

Ticari Doğal Aktif Bileşenlerin Sıtma Tedavisindeki Etkinliğinin Araştırılması

Investigation of the Efficacy of Commercial Natural Active Ingredients in Malaria Treatment

Ahmet Özbilgin*[ⓧ], Yener Özel**[ⓧ], İbrahim Çavuş*[ⓧ]

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

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

Atf/Cite as: Özbilgin A, Özel Y, Çavuş İ. Ticari doğal aktif bileşenlerin sıtma tedavisindeki etkinliğinin araştırılması. Turk Mikrobiyoloji Cemiy Derg. 2024;54(1):15-23.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, çeşitli biyolojik aktiviteleri yanında, güçlü antimikrobiyal etkinlikleri gösterilmiş olan kafeik asit, oleik asit ve oleuropein'in in vitro sitotoksik aktivitesi ve in vivo antimalaryal etkinliğinin sıtma modelinde araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda, kafeik asit, oleik asit, oleuropein, klorokin ve tedavi almayan grup olmak üzere her bir grupta beşer fare den toplam beş grup oluşturulmuştur. Tüm farelere 2.5×10^7 parazit/mL Plasmodium berghei ile enfekte eritrosit süspansiyonu intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Belirlenen dozlardaki etken maddeler farelere oral yol ile dört gün testine uygun olarak verilmiş ve farelerdeki parazitemi durumu farelerin kuyruk ucundan alınan kandan yapılan yayma preparatları ile 27 gün boyunca kontrol edilmiştir.

Bulgular: Tedavi almayan gruptaki farelerin ortalama parazitemi yüzdesi dokuzuncu gün %33, kafeik asit grubu farelerin 25. gün %30.8, oleik asit grubu farelerin 11. gün %28.6, oleuropein grubu farelerin 11. gün %31.2 olarak saptanmıştır. Kafeik asit grubu farelerin tedavi almayan gruptaki farelere göre yaşam süresinin 16 gün uzadığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubu farelerde deney süresi boyunca yapılan Giemsa boyalı ince yayma preparatlarında parazite rastlanmamıştır.

Sonuç: Özellikle kafeik asit olmak üzere üç etken maddenin de in vivo fare modelinde parazit gelişimini baskıladığı ve farelerin yaşam süresini uzattığı tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, söz konusu etken maddelerin yeni nesil antimalaryaller olarak daha kapsamlı çalışılması için literatüre önemli katkılar sunacaktır.

Anahtar kelimeler: Antimalaryal, kafeik asit, oleik asit, oleuropein, in-vivo, sıtma

ABSTRACT

Objective: In the present study, in vitro cytotoxic activities and in vivo antimalarial efficacies of caffeic acid, oleic acid, and oleuropein, which have shown strong antimicrobial activities, were aimed to be investigated in a malaria model, along with various biological activities.

Methods: We established five groups, each with five mice: first, second, third and fourth groups were given caffeic acid, oleic acid, oleuropein, and chloroquine, respectively, while the fifth served as an untreated control. All mice were intraperitoneally infected with the suspension having 2.5×10^7 parasites/mL of Plasmodium berghei-infected erythrocytes, followed by oral administration of active substances at specified doses for four days. Parasitemia was monitored for 27 days through blood smears obtained from the tail-tip.

Results: The average rates of parasitemia in the group of mice that did not receive any treatment was 33% on day 9, 30.8% for the caffeic acid group on day 25, 28.6% for the oleic acid group on day 11, and 31.2% for the oleuropein group on day 11. It was observed that the life span of the mice in the caffeic acid group extended for 16 days compared to the untreated control group. No parasites were found in the blood smears stained with Giemsa during the experiment in the control group of mice.

Conclusion: It was found that all three active ingredients, especially the caffeic acid, suppressed parasite development and extended the lifespan of mice in vivo. The data obtained from this study will make significant contributions to the literature for more comprehensive research on these active substances as next-generation antimalarial agents.

Keywords: Antimalarial, caffeic acid, oleic acid, oleuropein, in-vivo, malaria

Alındığı tarih / Received:

16.06.2023 / 16.June.2023

Kabul tarihi / Accepted:

09.11.2023 / 09.November.2023

Yayın tarihi / Publication date:

25.03.2024 / 25.March.2024

ORCID Kayıtları

A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

Y. Özel 0000-0001-6618-8251

İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146

✉ icvs26@yahoo.com

GİRİŞ

Sıtmanın destansı geçmişi, insanlık tarihinden eskiye dayanmaktadır⁽¹⁾. Bilim adamları, sıtmanın öncelikle Afrika'nın Etiyopya bölgesinde bulunan primatlarda ortaya çıktığını ve sonra insanlar arasında yayıldığını göstermiştir. Sıtma, Nil Vadisi'nden Akdeniz Bölgesi'ne, daha sonra Asya'ya ve kuzeyde Avrupa'ya yayılarak farklı uygarlıklar üzerinde önemli bir rol oynamıştır⁽¹⁻³⁾.

