

Mitojen ve Çeşitli Lizatlarla Modifiye Edilen Besiyerlerinin Promastigot Taşıma Kapasiteleri

THE CARRYING CAPACITIES OF THE MEDIA THAT WAS MODIFIED WITH MITOGEN AND VARIOUS LYSATES

Fuat DİLMEÇ*, Ali MATUR**, Mehmet KARAKAŞ***, Soner UZUN****

* Arş.Gör.Dr., Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD,

** Prof.Dr., Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD,

*** Yrd.Doç.Dr., Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji AD,

**** Yrd.Doç.Dr., Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji AD, ADANA

Özet

Leyişmaniyoz etkenlerine moleküler yöntemlerin uygulanabilmesi eldeki hücre sayısı ile yakından ilgilidir. Bu çalışmada, bilinen populasyon taşıma kapasitesinin artırılması ve maksimum hücre sayısına erişme süresinin kısaltılması hedeflendi. Modifiye Evans bifazik besiyerine ek olarak yalnız 1x RPMI-1640 besiyerine çeşitli kan ve kan ürünleri katılarak elde edilen yeni modifiye monofazik besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerine belirli sayıda *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) parazitleri ekildi.

İnkübasyon sonrası hem yalnız 1x RPMI-1640 besiyerinde hem de kan ve kan ürünlerinin ilavesi ile elde edilen yeni modifiye besiyerlerinde, birim hacme düşen parazit sayılarının, daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen düzeyi aşamadıkları tespit edildi. Buna karşılık, maksimum hücre sayısına erişme süreleri arasında farklılıklar belirlendi. Buna göre; *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) hücreleri modifiye Evans besiyerinde 14., yalnız 1x RPMI-1640 besiyerinde 12. ve insan tam kan lizatının eklendiği 1x RPMI-1640 besiyerinde ise dördüncü günde maksimum hücre sayısına eriştiği gözlemlendi.

Ayrıca, mitotik indeksi artırarak taşıma kapasitesine daha kısa zamanda erişmek amacıyla fitohemagglütinin (PHA) denemesi yapıldı. Farklı derişimlerde fitohemagglütinin, yalnız 1x RPMI-1640 besiyerlerine eklendikten sonra *L.major* (5-ASKH) ekildi ve belirli zaman aralıklarıyla birim hacme düşen hücre sayıları belirlendi. Yapılan çalışmaya göre, besiyerine eklenen mitojen maddenin (PHA) populasyon taşıma kapasitesini ve ikilenme süresini etkilemediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Leyişmanya kültürü, Kan lizatı, Maksimum üreme oranı, Taşıma kapasitesi, Mitojen maddeler

T Klin Tıp Bilimleri 1999, 19:330-336

Geliş Tarihi: 09.06.1999

Yazışma Adresi: Dr.Ali MATUR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD
01330 Balcalı-ADANA

Bu çalışma "First World Congress on Leishmaniosis" İstanbul-1997'de poster olarak sunulmuştur.

Bu çalışma ÇÜ Rektörlüğü Araştırma Fonu (SBE.96.4) tarafından desteklenmiştir.

Summary

The molecular methods that can be applied to Leishmania parasites are directly related with the cell number that is present. In this study, it was aimed to increase conventional carrying capacity of culture and to decrease the period to reach the maximum cell number. The medium was prepared as modified Evans' biphasic medium and as monophasic RPMI-1640 with blood or blood products. The determined cell numbers of *L.tropica* (K-27) and *L.donovani* (DD-8) were inoculated into these media, separately.

The 1x RPMI-1640 media of both type, simple and modified ones did not show any positiveness comparing with the preliminary studies performed with traditional media. However, the reaching periods to full capacity happened to be different. *L.tropica* (K-27) and *L.donovani* (DD-8) cells in Evans' modified medium and simple 1x RPMI-1640 were highest in 14th, and enriched 1x RPMI-1640 medium with human whole blood lysate reached almost the same level after only four days.

