

GİRİŞ VE AMAÇ

Çevrede oldukça yaygın olarak bulunan protozoonlar arasında olan *Acanthamoeba* türleri, insan vücuduna yerleşerek çeşitli hastalıklar meydana getirirler. Bu tür amipler, Granülomatöz Amibik Enfefalit (GAE), kutanöz acanthamoebiasis, *Acanthamoeba* keratiti ve AIDS’li hastalarda infeksiyonun çeşitli organlara yayılmasına bağlı olarak kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirirler (34, 43, 62).

Son yıllarda *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu infeksiyonların görülme sıklığı artmıştır. Özellikle, *Acanthamoeba* keratiti, 1980’li yıllara kadar çok nadir olarak görülürken, bu yıllardan sonra, yumuşak kontakt lens kullanımının yaygınlaşmasına bağlı olarak, bu hastalığın görülme sıklığı da çok artmıştır. *Acanthamoeba* keratiti, korneadaki travma, kontakt lens kullanımı, kontakt lenslerin kontamine lens solüsyonlarıyla temizlenmesi gibi etkilerle meydana gelen, kornea ile amibin direkt teması sonucu oluşmaktadır. İnfeksiyonda şiddetli oküler ağrı, yangı, görme bozukluğu ve halka şeklinde stromal infiltrasyon vardır. Tanısı çoğunlukla, kornea kazıntı materyalinin direkt incelenmesinde amibi saptayarak, bu materyalden etkeni üreterek ya da histopatolojik kesitlerde paraziti görerek konur. Tedavide çeşitli ilaçlar denenmiştir. Etkili olanlar arasında propamidine isethionate, ketoconazole, miconazole ve itraconazole sayılabilir. Bu hastalık tedavi edilmediğinde görmenin ya da gözün kaybı söz konusudur (29, 43, 64).

Deneysel olarak kemelerde oluşturduğumuz *Acanthamoeba* keratiti üzerine yaptığımız çalışmalarda temel amacımız; dünyada birçok ülkede sıkça görülen ve ülkemizde de son yıllarda yumuşak kontakt lens kullanımının artmasıyla görülme sıklığının artması muhtemel olan bu hastalığın klinik ve histopatolojik görünümünün nasıl olduğunu ve uyguladığımız tedavi protokolünün etkisini belirlemektir. Yaptığımız araştırmamızdaki temel noktalar:

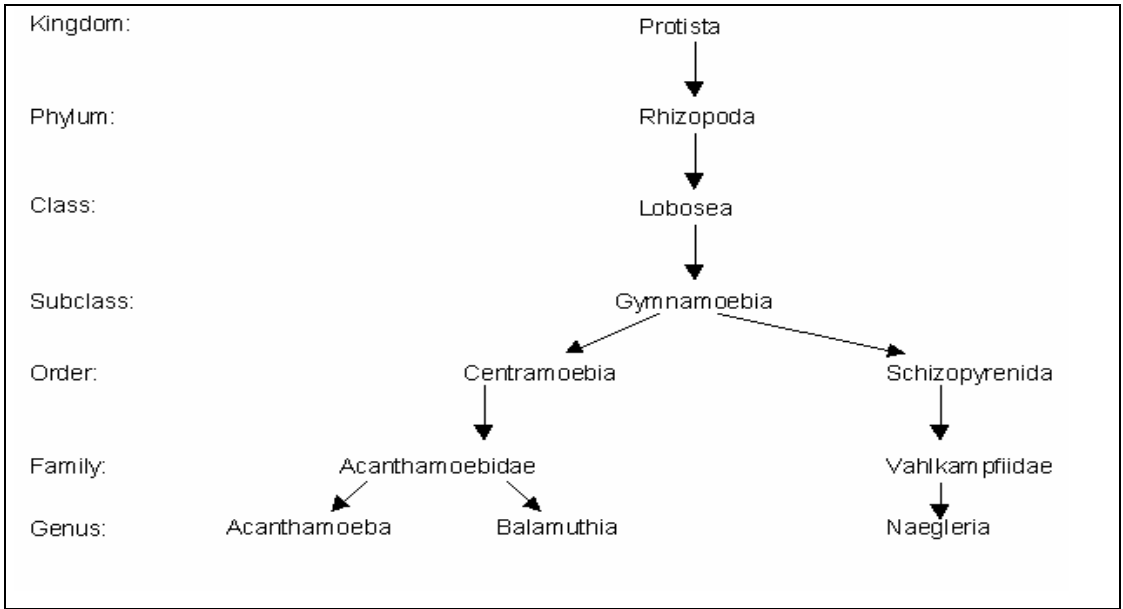
1. Viyana Üniversitesi, Medikal Parazitoloji bölümünden elde ettiğimiz *Acanthamoeba* türlerinin, önce üzerine bakteri sürülmüş, besleyici değeri olmayan agar ortamında monoksenik kültürlerinin, daha sonra ise sıvı besiyerinde aksenik kültürlerinin elde edilmesi;
 2. Besiyerinde üretilen amiplerin canlı olarak ve boyanarak incelenmesi;
 3. Keme gözleri, *A. castellanii* ile infekte edilip, inokülasyondan sonra, her hafta bir keme gözünden histopatolojik kesitler hazırlayarak, 12 hafta boyunca histopatolojik gelişimin takip edilmesi;
 4. *A. castellanii* ve *A. hatchetti* ile infekte edilen keme gruplarında, karşılaştırmalı olarak, amiplerin keratit yapma yeteneklerinin incelenmesi;
 5. *A. castellanii* ve *A. hatchetti* ile infekte keme gözlerinde keratit oluştuktan sonra, bunun neomycin-polymyxin B-gramicidin (neosporin) ve %0.002'lik cholorhexidine solüsyonu ile tedavi edilmesi ve tedaviye cevaplarının karşılaştırmalı olarak incelenmesi;
- olarak belirlenmiştir

GENEL BİLGİLER

ACANTHAMOEBEA CİNSİ AMİPLER

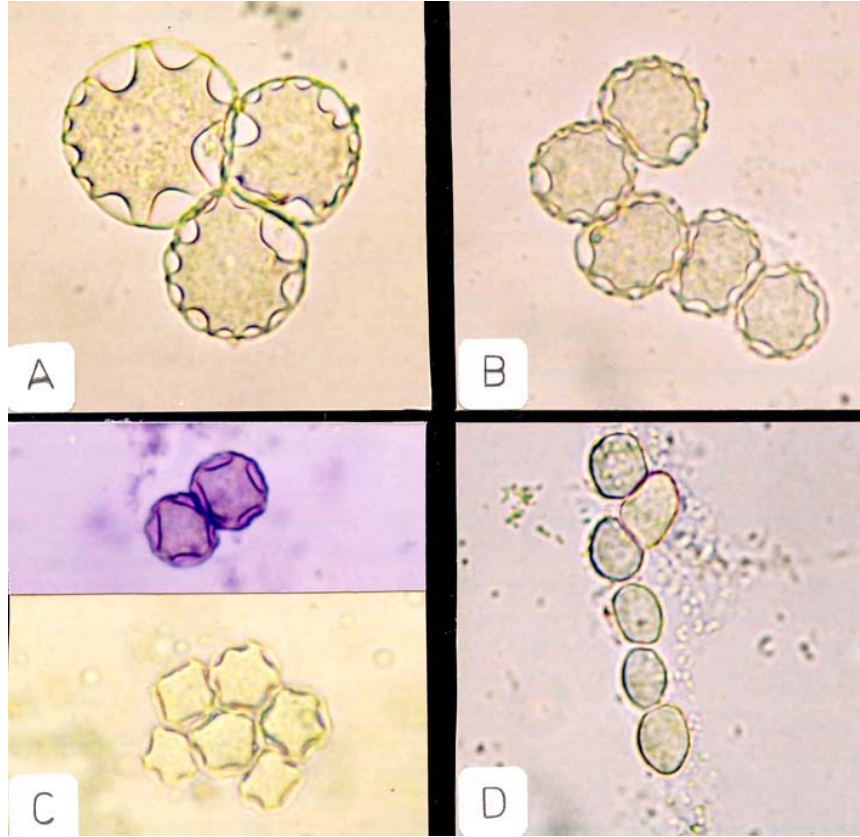
I. SINIFLANDIRMA

Acanthamoeba cinsi amipler, ilk kez 1930 yılında Castellani tarafından, *Cryptococcus pararoseus* kültürlerinde bulunmuş ve tanımlamıştır. Daha sonra bu cinsin sınıflandırılması, 1931 yılında Volkonsky tarafından yapılmış, fakat gerçek sınıflandırma son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur (John 1998). *Acanthamoeba* cinsinin en son sınıflandırması Şekil 1'de gösterildiği şekildedir. Buna göre *Acanthamoeba* cinsi, Acanthamoebidae ailesi, Centramoebida takımı, Lobose sınıfı, Rhizopoda şubesi (filumu) içinde yer almaktadır (43). Son yıllarda 16S-rRNA genlerinin moleküler analizi yapılmış, bu çalışmalar sonucunda *Balamuthia* cinsi, Leptomyxidae familyasından, Acanthamoebidae ailesine transfer edilmiştir (5).



Şekil 1. *Acanthamoeba*, *Balamuthia* ve *Naegleria* cinsi amiplerin sınıflandırılması (43).

Acanthamoeba cinsinin ayrımı en kolay, bu cinse özgü olan, trofozoitler üzerindeki, acanthopoda adı verilen, diken şeklindeki yüzey çıkıntıları ile yapılır (34, 57, 62). Morfolojik kriterler kullanarak tür düzeyinde ayırım yapmak çok zordur. *Acanthamoeba* türleri, kist büyüklüğü ve şekline göre üç morfolojik gruba ayrılmışlardır (Şekil 2): Grup I'deki türler, diğer gruptaki türlerle kıyaslandığında oldukça büyük kistlere sahiptir. Ektokistle, endokist arasında oldukça belirgin bir şekilde görülen açıklık vardır ve yıldız şeklindeki endokist, uçlardan ektokistle bağlantılıdır (Şekil 2-A). Grup II'deki türlerin ektokisleri buruşuk bir görünümde iken endokist yıldız, poligonal, üçgen veya oval şekilde olabilir (Şekil 2-B,C). Grup III'deki türlerin kistleri küçüktür, kist duvarı ince ve düz bir yapıdadır, ektokist düz çeperi ile endokisti çevreler. Ektokistle, endokist arasındaki mesafe çok azdır (Şekil 2- D) (29, 34, 43).



Şekil 2. *Acanthamoeba* türlerine ait kistlerin büyüklük ve şekline göre ayrımı. A'da Grup I'de yer alan, *A. astronyxis*'e ait kist morfolojisi görülürken, B ve C'de Grup II'de bulunan, sırasıyla, *A. castellanii* ve *A. polyphaga*'ya ait kist morfolojisi (C'de üstte bulunan şekilde, *A. polyphaga* kistleri metilen mavisi ile boyanmış durumda) D'de ise Grup III'de bulunan *A. palestinensis*'in kist morfolojisi görülmektedir.

Günümüze kadar çeşitli çevrelerden veya klinik örneklerden izole edilen *Acanthamoeba* türlerinin, kist morfolojisi ve büyüklüğüne göre hangi grupta yer aldığı belirlenmiştir. Bu ayrım Tablo 1'de görülmektedir (29, 43).

Grup I	Grup II	Grup III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. commandoni</i>	<i>A. divionensis</i>	<i>A. healyi</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. griffini</i>	<i>A. jacobsi</i>
<i>A. pearcei</i>	<i>A. hatchetti</i>	<i>A. lenticulata</i>
<i>A. tubiashi</i>	<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. palestinensis</i>
	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. guina</i>	
	<i>A. rhysodes</i>	
	<i>A. stevensoni</i>	
	<i>A. tubiashi</i>	

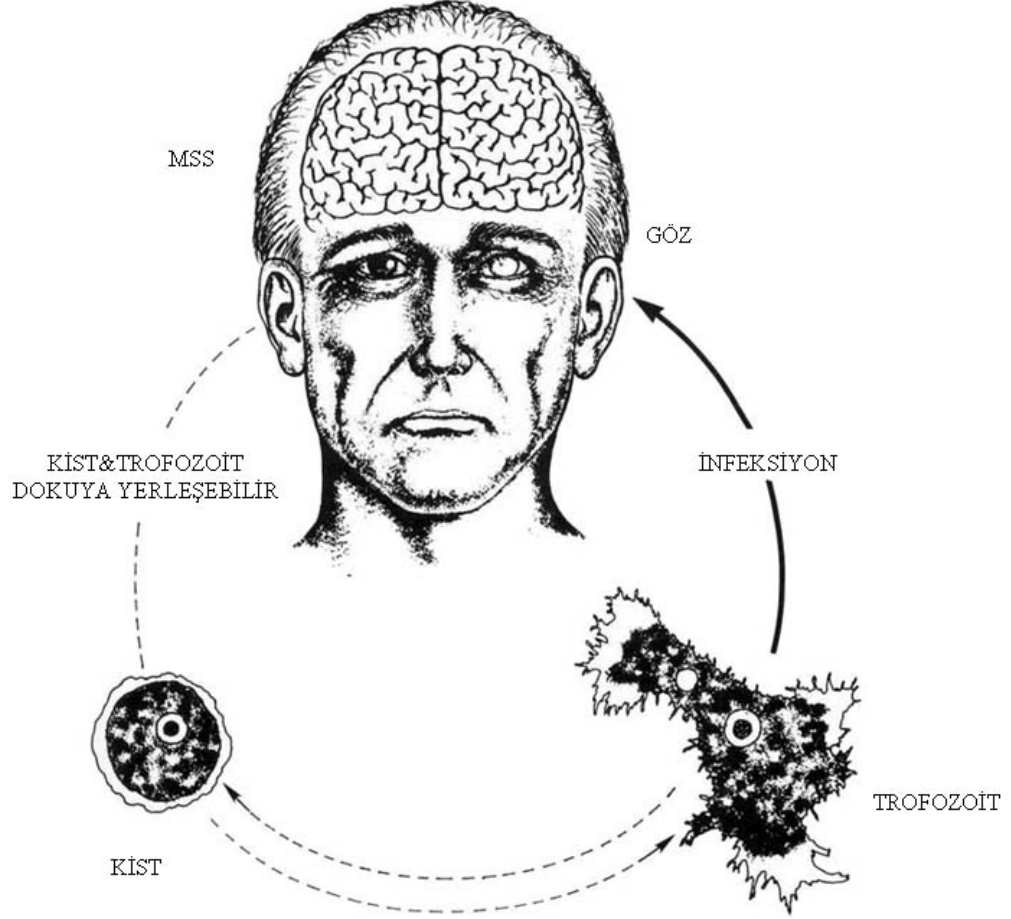
Tablo 1. İnsan ve çevreden izole edilen *Acanthamoeba* türleri ve kist morfolojisine göre yer aldığı gruplar.

Kist morfolojisi bazı kültürlerin içeriklerine bağlı olarak değişiklik gösterebilir, bu nedenle sadece kist morfolojisine göre idendifikasyon yapmak uygun olmayabilir. *Acanthamoeba* türlerinin tanımlanmasında moleküler, immunolojik, biyokimyasal ve fizyolojik kriterler kullanılmaktadır (43).

II. DAĞILIMI VE BİYOLOJİSİ

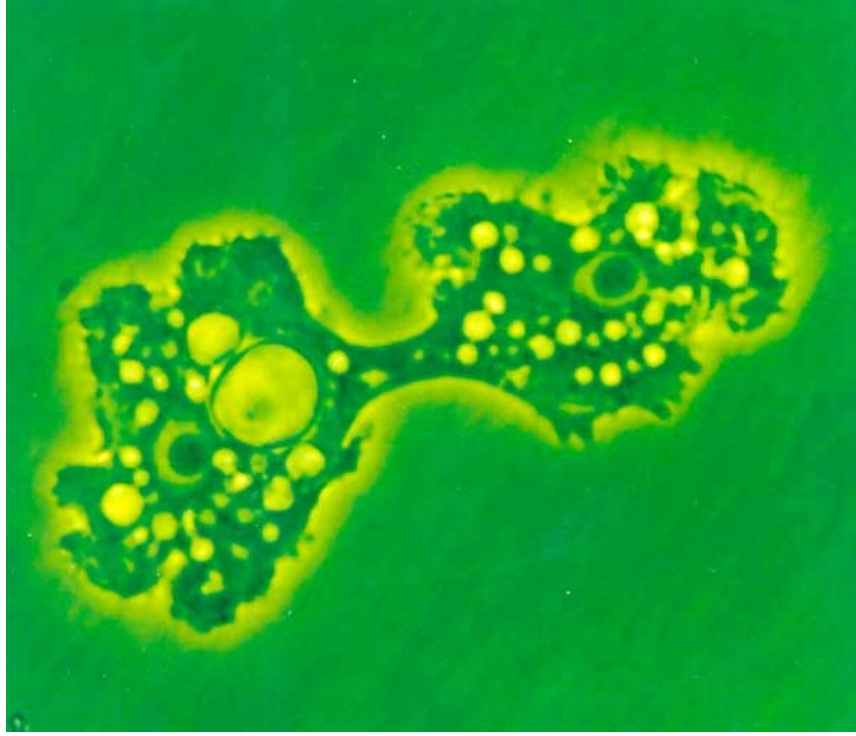
A. Dağılımı: *Acanthamoeba* türleri çevrede yaygın olarak bulunan protozoonlar arasındadır. Bu türler dünyada çok geniş bir dağılım gösterirler ve topraktan, çamurdan, havadan, kaplıcalardan, deniz suyundan, yüzme havuzlarından, lağımlardan, hava temizleme ünitelerinden, evlerde bulunan çeşme sularından, şişe sularından, dış tedavi ünitelerinden, kontakt lenslerden, lens saklama kaplarından, lens temizleme solüsyonlarından, bakteri ve mantar kültürlerinden, memeli hücre kültürlerinden izole edilmişlerdir (12, 21, 31, 32, 42, 43, 46, 57, 61, 74, 75, 77). Bunun yanında, bu tür amipler bitkilerden, balık, amfibi, sürüngen ve memeliler grubundaki hayvanlardan, sağlıklı görünen insanların nazal mukoza ve torakslarından, infekte beyin ve akciğer dokusundan, immunbaskın kişilerin deri lezyonlarından ve keratitli hastaların korneal dokusundan izole edilmiştir (13, 16, 37, 43, 44, 51, 60, 68, 74, 78).

B. Yaşam Döngüsü ve Biyolojisi: *Acanthamoeba* cinsi amiplerin yaşam döngüsünde iki dönem ayırt edilir: Birincisi, aktif olarak beslenen, büyüyen, çoğalan ve hareket eden trofozoit formu, ikincisi ise, dış çevre koşullarına daha dayanıklı olan kist formudur. *Acanthamoeba* türleri, insan vücudunda başta merkezi sinir sistemi (MSS) ve göz olmak üzere deri, akciğer, mukoza ve toraksta yerleşebilirler. Bu cins amipler, dokuda hem trofozoit, hem de kist halinde bulunurlar. Buna karşın *Naegleria* cinsi amipler dokuda sadece trofozoit formunda bulunmaktadır (34, 43, 59, 62). Şekil 3'de *Acanthamoeba* türlerinin yaşam döngüsü ve insanda oluşturduğu infeksiyon görülmektedir (33).



Şekil 3. *Acanthamoeba* türlerinin yaşam döngüsü ve insanda oluşturduğu infeksiyon.

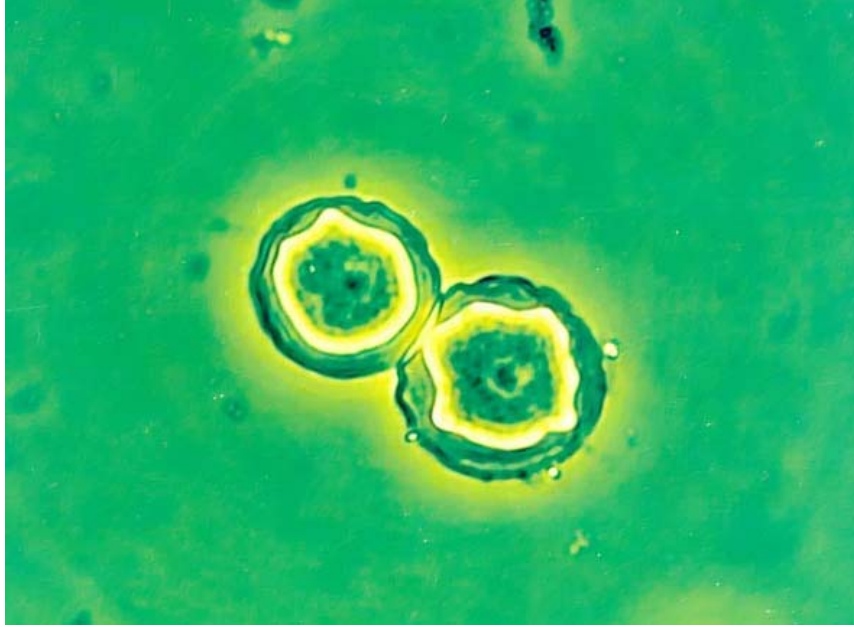
Trofozoit Formu: *Acanthamoeba* trofozoitlerinin büyüklükleri 25-56 μm arasında değişiklik gösterir ve genellikle yavaş olan hareketlerini, parmak şeklinde olan lopopod ve akantopod (acanthopodium) denilen dikensi yalancı ayaklar ile sağlarlar (Şekil 4). Besinleri, genellikle çevrede bulunan bakteri, alg ve mantarlardır, bu partikül halindeki besinleri fagositoz ile alırlar. Bunun yanında sıvı ortamda erimiş halde bulunan besinleri de pinositoz ile alarak beslenebilirler (34, 43, 59, 62).



Şekil 4. Sıvı besiyeri içinde bulunan bir *A. castellanii* trofozoitinin inverted mikroskopdaki görünümü (x40).

Acanthamoeba türlerinin hücresel organizasyonları elektron mikroskobu çalışmaları ile ortaya konmuştur. Organeller, tipik bir büyük ökaryotik hücredeki gibidir. *Acanthamoeba* trofozoitlerinde düzgün ve kıvrımlı endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, serbest ribozomlar, besin vakuolleri, mitokondria, ve mikrotubuller bulunmaktadır. Trofozoitteki sitoplazmik içerik, üç tabakalı bir plazma membranı ile çevrilidir. Sitoplazmada, hücrenin su içeriğini kontrol altında tutan kontraktıl vakuoller bulunmaktadır (43). Tek olan çekirdekte, büyük ve merkezi bir çekirdekcik mevcuttur. Genellikle, tek çekirdekli olmasına rağmen, sıvı haldeki kültürlerde bulunan trofozoitler çok çekirdekli olabilir. Üreme, eşeysiz olarak, ikiye bölünmeyle olur (34, 43, 59, 62).

Kist Formu: Tek çekirdekli ve yuvarlak olan kistlerin, çeperleri endokist ve ektokist denilen çift tabakadan meydana gelir. Genellikle dış tabaka hafifçe kıvrık, iç tabaka polihedral bir görünümde (Şekil 5). Büyüklüğü 13-20 µm arasında değişiklik göstermektedir. Kistler dezenfektanlara, klor, antibiyotiklere karşı dirençlidir. Düşük sıcaklıklarda (0-2°C) canlı kalırlar. Çevre koşulları uygun olduğunda, kistlerden trofozoitler çıkar. *Acanthamoeba* türlerinin kist morfolojisi, agar plakları üzerinden bile kolayca ayırt edilir (34, 43, 59, 62).



Şekil 5. Page'in tuzlu su eriyiği içinde bulunan, *A. castellanii* kistlerinin inverted mikroskopdaki görünümü (x40).

III. NEDEN OLDUĞU HASTALIKLAR

A. Granülopatöz Amibik Ensefalit (GAE): GAE, *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu, kronik, yavaş ilerleyen merkezi sinir sistemi (MSS) infeksiyonudur. Başlangıçta *Naegleria* cinsi ile birlikte PAME olgularından sorumlu tutulan *Acanthamoeba* türlerinin, kronik MSS infeksiyonuna neden oldukları belirlendikten sonra, bu cinsin türlerinin neden olduğu parazitoza “Granülopatöz Amibik Ensefalit” denmesi önerilmiştir (34, 43, 58, 62). Bu hastalığın inkübasyon periyodu tam olarak bilinmemektedir. Klinik bulguları saptamak için birkaç hafta veya ay gerekli olabilir. GAE, sistemik lupus erythematosus, diyabet, tüberküloz, deri ülserleri, AIDS gibi hastalıkların yanında alkolizm, ilaç bağımlılığı, steroid tedavisi, kanser kemoterapisi, radyoterapi ve organ transplantasyonu gibi durumlarda çok hızlı ilerler (34, 43).

Acanthamoeba türlerinin MSS’ye yerleşmesi sonucu meydana gelen semptomlar aşağıdaki gibidir (34, 43, 62):

- Baş Ağrısı
- Mental durumda anormallikler
- Ense sertliği
- Nöbet
- İrritasyon
- Bulantı ve kusma
- Yarı felç
- Kafa tası sinirlerinin felci
- Halüsilasyonlar
- Yürüme bozukluğu
- Çift görme
- Işığa karşı duyarlılık

- Uyku düzensizliği
- İştahsızlık
- Babinski Belirtisi (Yarı felçlilerde ayak altı çizildiğinde meydana gelen ekstansiyon hareketi)
- Kernig Belirtisi (Karın üzerine kıvrılan bacağıın tekrar eski durumuna getirilememesi)

Patolojik bulgular genellikle kanamaya bağlı nekroz, fibrin birikimi ve inflamasyon içerir. Serebral hemisferlerde şiddetli ödem görölür. Multifokal lezyonlar orta beyin, beyin sapında, corpus callosum ve serebellumda görölür. Temel olarak, polimorfonükleer lökositler ve mononükleer hücrelerden oluşın, kronik inflamasyon sıvısı, korteks üzerinde görölür (43).

GAE olgularının tanısında, BOS ya da beyin dokusu incelenir. Bu materyallerden lam-lamel arasında preparat hazırlanıp, direkt olarak veya çeşitli boyalarla boyandıktan sonra mikroskopta incelenerek amip varlığı aranır. Bunun yanında, alınan materyaller kültür ortamına ekilerek amibik bir üreme olup olmadığına bakılabilir. Laboratuvarda yetiştirilmiş fındık farelerine, hastalardan alınan örnekler steril koşullarda burundan verilir ve birkaç gün içinde hayvanlarda meydana gelen değişiklikler gözlenir, daha sonra enfekte edilen farelerin beyin dokuları incelenerek amip trofozoitlerinin ve kistlerinin bulunup bulunmadığı araştırılır. Beyin dokusundan histopatolojik kesitler hazırlayıp, çeşitli boyalarla boyanarak da amip varlığı araştırılabilir. Hematoksilen-Eozin, Gram, Giemsa gibi boyalarla boyanmış preparatlarda trofozoitler, makrofaj veya diğer hücrelerden çekirdekçiğin yapısı ile ayrılır (34, 43, 58, 62, 63).

GAE'nin tedavisinde, tek bir ilaçla tedaviye kıyasla, kombine ilaç tedavisinin daha etkili olduğu bildirilmiştir. Bunun sebebi, birçok ilacın amebosidal etki yerine amebostatik etki göstermesidir. Bu parazitozun tedavisinde, erken tanı çok önemlidir, maalesef birçok GAE olgusunda hasta öldükten sonra tanı konabilmiştir (43). GAE olgularında serebral ödem ve inflamasyonu önlemek için kortikosteroidler kullanılmasına rağmen, araştırmacılar GAE olgularında kullanılmalarını önermemektedir. Genellikle tedavide, ketoconazole, rifampin, trimethoprim, sulfamethoxazole gibi ilaçlar kullanılmaktadır (34, 43, 62).

