

60180

T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI KÜLTÜR ORTAMLARINDA  
LEİSHMANIA PROMASTİGOTLARININ ÜREMESİ ÜZERİNE  
SICAKLIK, pH VE CO<sub>2</sub>'İN ETKİSİ**


YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arş.Gör. SERPİL DEĞERLİ

Danışman öğretim üyesi  
Prof.Dr.SEMRA ÖZÇELİK

Ağustos - 1997

SİVAS



"Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarih ve 84 / 1 no'lu kararıyla kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır."

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I - GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II - GENEL BİLGİLER.....	4
III - GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
IV - BULGULAR.....	21
V - TARTIŞMA.....	35
VI - SONUÇ.....	42
VII - ÖZET.....	43
VIII - SUMMARY.....	44
IX - KAYNAKLAR.....	45

## T A B L O L A R

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo. 1-</b> NNN besiyerinde farklı sıcaklıklarda inkübe edilen promastigotların üreme durumu.....	22
<b>Tablo. 2-</b> NNN besiyerinde farklı sıcaklıklarda saptanan promastigot sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	23
<b>Tablo. 3-</b> Farklı pH' lardaki NNN besiyerinde üretilen promastigotların durumu.....	24
<b>Tablo. 4-</b> Farklı pH' larda hazırlanan NNN besiyerinde üretilen promastigotların istatistiksel değerlendirilmesi.....	25
<b>Tablo. 5-</b> NNN besiyerinde farklı CO <sub>2</sub> ortamlarında inkübe promastigotların durumu.....	26
<b>Tablo. 6-</b> NNN besiyerinde farklı CO <sub>2</sub> konsantrasyonlarında inkübe edilen promastigot sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	27
<b>Tablo.7-</b> Sığır kanlı besiyerinde farklı sıcaklıklarda inkübe edilen promastigotların durumu.....	28
<b>Tablo.8-</b> Sığır kanlı besiyerinde farklı sıcaklıklarda saptanan promastigot sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	29
<b>Tablo. 9 -</b> Farklı pH' larda hazırlanan sığır kanlı besiyerinde üretilen promastigotların durumu.....	30
<b>Tablo.10-</b> Farklı pH' larda hazırlanan sığır kanlı besiyerinde üretilen promastigotların istatistiksel değerlendirilmesi.....	31
<b>Tablo.11-</b> Sığır kanlı besiyerinde farklı CO <sub>2</sub> ortamlarında inkübe edilen promastigotların durumu.....	32
<b>Tablo.12-</b> Sığır kanlı besiyerinde farklı CO <sub>2</sub> konsantrasyonlarında inkübe edilen promastigot sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	33
<b>Tablo.13-</b> Sığır kanlı besiyeri ve NNN besiyerinin sıcaklık denemelerine göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	33
<b>Tablo.14-</b> Sığır kanlı besiyeri ve NNN besiyerinin pH denemelerine göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	34
<b>Tablo. 15-</b> Sığır kanlı besiyeri ve NNN besiyerinin CO <sub>2</sub> denemelerine göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	34

## G R A F İ K L E R

	<u>Sayfa</u>
<b>Grafik A :</b> NNN besiyerinde farklı sıcaklıklarda hazırlanan promastigotların üreme eğrisi.....	22
<b>Grafik B :</b> Farklı pH'larda hazırlanan NNN besiyerinde üretilen promastigotların üreme durumları.....	24
<b>Grafik C :</b> NNN besiyerinde farklı CO <sub>2</sub> ortamlarında inkübe edilen promastigotların üreme eğrisi.....	26
<b>Grafik D :</b> Sığır kanlı besiyerinde farklı sıcaklıklarda inkübe edilen promastigotların üreme eğrisi.....	28
<b>Grafik E :</b> Sığır kanlı besiyerinde farklı pH'larda üretilen promastigotların durumu.....	30
<b>Grafik F :</b> Sığır kanlı besiyerinde farklı CO <sub>2</sub> ortamlarında inkübe edilen promastigotların üreme eğrisi.....	32

## SEKİLLER

	Sayfa
<b>Şekil I</b> : Amastigotun ince yapısı .....	8
<b>Şekil II</b> : Promastigotun ince yapısı.....	9



## TEŐEKKÖR

Çalıőmalarımın gerçekteőmesinde çok büyük katkı ve desteği olan danışman hocam Sayın Prof.Dr. Semra ÖZÇELİK'e, her konuda tecrübelerinden yararlandığımız Sayın Prof. Dr. Gülendame SAYGI'ya, ayrıca yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Ziyet ÇINAR'a ve Vet. Hek. Yücel YALMAN'a Arş.Gör.Naci DEĞERLİ'ye çok teőekkür ederim.

## GİRİŞ VE AMAÇ

Leishmania türleri, memelilerin zorunlu hücre içi parazitleri olup, enfekte dişi kum sinekleri (Phlebotomus = tatarcık = yakarca) tarafından, kan emme işlemi sırasında bulaştırılmaktadır. Bu şekilde bulaşan Leishmania türleri insanda deride ve iç organlarda yerleşerek hastalık oluşturabilmektedir.

Leishmania cinsindeki türlerin evriminde; omurgalı konakta amastigot, (layşmanya) vektör vücudunda ve kültürlerde promastigot ( leptomonas ) olmak üzere iki farklı şekil bulunmaktadır (2,8,9,11,16,23,24,27,30,35,36,37).

İnsanda hastalık oluşturan Leishmania türleri morfolojik olarak birbirlerine oldukça benzerlik göstermelerine karşın, klinik olarak üç farklı hastalığa neden olmaktadır.

1-İç organlar Leyişmaniyozu ( Kala-azar)

2-Kutanöz Leyişmaniyoz (Deri Leyişmaniyozu) (Şark çıbanı)

3-Mukokutanöz Leyişmaniyoz (Espundia)

Kala-azar olgularına ülkemizde Ege, Marmara, Akdeniz ve Karadeniz iklim bölgelerinde rastlanılmaktadır. Ege bölgesinde saptanabilen ilk olgu 1954'de Karaburun'da gözlenmiş, daha sonra artan oranlarda bölgenin değişik yörelerinde saptanmıştır. Deri leyişmaniyoz'una ise ülkemizde, Güney Doğu Anadolu bölgemizde hiper endemik karakterde olmak üzere Orta Anadolu' da dağınık tek tük olgular şeklinde (sporadik olarak) rastlandığı bildirilmektedir. Kala-azar ve deri leyişmaniyoz'u Yeni ve Eski Dünyada görülmekte fakat ayrı Leishmania türleri tarafından meydana getirilmektedir. Espundia ise, sadece Yeni Dünyada görülmektedir (23,31,35).

Dünyada 20 milyondan fazla insanın Leishmania türleri ile enfekte olduğu ve her yıl ilave olgu sayısının 400.000' e ulaştığı, yaklaşık 350 milyon insanın risk altında bulunduğu tahmin edilmektedir. Son 5 yılda saptanan ölüm olgusu ise 40.000 civarındadır ( 23).



Tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkan *Leyişmaniyoz*'un kontrolü, bulunduğu her yörenin farklı özellikler göstermesine bağlı olarak oldukça zor olmaktadır. Bu nedenle hastalığın endemik olduğu yerlere özgü kontrol programlarına, bu tip hastalıkların tanısını koyabilecek yetişmiş elemanlara gereksinim vardır.

*Leyişmaniyoz*'un tanısı, parazitin insanda hastalık oluşturduğu bölgeye göre bazı farklılıklar göstermekle birlikte, temelde direkt inceleme ve/veya kültür yöntemleri ile yapılabilmektedir.

*Leyişmaniyoz*'a sebep olan *Leishmania* türlerinin *in vitro* kültürü, bu organizmaların biyokimyasının, hücre biyolojisinin, immünolojik ve kemoterapötik özelliklerinin tanımlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, serolojik tanı yöntemlerinin hazırlanması aşamalarında antijen elde etmek için çok sayıda parazite gereksinim duyulduğundan, *in vitro* kültür ortamlarından sıklıkla yararlanılmaktadır (19).

*Leishmania*'ların evriminde görülen promastigot ve amastigotların her ikisinin de kültürü yapılabilmektedir. Promastigotlar için bifazik, yarı katı ve sıvı besiyerleri kullanılırken, amastigotlar için hücre kültürleri tercih edilmektedir (26,10). *In vitro* kültürlerde parazitin gereksinim duyduğu fiziksel ve kimyasal koşulların çok iyi belirlenmesi kültürün amacını gerçekleştirme yönünden önemlidir. *Leishmania*'ların amastigot formlarının üretilmesi daha zahmetli ve zor olduğundan tanı amacıyla bu tip kültürler kullanılmamaktadır. Buna karşın vektör Phlebotom vücudundaki şekil olan promastigot formların üretilmesi yoluyla tanıya kolayca gidilebilmektedir.

*In vitro* kültür ortamlarında sıcaklık ve pH'nın, promastigotların amastigotlara ayrıca bunun tersi yönde yani amastigotların promastigotlara dönüşümü için gerekli olan en önemli unsurlar olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca CO<sub>2</sub>'in varlığının da bu tip bir farklılaşmada gerekli bir öğe olduğu bildirilmektedir (36).

Çalışmamızda, bu bilgilerden yola çıkılarak *Leishmania tropica* promastigotlarını in vitro ortamlarda üreyebilmeleri için gerekli olan optimal sıcaklık, pH ve CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarının saptanabilmesi amaçlanmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### TARİHÇESİ

Leishmania'ların farklı türleriyle oluşan farklı hastalıklarının dünyada ve yurdumuzda ilk kez bulunuşları birbirine yakın zamanlarda olmuştur.

İlk kez 1900' de Leishman, Hindistan'da Kalküta yakınında Dumdum'da dizanteriye yakalanarak İngiltereye gönderilen ve 7 ay sonra ölen bir askerin dalağında yapılan yayma preparatlarda küçük, oval cisimler görmüş ve bunları 1903'de yayımlamıştır (35).

Aynı yıl Donovan, Madras'ta kala-azar olgularında, ölümden önce veya sonra dalaktan elde ettiği materyalden hazırlanan yayma preparatlarda paraziti görmüş ve bunların Trypanosoma'lardan farklı olduğunu bildirmiştir (10,35).

Yurdumuzda kala-azarın varlığını ilk kez bildiren ise Kristamonas'tır. Bu hekim Trabzon'da kala-azar tespit ettiğini bildirmiştir. Prof Dr. Abdülkadir Noyan, Irak cephesinde çalışırken 1916 yılı temmuz ayında düzensiz ateşli, büyük sert dalaklı ve tekrar tekrar yapılan kan incelemelerine rağmen sıtma paraziti bulunamayan hastalardan dalak-karaciğer ponksiyonu yaptıklarında bu hastaların 11'inde L.donovani saptandığını bildirmiştir. Bu olguları savaş nedeniyle hemen yayımlayamamış ve 1916 yılında Sahra Sıhhiye Müfettişliğine iletmiştir.

Dr. Hulusi Behçet, Edirne merkez hastanesine gelen Halep'li erlerde parazit taraması esnasında, kabukların altındaki epitel uzantılarını çivi belirtisi diye adlandırmış, Cezayirli Montpellier (1925) ise bunları orağa benzetmiştir. 1918 yılında Dr. Hafert Kaller İzmir civarında kala-azar'a rastladığını bildirmiştir.

Dr. Akil Muhtar Özden de 1936 yılında bir kaç kala-azar olgusu bildirmiştir.

Köpeklerde kala-azar bulunduğuna dair ilk bilgiler ise yurdumuzda Dr. Nurettin Onur'a aittir.

Şark Çıbanı ise ilk kez 1745'de İngiliz hekimi Poccocke ve 1756'da A.Russel tarafından bildirilmiştir. Hastalığın bu gün bilinen etkisiyle ilişkili ilk tanımı 1885'de Cunningham tarafından yapılmıştır (35).

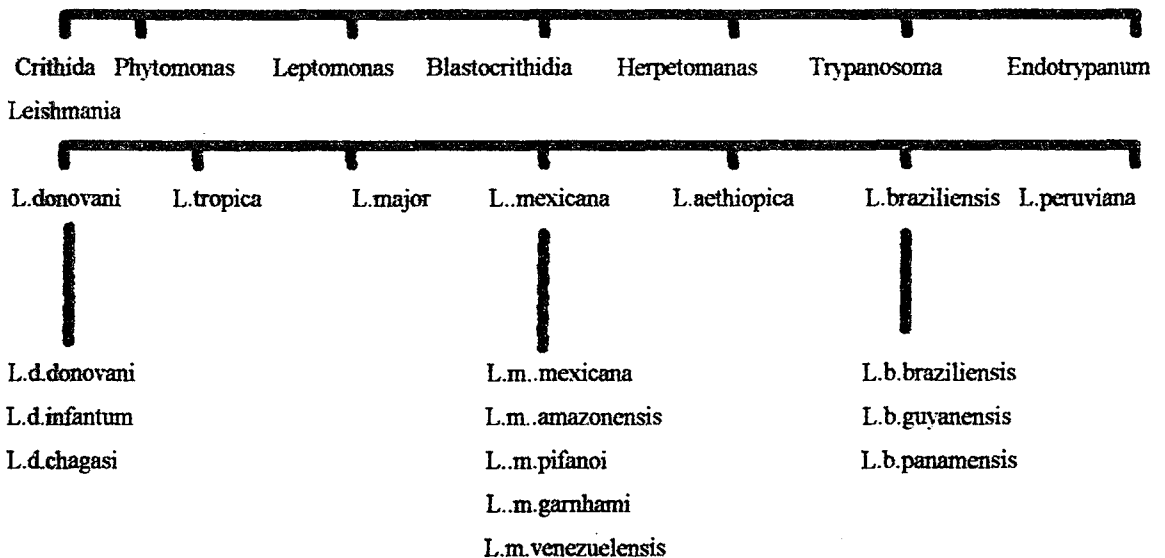
1904 yılında Rogers, ilk kez, sitratlı hasta kanında Leishmania promastigotlarını üretmeyi başarmıştır. 1908'de ise Nicolle, NNN besiyerinde Leishmania tropica'nın kültürünü yapmış ve parazite L. wrighti adını vermiştir (10,35).

