

Manisa İlimizde Görülen Leishmaniasis Etkeni *Leishmania* Türlerinin Kriyoprezervasyonu

Cryopreservation of *Leishmania* Species in Manisa Province

İbrahim Çavuş¹, Fulya Ocak², Tuğba Kaya¹, Ahmet Özbilgin¹

¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

²Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Manisa, Türkiye

Cite this article as: Çavuş İ, Ocak F, Kaya T, Özbilgin A. Cryopreservation of Leishmania Species in Manisa Province. Türkiye Parazitol Derg 2017; 41: 152-5.

ÖZ

Amaç: Coğrafyamızda önemli bir sağlık problemi nedeni olan *Leishmania* türlerinin virülansının ve genetik materyalinin korunması için yapılacak kriyoprezervasyon yönteminin sağlıklı işleyip işlemediğinin gözlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerlerinde ardışık pasajlarla devam eden *Leishmania tropica*, *L. infantum*, *L. major* ve *L. donovani* suşları kullanılmıştır. NNN besiyerinde kültürü yapılan promastigotlar RPMI 1640 sıvı besiyerlerine aktarılmış ve logaritmik faza giren promastigotlar fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 3 defa yıkanmıştır. Promastigot sayısı 10⁸ mL/promastigot olarak ayarlanmış ve üzerine %15 Dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. *Leishmania* türlerinin her biri 12 ayrı steril kriyo tüplerine aktarılmıştır. Tüpler Coolcell kutularına yerleştirilerek -86°C'de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün hızlı bir şekilde tüpler sıvı azot tankına aktarılmıştır. Sıvı azot tankına aktarılan kriyo tüpleri birer ay ara ile her *Leishmania* türünden birer adet çıkarılarak uygun şekilde çözündürülmüş ve NNN besiyerlerine ekimleri yapılmıştır.

Bulgular: Çalışma süresince her ay sıvı azot tankından çıkarılan *Leishmania* izolatlarının her birinin % 60-65 oranında canlılıklarını koruduğu ve NNN besiyerlerine yapılan ekimlerinde promastigotların 7.günde logaritmik faza girdiği gözlenmiştir. Mikroskop incelemelerinde promastigot yapılarında ve hareketlerinde anormallikler gözlenmemiştir.

Sonuç: Çalışmamızda leishmaniasis ile ilgili yapılması planlanan araştırmalarda kriyoprezervasyonun önemli olduğu ve DMSO ile yapılan kriyoprezervasyonun başarılı olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania* spp., Kriyoprezervasyon, Manisa, Türkiye

Geliş Tarihi: 27.02.2017

Kabul Tarihi: 11.07.2017

ABSTRACT

Objective: It was aimed to assess the success of the cryopreservation process which is carried out in order to preserve the genetic material and the virulence of the *Leishmania* species that are an important health problem in our region.

Methods: *Leishmania tropica*, *L. infantum*, *L. major*, and *L. donovani* strains in Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium in MCBU were used. Promastigotes cultured in the NNN medium were transferred to RPMI 1640 medium; promastigotes in the logarithmic phase were washed three times with PBS, and 15% dimethylsulfoxide (DMSO) was added. *Leishmania* species were transferred to 12 separate tubes. The tubes were stored at -86°C for one night by placing them in Coolcell boxes. The tubes were transferred into a liquid nitrogen tank. One cryotube per *Leishmania* strain is thawed monthly and cultured in NNN medium.

Results: For the duration of study it was observed that each *Leishmania* isolate preserved 60-65% of their viability and entered the logarithmic phase on the 7th day following the inoculation in the NNN medium. Abnormalities in the structures and movements of the promastigotes were not observed in microscopic examinations.

Conclusion: The following conclusions were made: cryopreservation is important for studies planned related to leishmaniasis and cryopreservation with DMSO is successful.

Key words: *Leishmania* spp., Cryopreservation, Manisa, Turkey

Received: 27.02.2017

Accepted: 11.07.2017

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: İbrahim Çavuş, E.mail: icvs26@yahoo.com

DOI: 10.5152/tpd.2017.5267

©Telif hakkı 2017 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2017 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolog.org

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından düzenlenen 69. Dünya Sağlık Toplantısında benimsenen ihmal edilen tropikal hastalıklarından biri olan leishmaniasis, *Leishmania* parazitlerinin neden olduğu *Phlebotomus* cinsi enfekte dişi kum sineklerinin kan emmesi sırasında insanlara bulaştırdığı protozoon parazit hastalığıdır. Leishmaniasisin Visseral Leishmaniasis (VL), Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL), Kutanöz Leishmaniasis (KL) ve Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL) olmak üzere dört ana formu bulunmaktadır (1).