B. AIDS'li Hastalarda *Acanthamoeba* İnfeksiyonu:

AIDS'li bir kişideki *Acanthamoeba* infeksiyonu ilk kez 1986 yılında bildirilmiştir (20). Bu yıldan sonra, AIDS'li kişilerde, çok sayıda *Acanthamoeba* infeksiyonu olgusu bildirilmiş olup, bu olguların bir çoğunda tanı otopsi ile konmuştur. HIV, insanın immün sistemini baskıladığından, AIDS'li kişilerde infeksiyonun diğer organ ve dokulara sıçraması sık görülen bir durumdur. AIDS'li kişilerde hastalık çok hızlı ilerler ve birçok hastada nörolojik semptomların görülmesinden bir ay veya daha kısa süre sonra ölüm gerçekleşir. AIDS hastalarında kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri çok sık görülmektedir. Bunun yanında bu hastalarda, *Acanthamoeba* cinsi amiplerin etken olduğu lökositoklastik vaskülit, amebik osteomyelitis ve endofthalmit olguları bildirilmiştir (34, 43).

C. Kutanöz Acanthamoebiasis: Genellikle AIDS hastalarında görülen bu infeksiyon, tek başına veya MSS infeksiyonu ile birlikte görülmektedir. Bu hastalık sert eritamatöz nodüller veya deri ülserleriyle karakterizedir. Kutanöz acanthamoebiasis'in erken belirtisi sert papülonodüllerin meydana gelmesidir. Bu nodül, irinli bir materyal toplar ve daha sonra iyileşmeyen sert ülserlere dönüşür. Kutanöz lezyonların histopatolojik incelenmesi sonucunda, nekroz odağı çevresinde, inflamatuvar hücreler, vaskülit, trofozoitler ve kistlerin bulunduğu gösterilmiştir (43).

Kutanöz acanthamoebiasis'de tanı materyali olarak, lezyondan alınan biyopsi materyali kullanılmaktadır. Bu materyal, üzerine bakteri sürülmüş besleyici değeri olmayan agar ortamına ekilerek, amip üremesinin olup olmadığı takip edilir. Histopatolojik tanıda, biyopsi materyali, hematoksilen-eozin, periyodik asit-schiff, calcofluor beyazı gibi boyalarla boyanarak amip varlığı araştırılabilir. Buna ek olarak, PCR, RFLP gibi moleküler metodlar ile immünokimyasal yöntemler de tanıda kullanılabilir (43).

Henüz tedavisinde kesin olarak bir ilaç önerilmeyen bu infeksiyonun tedavisinde farklı ilaçlar kullanılmaktadır. Kutanöz acanthamoebiasis itraconazole, pentamidine, 5-fluocytosine, topical chlorhexidine gluconate ve ketoconazole krem kullanarak başarılı olarak tedavi edildiği bildirilmiştir (43).

D. ACANTHAMOEBA KERATİTİ

Acanthamoeba türleri, insanda kronik, ilerleyici ülser oluşumu ile karakterize olan, tedavisi ve tanısı oldukça zor bir keratite neden olurlar (29). *Acanthamoeba* keratiti aslında yeni tanımlanan hastalıklar arasındadır. İlk kez Nagington ve arkadaşları tarafından, 1974 yılında bildirilmiştir (64). Fakat, hastalık 1980'li yıllara kadar çok nadir görülürken, bu yıllardan sonra kontakt lens kullanımına bağlı olarak insidansında önemli bir artma görülmüştür (28, 47, 48, 77).

Vahlkampfia ve *Hartmanella* cinslerinin kontakt lens kullananlarda keratite neden olduğu bildirilmiştir (1). Bunun yanında, sekiz *Acanthamoeba* türü keratite neden olmaktadır (43). Bu türler şunlardır:

- *Acanthamoeba castellanii*
- *A. polyphaga*
- *A. hatchetti*
- *A. culbertsoni*
- *A. rhyodes*
- *A. lugdunensis*
- *A. quina*
- *A. griffini*

Acanthamoeba keratiti, bu amiplerin kornea ile direkt teması sonucu oluşmaktadır. Bu temasta, korneadaki travma, kontakt lens kullanımı, kontakt lenslerin kontamine lens solüsyonları ile temizlenmesi rol oynamaktadır (21, 28, 47, 48, 77). *Acanthamoeba* keratiti, immün sistemi sağlam, sağlıklı kişilerde görülür ve bu kişilerde koruyucu immünite gelişmez. İnfeksiyonda, şiddetli oküler ağrı, yangı, görme bozukluğu ve halka şeklinde stromal infiltrasyon vardır. Tanısı çoğunlukla, kornea kazıntı materyalinin direkt incelenmesinde amibi saptayarak, bu materyalden etkeni üreterek ya da histopatolojik kesitlerde paraziti görerek konur. Tedavide çeşitli ilaçlar denenmiştir. Etkili olanlar arasında propamidine isethionate,

ketoconazole, miconazole ve itraconazole sayılabilir. Bu hastalık tedavi edilmediğinde görmenin ya da gözün kaybı söz konusudur (29, 43, 64).

EPİDEMİYOLOJİ

Gözde *Acanthamoeba* infeksiyonu ilk kez 1974 yılında Nagitton ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Burada iki olgu tanımlanmıştır. Birinci olgu, bayan bir öğretmendir. Bu olguda, öğretmenin gözüne kuş çarpma hikayesi vardır, bunun sunucunda oldukça ilerlemiş keratit meydana gelmiş ve hastaya rekalsitran tedavisi uygulanmıştır. İkinci olgu ise, bir yıl önce gözüne ağaç dalı çarparak yaralanma meydana gelen erkek bir çiftçidir. Bu yaralanmadan sonra göz hızla iyileşmiş ve bir yıl sonra *Acanthamoeba* infeksiyonunun ilk belirtileri ortaya çıkana kadar hastaya herhangi bir sıkıntı vermemiştir (43, 64). Bu olgular bildirilmeden önce 1973 yılındaki Dallas'ta yapılan Oküler Mikrobiyoloji ve İmmunoloji grubu toplantısında Amerika'lı bir çiftçideki rekalsitran korneal infeksiyonu bildirilmiştir (64). Burada bildirilen olguyla, Nagitton ve arkadaşlarının 1974 yılında bildirdikleri olgular aynı görünümündedir. Bu üç olguda bir travma sonucu meydana gelmiştir ve tedavi edilmeye çalışılmasına rağmen körlükle sonuçlanmıştır. Bu olgulardan sonraki 10 yılda *Acanthamoeba* infeksiyonu çok nadir olarak görülmüştür ve bu yıllarda, olguların ana nedeni hafif oküler travma olan 11 *Acanthamoeba* keratiti olgusu bildirilmiştir (64). Bildirilen olguların hiçbirinde kontakt lens kullanımına bağlı bir keratit görülmemiştir.

1984 yılı başlarında, gözünde travma hikayesi olmayan *Acanthamoeba* keratitli hastaların sayısında büyük artma görülmüştür (47). Yumuşak kontakt lens kullanımına bağlı *Acanthamoeba* keratiti ilk kez 1984 yılında Samples ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. İnfeksiyon 42 yaşındaki, Amerika'lı, erkek bir hastada meydana gelmiş ve korneadan *A. castellanii* izole edilebilmiştir. Araştırmacılar kontaminasyonun sıcak su

küvetlerinden meydana geldiğini düşünmüşlerdir (56). Bu olguyu takiben, aynı yıl içinde 48 yaşındaki bir kadında yumuşak kontakt lens kullanımına ve travmaya bağlı olan ikinci olgu Hirst ve arkadaşları tarafından Amerika Birleşik Devletlerinden bildirilmiştir. Bu olguda tanı kültür ve histopatolojik çalışmalar ile konmuş ve indirekt immunfloresan tekniği ile izole edilen amip türünün *A. castellanii* olduğu belirlenmiştir (25). 1985 yılının Mart ayında yumuşak kontakt lens kullanan bir bayanın iki gözünde birden *Acanthamoeba* keratiti belirlenmiştir (64). Aynı yıl Eylül ayında, Moore ve arkadaşları yaşları 13, 22 ve 25 olan ve günlük yumuşak kontakt lens kullanan üç gence, *Acanthamoeba* keratiti tanısı koymuşlardır. Hastaların kontakt lenslerini damıtık su ve tuz tabletlerinden yapılmış olan tuz solüsyonları ile steril ettikleri belirlenmiştir. Araştırmacılar, hastalardan birinin lens solüsyonundan, *Acanthamoeba* cinsi amip izole etmişlerdir. Bu hastaların tanısı, korneal biyopsi materyalleri ile konmuş ve hastalık neomycin-polymyxin, miconazole ve propamidine isethionate ile tedavi edilmiştir (47).

Stehr-Green ve arkadaşları ABD'deki epidemiyolojiyi belirlemek için Oküler Mikrobiyoloji ve İmmünoloji Grubunun ve Hastalık Kontrol Merkezinin verilerini toplamışlar ve 1981 ile 1989 yılları arasında, toplam 208 *Acanthamoeba* keratiti olgusu olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, 1981 ile 1984 yılları arasında keratit olgularının sayısında kademeli bir artış görülürken, 1985 yılı başlarında olağanüstü bir artma olduğunu belirtmişlerdir. Erkek ve kadınların aynı oranda etkilendiğinin belirlendiği çalışmada hastaların %85'inin kontakt lens kullandığı vurgulanmıştır (71).

Bacon ve arkadaşları, Mart 1984 ile Eylül 1992 yılları arasında Londra'da bulunan Moorfield göz hastanesinde, ard arda gelen 72 *Acanthamoeba* keratiti (77 göz) olgusunun, tanı faktörlerinin, kültür prosedürlerinin başarısının, ilaç ve cerrahi tedavilerin sonuçlarının değerlendirdikleri bir makale yayınlamışlardır. Farklı tanı yöntemlerini değerlendiren araştırmacılar, yumuşak ve sert kontakt lens kullanan kişilerde

oluşan keratiti karşılaştırmışlar, yumuşak kontakt lens kullananlarda olgu sayısının fazlalığına ve klinik görünümünün daha ağır olduğuna dikkat çekmişlerdir (6).

Radford ve arkadaşları İngiltere’de bulunan 14 bölgesel sağlık otoritesi göz hekiminin, 12’si ile koordineli olarak yürüttükleri çalışmada 1 Ekim 1992 ile 30 Eylül 1996 tarihleri arasındaki verileri toplamışlar ve bu bölgelerde toplam 243 hastaya *Acanthamoeba* keratiti tanısı konduğunu belirlemişlerdir. Buna göre insidansını her 100.000 kişide 0,14 olarak belirlemişlerdir (54).

Yurdumuzdaki ilk *Acanthamoeba* keratiti olgusu 1996 yılında, Akyol ve arkadaşları tarafından Elazığ’dan bildirilmiştir (4). İkinci olgu Akısü ve arkadaşları tarafından, 1999 yılında İzmir’den bildirilmiştir (2). Bildirilen bu iki olguda da etken izole edilememiştir (70).

KLİNİK GÖRÜNÜM

Yabancı bir cisim tarafından yaralanma nedeniyle oluşan korneal travma, kontakt lensle yüzme, steril olmayan lens temizleme solüsyonlarının kullanılması gibi nedenlerle gözde *Acanthamoeba* infeksiyonu gelişebilir (29, 34, 43). Genellikle tek gözün etkilendiği *Acanthamoeba* keratitinin klinik görünümü oldukça değişiklik gösterir. Hastalığın başlangıcında görülen semptomlar *Acanthamoeba* keratitine spesifik değildir ve genellikle mikroerozyonlar ve düzensiz sınırlara sahip opasite görülür. Bu durumda kornea floresan boya ile boyanmaz (29). Bu görünüm Herpes simplex infeksiyonunun başlangıçtaki görünümü olan dendritiform keratite benzer ve tanıda karışıklıklara neden olur. *Acanthamoeba* keratitinde, multifokal bileşik yapıda olmayan granüler epitelyopati ve subepitelyal opasitelerin varlığı, perinöral inflamasyona bağlı lezyonun görünümü, şiddetli ağrı, kontakt lens kullanımı ya da kontamine sularla temas gibi risk faktörlerinin

mevcudiyeti ve antiviral tedaviye cevap vermemesi gibi özellikler herpetik keratitle ayırıcı tanısında önemlidir (3, 29, 43, 64).

İlerlemiş *Acanthamoeba* keratiti olgularındaki semptomlar aşağıdaki gibidir(3, 29 43, 64):

- Kapak düşmesi (Eyelid ptosis)
- Konjunktivanın kızarıklığı (Conjunctival hyperemia)
- Işığa hassasiyet (Photophobia)
- Göz sulanması (Watering-Tearing)
- Bulanık görme (Blurred vision)
- Gözde ağrı (Ocular pain)
- Kornea sinir tabakalarının infiltrasyonu (Perineural infiltrates)
- Korneadaki beyaz görünümde olan leke (Opacities)
- Kornea epitel defekti (Loose corneal epithelium)
- Batma, yanma, sulanma şikayeti (Irritation)

Başlangıçta amip, kornea epitelinde sınırlı kalır, fakat hastalık ilerledikçe, stroma içinde yayılmaya başlar ve buna bağlı olarak inflamasyon gerçekleşir. Çoğunlukla, *Acanthamoeba* keratitinin karakteristik klinik görünümü halka şeklinde stromal infiltrasyondur ve stromada nötrofiller gibi inflamatör hücreler birikim gösterir. Klinik olarak, konjunktiva kızarıklığı, korneal inflamasyonu, episklerit, sklerit meydana gelir. Trofozoitler, korneal sinirlere infiltre olabilir, bunun sonucunda neurit ve nekroz oluşabilir. Nadir olarak meydana gelen durum, *Acanthamoeba* cinsi amiplerin korneadan retinaya sıçramasıdır, bu durumda korioretinit meydana gelir. Medikal ve cerrahi tedavinin cevap vermediği şiddetli olgularda gözün çıkarılması gerekebilir (3, 29, 43, 64).

Bacon ve arkadaşları, 72 *Acanthamoeba* keratiti hastasının 9'unda (%12.5) perinöral infiltrasyon, 9'unda (%12.5) tipik semptomlar ile birlikte atipik bir keratit görünümü, 3 hastada halka şeklinde inflamasyon (% 4), 3 (% 4) hastada dendriform ülser, 9 hastada limbit (% 12.5) saptamışlardır (6).

TANI

Acanthamoeba keratitinin tanısı oldukça zordur, çünkü klinik görünümü *Herpes simplex*, *Pseudomonas aeruginosa* veya fungal keratite çok benzer. Bu durum, tanıda yanlışlıklara neden olabilir. Yanlış tanı sonucunda uygulanacak anti-viral, anti-fungal veya anti bakteriyel tedavi hastalığın kliniğini gölgeler ve tedavide gecikmelere neden olur (43).

Tanı için korneal veya konjuktival sürüntü örnekleri uygun değildir. *Acanthamoeba* kist ve trofozoitlerini saptamak için, korneal kazıntı ve biyopsi materyalleri çok uygundur (3, 29, 43).

Antibiyotik tedavisine cevap vermeyen korneal ülser *Acanthamoeba* keratitini düşündürse de (3, 29), esas tanı laboratuvar araştırmaları ile konur. Tanı için kullanılan farklı yöntemler mevcuttur:

I. Kültür Yöntemi: Kültür yöntemi etkenin belirlenmesi açısından çok önemlidir. *Acanthamoeba* türü amiplerin gelişebildiği birçok besiyeri mevcuttur (65) ama tanıda en çok kullanılan besiyeri, üzerine *Escherichia coli* ya da başka bir gram negatif bakteri sürülmüş olan, besleyici değeri olmayan agar ortamıdır. Kültür için korneal kazıntı materyali çok uygundur. Agar besiyerinin hazırlanışı kısaca şöyledir: Agar, %1.5-2 oranında hazırlanarak, otoklavda steril edilir ve 10-15 mL steril petri kaplarına dökülür; kullanmadan önce üzerine bakteri sürüldükten sonra petrinin orta kısmına materyal konur ve 35-37°C'de inkübe edilir, ertesi günden itibaren amip üremesi olup olmadığı mikroskopta incelenerek belirlenir (57,62). Burada dikkat edilmesi gereken nokta, korneal kazıntı materyalinde bakteri ya da mantar olabilir, bu durum da tanıda karışıklıklara neden olabilir. Korneal kazıntı örneğinden yapılan kültür negatif çıktığında, korneal biyopsi örneğinden kültür yapılması gerekebilir, bunun yanında lens saklama kaplarından ve lens temizleme solüsyonlarından alınan örneklerden de kültür yapılmalıdır. Bu

materyallerden yapılan kültürlerin pozitif çıkması tanıyı kesinleştirmez, fakat *Acanthamoeba* infeksiyonu olduğunu düşündürebilir (43).

II. Sitolojik Tanı: Sitolojik tanı için farklı yöntemler kullanılır.

A) İndirekt İmmunofloresan - Antikor Testi: Bu test ile korneal kazıntı veya doku biyopsi materyallerinde amiplerin varlığı belirlenebilir. Anti-amip antikorları oluşturmak için genellikle tavşan kullanılır, elde edilen antikorlarla indirekt-immun floresan yöntemi ile amiplerin varlığı belirlenebilir (17).

B) Calcoflour Beyazı: Bu boya, kemofloresan bir boya olup, polisakkarit polimerlerine affinitesi vardır. Bu nedenle korneal dokulardaki amip kist ve trofozoitlerinin belirlenmesinde kullanılabilir. Oldukça basit ve hızlı olan bu metodun işlem basamakları kısaca şu şekildedir: Korneal kazıntı materyali lama sürülür, metil alkolde 3-5 dakika tespit edildikten sonra lam üzerine birkaç damla %1'lik Calcoflour beyazı ile %1'lik Evans Blue damlatılır ve 5 dakika sonra boya fazlalıkları uzaklaştırılıp, lamel kapatılarak floresan mikroskobunda incelenir. Bu boya ile amiplerin kist duvarı, parlak elma yeşiline boyanırken, trofozoitler kırmızı-kahverengiye boyanır. Calcoflour beyazı ile parafine gömülü dokular içindeki trofozoit ve kistler de hızlı bir şekilde boyanarak belirlenebilir (43, 76) .

C) Akridine Orange: Korneal kazıntı örnekleri ve serebrospinal sıvı akridine orange ile boyanarak, *Acanthamoeba* keratitinin ve GAE'nin hızlı ve kolay bir şekilde tanısı yapılabilir. Korneal kazıntı örneklerinin akridin orange ile boyanması sonucu,

inflamatuvar hücreler ve korneal epitel hücreleri arasında *Acanthamoeba* kistleri sarı-portakal rengine boyanarak belirgin hale gelir (22).

D) Laktofenol (Pamuk Mavisi): Bu boya ile korneal kazıntı örneklerinde, *Acanthamoeba* kistlerinin varlığı hızlı ve kolay bir şekilde belirlenebilir. Korneal kazıntı temiz bir lama sürülür ve üzerine bir damla laktofenol (pamuk mavisi) (20 g fenol kristalleri, 20 mL laktik asit, 40 mL gliserol, 20 mL distile su, 0.05 g pamuk mavisi) damlatıldıktan sonra lamel kapatılarak ışık mikroskopunda incelenir. Burada *Acanthamoeba* kistlerinin çift katlı duvarı belirginleşir ve kist çevreye göre oldukça koyu maviye boyanır. Bazı laboratuvarlar bu boyanın kanserojen etki göstermesinden dolayı Laktofenol Anilin Blue boyasını tercih etmişler fakat bu boyanın *Acanthamoeba* kistleri ile hasta dokusu arasındaki kontrastı iyi sağlamamasından dolayı başarılı sonuçlar elde edememişlerdir (73).

III. Konfokal Mikroskop ile Tanı: Konfokal kornea mikroskopisi son yıllarda geliştirilmiş olan bir muayene tekniğidir. Korneanın geniş bir alanda, dış tabakadan, iç tabakaya kadar taranmasını sağlar. Konfokal mikroskopa, binoküler mikroskop ile görülemeyecek hücre yapılarının en yüksek büyütmede görülebilmesi sağlanır (69). *Acanthamoeba* cinsi amipler, konfokal mikroskop ile in vivo olarak belirlenebilir. Kültür yönteminde sonuçların geç alınması ve korneal kazıntı ya da korneal biyopsi materyaline gereksinim duyulması, sitolojik tanı yöntemlerinde de yine korneal kazıntı materyaline gereksinim duyulması ve çoğunun pahalı olması konfokal mikroskop ile tanıyı avantajlı hale getirmiştir. Henüz rutin klinik kullanımı

olmayan bu yöntemin temel avantajı, *Acanthamoeba* cinsi amiplerin tam olarak korneayı istila edemediği durumlarda bile hızlı tanı imkanı sağlamasıdır. Bu mikroskop ile kistler, yüksek kontrastta 10-25 µm çapında, oval ya da yuvarlak, iki tabakalı kist duvarı ile, trofozoitler ise değişen büyüklük ve şekilleriyle ayırt edilirler (43, 53, 64).

IV. PCR ile Tanı: Son yıllarda umut verici teknikler arasında görülen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) oldukça spesifik bir yöntemdir. Mutlaka korneal kazıntı materyaline gerek duyulan bu yöntemde, korneal dokudan DNA izole edilir ve *Acanthamoeba*'ya spesifik oligonükleotit primerleri kullanarak, izole edilen DNA içinde *Acanthamoeba*'ya ait olan gen bölgesinin varlığı araştırılır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, kullanılan primerlerin mutlaka *Acanthamoeba* genusuna spesifik olmasıdır. Eğer göz birkaç amip ile (1-5 adet) enfekte ise diğer metodlarla tanı konulması çok zordur. Bu durumda göz yaşı örneklerinden PCR yapılması önerilir. PCR tanı amaçlı kullanımı yanında, hastaların tedaviye cevaplarının araştırılmasında da güvenli bir şekilde kullanılabilir (29, 43, 64).

V. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Tekniği ile Tanı: Floresan in situ tekniği ile, türe spesifik radyoaktif işaretli prob kullanarak *Acanthamoeba* keratitinin tanısı konabilir. Türe özgü dizi T4 problarıdır ve cins düzeyinde ortak olan bu prob 22 bazdan oluşur. Bu dizi 18S rDNA dizisine komplementerdir. Bu yöntemle *Balamuthia mandrillaris* ve *Hartmanella vermiformis* türlerinin tanısı konamaz (72).

VI. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): Bu yöntem tanı amaçlı kullanımının yanında, çoğunlukla gözü infekte

eden *Acanthamoeba* türünü belirlemeye yönelik bir tekniktir. *Acanthamoeba* cinsine ait varyasyon bölgeleri PCR ile çoğaltıldıktan sonra, restriction endonükleazlar ile kesilir ve enzimin tanıma bölgelerinin özelliğine göre amibin türü belirlenir. *Acanthamoeba* cinsinde varyasyon bölgesi 18 S rRNA bölgesidir. Aynı şekilde mitokondrial 16S rRNA bölgesi de varyasyon gösterir. Rastgele de olsa, total DNA'nın da varyatif olduğu bildirilmiştir (43).

VII. Immunohistokimyasal Analiz: *Acanthamoeba* cinsi amiplere özgül immunohistokimyasal proplar kullanarak *Acanthamoeba* keratitinin tanısı konulabilir (43).

TEDAVİ

Acanthamoeba keratitinin tanısı zor olduğundan, sık sık tedavide gecikmeler ve buna bağlı olarak da görme kaybı olabilir. Eğer infeksiyon çok erken tanımlanırsa etkenin sadece epiteli istila etmiş olma olasılığı yüksektir ve daha kolay ve kısa sürede tedavi edilmesi mümkündür (43). Tedavi geciktiği takdirde amipler, korneanın derin tabakalarını istila eder ve bu durumda tedavi süresi birkaç ay, bir yıl ya da daha uzun olabilir. Bunun yanında hastalığın tekrar etme olasılığı artar, çünkü dokudaki trofozoitler kist formuna geçer ve kullanılan birçok amobisidal ilaç, kistlere etki etmez (6). Tedavide başarısızlık sık görülen bir durumdur, bunun sebebi de kullanılan ilaçların zayıf etki göstermesi, tedavi süresinin yetersiz olması veya etkenin ilaçlara direnç kazanması olabilir (18, 27, 43).

Acanthamoeba keratitinin tedavisinde farklı protokoller uygulanmaktadır:

I. Amobisidal Ajanlar: *Acanthamoeba* keratitinin ilk görülmesinden sonraki 10 yılda, bu hastalık klinik bir problem haline gelmiştir. Bu dönemde çok çeşitli topikal ajanlar ve bunların kombinasyonları kullanılmış fakat genellikle tedavi başarısız olmuştur. Tedavideki başarısızlık genellikle penetran keratoplasti gerektirmiş, bu durum da çoğunlukla görmenin ya da gözün kaybı ile sonlanmıştır (29). Wright ve arkadaşları, ilk kez 1985 yılında *Acanthamoeba* keratitinin başarılı bir şekilde tedavisini, %1'lik propamidin isethionate (Brolene) ve % 0.15 dibromopromidine kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu iki ilaç DNA sentezini inhibe eden diamidin türevleridir. Tedavi sonrası kullanılan neomycin'in toksik etki gösterdiği saptanmıştır (78). Araştırmacılar bu tedavi protokolünün erken dönemdeki enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğunu belirtmişlerdir (6, 78).

Miconazole, itraconazole ve ketaconazole gibi imidazoller de tedavide başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (8, 27, 30, 48). Miconazole'ün topikal olarak tedavide kullanımı sonucunda epitelyal toksisitenin meydana geldiği bildirilmiştir. Ketaconazole'in *Acanthamoeba* keratitinin tedavisinde etkili olabilmesi için sistemik olarak verilmesi önerilmektedir (43). Ishibashi ve arkadaşları *Acanthamoeba* keratitli üç hastaya, oral itranazole ve topikal %0.1 miconazole uygulamışlar ve uygulamadan 6-7 gün sonra hastalıkta önemli derecede gerileme görülürken, hastanın durumuna göre 5-9 haftada tam olarak iyileştiğini belirtmişlerdir. Tedavide kullandıkları bu ilaçların toksik etkisi olmadığını da araştırmalarında vurgulamışlardır (30). Hirst ve arkadaşları *Acanthamoeba* keratitli bir hastayı, 6 hafta boyunca sistemik ketaconazole ve topical miconazole ile başarılı bir şekilde tedavi etmişlerdir (25). Berger ve arkadaşları *Acanthamoeba* keratiti tanısı konan 7 hastanın tedavisinde, topical neomycin-polymyxin B-gramicin, %1'lik propamidine isethionate ve %1'lik miconazole nitrat'tan oluşan üçlü kombine ilaç kullanmışlardır. Araştırmacılar bu tedavinin erken ve ilerlemiş olguların her ikisinde de etkili olduğunu belirtmişlerdir (8).

Polyhexamethylene biguanide (PHMB), Zeneca Farmasötik firmasının dezenfektan olarak ürettiği, Baquacil olarak bilinen bir üründür. Bu ürünün *Acanthamoeba* cinsi amiplerin hem trofozoitlerine, hem de kistlerine etkili olduğu bildirilmiştir (Seal 1995). Katyonik bir antiseptik olan bu maddenin terapötik kullanımı için lisansı yoktur. Buna rağmen Larkin ve arkadaşları %0.02 konsantrasyonda tedavide başarılı sonuçlar elde etmişlerdir (67). PHMB'nin yalnız kullanımı sonucu toksik etki meydana gelmezken, diğer ajanlarla birlikte kullanımı sonucu toksisite meydana gelebilmektedir (43). Diğer bir katyonik antiseptik olan chlorhexidine ile *Acanthamoeba* keratiti tedavisinde başarılı sonuçlar

elde edilmektedir. Kasirukvangs ve arkadaşları %0.006'lık cholorhexidine solüsyonunun yalnız kullanımı sonucunda beş hastanın dördünde başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir (38).