In order to reach the full capacity in minimum period of time, we tried to have the advantage of higher mitotic index with phytohaemagglutinin (PHA). The PHA in different concentrations were added into simple 1x RPMI 1640 media, then the media were inoculated with *L.major* (5-ASKH). Following the cell numbers throughout the cultivation no positive effect was detected at all.

Key Words: Blood lysate, Growth rate, Leishmania culture, Maximum carrying capacity, Mitogen agents

T Klin J Med Sci 1999, 19:330-336

Leyişmaniyoz etkenleri; tropikal ve subtropikal bölgelerde yaklaşık 15 milyon kişiyi etkilemiş olup, bunlara her yıl 400.000 yeni vaka eklenmektedir (1). Leyişmaniyoz, ülkemizin Güney Doğu Anadolu bölgesinde epidemik, Çukurova bölgesinde de endemik olarak bir seyir göstermektedir (2).

Promastigotlar için kullanılan besiyerlerine, değişik maddelerin katılımıyla üremenin etkilemediği bilinmektedir. Türkiye'de yapılan *L.tropica* ve *L.infantum* parazitlerinin kültüründe klasik NNN besiyerine sığır kanı, Nutrient broth'a Fötal Calf Serum (FCS), RPMI-1640 besiyerine FCS ve insan idrarı katılmak suretiyle başarı sağlanmıştır (3-5). Yeni Dünya leişmaniyoza etkenlerinin üretildiği Brain Heart Infusion Agar'ın örtü sıvısına FCS, hemoglobin, pepton ve hemin katıldığında promastigotların daha olumlu yönde üredikleri görülmüştür (6,7). Çin leişmanya izolatlarının kültürü, insan tam kan lizati ve Fötal Bovin Serum (FBS) bulunan Medium 199'da yapılmış ve kan lizatının olumlu etkisinden söz edilmiştir (8). Bir başka çalışmada 1x μ -Minimal Essential Medium (μ -MEM), 1x RPMI 1640 ve Dulbecco'nun modifiye Eagle Powder (DME) besiyerlerine ayrı ayrı FBS ve hemin katılarak, bu besiyerlerine *L.donovani* ekilmiş, birim hacme düşen hücre sayısı izlenmiştir. Besiyerlerine hemin katılmak suretiyle "populasyon taşıma kapasitesi" ve "maksimum hücre sayısı"na erişme süresinin μ -MEM'de en kısa, DME besiyerinde en uzun olduğu bulunmuştur (9). Modifiye Evans besiyerine ait örtü sıvısına prolin katıldığında da parazitler çok iyi üreme göstermişlerdir (10,11). 1x Grace's insekt besiyerine; FBS katılarak bu besiyeri izolasyon için kullanıldığında başarısız olunmuş, aynı besiyerine defibrine tavşan tam kanı ekleneince, Kala-Azar etkenlerinin izolasyonunda büyük başarı elde edildiği bildirilmiştir (12). Yapılan bir çalışmada; FCS içeren 1x Schneider's Drosophila besiyerinde hem *L.tropica* hem de *L.major*, 7×10^7 hücre/ml; *L.donovani*, 5×10^7 hücre/ml (13); FCS içeren 1x RPMI-1640 ve Nutrient broth besiyerlerinde; *L.donovani* sırasıyla $2-6 \times 10^7$ /ml ve 2.5×10^7 hücre/ml (14), aynı şekilde klasik NNN'de $1.5-2.5 \times 10^7$ hücre/ml düzeyinde hücre elde edilmiştir (15).

İnsan T lenfositleri G_0 fazında bulunmaktadır. In vitro çalışmalarda lenfosit kültürüne eklenen fitohemaglutinin (PHA-L), lenfositlerde RNA sentezini stimüle ederek hücreleri blast hücrelerine dönüştürür. Bu madde bir lektindir ve mitojen olarak kullanılır (16-18).