Dünyada ve ülkemizde en sık görülen kutanöz leishmaniasis formudur. Genellikle vücudun açık kalan bölgelerinde ülsere ve nodüler cilt lezyonlarına neden olması, skar kalması, ciddi sakatlıklar bırakması nedeniyle önemlidir (1-2).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre son beş yılda yaklaşık 1 milyon KL vakası rapor edilmiş ve 431 milyon insandan fazlası kutanöz leishmaniasis riski altındadır. Ülkemizde Güneydoğu Anadolu bölgesi başta olmak üzere Ege ve Akdeniz Bölgelerindeki illerimizde kutanöz leishmaniasis olguları sıkça bildirilmektedir. Ülkemizin bulunduğu coğrafik konum itibarıyla Asya ve Avrupa kıtalarını birbirine bağlayan köprü konumunda bulunması, kutanöz leishmaniasis endemik olduğu komşu ülkelerde meydana gelen iç karışıklıklar ve savaşlar nedeniyle bu bölgelerden ülkemize çok sayıda göçmen girişinin olması, iklimsel değişikliklere bağlı olarak endemik olmayan bölgelerden de kutanöz leishmaniasis vakalarının bildirilmesi leishmaniasis epidemiyolojisi açısından önemlidir (3).

Kriyoprezervasyon, özel koruyucu maddeler yardımıyla hücrelerin ya da dokuların düşük sıcaklıkta saklanması olayıdır. Kriyoprezervasyon esnasında hücrelerde bütün biyolojik aktiviteler ve biyokimyasal reaksiyonlar durdurulur.

Kriyoprezervasyon yönteminin kullanılması neticesinde suşların bakteri ve mantar kontaminasyonlarının önlenmesi, canlılıklarının ve ilaç direnci gibi biyolojik özelliklerini korunması, virülans özelliklerini ve antijenik yapılarını kaybetmeden uzun süre saklayabilmeleri sağlanmaktadır (4-5).

Bu çalışmamız coğrafyamızda önemli bir sağlık problemi nedeni olan ülkemizdeki hastalardan elde edilmiş *Leishmania* türlerinin (*Leishmania tropica*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major* ve *Leishmania donovani*) virülansının ve genetik materyalinin korunması için yapılmakta olan kriyoprezervasyon yönteminin sağlıklı işleyip işlemediğini denemek amacıyla yapılmıştır.

YÖNTEMLER

Manisa ilimizde görülen KL ve VL hastalarından izole edilmiş ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında NNN besiyerlerinde ardaşık pasajlarla devam ettirilen *L. tropica*, *L. infantum*, *L. major* ve *L. donovani* suşları kullanılmıştır. NNN besiyerinde üreyen promastigotlar RPMI 1640 +%15 Fetal Bovine Serum +%1 Gentamisin solüsyonu ve %1 Penicillin/Streptomycin solüsyonu içeren sıvı besiyerlerine aktararak 25°C'deki etüv içerisinde 10 gün tutulmuştur. Logaritmik faza giren promastigotlar steril falcon tüplerine aktarılmış ve 4400 rpm 10 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üst kısım dökülerek pellet üzerine 10 ml fosfat tampon

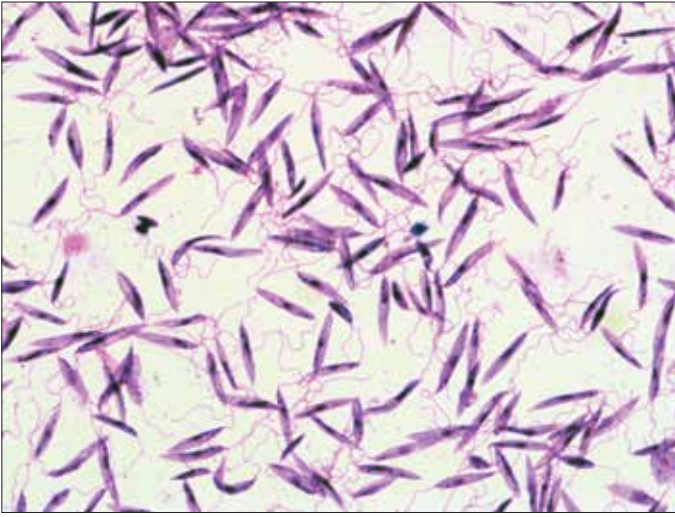


Şekil 1. Kriyoprezervasyonu yapılan promastigotların sıvı azot tankında arşivlenmesi

