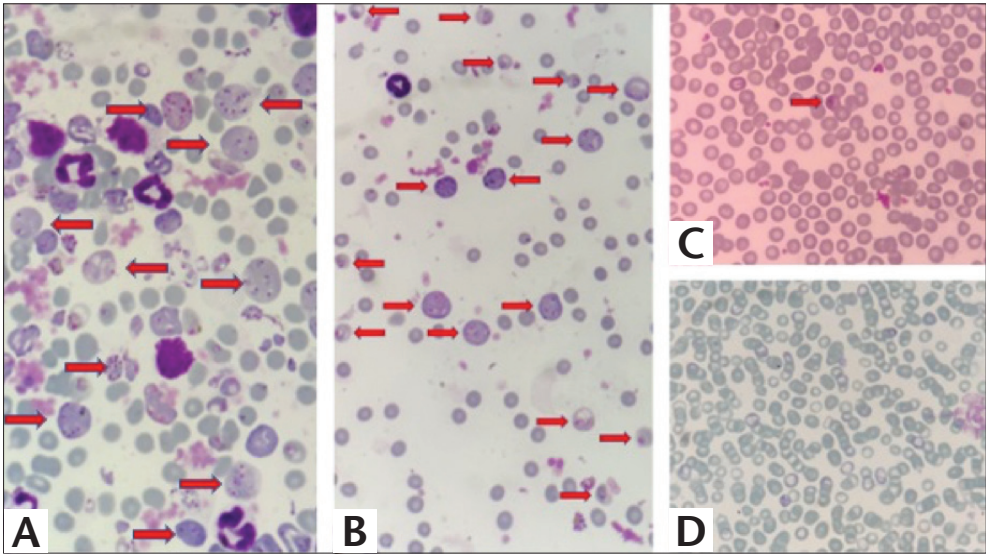
Etken madde grupları ve TAG grubu üçüncü ve dokuzuncu günler için karşılaştırıldığında, parazitemi oranındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) bulunmuştur.

Etken madde grupları birbiriyle kıyaslandığında, CIN ve CBD gruplarının parazitemi oranındaki farklılık, dokuzuncu ve 17. günlerde anlamlı değilken ( $p > 0.05$ ) diğer tüm günlerde istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) bulunmuştur. Aynı şekilde CIN/ERA ve CBD/ERA grupları arasında üçüncü gün dışında ( $p > 0.05$ ) diğer tüm günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ( $p < 0.05$ ) saptanmıştır.

**Tablo VII. Etken Madde Gruplarında Ortalama Parazitemi Oranları (%)**

Gün	CIN	CBD	ERA	CQ	TAG
3. gün	0	0	1.8	0	5.0
5. gün	0	0	2.4	0	7.4
7. gün	0	0	9.4	0	14.6
9. gün	0	0.08	17.8	0	33.0
11. gün	0.07	3.20	26.8	0	Ex
13. gün	5.8	15.60	30.2	0	Ex
15. gün	7.8	20.8	31.8	0	Ex
17. gün	25.4	23.2	33.6	0	Ex
19. gün	Ex	27.6	Ex	0	Ex
21. gün	Ex	29.6	Ex	0	Ex
23. gün	Ex	Ex	Ex	0	Ex

CIN: Cinnamaldehyde, CBD: Cannabidiol, ERA: Eravacycline, CQ: Klorokin, TAG: Tedavi almayan grup, Ex: Eksitus (ölüm).



**Şekil 9.** Dokuzuncu günde A) TAG grubunda B) ERA grubunda ve C) CBD grubunda enfekte eritrositler D) CIN grubunda enfekte eritrosit görülmemiştir.

## TARTIŞMA

Geleneksel tıpta kullanılan bitkiler, sıtmaya karşı kullanılacak ilaç arayışında potansiyel kaynak olarak görülmektedir. Peru'da kınakına ağacının kabuğundan elde edilen kinin ve Çin'de ateş düşürücü olarak kullanılan *Artemisia annua*'dan elde edilen artemisinin, etnofarmakolojik yaklaşımlarla sıtma için geliştirilen en etkili ilaçlardandır<sup>19</sup>.