Sunulan bu çalışma ile birim hacim başına düşen hücre sayısını arttırmak ve maksimum hücre

sayısına erişme süresini kısaltmak amacıyla *L.tropica* (K-27) ile *L.donovani* (DD-8) parazitleri; modifiye Evans besiyeri ile kan ve kan ürünlerinin eklendiği 1x RPMI-1640 besiyerlerinde üretildi. Ayrıca değişik derişimlerde PHA-L içeren yalnız 1x RPMI-1640 besiyerine *L.tropica* (K-27) hücreleri ekildi ve belirli zaman aralıkları ile hücre sayıları belirlendi.

Gereç ve Yöntem

Birim hacme düşen maksimum promastigot sayısını tespit amacıyla şu besiyerleri denendi:

a) Modifiye Evans bifazik besiyeri (10); bakteriyolojik pepton, beef ekstrakt, tuz ve agar suda eritildikten sonra, pH 7'ye ayarlandı. Otoklav sonrası besiyerine %10 defibrine tavşan tam kanı ve $200 \mu\text{g/ml}$ gentamisin eklendi. Bu besiyeri, kültür tüplerine 2'şer ml dağıtılıp yatık olarak katılaştırıldı. Üzerine 1 ml izotonik solüsyon eklendi.

b) Yalnız 1x RPMI-1640 monofazik besiyeri: 100 ml besiyeri için 10 ml 10x RPMI-1640 (Sigma) besiyerine steril şartlar altında 25mM HEPES (Sigma), 4.76mM NaHCO_3 (Seromed), %10 FBS (Seromed), 2mM L-glutamin (Seromed) ve $100 \mu\text{g/ml}$ gentamisin (Roche) eklenerek pH (7.0) ayarlandı.

c) %15 tavşan tam kanı eklenerek hazırlanan 1x RPMI-1640 besiyeri,

d) %15 tavşan tam kan lizati eklenerek hazırlanan 1xRPMI-1640 besiyeri,

e) %15 insan tam kan lizati eklenerek hazırlanan 1x RPMI-1640 besiyerleri.

Tam kan lizati hazırlanması amacıyla (10); 10 ml heparinli tam kanın plazması santrifüjle ($800 \times g$) ayrıldı. Kalan hücre çökeltisi, aynı hacimdeki izotonik solüsyonla üç defa yıkamanın ardından, 10 ml saf suda ve soğuk ortamda tutularak eritrositlerin parçalanması sağlandı. Parçalanmayan lökosit hücreleri santrifüjle ($1000 \times g$) uzaklaştırılarak tam kan lizati elde edildi. Tüm besiyerleri ikişer ml şeklinde kültür tüplerine dağıtılarak her bir besiyeri için ayrı ayrı beşer tüp serisi hazırlandı. Dr. ALVAR (İspanya) ve Dr. STRELKOVA'dan sağlanan *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) parazitleri

belirli sayıda bu besiyerlerine ekildi ve belli zaman aralıkları ile maksimum hücre sayıları Thoma lamı ile sayıldı.

Fitohemaglutinin'in (PHA-L, Seromed) 1.2 mg'ı 5 ml suda çözüldü ve yalın 1x RPMI-1640 besiyerinin beşer tüplük serisine sırasıyla 0, 1, 3, 5, 8 ve 15 mg/ml olacak şekilde katıldı. Yukarıda sözü edilen araştırmacılar tarafından sağlanan *L.major* (5-ASKH) hücreleri de bu besiyerlerine belirli sayıda ekildi. Her iki günde Thoma lamı ile sayım yapıldı. Her besiyeri için elde edilen ortalama maksimum promastigot sayıları, Bilgisayar SPSS istatistik programları kullanılarak student t-testi ile karşılaştırıldı.

Bulgular

Modifiye Evans bifazik besiyeri (a) ile yalın 1x RPMI-1640'ın kan ve kan ürünleri eklenmesiyle hazırlanan modifiye besiyerlerine (b-e) ekilen *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) parazitlerinin belli zaman aralıklarında belirlenen ortalama hücre sayıları ve ortalama maksimum hücre sayısına erişim süreleri ayrı ayrı Tablo 1'de verildi.