Brosseur ve arkadaşları, 1994 yılında %1'lik hexamidine ile *Acanthamoeba* keratitinin tedavisini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar öncelikle in vitro olarak, hexamidine'in kist ve trofozoitler üzerine etkisini incelemişler ve oldukça yüksek seviyede öldürücü olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra hastaların tedavisinde kullandıklarında in vitro çalışmaların sonuçları desteklenmiş ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir (9).

Chlorhexidine digluconate ile PHMB'nin kombinasyonu veya hexamidine, pentamidine ve propamidine isethionate yada PHMB ile hexamidin'in debridmen tedavisiyle birlikte kullanılması ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir (28, 29, 55, 67). Propamidine'nin tedavideki başarısı yanında, uzun süreli kullanımında *Acanthamoeba* keratitli hastaların gözlerinde anormalliklere yol açtığı görülmüştür (36).

Katyonik Antiseptikler	Chlorhexidine digluconate	Membran fonksiyonunu inhibe eder.
	Polyhexamethylene biguanide (PHMB)	
Diamidinler	Hexamidine	DNA sentezini inhibe eder.
	Pentamidine	
	Propamidine isethionate (Brolene)	
Aminoglikozitler	Neomycin	Protein sentezini inhibe eder.
	Paramomycin	
İmidazoller	Clotrimazole	Hücre duvarının yapısını bozar.
	Fluconazole	
	Ketaconazole	
	Itraconazole	
	Miconazole	

Tablo 2. *Acanthamoeba* keratitinin tedavisinde kullanılan amoebisidal ajanlar

II. Kortikosteroidler: Topikal kortikosteroidler bazen *Acanthamoeba* keratitinin tedavisinde kullanılmaktadır fakat kullanılmaları tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar, bu ajanların kişinin immün cevabını baskıladığından kullanılmasının uygun olmadığını belirtmektedirler (11). Bunun yanında steroidlerin, kist haline geçişi ve kisten trofozoitlerin çıkışını önlediği bildirilmiştir. Bu durum, hastalığın kontrol altına alınması açısından önemlidir. Fakat bunun dezavantajı, steroid kullanımı ile kistler amebosidal ilaçlara daha dayanıklı hale gelirler (29, 52). Bacon ve arkadaşları, sadece uveit, ağrısız ülser, stromal lizis indikasyonları olanlarda ve keratoplasti sonrası, 77 gözün 49'una topikal steroid uygularken, 72 hastanın 4'üne (şiddetli sklerit olan) flurbiprofen ve topikal steroidi kombine

olarak kullanmışlar ve iyi sonuçlar elde etmişlerdir (6). Illingworth ve arkadaşları antiamoebal tedavi ile hastalığı kontrol altına aldıktan sonra, 23 gözün 18'inde steroid kullanmışlar ve hastalığın ilerlemesini önlemişlerdir (28).

III. Antibakteriyal Ajanlar: *Acanthamoeba* keratitinin ilk görüldüğü yıllarda sıklıkla kullanılan antibakteriyal ilaçlar, etkili antiamoebal ilaçların bulunmasıyla daha az kullanılır hale gelmiştir (43). Bu ilaçların kullanılmasının temel amacı, amip infeksiyonu ile birlikte meydana gelen bakteriyal infeksiyonu temizlemektir. Bacon ve arkadaşları *Acanthamoeba* keratiti tanısı konan 72 hastanın, 25'inin kornea kazıntı materyalinden bakteri izole etmişlerdir (6). Klinik olarak bakteri infeksiyonundan şüphelenildiğinde veya korneadan bakteri izole edildiğinde, antiamoebidal ilaçlara ek olarak antibakteriyal ilaçların kullanılması önerilmektedir, bu durum *Acanthamoeba* keratitini kontrol altına almak açısından önemlidir (29).

IV. Kornea Kazıma Yöntemi: Kornea epitelinde etkilenen bölgenin kazınması ile tedavide başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Holland ve arkadaşları erken dönemde *Acanthamoeba* keratitinin tanısını koymuşlar ve kornea kazıma tedavisi uyguladıktan sonra hastaya antiamoebidal ilaçlar vermişlerdir. Araştırmacılar tedaviden iki hafta sonra korneanın hızla rejenere olarak, normal haline dönüştüğünü ve enfeksiyonun tekrarlama riskinin çok düşük olduğunu belirtmişlerdir (26). Brooks ve arkadaşları tarafından epiteli az etkilenmiş olan kornea epiteline kazıma tedavisi uygulanmışlar ve tedavinin sonucunda hastalığın tekrarlanmadığı

görülmüştür. Aynı zamanda araştırcılar bu tedaviye ek olarak medikal tedavinin uygulanmasını önermektedirler (10).

- V. Penetran Keratoplasti:** Bu tedavi, hastalıklı kornea dokusunun, değişik çaplarda, tam kalınlıkta kornea dokusu olan verici doku ile değiştirilmesidir (69). *Acanthamoeba* keratitinde, maksimum tedaviye rağmen ilerleyen veya perforasyon riski yüksek olan hastalarda, erken dönemde penetran keratoplasti uygulaması gerekli olabilir. Bu hastalarda infeksiyonun tekrarlama riski yüksektir. Görme rehabilitasyonu için keratoplasti, infeksiyon tamamen tedavi edildikten en az altı ay sonra uygulanmalıdır (3, 29).

GEREÇ VE YÖNTEM

I. Amiplerin Elde Edilmesi, Üretilmesi ve İncelenmeleri

Ia. Deneyde Kullanılan Amip Türleri ve Elde Edilmesi:

Deneyde kullanılan *Acanthamoeba* cinsi amipler Viyana Üniversitesi, Medikal Parazitoloji bölümünden elde edilmiştir. Buradan elde edilen iki amip türü deneylerde kullanılmıştır. Bu türler:

A. *Acanthamoeba castellanii* (1BU): Yaygın bir keratit olgusundan, Julia Walochnik tarafından izole edilmiştir. Sekans tipi T4'tür. Bu suş, 30, 34, 37 ve 40°C'lerde çok iyi ürerken, 47°C'de üreme hızı çok yavaştır (75).

B. *Acanthamoeba hatchetti* (2HH): Julia Walochnik tarafından, çok hızlı ilerleyen bir keratit olgusundan izole edilmiştir. Yüksek sıcaklıklara oldukça dayanıklı olan bu suşun sekans tipi T4'tür (75).

Ib. Amiplerin Üretilmesi: Amiplerin üretilmesinde iki farklı ortam kullanıldı. Bunlar:

A. Besleyici Değeri Olmayan Agar (BDOA): Deneyde kullanılan amip türleri Viyana Üniversitesi, Medikal Parazitoloji bölümünden, bu ortam içinde gönderilmiştir. Daha sonra bu besiyeri laboratuvarında hazırlanarak, gelen amiplerin devamı sağlanmıştır. Bu besiyeri şu şekilde hazırlandı: %1.5-2 oranında agar, damıtık su içinde eritildi; otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra, sıcakken, steril koşullarda 9 cm çapa sahip petri kaplarına 10 mL, 7 cm çaplı petri kaplarına 5 mL döküldü ve bir gün bekledikten sonra ekim veya pasajlar için kullanıldı.

Agar besiyerinde üremenin gerçekleşebilmesi için, agar yüzeyine *Escherichia coli* sürüldü. Bu bakteriyi üretmek için, içeriği; 5 g pepton, 2.5 g NaCl, 15 g Betext, 5 g agar ve 500 mL damıtık sudan ibaret olan stok besiyeri hazırlandı. Maddeler damıtık suda eritildikten sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi ve sıcakken, steril koşullarda, steril seroloji tüplerine döküldü ve eğri bir zeminde donması sağlandı. Hazırlanan bu besiyerine, stok besiyerinden pasaj yapıldı ve 24 °C’lik etüvde 24-48 saat inkübe edildi. BDOA’a amipleri pasaj yapmadan önce, steril koşullarda, eküvyon yardımı ile stok besiyerinde üremiş olan bakterilerden sürüldü.

Amip üremesi olan plaklar, açılmadan, ters-yüz durumda 10’luk objektif ile incelendiler. Bu incelemede amipler, sadece trofozoitlerin bulunduğu erken dönemde kontraktıl vakuollerinin ve çekirdeklerinin görünümüyle, daha sonraki dönemlerde de tipik kist görünümüleriyle ayırt edildiler. Bu şekildeki inceleme sonucu amip üremesi olan bölgeler cam kalemi ile işaretlendi. Daha sonra normal duruma getirilen plaklar steril koşullarda açıldı, işaretlenen bölgeden küçük bir parça, steril lansetle kesilip, lanset üzerine alındı ve bu parça, üzerine *E. coli* sürülmüş olan yeni BDOA plağının ortasına ters çevrilerek aktarıldı. Ertesi günden itibaren plaklar yine ters-yüz durumda, mikroskobun 10x objektifinde inceleyerek amip üremesi takip edildi. Bu şekilde amipler monoksenik olarak üretilmiş oldu.

B. Sıvı Besiyeri: Amipler *E.coli* ile birlikte monoksenik olarak üretildikten sonra aksenik kültürleri hazırlandı. Bunun için tamponlu tuzlu su eriyiği (0.120 g NaCl, 3 mg MgCl₂.6H₂O, 3 mg FeSO₄.7H₂O, 0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, 1L Damıtık su) içinde hazırlanan %1 protease peptone, % 1 yeast extract ve %1 glukozdan oluşan PPYG besiyeri kullanıldı (50, 65). Hazırlanan bu besiyerinin pH’ı, 7 olacak şekilde ayarlandı ve otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi. Daha sonra steril koşullarda besiyeri içine 500 IU/mL Penicilline G ve 0.5 mg/mL

Streptomycine eklenerek, hücre kültürü şişelerine 15-20 mL olacak şekilde dağıtıldı.

Sıvı Besiyerine Geçiş: Besleyici değeri olmayan agar ortamında, trofozoitlerin kist haline geçmesi beklendi. Mikroskopik inceleme sonucunda çoğunluğunun kist formunda olduğu belirlenen plaklar, steril koşullarda açıldı ve agar yüzeyi steril olarak hazırlanan Page'in tuzlu su eriyiği (0.120 g NaCl, 0.004 g MgSO₄.7H₂O, 0.004 g CaCl₂.2H₂O, 0.14 g Na₂HPO₄, 0.136 g KH₂PO₄, 1L damıtık su) ile yıkanarak kistler toplandı. Kistler steril santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım atıldı ve çöküntü vortekslelendikten sonra üzerine 5 mL Page'in tuzlu su eriyiğinden eklenerek yine aynı hızda 10 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Son yıkama sonunda bakterileri elimine etmek amacı ile çökelti üzerine % 3'lük HCl çözeltisi eklendi ve bir gece oda sıcaklığında beklendi. Ertesi gün % 3'lük HCl içinde bulunan kistler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, üst sıvı atıldı ve çökelti yine Page'in tuzlu su eriyiği ile 3 kez yıkandı. Son yıkama sonrası, çöküntü vortekslelendikten sonra, içinde 15-20 mL PPYG besiyeri bulunan, hücre kültürü şişelerine aktarıldı ve 37 °C'de inkübe edildi. Ekim yapıldıktan birkaç gün sonra başlamak üzere, inverted mikroskopta amip üremesinin olup olmadığı takip edildi. İlerleyen günlerde amip üremesinin fazla olduğu kültürlerden pasajlar yapıldı. Bu amaçla, öncelikle tabana yapışmış olan trofozoitlerin çıkması için hücre kültürü şişeleri hızla çalkalandı. Daha sonra, steril koşullarda bu besiyerinden 5 mL alınarak, içerisinde 15-20 mL besiyeri bulunan yeni hücre kültürü şişelerine aktarıldı ve yine flasklar 37 °C'de inkübe edildiler.

Ic. Amiplerin İncelenmesi: Üretilen amipler canlı olarak ve çeşitli boyalarla boyanarak olmak üzere iki şekilde incelendiler.

A. Canlı amiplerin görünümlerinin incelenmesi: Agar yüzeyindeki ve PPYG besiyeri içindeki canlı amip trofozoit ve kistleri mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekildi. Agar plakları öncelikle açılmadan 10x objektifte incelenerek amip trofozoit ve kistlerinin yoğun olduğu bölgeler işaretlendi. Daha sonra steril koşullarda plaklar açıldı ve işaretli bölgelerden agar kesilerek lam üzerine alındı. Kesilen agar üzerine lamel kapatıldı ve 10x ve 40x objektiflerde incelendi. Daha sonra başka bir lam üzerine 1-2 damla serum fizyolojik damlatıldı ve agardan kesilen parça ters çevrilerek serum fizyolojik üzerine kondu. Agarda bulunan trofozoit ve kistlerin serum fizyolojik içine geçmesi için bir süre beklendikten sonra agar parçası atıldı ve yine lamel kapatılarak mikroskopta incelendi.

PPYG besiyeri içindeki kistler ve trofozoitlerin hareketleri inverted mikroskopta 10, 20 ve 40'lık büyütmelemlerde incelenerek fotoğrafları çekildi.

C. Amiplerin Boyanarak İncelenmesi: Amiplerin boyanmasında Heidenhain'in demirli hematoksilen boyası, Giemsa, PAP, PAS Schiff, Van Gison, Masson Trikrom, Orsein, Retikülin, Toludin-O, Musicarmin boyaları kullanıldı. Boyama işlemine geçmeden önce, agar plaklarında amip üremesi olan bölgeler belirlendi; bu bölgeler kesilerek plaktan çıkarıldı ve üst yüzeyleri lam yüzeyine gelecek şekilde ters-yüz edilerek lama yerleştirildi. Amiplerin lam yüzeyine geçmesi için 1-1.5 saat bekletildi. Daha sonra amipler Schaudinn fiksatifinde tespit edildikten sonra boyandı.

II. Keme Gözünde Keratit Oluşturma

IIa. Deneyde Kullanılacak Kemeler ve Grupları

A. Kemelerin Türü ve Özellikleri: Deneyde kullanılan kemeler Cumhuriyet Üniversitesi, Deney Hayvanları Bölümünden elde edilmiştir. Tür adı Wistar albino olan kemelerin ortalama ağırlıkları 250 g olarak belirlendi. Deneye başlamadan önce bütün kemelerin korneaları incelenerek normal olup olmadığı kontrol edildi ve kemeler gruplara ayrılarak numaralandırıldı.

B. Deney Grupları: Deneyde kullanılan kemeler, histopatolojik inceleme için oluşturulan grup ve hastalığın gelişiminin ve tedavisinin takip edildiği grup olmak üzere iki temel gruba ayrıldı:

1. Histopatolojik inceleme için oluşturulan grup: Bu grup 12 adet kemeden oluşmaktadır. Bu gruptaki kemelerin sağ gözleri *A. castellanii* (1BU) ile infekte edildi ve inokülasyondan bir hafta sonrasında itibaren her hafta bir kemenin gözünün önce klinik değerlendirmesi yapıldı, daha sonra infekte göz çıkartılarak rutin yöntemlerle histopatolojik kesitleri hazırlandı.
2. Hastalığın gelişiminin ve tedavisinin takip edildiği gruplar: Bu gruplarda, karşılaştırmalı olarak iki farklı *Acanthamoeba* türünün keratit yapma yetenekleri ve keratit oluştuktan sonra uygulanan tedaviye cevaplarını araştırmak amacı ile 6'şar kemenin bulunduğu, 3 grup oluşturuldu.

Grup I : Bu grubu oluşturan kemelerin sağ gözleri *A. castellanii* ile infekte edildi.

Grup II: Bu gruptaki kemelerin sağ gözleri *A. hatchetti* ile infekte edildi.

Grup III: Kontrol grubu olarak belirlenen bu kemelerin sağ gözlerine Page'in tuzlu su eriyiği inoküle edildi.

IIb. Keme Gözüne Yapılan İnokülasyon

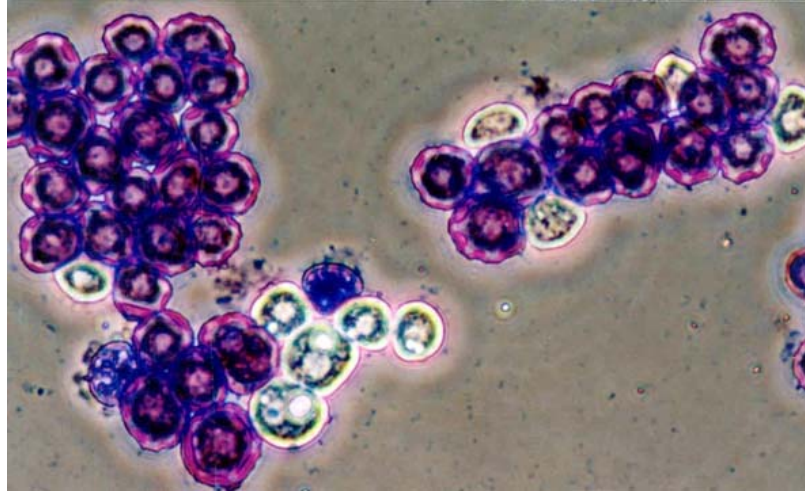
A. Kemelere Uygulanan Anestezi: Kemelere uygulanacak anestezi maddeler ve dozları aşağıda belirtildiği şekildedir:

- Rompun – 10 mg / kg (i.m – s.c)
- Ketamine HCl – 90 mg / kg (i.m)

B. Farelere inoküle edilecek amip süspansiyonunun hazırlanması: PPYG besiyeri içinde üretilmiş ve çoğunluğu kist haline geçmiş olan kültürler inokülasyon için kullanıldı. Öncelikle bu flasklar çalkalanarak tabana yapışmış halde bulunan trofozoitlerin çıkması sağlandı. Daha sonra bu kültür, steril 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı döküldü ve çökelti iki kez Page'in tuzlu su eriyiği ile yıkandı. İki yıkama sonunda üst sıvı döküldü, çökelti vortekslendikten sonra 1 mL'ye tamamlandı.

C. İnokülümdeki amip sayısının ve evrim formunun belirlenmesi: Keme gözüne inoküle edilecek amiplerin sayısı thoma lamı ile belirlendi. Lamelin thoma lamına iyice yapışması sağlandıktan sonra, sayım yapılacak inokülümde steril koşullarda bir damla alınarak lamelin kanarına damlatıldı. 40x objektifte 16 küçük karedeki (bir büyük kare) amipler sayıldı. Amipler sayılırken büyük karenin kenarları üzerinde bulunan amiplerden sadece iki kenardakiler sayıldı diğer iki

kenar üzerinde bulunan amipler bu sayıya ilave edilmedi. Bulunan sayı, $n \times 16 \times 10.000$ (n =amip sayısı) formülüne göre hesaplanarak 1 mL'deki amip sayısı bulundu. Bu sayımla inoküle edilecek amip miktarı, her iki tür için de 1.2×10^6 amip/mL olarak belirlendi. Bakterili olan amip süspansiyonu hazırlanırken, amip süspansiyonu, bakteri süspansiyonu ile karıştırıldı ve amip sayısı 1.2×10^6 amip/mL, bakteri sayısı ise 2×10^4 bakteri/mL olacak şekilde ayarlandı. Bir damla inokülüm ile bir damla metilen mavisi karıştırıp, mikroskopta incelenmesi sonucu inokülümdeki amiplerin evrim formları daha açık bir şekilde belirlendi. Metilen mavisi ile kist formları boyanırken, trofozoitlerin boyanmadığı görüldü (Şekil 6). Buna göre inokülümün % 90'ı kistlerden oluşurken, % 10'unu trofozoitler oluşturdu.



Şekil 6. PPYG besiyerindeki *A. hatchetti* trofozoit ve kistlerinin metilen mavisi ile boyanmış görünümü.

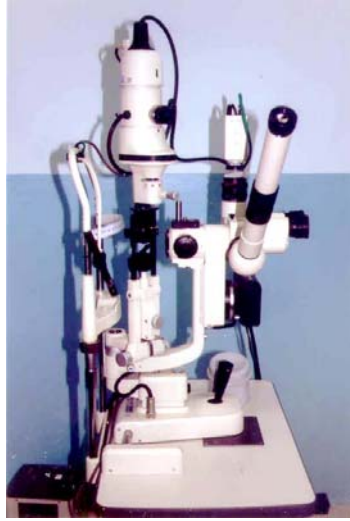
D. İnokülümdeki bakteri süspansiyonunun hazırlanması ve sayısının belirlenmesi: Bakteri süspansiyonu için, stok besiyeri içinde üremiş olan *Escherichia coli* kullanıldı. Steril koşullarda bu besiyeri içinden eküvyon yardımıyla bakteriler alındı ve 1 mL Page'in tuzlu su eriyiği içine aktarıldı. Süspansiyon vortekslenerek bakterilerin eriyik içinde

dağılması sağlandı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, tekrar Page'in tuzlu su eriyiği ile 1 mL'e sulandırıldı. Daha sonra yeniden vortekslenen süspansiyondaki bakteri sayısı, inverted mikroskopta, 40'lık objektifte, thoma lamında sayıldı. Buna göre mililitredeki bakteri sayısı $2 \cdot 10^4$ olarak belirlendi.

E. Keme gözüne yapılan inokülasyon: İnokülasyon işlemi Leica – M841 marka operasyon mikroskobu altında ve 16'lık büyütmede gerçekleştirildi. İnokülasyon işlemine başlamadan önce kemelere genel anestezi uygulandı. Anestezi altındaki kemelerin gözlerinde bulunabilecek yabancı cisimleri temizlemek amacı ile gözler steril serum fizyolojik ile yıkandı. İnokülasyon için 30 G'lik iğneye sahip, mikrolitreli şırıngalar kullanıldı. Öncelikle bu iğne yardımı ile korneanın merkezine yakın bir yerden düz bir kesi yapıldı. Daha sonra, iğne oluşturulan kesiden korneanın merkezinden stroma tabakasına ilerletilerek, 10µL amip bakteri süspansiyonu inoküle edildi. Kontrol grubunda bulunan kemelere aynı yöntemle ve aynı miktarda, steril Page'nin tuz solüsyonu inoküle edildi. Anestezi uygulanmış keme gözlerinde lagoftalmus (göz kapaklarının kapanmaması) gelişti. Lagoftalmus sonrası, gelişmesi muhtemel epitel defektini (exposure keratopatisi) önlemek amacı ile kornea, her 5 dakikada bir serum fizyolojik ile yıkandı.

İnokülasyon işlemi üç kez tekrarlandı. İlk iki denemede keme gözlerine, konsantrasyonu 1.2×10^6 amip/mL olan, bakterisiz amip süspansiyonundan inoküle edildi. Daha sonra istenilen sonuçların elde edilememesi nedeniyle bu kemeler deneyden çıkarıldı ve yeni deney grubundaki kemeler, bakteri-amip süspansiyonu ile infekte edildi.

F. Klinik Değerlendirme: Klinik değerlendirme Topcon – SL . 7F marka binoküler mikroskop ile 25 büyütmede yapıldı (Şekil 7). İnokülasyondan sonra kemeler, genel anestezi altında 3., 5., 7. ve 7. günden sonra birer hafta ara ile ve tedaviye başladıktan sonra yine 1., 3., 5., 7. ve 7. günden sonra birer hafta ara ile klinik olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonrası, aynı mikroskoba takılı olan Topcon – MT-α marka fotoğraf makinası ile bütün keme gözlerinin fotoğrafları çekildi.



Şekil 7. Klinik değerlendirmenin yapıldığı, biyomikroskopun görünümü.

Keme gözlerinin klinik değerlendirilmesi iki şekilde yapıldı:

- 1. Korneanın Direkt İncelenmesi:** Bu incelemede kornea, retroilluminasyonla ve oblik slit ışık altında incelenerek korneadaki opasite değerlendirildi. Retroilluminasyon, korneanın geriden aydınlatılması amacıyla ışığın iris üzerinden yansıtılmasıdır. Bu yöntemle çok küçük epitel ve endotel değişiklikleri, küçük kan damarlarının tespiti söz konusudur. Oblik slit ışık yaygın ışık altında, büyük anormallikleri tespit etmek için kullanılır (3, 69). Korneanın tüm katları ince bir ışık fantı altında incelenir. Opasitenin değerlendirilmesinde, aşağıda belirtilen klinik derecelendirme sistemi kullanıldı (40).

- **Derece III:** İris damarlarının tam seçilemediği, retroilluminasyonla görülebilir opasite.
- **Derece II:** İris damarlarının seçilebildiği, retroilluminasyonla görülebilir opasite.
- **Derece I:** Yalnızca oblik slit ışık ile görülebilir opasite.
- **Derece 0:** Normal.

2. **Korneanın Boyanarak İncelenmesi:** Korneada meydana gelen epitel defektlerini ve ülserlerini belirlemek için kornea floresein ile boyandı. Bu boya epitel tarafından emilmediğinden geniş bir alanda epitel kayıplarını (kornea erezyonu gibi), ve çok küçük hasarların (yüzeysel, noktasal ve keratit gibi) görülebilmesini sağladı. Ticari olarak uzun, ince bir kağıt parçasının uç kısmında bulunan floresein boyası üzerine bir damla % 0.5'lik proparakain hidroklorür (Alcaine) damlatıldıktan sonra boya keme gözüne değdirildi. Kemenin göz kapakları açılıp kapatılarak boyanın gözde dağılması sağlandı. Açık ışık altındaki kobalt mavisi filtre ile yapılan biyomikroskopik muayenede korneadaki defekt bölgesi yeşil renkte görüldü.

G. Tedavi: Oluşturulan *Acanthamoeba* keratitinin tedavisinde iki farklı göz damlası kullanıldı.

A. Ticari adı Neosporin olan, 1 mL'sinde 5000 IU polimiksin B sülfat, 1700 IU neomisin sülfat ve 25 IU gramisidin içeren göz damlası kullanıldı.

B. %0.002 chlorhexidin solüsyonu: Bu solüsyon ticari olarak satılmadığından ilaç firmalarından % 20'lik solüsyonu elde edildi.

Bu solüsyon ticari adı Dacrolux olan steril göz damlası (yapay gözyaşı) ile sulandırıldı ve %0.002'lik solüsyon elde edildi.

Tedaviye 7. haftada başlandı ve kullanılan her iki göz damlası da 6 hafta boyunca 1'er saat aralıklarla, günde 8 defa damlatıldı. Tedaviye başlandıktan sonra, kemelerin tedaviye cevapları, 1, 3, 5, 7 ve 7. günden sonra birer hafta ara ile binoküler mikroskopta değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

III. *Acanthamoeba* Keratitindeki Histopatolojik Gelişimin İncelenmesi

IIIa. İnfekte Gözün Çıkarılması ve Tespiti: Histopatolojik değerlendirme için oluşturulan gruptan, kontrol grubundan ve karşılaştırmalı olarak iki amip türünün keratit yapma yetenekleri ve tedaviye cevaplarının incelendiği gruptaki kemelerin gözlerinden histopatolojik kesitler hazırlandı. İnfekte göz çıkarılmadan önce, binoküler mikroskopta klinik değerlendirilmesi yapıldı ve fotoğrafı çekildi. Daha sonra kemenin boynu kırılarak öldürüldü. İnfekte olan sağ gözün, göz kapakları geriye çekildi; ince uçlu bir pens yardımıyla keme gözü alttan sıkıştırıldı ve ince uçlu özel bir bıçak yardımıyla göz pensle tutulan yerin altından kesilerek çıkarıldı. Çıkarılan göz petriye konuldu ve tespit işlemine kadar kurummasını önlemek için üzerine 7-8 damla kadar serum fizyolojik damlatıldı. Gözler 5-10 dakika içinde patoloji laboratuvarına götürüldü. Gözün daha iyi tespit olabilmesi için, toplu iğne yardımı ile göz arka kısmından delinerek %10'luk formalin içine alındı ve tespit olması için 24 saat beklendi.