Yurdumuzda ise Leishmania tropica'nın kültürünün ilk kez 1911'de Reşat Rıza ve Mustafa Bey tarafından yapıldığını Dr. Hulusi Behçet bildirmektedir. Adler ve Theoder, Phlebotomus 'larda promastigotları bularak, deneysel olarak Phlebotomus'tan insana şark çıbanını geçirmişlerdir. Adler, Leishmania'nın tatarcık sokmasıyla insandan insana geçtiğini kesin olarak göstermiştir (10,31,35).

Yapılan bu tanımlamalardan sonra Leishmania'ların sistematikteki yeri aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Evren	:Animalia
Üst şube (Superphylum)	:Protozoa
Şube (Phylum)	:Sarcomastigophora
Alt şube (Subphylum)	:Mastigophora
Sınıf (Class)	:Zoomastigophora
Takım (Ordo)	:Kinetoplastida
Alt takım (Subordo)	:Trypanosomatina
Aile (Familya)	:Trypanosomatida

Cins (Genus)



## DÜNYADAKİ VE YURDUMUZDAKİ DAĞILIMI

Visseral leişmaniyoz dünyanın her tarafında, özellikle tropikal ve subtropikal ülkelerde görülen bir paraziter hastalıktır. Etkenlerinin ise Eski Dünya'da *Leishmania donovani* ve *L. infantum* türleri ,Yeni dünya'da ise *L. chagasi* olduğu bildirilmektedir.

*Leishmania infantum* Akdeniz çevresi ülkelerde (Kuzey Afrika, Ürdün, Suriye, Türkiye, İtalya, İran, Türkistan) kala-azar etkeni olup *Phlebotomus papatasi*, *P. major*, *P. perniciosus* *P. longicuspis* türü tatarcıklar tarafından bulaştırılır. Bu bölgede, daha çok tarım alanlarında, köylerde, dağlık alanlarda ise özellikle Kuzey Afrikanın Akdeniz kıyısı boyunca parazite rastlanmaktadır.

Ülkemizde ise kala-azar Ege ve Akdeniz bölgesinde endemik, diğer bölgelerde daha çok sporadik olarak seyretmektedir. WHO'ya göre yurdumuzda bu hastalık etkeninin *L. infantum* olduğu bildirilmektedir. Ancak henüz vektörü bilinmemektedir. *L. chagasi*'ye, daha çok Güney Amerika'nın merkezinde, kuzeyinde ve Orta Amerika'da, sporadik olarak ise Güney Batı Amerika'da rastlanmaktadır ve ara konağı *P. lutzi*, *P. intermedius*, *P. longipalpis* olabilmektedir (23,35).

Türkiyede deri leişmaniyoz (Şark çıbanı) etkenleri *L. tropica* ve *L. major*'dür. *L. tropica*'nın oluşturduğu ve antroponik tipteki epidemilerle karakterize kuru tip lezyona daha çok rastlanılmasına rağmen *L. major*'un etken olduğu yaş tip lezyon oldukça nadir görülmektedir. *P. papatasi* ve *P. sergenti* vektör rolü oynamaktadır (35).

*Leishmania aethiopica*, yaygın (diffüz) deri leişmaniyoz etkeni olup,Orta Afrika özellikle Aethiopia ve Kenya'da görülmektedir. Parazitin ara konak görevini *P. martini* yapmaktadır. *Leishmania mexicana*, *L. pifanoi*,*L. braziliensis panamensis*, *L. b. guyanensis* ve *L. peruviana* Yeni Dünya deri leişmaniyoz etkenidirler.

*Leishmania braziliensis braziliensis*, Brezilya ve Venezuela'da ormanlık bölgelerde daha çok rastlanılan, mukokütanöz deri leişmaniyoz etkenidir. Paraziti taşıyan tatarcık türü, *P. intermedius*'tur (23).

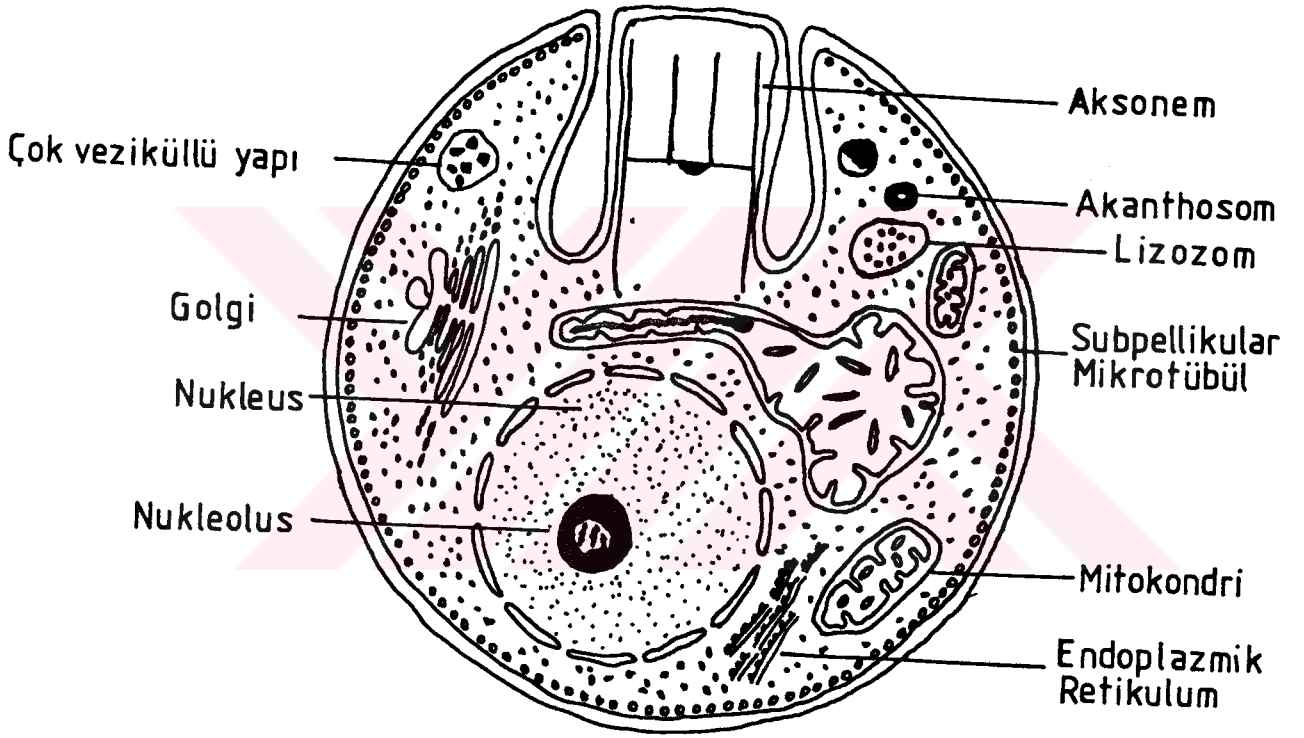
## MORFOLOJİSİ

Şark Çıbanı, Kala-azar ve Güney Amerika insanlarında mukokutanöz leyişmaniyoz'a neden olan Leishmania türlerinin, insan ve başka memelilerin vücudunda kamçısız (amastigot) , tatarcık vücudunda kamçılı ( promastigot ) olmak üzere iki evrim şekli vardır.

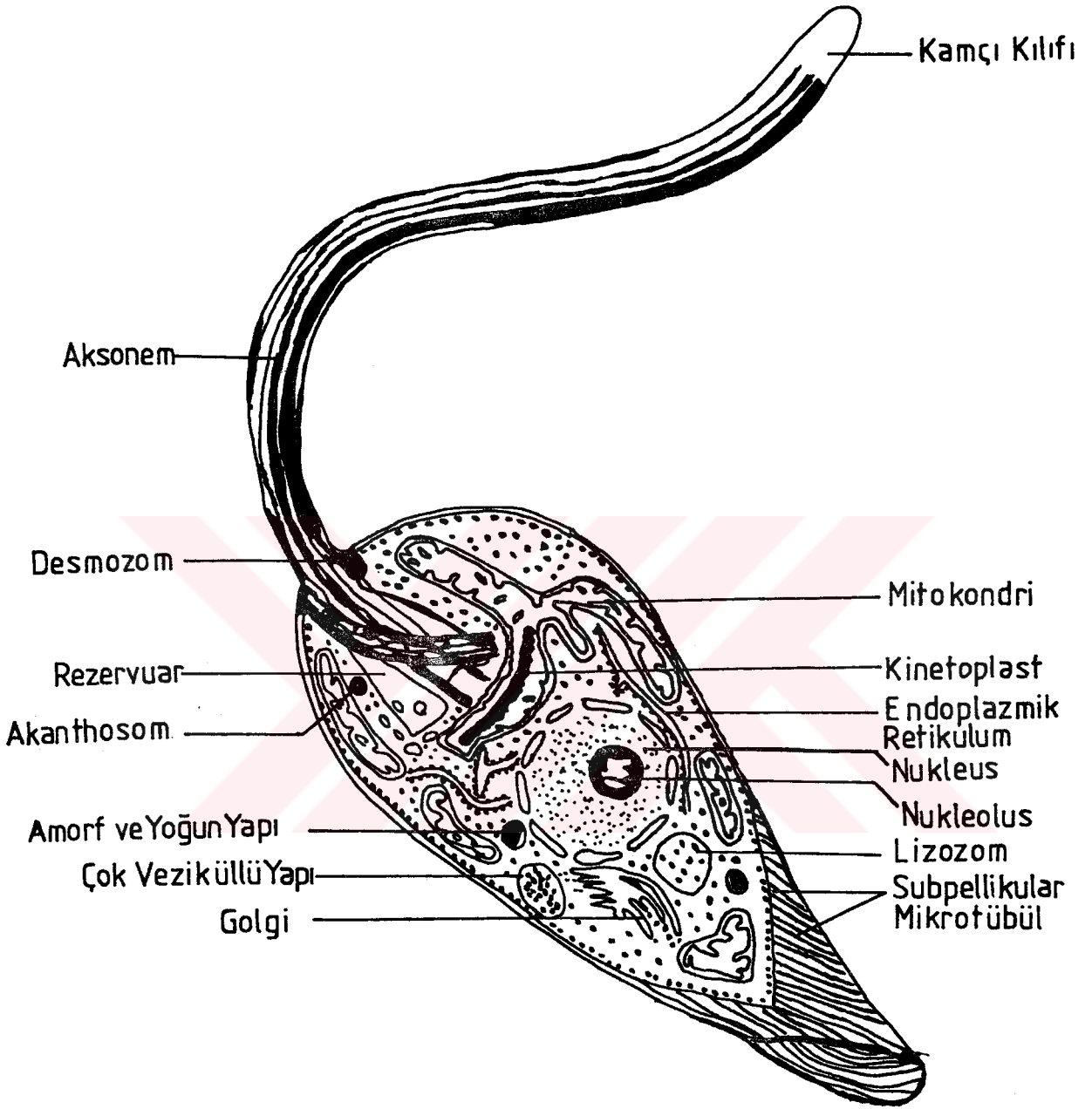
Amastigot formlar 2-4 µm büyüklüğünde yuvarlak veya oval olup, omurgalı konakta RES makrofajlarının fagolizozomları içinde çoğalmaktadır. Kamçısız ve hareketsizdirler. Giemsa ile boyanmış preparasyonlarda, sitoplazma soluk mavi boyanır, içinde pembe veya kırmızı boyanan, arka uca yakın, oldukça büyük bir çekirdek ve ona bitişik bir kinetoplast vardır. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde ise kısa gömme kamçı görülebilmektedir. Çekirdek yuvarlak veya oval ve 1-1,2 µm çapındadır. Çekirdek ve kinetoplastın her ikisi de DNA içermektedir. Sitoplazmada ayrıca mitokondri, vaküoller, lizozom ve golgi cihazı da bulunmaktadır ( şekil 1 ) (31).

Promastigot formlar, Phlebotomus'ların barsaklarında ve besiyerlerinde bulunan tipik formlardır. 12-20 µm uzunlukta, 1,5- 2,5 µm genişlikte olup, mekik şeklinde vücudu ve yaklaşık aynı uzunlukta ön uçtan çıkan serbest bir kamçısı bulunmaktadır. Kamçı karakteristik aksonemal yapıdadır. Aksonem ise 2 merkezi, 9 periferel fibril çifti içermektedir. Kamçının bağlantı noktasında " kamçı paketi " adı verilen ve sitostoma benzeyen bir kinetoplast bulunmaktadır. Çekirdek parazitin vücudunun ortasında bulunur. Sitoplazma içinde Endoplazmik Retikulum ve Golgi aygıtı bulunmaktadır ( şekil 2 ) (31).

Leishmania türlerinin hepsi amastigot ve promastigotların yapısal özellikleri yönünden belirgin bir farklılık göstermemektedirler. Ancak türler ve suşlar arasında izoenzim elektroforezi ile saptanan ve antijenik yapı özelliklerini gösteren farklılıkların bulunduğu bildirilmiştir (31).



Şekil I. Amastigotun ince yapısı



Şekil II. Promastigotun ince yapısı



## EVİRİMİ

Leishmania türleri, evrimlerini biri omurgalı (insan) ,diğeri omurgasız (tatarcık) olmak üzere iki ayrı konakta sürdürmektedirler. Enfekte omurgalı konaktan kan emme sırasında tatarcık tarafından amastigotlar alınmaktadır. Bu sırada şişmiş durumdaki enfekte makrofajlar bir travmaya maruz kalarak parçalanmakta ve amastigotlar serbest kalmaktadır. Alınan kanın etrafı mide hücreleri tarafından salgılanan bir membran ile çevrilidir. Burada amastigotların bir kısmı sindirilirken bir kısmı bölünmeye uğrar. Amastigotların büyüklüğü artar, vücudun uzaması ve kamçı gelişimi ile promastigotlara dönüşürler. Burada çoğalmalarını sürdürerek membranın ön kısmını eritip, mideye geçerler. Bu promastigotlara " Nektomonad " denir, daha uzun ve incedirler (23).

Bunlar midenin ön ucundaki stomadeal kapağa geldikleri zaman kamçılarıyla barsak epitel hücrelerinin mikrovilluslarına tutunurlar. Kamçı ve mikrovilluslar arasında epidermazom adı verilen bağlayıcı yapılar meydana gelir bu esnada bölünme devam eder.