solüsyonu (PBS) eklenmiştir. Tekrar 4400 rpm 10 dk +4°C'de santrifüj edilmiş ve üst kısım santrifüj sonunda dökülmüştür. Bu yıkama işlemi 3 defa uygulanmıştır. Son yıkama işleminden sonra pellet üzerine PBS eklenerek promastigot sayısı 10^8 ml/promastigot olacak şekilde mikroskopta thoma lamı ile sayılarak ayarlanmıştır. Hazırlanan promastigot süspansiyonlarının üzerine %15 Dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek steril pastör pipeti yardımıyla homojen bir şekilde karıştırılması sağlanmıştır. Daha sonra steril internal kapaklı kriyo tüplerine 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır. *L. tropica*, *L. infantum*, *L. major* ve *L. donovani* türlerinin her biri için 12 kriyo tüpü olacak şekilde 48 kriyo tüpü hazırlanmıştır. Kriyo tüpleri Coolcell kutularına yerleştirilerek -86°C'de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün hızlı bir şekilde Coolcell kutularından çıkarılan kriyo tüpleri sıvı azot tankına aktarılmıştır (Şekil 1). Sıvı azot tankına aktarılan *L. tropica*, *L. infantum*, *L. major* ve *L. donovani* promastigotları içeren kriyo tüpleri bir yıl boyunca birer ay ara ile her türden birer adet çıkarılarak 37°C'lik su banyosunda eritilmiştir. Promastigotlar mikroskop altında hareketliliklerine ve Eozin boyası testine göre değerlendirilmeleri için Thoma lamı ile canlılık yüzdelerine bakılmıştır. Her bir örnek NNN besiyerine ekimleri yapılarak 25°C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 3., 5., 7., ve 9. günlerde üremeleri açısından değerlendirilmiştir. Çalışma Helsinki Declaration'a uygun olarak yapılmıştır. Çalışmanın niteliği nedeniyle etik kurul alınmasına gerek yoktur. İstatistiksel olarak gruplar arası karşılaştırma Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS) istatistik programı ile anlamlılık derecesi $p < 0,05$ alınarak yapılmıştır.

BULGULAR

Sıvı azot tankından 12 ay boyunca her ay çıkarılan promastigotların % 60-65 oranında canlı olduğu tespit edilmiş ve NNN besiyerlerine yapılan ekimlerinde 7. günden itibaren logaritmik faza girerek 10^8 ml/promastigot yoğunluğunda olacak şekilde üredikleri görülmüştür. Her dört *Leishmania* izolatinde bir yıl boyunca aynı oranda canlılıklarını koruduğu ve NNN besiyerlerine yapılan ekimlerinde promastigotların 7.günde logaritmik faza girdiği gözlenmiştir. Ki-kare (χ^2) testi ile anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Mikroskop incelemelerinde promastigot yapıları ve hareketlerinde anormallikler (hücre içerisinde vakuol oluşumu, hareket azalması) gözlenmemiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Kriyoprezervasyondan sonra üretilen promastigotlar

TARTIŞMA

Hücre içi zorunlu parazit olan *Leishmania* parazitlerinin neden olduğu leishmaniasis, enfekte dişi kum sineklerinin (*Phlebotomus*) kan emmesi sırasında insanlara bulaştırdığı paraziter bir hastalıktır. İnsanların ve yaklaşık 70 hayvan türünün doğal rezervuar olduğu bildirilmektedir. (1-2).