IIIb. Histopatolojik Kesitlerin Hazırlanması ve

Değerlendirilmesi: Tespit olan gözlerin arka kısımları bir bistüri yardımıyla kesilerek çıkarıldı, böylece göz, üst tarafta korneanın bulunduğu yarım küre şekline geldi ve bu şekliyle doku kasetlerine yerleştirildi. Dokular, sırasıyla % 70, % 80, %90 ve %100'lük alkollerde birer saat bekletilerek dokularda bulunan su uzaklaştırıldı. Daha sonra ksilende şeffaflaştırılan dokuların, sıvı parafinde 4 defa değişimleri yapıldıktan sonra, yarım küre şeklindeki doku dik bir şekilde bloklandı. Parafin bloklarda bulunan dokuların mikrotom ile 3 µm kalınlığında, her bloktan yaklaşık 60 adet olacak şekilde kesitleri hazırlandı. Kesitler, 60 °C'lik etüvde parafinden arındırıldıktan sonra rutin olarak kullanılan Hematoksilen & Eozin boyasıyla boyandı. Bunun yanında, her bloktan ikişer kesit alınarak PAS boyası ve dokudaki histiyositleri boyayan LCA immün boyası ile boyandı. Elde edilen preparatlar ışık mikroskobu ile incelenerek, uygun alanlar çeşitli büyütmelemlerde fotoğraflandı.

BULGULAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları temel olarak üç gruba ayırarak değerlendirdik:

- I. Deneyde kullanılan amiplerin üretilmesi ve özellikleri ile ilgili bulgular.
- II. Keme gözünde oluşturulan keratit ve tedavisi ile ilgili bulgular.
- III. *Acanthamoeba* keratitinin histopatolojik gelişimi ile ilgili bulgular.

I. Deneyde kullanılan amiplerin üretilmesi ve özellikleri ile ilgili bulgular:

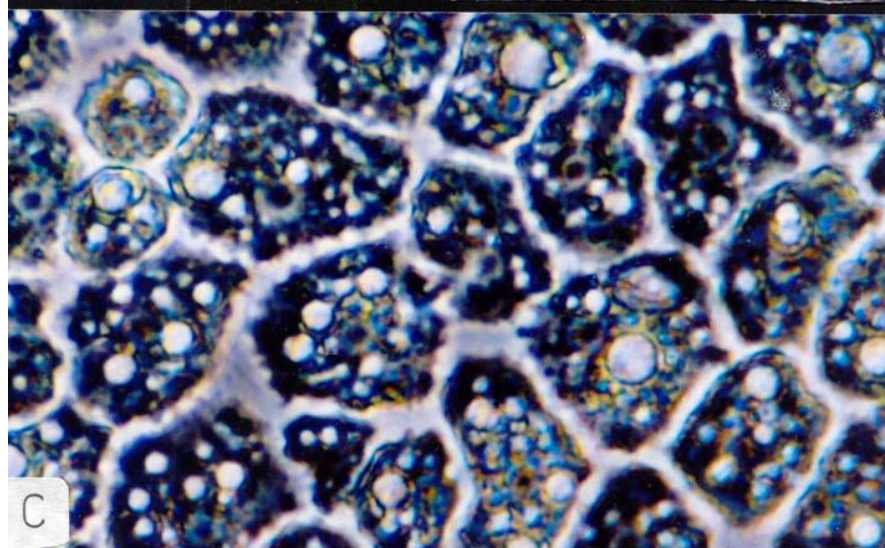
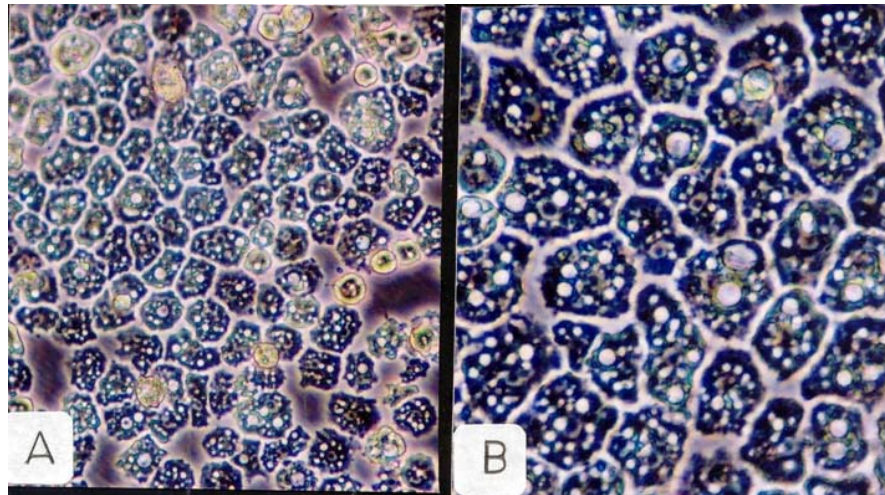
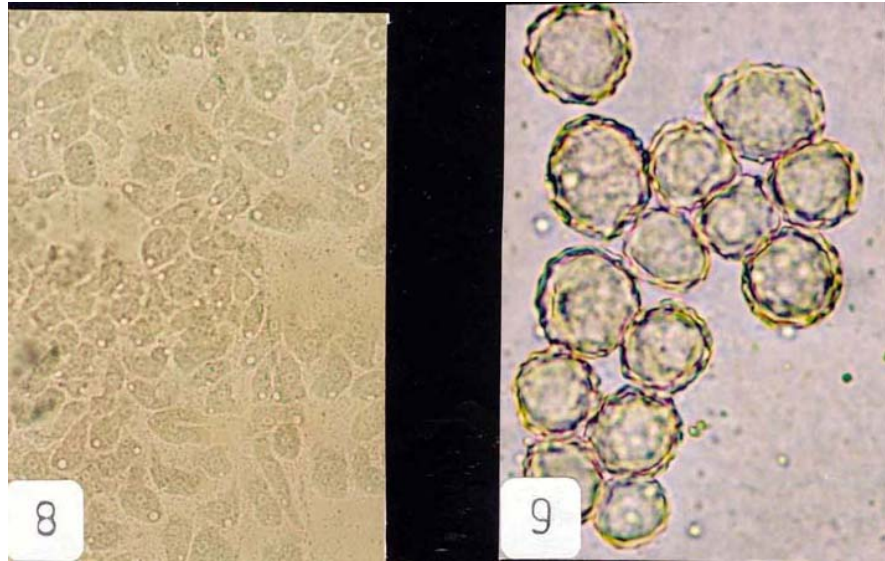
Viyana Üniversitesi, Medikal Parazitoloji Bölümünden BDOA ortamında gönderilen amiplerin devamlılığı aynı besiyerinde kolaylıkla gerçekleştirildi. Bu besiyerinde üretilmiş amipler erken dönemlerdeki incelemelerde, çekirdek ve kontraktıl vakuollerinin görünümü ile ayırt edilirken, daha geç dönemde tipik kist morfolojileri ile ayırt edildiler. Şekil 8'de *A. castellanii* trofozoitlerinin agar üzerindeki yoğunluğu ve trofozoitlerin çekirdek ve kontraktıl vakuollerinin yapısı görülürken, Şekil 9'da yine agar üzerindeki kistlerin tipik şekilleri görülmektedir. Daha sonra bu besiyerindeki kistler toplanıp, yıkanıp, bir gece %3'lük HCl çözeltisinde bekletilmesi ile, çok yoğun olarak bulunan bakteriler elimine edildi ve kontaminasyon olmadan her iki amip türü de PPYG besiyerinde başarılı bir şekilde üretildi. PPYG besiyeri içindeki trofozoitler ve kistler inverted mikroskopta incelendi. Bu incelemede, trofozoitlerin çok kısa bir zamanda, hücre kültürü şişelerinin tabanını tamamen kaplayacak şekilde çok yoğun bir şekilde ürettiği görüldü (Şekil 10-A,B,C). Sıvı haldeki kültürlerde fazla sayıda, çok çekirdekli trofozoitlere rastlandı (Şekil 11, 12). Bunun yanında sıvı besiyerinde iki amibin aralarında köprü oluşturarak yaptıkları

konjugasyon benzeri olaylar sık bir şekilde izlendi. Şekil 13'de ilk görüldüğü andan itibaren takip edilen iki trofozoitin şekillerinde ve çekirdeklerinde meydana gelen değişiklikler takip edildi ve belli aralıklarla fotoğrafları çekildi. İlk görüldüğü anda ince bir köprü ile bağlantılı oldukları gözlenen trofozoitlerde biri büyük bir çekirdeğe sahipken, diğer trofozoitin çekirdeği görülmedi (Şekil 13-A). 5 dakika sonra üstteki trofozoitin çekirdeği bölündü ve alttaki trofozoitte de iki çekirdek belirginleşmeye başladı ve aradaki köprünün orta bölgesi kalınlaştı (Şekil 13-B). 25. dakikadan itibaren artık her iki trofozoitinde ikişer çekirdekleri görünür hale geldi (Şekil 13-C). 30. dakika da üstteki trofozoitte, bir tanesinin çekirdeği yarım olarak görünen üç çekirdeği görüldü. Aradaki bağlantı üstteki trofozoit tarafında oldukça inceldi ve arada daha kalın olan bağlantı bölgesi alttaki trofozoite doğru kaymaya başladı. Alttaki trofozoitin çekirdekciklerinden biri, 30. dakikada çok belirgin değildi (Şekil 13-D). 40. dakikada aradaki köprünün kalın bölgesi alttaki trofozoite birleşti. Her iki trofozoitte de iki çekirdekcik görüldü fakat alttaki trofozoitte daha belirgin olarak çekirdekciklerin ortaları daha açık renkli olarak köprünün başlangıcındaydı (Şekil 13-E). 42. dakikada alttaki trofozoitin biri soluk renkte, biri daha büyük iki çekirdek görüldü (Şekil 13-F) ve köprüdeki kalın bölge üst trofozoite doğru ilerlemeye başladı (Şekil 13-F,G). 75. dakikada trofozoitler birbirine yaklaştı, aradaki köprünün kalın bölgesinde çekirdeciğe benzeyen yuvarlak bir yapı görüldü (Şekil 13-H). 85. dakikada alttaki trofozoitin çekirdekciklerinden biri tamamen kayboldu ve köprünün kalın bölgesi tekrar alttaki trofozoite doğru kaymaya başladı (Şekil 13-I). 95. dakikada alttaki trofozoitin iki çekirdeği de kayboldu (Şekil 13-J). 105. dakikada çekirdekleri kaybolan, alttaki trofozoit uzamaya başladı (Şekil 13-K). 120. dakikada köprünün kalın bölgesi tamamen alttaki trofozoite birleşti, alttaki trofozoit, biraz daha uzadı ve büyük bir çekirdek belirginleşti (Şekil 13-L). 130. dakikada iki trofozoit iyice yaklaştı (Şekil 13-M). 140. dakikada birbirine yaklaşmaya devam eden trofozoitler (Şekil 13-N), 150.

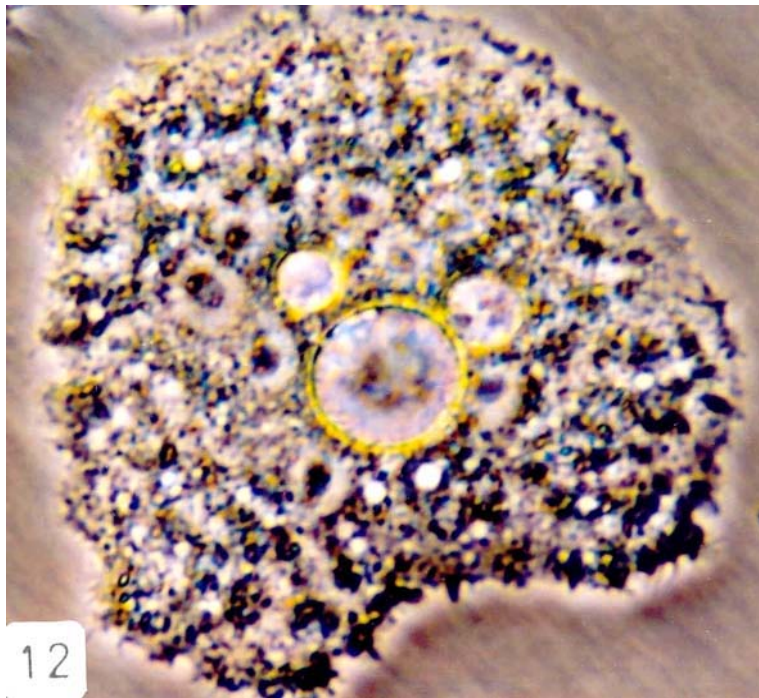
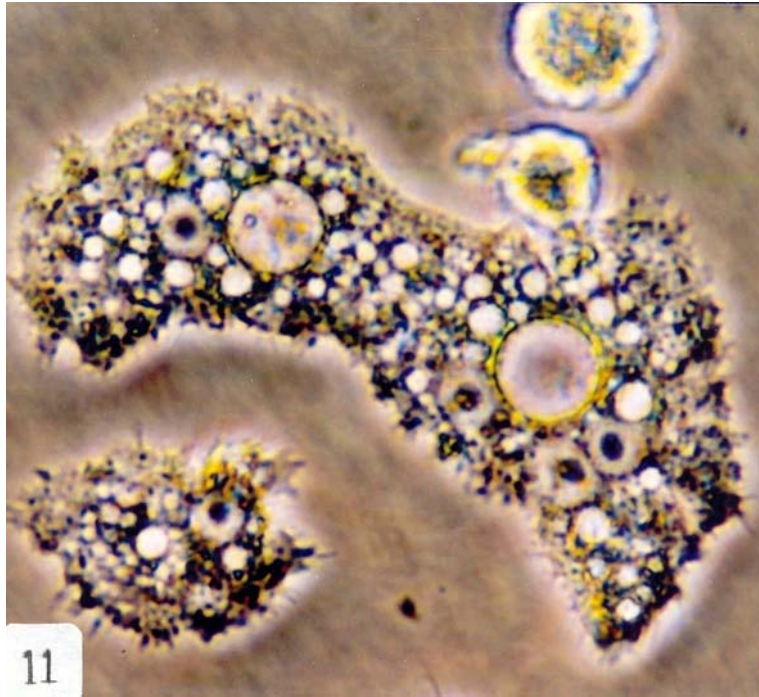
dakikada birleştiler (şekil 13-O).160. dakikada birleşen iki trofozoit boğumlaştı (şekil 13-P) ve 170. dakikada ince köprülerle birbirine bağlanan üç kısıma ayrıldı. (şekil 13-R). 180. dakikada soldaki trofozoit ortadaki ile birleşmeye başladı ve soldaki trofozoite ortadakinden, aradaki köprü aracılığı ile ekirdekciğin aktarıldığı görüldü (şekil 13-S) ve 200. dakikada iki trofozoit bölündü (şekil 13-T).

Şekil 8, 9. Agar üzerindeki *A. castellanii* trofozoit ve kistlerin görünümü. Şekil 8'de 10'luk objektifte, agar üzerindeki trofozoitlerin, kontraktıl vakuolleri ve çekirdekleri görülürken, Şekil 9'da yine agar üzerindeki kistlerin 40'luk objektifteki tipik şekilleri görülmektedir.

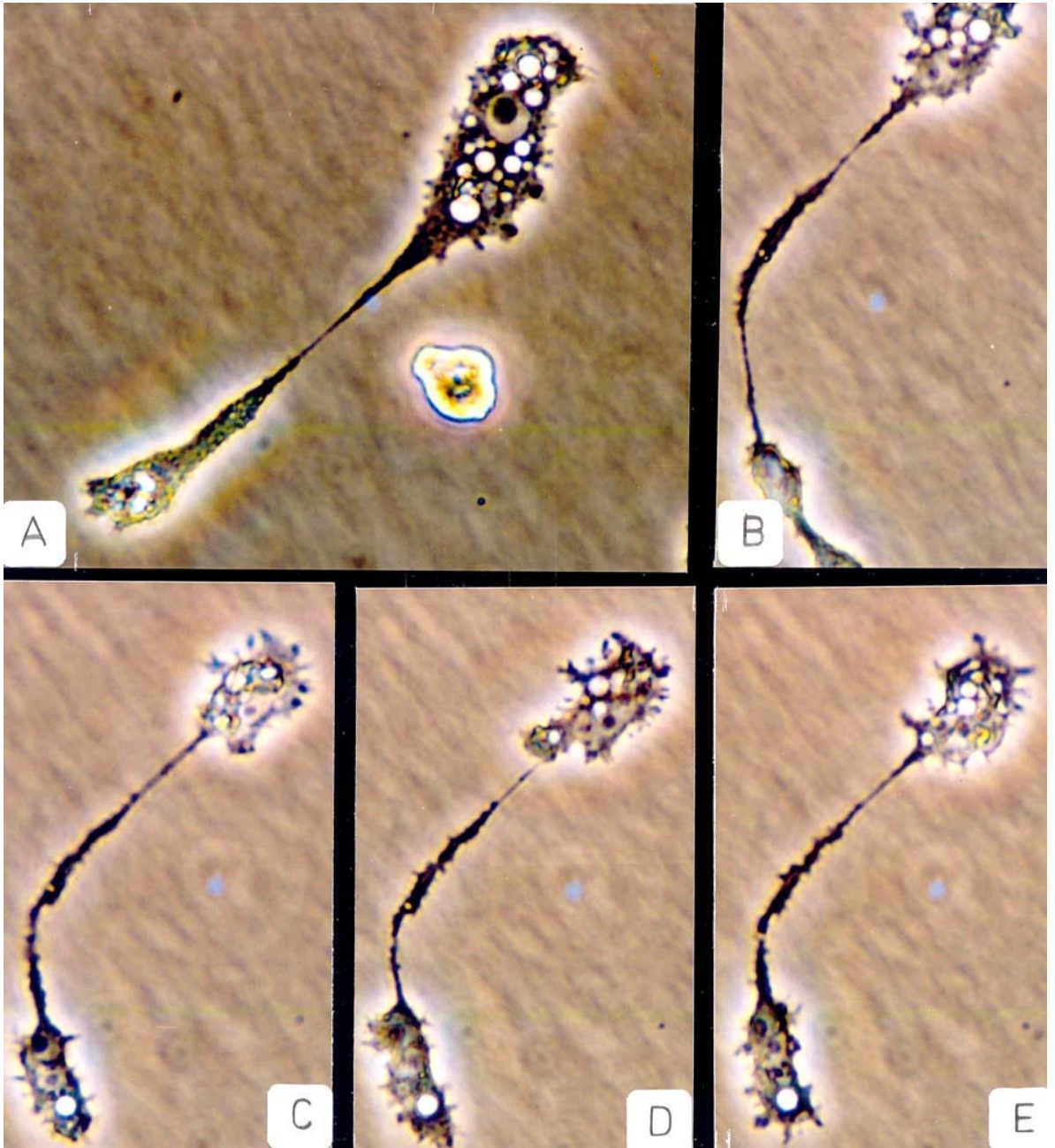
Şekil 10. Sıvı besiyeri içindeki trofozoitlerin, inverted mikroskopta 10'luk (A), 20'lik (B) ve 40'luk (C) objektiflerdeki görünümleri.



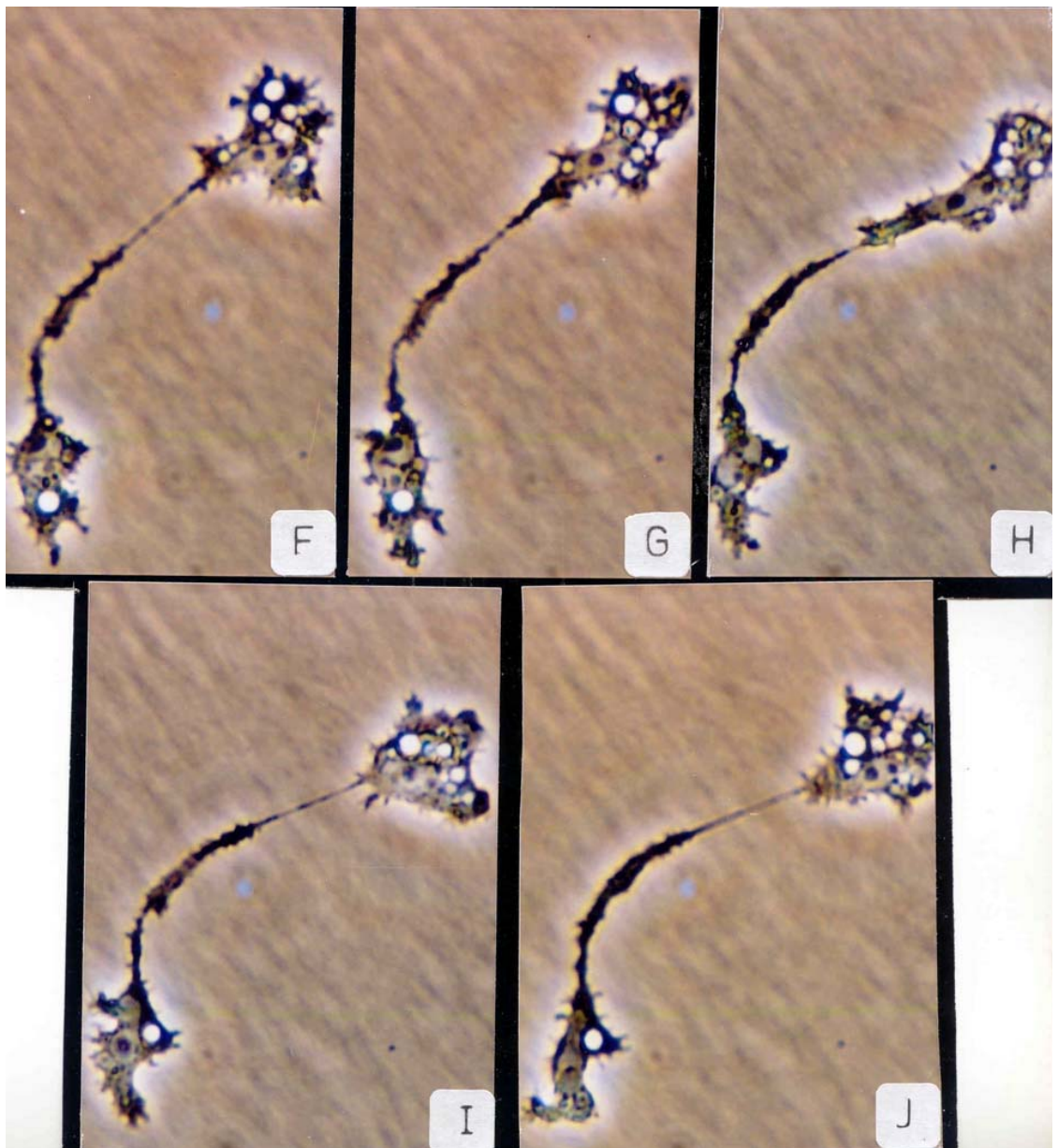
Şekil 11, 12. Sıvı besiyeri içindeki çok çekirdekli trofozoitlerin, inverted mikroskoptaki görünümleri (40x).



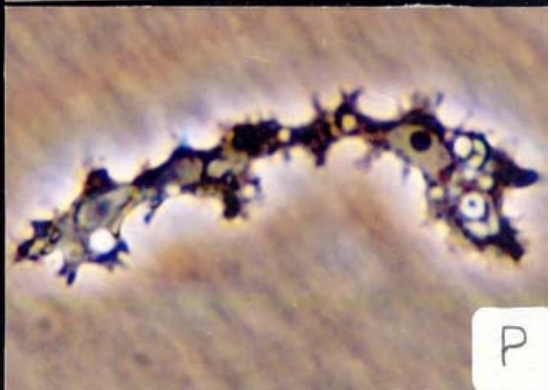
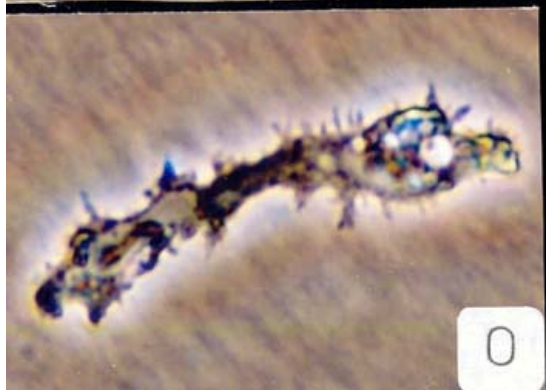
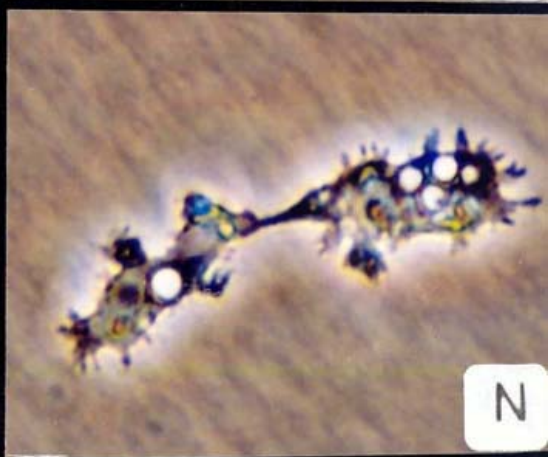
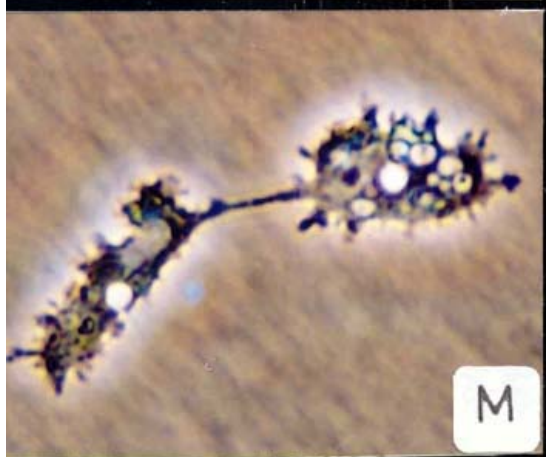
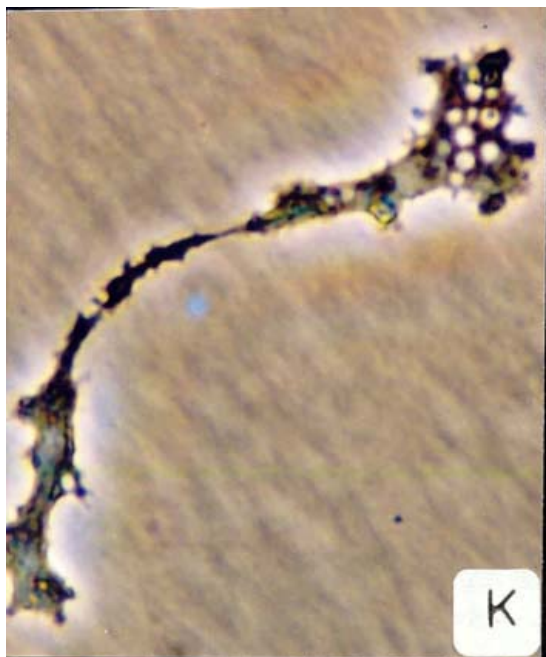
Şekil 13 – A,B,C,D,E. Sıvı besiyerinde, ilk görüldüğü andan itibaren takip edilen iki trofozoitin şekillerinde ve çekirdeklerinde meydana gelen değişikliklerin, belli zaman aralıklarındaki görünüşleri (40x). İlk görüldüğü anda ince bir köprü ile bağlantılı oldukları gözlenen trofozoitlerde biri büyük bir çekirdeğe sahipken, diğer trofozoitin çekirdeği görülmedi (A). 5 dakika sonra üstteki trofozoitin çekirdeği bölündü ve alttaki trofozoitte de iki çekirdek belirginleşmeye başladı ve aradaki köprünün orta bölgesi kalınlaştı (B). 25. dakikadan itibaren artık her iki trofozoitin de ikişer çekirdekleri görünür hale geldi (C). 30. dakika da üstteki trofozoitte, bir tanesinin çekirdeği yarım olarak görünen üç çekirdeği görüldü. Aradaki bağlantı üstteki trofozoit tarafında oldukça inceldi ve arada daha kalın olan bağlantı bölgesi alttaki trofozoite doğru kaymaya başladı. Alttaki trofozoitin çekirdekciklerinden biri, 30. dakikada çok belirgin değildi (D). 40. dakikada aradaki köprünün kalın bölgesi alttaki trofozoite birleşti. Her iki trofozoitte de iki çekirdekcik görüldü fakat alttaki trofozoitte daha belirgin olarak çekirdekciklerin ortaları daha açık renkli olarak köprünün başlangıcındaydı (E).