Kutanöz leyişmaniyoz etkeni olan *L.tropica*'nın; modifiye Evans bifazik besiyerinde (a) populasyon taşıma kapasitesine 14., yalın 1x RPMI-1640 besiyerinde (b) 12.gün, %15 tavşan tam kanı içeren 1x RPMI-1640 (c) besiyerinde sekizinci gün,

%15 tavşan tam kan lizati içeren 1x RPMI-1640 (d) besiyerinde altıncı gün ve %15 insan tam kan lizati içeren 1x RPMI-1640 besiyerinde (e) de dördüncü gün ulaştığı belirlendi.

L.tropica'nın (K-27) besiyeri bileşimine göre maksimum hücre sayılarına erişim süreleri farklı olurken; populasyon taşıma kapasiteleri kendi aralarında istatistiki olarak karşılaştırıldı (Tablo 2). Modifiye Evans bifazik besiyerinde elde edilen ortalama maksimum hücre sayılarının diğer besiyerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Modifiye sıvı besiyerlerinde maksimum hücre sayıları kendi içinde karşılaştırıldığında ise; tavşan tam kan lizati içeren besiyerinin (d) yalın 1x RPMI-1640 besiyerine (b) oranla, 1x RPMI-1640 besiyeri (b) ile tavşan tam kanı eklenen 1x RPMI-1640 besiyerinin (c) insan tam kan lizati içeren 1x RPMI-1640 besiyerine (e) oranla daha fazla hücre içerdiği tespit edildi ($p<0.05$).

Kala-azar etkeni olan *L.donovani* (DD-8) ise; modifiye Evans bifazik besiyerinde (a) 14.gün, yalın 1x RPMI-1640 (b) besiyerinde 12.gün, %15 tavşan tam kanı içeren 1x RPMI-1640 (c) besiyerinde sekizinci gün, %15 tavşan tam kan lizati içeren 1x RPMI-1640 besiyerinde (d) yedinci gün ve %15 insan tam kan lizati içeren 1x RPMI-1640 (e) besiyerinde ise dördüncü günde ortalama maksimum hücre sayısına eriştiği belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı besiyerlerinin ortalama populasyon taşıma kapasiteleri*

Gün	<i>L.tropica</i> (K-27) (hücre/mlx10 ⁶)					<i>L.donovani</i> (DD-8) (hücre/mlx10 ⁶)				
	(a) Mod. Evans	(b) RPMI 1640	(c) RPMI 1640	(d) RPMI 1640	(e) RPMI 1640	(a) Mod. Evans.	(b) RPMI 1640	(c) RPMI 1640	(d) RPMI 1640	(e) RPMI 1640
00	00.40	00.20	00.20	00.20	00.20	00.48	00.24	00.24	00.24	00.24
04	13.50	07.50	12.00	19.60	29.25	13.70	03.40	09.60	12.15	28.40
06	16.25	15.15	19.50	31.10	23.50	21.50	10.65	15.70	24.55	15.90
07	22.75	18.05	24.10	24.85	18.85	27.35	13.20	20.45	26.10	14.50
08	27.75	22.10	29.70	19.70	14.90	32.70	18.75	25.55	18.05	12.10
10	38.50	28.30	25.10	09.15	07.55	40.70	25.65	21.25	13.05	09.00
12	42.05	29.30				45.05	28.15			
14	43.60	17.55				46.55	16.00			
16	22.75					27.85				

- Besiyerlerinin sıralaması "Gereç-Yöntem"deki sıralamanın benzeridir.

Tablo 2. Farklı besiyerlerinin ortalama maksimum promastigot sayılarının karşılaştırılması

