TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS PROTOSKOLEKSLERİNİN İN VİTRO ORTAMDA GELİŞİMİ ve PROTEİN YAPILARININ SDS-PAGE YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Cenk Soner BÖLÜKBAŞ

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet DOĞANAY

2007 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Parazitoloji Doktora **Programı**
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 19 /10 /2007

Prof. Dr. Ayşe BURGU
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ahmet DOĞANAY
Ankara Üniversitesi
Raportör (Danışman)

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Hatice ÖGE
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Kader YILDIZ
Kırıkkale Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vi
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	1
1.2. *Echinococcus granulosus*'un Taksonomisi	3
1.3. *Echinococcus granulosus*'un Morfolojisi	4
1.4. *Echinococcus granulosus*'un Biyolojisi	6
1.5. Türkiye'de *Echinococcus granulosus*'un Yaygınlığı	8
1.5.1. Türkiye'de *Echinococcus granulosus*'un Sonkonaklardaki Yaygınlığı	9
1.5.2. Türkiye'de Hidatidozis'in Arakonaklardaki Yaygınlığı	9
1.6. Helmintlerin İn Vitro Kültürü Hakkında Genel Bilgiler	11
1.7. Cestodlarda İn Vitro Kültivasyon ve Karşılaşılan Temel Problemler	13
1.7.1. *Echinococcus granulosus*'un İn Vitro Kültürünün Tarihçesi	15
1.7.2. *Echinococcus granulosus*'da İn Vitro Kültür	17
1.7.2.1. Onkosferlerin İn Vitro Kültürü	18
1.7.2.2. Protoskolekslerin İn Vitro Kültürü	19
1.7.2.2.1. Monofazik Besiyerinde Kültür (Kistik yönde gelişim)	23
1.7.2.2.2. Difazik Besiyerinde Kültür (Strobilar yönde gelişim)	25
1.8. Protein Yapılarının SDS – PAGE Yöntemi ile Belirlenmesi	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	31
2.1. Hidatik Kistlerin Elde Edilmesi	31
2.2. Kistlerin Aseptik Diseksiyonu ve Monofazik Kültüre Hazırlık	31
2.3. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	35
2.3.1. SDS – PAGE için Gerekli Kimyasallar ve Formülasyonları	36
2.3.2. Jelin Hazırlanması, Örneklerin Hazırlanması, Örneklerin Çukurlara Konması ve Jelin Elektroforezi	37
2.4. İstatistiksel Analiz ve Matematiksel Modellemeler	38
3. BULGULAR	40
4. TARTIŞMA	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
ÖZET	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	75

ÖNSÖZ

Hidatidozis, *Echinococcus* cinsine ait türlerin larva şekillerinin (metacestod) insan ve hayvanlarda oluşturduğu, hem sağlık hem de ekonomik yönden oldukça önemli, zoonotik bir hastalıktır.

Türkiye'de hidatidozdan sorumlu olan Ekinokok türü *Echinococcus granulosus*'dur. Hastalık özellikle fertil kistler taşıyan koyunlarla evcil köpekler arasında seyir göstermekte, hastalığa enfekte köpeklerle yakın temas kuran insanlar da yakalanmaktadır. Çevre sağlığı ve koruyucu hekimlik önlemlerinin yetersiz kaldığı pek çok toplumda olduğu gibi Türkiye'de de hidatidoz halen önemini korumaktadır.

Hidatidoz hastalığına neden olan *Echinococcus granulosus*'un biyolojisini, epidemiyolojisini, gelişmesini ve farklılaşmasını sağlayan mekanizmaları daha iyi anlayabilmek, yeni mücadele yolları, teşhiste daha kolay ve daha güvenilir yöntemler geliştirebilmek için in vitro kültür çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar son yıllarda özellikle antijen üretimi, aşı geliştirme, immunodiyagnoz, farklı kimyasal madde ve ilaçların etki mekanizmalarının analizleri üzerine yoğunlaşmaktadır. Pek çok çalışmada iyi bir model olarak kullanılabilen in vitro kültürde geliştirilmiş *Echinococcus granulosus* mikrokistleri sayesinde laboratuvar hayvanlarında 6 – 8 ay gibi uzun bir süre uygun sekonder kistlerin gelişmesi beklenmeden ve bu süre zarfında bir çok deney hayvanının da kaybedilmesi riskine girmeden bu çalışmalar rahatlıkla yapılabilecektir. Geliştirilen kistlerin model olarak kullanılabilmesi, mezbahadan arakonaklardan kist bulma zorluğunun da aşılmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmada konak baskısı olmaksızın kiste ait biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerin incelenmesi, antijen üretimi, immunodiyagnoz ve aşı geliştirme çalışmaları, patogenezde rol oynayan metabolizmaların incelenmesi, farklı kimyasal madde ve ilaçların etki mekanizmalarının analizleri gibi pek çok çalışmada kullanılabilecek mikrokistlerin in vitro kültürde gelişimi incelenmiş ve elde edilen mikrokistlerden antijen elde edilerek protein yapıları belirlenmiştir.