Her 30 saniyede bir çocuğun sıtma nedeniyle hayatını kaybettiği dünyamızda küresel olarak 92 ülkede tahminen 3.4 milyar insanın sıtma ile enfekte olduğu ve 1.1 milyar kişinin ise yüksek risk altında olduğu tahmin edilmektedir. 2022 Dünya Sıtma Raporu'na göre, 2021 yılında küresel olarak 247 milyon sıtma vakası ve yaklaşık 619.000 sıtma kaynaklı ölüm görülmüştür. Aynı raporda, Türkiye'de 2010 yılından 2019 yılına kadar yerli vaka görülmediği bildirilmiştir. Rapor edilen yurt dışı kaynaklı sıtma vakaları 2019 yılında 277 ve 2020 yılında 133 olarak belirtilmiştir⁽⁴⁾.

Antimalaryal ilaçlara karşı gelişmekte olan direnç sorunu, küresel sıtma kontrolü için tehdit olmaya devam etmektedir. Bu tehdit karşısında 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü, "Küresel Sıtmayı Ortadan Kaldırma Vizyonu"nu yeniden onaylamış ve 2016-2030 yılları arasında yerel, ulusal ve bölgesel çabalara rehberlik edecek Küresel Teknik Stratejiler adında bir çerçeve protokol yayınlamıştır⁽⁵⁾. Temel strateji; sıtma tanı ve tedavisine evrensel erişim, mümkün olduğunda ortadan kaldırmaya yönelik hızlandırma, gelişmiş gözetim, sürekli araştırma, yenilik, altyapı ve kapasite geliştirme yatırımlarına odaklanmıştır. "Küresel Teknik Stratejiler" protokolü, 2020 yılına kadar sıtma mortalitesi ve vaka insidansında %40, 2030 yılına kadar ise %90 oranında azalma hedeflemiştir⁽⁵⁾. Ancak son veriler, bu hedefin karşılanmayacağını göstermektedir^(6,7). Sıtma kontrolüne yönelik tehditler arasında, ilaca dirençli parazitlerin ortaya çıkması ve yayılması bulunmaktadır. Parazit genomu ve çoklu ilaca dirençli sıtmanın tanımlanması, ilaç geliştirilmesi, hastaların izlenmesi, kontrol altına alınması ve tedavi edilmesi için çok uluslu iş birliklerinden yararlanılması gerekmektedir^(8,9).

Özellikle artan direnç sorununa karşın alternatif ilaç adayı moleküllerin belirlenmesi ve bunların antimalaryal kapasitelerinin araştırılması zorunluluk arz etmektedir. Bu çalışmada, *Plasmodium berghei* ile oluşturulmuş *in vivo* fare modelinde ticari doğal aktif bileşenlerden kafeik asit (CAF), oleik asit (OLA) ve oleuropein (OLE)'in sitotoksik aktivitesi ve antimalaryal etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma; Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (22.03.2022 tarih ve 77.637.435/227 sayı) onaylanmıştır.

Ticari doğal aktif bileşenler: Bu çalışmada, zeytin bitkisinin ana bileşenlerinden olan oleuropin (Sigma 12247) ve oleik asit (Sigma 01383) ile fenolik bileşenlerden biri olan kafeik asit (Sigma C0625) kullanıldı.

Sitotoksik aktivite testi: OLE, OLA ve CAF'ın sitotoksik aktivite testlerinde L929 fare fibroblast hücre hattı kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda kullanılarak MTT [3-(4.5-dimetiltiyazol-2-yl)-2.5-difeniltetrazolyum bromit] yöntemi ile sitotoksik aktiviteleri belirlendi⁽¹⁰⁾.

Deney hayvanları ve parazit: Erkek 20-25 g ağırlığında, 2-4 aylık Balb/C cinsi fareler kullanıldı. Deney hayvanları ortama alışmaları için oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüde bir hafta tutuldu. Antimalaryal testler için klorokine duyarlı *P. berghei* ANKA suşu kullanıldı.

Deney hayvanı grupları ve uygulanan dozlar: Deney hayvanları rastgele beş gruba (tedavi almayan, klorokin tedavisi alan ve üç test grubu) ayrıldı. Her grup beş deney hayvanından oluşturuldu. Kontrol gruplarından, tedavi almayan gruba serum fizyolojik, tedavi grubuna ise 50 mg/kg klorokin verilirken, etken madde gruplarına ön çalışmalar ile farelerin tolere edebildiği (kusma ve kasılmaların olmadığı) dozun yarısı tarama dozu olarak belirlenerek CAF grubuna 20 mg/kg, OLA grubuna 320 mg/kg ve OLE grubuna ise 2 mg/kg etken madde oral yoldan verildi^(11,12).