Besiyeri Adı	L.tropica (K-27)		L.donovani (DD-8)	
	×±SH (x10 ⁶)	P değeri	×±SH (x10 ⁶)	P değeri
Mod. Evans (a)	43.6±0.54		46.5±0.7	
RPMI-1640 (b)	29.3±0.26	P<0.001	28.1±0.95	P<0.001
Mod. Evans (a)	43.6±0.54		46.5±0.7	
RPMI-1640 (c)	29.7±0.32	P<0.001	25.5±0.72	P<0.001
Mod. Evans (a)	43.6±0.54		46.5±0.7	
RPMI-1640 (d)	31.1±0.6	P<0.001	26.1±0.13	P<0.001
Mod. Evans (a)	43.6±0.54		46.5±0.7	
RPMI-1640 (e)	29.0±0.28	P<0.001	28.4±0.64	P<0.001
RPMI-1640 (b)	29.3±0.26		28.1±0.95	
RPMI-1640 (c)	29.7±0.32	P>0.05	25.5±0.72	P>0.05
RPMI-1640 (b)	29.3±0.26		28.1±0.95	
RPMI-1640 (d)	31.1±0.6	0.01<P<0.05	26.1±0.13	P>0.05
RPMI-1640 (b)	29.3±0.26		28.1±0.95	
RPMI-1640 (e)	29.0±0.28	0.01<P<0.05	28.4±0.64	P>0.05
RPMI-1640 (c)	29.7±0.32		25.5±0.72	
RPMI-1640 (d)	31.1±0.6	P>0.05	26.1±0.13	P>0.05
RPMI-1640 (d)	31.1±0.6		26.1±0.13	
RPMI-1640 (e)	29.0±0.28	0.01<P<0.05	28.4±0.64	0.01<P<0.05

Not) ×: Ortalama maksimum promastigot, SH: Standart hata.

Tablo 3. Mitojen madde (PHA-L) eklenen besiyerlerinin ortalama promastigot sayıları

Gün	PHA-L (0 mg/ml)	PHA-L (1 mg/ml)	PHA-L (3 mg/ml)	PHA-L (5 mg/ml)	PHA-L (8 mg/ml)	PHA-L (15 mg/ml)
00	7.00x10 ⁴	7.00x10 ⁴	7.00x10 ⁴	7.00x10 ⁴	7.00x10 ⁴	7.00x10 ⁴
02	6.00x10 ⁵	6.67x10 ⁵	6.67x10 ⁵	8x67x10 ⁵	6.67x10 ⁵	8x67x10 ⁵
04	4.80x10 ⁶	2.07x10 ⁶	2.70x10 ⁶	1.73x10 ⁶	1.67x10 ⁶	3.00x10 ⁶
06	1.28x10 ⁷	1.27x10 ⁷	1.50x10 ⁷	1.38x10 ⁷	1.35x10 ⁷	1.34x10 ⁷
08	2.46x10 ⁷	2.46x10 ⁷	2.29x10 ⁷	2.38x10 ⁷	2.04x10 ⁷	2.30x10 ⁷
10	2.67x10 ⁷	2.92x10 ⁷	2.59x10 ⁷	2.67x10 ⁷	2.22x10 ⁷	2.83x10 ⁷
12	2.87x10 ⁷	3.17x10 ⁷	2.93x10 ⁷	2.90x10 ⁷	2.90x10 ⁷	3.23x10 ⁷
14	3.08x10 ⁷	3.30x10 ⁷	3.17x10 ⁷	3.12x10 ⁷	3.13x10 ⁷	3.20x10 ⁷
16	1.26x10 ⁷	1.06x10 ⁷	1.10x10 ⁷	1.05x10 ⁷	1.06x10 ⁷	1.07x10 ⁷

L.donovani (DD-8) paraziti ortalama maksimum hücre sayılarına erişim süresi besiyerlerine göre değişirken; populasyon taşıma kapasiteleri kendi aralarında karşılaştırıldı (Tablo 2). Modifiye Evans bifazik besiyerinde elde edilen ortalama maksimum hücre sayıları, diğer sıvı besiyerlerine oranla daha fazla bulundu (p<0.05). Sıvı besiyerleri ortalama maksimum hücre sayısı yönünden kendi aralarında karşılaştırıldığında; insan tam kan lizati içeren 1x RPMI-1640 besiyerinin (e) sadece tavşan

tam kanı içeren 1x RPMI-1640 besiyerine (c) oranla daha fazla hücre taşıdığı belirlendi (p<0.05).