Çalışmalarım sırasında değerli öneri ve yardımlarıyla her zaman destek olan başta danışman hocam Prof. Dr. Ahmet DOĞANAY ve Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşe BURGU olmak üzere tüm Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, mesai arkadaşlarıma ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	Amonyum per sulfat
℃	Santigrat derece
CO_2	Karbondioksit
dH_2O	Distile su
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Miliamper
max	Maksimum
min	Minimum
ml	Mililitre
µm	Mikrometre
N	Normal
O_2	Oksijen
R^2	Tanımlayıcılık (Belirtme) katsayısı
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS – PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1. Erişkin *Echinococcus granulosus* (Orijinal) 4

Şekil 1.2. *Echinococcus granulosus* yumurtası 5

Şekil 1.3. Koyun karaciğerindeki hidatik kistler (Orijinal) 6

Şekil 1.4. Sonkonağın ince bağırsağındaki erişkin *Echinococcus granulosus*'lar 7

Şekil 1.5. *Echinococcus granulosus*'un biyolojisi 7

Şekil 1.6. Echinococcus granulosus onkosferlerinin in vitro kültüründe 10 gün içinde şekillenen değişiklikler 19

Şekil 1.7. *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin gelişimleri 20

Şekil 1.8. Koyun hidatik kistinden elde edilen çimlenme kapsülü 22

Şekil 1.9. *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin monofazik besiyerinde kültüre edilmeleriyle gelişen değişik formlar 24

Şekil 1.10. İn vitro kültürde invagine ve evagine formdaki protoskolekslerin mikrokiste dönüşümü 25

Şekil 1.11. *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin segmentasyona kadar geçirdiği evreler 27

Şekil 2.1. İn vitro kültüre hazırlık aşamaları 32

Şekil 2.2. a. Protoskolekslerin elde edildiği hidatik kistler
b. Germinal mebranın çıkarılabilmesi için makas yardımıyla kesilen kistler 33

Şekil 3.1. Pepsin solüsyonuyla muameleden önce protoskolekslerin durumu 40

Şekil 3.2. Pepsin solüsyonuyla muameleden sonra protoskolekslerin durumu 40

Şekil 3.3. Kültürün 1. gününde protoskoleks 41

Şekil 3.4. Kültürün 1. gününde protoskoleksler 41

Şekil 3.5. Kültürün 5. gününde veziküler (a) ve invagine (b) formdaki protoskoleksler 42

Şekil 3.6. Kültürde 5. – 15. günler arasında karşılaşılan formlar 43
Şekil 3.7. Kültürün 20. günü 43
Şekil 3.8. Kültürün 30. gününde lamina tabakasının da şekillendiği mikrokist 44
Şekil 3.9. Kültürün 30. gününde arka keseli invagine formdaki protoskoleks 44
Şekil 3.10. Kültürün 60. gününde mikrokist 45
Şekil 3.11. Mikrokiste dönüşmüş arka keseli (a) ve veziküler (b) formlar 46
Şekil 3.12. Mikrokiste dönüşmüş arka keseli formlar 47
Şekil 3.13. Kültürün 90. gününde mikrokist 48
Şekil 3.14. Kültürün 120. gününde mikrokist 48
Şekil 3.15. Kültürün 150. gününde mikrokist 49
Şekil 3.16. Normal morfolojisini kaybetmeye başlamış mikrokist 54
Şekil 3.17. Germinal membranı ufalmaya başlayan mikrokist 55
Şekil 3.18. Germinal membranı kistin merkezinde ufak bir alanı kaplayan, dejenere olmuş mikrokist 55
Şekil 3.19. SDS – PAGE yöntemiyle yapılan elektroforez sonuçları 56

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 1.1. *Echinococcus granulosus*'un köpeklerdeki yaygınlığı 9

Çizelge 1.2. 1993 – 2003 yılları arası Et-Balık Kurumunda kesimi yapılan büyükbaş hayvanlardaki (sığır – manda) kistik ekinokokozun yaygınlığı 10

Çizelge 1.3. 1993 – 2003 yılları arası Et - Balık Kurumunda kesimi yapılan küçükbaş hayvanlardaki (koyun – keçi) kistik ekinokokozun yaygınlığı 11