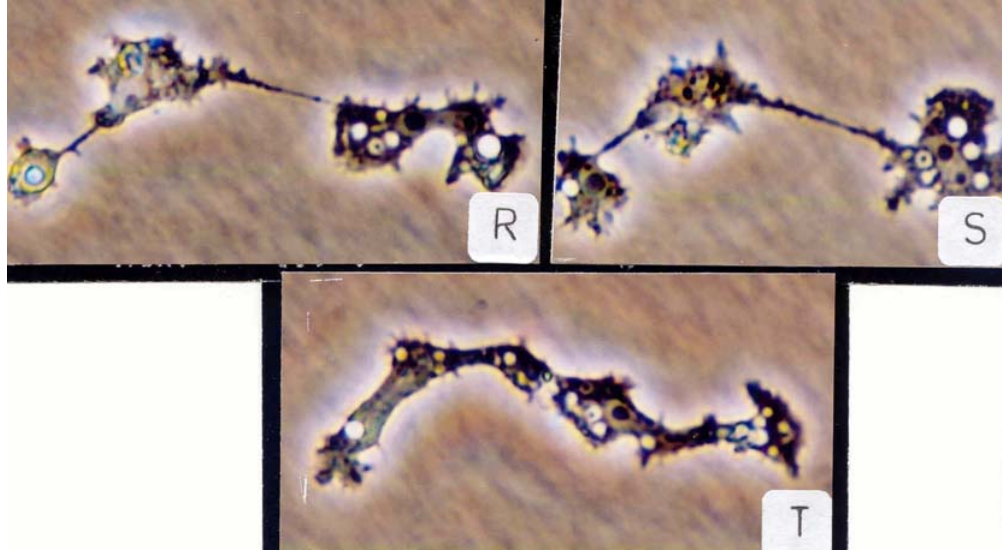


Şekil 13 – F, G, H, I, J. 42. dakikada alttaki trofozoitin biri soluk renkte, biri daha büyük iki çekirdek görüldü (F) ve köprüdeki kalın bölge üst trofozoite doğru ilerlemeye başladı (F,G). 75. dakikada trofozoitler birbirine yaklaştı, aradaki köprünün kalın bölgesinde, çekirdeksi benzeyen yuvarlak bir yapı görüldü (H). 85. dakikada alttaki trofozoitin çekirdekçiklerinden biri tamamen kayboldu ve köprünün kalın bölgesi tekrar alttaki trofozoite doğru kaymaya başladı (I). 95. dakikada alttaki trofozoitin iki çekirdeği de kayboldu (J).



Şekil 13 – K,L,M,N,O,P. 105. dakikada çekirdekleri kaybolan, alttaki trofozoit uzamaya başlandı (K). 120. dakikada köprünün kalın bölgesi tamamen alttaki trofozoite birleşti, alttaki trofozoit, biraz daha uzadı ve büyük bir çekirdek belirginleşti, üstteki trofozoitin çekirdekleri ise daha az belirgin hale geldi (L). 130. dakikada iki trofozoit iyice yaklaştı (M). 140. dakikada birbirine yaklaşmaya devam eden trofozoitlerden, alttaki trofozoitte büyük bir çekirdek ve çekirdeğin yerleştiğini ayrı bir boşluk oluştu (N), 150. dakikada birleştiler ve alttaki trofozoitin büyük çekirdeği daha önce oluşan boşluğa doğru uzamaya başladı (O).160. dakikada birleşen iki trofozoit boğumlaştı ve alttaki trofozoitin çekirdeği bölündü (P).

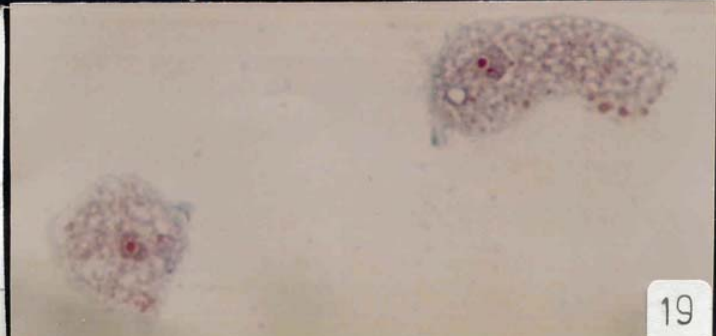
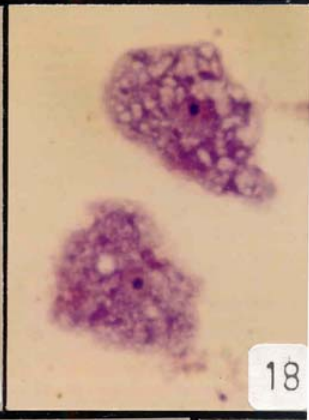
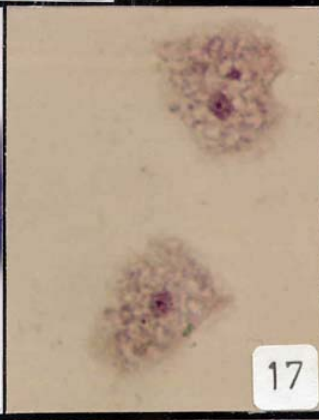
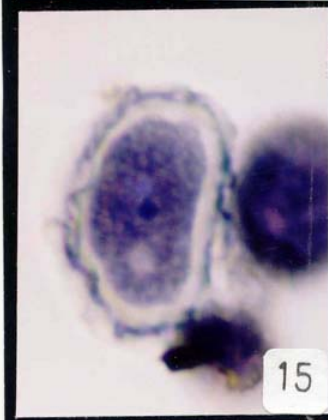
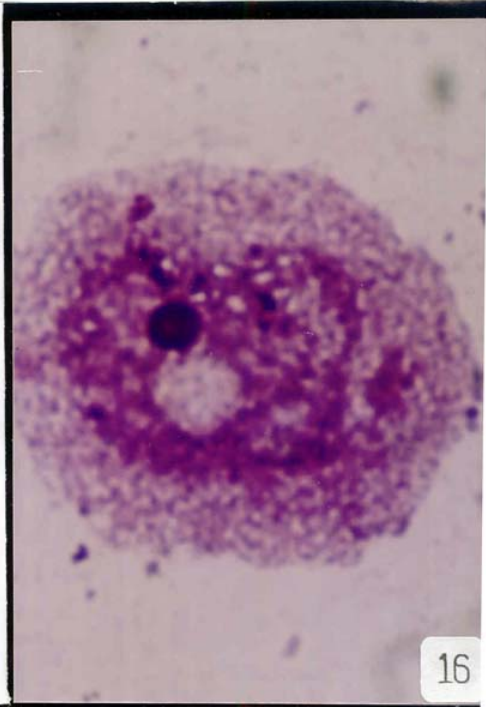
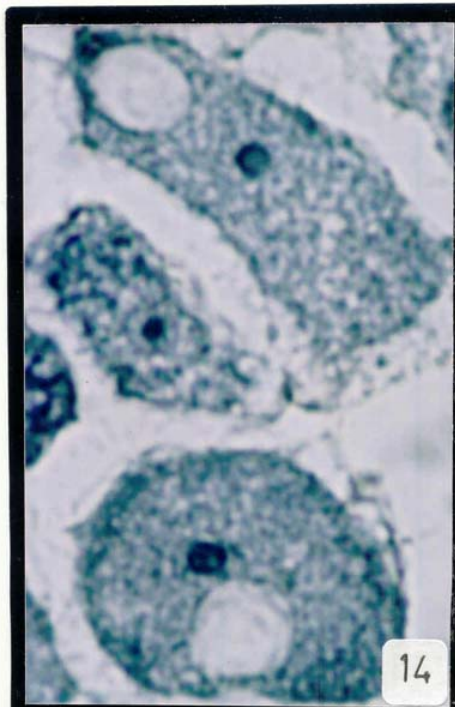




Şekil 13 – R,S,T. 170. dakikada ince köprülerle birbirine bağlanan üç kısma ayrıldı. (Şekil 13-R). 180. dakikada soldaki trofozoit ortadaki ile birleşmeye başladı ve soldaki trofozoite ortadakinden, aradaki köprü aracılığı ile çekirdeciğin aktarıldığı görüldü (Şekil 13-S) ve 200. dakikada iki trofozoit bölündü (Şekil 13-T).

Amiplerin boyanmasında Heidenhain'in demirli hematoksilin boyası (HHDH), Giemsa, PAP, PAS Schiff, Van Gison, Masson Trikrom, Orsein, Retikülin, Toludin-O ve Musicarmin boyları kullanıldı. Kullandığımız boylardan HHDH, Giemsa, PAS Schiff, Mason Trikrom, Toludin-O boyları, amiplerin hücre yapılarından, çekirdeklerini, çekirdekciklerini, kontraktıl vakuollerini, ektoplazma ve endoplazmalarını ayırt edecek şekilde boyadı. Şekil 14'de *A. castellanii* trofozoitleri, Şekil 15'de ise kisti HHDH ile boyanmış durumda görülürken, Şekil 16'da Giemsa, Şekil 17'de PAS Schiff, Şekil 18'de Toludin-O, Şekil 19'da ise Mason Trikrom ile boyanmış trofozoitler görülmektedir. Retikülin, PAP ve Van Gizon boyları ile boyanmış amipler, zeminle ayırt edilemeyecek kadar soluk renkte boyanırken, Musicarmin ve Orsein boyları ile trofozoitlerin hücre yapıları ayırt edilemedi.

Şekil 14-15-16-17-18-19. *A. castellanii* trofozoitlerinin farklı boyalarla boyanmış görünümü. Şekil 14’de trofozoitler (100x), Şekil 15’de ise bir kist (100x) HHDH ile boyanmış durumda görülürken, Şekil 16’da Giemsa (100x), Şekil 17’de PAS Schiff (40x), Şekil 18’de Toludin-O (40x), Şekil 19’da ise Masson Trikrom (40x) ile boyanmış trofozoitler görülmektedir.

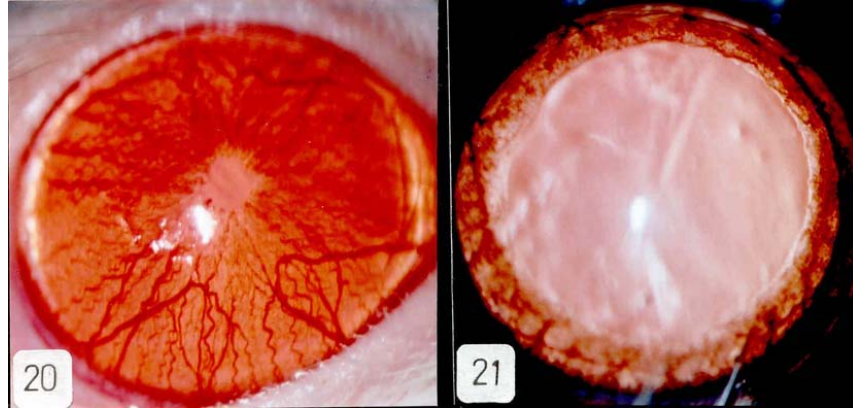


II.Keme gözünde oluşturulan keratit ve tedavisi ile ilgili

bulgular:

Araştırmamızın başlangıcında yaptığımız ilk iki denememizde, keme gözlerine, bakterisiz, amip miktarı 1.2×10^6 amip/mL olan süspansiyon inoküle edildi. Bu iki denememizde, üçüncü günden itibaren keratitin geliştiği, fakat bu oluşan keratitin 5-10 gün içerisinde iyileştiği izlendi. Kemelerde oluşturduğumuz keratiti daha uzun süre takip etmeyi planladığımızdan, bu kemeleri deneyden çıkararak, yeni deney grubuna bakteri-amip süspansiyonu inoküle ederek oluşturduğumuz keratitle, çalışmamıza devam ettik.

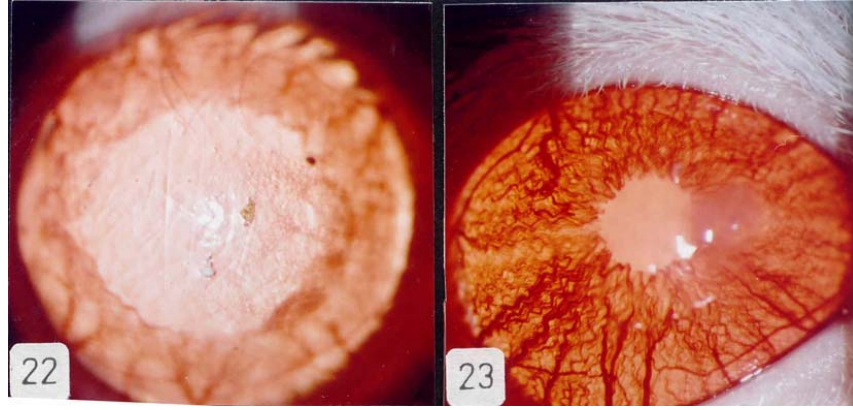
İki farklı *Acanthamoeba* türünün bakteri ile birlikte göze inokülasyonu sonucu bütün kemelerde *Acanthamoeba* keratiti gelişti. Normal bir keme korneası, Şekil 20 ve Şekil 21’de görüldüğü gibi saydam, damarsız iken irise ait damarlar oldukça belirgin olarak izlendi. Şekil 20’de normal keme korneası pupil myotik halde görülürken, Şekil 21’de pupil dilate durumda görülmektedir.



Şekil 20 – Şekil 21. Normal keme gözünün görünümü. Şekil 20’de normal keme korneası pupil myotik halde görülürken, Şekil 21’de pupil dilate durumda görülmektedir (25x).

Acanthamoeba türü amiplerle infekte olan keme gözlerinde, epitelyal ödem, punktata epitelyopati, ileri aşamalarda korneal ülser, stromal infiltratlar, damarlaşma ve sonrasında da pannus dokusu gelişimi izlendi.

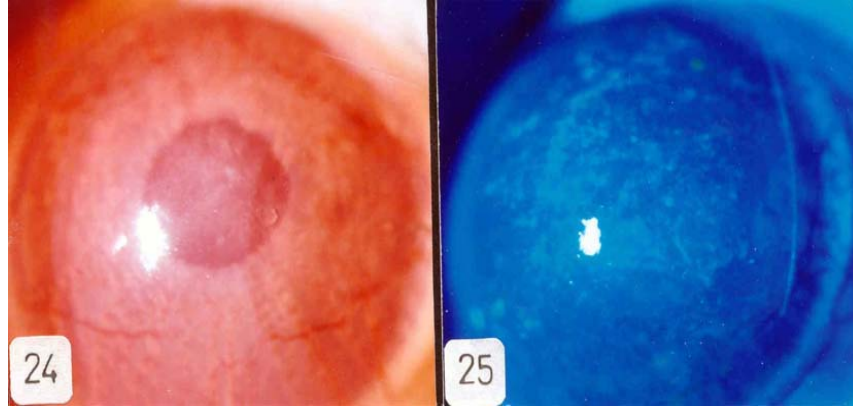
Epitelyal Ödem: Endotel yetmezliğinin önemli bir belirtisi olan epitelyal ödem, başlangıçta normal kornea röllesinin kaybı şeklinde görülürken, ciddi olgularda veziküller ve büller (içi sıvı ile dolu veziküller) şeklinde görülür. Şekil 22’de korneadaki epitelyal veziküller, Şekil 23’de ise büll formunda epitelyal ödem görülmektedir.



Şekil 22-23. Korneada oluşan epitelyal ödemin görünümü. Şekil 22’de korneadaki epitelyal veziküller, Şekil 23’de ise büll formunda epitelyal ödem görülmektedir (25x).

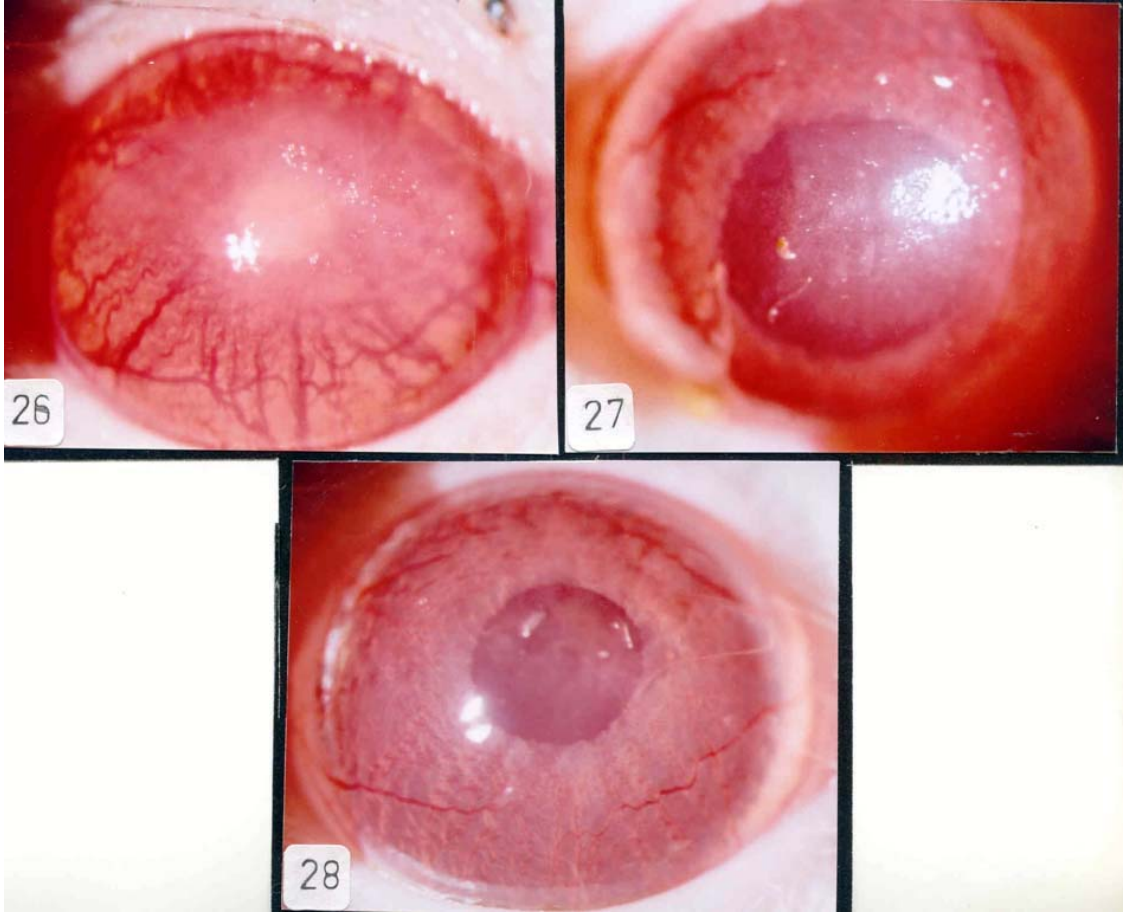
Punktata Epitelyopati ve Korneal Ülser:

Punktata epitelyopati ince, zeminden hafifçe çökük, gri-beyaz noktalarla karakterize olan epitelyal erozyonlar olup, floresein ile iyi boyanır. Bunlar, çeşitli kornea problemlerinde görülen ve spesifik olmayan lezyonlardır. Şekil 24’de punktata epitelyopatinin slit ışık altındaki görünümü, Şekil 25’de ise aynı gözün floresein ile boyanıp, biyomikroskopta, kobalt mavisi filtresi altındaki epitel defektleri görülmektedir.



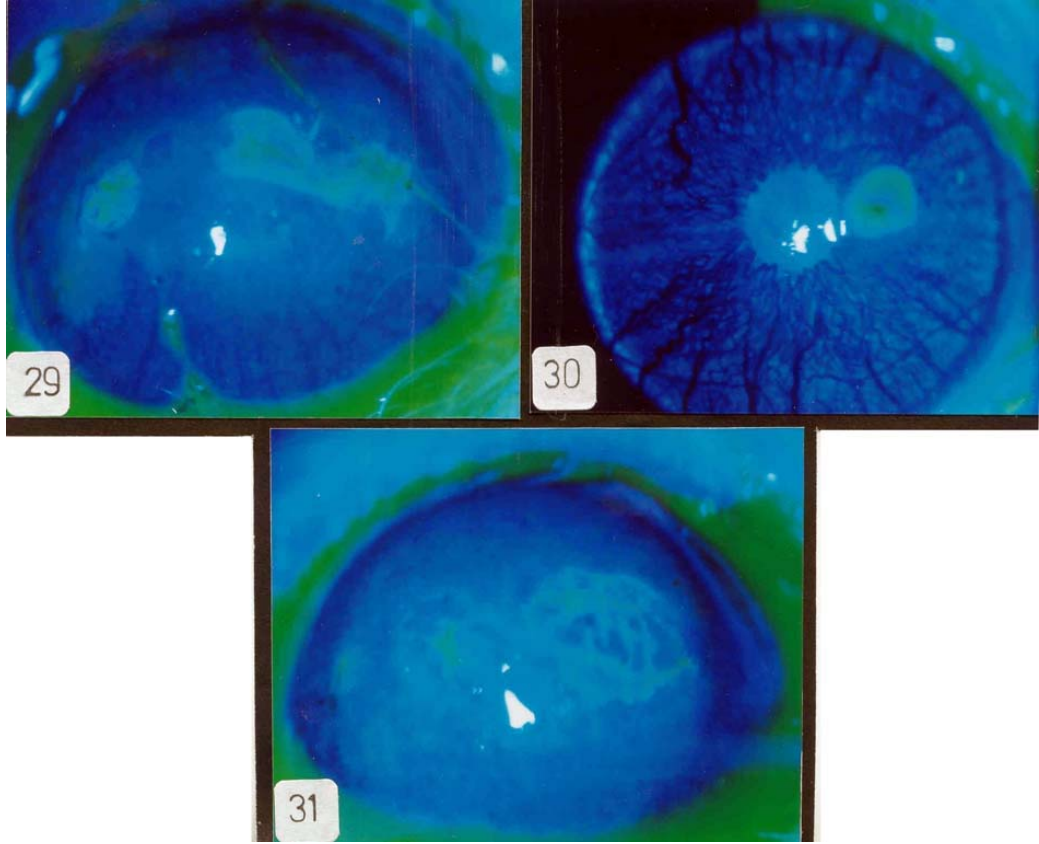
Şekil 24-25. Korneada meydana gelen punktata epitelyopatinin görünümü. Şekil 24’de punktata epitelyopatinin slit ışık altındaki görünümü, Şekil 25’de ise aynı gözün floresein ile boyanıp, biyomikroskopta, kobalt mavisi filtresi altındaki epitel defektleri görülmektedir (25x).

Punktata epitelyopatinin ilerlemesiyle, yani geniş alanlara yayılmasıyla, farklı derecelerde opasiteler oluşur. Çalışmamızda oluşturduğumuz deneysel *Acanthamoeba* keratitinde opasitenin değerlendirilmesinde, klinik derecelendirme sistemi kullanıldı. Buna göre opasite 4 farklı derecede değerlendirildi. III. Derecedeki opasitede, Şekil 26’da görüldüğü gibi, iris damarlarının tam seçilemediği, sadece retroilluminasyonla görülebilen opasite vardır. II. derece opasitede, iris damarlarının seçilebildiği, retroilluminasyonla görülebilen opasite gelişti (Şekil 27). Derece I’de yalnızca oblik slit ışık ile görülebilen opasite görülürken (Şekil 28), derece 0 normal kornea olarak değerlendirildi (Şekil 20, 21).



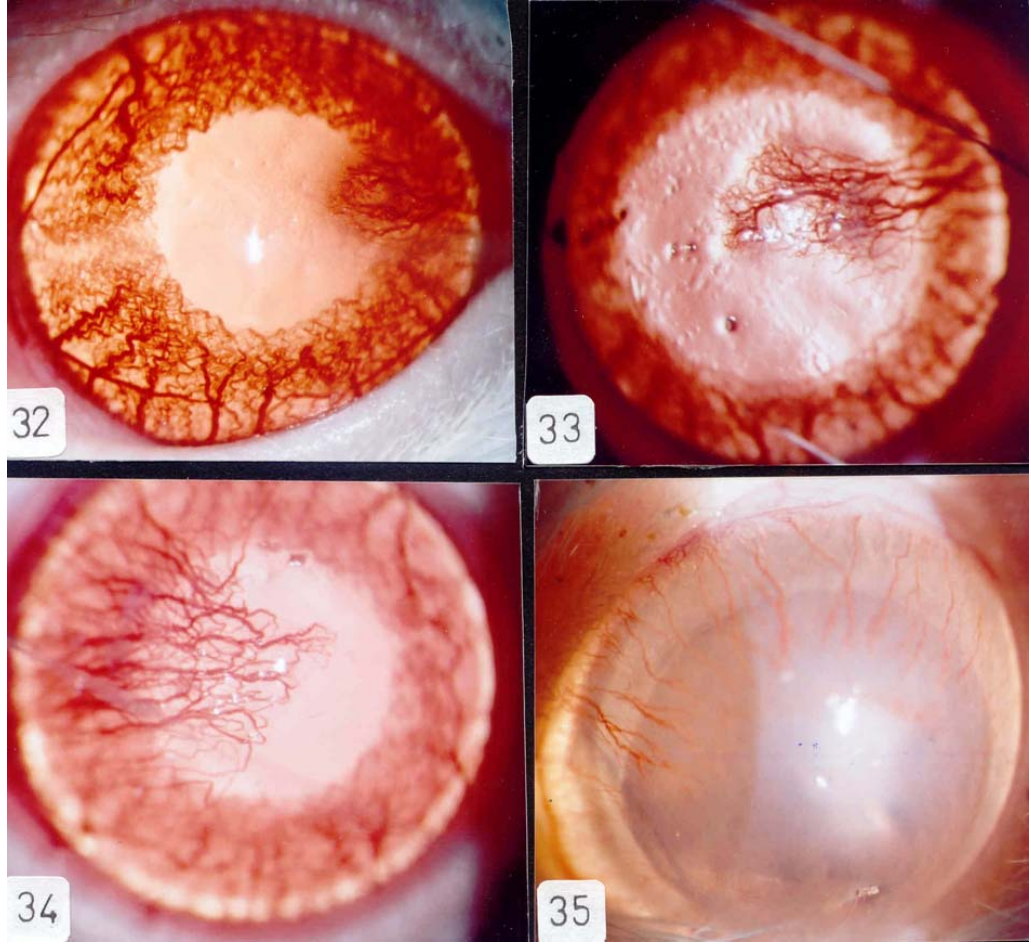
Şekil 26-27-28. Korneada, farklı derecelerde meydana gelen opasitenin görünümü. Şekil 26'da III. derece, Şekil 27'de II. derece, Şekil 28'de ise I. derecede opasite görülmektedir.