Deney hayvanlarının enfeksiyonu: Donör farelerdeki parazitemi oranı tespit edildikten sonra servikal dislokasyon yapılarak bu fareler sakrifiye edildi. Koltuk altı veni kesilerek %0.5 trisodyum sitrat içeren tüpe toplanan kanın parazitemi oranı serum fizyolojik ile 2.5×10^7 parazit/mL konsantrasyonda olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra tüm farelere intraperitoneal (IP) olarak 0.1 mL verildi⁽¹³⁾.

Antimalaryal aktivitenin belirlenmesi

Dört gün testi: Etkin maddelerin *in vivo* antimalaryal etkinliği, Porter ve Peters tarafından tarif edilen "4 gün testi" ile araştırıldı. Farelere (0. gün) enfeksiyondan iki saat sonra ilk doz tedavileri verildi. Daha sonra 24., 48. ve 72. saatlerde diğer dozlar uygulandı. Son tedavinin verildiği günden itibaren farelerin kuyruk ucundan kan alındı ve ince yayma preparatlar yapılarak Giemsa ile boyandı⁽¹⁴⁾.

Parazitemi oranının belirlenmesi: Deney gruplarındaki farelerin parazitemi oranı, iki gün arayla farelerin kuyruk ucu veninden alınan kandan hazırlanan ince yayma preparatların mikroskop altında incelenmesi ile değerlendirildi. Parazitemi takibi 27 gün boyunca tarif edildiği şekilde hesaplanarak her gruptaki her bir fare için ayrı ayrı kaydedildi. Her bir ince yayma preparatında en az on farklı alanda enfekte eritrositler sayılarak % parazitemi oranları aşağıdaki formüle ile hesaplandı⁽¹⁵⁾.

$$\% \text{ Parazitemi (\% P)} = \frac{\text{Enfekte eritrosit (ERT) sayısı}}{\text{Enfekte ERT sayısı} + \text{enfekte olmayan ERT sayısı}} \times 100$$

İstatiksel analiz: İstatistiksel analizler Sidak's Multiple Comparisons yöntemi ile yapıldı. p değeri 0.05'ten küçük olduğunda yapılan istatistiksel değerlendirme anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

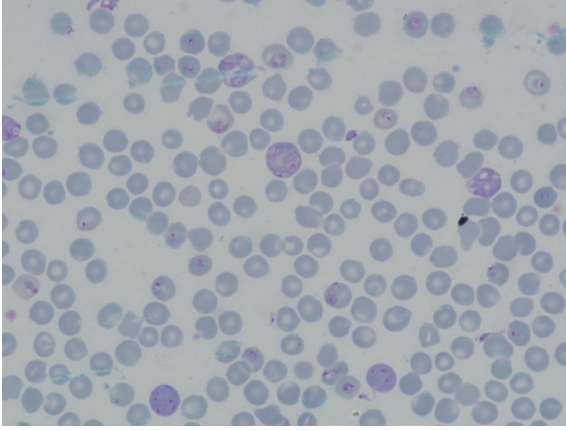
Sitotoksik aktivite: Sitotoksik aktivite testi sonucunda CAF için EC_{50} (Yarım maksimal etkili konsantrasyon) 70 μM , OLE için EC_{50} 149 μM ve OLA için EC_{50} >200 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır. Etkin maddelerin LC (öldürücü

konsantrasyon)'leri ise CAF ve OLE için >800 μM , OLA için ise >200 $\mu\text{g/mL}$ olarak değerlendirilmiştir.

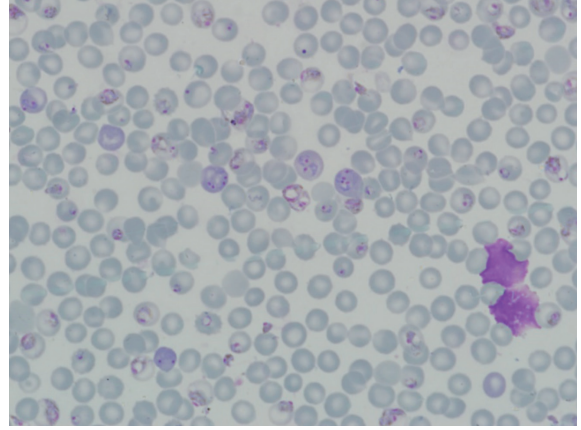
Antimalaryal aktivitenin belirlenmesi: Uygulanan dört gün testi sonucunda tedavi almayan gruptaki farelerin üçüncü gün yapılan ince yayma preparatlarında ortalama %5 oranında parazitemi tespit edilmiştir. Beşinci günde ortalama %7.4, yedinci günde %14.6 ve dokuzuncu günde ortalama %33 oranında parazitemi saptanmıştır. Tedavi almayan grupta yer alan farelerin dokuzuncu günde fiziksel durumlarının kötüleştiği gözlenmiştir. Bu gruptaki tüm farelerin tüylerinin dikensi ve kirli, kuyruk ve kulaklarının anemik, solunumlarının hızlı ve hareketlerinin yavaş olduğu görülmüştür. Dokuzuncu günün akşamında farelerin dördü, 10. günde ise sonuncusu ölmüştür. Klorokin tedavisi alan kontrol grubunda üçüncü günden itibaren 27. güne kadar yapılan incelemelerin hiçbirinde enfekte eritrosit görülmemiştir. Bu gruptaki farelerin tamamı deney süresi boyunca canlı kalmıştır.