Çizelge 2.1. Hazırlanan pepsin solüsyonunun formülasyonu 34

Çizelge 2.2. Hazırlanan besiyerinin formülasyonu 34

Çizelge 2.3. Resolving ve Stacking Jelin formülasyonu 37

Çizelge 3.1. Veziküler yönde gelişen protoskolekslerin 1 – 30. günler arasında minumum, maksimum ve ortalama uzunlukları 45

Çizelge 3.2. Mikrokistlerin in vitro kültürde gelişiminin ortalama değerlere göre linear modelle gösterimi 50

Çizelge 3.3. Mikrokistlerin in vitro kültürde gelişiminin ortalama değerlere göre kuadratik modelle gösterimi 51

Çizelge 3.4. Mikrokistlerin in vitro kültürde gelişiminin ortalama değerlere göre kübik modelle gösterimi 52

Çizelge 3.5. İn vitro kültürde gelişen mikrokistlerin aylara göre minimum, maksimum ve ortalama çaplarının box – plot grafiğiyle gösterimi 53

Çizelge 3.6. İn vitro kültürde gelişen mikrokistlerin minimum, maksimum ve ortalama ($\overline{X} \pm S_{\overline{x}}$)çapları (µm) 54

1. GİRİŞ

Hidatidozis, *Echinococcus* cinsine bağlı türlerin larva formlarının meydana getirdiği, insan ve hayvan sağlığını ve ekonomiyi yakından ilgilendiren, zoonoz özellikte önemli bir paraziter hastalıktır (Tiğin ve ark., 1991; Morris ve Richards, 1992; Cross, 1994).

1.1. Tarihçe

Echinococcosis hakkındaki ilk bilgiler Hippocrates'in (M.Ö. 460 – 347) sığır ve domuzda hidatik kistin varlığını bildirmesi ve insan karaciğerinde saptadığı hidatik kisti su kesesi olarak tanımlamasıyla elde edilmiştir. Aristoteles (M.Ö. 384 – 322), Aretaeus (M.Ö. 50 – 150) ve Galenus (129 – 200)'da karaciğer ve akciğerde su dolu keselerin varlığını bildirmişlerdir. 1684'de Redi, 1685'de Hartman ve 1691'de Tyson hidatik kistin zoonoz karakterde olduğunu kaydetmişlerdir. Parazitin erişkin formunun ise ilk kez 1694 yılında Hartmann tarafından köpeklerde görüldüğü kabul edilmektedir. 1760'da hidatik kistlerin parazit özelliğini bildiren Palas, 1766'da da insanda ve hayvanlarda rastlanan hidatik kistlerin aralarındaki yapısal benzerlik üzerinde durmuştur. 1780'de Goeze hidatik kistteki skolekslerle Echinococcus'un skoleksinin varlığını saptamış ve bunlarla coenurus skolekslerinin ayrımını yapmıştır. 1786 da Batsch köpeğin bağırsağında bulunan ufak şerit ile hayvanların ve insanların değişik organlarında bulunan hidatik kistlerin aynı parazit türünün ayrı birer gelişim aşamaları olduğunu ilk kez bildirmiş ve buna *Hydatigena granulosa* adını vermiştir. 1790'da Gemelin paraziti *Taenia granulosa* olarak adlandırmıştır. 1801'de Echinococcus cinsinin özelliklerini ilk defa tarif eden Rudolphi, hidatik kiste Echinococcus adını vermiştir. Rudolphi 1808'de köpek bağırsağında bulduğu erişkin şeritin yapısal özelliklerini incelemiş, bu şeritlerin varlığını o zamanlar yaygın bir görüş olan bağırsak villilerinden oluştuğu kuramı ile