Fitohemaglutinin (PHA-L), hücre taşıma kapasitesine ve bu kapasiteye ulaşma zamanına olan etkisinin araştırıldığı çalışmada, L.major (5-ASKH) promastigotları kullanıldı (Tablo 3).

Besiyerleri arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalara göre bu maddenin ortalama maksimum hücre sayılarına ve bu sayılara erişim

Tablo 4. Mitojen içeren besiyerlerinin ortalama maksimum hücre sayılarının karşılaştırılması

Besiyeri	$\times \pm SH$ ($\times 10^6$)	P değeri	Besiyeri	$\times \pm SH$ ($\times 10^6$)	P değeri
Kontrol	30.8 \pm 0.7		1 μ g/ml	32.6 \pm 0.5	
1 μ g/ml	32.6 \pm 0.5	P>0.05	15 μ g/ml	32.3 \pm 0.2	P>0.05
Kontrol	30.8 \pm 0.7		3 μ g/ml	32.6 \pm 0.5	
3 μ g/ml	31.7 \pm 0.3	P>0.05	5 μ g/ml	31.2 \pm 0.7	P>0.05
Kontrol	30.8 \pm 0.7		3 μ g/ml	32.6 \pm 0.5	
5 μ g/ml	31.2 \pm 0.7	P>0.05	8 μ g/ml	31.3 \pm 0.8	P>0.05
Kontrol	30.8 \pm 0.7		3 μ g/ml	32.6 \pm 0.5	
8 μ g/ml	31.3 \pm 0.8	P>0.05	15 μ g/ml	32.3 \pm 0.2	P>0.05
Kontrol	30.8 \pm 0.7		5 μ g/ml	31.2 \pm 0.7	
15 μ g/ml	32.3 \pm 0.2	P>0.05	8 μ g/ml	31.3 \pm 0.8	P>0.05
1 μ g/ml	32.6 \pm 0.5		5 μ g/ml	31.2 \pm 0.7	
3 μ g/ml	32.6 \pm 0.5	P>0.05	15 μ g/ml	32.3 \pm 0.2	P>0.05
1 μ g/ml	32.6 \pm 0.5		8 μ g/ml	31.3 \pm 0.8	
5 μ g/ml	31.2 \pm 0.7	P>0.05	15 μ g/ml	32.3 \pm 0.2	P>0.05
1 μ g/ml	32.6 \pm 0.5		8 μ g/ml	31.3 \pm 0.8	
8 μ g/ml	31.3 \pm 0.8	P>0.05	15 μ g/ml	32.3 \pm 0.2	P>0.05

Not) \times Ortalama maksimum promastigot sayısı, SH: Standart hata.

sürelerine etki etmediği belirlendi (P>0.05) (Tablo 4).

Tartışma

Yapılan çalışmalarda kutanöz leyişmanoz etkenlerinin tropikal ve subtropikal bölgelerde olduğu kadar (1,15), bölgemizde de endemik ve epidemik olarak seyrettiği bilinmektedir (2,3).

Moleküler çalışmalarda çok sayıda hücre kullanıldığından, hem yüksek populasyon taşıma kapasitesi, hem de bu kapasiteye erişme süresinin mümkün olduğunca kısa olması aranan parametrelerdir. Daha önce yapılan çalışmalara göre; 1x RPMI-1640 besiyerinde (9,14) en yüksek hücre sayısı 2-5 \times 10⁷/ml, Schneider's Drosophila besiyerinde (13) 5-8 \times 10⁷/ml, klasik NNN'de (15) 1.5-2.5 \times 10⁷/ml elde edilmiştir. Bu çalışmada; kutanöz etkeni olan *L.tropica* (K-27) ve kala-azar etkeni *L.donovani* (DD-8) promastigotlarının, besiyerlerinde birim hacme düşen maksimum hücre sayılarının daha önce yapılan çalışma sonuçlarıyla benzer, ancak populasyon taşıma kapasitesine erişme zamanının farklılık gösterdiği tespit edildi (Tablo 1). Bu sonuç, fazla hücre gerektiren bir çok çalışma için kültür süresini kısaltması açısından bir fırsattır. Diğer yandan, sürenin kısaltılması kontaminasyon riskini de azaltmaktadır. Modifiye bifazik