CAF grubunda yer alan farelerin tamamında dokuzuncu güne kadar hiç enfekte eritrosit görülmemiştir. 11. gün yapılan yaymalarda tüm farelerde ortalama %1.6 (%1-3) oranında parazitemi tespit edilmiştir. Diğer günlerde yapılan ince yaymalarda parazitemi oranı giderek artmaya başlamış ve 13. günde ortalama %5.4, 15. günde ortalama %7.8, 17. günde ortalama %11.6, 19. günde ortalama %19, 21. günde ortalama %23.4 ve 25. günde ise ortalama %30.8 oranında parazitemi saptanmıştır. 25. günün akşamında grupta yer alan farelerin ikisi, 26. günde ise diğer üçü ölmüştür. Yaşam süresi açısından değerlendirildiğinde, CAF grubundaki farelerin yaşam süresinin tedavi almayan farelere göre 16 gün daha uzun olduğu görülmüştür.

OLA grubundaki farelerin ince yaymalarında üçüncü günde ortalama %2.6, beşinci günde ortalama %5.6, yedinci günde ortalama %9.6, dokuzuncu günde ortalama %17.2 ve 11. günde ise %28.6 enfekte eritrosit görülmüştür. 11. günün gecesinde fiziksel görünümü kötüleşen farelerden üç tanesi, 12. günde ise diğer ikisi ölmüştür. Grubun yaşam süresinin tedavi almayan gruba göre iki gün uzadığı saptanmıştır (Resim 1-2).



Resim 1. Kafeik asit grubu, Giemsa boyalı ince yayma preparatı (100X)



Resim 2. Oleik asit grubu, Giemsa boyalı ince yayma preparatı (100X)

OLE grubundaki farelerin ince yaymalarında üçüncü günde ortalama %4.8, beşinci günde ortalama %6.4, yedinci günde ortalama %14.4, dokuzuncu günde ortalama %21.8 ve 11. günde ise %31.2 oranında enfekte eritrosit görülmüştür. 11. günün gecesinde fiziksel görünümü kötüleşen farelerden dört tanesi, 12. günde ise sonucusu ölmüştür. Grubun yaşam süresinin tedavi almayan grubuna göre iki gün daha uzundur (Tablo 1).

Tablo 1. Etken madde gruplarının ortalama % parazitemi oranları

Gün	CAF (%)	OLA (%)	OLE (%)	KG (%)	TAG (%)
3	0	2.6	4.8	0	5
5	0	5.6	6.4	0	7.4
7	0	9.6	14.4	0	14.6
9	0	17.2	21.8	0	33
11	1.6	28.6	31.2	0	Eks
13	5.4	Eks	Eks	0	Eks
15	7.8	Eks	Eks	0	Eks
17	11.6	Eks	Eks	0	Eks
19	19	Eks	Eks	0	Eks
21	23.4	Eks	Eks	0	Eks
23	27.2	Eks	Eks	0	Eks
25	30.8	Eks	Eks	0	Eks
27	Eks	Eks	Eks	0	Eks

CAF: kafeik asit, OLA: oleik asit, OLE: oleuropein, KG: kontrol grubu, TAG: tedavi alan grup.

İstatistiksel analiz: Klorokin tedavisi alan grup CAF grubunun paraziteminin görülmediği ilk dokuz günü ile kıyaslandığında parazitemi oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Ancak CAF grubunun dokuzuncu günden ve OLA ve OLE gruplarının ise üçüncü günden sonraki parazitemi oranları klorokin tedavisi alan gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Tedavi almayan grup ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, klorokin tedavisi alan grup ile tüm günlerde parazitemi oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). CAF grubu ile dokuzuncu güne kadar parazitemi oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). OLA grubu ile üçüncü ve beşinci günde parazitemi oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değil iken ($p>0.05$), yedinci ve dokuzuncu günlerde ise istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). OLE grubu ile üçüncü, beşinci ve yedinci günlerde parazitemi oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değil iken ($p>0.05$), dokuzuncu günde ise istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Etken madde grupları birbiri ile kıyaslandığında, CAF grubundaki parazitemi oranı 11. güne kadar OLA ve OLE gruplarından farklı ($p<0.05$) bulunmuştur. OLA ve OLE gruplarının parazitemi oranları ise 11. güne kadar benzer bulunmuştur ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Geliştirilen ve kullanıma giren birçok ilaç doğal ürünlerden ve bunların türevlerinden elde edilmiştir^(16,17). Geçmişten günümüze bitkiler, hayvanlar ve mineraller hastalıkların tedavisinde önemli doğal bileşiklerin temeli olmuştur⁽¹⁷⁾. Çeşitli kültürlerde sıtma tedavisi için kullanılan bitkiler yeni ilaçların geliştirilmesi için önemli bilgilerin elde edilmesini sağlamıştır. Geleneksel tıptan kaynak alan ve geliştirilen kına kına ağacının kabuğundan elde edilen kinin ve ateş düşürücü olarak kullanılan *Artemisia annua*'dan elde edilen artemisinin, günümüzde kullanılmaya devam edilen en etkili sıtma ilaçlarından biridir⁽¹⁸⁾.