Epitel defekti daha geniş ve derin bir hal aldığında korneal ülser olarak adlandırılır. Korneadaki ülser floresein ile boyanarak belirlendi. Şekil 29'da geniş alanları kaplayan ülser (coğrafik ülser), Şekil 30'da, keskin sınırlı, derin yerleşimli ülser (nodüler ülser), Şekil 31'de ise dentritik ülserin oluşumu görülmektedir.



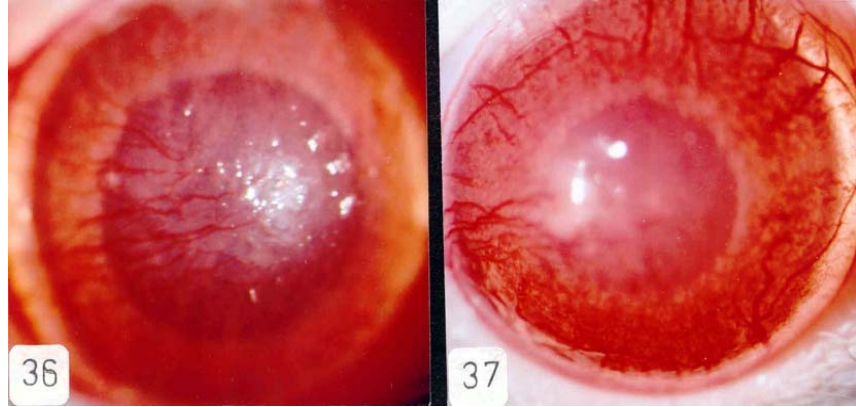
Şekil 29-30-31. Floresein ile boyanarak belirlenen korneal ülserin görünümü. Şekil 29’da coğrafik ülser, Şekil 30’da, nodüler ülser, Şekil 31’de ise dentritik ülserin oluşumu görülmektedir (25x).

Stromal Damarlanma: Çeşitli kornea hastalıklarında ortaya çıkabilir. Yüzeysel lokalize damarlar, spesifik kornea lezyonlarıyla birlikte gözlenir ve kıvrımlı bir gidiş gösterir, buna karşın derin damarlanma kornea içinde düz gidiş gösterir. Şekil 32’de erken dönemde, korneadaki periferik damarlanma görülürken, Şekil 33, 34’de daha geç dönemdeki damarlanma görülmektedir. Şekil 35’de ise *A. hatchetti* infeksiyonunda, ikinci haftada, korneadaki 360°’lik damarlanma ve infiltrasyon görülmektedir.



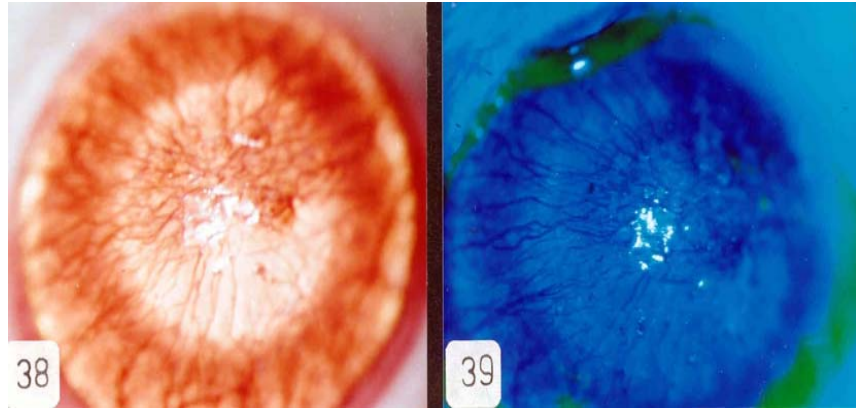
Şekil 32-33-34-35. Korneada farklı derecelerde meydana gelen vaskülarizasyon görülmektedir. Şekil 32 'de *A. castellanii* ile infekte keme gözündeki erken dönemde (3. Hafta), Şekil 33 ve 34'de ise daha geç dönemdeki vaskülarizasyon (sırasıyla, 6 ve 7. hafta) görülmektedir. Şekil 35'de *A. harchetti* infeksiyonunda, 2. haftada, korneadaki 360°'lik damarlanma ve infiltrasyon görülmektedir (25x).

Stromal İnfiltratlar: Aktif inflamasyonu gösterir, lokositlerden oluşur. Biyomikroskopta fokal, granüler infiltratlar olarak görülür. Şekil 36 ve 37'de periferik vaskülarizasyonla birlikte stromal infiltrasyon görülmektedir.



Şekil 36-37. Korneada oluşan, periferik vaskülarizasyonla birlikte stromal infiltrasyon görülmektedir (25x).

Pannus: Fibrovasküler dokunun limbustan subepitelyal mesafeye doğru içe yürümesidir. Şekil 38’de oblik ışık altında, Şekil 39’da ise floreseinle boyanmış durumu görülmektedir



Şekil 38-39. Şekil 38’de korneadaki pannus oluşumunun oblik ışık altında, Şekil 39’da ise floreseinle boyanmış durumu görülmektedir (25x).

A) *A. castellanii*'nin keme gözlerinde oluşturduğu keratitin bulguları: *A. castellanii* ile infekte edilen 6 kemenin hepsinde keratit gelişti. Son incelemede, II. derecede opasite geliştiği belirlenen kemelerden biri 15. günde öldü. Keme gözlerine *A. castellanii* inoküle edilerek keratit oluşturulan 5 kemenin 4'ünde 3. derecede opasite görülürken (% 80), 1 tanesinde (% 20) I. derecede opasite gelişti. İnfekte keme gözlerinin hepsinde farklı derecelerde periferik vaskülarizasyon gelişti. Damarlanma, 5 kemenin 3'ünde (% 60) 3. haftada başlarken, 1 tanesinde 2. haftada (%20), 1 tanesinde de 9. haftada yani tedavinin başlangıcından 2 hafta sonra başladı. III. derecede opasite gelişen 4 keme gözünde damarlaşıma çok yoğunken, I. derecede opasite gelişen kemenin 9. haftasında oluşmaya başlayan damarlaşıma az yoğunlukta idi. Korneada meydana gelen ülser, 2 kemede (% 40), coğrafik ülser şeklinde yani geniş alanları kaplarken, 2 tanesinde (% 40) dentritik ülser, 1 tanesinde (%20) ise keskin sınırlara sahip, derin yerleşimli (nodüler boyanma gösteren) ülser şeklindeydi.

B) *A. hatchetti*'nin keme gözlerinde oluşturduğu keratitin bulguları: Bu tür amip ile infekte edilen bütün keme gözlerinde keratit gelişti. Kemelerden biri, 3. haftada, gözünde 3. derecede opasite, geniş alanlı ülser ve 360⁰'lik yoğun bir vaskülarizasyon oluşmuşken öldü. Böylece deney grubumuzda 5 keme kaldı. *A. hatchetti* ile infekte edilen 5 kemenin ikisinde 2. derecede (% 40), 3 tanesinde ise 1. derecede (%60) opasite gelişti. Bu gruptaki kemelerin sadece bir tanesinde 6. haftada yoğun olmayan bir vaskülarizasyon gelişti. Kemelerde oluşan korneal ülser, 3 kemede oldukça geniş alanları kaplarken (% 60), 2 tanesinde (% 40) korneadaki hasar, punktat epitelyopati düzeyindeydi.

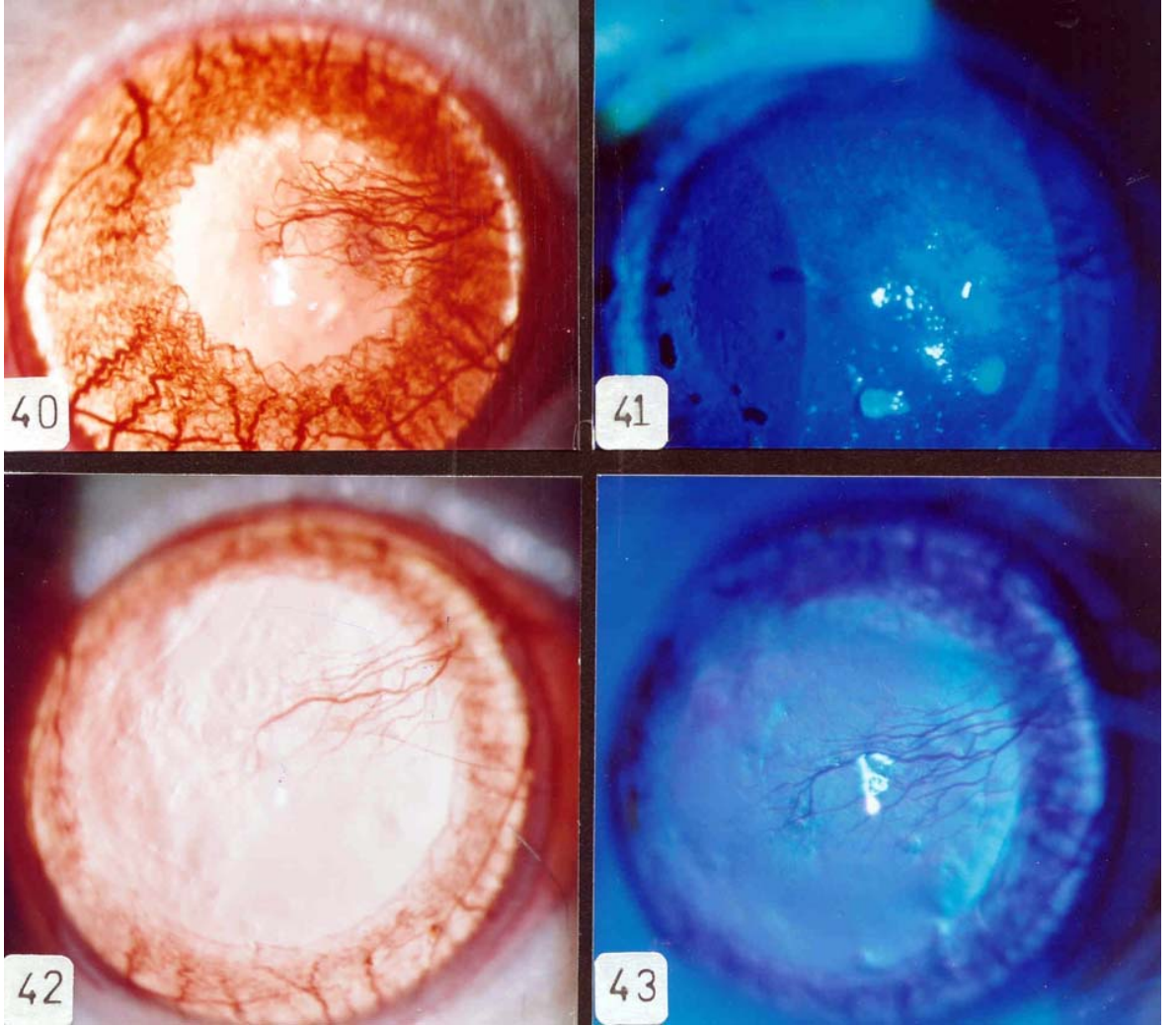
Tedavi:

Oluşturulan *Acanthamoeba* keratitinin tedavisinde, ticari adı Neosporin olan, 1 mL'sinde 5000 IU polimiksin B sülfat, 1700 IU neomisin sülfat ve 25 IU gramisidin içeren göz damlası ve %0.002 cholorhexidin solüsyonu kullanıldı. Kullanılan her iki göz damlası da 6 hafta boyunca 1'er saat aralıklarla, günde 8 defa damlatıldı.

A. castellanii ile infekte edilen bütün keme gözleri, tedaviye başlandıktan 6 hafta sonra iyileşti. III. Derece opasite gelişen gözlerde, pannus dokusu gelişimi ile birlikte göz bütünlüğünün korunduğu görüldü. Tedavi öncesi yoğun olan vaskülarizasyon, tedavi ile gerileme gösterdi ve tedavi sonrası hayalet damar gelişimi ile iyileşme izlendi. Şekil 40'da *A. castellanii* ile infekte keme gözünün oblik ışık altındaki tedaviden önceki görünümü, Şekil 41'de ise aynı gözün floreseinle boyanmış hali görülmektedir. Şekil 42 ve 43 ise aynı gözün tedaviden sonraki görünümüdür.

A. hatchetti ile infekte edilen gözlerde oluşan keratit, daha hafif bir seyir gösterdi. Bu yüzden de bu gruptaki kemeler, tedaviye daha iyi ve çabuk cevap verdi. Gözlerinde birinci ve ikinci derecede opasite gelişen kemeler, 4 hafta içinde iyileşirken, 6. haftada görme aksını kapatmayan, düşük yoğunluklu, periferik vaskülarizasyon gelişimi tedavi sonrası gerileme gösterdi.

A. castellanii ile infekte edilen gözlerde tablo daha hızlı ve kötü seyrederken, *A. hatchetti*, invaziv olmayan ve daha yavaş seyirli bir tablo gösterdi. Bu klinik tabloyla uyumlu olarak, *A. hatchetti* ile infekte gözler tedaviye daha iyi cevap verirken, *A. castellanii* ile infekte gözler, pannus oluşumu ile birlikte iyileşme gösterdi.



Şekil 40-41-42-43. *A. castellanii* ile infekte olan keme gözünün, tedaviden önceki ve tedaviden sonraki durumu görülmekte. Şekil 40'da *A. castellanii* ile infekte keme gözünün oblik ışık altındaki tedaviden önceki görünümü, Şekil 41'de ise aynı gözün floreseinle boyanmış hali görülmektedir. Şekil 42 ve 43 ise aynı gözün tedaviden sonraki görünümüdür (25x).

III. *Acanthamoeba* keratitinin histopatolojik gelişimi ile ilgili bulgular:

Histopatolojik inceleme için, 12 kemededen oluşan bir grup oluşturularak, bu gruptaki kemelerin gözleri *A. castellanii* ile infekte edildi. Her hafta bir kemenin gözünün histopatolojik incelemesini yapmayı planladığımız ve toplam 12 hafta sürecek olan çalışmamızda, iki kemenin ölmesi nedeniyle, inceleme 10 hafta (70 gün) takip edilebildi. Bunun yanında hem kontrol grubundaki kemeler hem de *A. castellanii* ve *A. hatchetti*'nin keme gözlerinde keratit yapma yeteneklerinin ve keratit oluştuktan sonra uygulanan tedaviye cevaplarını araştırmak için oluşturulan gruplardan da, tedavi sonrası histopatolojik kesitleri hazırlanarak incelendi.

Histopatolojik kesitleri hazırlanmadan önce bütün keme gözlerinin klinik değerlendirilmesi yapıldı ve fotoğrafları çekildi. Buna göre ilk hafta incelemesinde periferik vaskülarizasyonla birlikte geniş alanları kaplayan ülser görülürken, ikinci haftada korneanın yarısını kaplayan opasite, yoğunluğu az olan bir vaskülarizasyon ve birinci haftaya göre daha hafif bir ülser görüldü. Üçüncü haftada oluşan keratit punktat epitelyopati düzeyinde, dördüncü haftada, geniş alanları kaplayan opasite ve ülser oluşumu, beşinci haftada yine ülser oluşumu ile birlikte opasite belirlendi. Altıncı haftada, korneanın yarısından fazlasını kaplayan opasite ve derin yerleşimli bir ülser, yedinci haftada ise yine oldukça geniş bir yayılım gösteren ülser belirlendi. Sekizinci haftada, korneanın yarısını kaplayan opasite ve geniş yayılım gösteren fakat çok derin olmayan ülser oluşumu görüldü. Dokuzuncu haftanın klinik değerlendirmesi sonucu, ikinci derecede opasite ve çok derin olmayan fakat geniş alanları kaplayan ülser görülürken, onuncu haftada infekte gözde herhangi bir opasite ve ülser tespit edilmedi.

Kontrol grubundaki keme gözlerinin histopatolojik olarak incelenmesi sonucu, korneada herhangi bir hasar belirlenmedi. Şekil 44'de normal bir keme korneası görülmektedir. Buna göre en üstte 3-4 tabakadan oluşan bir epitel tabakası, onun altında çok ince bir çizgi şeklinde görülen bowman

tabakası, bu tabakanın altında korneanın yaklaşık olarak %80-90'ını oluşturan, damarsız, kollajen liflerden oluşan kornea stroması ve onun altında ise desement zarı ve endotel tabakası bulunmaktadır.

A. castellanii ile infekte gözlerin histopatolojik olarak incelenmesi sonucu, genellikle nötrofillerden ve eozinofillerden oluşan bir immün yanıt oluştu (Şekil 45, 46, 47, 48). Bunun yanında bazı kemelerde lenfositlerin de inflamasyona katıldığı gözlemlendi. Kornea dokusunda, stromal lamellada bozulma, yoğun vaskülarizasyon ve ödem (Şekil 45, 46, 47, 48, 49) tespit edildi. Stroma içinde amip trofozoitleri görülürken (Şekil 49, 50, 51, 52), kistlere rastlanmadı. Amip görülen bloklardan, tekrar kesitler alınarak, PAS ve LCA immün boyası ile boyandı. Amipler PAS boyası ile boyanırken, LCA immün boyası ile boyanmadı. Böylece, amip trofozoiti diye tanımladığımız yapıların histiyosit olma olasılığı ortadan kalktı.

Histopatolojik incelemenin birinci ve ikinci haftasında, oldukça yoğun damar oluşumu görüldü. Bu haftalarda, nötrofil ve eozinofillerden oluşan yoğun bir immün yanıt meydana geldi. Bunun yanında stroma içinde, grup oluşturmayan, tek tek amip trofozoitleri belirlendi. İkinci haftada birinci haftadan farklı olarak, inflamasyona lenfositler de katıldı.

Üçüncü ve dördüncü haftalarda vaskülarizasyonun, inflamasyonun ve subepitelyal tabakada ödemin azaldığı görüldü. Nötrofiller ve eozinofiller ilk haftalara göre daha azdı. Stromada yine amip trofozoitlerine rastlandı.

Beşinci haftada nötrofil, lenfosit ve monositlerin bulunduğu akut iltihabın geliştiği belirlendi. Dokuda trofozoitler, az ödem ve damar proliferasyonu da mevcuttu.

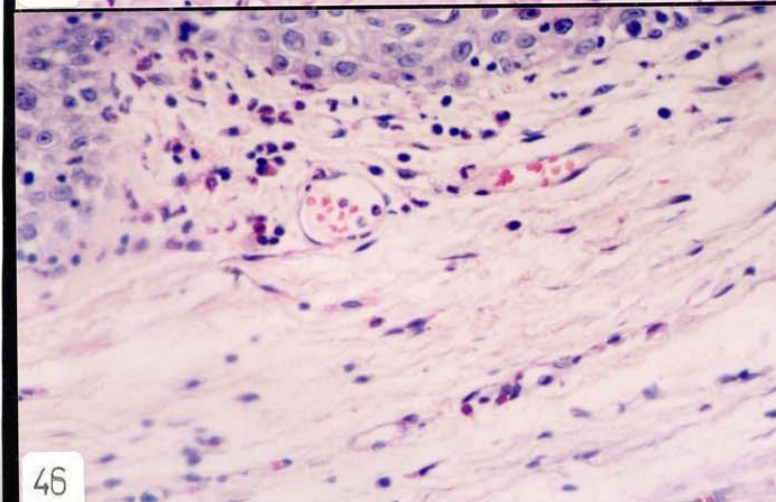
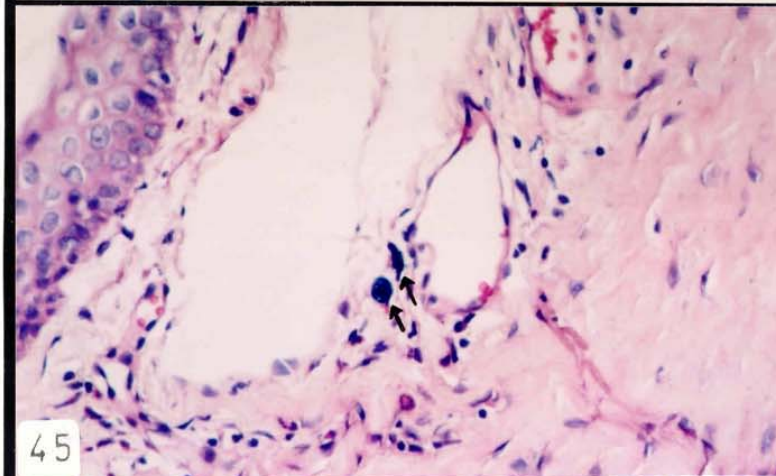
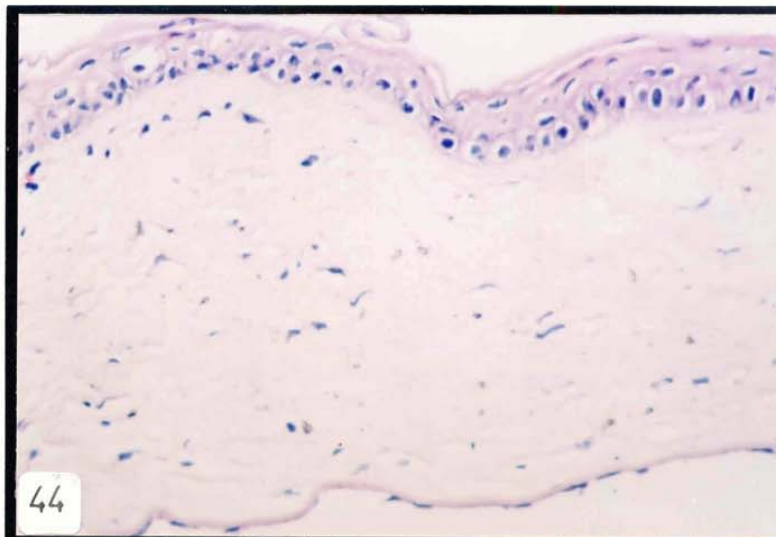
Altıncı, yedinci, sekizinci ve dokuzuncu haftalardaki histopatolojik incelemeler sonucu, bütün keme gözlerinin histopatolojik olarak hemen hemen aynı görünümde olduğu görüldü. Bu haftalardaki histopatolojik incelemelerde, dokuda az sayıda nötrofil ve eozinofillerden oluşan bir immün yanıt, küçük kapiler damarlar ve amip trofozoitleri belirlendi. Onuncu haftada doku normal görünümdeydi.

A. castellanii ve *A. hatchetti* ile infekte gözlerin de tedavi sonrası histopatolojik incelemeleri yapıldı. Buna göre, *A. castellanii* ile infekte 5 gözün 3'ünde (%60), *A. hatchetti* ile infekte gözlerin ise 2'sinde (%40) dokuda amip trofozoitleri görüldü. Bunun yanında her iki grupta da az sayıda nötrofil ve eozinofillerden oluşan immün yanıt ve çok küçük kapiller damarların varlığı da kornea dokusunda belirlendi.

Şekil 44. Normal bir keme korneasının, enine kesitinin H&E ile boyanmış görünümü (20x).

Şekil 45. Birinci haftada, kornea dokusunda meydana gelen, nötrofillerden oluşan immün yanıt, damarlanma, ödem ve trofozoitler (oklar) görülmekte (20x).

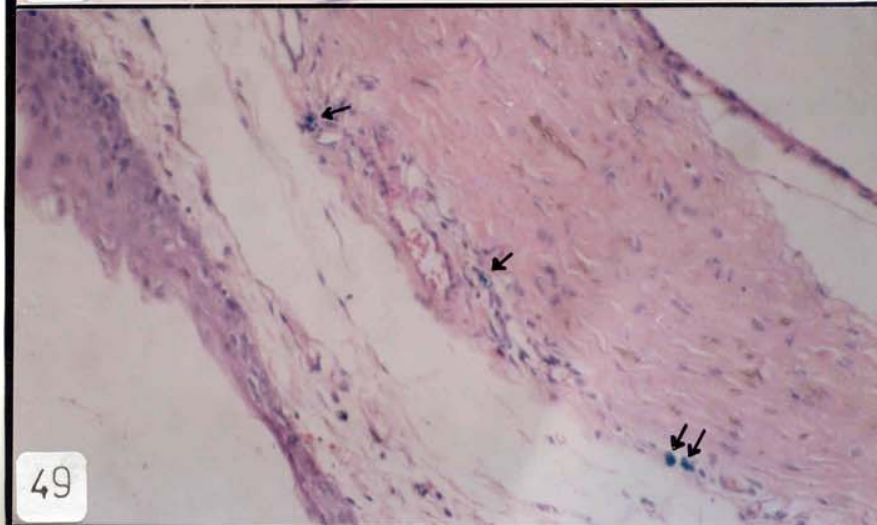
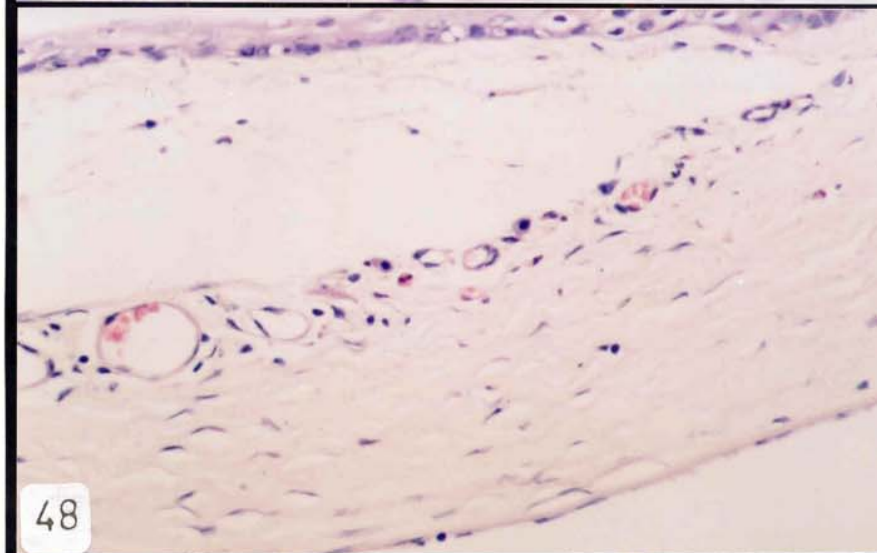
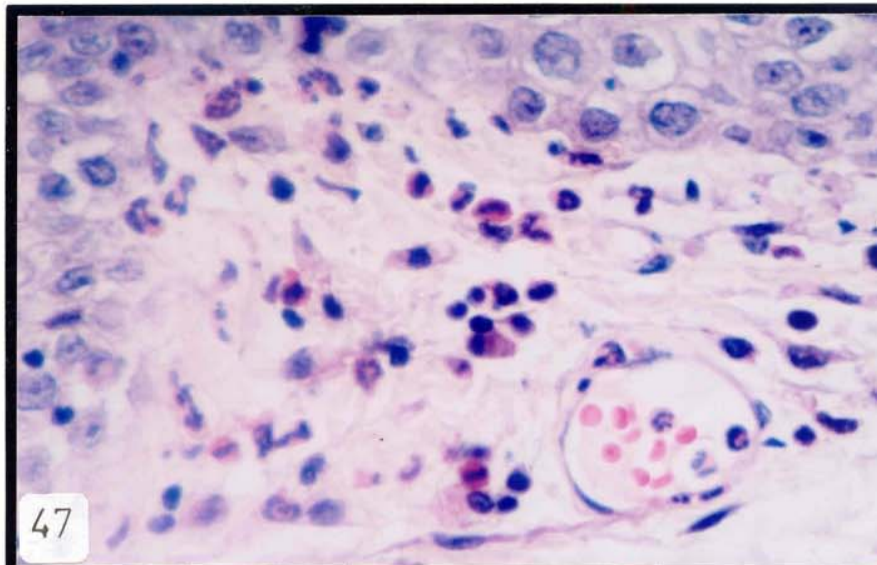
Şekil 46. *A. castellanii* inoküle edildikten iki hafta sonra, kornea dokusunda meydana gelen, nötrofil ve eozinofillerden oluşan yoğun immün yanıt ve damarlanma görülmekte (20x).