**Tablo VIII. Etken Maddelerin Ortalama Supresyon Oranları (%)**

Etken Madde	Doz	Supresyon 5. gün	Supresyon 9. gün
CIN	50 mg/kg	100	100
CBD	20 mg/kg	100	99.7
ERA	50 mg/kg	67.3	43.3

CIN: Cinnamaldehyde, CBD: Cannabidiol, ERA: Eravacycline.

*C.zeylanicum* uçucu yağının ana bileşeni olan CIN'in, bakteri, maya, *Leishmania* ve *Toxoplasma* gibi geniş bir mikroorganizma yelpazesi üzerinde güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir<sup>20</sup>. Bu çalışmada, *P.berghei* ile enfekte fare gruplarına 50 mg/kg dozda CIN verilmiştir. CIN grubunda enfeksiyondan sonraki dokuzuncu güne kadar parazitemi görülmezken TAG grubunda parazitemi oranı ortalama %33 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. CIN grubunda parazitemi, 13. günde saptanmaya başlamış ve 17. günde ortalama %25.4 ile en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Farelerin yaşam süresi, TAG grubuyla kıyaslandığında sekiz gün daha uzamıştır. Dört doz şeklinde verilen CIN'in 11. gün itibarıyla vücuttan atılmaya başlaması ile parazit supresyonunun ortadan kalktığı ve farelerdeki parazitemi oranının bu nedenle hızlı bir şekilde yükseldiği düşünülmektedir. Elde edilen veriler, fare modelinde CIN'in *P.berghei* enfeksiyonunu baskıladığını göstermektedir. Parvazi ve arkadaşları tarafından yapılan cinnamon özütünün *Plasmodium falciparum*'a etkisinin incelendiği bir çalışmada, cinnamon özütünün alanin, aspartam, glutamat, pantotenat yolaklarına ve koenzim A ile lizin biyosentez ve glutatyon metabolizmasına etkili olabileceği metabolomik analiz ile gösterilmiş ve bu yolların hedef alınabileceği bildirilmiştir<sup>21</sup>. Nkanwen ve arkadaşları benzer bir çalışmada, cinnamon özütünün *P.falciparum* enoil-ACP redüktaz (pfENR) enzimi üzerine in vitro etkisinin inhibe edici olduğunu; Arianie ve arkadaşları ise yaptıkları in silico analizler sonucunda, izotiyonat bazlı CIN türevlerinin antimalaryal etkinliğinin umut verici olduğunu bildirmişlerdir<sup>22,23</sup>. Tartışılan bu çalışmalarda in vitro ve in silico yöntemleriyle *Plasmodium*'da hedef alınabilecek noktalar belirlenmeye çalışılmış olup CIN'in in vivo deney modelinde de antimalaryal etki gösterebileceği ifade edilmiştir. Elde edilen veriler, ilk olma niteliğinde olup fare modelinde CIN'in *P.berghei* enfeksiyonunu baskıladığını göstermekte, yukarıda tartışılan modelleme çalışmalarını desteklemekte ve yeni antimalaryal ilaç geliştirme stratejileri için literatüre önemli bir katkı sunmaktadır.

*C.sativa* (kenevir)'da bulunan CBD'nin nöroprotektif özelliklere sahip olduğu bilinmektedir<sup>24,25</sup>. Antimalaryal ilaçların, sıtma tedavisindeki etkinliğine rağmen serebral sıtma (SM) vakalarında nörolojik hasarı önleme üzerindeki etkileri net değildir<sup>26</sup>. Bu nedenle, antimalaryal ilaçlar ve nöroprotektif bileşiklerin kombinasyonu, SM hastalarında nörolojik defektlerin iyileştirilmesi bakımından olumlu bir yaklaşım sunabilir. *C.sativa*'dan izole edilen bileşenlerin, in vitro olarak orta derecede antimalaryal aktiviteye sahip olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır<sup>27</sup>. Bu çalışmada, *P.berghei* ile enfekte edilmiş