CAF literatürde sıklıkla çeşitli kanser hücre hatları üzerinde çalışılmış ve antikanser etkisine yönelik veriler elde edilmiştir⁽¹⁹⁾. OLA, tekli doymamış bir cis-9-oktadesenoik asittir⁽²⁰⁾. Birçok çalışma OLA'nın, sitotoksik ilaçlarla sinerjik etkileşim gösterdiği ve bu ilaçların antitümör etkisini artırdığını bildirmektedir^(21,22). OLE, hidroksitirozol, elenolik asit ve bir glikoz molekülünden oluşan fenolik bir bileşik olup zeytin yaprağında en yüksek oranda bulunan biyoaktif bileşendir⁽²³⁾. Bazı araştırmalarda OLE antibakteriyel etkinliği gösterilmiş olup gram pozitif bakteriler üzerindeki etkisinin, gram negatif bakteriler üzerindeki etkisinden daha güçlü olduğu bulunmuştur. Bu durum hücre yapılarındaki farklılıklarla ilişkilendirilmektedir^(24,25).

Suberu ve ark.⁽²⁶⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, *Artemisia annua* L. *aqueous* ekstratında bulunan bileşenlerin antimalaryal etkinliği *in vitro* olarak araştırılmıştır. Ekstratın GC-MS analizinde tespit edilen bileşenlerden biri de CAF'tır ve *Plasmodium falciparum*'un HB3 (klorokin duyarlı) ve Dd2 (klorokin dirençli) suşlarına karşı IC₅₀ (Yarım maksimum inhibitör konsantrasyonu) değeri sırasıyla 60.4 µM ve 47.5 µM olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada artemisinin ve CAF kombinasyonu dama tahtası (checkerboard) yöntemi ile araştırılmış ve iki bileşik arasında antagonistik bir ilişki tespit edilmiştir. Araştırmacılar, CAF'ın tek başına antimalaryal etkinlik göstermesine rağmen artemisinin ile antagonistik ilişki sergilemesini,

CAF'ın güçlü antioksidan özelliklere sahip olması ile açıklamış ve elde ettikleri bu verinin literatürde yer alan birkaç çalışma ile de desteklendiğini bildirmişlerdir^(27,28). Degotte ve ark.⁽²⁹⁾ tarafından *in vitro* ortamda yapılan benzer bir çalışmada, *P. falciparum*'a karşı, CAF ve ester türevlerinin IC₅₀ değerlerinin 16-241 µM arasında değiştiği, ester türevlerinin CAF'a kıyasla daha güçlü antimalaryal etkinlik ve insan hücrelerine karşı seçicilik gösterdiği bildirilmiştir. Denenen moleküllerin antimalaryal etkinlik göstermesi ve insan hücrelerine karşı seçici olması nedeniyle bu moleküllerin alternatif ilaç adayı olabileceği ifade edilmiştir. Fordjour ve ark.⁽³⁰⁾ *in vitro* kültür yöntemi ile CAF, rosmarinik asit, klorojenik asit, o-kumarik asit, ferulik asit, gallik asit ve protokatekuik asitin *P. falciparum*'un 3D7 suşuna karşı antimalaryal aktivitesini araştırmış ve test edilen fenolik asitler arasında, CAF ve gallik asitin, sırasıyla 17.73 µg/ml ve 26.59 µg/ml ortalama IC₅₀ değeri ile en güçlü etkinliğe sahip olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, doğal fenolik bileşiklerin, kayda değer düzeyde antimalaryal aktiviteye sahip olduğunu ve bu bileşikler açısından zengin doğal gıda ürünlerinin tüketilmesinin sıtma profilaktik etki sağlayabileceğini ifade etmiştir. Cardona-G ve ark.⁽³¹⁾ S-allylCysteine Ester ve CAF birleşimine dayalı hibrit moleküller sentezlemiş ve bunların dördünü *Trypanosoma cruzi* ve *P. falciparum*'a karşı etkinliğini *in vitro* ortamda araştırmışlardır. Hibrit 6 molekülü, 5.45 µM EC₅₀ değeri ile *T. cruzi*'ye karşı iyi aktivite sergilerken, hibrit üç molekülü, 18.08 µM EC₅₀ değeri ile *P. falciparum*'a karşı güçlü antimalaryal etkinlik göstermiştir. Alson ve ark.⁽³²⁾ CAF ve türevlerinin *in vitro* ve *in vivo* ortamda antimalaryal etkinliğini araştırmıştır. *P. falciparum* 3D7 (klorokin duyarlı) suşuna karşı *in vitro* ortamda CAF'ın etil, izopropil ve metil esterlerinin yaklaşık 20 µM IC₅₀ değerleri ile güçlü antimalaryal etkinliğe sahip olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, *P. berghei* ile oluşturulan sıtma modelinde ise etkili bulunan bu üç molekülü araştırmış ve 100 mg/kg dozda %55 parazit inhibisyonu ile CAF'ın etil esterinin en güçlü antimalaryal etkinliğe sahip olduğunu ve şizogonik döngünün ilk altı saatinde, artemisine benzer şekilde parazitin halka ve genç trofozoit formlarına karşı etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Söz konusu çalışmada, etil ester türevinin CAF'tan daha güçlü antimalaryal aktivite göstermesinin, ester türevlerinin lipofilik