Dünyada KL vakalarının %70'i Cezayir, Koska Rika, Afganistan, İran, Sudan, Brezilya, Kolombiya, Etiyopya, Peru, ve Suriye'de olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde Güneydoğu Anadolu, Ege ve Akdeniz Bölgelerindeki illerimizde sıkça görülmektedir. Son yıllarda ülkemizin bulunduğu coğrafyada yaşanan iç karışıklıklar ve savaşlar nedeniyle kutanöz leishmaniasisin endemik olduğu bölgelerden ülkemize çok sayıda göçmen girişi olmakta ve ülkemize gelen misafirler ülkemizin farklı bölgelerine yerleşmektedir. Bunun yanı sıra küresel iklim değişikliklerine bağlı olarak ekolojik dengede vektör ve rezervuarları etkileyen değişikliklerin olması son yıllarda endemik olmayan bölgelerden de KL vakaları bildirilmektedir (2, 6-8).

Kutanöz leishmaniasis etkeni *L. tropica* ve *L. major*'e ek olarak daha önceleri sadece VL etkeni olarak düşünülen *L. infantum* ve *L. donovani*'nin de moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda KL etkeni olarak bildirilmiştir (9).

Kriyoprezervasyon, özel koruyucu maddeler yardımıyla hücrelerin ya da dokuların düşük sıcaklıkta saklanması olayıdır. Kriyoprezervasyon esnasında hücrelerde bütün biyolojik aktiviteler ve biyokimyasal reaksiyonlar durdurulur. Kriyoprezervasyon işleminde yavaş dondurma (slow freezing), hızlı dondurma (rapid freezing) ve vitrifikasyon (vitrification) olmak üzere üç yöntem kullanılmaktadır. Kriyoprezervasyonun temel amacı dondurma ve çözündürme esnasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engellemek ve oluşması muhtemel buz kristallerinden hücrelerin zarar görmesini önlemektir. Dondurma ve çözündürme prosedürleri her organizma için farklılık göstermektedir. Dondurma sırasında kullanılan kriyoprotektan maddelerin kriyoprezervatif özellikleri de dikkate alınarak dondurulacak organizmaya göre belirlenmelidir.

Çeşitli suşların uzun süre in vivo olarak deney hayvanı modellerinde ve in vitro kültür ortamlarında canlılıklarının sürekli olarak devam ettirilmesi suşların biyolojik ve kimyasal özelliklerinin ve antijenik özelliklerinin değişmesine, patojenitelerinin azalmasına neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca deney hayvanı modellerinin ve kültür pasajları insan kontaminasyon riskini de arttırmaktadır (10).

Kriyoprezervasyon yönteminin kullanılması neticesinde suşların bakteri ve mantar kontaminasyonlarının önlenmesi, canlılıklarının ve ilaç direnci gibi biyolojik özelliklerini koruması, virülan özelliklerini ve antijenik yapılarını kaybetmeden uzun süre saklayabilmeleri sağlanmaktadır. Aşı çalışmaları gibi uzun süreli deneysel çalışmalarda suşların güvenli bir şekilde saklanması istenmeyen farklılıkları ortadan kaldıracaktır (4-5, 11-15).

Çalışmamızda, *Leishmania* spp. parazitlerinin kriyoprezervasyonu ve bu örneklerin tekrar çalışmalar için uygun şekilde canlandırılarak kültürde üretme işlemleri yapılmıştır. Araştırmamızda kulanığımız kutanöz leishmaniasis etkeni dört tür *Leishmania*'nın bir yıl boyunca her ay sıvı azottan çıkarılan örneklerinde % 60-65 oranında canlılık olduğu tespit edilmiş ve NNN besiyerlerine yapılan ekimlerinde 7. günden itibaren logaritmik faza girdikleri görülmüştür. Benzer çalışmaların uygun şartlarda *Leishmania* amastigotları ile de yapıldığında benzer canlılık ve üreme oranlarını sağlayacağı düşünülmektedir. Kriyoprezervasyon işleminde kullanılan kriyoprotektan maddesi DMSO'nun *Leishmania* promastigotlarının canlılıklarını koruduğu ve *Leishmania* promastigotlarının kriyoprezervasyonu için uygun bir koruyucu olduğu düşünülmektedir.

Kriyoprezervasyon yapılmış örneklerde literatürlerde de belirtildiği gibi ileri çalışmalarda kullanılacak parazitin genetik materyalin değişmeden kalması, örneklerin virülanlığını kaybetmemiş olması ve laboratuvar iş yükünün azaltılarak meydana gelebilecek hataların en aza indirilebilmesi açısından da büyük önem taşımaktadır.