farelere 20 mg/kg dozda CBD oral yoldan verilmiştir. Enfeksiyondan sonraki yedinci güne kadar CBD'nin paraziti baskılama oranı %100, TAG grubundaki parazitemi oranının en yüksek seviyeye ulaştığı dokuzuncu günde ise parazit supresyonu ortalama %99.7 olarak tespit edilmiştir. CBD grubundaki farelerin sağ kalım süreleri TAG grubu ile kıyaslandığında, farelerin yaşam sürelerinin 12 gün uzadığı gözlenmiştir. CBD grubunda dokuzuncu günde parazitemi %0.08 olarak tespit edilmeye başlanmış ve 21. günde ortalama %29.6 parazitemiyle en yüksek seviyeye çıkmıştır. CBD'nin vücuttan atılmasına bağlı olarak paraziteminin 11. günden itibaren hızla yükseldiği gözlenmekte, buna karşın TAG grubu ile kıyaslandığında CBD'nin enfeksiyonu iyi derecede baskıladığı görülmektedir. Antimalaryal ilaçlar ve nöroprotektif bileşiklerin kombinasyonu, SM hastalarında nörolojik defektlerin iyileştirilmesi bakımından olumlu bir yaklaşım sunabilir. Benzer bir hipotez kuran Campos ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *P.berghei* ile enfekte edilen farelere CBD, 30 mg/kg dozda enfeksiyonun üçüncü gününden 10. gününe kadar sekiz defa IP olarak verilmiştir. Enfeksiyondan sonraki beşinci günde, fareler artesunat ile tedavi edilmiştir. *P.berghei* ile enfekte farelerin, hafıza eksiklikleri sergilediği, anksiyete benzeri davranışlarda artış olduğu ve bu etkilerin CBD verilmesi ile önlendiği bildirilmiştir<sup>28</sup>. *C.sativa* diyetinin antimalaryal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, Akinola ve arkadaşları, %40'lık *C.sativa* diyetiyle beslenen fare grubundaki ortalama hayatta kalma süresinin tedavi grubu ile benzer olması nedeniyle bu bitkinin *P.berghei*'nin patojenitesini azaltma potansiyeli olduğunu bildirmiştir<sup>29</sup>. CBD'nin etki mekanizmasının belirlenmesine yönelik Joshua ve arkadaşları tarafından yapılan in silico bir çalışmada, CBD'nin modifiye bir türevinin *P.falciparum* dihidrofolat redüktaz enzimine karşı etkili olabileceği ve deney modellerinde araştırılması gerektiği bildirilmiştir<sup>30</sup>. CBD'nin in vivo fare modelinde antimalaryal etkinliğine ilişkin elde edilen veriler de ilk olma niteliğinde olup antimalaryal ilaçlar ve CBD kombinasyonlarının hem antimalaryal etkinlik hem de sıtma sonrası gelişebilecek nörolojik defektlerin tedavisi açısından umut verici olabileceği düşünülmektedir.