Şekil 47. Şekil 46'daki yoğun inflamasyon alanının 40'luk objektifteki görünümü. İnflamasyon alanında nötrofiller, eozinofiller ve bir tane damar görülmekte.

Şekil 48. Üçüncü haftada, subepitelyal tabakada geniş bir ödem oluşumu, damarlanma, inflamasyon alanında nötrofiller ve eozinofiller görülmekte (10x).

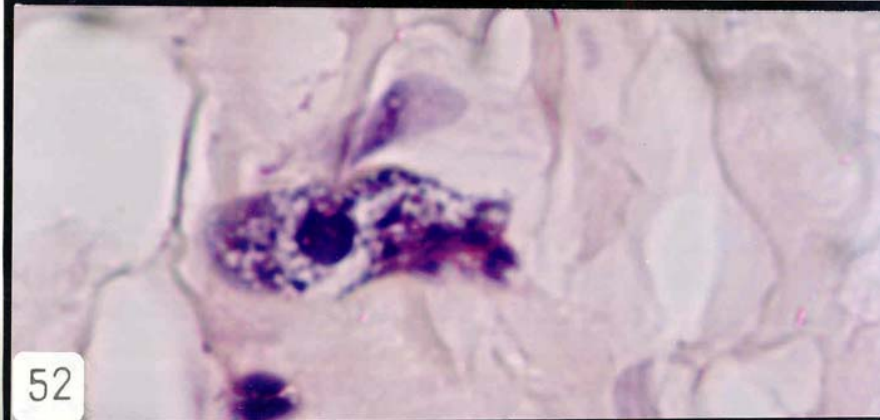
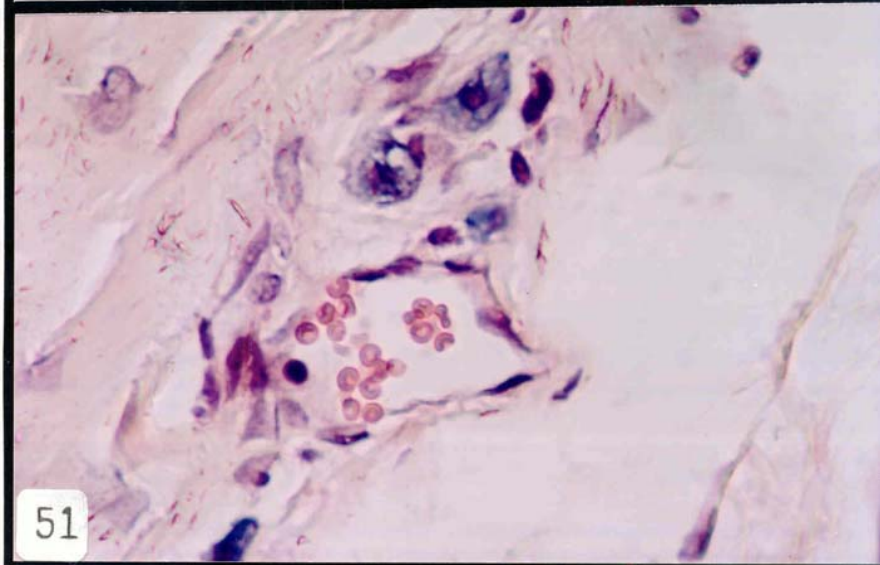
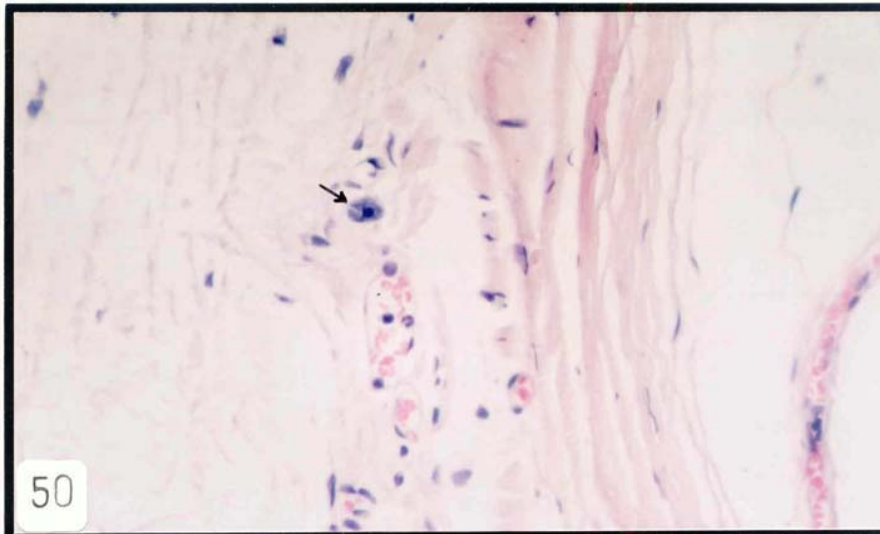
Şekil 49. Birinci haftadaki, kornea dokusunda amipler (oklar), yoğun damar oluşumu ve ödem görülmekte (10x).



Şekil 50. *A. hachetti* ile infekte keme gözünün, tedavi sonrası histopatolojik görünümü. Kornea dokusunda inflamasyon azalmış fakat damar oluşumu ve amip trofozoiti (ok) hala mevcut (20x).

Şekil 51. Üçüncü haftada, kornea dokusunda bulunan iki trofozoit ve bir damar görülmekte (40x)

Şekil 52. Birinci haftada, kornea dokusunda bulunan trofozoitin 100'lük objektifteki görünümü.



TARTIŞMA

Acanthamoeba türleri çevrede çok yaygın olarak bulunan protozoonlar arasındadır. Bu türler toprak, çamur, hava, yüzme havuzları gibi çeşitli çevrelerden, klinik örneklerden, balık, sürüngen, memeli grubundaki hayvanlardan izole edilmiştir (34, 43). Bu tür amipler, Granülatöz Amibik Ensefalit (GAE), kutanöz acanthamoebiasis, *Acanthamoeba* keratiti ve AIDS'li hastalarda infeksiyonun çeşitli organlara yayılmasına bağlı olarak kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirirler (33, 34, 43, 62).

Son yıllarda *Acanthamoeba* türlerine bağlı infeksiyonlar yaygın olarak görülmektedir. Özellikle, 1980'li yıllara kadar nadir olarak görülen *Acanthamoeba* keratiti, bu yıllardan sonra özellikle kontakt lens kullanımının artmasıyla sık görülmeye başlamıştır. Kontakt lens kullanımının yanında, travma, kontakt lenslerin kontamine sularla teması gibi kornea ile amibin direkt teması sonucu oluşan hastalığın tanısı ve tedavisi oldukça zordur (14, 29, 43, 49).

DeneySEL olarak *Acanthamoeba* keratiti oluşturup, hastalığın histopatolojik gelişiminin takip edildiği ve iki farklı *Acanthamoeba* türü ile oluşturulan infeksiyon üzerine, iki ilacın etkisinin incelendiği çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları 4 temel başlık altında tartışmaya aldık:

- I. Amiplerin üretilmesi ve incelenmesi
- II. Keme gözünde oluşturulan keratit
- III. Oluşturulan keratitin tedavisi
- IV. *Acanthamoeba* keratitinin histopatolojik gelişiminin incelenmesi

I. Amiplerin üretilmesi ve incelenmesi: Viyana Üniversitesi, Medikal Parazitoloji Bölümünden BDOA içerisinde gönderilen *A. castellanii* ve *A. hatchetti* türleri çalışmamızda kullanıldı. Walochnik ve arkadaşları bizimde çalışmamızda kullandığımız iki amip türünün içinde bulunduğu, klinik ve klinik olmayan örneklerden izole ettikleri 13 *Acanthamoeba* suşunun morfolojik, moleküler biyolojik ve fizyolojik karakterlerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, ilerlemiş keratit olgularından izole ettikleri, çalışmamızda kullandığımız iki amip türünün kist morfolojisi ve büyüklüğüne göre II. grupta yer aldığını belirlemişlerdir. Bunun yanında, iki türün de aksenik kültürde çok iyi ürediğini, agar üzerindeki hareketlerinin oldukça iyi olduğunu ve 30, 34, 37, 40 °C’lerde çok iyi ürerken, 42 °C’de üreme hızının daha yavaş olduğunu çalışmalarında belirtmişlerdir. Bunun yanında *A. hatchetti*’nin sitopatik etkisinin *A. castellanii*’ye göre daha güçlü olduğunu ve her iki türün de sekans tiplerinin T4 olduğunu bulmuşlardır (75).

Sıvı besiyerinde sık bir şekilde iki, üç veya dört amibin karşılıklı olarak aralarında köprü kurdukları, konjugasyon benzeri olayları gözlemlendi. Saygı, 1971 yılında yaptığı doktora tez çalışmasında, buna benzer olayları gözlemiş fakat herhangi bir açıklama getirmemiştir (58). John’da 1993 yılında yayınlanan “Parazitik Protozoa” adlı kitabın içinde bulunan, “Opportunistically Pathogenic Free-Living Amebae” başlıklı bölümde aksenik kültürde, aralarında köprülerle bağlantı kuran üç amibin, scanning elektron mikroskopunda çekilen fotoğrafını yayınlamış ve araştırmacı amipler arasında genetik bir değişim olabileceğini belirtmiştir (33). İverted mikroskopta uzun süre gözlediğimiz amiplerdeki, çekirdek bölünmeleri, aradaki köprüdeki madde geçişi diye tahmin ettiğimiz kalınlaşan bölgeler ayrıntılı bir şekilde gözlemlendi. Gözlemlerimiz sonucu amipler arasında genetik madde değişimi olabileceğini düşünüyoruz.

Amiplerin boyanmasında, Heidenhain’in demirli hematoksilin boyası, Giemsa, PAP, PAS Schiff, Van Gison, Mason Trikrom, Orsein, Retikülün, Toludin-O ve Musicarmin boyaaları kullanıldı. Bu boyalardan, HHDH,

Giemsa, PAS Schiff, Masson Trikrom, Toludin-O boyaları, amip trofozoitlerinin çekirdek, çekirdekcik, ektoplazma, endoplazma ve kontraktıl vakuollerini belirgin bir şekilde boyadı. Bu nedenle, amiplerin bu boyalarla boyanmasının uygun olduğu, diğer boyaların ise amiplerin boyanmasında kullanışlı olmadığı kanısındayız.

II. Keme gözünde oluşturulan keratit: *Acanthamoeba* keratitinin hayvan modellerinin gerçekleştirilmesi, bu hastalığın patogenezinin açıklanması ve farklı tedavi yaklaşımlarının belirlenmesi açısından kolaylıklar sağlamıştır. Birçok araştırmacı da hayvan modellerinde farklı araştırmalar yapmıştır. Larkin ve Easty, 1990 yılında yayınlanan makalelerinde, *Acanthamoeba* keratiti ile ilgili ilk bulgularını yayınlamışlardır. Araştırmacılar, keme gözlerine, 1.10^6 amip/mL (%90 kist) konsantrasyonunda, *A. polyphaga* türü amipleri intrastromal olarak inoküle etmişler ve çalışmada kullandıkları 24 kemenin hepsinde granüler opasite ile karakterize olan *Acanthamoeba* keratiti oluşturmuşlardır. Kemelerde korneal perforasyon, vaskülarizasyon, epitelyal hastalıklar ve nodüler infiltrasyon veya hipopyon gibi anterior uveitis bulgularının görülmediğini vurgulayan araştırmacılar, 70 gün boyunca izledikleri keme gözlerinde keratitin kademeli olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Makalede, 1, 3 ve 5. günlerde hemen hemen bütün kemelerde 3. derecede opasite geliştiği fakat 7. gündeki incelemede birçok kemede korneal opasitenin 2. dereceye azaldığı belirtilmiştir (40).

Badenoch ve arkadaşları, *Acanthamoeba* keratitli hastaların bir çoğundan, amiplerle birlikte bakteri izole edildiğinden yola çıkarak, infeksiyonda bakterinin bulunmasının *Acanthamoeba* keratitinin gelişimini desteklediğini öne sürmüşlerdir. Buradan yola çıkan araştırmacılar, *Acanthamoeba* keratitli bir hastadan izole edilen, *Acanthamoeba* suşu ve *Corynebacterium xerosis*'i, inokülümde 10^4 trofozoit/mL amip, 10^6 *Corynebacterium*/mL, bakteri bulunacak şekilde kemelere inoküle

etmişlerdir. İnokülasyonun 7. gününde bakteri-amip süspansiyonu inoküle edilen kemelerde, sadece amip inoküle edilen kemelerle kıyaslandığında, periferel vaskülarizasyonla birlikte yoğun bir infeksiyonun meydana geldiği belirtilmiştir (7).

Biz de yaptığımız çalışmada, öncelikle keme gözlerine, bakterisiz, 1.2×10^6 amip/mL konsantrasyonundaki amip süspansiyonundan 10µL inoküle ettik. Keme gözlerinde keratitin oluştuğunu, fakat 10-15 gün içerisinde hastalığın iyileştiğini gözledik. İki kez tekrarladığımız denememizde aynı sonuçları aldık. Araştırmamızda, *Acanthamoeba* keratitinin gelişimini, daha uzun süre takip etmek istediğimizden inokülümeye 2×10^4 bakteri/mL *E. coli* ekledik ve Bodenoch ve arkadaşlarının çalışmasına paralel olarak, bakteri eklenmesinin keratitin gelişimini arttırdığını tespit ettik.

John ve arkadaşları, deneysel olarak tavşanlarda oluşturdukları *Acanthamoeba* keratitinde kortikosteroidlerin etkisini araştırmışlardır. *Acanthamoeba* keratitli bir hastadan izole edilen *Acanthamoeba castellanii*'yi BDOA ortamında üretmişler ve daha sonra bu besiyeri üzerinden amipleri (%90 kist) toplayarak, 4.3×10^5 amip/mL konsantrasyonunda süspansiyonu hazırlamışlardır. Hazırladıkları inokülümü, 23 adet tavşanın gözlerine inoküle ederek, bütün tavşanlarda *Acanthamoeba* keratiti geliştirmişlerdir. İnokülasyondan sonra tavşanları, sayıları 8, 6, 6 olarak üç gruba ayırmışlar, birinci gruba kortikosteroid vermezken, ikinci gruptaki tavşanların gözlerine, 0.2 mL ve üçüncü gruba 1 mL dexamethasone sodium phosphate (DSP-0.4 mg/mL) inoküle etmişlerdir. Geriye kalan üç tavşanın korneal epitelyumları iğne ile aşındırılarak, *Acanthamoeba* süspansiyonundan 6 damla damlatılmıştır. Bu üç tavşanın sadece birinde, 2. günde keratit gelişmiştir. Araştırmacılar, bütün tavşanlarda 2, 8, 14 ve 28. günlerde kornea kazıntı örneği almışlar, bu örneklerden *Acanthamoeba* izole etmişler, fakat bakteri izole edememişlerdir. Çalışmada, 2. ve 3. gruptaki korneal infiltrasyonun

uzunluğunun 1. gruba göre daha büyük olduğu belirlenmiş, bunun sebebi olarak da kortikosteroidlerin eklenmesiyle, amiplerin daha iyi çoğalmaları gösterilmiştir. Bunun yanında amiplerin yüksek oksijen alanlarına doğru hareket ettiği, yani süperfisiyal stromaya hareket ettiği gösterilmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak, DSP'nin *Acanthamoeba* keratitli hastalarda kullanımının zararlı olacağını belirtmişlerdir (35).

McClellan ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada, korneal inflamasyon ve uveit ya da kornea nakli sonucu, doku reddini önlemek amacıyla sıklıkla kullanılan steroidlerin, *A. castellanii* patojenliği üzerine in vitro ve in vivo olarak etkisini incelemişlerdir. Steroid olarak, dexamethosone phosphate (DP)'in kullanıldığı çalışmada, amiplerin çoğalması, kist haline geçmesi ve trofozoitlerin kistten çıkışını nasıl etkilediği in vitro olarak araştırılmıştır. Bunun yanında, deneysel *Acanthamoeba* keratiti oluşturmuşlar ve bu hayvanlara intramuskuler olarak steroid verildiğinde keratitin şiddetinde önemli derecede artma olduğunu belirlemişlerdir. DP ile muamele edilen trofozoitlerde proliferasyonun, 4-10 kat arttığı, buna karşın *Acanthamoeba* trofozoitlerinin kist haline geçmesine etkisi olmadığını bulmuşlardır. Araştırmada, DP ile etki edilen trofozoit ve kistlerin korneal epitelyal hücreleri üzerindeki sitopatik etkisinin de arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmada, DP'nin trofozoit ve kistlerin patojenliğini arttırdığı vurgulanmıştır (45).

He ve arkadaşları, araştırmalarında, domuzlarda kontakt lensin neden olduğu deneysel *Acanthamoeba* keratiti oluşturarak hastalığın klinik ve histopatolojik görünümünü incelemişlerdir. Araştırmacılar, *Acanthamoeba* keratitinin klinik olarak üç döneme ayrıldığını vurgulamışlardır. Bu dönemler: Akut dönem, yoğun infiltrasyon dönemi ve durgun dönem. Akut ve yoğun infiltrasyon döneminde, korneal kazıma ve sürüntü örneklerinden amip izole edilebilirken, durgun dönemde kistler, histopatolojik kesitlerde ancak derin stroma içinde görülebilmektedir. Klinik görünümünün de, insanda oluşan *Acanthamoeba* keratiti ile aynı olan, beyaz halka şeklinde

infiltrasyon, stromal ödem ve keratik presipitatlar görülürken, histopatolojik kesitlerde geniş nötrofilik infiltrasyonlar, stromal nekroz ve stromanın yapısında bozulmalar belirlenmiştir. Araştırmacılar, insan gözü ile domuz gözünün aynı anatomik yapıda olduğunu, bu nedenle de domuz gözünde oluşturulan *Acanthamoeba keratiti* modeli ile patogenezi, hücre biyolojisi ve tedavi çalışmalarında çok başarılı sonuçlar elde edileceğini belirtmişlerdir (24).

Keme gözlerine, bakteri ile birlikte *Acanthamoeba* türü amipleri inoküle ettiğimiz çalışmamızda, He ve arkadaşlarının araştırmalarında belirttikleri, *Acanthamoeba keratiti*'nin üç klinik dönemi bizim oluşturduğumuz infeksiyonda da belirgindi. İnfeksiyonun başlangıcındaki epitelyal ödem ve punktat epitelyopati, hastalığın akut dönemindeki bulgular iken, ileri aşamalarda oluşan korneal ülser, stromal infiltratlar ve damarlanma, yoğun infiltrasyon döneminin ve sonrasında oluşan pannus dokusu gelişimi ise, hastalığın durgun döneminin bulgularıdır. Araştırmamızda, akut ve yoğun infiltrasyon döneminde, keme gözlerinden amiplerin izolasyonuna yönelik bir çalışma yapılmamıştır.

III. *Acanthamoeba keratiti*'nin tedavisi: *Acanthamoeba keratiti* tedavisi zor olan bir hastalıktır. Bu hastalığın tedavisinde, günümüze kadar farklı tedavi yaklaşımları denenmiş olmasına karşın, tam bir görüş birliğine varılmamıştır. Bu hastalığın tedavisinde, günümüze kadar kullanılan ilaçlar, katyonik antiseptiklerden; chlorohexidine digluconate ve polyhexamethylene biguanide (PHMB), diamidinlerden; hexamidine, pentamidine, propamidine isethionate (Brolene), aminoglikozitlerden; neomycin, paranomycin ve imidazollerden; clotrimazole, fluconazole, ketaconazole, itraconazole, miconazole kullanılmıştır. Bu amebosidal ajanların yanında kortikosteroidler, antibakteriyel ajanlar, korneanın kazınması ve penetran keratoplasti de tedavide kullanılmaktadır (6, 8, 25, 28, 29, 30, 38, 43, 67, 78).

Acanthamoeba keratitinin başarılı bir şekilde tedavisi ilk kez 1985 yılında Wright ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, 44 yaşındaki bir hastada epitelyal hasar, hipopyon ve sekonder glokomla birlikte iltihabi keratitin geliştiğini belirlemiş ve korneadan alınan kazıntı materyalinden *Acanthamoeba* cinsi amip izole etmişlerdir. Bu hastanın tedavisinde, %1'lik propamidine isethionate (Brolene), ve %0.15 dibromopromidine kullanmışlardır. Tedavi sonrası kullanılan neomycin'in toksik etki gösterdiği saptanmıştır. Araştırmacılar, bu tedavi protokolünün erken dönemdeki enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğunu belirtmişlerdir (78).

Hargrave ve arkadaşları, 1999 yılında yaptıkları çalışmada, *Acanthamoeba* tanısı konan 83 hastayı (87 göz) propamidine isethionate ve neomycin-polymyxin B-gramicin göz solüsyonu ile tedavi etmişlerdir. Tedavi sonucunda, 87 gözün 60'unda (%69) başarılı sonuçlar elde edilmiştir (23).

Duguid ve arkadaşları, 1997 yılında yayınlanan makalede, Eylül 1992 ile Şubat 1995 tarihleri arasında Moorfield's göz hastanesine gelen 111 *Acanthamoeba* keratiti hastasını %0.02'lik polyhexamethyl biguanide ve propamidine ile tedavi etmişlerdir. Hastalarda yapılan incelemeler sonucunda, hastaların 65'inin (%58.6), hastalığın erken döneminde (ilk 28 gün içinde), 21 hastanın (18.9) ara dönemde (28 gün – 2 ay arası), 20 hastanın ise geç dönemde (2 aydan fazla) olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan 5 hastanın ise, hangi dönemde olduğu tespit edilememiştir. Araştırmacılar, tedavi sonucunda, uygulanan tedavi protokolünün bütün hastalarda etkili olduğunu ve hastalığın kontrol altına alındığını belirtmiştir. Bu tedavi ile sadece 10 hastada keratoplasti gerektiğinden yola çıkarak, keratoplasti gereksiniminin de bu tedavi ile azaldığını araştırmada belirtilmişlerdir (15).

Kosrirkvongs ve arkadaşları, 1999 yılında yaptıkları çalışmada, 5 *Acanthamoeba* keratiti tanısı konan hastayı %0.006'lık cholorhexidine

solüsyonu ile tedavi etmişlerdir. Araştırmacılar, hastaların 4'ünün bir hafta içinde hızla düzeldiği ve üç hafta içinde ise epitelyal hasarın ve infiltrasyonun tamamen iyileştiğini tespit etmişlerdir. Hastalardan birinde ise ülser ve glokom geliştiği görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada erken tanısı konan *Acanthamoeba keratiti* olgularının cholorhexidine ile başarılı bir şekilde tedavi edilebileceği bildirilmiştir (38).

Seal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Acanthamoeba keratiti* tanısı konan 12 hastadan izole ettikleri *Acanthamoeba* cinsi amiplere, önce cholorhexidine (%0.002) ve propamidine'nin in vitro etkisini inceleyerek, bu iki ilacın amip trofozoit ve kistleri üzerinde oldukça öldürücü etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra bu ilaçlarla hastaları tedavi etmişler ve sonuç olarak bütün hastalarda *Acanthamoeba* infeksiyonunun ya tamamen iyileştiği ya da kontrol altına alındığı bildirilmiştir. Tedavinin 6. ayında iki hastada inflamasyonun etkisiyle korneada skar meydana gelirken, 3 hastada ise farklı bir stromal infiltrasyonun meydana geldiğini belirten araştırmacılar, ilacın hastaların hiçbirinde toksik etki meydana getirmediğini de araştırmalarında belirtmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, *Acanthamoeba* cinsi amiplerin, cholorhexidine dirençli olmadığını ve bu ilacın yeterli periyotta kullanımı ile hastalığın tedavisinde etkili olacağını bildirilmiştir (66).

Murthy ve arkadaşları, 45 yaşında, gözünde ilerlemiş ülseratif keratit gelişen bir hastayı, 8 hafta boyunca %0.02'lik cholorhexidine gluconate ile tedavi etmişler ve araştırmacılar tedavi sonrası yaptıkları incelemede kornea epitelinde kayıp olduğunu belirlemiş ve hastaya penetran keratoplasti uygulamışlardır. Sonuç olarak bu hastada %0.02'lik cholorohexidine gluconate'ın kullanımının ülseratif keratiti ilerlettiği belirtilmiştir (49).

Cholorohexidine gluconate, membran fonksiyonunu inhibe eden katyonik bir antiseptiktir. *Acanthamoeba keratiti*'nin tedavisinde bu ilaç, genellikle %0.002 ve %0.006'lık konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Murthy ve arkadaşlarının kullandıkları doz, oldukça yüksek

konsantrasyondadır ve bu nedenle kornea epitelinde kayıp meydana getirmiş olabilir. Bizim yaptığımız çalışmada, keme gözlerinde, %0.002'lik cholorohexidine'in kullanımı sonucu herhangi bir epitel kaybı oluşmadı.

Hirst ve arkadaşları, 48 yaşında, yumuşak kontakt lens kullanan ve gözünde korneal ülser meydana gelen bir hastaya *Acanthamoeba* keratiti tanısı koymuşlar ve bu hastayı, 6 hafta boyunca sistemik ketoconazole ve topikal miconazole ile başarılı bir şekilde tedavi etmişlerdir. Araştırmacılar, bu tedavi protokolünün sadece trofozoit formlarına etkili olduğunu da çalışmalarında vurgulamışlardır (25).

Ishibashi ve arkadaşları, 23, 19 ve 37 yaşlarındaki, günlük yumuşak kontakt lens kullanan üç kişiyi, debridement tedavisine ek olarak, oral itraconazole ve %0.1'lik topikal mikonazole ile tedavi etmişlerdir. Tedavinin başlangıcından 6-7 gün sonra keratitte gerileme ve iyileşme görülürken, hastalardan birincisinde 9, ikincisinde 5, üçüncüsünde ise 8 hafta sonra, tamamen iyileşme gerçekleşmiştir (30).

Berger ve arkadaşları, *Acanthamoeba* keratiti tanısı koydukları 7 hastayı topikal neomycin-polymyxin B-gramicidin, %0.1'lik propamidine isethionate ve %1'lik miconazole nitrate ile tedavi etmişlerdir. Araştırmacılar, bu ilaçlara ek olarak, hastalardan beşine topikal kortikosteroid uygulamışlardır. Uygulanan bu medikal tedavi ile, 7 hastanın 6'sında başarı sağlanırken, bir hastada medikal tedaviye ek olarak, penetran keratoplasti gerekmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, kullandıkları bu üçlü kombine ilacın erken ve ilerlemiş *Acanthamoeba* keratiti olgularının her ikisinde de etkili olduğunu belirtmişlerdir (8).

Brasseur ve arkadaşları, %1'lik hexamidine diisethionate (Desamedine)'in önce *Acanthamoeba* keratiti tanısı konan bir hastadan izole edilen *Acanthamoeba* cinsi amipler üzerine in vitro etkisini araştırmışlar ve kist ve trofozoitler üzerinde oldukça yüksek seviyede öldürücü olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra ise 40 ve 22 yaşlarında ve yumuşak kontakt

lens kullanan ve *Acanthamoeba* keratiti tanısı konan iki hastayı hexamidinle tedavi ederek oldukça başarılı sonuçlar almışlardır (9).

Acanthamoeba keratiti hastalarında, cholorhexidine'in yalnız kullanımı, neomycin-polymyxin B-gramicidin (neosporin)'in ise propamidin isethionate ile birlikte kullanımı sonucu başarılı sonuçlar elde edilmiştir (23, 38).