SONUÇ

Ülkemizde yeni KL ve VL vakaların ve yeni odakların çıkması ile önemli bir halk sağlığı sorunu olan leishmaniasis önemini daha da arttıracakı kesindir. Çalışmamızda *Leishmania* türlerinin kriyoprezervasyonu ve kriyoprezervasyon sonrası canlandırma ve üretme işlemi başarı ile yapılmıştır.

Kriyoprezervasyonu yapılması planlanan suşlarda mutlaka uygun kriyoprezervasyon işlemleri ve kriyoprotektanların kullanılmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz. Türkiye'nin *Leishmania* hafızasının bu yolla oluşturulabileceği ve bu yöntemle oluşturulan izolat bankalarının ileride bu konuda yapılacak araştırmalara önemli kaynak oluşturacağı kanısına varılmıştır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik kurum onayına gerek yoktur.

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - İ.Ç., F.O.; Tasarım - F.O., A.Ö., T.K.; Denetleme - F.O., İ.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - A.Ö.; Analiz ve/veya Yorum - A.Ö., F.O., İ.Ç.; Literatür Taraması - F.O., İ.Ç., T.K.; Yazıyı Yazan - İ.Ç., T.K., A.Ö.; Eleştirel İnceleme - A.Ö., İ.Ç.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Approval from the ethics committee was not required in this study.

Informed Consent: Not required in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - İ.Ç., F.O.; Design - F.O., A.Ö., T.K.; Supervision - F.O., İ.Ç.; Data Collection and/or Processing - A.Ö.; Analysis and/or Interpretation - A.Ö., F.O., İ.Ç.; Literature Review - F.O., İ.Ç., T.K.; Writing - İ.Ç., T.K., A.Ö.; Critical Review - A.Ö., İ.Ç.

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

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

- Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniasis. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, editors. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları Kitabı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No: 22; 2007. p. 197-244.
- WHO, Leishmaniasis. Available from: www.who.int/leishmaniasis/en/
- OK UZ, Balcıoğlu IC, Taylan Ozkan A, Ozensoy S, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey. Acta Trop 2002; 84: 43-8. [CrossRef]
- Miyata A. Cryo-Preservation of the Parasitic Protozoa. Jap J Trop Med Hyg 1975; 3: 161-200. [CrossRef]
- Duran N, Yarkin F, Allahverdiyev AM. The Effect Of The Various Freezing Methods On The Cell Viability Of Cryopreserved Hep-2 And Rabbit Kidney Cells. Türk Hij Den Biyol Derg 2001; 58: 53-60.
- Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region, WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean, WHO Regional Publications Eastern Mediterranean Series; 35, 2013.
- Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in, WHO Weekly Epidemiological Record, 2016; No 22, 91: 285-296.
- Du R, Hotez PJ, Al-Salem WS, Acosta-Serrano A. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. PLoS Negl Trop Dis 2016; 1:e0004545. [CrossRef]
- Ertabaklar H, Ertuğ S, Çalışkan SÖ, Bozdoğan B. Determination of *Leishmania* Species by PCR-RFLP in the Smear Samples Taken from the Lesions of Cutaneous *Leishmaniasis* Cases. Mikrobiyol Bul 2016; 50: 300-6. [CrossRef]
- Özbilgin A, Östan İ, Kurt Ö. Kriyoprezervasyon. Korkmaz M, Ok ÜZ, editors. Parazitolojide Laboratuvar. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No:23; İzmir 2011. p.405-9.
- Sağırkaya H, Bağış H. Cryopreservation of Mammalian Embryos. Uludağ Univ J Fac Vet Med 2003; 22: 127-35.
- Kousha S, Mohebbi M. Cryopreservation Methods for Different Species of *Leishmania*. Pejouhandeh 2000; 5: 157-64.
- Pegg DE. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Second Edition. Totowa, New Jersey. Day JG and Stacey GN; 2007.
- Callow LL, Farrant J. Cryopreservation of the Promastigote Form of *Leishmania tropica* var major at Different Cooling Rates. Int J Parasitol 1973; 3: 77-88. [CrossRef]
- Diamond LS. Freeze-Preservation of Protozoa. Cryobiology 1964; 1: 95-102.[CrossRef]