Bu bölgede gelişen ve **Haptomonad** adı verilen promastigotlar, ön tarafa doğru göç ederek özafagus ve farinkse tutunarak lümeni tıkırlar. Promastigotlar özafagustan ayrılarak daha küçük ve uzun formlar halinde ağız parçalarına geçerler. Bölünmezler, bağlanmazlar ve omurgalılardaki yaşama adapte olabilirler. Bunların bir kısmı tekrar uzun kamçılı, kısa ,yuvarlak formlara dönüşerek stomadeal kapağın tamamına bağlanabilirler. Bu enfektif promastigotlar uzun kamçıların bulunması, arka ucunun sivri ve vücutlarının dar olması ile diğeri promastigotlardan ayırdedilirler. (20)

Enfekte kanın alınmasından sonra tatarcığın paraziti tekrar bir başka omurgalı konağa bulaştırabilmesi için L. mexicana türlerinde 4 güne, L.infantum için ise 6 güne gereksinim vardır (23).

Enfekte phlebotomun, insanı sokmasıyla bu promastigotlar insana enjekte edilir. İlk bir kaç saat içinde deriye ait retikülo-histiyositler ve lenfoid doku

hücrelerince fagosite edilirler. Makrofajlar içinde promastigotlar, amastigotlara dönüştükten sonra ikiye bölünerek çoğalırlar. Daha sonra amastigotlar hücre çeperinin yırtılmasıyla serbest kalırlar. Serbest kalan amastigotlar tekrar makrofajları enfekte ederek bu olayın seyir ettiği bölgede patolojik değişiklikler oluşturarak hastalığın klinik belirtilerinin ortaya çıkmasına yol açar ( 35).

Chang ve arkadaşlarının yapmış olduğu in vitro çalışmalarda makrofajların, promastigotlarla ilişkiye girmesinden 4-8 saat içinde enfekte olduğu ve 24 saat sonra da amastigotların görüldüğü saptanmıştır(23).

Makrofajlarla promastigotların ilk kez karşılaşmalarından sonra birbirine bağlanma olayında, promastigot üzerindeki ligandlar ile makrofaj üzerindeki reseptörler ve kompleman rol oynamaktadır. Leishmania promastigotlarının işgal işleminde rol alan ligandları yüzey proteini olan gp63 ile LPG (Lipofosfoglikan) dir. Ayrıca immun serumun bulunduğu ortamlarda Ig lerin aracılık yaptığı bir bağlanmayla makrofaj üzerindeki Fc reseptörleri de bağlanma işleminde görev yapmaktadırlar. Ortamda serum olmadığı durumda yani komplemanın bulunmaması durumunda da Leishmania promastigotları makrofajlara girebilmekte ve bu olayda CR3 reseptörü, promastigot üzerindeki LPG ve gp63 ligandları rol oynamaktadır (30).

Leishmania türleri, bütün hayat dönemlerinde, büyük ölçüde hidrolitik ve proteolitik aktivite gösteren olumsuz bir ortamda yaşarlar. Yaşamlarını sürdürmek amacıyla her iki konakta var olan sıcaklık, pH, besin ve serum bileşenleri açısından farklılık gösteren koşullara maruz kalırlar. Leishmania'lar pH ve sıcaklık toleransı, morfogenezis ,kompleman sindirimine karşı direnç ve yüzey moleküllerindeki değişimler gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla buldukları ortamlara adapte olma özelliğine sahiptirler (36).

Yüksek yapılı ökaryotik organizmalar olumsuz ortam koşullarına örneğin, pH ve sıcaklıktaki ani dönüşümlere karşı çok fazla tolerans gösteremezler. Bu gibi durumlarda bir çok ökaryotik hücre ölümden kurtulamaz. Oysa Leishmania parazitleri hayat döngülerinin bir parçası olarak pH ve sıcaklıklardaki ani değişimlerde hem canlı kalır hem de yaşamlarını sürdürebilirler. pH ve sıcaklıktaki çeşitlilik Leishmania'ların gen düzeyinde bir dönüşümü başlatır ve bu da parazitin yeni hayat formlarının gelişiminin başlangıcı olur (36).

Leishmania'lar infekte ettikleri makrofajların fagolizozomlarında pH 4,5 - 6 da yaşarlar. Phlebotomusun sindirim sisteminin pH'sı ise henüz saptanamamıştır. Bununla birlikte anofel ve diğer sineklerdekilere benzer ( pH 8,5 )muhtemelen alkali karakterde olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde konak makrofajları tarafından fagosite edilen promastigotun amastigota dönüşümü, parazitin çok hızlı olarak asidik çevreye maruz kalmasına yol açar.

Değişik enzimatik denemelerden elde edilen bulgulara göre Leishmania'lar farklı çevresel pH değerlerine büyük ölçüde adapte olabilme özelliği göstermektedir. Örneğin Leishmania mexicana'nın promastigotlarının yüzeylerinde bir tür metal içeren proteinaz vardır. Bu proteinaz yaklaşık pH 7 de optimal aktivite gösterir. Oysa Leishmania mexicana'nın amastigotlarının oluşturduğu metaloproteinaz (gp63 benzeri) ise pH 5,5 -6 arasında optimal aktivite gösterir. Bu yönüyle parazite ait metaloproteinaz diğer lizozomol proteinazlara benzemektedir. Bu sonuçlar son günlerde Leishmania'ların hayat siklusu ile ilgili olarak bunların özgün gp63 içerdiğini belirten bilgilerle de uyum içindedir (36).

Leishmania'ların yaşadığı hücre içi ve hücreler arası çevrenin pH'sı, farklılık göstermekle birlikte, parazitin hücre içi pH'sı hayat döngüsü süresince sabit kalmaktadır. Promastigot ve amastigotların fonksiyonlarını farklı çevresel pH'ya karşılık gelen değerlerde çok iyi sürdürebilmeleri, çevresel pH'daki değişime duyarlılık mekanizmaları geliştirdikleri görüşünü akla getirmektedir. Bu hipotez, L.major , L. donovani ve L.mexicana amozonensis promastigotlarının pH 4,5 - 5 ve 6 ya ayarlanmış kültürlerde hücresel aktiviteleri göz önünde bulundurularak elde edilmiştir. Bu çalışmada pH 4,5'a uyarlanmış promastigotların pH 6'da büyütülenlere göre 1,6 kat daha fazla bir yaşama şansına sahip oldukları görülmüştür.

Leishmania'ların, çevresel pH'lardaki aşırı değişimlerde canlı kalabilmek, promastigot ve amastigot dönemlerinde enzimatik aktivitelerini sürdürebilmek için sitoplazmik iyon konsantrasyonlarını korumaları gerekmektedir. Ara konağın sindirim sisteminde promastigotların hücre içi pH'sı, çevreden daha asidik karakterdedir. Son konakta makrofajlardaki lizozomların pH'sı ise parazitin hücre içi ortamından daha yüksek asidite gösterir.

### Leishmania'ların Sıcaklık Toleransı

Leishmania 'lar vektör tatarcık vücudunda 22°C-28°C arası sıcaklıkta yaşar. Memeli konağa geçişle birlikte, deri lezyonlarında 31°C-35°C 'ye, iç organlarda ise 37°C 'ye maruz kalırlar. Sıcaklıktaki böylesine ani değişimler hücre membran ve protein bileşenlerine zarar vererek ölüme yol açar. Bununla birlikte konakta canlı kalabilmek amacıyla Leishmania türleri, termotolerans kazanma özelliğine sahiptirler.

Güney Amerika Leishmania türlerinin promastigotları (L.mexicana, L.panamensis, L.braziliensis ) in vitro ortamda aksenik koşullar altında memeli vücut sıcaklığına maruz bırakıldığında (33°C-37°C), memeli makrofajlarındaki promastigotların amastigotlara dönüşümleri sırasında gözlenen morfolojik değişimlere benzer tarzda dönüşümler görülmüştür. Promastigotlar yuvarlaklaşır ve kamçı kökleri kaybolacak derecede kısaldığından hareketlerini kaybederler.

Promastigotların amastigotlara sıcaklığa bağlı olarak değişimleri geri dönüşümlüdür. Sıcaklığın azalmasına paralel olarak kamçılar tekrar büyür, parazit bölünme yeteneğini yeniden kazanır (36).

Leishmania donovani'nin önceden sıcaklık şoku ile etkileştirilip daha sonra da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li ortamda tutulduğunda, parazitlerin hidroksilik radikallere karşı koruyuculuk kazandığı bulunmuştur (36).

### **LEISHMANIA'LARIN FİZYOLOJİSİ VE BİYOKİMYASI**

Leishmania promastigotlarının gelişimleri ortamdaki O<sub>2</sub> basıncı ile yakından ilgilidir. Promastigotların düşük oksijen basıncı altında büyüklüklerinde, protein içeriklerinde ve hareketliliklerinde azalma, ölümlerde artma olmaktadır. Çünkü böyle bir ortamda glukoz tüketimi yaklaşık olarak % 50 oranında azalmaktadır (13). Ortamda% 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 O<sub>2</sub> bulunduğu durumlarda anaerobik glukoz tüketimi ile aerobik glukoz tüketimi hemen hemen eşitlenmektedir. Bu da enerji üretiminde oldukça önemli ürünlerden olan süksinat üretiminde belirgin bir artışa yol açmaktadır. CO<sub>2</sub> yokluğunda anaerobik glukoz tüketiminin neredeyse duraklaması promastigotların süksinat üretimi olmadıkça redox dengesini kurmada çok sınırlı bir kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir (2,7,13).

İlk yapılan çalışmalarda CO<sub>2</sub>' in anaerobik glukoz kullanımını kuvvetli bir şekilde stimüle ettiği ve hatta Trypanosoma'larda olduğu kadar Leishmania'ların anaerobik glukoz metabolizmasında da önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (26).

Leishmania promastigotları her ne kadar aerobik organizmalar olarak düşünülse de bunlar hipoksik koşullar altında da gelişebilirler ve hatta tam anaerobik koşullarda bile bir kaç saat canlılıklarını sürdürebilirler ( 7,10).

İn vivo ortamda CO<sub>2</sub> 'in amastigotların promastigotlara dönüşmesi için bir tetik görevi yaptığı bildirilmektedir (13).

Değişik karbondioksit konsantrasyonlarının üreme üzerindeki etkisi azdır. İn vivo ortamda Leishmania mexicana mexicana'nın promastigotlarının amastigota dönüşmesi için O<sub>2</sub> ye ihtiyaç vardır. Ama çok düşük bir düzeyde ( % 0,4 ) O<sub>2</sub> dönüşüm için yeterlidir. Buna karşın yüksek O<sub>2</sub> konsantrasyonunda dönüşüm de oldukça düşük hızda, parazitlerin transformasyon sayısı da çok az olmaktadır. % 5 lik CO<sub>2</sub> ortamındaki dönüşüm % 0,1'liğe oranla çok daha hızlı gelişmekte, amastigottan promastigota dönüşüm olayı 48 saat içinde tamamlanmaktadır. Amastigotlardan promastigotlara dönüşümün, parazitin tatarcık tarafından alınmasından sonra in vivo ortamda düşük O<sub>2</sub> basıncı ve % 5 'lik CO<sub>2</sub> düzeyine bağlı olarak başlatıldığı bildirilmiştir (13).

Leishmania'ların metabolik aktiviteleri sonucunda kültür ortamına parazitin türüne göre değişen, molekül ağırlığı yüksek maddeler birikmektedir. Bu maddelerin bazıları, Leishmania'ların partikül antijen olarak kullanılmasıyla elde edilen antikorlarla reaksiyona girdiği ve böylece Leishmania türlerinde serotiplerin ortaya çıktığı bildirilmektedir. Bu maddelere "Excreted Factor (EF) " adı verilmektedir(20).

Amastigot formlar normal olarak memelilerin mononükleer fagositik hücrelerinde bulunmaktadır. Bu nedenle in vivo kültürleri de bu hücreler içinde ve vücut sıcaklığında yapılmaktadır. Hücre kültürlerinde belli makrofaj hücre serileri veya fare, hamster gibi deney hayvanlarından elde edilen periton makrofajları kullanılmaktadır. Uygun bir kültüre konulan amastigotların % 85' i 48 saat içinde promastigotlara dönüşmektedir.

İn vitro ortamda *Leishmania major*'ün makrofaj içinde 35°C de ,37°C den daha hızlı bir biçimde çoğaldığı fakat 39°C de hızla yok olduğu bildirilmektedir (4). Benzer şekilde *L. mexicana* 'nın da sıcaklığa oldukça duyarlı olduğu ve parazitlerin makrofaj kültürlerinde 34°C de büyüüp çoğalmasına rağmen 37,5°C de hücrelere giremediği saptanmıştır (33). Yine *Leishmania donovani*'nin amastigotlarının hem 35°C hem de 37°C de eşit oranda çoğaldıklarını ve 39°C de ise az bir oranda yok oldukları bildirilmektedir.

*Leishmania promastigot*larının sıvı kültür ortamında aşamalı olarak, uzun kamçılı formdan, iğ şeklindeki ara forma geçerek, oradan yuvarlak ve kamçısız forma dönüşebildikleri bildirilmektedir (9 ).

Sıvı kültür ortamlarında *Leishmania*'ların üreme sürelerinde ve morfolojilerinde değişiklikler gözlenmiştir. Bu değişimin derecesi, parazitin yapısı üzerine etkisi, antijen olarak kullanıldığı serolojik testlerdeki etkileri araştırılmaktadır (9).

Kültürdeki promastigot formlar, omurgalı konağı infekte edebilme özelliğini uzun süre koruyabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, *Leishmania tropica*'nın bazı suşlarının insandan izole edildikten 11 yıl sonra, yine laboratuvar hayvanlarından elde edildikten 9 yıl sonra infektivitesini koruduğu ispatlanmıştır (10).

*Leishmania*'ların çoğu türlerinin kültürünü yapmak kolaydır. Ancak *Leishmania braziliensis*'in kültürünün yapılması oldukça zordur. Bununla birlikte " U.S. Army Medical Research Unit" (USAMRU) denilen besiyerinde, *Leishmania braziliensis panamensis*'in oluşturduğu mukokütanöz leişmaniyoz'da yaradan alınan örneklerdeki parazitlerin üretilmesi mümkün olmuştur ve bu besiyerinde parazitin üreme yoğunluğunun da fazla olduğu görülmüştür. *Leishmania braziliensis braziliensis* " Belem" besiyerinde üremediği halde USAMRU besiyerinde oldukça iyi ürettiği bildirilmiştir. Bu iki besiyeri arasındaki farkın ticari olarak hazırlanan agara dayandığı öne sürülmüştür (32).