besiyerinin her iki hücre için, sıvı besiyerlerine oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre artışı gösterirken; besiyerine eklenen kanlardan gelen parazit dışı antijen ve DNA içermesi yüzünden moleküler çalışmalarda uygun bulunmadı (Tablo 2). Çalışmaya göre; bazı kan ve kan ürünleri içeren sıvı besiyerleri arasında hücre sayıları yönünden istatistiki farklılıklar vardır (p<0.05), ancak bunun farklı çevre koşullarından ileri geldiği düşünülebilir.

Muhtemel kontaminasyonların önüne geçilmesi ve kültür süresinin kısaltılması, besiyerinin taşıma kapasitesine kısa zamanda erişmesi ile mümkündür. Çalışmada kullanılan *L.tropica* (K-27) ve *L.donovani* (DD-8) referans promastigotları, modifiye Evans bifazik besiyerinde (a) 14.günde ve insan tam kan lizati içeren 1x RPMI-1640 besiyerinde (e) dördüncü günde en yüksek hücre sayısına eriştiği tespit edildi. Diğer yandan, kan ve kan ürünü içermeyen 1x RPMI-1640 besiyerinde (b) *L.tropica* ve *L.donovani*, en yüksek hücre sayısına 12.günde ulaştığı gözlemlendi. Tablo 1 sonuçlarına bakıldığında, kan ve kan ürünlerinin katıldığı sıvı besiyerlerinde, maksimum hücre sayısına erişme zamanının kısaltıldığı görülür. Monofazik besiyerinin bileşimi temelde aynı olmasına karşın, eklenen kan ve kan ürünlerinin elde edildikleri kaynaklara göre,

maksimum hücre sayılarına erişme sürelerini değiştirdiğini görmekteyiz. Bu da farklı kaynaklardan alınan kan bileşimlerinin, leişmaniyoz etkenlerini farklı şekilde etkilediğini göstermektedir. İlâveten, kanın alınması ve işlenmesi sırasında uygulanan yöntemlerin muhtemel etkisi de unutulmamalıdır. Daha önce ülkemizde (3-5) ve yurt dışında (6,9,10,12) yapılan kültür çalışmalarında; besiyerlerine prolin, hemin, hemoglobinin, sığır ve insan kanı gibi bileşenlerin katılmasıyla, kültürde olumlu sonuçlar alındığı bilinmektedir.

İnsan tam kan lizatu; hem kültür süresini kısaltması, hem de insan lökosit hücrelerinden gelen parazit dışı DNA'nın azlığından dolayı DNA'ya dayalı moleküler çalışmalarda kullanılacak monofazik besiyerlerine katılabilir. Ayrıca; hücrelere acil ihtiyaç yoksa maksimum hücre sayısına erişme süresinin uzun olduğu yalın 1x RPMI-1640 ve acil gereksinim varsa, maksimum hücre sayısına erişme süresinin kısa olduğu insan tam kan lizatu içeren 1x RPMI-1640 besiyerinde kültürün yapılması öngörülebilir.

Lektinlerin (PHA, PWM gibi), in vitro G₀ fazındaki lenfosit hücrelerinde RNA sentezini stimüle ederek, lenfosit hücrelerini lenfoblast durumuna dönüştürdükleri bilinmektedir. Özellikle Fitohemaglütinin (PHA-L), T lenfositlerinin mitotik stimülatörü olarak, besiyerlerine ml'de 5 mg'dan az kullanıldığında bu hücrelerin mitozu sürüklendiği tespit edilmiştir (16-18). Buradan yola çıkarak PHA-L'nin promastigotların maksimum hücre sayısına erişim sürelerine ve populasyonun taşıma kapasitelerine etki edip etmediği araştırıldı. Ancak PHA'nın değişik konsantrasyonlarının kullanıldığı besiyerlerinde elde edilen ortalama maksimum hücre sayıları ile kontrol grubu hücre sayıları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, bu maddenin promastigot üremesine etki etmediği belirlendi (Tablo 3,4).