karacterinin yüksek olması ile ilişkili olarak hücre içi hedeflere ulaşma yeteneği ile açıklanabileceği ifade edilmiştir.

OLA'nın antiparaziter etkinliğine yönelik literatürde sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır. Anwar ve ark.⁽³³⁾ 2019 yılında oleik asit ve oleik asit-gümüş nanopartikül kompleksinin protozoon bir parazit olan *Acanthamoeba castellanii*'ye karşı güçlü anti-amibik etkinliği olduğu bildirilmiştir. OLA ile yapılan güncel bir çalışmada, anemi modeli oluşturularak OLA'nın eritrosit apoptozunu engellediği ve hemoglobini koruduğu bildirilmiştir⁽³⁴⁾. Sıtma enfeksiyonunda en çok etkilenen hücreler eritrositler olup, hastalığın en önemli klinik bulgusu parazitlerin eritrositleri parçalaması ile oluşan anemidir. Çalışmamızda OLA, TAG grubu ile kıyaslandığında parazite karşı etkili bulunmamıştır ancak TAG grubunda parazitemi seviyesinin en yüksek düzeye çıktığı dokuzuncu günde ortalama parazitemi %33 iken, OLA grubunda parazitemi oranı %17.2 olarak saptanmıştır. Farelerin yaşam süreleri de TAG grubuna göre iki gün uzamıştır. OLA'nın, kontrol grubu ile kıyaslandığında parazit gelişimini belirli bir süre baskıladığı gözlenmiştir. Bu durum OLA'nın parazite karşı direkt etkisinden ziyade anti-inflamatuar özelliğinin klinik sunuma yansımından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

OLE, zeytin (*Olea europaea L.*) ağacının farklı kısımlarındaki başlıca biyoaktif bileşendir. OLE'nin nöroprotektif rolü için apoptoz ve otofajinin indüklenmesi, serebral bölgenin antioksidan havuzunun artırılması, mikroglia hücrelerini ve astrositleri deaktif ederek proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin gereksiz salınımının azaltılması ve böylece nöroinflamasyonun oluşumunun önlenmesi gibi çeşitli mekanizmalar bildirilmiştir. Düzenli OLE alımı, alzheimer, parkinson, felç, depresyon, anksiyete ve epilepsi dahil olmak üzere sinirsel bozukluk risklerinin azalması ile ilişkili görünmektedir⁽³⁵⁾. OLE, matriks metalloproteinazlar (MMP) adı verilen bir molekül sınıfının aktivitesini ve üretimini azaltır. Aşırı MMP aktivitesi, hücreleri birbirine kenetleyen jel benzeri matriksi sıvılaştırarak damar endotelini plak hasarına karşı kademeli olarak savunmasız hale getirir. Zeytin bitkisinde

bulunan polifenol bileşikler arteriyel plak oluşumunu iki şekilde önler. İlk olarak, plak oluşumuna neden olan bir dizi "yapışma molekülünün" (beyaz kan hücreleri ve trombositler) aktivitesini ve üretimini azaltırlar⁽³⁶⁾. Bu maddeler arter duvarlarına yapışarak erken plak oluşumuna neden olur. İkinci olarak, trombosit agregasyonunu azaltırlar, bu da plak bölgelerinde kalp krizi veya felce neden olacak küçük pıhtıların oluşma olasılığını azaltır⁽³⁷⁾. Ayrıca OLE'nin antimikrobiyal etkinliğine yönelik literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır⁽³⁸⁾ ancak antimalaryal etkinliğine ilişkin veriler sınırlıdır. Ilıkçı Sağkan ve ark.⁽³⁹⁾ 2022 yılında yapılan bir çalışmada, OLE'nin protozoon bir parazit olan *Leishmania tropica* izolatına karşı etki mekanizması araştırılmış ve *L. tropica* promastigotlarında, proliferasyonu inhibe ettiği, apoptotik hücre ölümünü indüklediği, mitokondri membran potansiyelini değiştirdiği ve reaktif oksijen radikalleri salınımına sebep olduğu gösterilmiştir. OLE'nin plak oluşumunu engelleyici etkisi ve nöroprotektif özellikleri yanı sıra güçlü antioksidan ve antimikrobiyal etkinliklerinin de gösterilmesi antimalaryal etkinliğinin araştırılması açısından önemli bulunmuştur. Bu hipotezden yola çıkarak OLE'nin antimalaryal aktivitesi araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler, OLE'nin farelerde antimalaryal aktivitesinin zayıf olduğunu göstermektedir. Ancak TAG grubunun dokuzuncu gününde ortalama parazitemi %33 iken, aynı gün OLE grubunda paraziteminin %21.8 olduğu ve farelerin yaşam süresinin de TAG grubuna kıyasla iki gün uzadığı gözlenmiştir. Bu açıdan, OLE, sıtma parazitine karşı güçlü etkinlik göstermese de parazitin neden olduğu klinik sunumu olumlu yönde etkilediği düşünülmüştür.