Buna rağmen *Leishmania braziliensis panamensis* ve *Leishmania b.braziliensis*'in izolatlarının bir çok besiyerinde üretilmemesi, bu parazitlerin

üretilmesi ve tanımlanabilmesi için kültür ortamlarında değişik beslenme faktörlerine gereksinim duyduklarını göstermektedir (32).

## TANI

Leishmania türlerinin in vitro kültürü, bu parazitlerin biyokimyasının, hücre biyolojisinin, immünolojik ve kemoterapötik özelliklerinin tanımlanması için büyük önem taşımaktadır.

Leishmania'ların NNN besiyerinde kültürü ilk kez 1908'de Nicolle tarafından yapılmıştır ve bu paraziti Leishmania wrighti olarak adlandırmıştır. Tatarcık vücudunda bir evrim geçirdiği ise daha sonraki araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (35).

Promastigot ve amastigot formlarının her ikisinin de kültürü yapılabilmektedir. Amastigotlardan promastigotların üretilebilmesi için öncelikle uygun bir şekilde izolasyonun yapılması gerekmektedir. Materyal alınacak bölge sterilize edildikten sonra buradan alınan küçük bir deri parçasının kültürü yapılır. İç organlar leyişmaniyoz'unda ise genellikle kemik iliği ve dalak aspirasyon materyali kullanılmaktadır.

Hemoflagellatların kültürü için birçok farklı besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerlerini üç büyük kategoride sınıflandırmak mümkündür. a) Bifazik Besiyerleri (NNN, USAMRU), b) Yarı Katı Besiyerleri (Sloppy Evans Medium, Locke Blood Agar Medium), c) Sıvı besiyerleri (RPMI 1640, Medium 199, Schneider's Drosophila Medium, L-15, NCTC 109, HO-MEN) tüm bifazik ve yarı katı ortamlar parazitlerin replikasyonu için önemli bir faktör olarak kana ihtiyaç gösterirler. Sıvı besiyerlerin bir çoğu ise kan ve FBS (Fetal Bovine Serum) 'ye gereksinim duyarlar. FBS'nin pahalı oluşu ve kanın komponentlerinin immünolojik ve biyokimyasal çalışmaları güçleştirdiği gerçeği bu ortamların dezavantajlarıdır(26).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, kan ve serum kullanılmadan, hemoflagellatların üremesi için uygun bir besiyeri hazırlanmıştır (26). Bu tip besiyerlerinin özellikle biyokimyasal, fizyolojik ve farmakolojik çalışmalar için daha uygun olduğu belirlenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan *Leishmania promastigotları*, bunların kültürünün oluşturulmasında kullanılan besiyerleri ve besiyerlerinde kullanılan kanların hazırlanışı aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

**Parazitler** : Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D'dan sağlanan ve alt kültürleri Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji A.B.D.'da sürdürülen *Leishmania tropica promastigotları* kullanıldı.

**Kanlar**: Sığır kanı, Sivas Belediyesi Mezbahanesinden elde edildi. Steril boncuklu bolon içerisine konan kan, hızla çalkalanarak defibrine edildi. Çalışmamızda NNN besiyerinin hazırlanmasında kullandığımız tavşan kanı ise, C.Ü Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarındaki tavşanlardan sağlandı. Tavşandan kan alınacak bölge önce alkolle silindi. Sonra traş edildi. Bir kişi tavşanı sırt üstü yatırarak ayaklarını tuttu, diğer kişi ise steril enjektörle kalbe girerek kan alındı. Alınan kan steril boncuklu balon içine konularak hızlı bir şekilde çalkalandı. Kan soğuyuncaya kadar çalkalanmaya devam etmek kanın defibrine olması sağlandı.

**Besiyerleri** : Çalışmamızda, klasik NNN ( Novy- Nicolle - Mc Neal) besiyeri ve sığır kanlı besiyeri (SKB) kullanıldı.

Besiyerlerinin hazırlanışı aşağıda anlatıldığı şekildedir.

### NNN Besiyeri

Agar agar -----14 gr.

NaCl----- 6 gr.

Pepton-----1,8gr

Damıtık su ----- 900 ml.

Agar agar ve NaCl tartıldıktan sonra bir balon içine konuldu ve damıtık su ilave edildi. İyiçe çalkalanıp erimesi sağlandıktan sonra; balonun ağzı kapatılarak otoklavda 120° C' de 20 dakika bekletilerek steril edildi. Otoklavdan çıktıktan sonra besiyeri sıcaklığının yaklaşık 45° C 'ye düşmesiyle birlikte, ortama 2 :1 oranında tavşan kanı ilave edildi ( 2 besiyeri 1 tavşan kanı olacak şekilde ). Kanın alınmasından ileri gelebilecek herhangi bir kontaminasyonu engellemek için besiyerine 200 IU/ml



penicilline, 200mg/ml Gentamicyne eklendi. Daha sonra, steril vidalı kapaklı kültür tüplerine 5'er ml olacak şekilde dağıtıldı. Tüpler oda sıcaklığında yatık pozisyonda tutulup katılaşması sağlandı. 24 saat 37° C 'de bekletilerek kontaminasyon kontrolleri yapıldı. Besiyerleri, kullanılıncaya kadar +4° C' de saklandı. Promastigot ekimi yapılmadan önce tüplerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.

**Sığır kanlı Besiyeri ( SKB ) :** Mezbahanedede kesim sırasında hayvanın boğazından fişkırın kan steril boncuklu balonlar içine alınarak hızla çalkalandı ve kan soğuyuncaya kadar çalkalama işlemine devam edildi. Defibrine edilen sığır kanının içine 200 IU/ml Pencilline konuldu. Steril vidalı kapaklı kültür tüplerine 5-7'şer ml dağıtıldı.

Tüpler yatık olarak Pasteur Fırınında 75°C de 1 saat tutularak koagüle edildi. Besiyerleri soğuduktan sonra her bir tüpe 0.5 ml olacak şekilde steril serum fizyolojik eklendi. 37°C de 24 saat tutularak kontaminasyon testleri yapıldı ve kullanılıncaya kadar besiyerleri +4°C de saklandı.

## **FARKLI SICAKLIK DERECELERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR**

Bu aşamada, 5 ayrı etüv, 22°C, 26°C, 30°C, 34°C, 37°C olmak üzere farklı sıcaklıklara ayarlandı.

Çalışmaya başlamadan önce her bir dereceye en az 10 tüp ekim yapabilmek için, elimizdeki Leishmania promastigotlarından 10 besiyerine normal pasaj yapıldı. Bu besiyerlerinde 7 gün bekletilen kondansasyon sıvısındaki promastigotlar steril bir tüpte toplandı. Daha sonra hemositometre lamına 1 damla damlatılarak sayımları yapıldı. Burada 0,1 ml'deki promastigot sayısının  $1,5 \times 10^5$  olduğu saptandı. 50 adet NNN besiyerinin, herbirine  $1.5 \times 10^6$  promastigot/ml olacak şekilde ekimler yapıldı. Her farklı sıcaklık derecesine 10'ar tüp besiyeri konuldu. İlk ekimin yapılmasından 2 gün sonra sayımlara başlandı. 20 gün boyunca gün aşırı olarak sayım işlemleri devam etti. Sayılan promastigotlar ayrı ayrı not edildi.

Aynı şekilde sığır kanlı besiyerlerinin (50 tüp) herbirine  $1,5 \times 10^6$  promastigot/ml olacak şekilde ekimler yapıldı. Farklı sıcaklıklara ayarladığımız etüvlerin her birine 10'ar tüp konuldu. Sayma işlemine 20 gün boyunca devam edildi.

## **FARKLI CO<sub>2</sub> KONSANTRASYONLARINDA YAPILAN ÇALIŞMALAR**

Bu aşamada yeniden stok promastigot elde etmek için 10 adet NNN besiyerine normal pasaj yapıldı. 7. günde elde edilen promastigotlar steril bir tüpte toplanarak hemosimetre lamında sayıldı. CO<sub>2</sub>'li etüv önce %5 CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna ve 26°C lik sıcaklığa ayarlandı.

20 tane sığır kanlı ve 20 tane NNN besiyeri alınarak stok promastigot süspanسیونundan her bir tüpe  $1.5 \times 10^6$  promastigot/ml gelecek şekilde ekimler yapıldı. CO<sub>2</sub> 'li etüve her iki besiyerinden ayrı ayrı 10 tüp olmak üzere 20 tüp konuldu. 26°C ye ayarlanmış normal etüve de aynı şekilde 20 tüp konuldu. Ekim yapıldıktan 2 gün sonra ilk sayım yapıldı ve sayımlar 20 gün boyunca devam ettirildi.

%5 CO<sub>2</sub> li ortam ve normal ortamdaki sayımlar bittikten sonra, karbondioksitli etüv % 10 CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna ayarlandı. 20 tane ( 10 NNN +10 SKB ) besiyeri bu etüve, 20 tane ( 10 NNN +10 SKB ) besiyeri normal etüve konularak tekrar 20 gün boyunca sayımlar yapıldı.

## **FARKLI pH DERECELERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR**

İlk iki çalışmada olduğu gibi, tekrar stok promastigotların elde edilmesi yoluna gidildi. Besiyerinde üremenin en çok olduğu gün yani 7. günde promastigotlar bir tüp içerisine toplanıp sayıldı.

### **Tavşan kanlı besiyerinde pH ayarlaması**

Agar agar ve NaCl damıtık su içerisinde iyice eritildi ve 4 ayrı küçük cam balon içerisine 50 ml olacak şekilde konuldu. Bu cam balonların pH'ları sırasıyla fosfat tamponu ile pH 5, pH 6, pH 7 ve pH 8'e ayarlandı. Otoklavda 120°C de 20 dakika steril edildikten sonra 45°C ' ye kadar soğuması beklendi. Soğuduktan sonra her bir pH'daki sıvının içerisine 25 ml tavşan kanı eklendi. Cam balonlarda bulunan farklı pH'daki besiyerleri vidalı kapaklı tüplere 5'er ml dağıtıldı. Eğik olarak dondurularak kontaminasyon testleri yapıldı ( 37°C'de 24 saat bekletilerek).

### **Sığır kanlı besiyerinde pH ayarlanması**

Steril boncuklu balonda defibrine edilen sığır kanı vidalı kapaklı tüplere 5'er ml dağıtıldı ve eğik olarak Pasteur fırınında koagüle edildi (75°C de 1 saat). Diğer

tarafından 4 ayrı pH da serum fizyolojik hazırlandı ve otoklavda steril edildi. Koagüle edilmiş ve soğumuş olan sığır kanlı besiyerine farklı pH'larda ayarlanan serum fizyolojiktan 10 ayrı tüpe, 0.5 ml konularak 40 tüp hazırlandı. Kontaminasyon testleri yapıldı. ( 37<sup>0</sup>C'de 24 saat).

pH ayarlaması yapılan 40 tavşan kanlı, 40 sığır kanlı besiyerinin her birine 1.5.10<sup>6</sup> promastigot /ml gelecek şekilde ekimler yapıldı ve 26<sup>0</sup>C'lik etüve kaldırıldı. 2. günde ilk sayım yapılarak 20 gün boyunca sayma işlemine devam edildi.

#### **Promastigot sayısının hesaplanması**

Sayım yapılacak besiyerlerin kapakları alev karşısında açılarak hemositometre lamının üzerine 1 damla kondansasyon sıvısından damlatıldı. Üzeri lamel ile kapatılarak mikroskopta 40 lık objektifle 16 en küçük kare = 1 büyük kare sayıldı. Bulunan bu sayı ( Promastigot sayısı = n)  $n \times 16 \times 10.000$  şeklinde hesaplanarak 1 ml'deki promastigot sayısı bulundu ( Toma lamının özelliğine bağlı olarak) .

Promastigotların üremesinin çok yoğun olduğu dönemlerde, hareketi durdurmak ve sayım işlemini kolaylaştırmak için % 0,4' lük formalin kullanıldı. Hemositometre lamının üzerine 1 damla kondansasyon sıvısı, 1 damla % 0,4 'lük formalin konulup lamel kapatılıp sayma işlemi yapıldı. Ancak hesaplama yapılırken  $n \times 2 \times 16 \times 10.000$  formülünden faydalanıldı

## BULGULAR

*Leishmania tropica* promastigotlarının üremesinin en yoğun olduğu sıcaklık, pH ve CO<sub>2</sub> derecelerini belirlemek, ayrıca, tavşan kanı ile hazırlanan NNN besiyeri ile sığır kanlı besiyeri arasındaki farkı belirlemek amacıyla bu çalışma planlanmıştır. Elde edilen bulgular her iki besiyeri için aşağıda sunulduğu şekildedir.

### 1- NNN (NOVY -NİCOLLE -MC NEAL) BESİYERİ

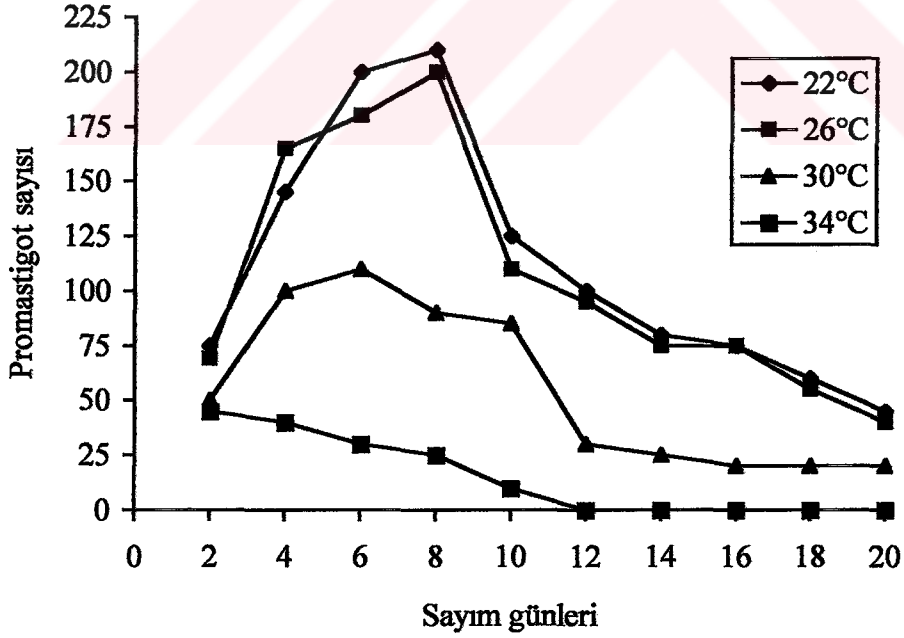
#### A. Sıcaklık denemeleri

Farklı sıcaklık derecelerine (22°C, 26°C, 30°C, 34°C, 37°C) ayarlanmış etüvlerde inkübe edilen besiyerindeki promastigotların 2 gün arayla yapılan sayımları sonucu elde edilen bulgular Tablo.1 de gösterilmiştir. Buna göre promastigotların yoğunluğunun en yüksek olduğu sıcaklık derecesinin 22°C olduğu saptanmış ve bu yoğunluk 6. ile 8. günlerde en yüksek bulunmuştur. Buna paralel olarak 26°C'de inkübe edilen promastigotların da 6. ve 8. günlerde optimal üreme gösterdiği gözlenmiştir.