açıklamaya çalışarak şerite *Taenia cateniformis* adını vermiştir. 1821'de Bremser insan hidatik kistlerinde protoskolekslerin varlığını göstermiştir. 1852 de ise Von Siebold köpekteki şerit biçimi ile kasaplık hayvanlardaki kist formu arasında biyolojik ilişki olduğunu deneysel enfeksiyonla ispatlamıştır. 1855'de Küchenmeister insanlardaki kistleri *Echinococcus altriciparien*s, hayvanlardaki kistleri ise *Echinococcus scoleciparien*s olarak adlandırmıştır. 1863'de Naunin, Krabe, Diesing ve 1885'de de Thomas farklı ülkelerde insan hidatik kistinden aldıkları protoskoleksleri köpeklere vererek ince bağırsaklarında erişkin ekinokokların geliştiğini saptamışlar, böylelikle de şerit ve larva formunun ayrı birer tür olmadıkları, belirli bir türün iki ayrı gelişim evresi olduğu ispatlanmıştır. 1863 yılında Leuckart petek benzeri yapı gösteren kistlerin *Echinococcus granulosus*'un varyetesi olduğunu ileri sürmüş ve bunu *Taenia echinococcus multilocularis* olarak adlandırmış, Kleman ise 1883 yılında bu parazite *Echinococcus alveolaris* adını vermiştir. Brumpt ve Joyeux Brezilya'da buldukları bir türü *Echinococcus cruzi* olarak adlandırmış, Diesing ise bu türün *Taenia oligarthra* olduğunu ileri sürmüştür. Bu tür Lüke tarafından 1910 yılında *Echinococcus oligarthus* olarak adlandırılmıştır. 1938'de Nikiforov *Echinococcus multilocularis*'in gelişmesinde arakonak kemiricilerin rolünü açıklamıştır. Vogel 1955'de kırmızı tilkilerin ince bağırsağından topladığı ekinokokları farelere vererek alveolar kistlerin geliştiğini gözlemlemiş, bu kistleri köpeklere yedirdikten 55 gün sonra da topladığı erişkin parazitleri inceleyerek *Echinococcus multilocularis* ile *Echinococcus sibiricensis*'in aynı tür olduğunu açıklamıştır. Smyth erişkin parazitlerin skoleksleri ile kistlerden elde ettiği skolekslerin yapı ve büyüklüklerinin birbirinden farklı olduğunu belitmiş, kistten elde ettiği skoleksleri protoskoleks olarak adlandırmıştır. Sweatman ve Williams 1962–63 yıllarında yaptıkları çalışmalarla ekinokokları morfolojik karakterlerine göre ayırarak *Echinococcus granulosus*'un dört alt türü olduğunu bildirmiş ve bunları *Echinococcus granulosus granulosus*, *E.g.borealis*, *E.g.canadensis* ve *E.g.equinus* olarak adlandırmışlardır. Rausch ve Bernstein tarafından 1972'de *Echinococcus vogeli* olarak isimlendirilen tür bir çalı köpeğinde bulunmuştur (Merdivenci,

1976; Merdivenci ve Aydınlıoğlu, 1982; Tiğin ve ark., 1991; Morris ve Richards, 1992; Cross, 1994; Tınar, 2004).

1.2. *Echinococcus granulosus*'un Taksonomisi

Echinococcus cinsine bağlı pek çok tür bildirilmiş ise de bugün Echinococcus cinsine bağlı *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786), *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1863), *Echinococcus oligarthus* (Diesing, 1863) ve *Echinococcus vogeli* (Rausch ve Bernstein, 1972) olmak üzere 4 türün geçerliliği kabul edilmektedir. Bu türlerden en yaygın ve en önemli olan, aynı zamanda ilk bildirilen tür *Echinococcus granulosus'*dur (Soulsby, 1982). *E. multilocularis* kuzey yarımkürede sınırlı bir alanda yaygınlık göstermekte, *E. vogeli* ve *E. oligarthrus* ise sadece Orta ve Kuzey Amerika'da görülmektedir (Morris ve Richards, 1992).

Echinococcus granulosus'un taksonomideki yeri aşağıdaki gibidir (Soulsby, 1982; Tiğin ve ark., 1991; Tenter ve Schnieder, 2006).

Ülkealtı : *Metazoa*
Kök : *Platyhelminthes*
Sınıf : *Cestoda*
Sınıfaltı : *Eucestoda*
Takım : *Cyclophyllidea*
Takımaltı : *Cyclophyllidina*
Familyaüstü : *Taenioidea*
Familya : *Taenidae*
Cins : *Echinococcus* (Rudolphi, 1801)
Tür : *Echinococcus granulos*us (Batsch, 1786)

1.3. *Echinococcus granulosus*'un Morfolojisi

Olgun *Echinococcus granulosus* 2 – 7 mm uzunluğunda olup, biri genç, biri olgun, biri de gebe olmak üzere 3 halkadan oluşur (Şekil 1.1). Rostellumda iki sıra halinde dizilmiş 30 – 60 çengele sahiptir. Ön sıradaki büyük çengeller 32 – 42 µm, arka sıradaki küçük çengeller de 20 – 36 µm uzunluğundadır. Skolekste 4 çekmen bulunur. Son halkanın uzunluğu genellikle parazitin tüm uzunluğunun yarısından daha fazladır. Genital delik tek taraflı olarak halkanın daha çok arka yarısında, seyrek olarak da ortasına yakın yer alır. Uterus çok iyi gelişmiş olup, yanlara değişik sayıda kısa, kör dallar verir. Olgun halkalarda dişi dölerme organları halkanın arka üçte birinde bulunur. Böbrek biçiminde olan ovaryum halkanın ortasında yer alırken, sayıları genellikle 40 – 60 arasında değişen testisler genital deliğin ön ve arka kısmında (daha çok önde) bulunurlar (Yamaguti, 1959; Lapage,1968; Thomas, 1974; Dunn, 1978; Güralp, 1981; Soulsby, 1982; Tiğin ve ark., 1991; Cross, 1994).