Sıtma tedavisinde antibiyotiklerin kullanımı, CQ dirençli parazitlerin ortaya çıkmasıyla başlamıştır. Tetrasiklinler komplike olmayan sıtmayı tedavi etmek için kullanılan ve 1950'lere dayanan ilk antibiyotik grubudur<sup>31</sup>. Antimalaryal etkisi olan antibiyotikler izoprenoid öncüllerinin biyosentezinden sorumlu, endosimbiyotik bakterilerden türetilen plastit benzeri bir organel olan apikoplastı hedef almaktadır<sup>32</sup>. Yeni nesil tetrasiklin grubu antibiyotikler olan tigesiklin ve ERA'nın hedef bölgelerinin *Plasmodium*'da mevcut olması ve tigesiklin ile yapılan az sayıdaki in vitro çalışmada umut verici sonuçlar alınması, ERA'nın antimalaryal etkinliğinin araştırılması için gerekli hipotezin kurulmasını sağlamıştır<sup>33-35</sup>. Bu çalışmada, ERA için enfeksiyonun beşinci gününde ortalama supresyon ve parazitemi oranı sırasıyla, %67.3 ve %2.4 iken, dokuzuncu günde %43 ve %17.8 olarak saptanmıştır. TAG grubu ile kıyaslandığında farelerin yaşam sürelerinin sekiz gün uzadığı gözlenmiştir. ERA grubu farelerde paraziteminin yüksek oranlara çıkmasına rağmen yaşam süresinin uzaması dikkat çekici bulunmuştur. Bu nedenle ERA, parazitemi gelişimine engel olmasa da klinik seyri olumlu etkiliyor olabilir. Bu veriler, ERA'nın in vivo antimalaryal etkinliğine yönelik ilk veriler olup ERA'nın antimalaryal etkinliğini gösteren in vitro

düzeyde yapılmış çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Koehne ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, ERA ve tigesiklinin *P.falciparum* 3D7 suşu ve 33 *P.falciparum* klinik izolatına karşı  $IC_{50}$  değeri, üçüncü gün sonunda sırasıyla, 1.996 ve 5.728 nM iken altıncı gün sonunda ise 14 ve 38 nM olarak saptanmıştır<sup>36</sup>. de Carvalho ve arkadaşları, ERA'nın etkinliğini *P.falciparum* 3D7 (CQ duyarlı) kültür-adapte standart suşuna karşı üç ve altı günlük inkübasyon süresinde araştırmış ve  $IC_{50}$  değerlerini sırasıyla 2.514 nM ve 5.1 nM olarak saptamıştır<sup>37</sup>. Literatürdeki in vitro sonuçlar oldukça etkili bulunmuştur ancak çalışmamızda in vivo ortamda zayıf antimalaryal etkinlik görülmüş olup sonuçların ERA'nın intravenöz uygulamasıyla farklılık gösterebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, test edilen üç etken maddenin de in vivo fare modelinde parazit gelişimini baskıladığı ve yaşam süresini uzattığı tespit edilmiştir ve söz konusu etken maddelerin yeni nesil antimalaryaller olarak daha kapsamlı çalışılması için yeterli veri sunulmaktadır. Sonuç olarak, yeni molekül iskeletlerinin geliştirilmesi, mevcut moleküllerin yapısal modifikasyonu, parazit yaşam döngüsünün ve ilaç etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması, hibridize ilaç moleküllerinin sentezlenmesi, yeni kombinasyon tedavilerinin tasarımı ve bitki bazlı doğal aktif bileşenlerden yeni antimalaryal ilaçların geliştirilmesi, aktif biyomoleküllerin izolasyonu ve tanımlanması gibi yaklaşımlar, antimalaryal direncin büyük bir sorun olmaya devam ettiği günümüzde çok daha fazla önem kazanmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2021-036 numaralı proje ile desteklenmiştir. Ayrıca in vivo sıtma modelinin oluşturulmasında gerekli olan parazit suşunun temin edildiği Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasına teşekkür ederiz.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 02.03.2021 ve Karar no: 77.637.435).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Malaria. Erişim adresi: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/malaria> (Erişim tarihi: 15.04.2023).
2. World Health Organization (WHO). 2016. Global technical strategy for malaria 2016-2030. Geneva. Erişim adresi: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240031357>
3. Hogan AB, Jewell BL, Sherrard-Smith E, Vesga JF, Watson OJ, Whittaker C, et al. Potential impact of the COVID-19 pandemic on HIV, tuberculosis, and malaria in low-income and middle-income countries: A modelling study. *The Lancet Global Health* 2020; 8(9): e1132-e1141. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30288-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30288-6)
4. Sherrard-Smith E, Hogan AB, Hamlet A, Watson OJ, Whittaker C, Winskill P, et al. The potential public health consequences of COVID-19 on malaria in Africa. *Nature Medicine* 2020; 26(9): 1411-6. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1025-y>