30°C'de, promastigotların 6. günde pik yaptığı ve sonraki günlerde sayının gittikçe azaldığı saptanmıştır. 34°C'de ise, besiyerine konulan promastigot sayısında hiç bir artış gözlenmemiştir ve inkübasyonun 10.cu gününden itibaren promastigotların hepsinin öldüğü görülmüştür. 37°C'de, ilk sayım günü de dahil olmak üzere hiç bir canlılık tesbit edilememiştir.

**Tablo 1.** NNN besiyerinde farklı sıcaklıklarda inkübe edilen promastigotların üreme durumları

Promastigot sayısı				
Günler	22 °C	26 °C	30 °C	34 °C
2	75	69	50	45
4	145	165	100	40
6	200	180	110	30
8	210	200	90	25
10	125	110	85	10
12	100	95	30	0
14	80	75	25	0
16	75	75	20	0
18	60	55	20	0
20	45	40	20	0



**Grafik A:** NNN besiyerinde farklı sıcaklıklarda üreyen promastigotların üreme eğrisi.

**Tablo. 2.** NNN besiyerinde farklı sıcaklıklarda saptanan promastigot sayılarının istatistiksel değerlendirmesi ( Tukey yöntemine göre).

Sıcaklık (°C)	X ± SX	
22	111.5 ± 18.16	
26	106.4 ± 17.69	F= 45.51
30	55 ± 17.39	P< 0.05
34	30 ± 9.48	
37	0	

Çalışmamızın sonucunda promastigotların üremesinin en yoğun olduğu sıcaklık değerinin 22°C-26°C arasında olduğu görüldü. İstatistiksel olarak da bu iki sıcaklık derecesi arasındaki farkın önemli olmadığı bulunmuştur (P>0.05).

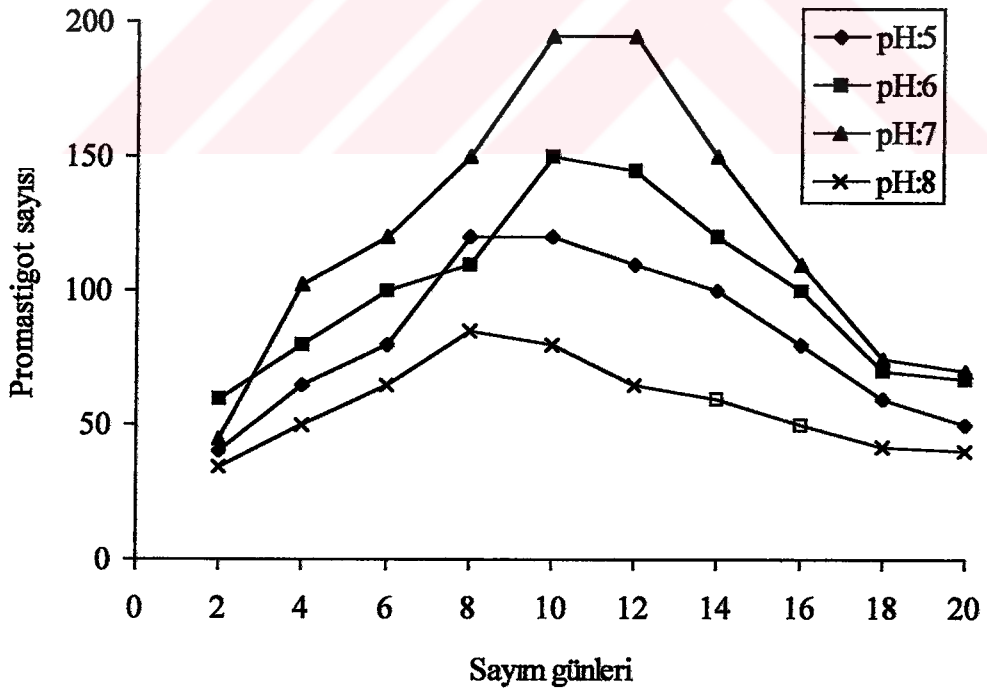
Grup ortalamaları Tukey yöntemine göre ikişerli olarak karşılaştırıldığında 30°C - 34°C arasındaki fark da önemli bulunmazken, 22°C - 30°C, 22°C - 34°C, 26°C - 30°C ve 26°C - 34°C arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05).

### **B. pH denemeleri**

Farklı pH derecelerine (pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 ) ayarladığımız besiyerlerinde promastigotların sayımı sonucu elde ettiğimiz bulgular Tablo. 2 de özetlenmiştir. Buna göre *Leishmania tropica* promastigotlarının optimal üreme gösterdiği pH değeri, pH 7 olarak saptanmıştır. Üremenin en yoğun olduğu gün ise pH 7 de ve pH 6 da 10.cu günde gözlenmiştir. pH 5 - pH 8 de inkübe edilen promastigotlar ise 8. günde en yoğun üreme göstermişlerdir.

**Tablo 3.** Farklı pH lardaki NNN besiyerinde üretilen promastigotların durumu

Promastigotların Sayısı				
Günler	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
2	40	60	45	34
4	65	80	102	50
6	80	100	120	65
8	120	110	150	85
10	120	150	195	80
12	110	145	195	65
14	100	120	150	60
16	80	100	110	50
18	60	70	75	42
20	50	67	70	40



**Grafik B.** Farklı pH'larda hazırlanan NNN besiyerinde üretilen promastigotların üreme durumları

**Tablo. 4.** Farklı pH larda hazırlanan NNN besiyerlerinde üretilen promastigotların istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

pH	X ± SX	
5	82.5 ± 26.9	
6	100.2 ± 31.68	
7	121.2 ± 38.30	F= 27.2
8	57.1 ± 18.05	P< 0.05

Farklı pH derecelerine ayarlanmış besiyerlerindeki promastigotların üreme yoğunlukları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.05).

Grup ortalamaları Tukey yöntemine göre ikişerli olarak karşılaştırıldığında ise, pH 5 - pH 6 arasında üreme yönünden bir fark olmadığı, pH 6 - pH 7, pH 7- pH 8 arasındaki farkın ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05).

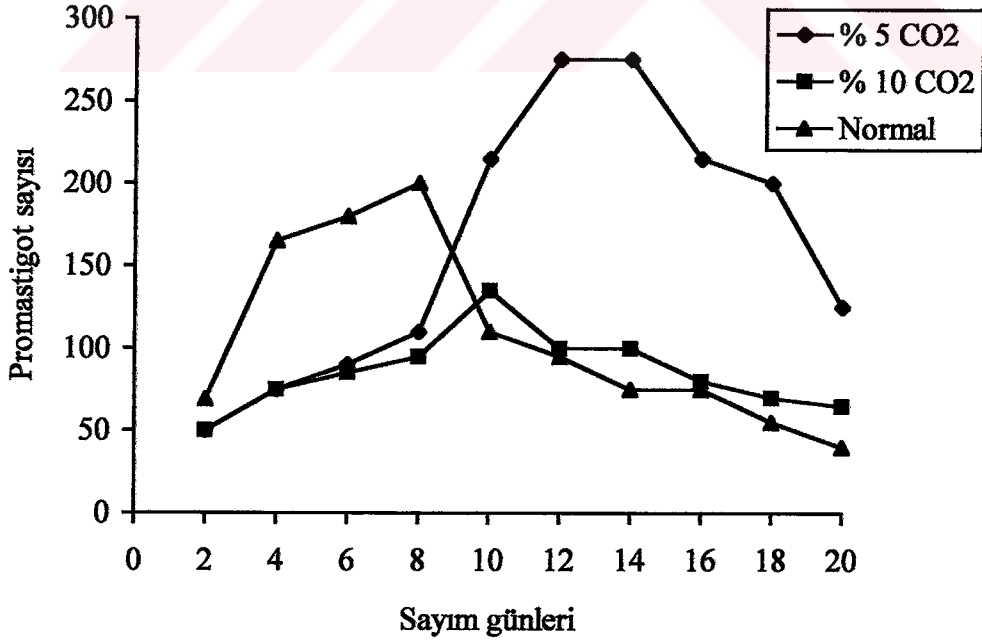
### **C. CO<sub>2</sub> ortamında üreme denemeleri**

%5 CO<sub>2</sub> ve %10 CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarına ayarlanan etüvlerde, düzenli olarak yapılan promastigot sayımları sonucu elde edilen bulgular Tablo. 3 de verilmiştir. Buna göre promastigotların üremesi bakımından en uygun olan ortamın %5 CO<sub>2</sub> konsantrasyonlu ortam olduğu görülmektedir. % 5 CO<sub>2</sub> 'li ortamda üretilen promastigotlar 12. günde optimal üreme gösterirlerken, normal etüvde inkübe ettiğimiz promastigotlar 8. günde optimal düzeye ulaşmışlardır. % 10 CO<sub>2</sub> ortamında da en yoğun üremenin 12. günde meydana geldiği ancak diğer ortamlar kadar yoğun promastigot saptanmadığı gözlenmiştir.



**Tablo. 5.** NNN besiyerlerinde farklı CO<sub>2</sub> ortamlarında inkübe edilen promastigotların durumu.

Promastigot sayısı			
Günler	% 5 CO <sub>2</sub>	% 10 CO <sub>2</sub>	Normal
2	50	50	69
4	75	75	165
6	90	85	180
8	110	95	200
10	215	135	110
12	275	100	95
14	275	100	75
16	215	80	75
18	200	70	55
20	125	65	40



**Grafik C:** NNN besiyerlerinde farklı CO<sub>2</sub> ortamlarında inkübe edilen promastigotların üreme eğrisi.

**Tablo. 6.** NNN besiyerinde farklı CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarında elde edilen promastigot sayılarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

CO <sub>2</sub>	X ± SX	
% 5 CO <sub>2</sub>	163.0 ± 51.54	
% 10 CO <sub>2</sub>	85.5 ± 27.04	F= 4.22
Normal	106.4 ± 17.69	P< 0.05

NNN besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> li ortamda promastigotların üremesinin optimal düzeyde olduğu bulunmuştur. Gruplar arası ortalamalar Tukey yöntemine göre karşılaştırıldığında ise, %5 CO<sub>2</sub> li ortam ile %10 CO<sub>2</sub> 'li ortam arasındaki üreme yoğunluğu farkı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). %5 CO<sub>2</sub> li ortam ile normal ortam arasında ve % 10 CO<sub>2</sub> 'li ortam ile normal ortam arasındaki üreme yoğunluğu farkının ise anlamlı olmadığı saptanmıştır (P>0.05).

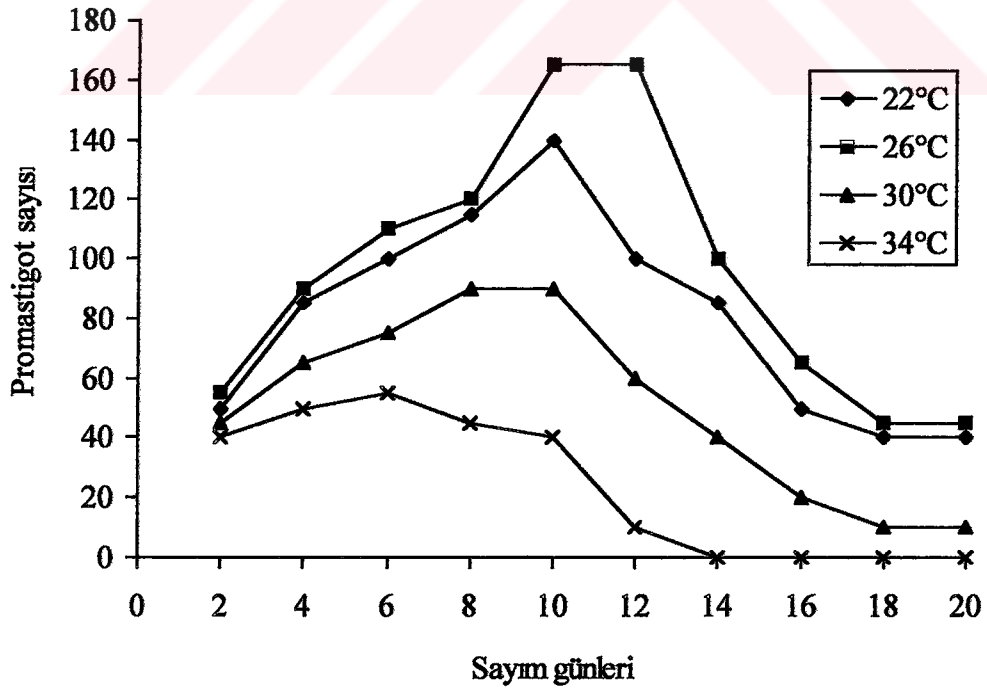
## 2.SIĞIR KANLI BESİYERİ

### A. Sıcaklık Denemeleri

Defibrine edilmiş sıgır kanı ile hazırladığımız besiyerinde promastigotların üretilmesi ve belirli günlerde sayımlarının yapılması sonucunda elde ettiğimiz veriler Tablo. 4 de özetlenmiştir. NNN besiyerinden farklı olarak üremenin en iyi olduğu sıcaklık derecesinin 26°C olduğu bulunmuştur. Hem bu sıcaklıkta hem de 22°C'de promastigotların 10. günde optimal üreme gösterdikleri saptanmıştır. 30°C'de ise en yoğun üreme noktasına 8. günde ulaşıldığı ve daha sonra promastigotların sayılarında hızlı bir şekilde düşüşün başladığı dikkati çekmiştir. 34°C'de ise promastigotların 12. güne kadar canlılıklarını koruyabildikleri ve daha sonraki sayımlarda canlı parazitin olmadığı dikkati çekmiştir. Tıpkı NNN besiyerinde olduğu gibi , sıgır kanlı besiyerinde de 37°C'de ilk günden itibaren canlı parazite rastlanmamıştır.