Şekil 1.1. Erişkin *Echinococcus granulosus* (Orijinal).

Parazitin yumurtaları, Taenidae familyasındaki diğer türlerin yumurtalarına benzemekte olup ayrımları kesin olarak yapılamamaktadır. Hafif oval olan yumurtalar 32 – 36 x 25 – 30 µm ölçülerindedir (Şekil 1.2). Yumurtanın onkosferi 3 çift çengel taşımakta, onkosferi radial çizgili kalın bir embriyofor çevrelemektedir. Yumurtanın kapsülü oldukça ince olup uterus içinde parçalanmaktadır (Güralp, 1981; Schantz, 1982; Soulsby, 1982).



Şekil 1.2. *Echinococcus granulosus* yumurtası (http://cal.vet.upenn.edu/paraav/images/ 11-50.jpg).

Echinococcus granulosus' un hidatik kist ya da Ekinokok kisti olarak adlandırılan larvaları uniloküler (=univeziküler) veya multikistik (=multiveziküler) yapıda olabilirler. Uniloküler kistler tek tek yerleşim gösteren büyükçe keselerdir. Multikistik formdaki kistler ise birbirlerine yapışık çok sayıda bağımsız kistlerden oluşur (Smyth, 1976; Güralp, 1981; Soulsby, 1982; Şenlik ve Diker, 2004). Kistler yerleştikleri organın dokusal özelliğine göre genellikle fındıktan portakal iriliğine kadar değişik büyüklüklerde olabilmektedir (Şekil 1.3). Nadiren de olsa kist çapı 50 cm'ye kadar ulaşabilmekte ve içlerinde 16 litre kadar kist sıvısı toplanabilmektedir.

İçi sıvı ile dolu kese şeklindeki bu larva formu kütiküla (laminar membran) ile çevrilmiştir, bunun altında tomurcuklanma özelliğine sahip doğurucu bir zar olan germinal membran bulunur. Kistin dışını konak

tarafından şekillendirilen fibröz kapsül sarar. Kist sıvısı akıcı ve berrak bir yapıdadır. Hidatik kist serbest protoskoleksleri, çimlenme kapsüllerini ve kız keseleri içerebilir. Çimlenme kapsülleri germinal tabakayla çevrili ve içinde protoskoleksler de bulundurabilen bir yapıdadır. Laminar tabaka, çimlenme kapsülü ve protoskoleksleri içeren kız keseler ise ana kistin birer kopyasıdırlar. Bazen kız keseler endojen büyümeyle ana kistin içinde ya da ekzojen büyümeyle ana kistin dışında da gelişebilirler. Ekzojen büyümeyle vücutta yeni hidatik kistler şekillenir (Smyth, 1976; Güralp, 1982; Soulsby, 1982; Tınar ve Coşkun, 1991; Morris ve Richards, 1992; Urquhart ve ark., 1996).

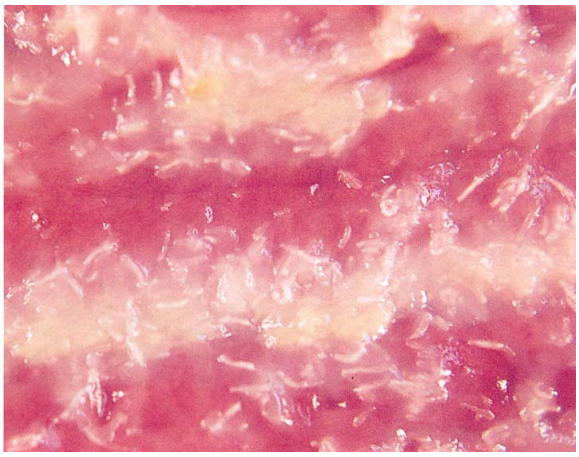


Şekil 1.3. Koyun karaciğerindeki hidatik kistler (Orijinal).