5. Nocht B, Werner H. (1910). Observations on relative quinine resistance in malaria from Brazil. German Medical Weekly 1910; 36: 1557-60.
6. Moore DV, Lanier JE. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. Am J Trop Med Hyg 1961; 10: 5-9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1961.10.5>
7. Harinasuta T, Migasen S, Bunnag D. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Thailand. UNESCO 1<sup>st</sup> Regional Symposium on Scientific Knowledge of Tropical Parasites. Singapore: University of Singapore 1962.
8. Payne D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today 1987; 3(8): 241-6. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(87\)90147-5](https://doi.org/10.1016/0169-4758(87)90147-5)
9. Rønn AM, Msangeni HA, Mhina J, Wernsdorfer WH, Bygbjerg IC. High level of resistance of *Plasmodium falciparum* to sulfadoxine-pyrimethamine in children in Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90(2): 179-81. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(96\)90129-7](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(96)90129-7)
10. Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, Muth S, et al. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. Malar J 2009; 8(1): 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-10>
11. van der Pluijm RW, Tripura R, Hoglund RM, Pyae Phyo A, Lek D, Ul Islam A, et al. Triple artemisinin-based combination therapies versus artemisinin-based combination therapies for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: A multicentre, open-label, randomised clinical trial. Lancet 2020; 395(10233): 1345-60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30552-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30552-3)
12. Uwimana A, Legrand E, Stokes BH, Ndikumana JM, Warsame M, Umulisa N, et al. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. Nature Medicine 2020; 26(10): 1602-8. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1005-2>
13. Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, et al. Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance. eLife 2020; 9: e51015. <https://doi.org/10.7554/eLife.51015>
14. Wink M. Medicinal plants: A source of anti-parasitic secondary metabolites. Molecules 2012; 17(11): 12771-91. <https://doi.org/10.3390/molecules171112771>
15. Hailesilase GG, Rajeshwar Y, Hailu GS, Sibhat GG, Bitew H. In vivo antimalarial evaluation of crude extract, solvent fractions and TLC-isolated compounds from *Olea europaea* Linn subsp. *cuspidata* (Oleaceae). eCAM 2020; 2020.
16. Porter M, Peters W. The chemotherapy of rodent malaria, XXV. Antimalarial activity of WR 122,455 (a 9-phenanthrenemethanol) in vivo and in vitro. Ann Trop Med Parasitol 1976; 70(3): 259-70. <https://doi.org/10.1080/00034983.1976.11687122>
17. Çavuş İ, Özbilgin A, Balcıoğlu İC. Sıtmada tedavi sürecinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile takibi: In vivo model. Mikrobiyol Bul 2021; 55(4): 603-16.
18. Gboeloh LB, Okon OE, Udoh SE. Antiplasmodial effect of *Anthocleista vogelii* on Albino mice experimentally infected with *Plasmodium berghei* (NK 65). J Parasitol Res 2014; 10: 1-6.
19. Rasoanaivo P, Ramanitrahasimbola D, Rafatro H, Rakotondramanana D, Robijaona B, Rakotozafy A, et al. Screening extracts of Madagascan plants in search of antiplasmodial compounds. Phytother Res 2004; 18(9): 742-7. <https://doi.org/10.1002/ptr.1533>
20. Senhaji O, Faid M, Elyachoui M. Antibiosis by cinnamon extracts against antibiotic resistant strains. Int J of Agri Biol 2005; 7(5): 724-8.
21. Parvazi S, Sadeghi S, Azadi M, Mohammadi M, Arjmand M, Vahabi F, et al. The effect of aqueous extract of cinnamon on the metabolome of *Plasmodium falciparum* using (1) HNMR spectroscopy. J Trop Med 2016; 2016: 3174841. <https://doi.org/10.1155/2016/3174841>
22. Nkanwen ERS, Awouafack MD, Bankeu JJK, Wabo HK, Mustafa SAA, Ali MS, et al. Constituents from the stem bark of *Cinnamomum zeylanicum* Welw. (Lauraceae) and their inhibitory activity toward *Plasmodium falciparum* enoyl-ACP reductase enzyme. Rec Nat Prod 2013; 7(4): 296-301.
23. Arianie I, Widodo İftitah ED, Warsito W. Natural isothiocyanate anti-malaria: Molecular docking, physico-chemical, adme, toxicity and synthetic accessibility study of eugenol and cinnamaldehyde. Int J App Pharm 2021; 13(6): 82-8. <https://doi.org/10.22159/ijap.2021v13i6.42292>