**Tablo. 7.** Farklı sıcaklıklarda sığır kanlı besiyerlerinde inkübe edilen promastigotların durumu

Promastigot sayısı				
Günler	22 °C	26 °C	30 °C	34 °C
2	50	55	45	40
4	85	90	65	50
6	100	110	75	55
8	115	120	90	45
10	140	165	90	40
12	100	165	60	10
14	85	100	40	0
16	50	65	20	0
18	40	45	10	0
20	40	45	10	0



**Grafik D:** Sığır kanlı besiyerinde farklı sıcaklıklarda inkübe edilen promastigotların üreme eğrileri.

**Tablo. 8.** Sığır kanlı besiyerinde farklı sıcaklıklarda üreyen promastigot sayılarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

Sıcaklık (°C)	X ± SX	
22	80.5 ± 25.45	
26	96.0 ± 30.36	F= 28.90
30	50.5 ± 15.97	P< 0.05
34	40.0 ± 12.65	

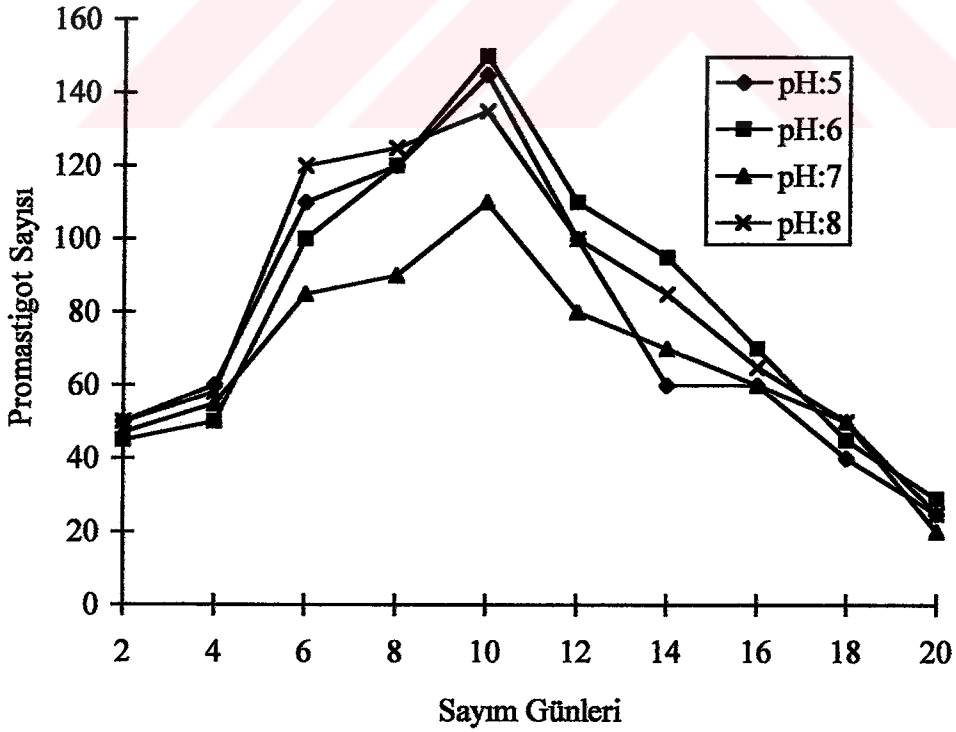
Sığır kanlı ortamda , farklı sıcaklıklarda , inkübe edilen promastigotların sayıları , Tukey yöntemine göre ikişerli olarak karşılaştırıldığında 22°C - 26°C arasındaki ve 30°C- 34°C arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken (P>0.05) , 22°C-30°C, 22°C-34°C, 26°C-30°C, 26°C-34°C arasındaki üreme yoğunluğu farkı anlamlı bulunmuştur (P<0.05).

### **B. pH Denemeleri**

Dört ayrı pH' ya ayarlanarak hazırlanan sığır kanlı besiyerlerinde üretilen promastigotların inkübasyonu sonucu elde edilen bulgular Tablo.5 de gösterilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi promastigotların üremesinin en yoğun olduğu ortamın pH 6 ya ayarlanan ortam olduğu saptanmıştır ve parazitlerin 10. günde en yüksek sayıya ulaştıkları görülmüştür. Diğer ortamlarda da aynı günde optimal üreme gözlenmiştir.

**Tablo.9.**Farklı pH'larda hazırlanan sığır kanlı besiyerlerinde üretilen promastigotların durumu

Sayım Günleri	Promastigot sayıları			
	pH5	pH6	pH7	pH8
2	50	45	47	50
4	60	50	55	58
6	110	100	85	120
8	120	120	90	125
10	145	150	110	135
12	100	110	80	100
14	60	95	70	85
16	60	70	60	65
18	40	45	50	50
20	25	29	20	25



**Grafik E.** Sığır kanlı besiyerlerinde farklı pH'larda üretilen promastigotların durumu.

**Tablo. 10.** Farklı pH derecelerinde hazırlanan sığır kanlı besiyerlerinde üretilen promastigotların istatistiksel olarak değerlendirilmesi

pH	X ± SX	
5	77.0 ± 24.35	
6	81.4 ± 25.74	F= 5.17
7	66.7 ± 21.09	P< 0.05
8	80.3 ± 25.39	

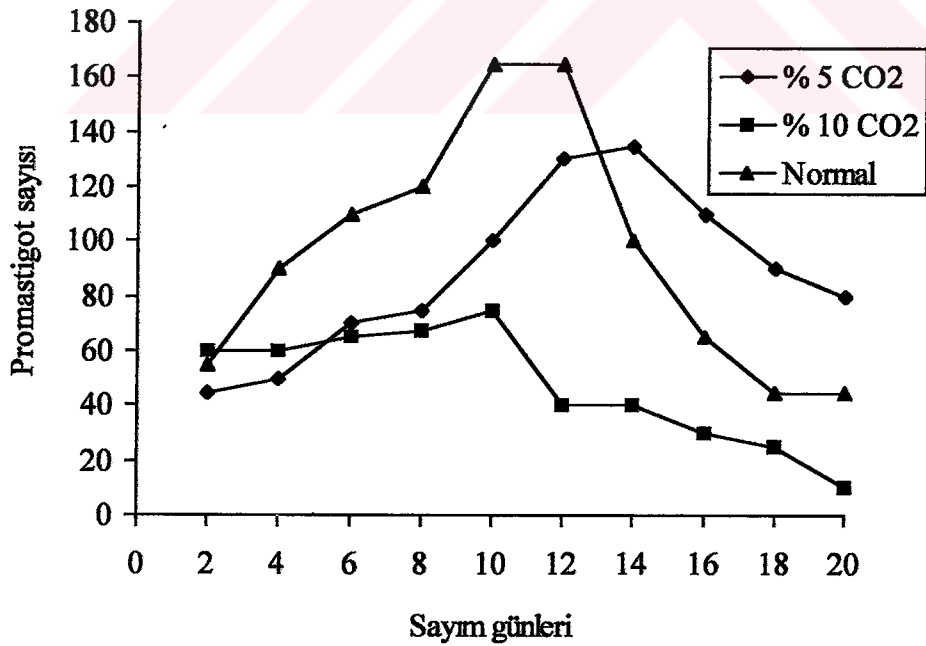
En iyi üremenin pH6 da olduğu belirlenen sığır kanlı besiyerinde, pH6- pH7 ve pH7-pH8 arasında promastigotların üreme yoğunluğu yönünden istatistiksel olarak bulunan fark anlamlıdır (P>0.05). pH5-pH6, pH5-pH7, pH5-pH8, pH6-pH8 arasındaki üreme farkının ise anlamlı olmadığı bulunmuştur.

### **C. CO<sub>2</sub> ortamında üreme denemeleri**

*Leishmania tropica* promastigotlarının % 5 CO<sub>2</sub> ve % 10 CO<sub>2</sub> li ortama ve ayrıca normal ortama bırakılması sonucu elde edilen bulgular Tablo. 6 da özetlenmiştir. Normal ortamda inkübe ettiğimiz besiyerindeki promastigot sayısı diğer ortamlara oranla daha yüksek bulunmuştur. % 5 CO<sub>2</sub> li ortamın ise % 10 CO<sub>2</sub> li ortama göre daha uygun olduğu saptanmıştır. Normal ortamdaki promastigotlar 10. günde en yoğun üreme gösterirken %5 CO<sub>2</sub> li ortamda 12. günde optimal düzeye ulaştığı görülmüştür.

**Tablo. 11.** Sığır kanlı besiyerinde farklı CO<sub>2</sub> ortamlarında promastigotların durumu

Promastigot sayısı			
Günler	% 5 CO <sub>2</sub>	% 10 CO <sub>2</sub>	Normal
2	45	60	55
4	50	60	90
6	70	65	110
8	75	67	120
10	100	75	165
12	130	40	165
14	135	40	100
16	110	30	65
18	90	25	45
20	80	10	45



**Grafik F:** Sığır kanlı besiyerinde farklı CO<sub>2</sub> ortamlarında promastigotların üreme eğrisi

**Tablo. 12.** Sığır kanlı besiyerinde farklı CO<sub>2</sub> ortamlarında üretilen promastigotların istatistiksel olarak değerlendirilmesi

CO <sub>2</sub>	X ± SX	
% 5 CO <sub>2</sub>	88.5 ± 27.98	
% 10 CO <sub>2</sub>	48.2 ± 15.24	F= 7.11
Normal	96.0 ± 30.36	P< 0.05

Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre , % 5 CO<sub>2</sub> li ile %10 CO<sub>2</sub> li ortam arasındaki promastigotların üreme yoğunluğu farkı ve %10 CO<sub>2</sub> li ortam ile normal ortam arasındaki fark önemli bulunmuştur. Buna rağmen % 5 CO<sub>2</sub> li ortam ile normal ortam arasında ki farkın önemli olmadığı görülmüştür (P<0.05).

### NNN VE SIĞIR KANLI BESİYERLERİNİN WILCOXON T TESTİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

#### 1- Sıcaklık Durumlarına Göre

Bu yönteme göre yapılan istatistiksel değerlendirmede her iki besiyerindeki üreme yoğunluğu arasındaki fark 22°C sıcaklık açısından önemli bulunurken, 26°C, 30°C ve 34°C dereceleri için bir fark olmadığı görülmüştür

**Tablo. 13.** Sığır kanlı besiyeri ve NNN besiyerinin sıcaklık denemelerine göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

Sıcaklık (°C)	NNN X ± SX	Sığır kanlı X ± SX	
22	111.5 ± 18.16	80.5 ± 25.45	T= 3.5 P< 0.05
26	106.4 ± 17.69	96.0 ± 30.36	T= 13.5 P> 0.05
30	55.0 ± 17.39	50.5 ± 15.97	T= 28 P> 0.05
34	30.0 ± 9.48	40.0 ± 12.65	T= 36 P> 0.05



## 2- pH Durumlarına Göre

Sığır kanlı besiyeri ve NNN besiyerinde, farklı pH larda promastigotların üremesi pH6 ortamında farklılık arzederken pH 7, pH 8 ve pH 5 ortamlarındaki yoğunluk farkının istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

**Tablo. 14.** Sığır kanlı besiyeri ve NNN besiyerinin pH denemelerine göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi

<b>pH</b>	<b>NNN X ± SX</b>	<b>Sığır kanlı X ± SX</b>	
5	82.5 ± 26.9	77.0 ± 24.35	T= 17 P> 0.05
6	100.2 ± 31.68	81.4 ± 25.74	T= 4.5 P< 0.05
7	121.2 ± 38.3	66.7 ± 21.09	T= 54 P> 0.05
8	57.1 ± 18.05	80.3 ± 25.39	T= 10 P> 0.05

## 3-CO<sub>2</sub> Ortamlarına Göre

Her iki besiyerinde, %5CO<sub>2</sub> ve %10CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarında promastigotların üreme yoğunluğu bakımından aradaki farkın önemli olduğu görülmüştür.

**Tablo. 15.** Sığır kanlı besiyeri ve NNN besiyerinin CO<sub>2</sub> denemelerine göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi

<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>NNN X ± SX</b>	<b>Sığır kanlı X ± SX</b>	
% 5 CO <sub>2</sub>	163.0 ± 51.54	88.5 ± 27.98	T= 0 P< 0.05
% 10 CO <sub>2</sub>	85.5 ± 27.04	48.2 ± 15.24	T= 0 P< 0.05

## TARTIŞMA

Son yıllarda başta protozoonlar olmak üzere parazitlerin kültürlerinin yapılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bunun sonucu Plasmodium'lar dahil bir çok protozoonun kültürü gerçekleştirilmiş ve ayrıca pek çok yeni kültür ortamı geliştirilmiştir.

Herhangi bir parazitin kültürünü yapmanın bir çok değişik amacı vardır. Bunları maddeler halinde sıralayacak olursak ;

- a. Hastalığa neden olan etkenin tanısını koymak amacıyla ya direkt olarak ya da diğer yöntemlere ek olarak kültürlerden yararlanılır.
- b. İmmünolojik çalışmalar için gerekli olan antijenlerin bol olarak hazırlanması amacıyla kültüre başvurulur.
- c. Klinik materyalin yeterli olmadığı ve kolay elde edilemediği durumlarda öğretimde kullanılmak amacıyla kültür yapılır.
- d. Deney hayvanlarına inokülasyon için gerekli olan kaynağı sağlayabilmek de kültürle mümkün olabilmektedir.

İn vitro ilaç denemelerinde ve organizmaların fizyolojilerini incelemede kültürlerden faydalanılır.

Kültür yapmanın amacı başlangıçta in vitro ortamda paraziti üretmeyi başarmaya dayanır. Ancak ileri aşamalarda aksenik ve tam anlamıyla yapay bir ortamda parazitin üretilebilmesi amacı esastır. Çünkü parazitin biyokimyasal özellikleri ve patojenite deneyleri için aksenik kültürler idealdir. Ancak her zaman aksenik kültürü yapmak pek mümkün değildir.