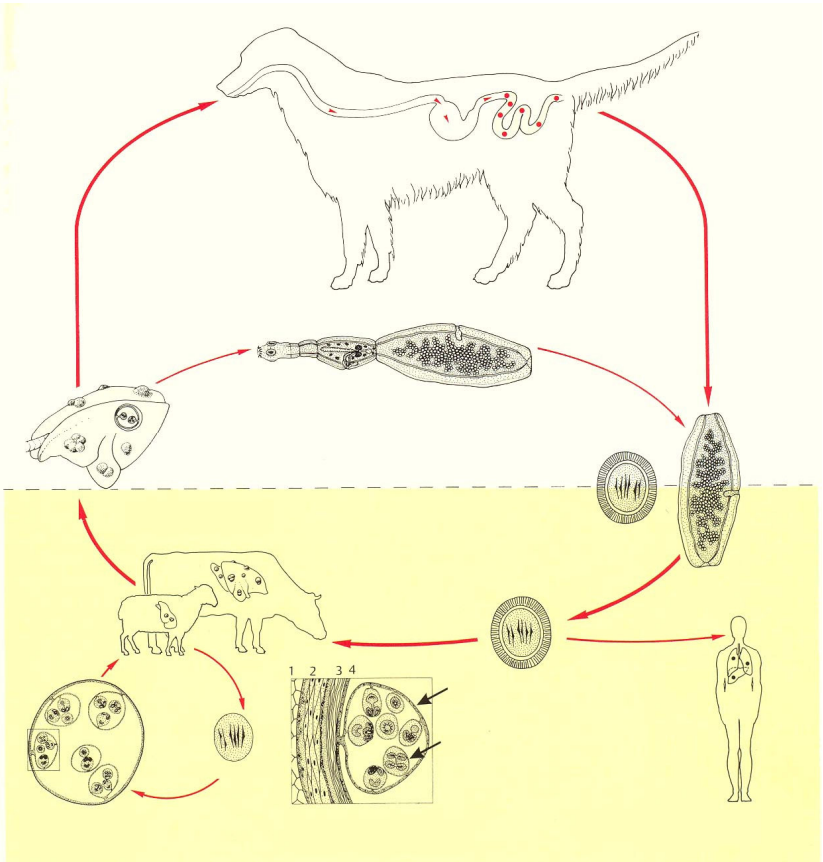
1.4. *Echinococcus granulosus*'un Biyolojisi

Echinococcus granulosus'un erişkinleri son konakların ince bağırsaklarında bulunur (Şekil 1.4). Uygun son konaklar, başta evcil köpekler olmak üzere kurt, çakal, dingo, coyote, tilki gibi çeşitli karnivorlardır. Parazitin larva formu olan kist hidatik ise başta evcil geviş getirenler ve tek tırnaklılar gibi otlayan hayvanlar olmak üzere domuz, deve, geyik, primatlar gibi pek çok evcil ve vahşi havyanda ve bu arada insanda da gelişebilmektedir. Bu kistler canlılarda başta karaciğer, akciğer olmak üzere beyin, omurilik, dalak, böbrek, kemik iliği ve kasları da içeren geniş bir organ ve doku grubuna

yerleşebilmektedir (Dunn, 1978; Güralp, 1981; Soulsby, 1982; Tiğin ve ark., 1991; Roberts ve Janovy, 2006).



Şekil 1.4. Sonkonağın ince bağırsağındaki erişkin *Echinococcus granulosus*'lar (Eckert ve ark., 2005).



Şekil 1.5. *Echinococcus granulosus*'un biyolojisi (Eckert ve ark., 2005).

Arakonaklar enfeksiyona erişkin parazitin, gebe halkaları ile dışarı çıkan yumurtalarını ağız yoluyla alarak yakalanırlar. Evcil ve yabani arakonak hayvanlar yumurtaları otlaklarda, ahırda yemlenme sırasında ya da nadiren de içme suyu ile, ayrıca kıllarına yumurta yapışmış köpekle temas ederek alırlar. İnsanlar ise enfeksiyonu yumurtalarla bulaşık sebze ve meyveleri iyi yıkanmadan yemek suretiyle, içme suyu ile ve sıklıkla da enfekte köpeğe temas sonucu yumurtalarla bulaşan ellerini iyice yıkamadan ağıza götürmek suretiyle alırlar. Nadiren de olsa solunum yoluyla havadaki tozlarla birlikte alınan yumurtaların akciğerlere tutunarak gelişebildikleri kaydedilmiştir (Merdivenci ve Aydınoğlu, 1982; Doğanay ve Kara, 1998; Şenlik, 2004).