Bu çalışmada, antimalaryal etkinliği *in vivo* sıtma modelinde araştırılan CAF, OLA ve OLE bileşenlerinden en güçlü antimalaryal etkinlik CAF için tespit edilmiştir. CAF grubunda 11. günde ortalama %1.6 oranında parazitemi görülmeye başlanmış, en yüksek parazitemi oranı 25. günde ortalama %30.8 olarak saptanmış ve 27. günde fareler ölmüştür. CAF grubunda bulunan farelerin yaşam süresinin tedavi almayan gruba göre 16 gün uzadığı görülmüş, CAF'ın parazitemi baskıladığı ve antimalaryal etkinliğe sahip olduğu saptanmıştır. Literatürde yer alan az

sayıdaki çalışma incelendiğinde bizim çalışmamızla da uyumlu sonuçlar alındığı görülmüş ve CAF'ın potansiyel bir antimalaryal ilaç adayı olabileceği kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak, yeni moleküllerin geliştirilmesi, mevcut moleküllerde yapısal değişimlerin yapılması, ilaç etki mekanizmasının daha net aydınlatılması, yeni kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesi ve bitki bazlı doğal aktif bileşenlerden yeni antimalaryal ilaçların geliştirilmesi artan direnç nedeniyle büyük önem kazanmaktadır.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (22.03.2022 tarih ve 77.637.435/227 sayı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2022-078 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Manisa Celal Bayar University, Animal Research Ethics Committee (03.22.2022; 77.637.435/227).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: Manisa Celal Bayar University Scientific Research Coordination Office with project number 2022-078.

KAYNAKLAR

- Schlagenhauf P. Malaria: From prehistory to present. *Infect Dis Clin North Am.* 2004;18(2):189-205. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.01.002>
- Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):595-612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002>
- Earle DP. Presidential address: a history of malaria and its ironies. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1979;90:1-26.
- World Health Organization (WHO). World malaria report. WHO, 2022. [<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>] (Erişim Tarihi: 15.Haziran.2023).
- World Health Organization (WHO). Global technical strategy for malaria 2016-2030. WHO, 2021. [<https://www.who.int/publications/i/item/9789240031357>] (Erişim Tarihi: 15.06.2023)
- Hogan AB, Jewell BL, Sherrard-Smith E, et al. Potential impact of the COVID-19 pandemic on HIV, tuberculosis, and malaria in low-income and middle-income countries: a modelling study. *Lancet Glob Health.* 2020;8(9):e1132-41. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30288-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30288-6)
- Sherrard-Smith E, Hogan AB, Hamlet A, et al. The potential public health consequences of COVID-19 on malaria in Africa. *Nat Med.* 2020;26(9):1411-6. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1025-y>
- Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2014;371(5):411-23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314981>
- Abdulla S, Ashley EA, Bassat Q, et al. Baseline data of parasite clearance in patients with falciparum malaria treated with an artemisinin derivative: an individual patient data meta-analysis. *Malar J.* 2015;14(1):359. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0874-1>
- Güler E, Özbilgin A, Çavuş İ, ve ark. Kuzey Kıbrıs'ta yetişen bitkilerden elde edilen oçucu yağlarda *Leishmania tropica*'ya karşı in vitro anti-leishmanial etkinlik araştırması. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2021;45(2):101-7. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.6888>
- Ch'ng JH, Lee YQ, Gun S, et al. Validation of a chloroquine-induced cell death mechanism for clinical use against malaria. *Cell Death Dis.* 2014;5(6):1305. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.265>
- Melariri P, Campbell W, Etusim P, Smith P. In vitro and in vivo antimalarial activity of linoleic and linoleic acids and their methyl esters. *Adv Stud Biol.* 2012;4(7):333-49.
- Ryg-Cornejo V, Ioannidis LJ, Hansen DS. Isolation and analysis of brain-sequestered leukocytes from *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice. *J Vis Exp.* 2013;71:50112. <https://doi.org/10.3791/50112>
- 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>
- Misganaw D, Engidawork E, Nedi T. Evaluation of the anti-malarial activity of crude extract and solvent fractions of the leaves of *Olea europaea* (Oleaceae) in mice. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):171. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2567-8>