Leishmania türlerinin üretilmesi amacıyla pek çok araştırmacı tarafından çeşitli besiyerleri denenmiş olup, farklı kaynaklarda farklı besiyerlerinin daha iyi sonuç verdiğiine ilişkin bulgular bildirilmiştir. Bizim yaptığımız çalışma sonucunda NNN besiyerinin, sığır kanlı besiyerine göre promastigotların üreme yoğunluğu bakımından daha uygun olduğu görülmüştür.

Benzer olarak Özçelik ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da, klasik NNN, koyun kanlı NNN, heparinli tavşan kanlı NNN ve sığır kanlı besiyeri olmak üzere toplam 4 ayrı kültür ortamı Leishmania tropica promastigotlarının üreme

yoğunluğu bakımından karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak klasik NNN besiyerinde diğer ortamlara göre promastigotların üremesinin çok daha yoğun olduğu bildirilmiştir. Bunun yanısıra sığır kanlı besiyerindeki üremenin, koyun kanı ile hazırlanan NNN besiyerinden daha başarılı sonuçlar verdiğini ve sığır kanlı besiyerinde üretilen promastigotların daha aktif ve morfolojik olarak oldukça düzgün olduğuna dikkat çekmişlerdir (19). Araştırmamızda bu sonuca paralel olarak sığır kanlı besiyerinde promastigotların daha düzgün morfolojiye sahip oldukları görülmüştür.

Sadigursky ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada hemoflagellatların üremesi için kan ve serum içermeyen yeni bir kültür ortamı geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Kolay hazırlanan ve çok pahalıya mal olmayan bu besiyerinde promastigotların oldukça iyi ürediğini ve alt kültürlerle devamının sağlandığını bu sayede çok sayıda parazit elde edilebileceğini göstermişlerdir. Ayrıca bu besiyerinde üretilen leptomonaslar üzerinde biyokimyasal çalışmaların yapılmasının daha uygun olabileceğini de ortaya koymuşlardır (26).

Klasik NNN besiyeri ile karşılaştırdığımız sığır kanlı besiyeri ilk kez Saygı tarafından bulunmuştur. Araştırmacı bu besiyeri ile *Leishmania tropica* promastigotlarının uygun laboratuvar koşullarında üretilip uzun süre pasajlanabildiğini ve besiyerinin esasının pişirilmiş sığır kanından ve üzerine eklenen serum fizyolojikten ibaret olduğunu bildirmiştir. Son derece basit ve kolay hazırlanması, ayrıca, agara gereksinim göstermemesi bakımından her yerde kullanılacak bir ortam olduğuna dikkat çekilmiştir (27).

Özbilgin ve arkadaşları tarafından visseral leişmaniyoz ve kutanöz leişmaniyozu ayırtmak amacıyla yapılan kültür çalışmalarında, her iki tür parazitin de besleyici buyyonda NNN ortamına oranla daha erken dönemde üreme gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda besleyici buyyonda ilk günde her iki *Leishmania* türüne ait amastigotlar promastigotlara dönüşürken, NNN besiyerinde bu dönüşüm ikinci ve üçüncü günden sonra gözlenmiştir. Buna göre nutrient broth besiyerinin NNN besiyerine göre tanıma zaman açısından daha avantajlı olduğu belirtilmiştir (22).

Lemesre ve arkadaşları, visseral ve mukokutanöz leişmaniyoz etkeni olan *L.chagasi* ile *L. braziliensis*'in büyüme karakteristiklerini farklı kültür ortamlarında

karşılaştırmışlardır. Çalışmada GLSH, RPMI veya LİTR9 kültür ortamları kullanılmıştır. *L. chagasi* tüm ortamlarda üreme gösterirken *L. braziliensis* için RPMI besiyeri uygun bulunmamıştır (16).

Aljeboori, kan içermeyen ve yalnızca fetal sıgır serumu (FCS) katkılı katı fazdan oluşan difazik bir ortam tanımlamış ve bu ortamda test edilen tüm *Leishmania* türlerinin başarı ile ürediğini bildirmiştir. Ayrıca çalışmasında, bu difazik kültür ortamıyla, geleneksel difazik kanlı agar içerikli ortam arasındaki üreme yoğunluğunu karşılaştırmıştır. Sonuç olarak FCS içeren ortamda *Leishmania* promastigotlarının en fazla üreme gösterdiğine dikkat çekmiştir (1).

Howard ve arkadaşları, böcek idrar bileşenlerinin *Trypanosoma* metasiklik formlarının gelişimini hızlandırmasından yola çıkarak, promastigotların üretiminde kültür ortamına insan idrarının katkı maddesi olarak kullanılabileceğini düşünmüşlerdir. Çalışmalarında %10 FCS içeren Schneider'in *Drosophila* kültür ortamına %1-5 oranında idrar ilave edildiğinde 8 farklı taksonomik gruba ait 11 *Leishmania* soyunun büyüüp üremelerinde belirgin bir hızlanma olduğunu ancak söz konusu olan aktif bileşenin ne olduğunun henüz tayin edilemediğini bildirmiştir. Ayrıca, kültürü gerçekleştirebilmek için gerekli dozu (promastigot sayısını) azalttığını ileri sürmüşlerdir(15).

Hanna ve arkadaşları ise, *Leishmania* promastigotlarının üremesini kolaylaştıran idrardaki bu bileşiğin, UV spektrum taramasında 265 nm' de maksimum absorbans gösteren düşük moleküler ağırlıklı (MW < 3000 Da) bir protein molekülü olduğunu saptamışlardır (12).

Sysoev, çalışmasında nutrient besiyerinde *Leishmania* major, *L.turanica*, *L.gerberi*, türlerinin üremesini karşılaştırmıştır. Promastigotlar Medium 199 içeren NNN besiyerinde inkübe edilerek, üreme oranı, bölünme zamanı ve üreme hızı araştırılmıştır. Sonuç olarak, her bir türün farklı büyüme karakterine sahip olduğunu ve *Leishmania turanica*'nın bu ortamda diğerlerinden daha üstün olduğunu bildirmiştir. Farklı suşları kısa ve uzun süreli inkübasyona tabi tuttuğunda, uzun süreli kültürlerin ortama daha kolay adapte olarak gelişme gösterdiğini ancak suşların virulanslarının azaldığını gözlemiştir (28).

NNN besiyerinde ve sığır kanlı besiyerinde yaptığımız çalışmanın sonucunda üremenin en yoğun 8. ve 10. günlerde olduğu saptanmıştır. Ayrıca 12. günden itibaren kültür ortamındaki promastigotların sayısında azalmaların başladığı görülmüştür.

Bizim sonuçlarımıza benzer olarak Werner, Colombiya'da 14 izolat kullanarak yapmış olduğu çalışmasında, bunların kültür ortamında ve hamsterlerdeki büyüme karakterlerini araştırmıştır. Sonuç olarak kültür ortamında maximum üremenin 10. günde görüldüğünü ve 12-15. günden itibaren üreme hızında bir azalma olduğunu belirtmiştir(33).

Hendricks ve Wright, Eski ve Yeni Dünya kutanöz leyişmaniyoz'un tanısının hızlandırılması amacıyla yeni bir kültür ortamı geliştirmiştir. Toplam 40 kişiden ve 55 lezyondan elde edilen aspiratlar bir böcek hücre kültürü olan ve % 30 fetal sığır serumu içeren Schneider'in Drosophila ortamına inoküle etmiştir. Buna paralel olarak da NNN besiyerine ekim yapılmış sonuçta promastigotlar Schneider'in Drosophila ortamında 6. günde promastigotlar gözlenirken, NNN ortamında ise yaklaşık 12. günde gözlenmiştir. Elde ettikleri bulgular Özbilgin ve arkadaşlarının (22) sonuçları ile uyumludur (14).

İstanbul Üniversitesinden sağladığımız Leishmania tropica suşu ile yaptığımız çalışmanın sonucunda, 22°C, 26°C, 30°C, 34°C, 37°C lerden , promastigotların NNN besiyerinde en yoğun üreme gösterdiği sıcaklık derecesinin 22°C olduğu saptanmıştır. Aynı sıcaklık spektrumunda, sığır kanlı besiyerinde ise en uygun sıcaklığın 26°C olduğu görülmüştür.

Wonde ve Honigberg , Leishmania donovani türünü 21°C den 37°C ye kadar değişen sıcaklıklara maruz bıraktığı çalışmasında, Tobie'nin modifiye ortamında 32°C ye kadar olan sıcaklıklarda parazitin üremesinin oldukça yoğun olduğunu gözlemiştir. 33°C nin üstündeki derecelerde ise promastigotların ancak tavuk embriyo özütü (CEE<sub>50</sub>) içeren ortamda üreyebildiğini ortaya koymuştur. Araştırmacılar , Lemma ve Schiller'in besiyerini kullanarak burada CEE<sub>50</sub> olmadığında 33°C nin üstündeki sıcaklıklarda promastigotların devamının sağlanmasının mümkün olmadığını görmüşlerdir. Diğer taraftan promastigotları oda sıcaklığından doğrudan doğruya

doğruya 32°C ye transfer ettiğinde hepsinin, ortamın içeriğine bakmaksızın, 6-8 günde öldüğünü gözlemişlerdir. Sonuç olarak 33°C ve 35°C sıcaklıkta promastigotların devamını sağlamak amacıyla kültür ortamına %5 oranında CEE<sub>50</sub> , 36°C ve 37° C de ise en azından %10 oranında CEE<sub>50</sub> ilavesinin gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Ancak tüm bu koşullara rağmen ortamda kamçılı formun çok nadir bulunduğunu da gözlemlemişlerdir (34).

Gillig, in vitro kültür ortamlarında Leishmania promastigotlarının 37°C ye adaptasyonu ile ilgili yapmış olduğu çalışmalarda, 3S suşunun Tobi'nin besiyerinde 32°C de bir süre kültürünü oluşturduktan sonra 37°C de üretmeyi başarmıştır. Üretilme aşamasında özellikle logaritmik fazdan alınan promastigotların bu sıcaklıklarda üreyebildiğini ve tavuk embriyo özütüne gereksinim duymadığını bildirmiştir. Araştırmacı Khartoum suşunun ise 35°C nin üzerindeki sıcaklıklarda üretilmediğini de bildirmiştir. Yine, 25°C da 14 seri pasaj sonunda promastigotların 37°C ye adapte edilebildiğini, buna karşın 30 seri pasaj sonunda ise bu sıcaklığa promastigotların adapte edilemediği de ortaya konmuştur. Leishmania'da eşeyli üreme görülmemesine rağmen 37°C ye adaptasyonun mutasyon sonucunda mı yoksa çevresel modifikasyon sonucunda mı olduğu belirlenememiştir (11). Çalışmamızda kullandığımız suşun sadece bizim laboratuvarımızda yaklaşık 100 kez pasajının yapıldığını düşünecek olursak bizim çalışmamızdaki promastigotların neden 34°C ve 37°C lerde üreyemedikleri anlaşılmaktadır.

NNN ve sığır kanlı besiyerlerinde, Leishmania promastigotlarını 37°C ye maruz bıraktığımızda ilk sayım gününden itibaren promastigotların öldüğünü saptadık. Bunun nedeni ise ,doğrudan 37°Cde yaşatmak yerine benzer çalışmalarda olduğu gibi daha öncesinde uzun süreli adaptasyon çalışmalarının yapılmamış olmasına bağlayabiliriz. Ayrıca yukarıda da belirtildiği gibi promastigotların 100 den fazla alt kültürünün yapılmış olması da canlı promastigot elde edilememiş olmasının bir başka nedeni olabilir.

Trager, Leishmania donovani promastigotlarını 22°C ile 30°C sıcaklıklardaki ortamlarda inkübe ettiğinde canlı aktif , hareketli formları gördüğünü ve 28°C de tutulan leptomonasların 37°C de, insan veya hamster eritrosit özütü içeren ortama

konulduğunda, konak hücre olmadan da leptomonasların gelişebildiğini ve kamçısız ara formları görmenin mümkün olabileceğini saptamıştır. Ve bu leptomonasların en azından 4 gün süreyle canlı kaldığını bildirmiştir. Böylece 37°C de gelişmenin yalnızca canlı dokularda varolabileceğine ilişkin düşüncelerin doğru olmadığı kanıtlanmıştır. Trager bu çalışmalarını bildirdiği yayınında Berrebi'nin kültür ortamında tuttuğu promastigotların 37°Cde herhangi bir gelişme göstermediğini ve mevcut parazitlerin 1 veya 2 gün sonrasında öldüğünü bulduğunu da bildirmektedir (29).

Trager 37°C deki formların son derece özel gereksinimlerinin olduğunu ve bunların 28°C de gelişen leptomonaslara oranla farklı olduğunu görmüştür. Özellikle kamçısız ara formların, hızlı gelişmeyi sağlayan ilave besinlere rağmen (insan ve hamster eritrosit özütü ) kültürlerde devamlılığı sağlanamamıştır (29).

Zilberstein'e göre, sıcaklığın artması bunun yanında pH'nın azalması promastigotların amastigotlara, amastigotların promastigotlara dönüşümünü sağlayan iki önemli çevresel faktördür. Kültür ortamlarında yalnızca sıcaklığın artması Eski Dünya Leishmania türlerinde, Yeni Dünya Leishmania türlerine kıyasla dönüşümü daha az etkilemektedir. Sıcaklık artışına paralel olarak pH azalmasının da yine bu olayları kolaylaştırdığı ortaya konmuştur. Örneğin lezyondan alınan *L. mexicana* amastigotları pH 5.5 ve 32°C' de yalnız amastigot morfolojisi oluşturmakla kalmaz ayrıca dönüşüm için gerekli olan, özgün sistein proteinaz ve komplemanın eritici etkisine karşı direnç ve infektivite de artış gibi unsurları içeren değişimleri meydana getirir. Bu sistemde CO<sub>2</sub>'in varlığı, farklılaşmayı tamamlayabilmek için gerekli olan bir diğer unsurdur. Amastigot formda kalabilmek için düşük pH'ya gereksinim duyulması amastigotların asit ortamı tercih ettiklerinin bir göstergesidir (36).

Altıntaş ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada karbondioksitin in vitro ortamda *Leishmania* promastigotlarının üremesi üzerine etkisi araştırılmıştır. % 5 CO<sub>2</sub> li ortamda ve 27°C'ye ayarlanmış normal ortamda tutulan promastigotların üreme yoğunluğu karşılaştırıldığında % 5 CO<sub>2</sub> ortamında promastigotların 1.5 kat daha fazla üreme gösterdiği belirlenmiştir (2).