Arakonakların sindirim sisteminde yumurtadan çıkan ve kan dolaşımına karışan onkosfer ilk olarak kapillar ağın zengin olduğu karaciğer ve akciğerde tutunmakta, buralarda tutunamayıp sistemik dolaşıma karışan onkosferler ise merkezi sinir sistemi, böbrek, pankreas, kemik doku gibi pek çok organ ve dokuda tutunabilmektedir. Evcil ruminantlarda hidatik kistlerin % 70'i karaciğerde, % 25'i akciğerlerde, % 5'i ise diğer organ ve dokularda görülmüştür (Güralp, 1981). Hidatik kistler oldukça yavaş büyümekte ve 5. aydan sonra içlerinde protoskoleksler, çimlenme kapsülleri ve kız keseler şekillenmektedir (Dunn, 1978, Güralp, 1981, Soulsby, 1982).

Son konaklar protoskoleks taşıyan kist hidatikli organları ağız yoluyla alarak enfeksiyona yakalanırlar. Kistlerdeki protoskoleksler ince bağırsakta tutunarak erişkin ekinokokları şekillendirirler. Köpekteki prepatent süre 9 hafta civarındadır (Dunn, 1978; Güralp, 1981; Soulsby, 1982).

1.5. Türkiye'de *Echinococcus granulosus*'un Yaygınlığı

Ekinokokoz Türkiye'de geniş bir yayılış göstermekte olup, parazitin epidemiyolojisinde genel olarak köpek - koyun biyolojik siklusu görülmektedir.

1.5.1. Türkiye'de *Echinococcus granulosus*'un Sonkonaklardaki Yaygınlığı

Türkiye'de yapılan çeşitli araştırmalarda *E.granulosus*'un köpeklerdeki yaygınlığı % 0,4 – 54,5 arasında bildirilmiştir. Çizelge 1.1'de 1959 ile 1998 yılları arasında yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar verilmiştir (Mimioğlu ve ark., 1959; Doğanay, 1983; Üner, 1989; Saygı ve ark., 1990; Zeybek ve Tokay, 1990; Hasslinger ve ark., 1993; Şahin ve ark., 1993; Ataş ve ark., 1997; Aydenizöz, 1997; Umur ve Arslan, 1998; Ayçiçek ve ark., 1998)

Çizelge 1.1. *Echinococcus granulosus*'un köpeklerdeki yaygınlığı

Yıl	Araştırıcı	Yer	Enfeksiyon % 'si
1959	Mimioğlu ve ark.	Ankara	4
1981 - 1982	Doğanay	Ankara	44
1989	Üner	İzmir	5,5
1990	Saygı ve ark.	Sivas	16
1990	Zeybek ve Tokay	Ankara	54,5
1993	Hasslinger ve ark.	Ankara	3,3
1993	Şahin ve ark	Kayseri	25
1997	Ataş ve ark.	Sivas	28
1997	Aydenizöz	Konya	28,33
1998	Umur ve Arslan	Kars	40,5
1998	Ayçiçek ve ark.	Ankara	0,94

1.5.2. Türkiye'de Hidatidozis'in Arakonaklardaki Yaygınlığı

Hidatidozun evcil kasaplık hayvanlardaki yaygınlığı 1989 – 2004 yılları arasında çeşitli araştırıcılar tarafından %1 – 81 arasında değişik oranlarda bildirilmiştir (Toparlak ve Gül, 1989; Celep ve ark., 1990; Öge ve ark., 1990;

Özçelik ve Saygı, 1990; Zeybek ve Tokay, 1990; Dik ve ark., 1992; Türkmen, 1992; Umur ve Arslantaş, 1993; Çivi ve ark., 1995; Aslan ve Umur, 1997; Dik ve ark., 1999; Hökelek, 1999; Özbek, 1999; Tuğrul, 1999; Şenlik, 2000; Daldal, 2001; Değer ve ark., 2001; Esatgil, 2001; Hökelek, 2001; Kaplan ve ark., 2001; Özcan, 2001; Tuğrul, 2001; Yılmaz ve Çiçek, 2001; Umur, 2003; Gıcık ve ark., 2004).