Araştırmalarımız sonucunda, *Acanthamoeba* keratitinin tedavisinde, cholorhexidine ile neomycin-polymyxin B-gramicidin göz solüsyonunun kombine olarak kullanıldığı bir tedavi protokolüne rastlamadık. Bu nedenle, kemelerde deneysel olarak oluşturduğumuz *Acanthamoeba* keratitinin tedavisinde, bu ilaç protokolünü denemeyi uygun bulduk.

İki farklı *Acanthamoeba* türünün keme gözlerine inokülasyonu sonucu, bütün kemelerde keratit gelişti. Fakat, *A. castellanii* inoküle edilen gözlerde, tablo daha hızlı ve kötü seyrederken, *A. hatchetti* ile infekte gözlerde invaziv olmayan, daha yavaş seyirli bir tablo gelişti. Bu klinik tabloyla paralel olarak, *A. hatchetti* ile infekte gözler tedaviye daha iyi cevap verirken, *A. castellanii* ile infekte gözler, pannus dokusu gelişimi ile birlikte iyileşme gösterdi. Tedavi öncesi yoğun olan damarlanma azaldı ve hayalet damar gelişimi görüldü. Bunun yanında yoğun olan epitel hasarlarının da tedavi ile tamamen iyileştiği görüldü. Altı hafta boyunca uyguladığımız tedavide klinik tablonun hızla düzelmesine karşın, histopatolojik kesitlerde hala amip trofozoitlerinin görülmesi, uygulanan tedavi süresinin yeterli olmadığını göstermektedir. Bu sürede hastalık kontrol altına alınmaktadır, fakat paraziti tamamen yok etmek için bu ilaç protokolünün daha uzun bir peryotta kullanılması gerekmektedir.

IV. *Acanthamoeba* keratitinin histopatolojik gelişimin

İncelenmesi: Birçok araştırmacı, klinik örneklerde ya da deneysel olarak oluşturduğu *Acanthamoeba* keratitindeki histopatolojik gelişimi incelemiştir. İncelemelerinde genellikle, amiplerin kornea içinde, stromal lamellada veya derin stroma içinde yayılması sonucu genellikle nötrofillerden oluşan immün cevap meydana geldiğini, fakat bazı olgularda nötrofillere ek olarak lenfositlerin ve plazma hücrelerinin de inflamasyona katıldığını bildirmişlerdir (43).

Garner, 1993 yılında yaptığı çalışmada, 30 *Acanthamoeba* keratiti tanısı konan hastadan aldığı doku örneklerini histopatolojik olarak incelemiş ve bu hastalığın patogenezi hakkında bilgi vermiştir. Bu 30 olgunun histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda patojenitenin 4 basamakta sıralanabileceğini vurgulamıştır:

1. İnfeksiyonun başlangıcında, epitelin parçalanması ile *Acanthamoeba* türü amiplerin stromayı istila etmesi.
2. Trofozoitlerin istilası sonucu keratositlerin sayısının azalması ve bu azalmanın kademeli olarak devam etmesi.
3. Nötrofil polimorfonükleer lökositlere bağımlı yangısal yanıt oluşması.
4. Lökositik ve parazitik etkilerle kollajenin yıkılması sonucu meydana gelen stromal nekroz.

Araştırmacı, 30 hastanın 25'inde nötrofil ve makrofajların baskın olduğu akut inflamasyonun geliştiğini tespit etmiştir (19).

Larkin ve East, infekte ettikleri kemelerin gözlerinden histopatolojik kesitler hazırlayıp, hematoksilin-eozin (H&E) ile boyayıp incelemiştir. Araştırmacılar birinci günde inokülasyon alanına nötrofil ve makrofajların yangısal cevabını belirlemişlerdir. Bunun yanında araştırmacılar, inflamatuvar hücrelerle, amiplerin ayırımının H&E boyası ile oldukça zor olduğunu belirtmişler, anti-*Acanthamoeba* antikorları ile immunoperoksidaz boyası kullanarak bu ayrımı kolaylıkla yapmışlardır. 3. günde kistlerden

trofozoitlerin çıktığı ve inokülasyon alanından hareket ettiği görülmüştür. Bu kez, karışık bir immün cevabın oluştuğu, birinci günde görülen nötrofil ve makrofajlar arasında lenfosit ve monositlerin bulunduğunu belirtmişlerdir. 7. günde trofozoitlerin korneayı iyice kapladığı, kistlerin sayısında ise büyük oranda azalma olduğu görülmüştür. 14. günde inokülasyon alanının bazı bölgelerinde stromal incelmeler görülürken, 21 ile 70. günler arasında amipler ve inflamatuvar hücreler eozinofilik materyallerle çevrili olarak görülmüştür (40). Aynı araştırmacıların bir yıl sonra yaptıkları çalışmada, yine keme gözlerinde deneysel olarak *Acanthamoeba keratiti* oluşturmuşlar ve immunohistokimyasal teknikler kullanarak konağın hücresel cevabını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, hücresel cevapta değişiklikler görülmüştür. Doku kesitlerinde, ilk gün nötrofillerin baskın olduğu bir hücresel cevap oluşurken, ilk günü takip eden günlerde makrofajların daha baskın olduğu görülmüştür. İncelemede bazen T lenfositlerinin görüldüğü fakat B lenfositlerinin hiç görülmediği belirtilmiştir (41).

Bizde yaptığımız histopatolojik incelemede, kornea dokusu içinde kistleri göremedik. Bunun sebebi, Larkin ve East'ın çalışmalarında belirttiği gibi kistlerin H&E boyası ile boyanan preparatlarda görülememesi olabilir.

John ve arkadaşları, tavşanlarda deneysel olarak oluşturdukları *Acanthamoeba keratiti*nde kortikosteroidlerin etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada yapılan histopatolojik incelemede araştırmacılar, ikinci günden itibaren dokuda, trofozoitlere ek olarak polimorfonükleer lökositlerin görüldüğünü belirtmişler ve buna ek olarak, trofozoitlerin neden olduğu infiltrasyonların genellikle korneanın merkezinde ve yüzeysel stromada lokalize olduğu görülmüşlerdir. Trofozoitlerin bu bölgelerde lokalize olmalarına sebep olarak da, oksijen alanlarının bu bölgelerde olması ve trofozoitlerin de hareketlerinin bu yönde olması gösterilmiştir (35).

He ve arkadaşları, domuz gözünde kontakt lensin neden olduğu deneysel *Acanthamoeba keratiti* oluşturmuşlar ve incelemelerinde hastalığın

akut, yoğun infiltrasyon ve durgun dönem olmak üzere üç döneme ayrıldığını belirtmişlerdir. Durgun dönemde yapılan histopatolojik incelemede, stroma içinde kistler, geniş nötrofilik infiltrasyonlar, stromal nekroz ve kollajen lamellada bozulma görülmüştür (24).

Badenoch ve arkadaşları, *Acanthamoeba* keratitli bir hastadan izole ettikleri *Acanthamoeba* suşu ile *Corynebacterium*'u kemelere inoküle ederek, deneysel *Acanthamoeba* keratiti oluşturmuşlardır. Araştırmacılar inokülasyondan 7 gün sonra, infekte edilen bütün gözlerde *Acanthamoeba* keratiti oluştuğunu ve yapılan histopatolojik incelemelerde stroma içinde trofozoitler, ödem, korneada incelme ve hipopyon görmüşlerdir. Ayrıca, nötrofil ve mononükleer hücreleri içeren karışık bir hücresel cevap geliştiğini de araştırmalarında belirtmişlerdir (7).

Biz de yaptığımız çalışmanın histopatolojik incelemesinde, yapılan çalışmalara paralel sonuçlar aldık. İlk haftalarda, nötrofil, eozinofil ve lenfositlerden oluşan yoğun bir immün yanıt oluşurken, ilerleyen haftalarda bu yoğunluğun azaldığı görüldü. Bunun yanında, stromada amip trofozoitleri, ödem ve periferik damarlanma da oldukça fazlaydı.

KAYNAKLAR

1. Aitken D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR, Seal DV. 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmanella* infection. *Ophthalmology*, 103(3): 485-494.
2. Akısü Ç, Baka M, Durak İ, Orhan V. 1999. *Acanthamoeba* keratitli bir olgu. Işık ve elektron mikroskopi bulguları. *T Parazitol Derg.*, 23(3): 340-342.
3. Akova YA, Yağmur M. 2001. Kornea Hastalıkları. "Temel Göz Hastalıkları" içinde (P Aydın, YA Akova, eds). Güneş Kitabevi. Ankara. S. 146-158.
4. Akyol N, Aşçı Z, Kükner S. *Acanthamoeba* keratitis: The first reported case from Turkey. 1999. *Ophthalmic Practice: Asia Ed.*, 2(2): 46-48.
5. Amaral Zettler LA, Nerad TA, O'Kelly CJ, Peglar MT, Gillevet PM, Silberman JD, Sogin ML. 2000. A molecular reassessment of the Leptomyxid amoeba. *Protista*, 151: 275-282.
6. Bacon AS, Frazer DG, Dart JKG, Matheson M, Ficker LA, Wright P. 1993. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984-1992. *Eye*, 7: 719-725.
7. Badenoch PR, Johnson AM, Christy PE, Coster DJ. 1991. A model of *Acanthamoeba* keratitis in the rat. *Rev Infec Dis.*, 13(5): 445.
8. Berger ST, Mondino BJ, Hoft RH, Donzis PB, Holland GN, Farley MK, Levenson JE. 1990. Successful medical management of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol.*, 110: 395-403.

9. Brasseur RF, Favennec L, Perrine D, Chenu JP, Brasseur P. 1994. Successful treatment of *Acanthamoeba* keratitis by hexamidine. *Cornea*, 13: 459-462.
10. Brooks JG, Coster DJ, Badenoch PR. 1994. *Acanthamoeba* keratitis. Resolution after epithelial debridement. *Cornea*, 13: 186-189.
11. D'Aversa G, Stern GA, Driebe WT. 1995. Diagnosis and successful medical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Arch Ophthalmol.*, 113: 1120-1123.
12. Dağcı H, Gül S, Emre S, Türk M, Sömez G, Tünger A, Yağcı A. 2001. Planlı değişimli yumuşak kontakt lenslerin *Acanthamoeba* ve bakteriyal kontaminasyon yönünden değerlendirilmesi. *İnfek Derg.*, 15(3): 357-362.
13. De Jonckheere JF, Michel R. 1988. Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol Res.*, 74: 314-316.
14. Değerli S, Saygı G. 2000. *Acanthamoeba* keratiti. *Türkiye Parazitol Derg.*, 24(3): 243-248.
15. Duguid IG, Dart JK, Marlet N, Allan BD, Matheson M, Ficker L, Tuft S. 1997. Outcome of *Acanthamoeba* keratitis treated with polyhexamethyl biguanide and propamide. *Ophthalmology*, 104: 1587-1592.
16. Dykova I, Lom J, Schroeder-Diedrich JM, Booton GC, Byers TJ. 1999. *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J Parasitol.*, 85(6): 1106-1113.
17. Epstein RJ, Wilson LA, Wisvesvara GS, Plaurde EG. 1986. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. *Arch Ophthalmol.*, 104(9): 1318-1321.

18. Ficker L, Seal D, Warhurst D, Wright. 1990. *Acanthamoeba* keratitis-resistance to medical therapy. *Eye*, 4: 835-838.
19. Garner A. 1993. Pathogenesis of acanthamoebic keratitis: hypothesis based on a histological analysis of 30 cases. *Br J Ophthalmol.*, 77: 366-370.
20. Gonzalez MM, Gould E, Dickinson G, Martinez AJ, Visvesvara G, Cleary TJ, Hensley GT. 1986. Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organism. *Arch Pathol Lab Med.* 110: 749-751.
21. Gray TB, Cursons RTM, Sherwan JF, Rose PR. 1995. *Acanthamoeba*, bacterial and fungal contamination of contact lens storage cases. *Br J Ophthalmol.* 79: 601-605.
22. Hahn TW, O'Brien TD, Soh WJ, Kim JH. 1998. Acridine orange staining for rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Jpn J Ophthalmol.*, 42(2): 108-114.
23. Hargrave SL, McCulley JP, Hussein Z. 1999. Results of a trial of combined propamidine isethionate and neomycin therapy for *Acanthamoeba* keratitis. *Brolene Study Group. Ophthalmology*, 106(5): 952-957.
24. He YG, McCulley JD, Alizadeh H, Pidherney M, Melan J, Ubelaker JE, Stewart GL, Silvany RE, Niederkorn JV. 1992. A pig model of *Acanthamoeba* keratitis: transmission via contaminated contact lenses. 1992. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 33(8): 126-133.
25. Hirst LW, Green WR, Merz W, Kaufmann C, Visvesvara GS, Jensen A, Howard M. 1984. Management of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*, 91: 1105-1111.

26. Holland GN, Donzis PB. 1987. Rapid resolution of early *Acanthamoeba* keratitis after epithelial debridement. *Am J Ophthalmol.*, 104: 87-89.
27. Horne DD, Frizell ME, Ingham L, Jans RG, Gubash SM, Anand CM, Athar MA. 1994. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging clinical problem. *CMAJ.*, 150: 923-925.
28. Illingworth CD, Cook SD, Karabatsas CH, Easty DL. 1995. *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. *Br J Ophthalmol.*, 79: 1078-1082.
29. Illingworth CD, Cook SD. 1998. *Acanthamoeba* keratitis. *Surv Ophthalmol.*, 42(6): 493-508.
30. Ishibashi Y, Matsumoto Y, Kabata T, Watanabe, Hommura S, Yasuraoka K, Ishii K. 1990. Oral itraconazole and topical miconazole with debridement for *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol.*, 109:121-126.
31. John DT, Howard MJ. 1995. Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res.*, 81: 193-201.
32. John DT, Howard MJ. 1996. Techniques for isolating thermotolerant and pathogenic free-living amoebae. *Folia Parasitol.*, 43: 267-271.
33. John DT. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. *Parasitic Protozoa*, 2nd edn, vol 3, eds Kreier JP, Baker JR, Academic Press, San Diego, 143-246.
34. John DT. 1998. Opportunistic Amoebae. "Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections" içinde. 9th ed. Vol. 5. Edward Arnold Ltd. London. Pp. 179-192.

35. John T, Lin J, Sahm D, Rockey JH. 1991. Effect of corticosteroids in experimental *Acanthamoeba* keratitis. *Rev Infec Dis.*, 13(5): 440-2.
36. Johns KJ, Head WS, O'Day DM. 1988. Corneal toxicity of Propamidine. *Arch Ophthalmol.*, 106: 68-69.
37. Kong HH, Kim TH, Chung DI. 2000. Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. *J Parasitol.*, 86(1): 12-17.
38. Kosrirukvongs P, Wanachiwanawin D, Visvesvara GS. 1999. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with chlorhexidine. *Ophthalmology*, 106: 798-80.
39. Larkin DF, Kilvington S, Dart JK. 1992. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology*, 99: 185-191.
40. Larkin DFP, Easty DL. 1990. Experimental *Acanthamoeba* keratitis: I. Preliminary findings. *Br J Ophthalmol.*, 74: 551-555.
41. Larkin DFP, Easty DL. 1991. Experimental *Acanthamoeba* keratitis: II. Immunohistochemical evaluation. *Br J Ophthalmol.*, 75: 421-424.
42. Larkin DFP, Kilvington S, Easty DL. 1990. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. *Br J Ophthalmol.*, 74: 133-135.
43. Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.*, 12(2): 273-307.

44. Matias R, Schottelius J, Raddatz CF, Michel R. 1991. Species identification and characterization of an *Acanthamoeba* strain from human cornea. *Parasitol Res.*, 77: 469-474.
45. McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. 2001. Effect of steroids on *Acanthamoeba* cysts and trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 42: 2885-2893.
46. Michel R, Just HM. 1984. [*Acanthamoeba*, *Naegleria* and other free-living amoebae in cooling and rinsing water in dental treatment unit]. *Zbl Bakt Hyg.*, 179: 56-72.
47. Moore MB, McCulley JP, Luckenbach M, Gelender H, Newton C, McDonald MB, Visvesvara GS. 1985. *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. *Am J Ophthalmol.*, 100: 396-403.
48. Moore MB, McCulley JP, Newton C, Cobo LM, Foulks GN, O'Day DM, Johns KJ, Driebe WT, Wilson LA, Ebsstein RJ. 1987. *Acanthamoeba* keratitis. A growing problem in soft and hard contact lens wearers. *Ophthalmology*, 94 1654-1661.
49. Murthy S, Hawksworth NR, Cree I. 2002. Progressive ulcerative keratitis related to the use of topical chlorhexidine gluconate (0.02%). *Cornea*, 21(2): 237-239.
50. Neff RJ. 1957. Purification, axenic cultivation and description of a soil amoeba, *Acanthamoeba* sp. *J Protozool.*, 4: 176-182.

51. Niszl IA, Veale RB, Markus MB. 1998. Cytopathogenicity of clinical and environmental *Acanthamoeba* isolates for two mammalian cell lines. *J Parasitol.*, 84: 961-967.
52. Osato M, Robinson N, Wilhelmus K, Jones D. 1986. Morphogenesis of *Acanthamoeba castellanii*: titration of the steroid effect. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 27: 37.
53. Pfister DR, Cameron JD, Krachmer JH, Holland EJ. 1996. Confocal microscopy findings of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol.*, 121: 119-128.
54. Radford CF, Lehmann OJ, Dart JKG. 1998. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. *Br J Ophthalmol.*, 82: 1387-1392.
55. Radford CF, Minassian DC, Dart JK. 2002. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome and risk factors. *Br J Ophthalmol.*, 86: 536-542.
56. Samples JR, Binder PS, Luibel FJ, Font RL, Visvesvara GS, Peter CR. 1984. *Acanthamoeba* keratitis possibly acquired from a hot tub. *Arch Ophthalmol.*, 102: 707-710.
57. Saygı G, Akın Z, Tecer H. 2000. Sivas'ta toprak ve termal su örneklerinden *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türlerinin soyutulması. *Türkiye Parazitol Derg.*, 24 (3): 237-242.
58. Saygı G, 1971. Studies on Free-Living Amoebae Ph.D. Thesis. Liverpool University.

59. Saygı G, Polat Z. 2003. Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitozlar (Primer amibik meningoensefalitis-Granüloamatöz amibik ensefalitis-Keratit). CÜ Tıp Fak Derg., 25(3): 140-149.
60. Saygı G, Yüksel T, Almaç A, Müderris S. 1982. Burundan soyutulan limax grubu amip ve birlikte görülen kirpikli. CÜ Tıp Fak Derg. 4(1): 95-98.
61. Saygı G. 1979. Erzurum'da topraktan *Acanthamoeba* türünün soyutulması. T Parazitol Derg., 2(2): 109-114.
62. Saygı G. 2002. Temel Tıbbi Parazitoloji. II. Baskı. Es-Form Ofset Ltd Şti. Sivas.
63. Saygı G. 2003. Özgür Yaşayan Amipler ve Oluşturdukları Parazitozlar. İnfeksiyon Hastalıkları. "İç Hastalıkları" içinde (G İliçin, K Biberoglu, G Süleyman, S Ünal, eds). 2. Baskı. 2. Cilt. Güneş Kitabevi. Ankara. S. 3429-3436.
64. Schaumberg DA, Snow KK, Dana MR. 1998. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: Where do we stand? Cornea, 17(1): 3-10.
65. Schuster FL. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev., 15(3): 342-354.
66. Seal D, Hay J, Kirkness C, Morrell A, Booth A, Ridgway A, Armstrong M. 1996. Successful medical therapy of *Acanthamoeba* keratitis with topical Chlorhexidine and propamidine. Eye, 10 (Pt 4): 413-421.
67. Seal DV, Hay J, Kirkness CM. 1995. Chlorhexidine or polyhexamethylene biguanide for *Acanthamoeba* keratitis. Lancet, 345: 136.

68. Sesma MJM, Garcia LC, Guillen LP. 1988. Free-living amoebas and cold-blooded animals. *J Parasitol.*, 74(5): 883-884.
69. Sezen F (ed). Göz Hastalıkları El Kitabı-Atlas (Lang GK'dan çeviri). Palme Yayıncılık / Ankara.
70. Sönmez Tamer G, Manavay G. 2003. Olgu sunumu: *Acanthamoeba keratiti*. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Program ve Özet Kitabı. Konya. S: 224.
71. Stehr-Green Jk, Bailey TM, Brandt FH, Carr CH, Bond WW, Visvesvara GS. 1987. *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers. A case control study. *JAMA.*,258: 57-60.
72. Stothard DR, Hay J, Schroeder-Diedrich JM, Seal DV, BYERS TJ. 1999. Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and T4 18S rRNA gene sequence type. *J Clin Microbiol.*, 37: 2687-2693.
73. Thomas PA, Kuriakose T. 1990. Rapid detection of *Acanthamoeba* cysts in corneal scrapings by lactophenol cotton blue staining. *Arch Ophthalmology*, 108: 168.
74. Walochnik J, Haller-Schober EM, Kölli H, Picher O, Obwaller A, Aspöck H. 2000. Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. *J Clin Microbiol.*, 38(11): 3932-3936.

75. Walochnik J, Obwaller A, Aspöck H. 2000. Correlations between morphological, molecular biological and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. Appl Environ Microbiol., 66(10): 4408-4413.
76. Wilhelmus KR, Osato MS, Font RL, Robinson NM, Jones DB. 1986. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using calcoflour white. Arch Ophthalmol., 104: 1309-1312.
77. Woodruff SA, Dart JKG. 1999. *Acanthamoeba* keratitis occurring with daily disposable contact lens wear. Br J Ophthalmol., 83: 1088-1089.
78. Wright P, Warhurst D, Jones BR. 1985. *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. Br J Ophthalmol., 69:778-782.

SONUÇ

Deneysel olarak oluşturduğumuz *Acanthamoeba* keratitindeki, histopatolojik gelişimin incelendiği ve iki farklı *Acanthamoeba* türünün keratit yapma yeteneklerinin ve tedaviye cevaplarının karşılaştırmalı olarak incelendiği araştırmamızın sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Viyana Üniversitesi, Medikal Parazitoloji bölümünden elde edilen *A. castellanii* ve *A. hatchetti* türlerinin monoksenik ve aksenik kültürleri elde edildi.
2. Agar ve sıvı besiyerindeki, canlı amip trofozoit ve kistlerinin görünüşleri incelendi. Sıvı besiyerindeki inceleme sonucu; iki, üç ya da dört amibin karşılıklı olarak aralarında köprü kurdukları, konjugasyon benzeri olayları izlendi.
3. Amiplerin boyanmasında kullanılan on farklı boyadan, Heidenhain'ın demirli hematoksilin boyası, Giemsa, PAS Schiff, Masson Trikrom ve Toludin-O boyalarının, diğer boyalarla kıyaslandığında trofozoitlerin hücre yapılarını daha iyi boyadığı belirlendi.
4. *Acanthamoeba* türü amiplerle infekte olan keme gözlerinde, epitelyal ödem, punktat epitelyopati, ileri aşamalarda korneal ülser, stromal infiltratlar, damarlanma ve sonrasında da pannus dokusu gelişimi görüldü.
5. *A. castellanii* ile infekte edilen keme gözlerinin histopatolojik olarak incelenmesi sonucu, genellikle nötrofil ve eozinofillerden oluşan bir immün yanıt olduğu belirlendi. Bunun yanında, stromal lamellada bozulma, yoğun vaskülarizasyon ve ödem görüldü. Stroma içinde amip trofozoitleri bulunurken, kistlere rastlanmadı.

6. *A. castellanii* ile infekte edilen gözlerde tablo daha hızlı ve kötü seyrederken, *A. hatchetti*, invaziv olmayan ve daha yavaş seyirli bir tablo gösterdi. Bu klinik tabloyla uyumlu olarak, *A. hatchetti* ile infekte gözler tedaviye daha iyi cevap verirken, *A. castellanii* ile infekte gözler, pannus oluşumu ile birlikte iyileşme gösterdi.

ÖZET

Deneysel Olarak Oluşturulan *Acanthamoeba* Keratitinin Histopatolojik Gelişimi ve Hastalığın Tedavisi Üzerine Çalışmalar

Çalışmamızda, *Acanthamoeba* keratitli hastalardan izole edilen, *A. castellanii*'nin 1BU suşu ve *A. hatchetti*'nin 2HH suşu kullanıldı. Bu tür amipler keme gözlerine inoküle edilerek, deneysel *Acanthamoeba* keratiti oluşturuldu. Bu iki amip türünün keratit yapma yetenekleri ve keratit oluştuktan sonra uygulanan tedaviye cevapları karşılaştırmalı olarak incelendi. Bunun yanında *A. castellanii* ile infekte keme gözlerindeki histopatolojik gelişim de takip edildi.

Amip türlerinin göze inokülasyonu sonucu, bütün keme gözlerinde keratit gelişti. İnfekte gözlerde epitelyal ödem, punktat epitelyopati, ileri aşamalarda korneal ülser, stromal infiltratlar, damarlanma ve sonrasında pannus dokusu gelişimi görüldü.

A. castellanii ile infekte edilen gözlerde tablo daha hızlı ve kötü seyrederken, *A. hatchetti*, invaziv olmayan ve daha yavaş seyirli bir tablo gösterdi. Bu klinik tabloyla uyumlu olarak, *A. hatchetti* ile infekte gözler % 0.002'lik Cholorhexidine ve neomycin - polymyxin B - gramicidin (neosporin)'in kombine olarak kullanıldığı tedaviye daha iyi cevap verirken, *A. castellanii* ile infekte gözler, pannus oluşumu ile birlikte iyileşme gösterdi.

A. castellanii infekte edilen keme gözlerinin histopatolojik olarak incelenmesi sonucu, genellikle nötrofil ve eozinofillerden oluşan bir immün yanıt oluştuğu, bunun yanında, stromal lamellada bozulma, yoğun vaskülarizasyon ve ödem görüldü. Stroma içinde amip trofozoitleri bulunurken, kistlere rastlanmadı.

SUMMARY

Histopathological Development of Experimental *Acanthamoeba* Keratitis and In Vivo Studies on Its Therapy

In the present study, it was aim was to define the clinical and histopathological description of *Acanthamoeba keratitis* and develop a new therapathic approach on experimental *Acanthamoeba* keratitis. For this purpose, we used two strains of *A. castellanii* (1BU) and *A. hatchetti* (2HH) which were isolated from *Acanthamoeba* keratitis cases. In animal experiments 3 groups of (each group consists of 6 rats) rats were used: group one inoculated with *A. castellanii*, group two with *A. hatchetti* and the last one was control. Experimental *Acanthamoeba* keratitis was induced in rats by intrastromal inoculation of *Acanthamoeba* (%90 cysts, %10 trophozoite). In control group Page's saline solution was used for inoculation. The abilities of both strains in keratitis development and therapathic difference between them were compared. The histopathological development of *A. castellanii* in rat corneal tissues were also investigated.

All rats inoculated with *Acanthamoeba* species developed keratitis. Clinical keratitis was developed acutely and progressed rapidly in rats infected with *A. castellanii* than those which were infected with *A. hatchetti*. Keratitis caused by *A. hatchetti* was noninvasive and followed a less progressive route. Certain clinical features were consistently observed in these rats such as, epithelial edema, punctate epitheliopathy, progressive corneal ulcer, stromal infiltrations, vascularisation and pannus tissue development.

The combined application of chlorhexidine (% 0.002) and neomycin - polymyxin B - gramicidin (neosporin) was used in the therapy of experimental keratitis. This therapy caused dramatic improvement in rats infected with *A. hatchetti*, whereas the rats infected with *A. castellanii* respond to this treatment with pannus development.

A marked inflammatory response of neutrophils and macrophages at the inoculation sites was detected in the histopathological section of rat corneal tissues that were inoculated with *A. castellanii*. In addition, dense vascularisation, stromal edema, and destructions of stromal lamellae were also observed in these sections.