24. Volkow ND, Baler RD, Compton WM, Weiss SR. Adverse health effects of marijuana use. *N Engl J Med* 2014; 370(23): 2219-27. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1402309>
25. Crean RD, Crane NA, Mason BJ. An evidence based review of acute and long-term effects of cannabis use on executive cognitive functions. *J Addict Med* 2011; 5(1): 1-8. <https://doi.org/10.1097/ADM.0b013e31820c23fa>
26. Dao NV, Cuong BT, Ngoa ND, Thuy le TT, The ND, Duy DN, et al. Vivax malaria: Preliminary observations following a shorter course of treatment with artesunate plus primaquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101(6): 534-9.
27. Ahmed SA, Ross SA, Slade D, Radwan MM, Khan IA, ElSohly MA. Minor oxygenated cannabinoids from high potency *Cannabis sativa* L. *Phytochemistry* 2015; 117: 194-9. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.04.007>
28. Campos AC, Brant F, Miranda AS, Machado FS, Teixeira AL. Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine model of cerebral malaria. *Neuroscience* 2015; 289: 166-80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.051>
29. Akinola O, Ogbecbe EO, Olumoh-Abdul HA, Alli-Oluwafuyi AO, Oyewole AL, Amin A, et al. Oral ingestion of cannabis sativa: Risks, benefits, and effects on Malaria-infected hosts. *Cannabis Cannabinoid Res* 2018; 3(1): 219-27. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0043>
30. Joshua PE, Njoku UO, Anyaegbunam ZK, Ndefo JC, Ogara AL, Cosmas S, et al. Evaluation of inhibitory effect of a cannabidiol derivative against the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Indo Am J P Sci* 2019; 6(7): 13510-20. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3344821>
31. Grande EN, Sanchez AR, Sanchez FR. The treatment of malaria with tetracycline. *Antibiotic Med Clin Ther* 1956; 3(3): 193-6.
32. Yeh E, DeRisi JL. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology* 2011; 9(8): e1001138. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001138>
33. Held J, Zanger P, Issifou S, Kreamsner PG, Mordmüller B. In vitro activity of tigecycline in *Plasmodium falciparum* culture-adapted strains and clinical isolates from Gabon. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(6): 587-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.02.003>
34. Starzengruber P, Thriemer K, Haque R, Khan WA, Fuehrer HP, Siedl A, et al. (2009). Antimalarial activity of tigecycline, a novel glycylycylcine antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(9): 4040-2. <https://doi.org/10.1128/AAC.00312-09>
35. Sahu R, Walker LA, Tekwani BL. In vitro and in vivo anti-malarial activity of tigecycline, a glycylycylcine antibiotic, in combination with chloroquine. *Malar J* 2014; 13: 414. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-414>
36. Koehne E, Kreidenweiss A, Adegbite BR, Manego RZ, McCall M, Mombo-Ngoma G, et al. In vitro activity of eravacycline, a novel synthetic halogenated tetracycline, against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Glob Antimicrob Resis* 2021; 24: 93-7. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.024>
37. de Carvalho LP, Groeger-Otero S, Kreidenweiss A, Kreamsner PG, Mordmüller B, Held J. Boromycin has rapid-onset antibiotic activity against asexual and sexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 11: 802294. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.802294>