Teşekkür

Çalışma süresince laboratuvar olanaklarından yararlandığımız TIBDAM yöneticilerine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, and Bastien P. The Leishmania genome comprises 36

chromosomes across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Research* 1996; 24(9): 1688-94.

2. Memişoğlu HR, Kotoğyan A, Acar MA, Özpoçraz M. Leishmaniasis. In: Tüzün Y, Kotoğyan A, Aydemir EH, Baransü O, eds. *Dermatoloji*. İstanbul: 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2. baskı. 1994; 221-31.
3. Değerli S, Özçelik S. Farklı kültür ortamlarında Leishmania promastigotlarının üremesi üzerine karbondioksitin etkisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1998; 22(2): 107-10.
4. Yereli K, Girginkardeşler N, Değerli K, Özbilgin A. Nutrient broth besiyerinde L.infantum ve L.tropica'nın kültürasyonu için basit bir metodun geliştirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1997; 21(2): 111-3.
5. Balcıoğlu IC, Girginkardeşler N, Yereli K, Özbel Y, Özbilgin A. Ülkemizde izole edilen Leishmania infantum ve L.tropica'nın in vitro üretilmesi üzerine insan idrarının etkisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1997; 21(2): 119-21.
6. Gomez-Eichelmann MC, Holz JrG, Beach D, Simpson AM, and Smpson L. Comparison of several lizard Leishmania species and strains in terms of kinetoplast minicircle and maxicircle DNA sequences, nuclear chromosomes, and membrane lipids. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1988; 27: 143-58.
7. Lopes UG, Momen H, Grimaldi Gjr, Marzochi MCA, Pacheco RS, and Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of Leishmania in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Parasit* 1984; 70(1): 89-98.
8. Lu HG, Zhong L, Guan LR, Qu jQ, Hu XS, Chai JJ, Xu ZB, Wang CT, and Chang KP. Separation of Chinese Leishmania isolates into five genotypes by kinetoplast and chromosomal DNA heterogeneity. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1994; 50(6): 763-70.
9. Kar K, Mukerji K, Naskar K, Bhattacharya A, and Ghosh DK. Leishmania donovani: A chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to promastigotes. *J Protozool* 1990; 37(4): 277-9.
10. Evans DA. In: *In vitro methods for parasite cultivation, Leishmania*. London: Acad. Press Ltd 1987: 52-75.
11. Navin TR, Arana FE, de Merida AM, Arana BA, Castillo AL, and Silvers DN. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42(1): 36-42.
12. Saran R, Gupta AK, Shrivastava SN, and Drasad LSN. Use of modified Grace's insect medium for the primary isolation of Leishmania donovani donovani in Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35(3): 488-90.
13. Groggl M, Daugirda JL, Hoover DL, Magill AJ, and Berman JD. Survivability and infectivity of viscerotropic L.tropica from operation desert storm participants in human blood products maintained under blood bank conditions. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49(3):308-15.
14. Kaddu JB, and Nyamori MP. Nutrient broth for the cultivation of leishmania. *J Parasitol* 1990; 76(2): 265-66.

15. Jaffe CL, Grimaldi G, and McMahon-Pratt D. The cultivation and cloning of leishmania. In: Morel CM. ed. Genes and antigens of parasites. Rio de Janeiro: A laboratory manual, publication of the UNDP/WORLD BANK/WHO special programme for Research and training in Tropical Diseases. 1984: 47-92.
16. Bost KL, Hellner CF, Holton RH, Patterree MS, Clements JD, Krogstad DJ, and Kincy-Chain T. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification and partial sequence of T helper 2-type lymphokine genes from the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56(3): 351-8.
17. Crossen PE, Godwin JM, and Bodger MP. Sister chromatid exchange in immature haemopoietic cells, T- and B- lymphocytes. *Hum Genet* 1986; 72: 101-3.
18. Greaves M, Jannossy G, Doenhoff M. Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens. *J Exp Med* 1974; 140-1.