Bizim yaptığımız çalışmanın sonucunda da NNN besiyerinde % 5 CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda promastigotların en yoğun üreme gösterdiği saptanmıştır. Sığır kanlı besiyerinde ise normal ortamda (26°C) inkübe edilen promastigotların % 5 CO<sub>2</sub> ve % 10 CO<sub>2</sub> li ortama göre daha yoğun üreme gösterdikleri bulunmuştur. NNN ve SKB'de %10 CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun promastigotların yoğunluğu üzerine fazla olumlu etkiye sahip olmadığı görülmüştür.

El Amin El Roufaie ve arkadaşları, sıvı kültür ortamında Leishmania promastigotlarında meydana gelen morfolojik değişiklikleri araştırdığı çalışmasında üç ayrı formun görüldüğüne dikkati çekmiştir. Bunları, uzun form, iğ şeklindeki form ve yuvarlak kamçısız form olarak tanımlamıştır (9). Bizim çalışmamız esnasında da 12. günden itibaren promastigotların yapısında yuvarlaşmalar ve kamçıların kaybolması gibi değişimlerin olduğu ayrıca ara ara toplu iğneye benzer tarzda promastigotların varlığı göze çarpmıştır.



## SONUÇ

Leyişmaniyoz'la ilgili olarak yapılan serolojik çalışmalarda, antijen hazırlanmasında ve kemoterapötik maddelerin etkilerini araştırmak amacıyla oldukça fazla oranda promastigota gereksinim duyulmaktadır. Bu yüzden, bol miktarda promastigot elde etmek için, bunların üreme gösterdiği optimal koşulların belirlenmesi gereklidir. Biz de çalışmamızda sıcaklık, pH ve CO<sub>2</sub>'in kültür sonuçlarına etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda klasik tavşan kanlı NNN besiyeri ve sığır kanlı besiyeri karşılaştırıldığında, NNN besiyerinde üremenin daha yoğun olduğu ve promastigotlar için daha uygun bir ortam olduğu anlaşılmıştır. Buna rağmen, kolay hazırlanan ve agara gereksinim göstermemesi nedeniyle oldukça ekonomik olan sığır kanlı besiyerinin de promastigotların üretilmesi amacıyla kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

NNN besiyerinde üremenin en iyi olduğu sıcaklık derecesi 22°C olarak bulunurken , sığır kanlı besiyerinde 26°C olduğu saptanmıştır. Fosfat tamponuyla pH'ları ayarlanan NNN besiyerinde, en yoğun üremenin pH 7' de olduğu gözlenirken sığır kanlı besiyerinde ise bunun pH 6'da gerçekleştiği görülmüştür.

%5 CO<sub>2</sub> 'in NNN besiyerindeki promastigotların üremesi üzerine çok olumlu etkisinin olduğu dikkati çekmiştir. Ancak bu karbondioksit konsantrasyonundaki olumlu etki %10 CO<sub>2</sub> ortamında aynı şekilde gözlenmemiştir ve %10 CO<sub>2</sub> ortamının çok uygun olmadığı bulunmuştur. Sığır kanlı besiyerinde ise 26°C'lik normal etüvde inkübe edilen promastigotların %5 CO<sub>2</sub> li ortamda tutulanlara göre daha yoğun bir şekilde üreme gösterdiği, buna rağmen %5 CO<sub>2</sub> li ortamın %10 CO<sub>2</sub> li ortama göre daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır.

## ÖZET

*Leishmania tropica* promastigotlarının üretilmeleri için en uygun sıcaklık, pH ve CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla planlanan bu çalışmada iki farklı besiyeri ve farklı parametreler denenmiştir. Çalışmada, NNN besiyeri ve sığır kanlı besiyerinde beş ayrı sıcaklıkta, dört farklı pH ve iki farklı CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda promastigotların üreme yoğunlukları belirlenerek üreme eğrileri çıkarılmış ve optimal koşullar saptanmıştır.

Her bir parametre ve kontrolleri için 10'ar tüpe eşit sayıda promastigot( $1,5 \times 10^6$  promastigot/ml) inoküle edilmiş ve 20 gün boyunca, gün aşırı hemositometre lamında sayımları yapılmıştır.

NNN besiyerinde, 22°C, 26°C, 30°C, 34°C ve 37°C sıcaklıklarda yapılan sayımlar değerlendirildiğinde en yüksek yoğunlukta üremenin 22°C de olduğu saptandı. Aynı koşullar sığır kanlı besiyeri için oluşturulduğunda ise maksimum üremenin 26°C olduğu gözlemlendi.

NNN besiyerinde pH 5, 6, 7 ve 8 'e ayarlanan ortamlardaki promastigot sayıları değerlendirildiğinde pH 7 nin en uygun ortam olduğu bulundu. Aynı işlemlerin tekrarlandığı sığır kanlı besiyerinde ise promastigotların pH 6 da daha yoğun ürediği saptandı.

% 5 CO<sub>2</sub> ve % 10 CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarına ayarlanmış etüvlerde ve ayrıca normal koşullar altında tutulan NNN besiyerindeki promastigotların sayımları yapıldığında, % 5 CO<sub>2</sub> ortamındaki promastigot yoğunluğunun normal ortama göre belirgin bir artış gösterdiği saptandı. Sığır kanlı besiyerinde bu koşulların promastigot üremesini çok az etkilediği görüldü. Bunun yanısıra her iki besiyerinde % 10 CO<sub>2</sub> li ortamın promastigot üreme yoğunluğu üzerinde olumsuz etkisi olduğu belirlendi.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, *Leishmania* promastigotları için NNN besiyerinde optimal üreme koşullarının, 22°C, pH 7 ve % 5 CO<sub>2</sub> li ortam, sığır kanlı besiyerinde ise 26°C, pH 6 ve CO<sub>2</sub> siz normal ortam olduğu saptandı.

## SUMMARY

*The effects of temperatures, pH and CO<sub>2</sub> concentrations on the growth of Leishmania promastigotes in the different culture media*

In this study, we have tried to find out the optimum growth, temperature, pH and CO<sub>2</sub> concentrations required by the promastigotes of *Leishmania tropica*. Two culture media were used simultaneously :1-Classical NNN medium, 2- Calf blood medium. On these media we tried five different temperature, four different pH, and two different CO<sub>2</sub> concentrations.

The parameters ,which were checked in the study ,were as follows: Five different temperatures (22°C, 26°C, 30°C, 34°C, 37°C ) four pH levels (pH 5, pH 6, pH 7, pH 8), and two CO<sub>2</sub> concentrations ( 5% CO<sub>2</sub> , 10 %CO<sub>2</sub> ).

For each parameter each of the ten culture tubes and plus control tubes were inoculated with  $1,5 \times 10^6$  promastigotes/ml per tube. These were incubated of appropriate temperatures. The growth in each tube was evaluated on the alternating days over a period of two days after the inoculation. The intensity of growth was determined by counting the promastigotes in a haemocytometer, then drawn a growth curve by plotting the mean counts of ten tubes, versus control tubes.

Our findings were as follows:

1-The optimum growth temperature was different for two culture media. Maximum growth was obtained in NNN at 22°C, whereas 26°C was more appropriate for CBM.

2-pH 7 provided the best growth in NNN, although the best growth in CBM was 6. However we have met with some difficulty in assessing the pH of this medium.

3-A little growth was observed at 10 % CO<sub>2</sub> in both culture media. On the other hand we have obtained higher growth rate at 5 % CO<sub>2</sub> in NNN than CBM.

Our findings were rather surprising since originally same parasites showed differences in requirements for optimum growth from the point of temperatures, pH and CO<sub>2</sub> used in two different media.

## KAYNAKLAR

- 1-Aljeboori T.I. : A simple diphasic medium lacking whole blood for culturing *Leishmania spp.* **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** **73** (1):117,1979.
- 2-Altıntaş N.,Özbel Y. : *Leishmania infantum* promastigot formlarının in vitro üretilmesine CO<sub>2</sub> in etkisi. **T. Par.Derg.** **16** (1):38-42,1992.
- 3-Berens R.L, Brun R.,Krasner S.M. : A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates **J.Parasitol.** **62** (3) : 360-5,1976.
- 4-Berman J.D.,Neva F.A. : Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocyte derived macrophages in vitro. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** **30** :318-21,1981.
- 5-Biegel D.Topper G. : *Leishmania mexicana* temperature sensitivity of isolated amastigotes and amastigotes infecting macrophages in culture **Exp. Parasitol.** **56** :289-297, 1983.
- 6-Bordier C.: The promastigote surface proteas of *Leishmania*. **Parasitology Today** **3**(5):151-153,1987.
- 7-Darling T.N.,Davis D.G.,London R.E., Blum J.J: CO<sub>2</sub> abolishes the reverse Pasteur effect in *Leishmania* promastigotes. **Mol. Biochem Parasitol.** **3** :177-188, 1989.
- 8-Dawes B. (Editör) : **Advances in Parasitology**. **5**: 116-121,1967.
- 9-El Amin El Roufaie M., Wright E.P., Laarman J.J., Pandman K.W. : Morphological changes and serological reactions in cultured *Leishmania donovani* promastigotes. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** **81**: 918-922, 1987.
- 10-Evans D.A. : Kinetoplastida. **In vitro methods for parasite cultivation.** Ed.A.E.R. Taylor, J.R.Bakers,1 th ed,Academic Press,London, 55-67, 1978.
- 11-Gillig G.J. III. : Adaption of *Leishmania* to in vitro cultivation at 37<sup>0</sup>. **J.Protozool.** **24** (3): 406-411, 1978.
- 12-Hanna S.,Di Giorgio C.,Dumon H.,De Reggi M.I.: Isolation of the urine component which stimulates in vitro *Leishmania* growth. First World Congress

- On Leishmaniosis. **Acta Parasitologica Turcica** 21 (1):150. 1997. İstanbul ,Turkey.
- 13-Hart D.T.,Coombs G.H. : The effects of carbon dioxide and oxygen upon the growt in vitro transformation of *Leishmania mexicana mexicana* **Mol.Biochem.Parasitol.** 4 (1-2), p:117-127, 1981.
- 14-Hendricks L., Wright N. : Diagnosis of cutaneous *Leishmaniosis* by in vitro cultuvation of saline aspirates in Schneider's Drosophila medium. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 28 (6) : 962-964,1979.
- 15-Howard M.K. , Pharooch M.M. (1991) : Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 85:477-479,1991.
- 16-Lemestre J.L., Dorcy F., Kweider M., Corpan A. : Requirments of defined cultivation conditions for standart growth of *Leishmania* promastigote in vitro.**Acta. Trop.** 45 (2): 99-108, 1988.
- 17-Merdivenci A. :**Medical Protozoology**.İstanbul Üniv. Cerr. Tıp. Fak. yayın No:27, 99-107, 1979.
- 18-O'Daly J.A., Rodriquez B. M.: Differential growth requirments of several *Leishmania* spp. in chemically defined culture media.**Acta Trop.** 45:109-126, 1988.
- 19-Özçelik S.,Çeliksöz A., Saygı G. :Farklı kültür ortamlarında L promastigotlarının in vitro kültürü.**T. Par. Derg.** 20 (2): 169-174 , 1996.
- 20-Özbel Y. :İzmir ve civarındaki Phlebotomus sp.lerde Elisa ve İzoenzim elektroforezi kullanılarak *Leishmania* promastigotlarının saptanması. **Ege Üniv. Sağlık Bil. Ens. Doktora Tezi.** İzmir, 1993.
- 21-Özbilgin A., Taşcı S., Atambay M. :*Leishmania infantum* promastigotlarının in vitro kültüvasyonunda sıvı ve bifazik besiyerlerinin karşılaştırılması.**T. Par. Derg.** 19 (1): 1-5, 1995.
- 22-Özbilgin A., Özbel Y., Alkan M.Z., Atanbay M. : Cultivation of *Leishmania* sp in nutrient broth **J.Egypt. Soc. Parasitol.**25 (2) :437-441, 1995.
- 23-Özcel M.A. : **Güney Doğu Anadolu projesini tehdit eden parazit hastalıkları**.Ege Üniv.yayınları, İzmir ,1995.

- 24- Pan A.A., Duboise M.S., Eperon S. :Developmental Life cycle of *Leishmania* cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. **J. Evk. Microbiol.** **40** (2) :213-223,1993.
- 25-Rob M.A., Hassan M., Bux D. :The isolation and cultivation of *Leishmania infantum* from apparently normal skin of visceral Leishmaniasis patients in Northern Pakistan. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** **86**:620-621, 1992.
- 26- Sadigurksy M., Brodskyn C.I. : A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** **35**(5): 942-946 ,1986.
- 27-Saygı G. :*Leishmania tropica* kültürü için basit ve ucuz bir besiyeri-piştirilmiş sığır kanı. **Cum. Üni. Tıp. Fak. Derg.** **7**(3-4) :151-156, 1985.
- 28-Sysoev V.V.:Comparative study of *Leishmania major*, *L.turanica* and *L.gerbilli* grown on the nutrient medium. **8. International Congress of Parasitol.** 10-14 Oct.(1994) ,İzmir, Turkey( 430)
- 29-Trager W. : The development of *Leishmania donovani* in vitro at 37°C. **J. Exp. Med.** **97**:177-188, 1953.
- 30-Turco S.J. : The lipophosphoglikan of *Leishmania*. **Parasitology Today.** **4**(9) : 255-257, 1988.
- 31-Unat E.K. : Unat'ın Tıp Parazitolojisi .İst.Üniv.Cerr. Tıp Fak. Yayın no:15,1995.
- 32-Walton B.C.,Shaw J.J.,Lainson R. : Observations on the in vitro cultivation of *L. braziliensis*. **J.Parasitol.** **63** (16) :1118-1119, 1977.
- 33-Werner J.K. : Colombian strain of *Leishmania* from man :growth characteristic in culture media and hamsters. **Trans .Roy. Soc.Trop.Med.Hyg.** **75**(5) :619-622,1981.
- 34- Wonde T. ,Honigberg B.M. : Morphology and infektivty of *Leishmania donovani* cultivated in nonliving media at elevated temperatures .**Am.J.Trop. Med.Hyg.** **35** (5) :942-944, 1972.
- 35-Yaşarol Ş.: *Leyişmaniyoz* . Türkiye Parazitoloji Dergisi Yayınları No.30-31,1981.

36-Zilberstein D., Shapira M. : The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Ann.Rew.Mic.48**:449-470, 1994.