16. Patwardhan B, Vaidya AD, Chorghade MS. Ayurveda and natural products drug discovery. *Cur Sci.* 2004;86(6):789-99.
17. Lahlou M. Screening of natural products for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2007; 2(5):697-705.
<https://doi.org/10.1517/17460441.2.5.697>
18. Rasoanaivo P, Ramanitrahasimbola D, Rafatro H, 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>
19. Hernandez LC, Machado ART, Tuttis K, et al. Caffeic acid and chlorogenic acid cytotoxicity, genotoxicity and impact on global DNA methylation in human leukemic cell lines. *Genet Mol Biol.* 2020;43(3):e20190347.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0347>
20. Engelbrecht TN, Schroeter A, Hauss T, Neubert RH. Lipophilic penetration enhancers and their impact to the bilayer structure of stratum corneum lipid model membranes: neutron diffraction studies based on the example oleic acid. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1808(12):2798-806.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.08.012>
21. Menéndez JA, Barbacid MM, Montero S, et al. Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur J Cancer.* 2001;37(3):402-13.
[https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(00\)00408-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(00)00408-1)
22. Carrillo C, Cavia MM, Alonso-Torre SR. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: a review. *Nutr Hosp.* 2012;27(6):1860-5.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.04.040>
23. Hassen I, Casabianca H, Hosni K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation-A mini-review. *J Func Foods.* 2015;18:926-40.
<https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.09.001>
24. Liu Y, McKeever LC, Malik NSA. Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2017;8:113.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00113>
25. Sanchez JC, Alsina MA, Herrlein MK, Mestres C. Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *Colloid Polym Sci.* 2007;285(12):1351-60.
<https://doi.org/10.1007/s00396-007-1693-x>
26. Suberu JO, Gorka AP, Jacobs L, et al. Anti-plasmodial polyvalent interactions in *Artemisia annua* L. aqueous extract - Possible synergistic and resistance mechanisms. *PLoS One.* 2013;8(11):e80790.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080790>
27. Cui L, Wang ZL, Miao J, et al. Mechanisms of in vitro resistance to dihydroartemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2021;86(1):111-28.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08180.x>
28. Sidhu ABS, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA. Decreasing pfmdr1 copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis.* 2006;194(4):528-35.
<https://doi.org/10.1086/507115>
29. Degotte G, Bernard P, Frederich M, Pierre F. Potential of caffeic acid derivatives as antimalarial leads. *Lett Drug Des Discov.* 2022;19(9):823-36.
<https://doi.org/10.2174/1570180819666220202160247>
30. Fordjour PA, Adjimani JP, Asare B, Duah-Quashie NO, Quashie NB. Anti-malarial activity of phenolic acids is structurally related. *Research Square rs-21702* [Preprint]. 2020.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-21702/v1>
31. Cardona-G W, Robledo SM, Prieto LJ, Yepes AF. S-allylCysteine ester/caffeic acid amide hybrids as promising antiprotozoal candidates: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *Braz J Pharm Sci.* 2022;58:e20822.
<https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e20822>
32. Alson SG, Jansen O, Cieckiewicz E, et al. *In-vitro* and *in-vivo* antimalarial activity of caffeic acid and some of its derivatives. *J Pharm Pharmacol.* 2018;70(10):1349-56.
<https://doi.org/10.1111/jph.12982>
33. Anwar A, Abdalla SAO, Aslam Z, Shah MR, Siddiqui R, Khan NA. Oleic acid-conjugated silver nanoparticles as efficient antiamebic agent against *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res.* 2019;118(7):2295-304.
<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06329-3>
34. Banerjee A, Dey T, Majumder R, et al. Oleic acid prevents erythrocyte death by preserving haemoglobin and erythrocyte membrane proteins. *Free Radic Biol Med.* 2023;202:17-33.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.03.019>
35. Butt MS, Tariq U, lahtisham-UI-Haq, Naz A, Rizwan M. Neuroprotective effects of oleuropein: Recent developments and contemporary research. *J Food Biochem.* 2021;45(12):e13967.
<https://doi.org/10.1111/jfbc.13967>
36. Singh I, Mok M, Christensen AM, Turner AH, Hawley JA. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008;18:127-32.
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.09.001>

37. Dell'Agli M, Maschi O, Galli GV, et al. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. Br J Nutr. 2008;99:945-51. <https://doi.org/10.1017/S0007114507837470>
38. Topuz S, Bayram M. Oleuropein extraction from leaves of three olive varieties (*Olea europaea* L.): antioxidant and antimicrobial properties of purified oleuropein and oleuropein extracts. J Food Process Preserv. 2022;46:e15697. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15697>
39. Ilıkçı Sağkan R, Kaya İ, Akın B, Özen H, Bulduk İ, Özlem Çalışkan S. Oleuropein'in *Leishmania tropica* promastigotları üzerinde mitokondri membran potansiyeli ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuna etkisi. Mikrobiyol Bul. 2022;56(4):692-705. <https://doi.org/10.5578/mb.20229607>