Türkiye Cumhuriyeti Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü (1993 – 2003 yılları arası) kayıtlarına göre Türkiye'nin çeşitli yörelerinden getirilen kasaplık hayvanlardaki kist hidatik yaygınlığı ise % 0,9 – 7,27 arasında değişmektedir (EBK istatistikleri). Yıllara göre muayene edilen hayvan sayısı, enfekte hayvan sayısı ve enfeksiyon yüzdeleri Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. 1993 – 2003 yılları arası Et-Balık Kurumunda kesimi yapılan büyükbaş hayvanlardaki (sığır – manda) kistik ekinokokozun yaygınlığı

YILLAR	Muayene Edilen Hayvan Sayısı	Kist Hidatikli Hayvan Sayısı	%
1993	321771	14328	4,45
1994	304303	9435	3,1
1995	148228	2266	1,52
1996	124777	2121	1,71
1997	151115	5050	3,34
1998	160919	4798	2,98
1999	137932	3793	2,74
2000	65752	1566	2,38
2001	113066	1534	1,35
2002	166010	10028	6,04
2003	94682	3413	3,6

Çizelge 1.3. 1993 – 2003 yılları arası Et - Balık Kurumunda kesimi yapılan küçükbaş hayvanlardaki (koyun – keçi) kistik ekinokokozun yaygınlığı.

YILLAR	Muayene Edilen Hayvan Sayısı	Kist Hidatikli Hayvan Sayısı	%
1993	1142372	47252	4,13
1994	932811	36406	3,9
1995	757828	6850	0,9
1996	375684	6983	1,85
1997	363193	8961	2,46
1998	527764	9501	1,8
1999	95641	6796	7,1
2000	67625	620	0,91
2001	28958	753	2,6
2002	6464	47	0,72
2003	12764	928	7,27

1.6. Helmintlerin İn Vitro Kültürü Hakkında Genel Bilgiler

Konağın sunduğu fiziksel ve kimyasal şartların oluşturulduğu, gereksinim duyulan besin maddelerinin dış ortamdan sağlandığı, canlıdakine benzer yapay ortamlarda bakteri, virus ve parazit gibi canlıların korunması ve geliştirilmesine “in vitro kültür” denmektedir (Tiğin ve Umur, 1989).

Helmintlerin in vitro kültürü; rutin koruma çalışmalarında, konak kullanmadan larva dönemlerinin ve erişkin parazitlerin elde edilmeye çalışılmasında, konak baskısı olmaksızın parazit gelişim dönemlerine ait biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerin incelenmesinde, antijen üretimi, immunodiyagnoz ve aşı geliştirme çalışmalarında, patogenezde rol oynayan metabolizmaların incelenmesinde, farklı kimyasal madde ve ilaçların etki mekanizmalarının analizlerinde kullanılmaktadır (Tiğin ve Umur, 1989; Smyth, 1990; Altıntaş,1991a; Casado ve ark., 1996; Yoneva ve Mızınska-Boevska, 2001; Ertabaklar ve Altıntaş, 2002a; Öge ve ark.,2004).

Pek çok helmint türünün in vitro kültürde tüm yaşam döngülerini tamamlamaları tam olarak başarılamamakla birlikte son yıllarda oldukça dikkate değer ilerlemeler kaydedilmiştir. Çalışmaların çoğu insanların ve evcil hayvanların medikal ve ekonomik öneme sahip helmintleri üzerine yoğunlaşsa da önemli olan nokta herhangi bir helmint cinsiyle yapılan başarılı bir tekniğin diğer cinslere de birtakım değişikliklerle rahatlıkla uygulanabilmesidir. Buna örnek olarak kanatlı şeritlerinden, ekonomik veya medikal bir önemi olmayan, in vitro kültürde olgunlaştırılıp fertil yumurtalar üretmesi sağlanan ilk cestod *Schistocephalus solidus* verilebilir. Bu parazit türüyle elde edilen deneyimle daha sonra zoonotik öneme sahip olan *Echinococcus granulosus* gibi pek çok cestod türünün başarılı in vitro kültürü yapılmıştır (Smyth, 1990).

Helmintlerin kültüründe oldukça başarılı sonuçlar elde edilmekle birlikte karşılaşılan problemler de çoktur. Bunlardan en önemlisi çok hücreli olan helmintlerin büyük çoğunluğunun kompleks yaşam döngüsüne ve karışık biyolojiye sahip olmasıdır. Bazı türlerin bir, bazı türlerin birden fazla arakonak kullanmaları, dolayısıyla her gelişme dönemlerinde farklı fiziko – kimyasal çevrelerde bulunmaları ve buna bağlı olarak da gereksinim duydukları besin maddelerinin değişmesi tek hücrelilerin kültüründe gözlenmeyen pek çok problemin helmintlerin kültüründe ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Helmintler bağırsak, akciğer, karaciğer, safra kanalları, dolaşım sistemi gibi birbirlerinden oldukça farklı organ ve dokulara yerleşmekte, bunun sonucunda da besin olarak bağırsak içeriği, kan, safra, mukus, doku, hücre, sekret gibi yine birbirinden oldukça farklı maddelerle beslenmektedirler. Bütün bu koşullar göz önünde bulundurulduğunda helmintlerin kültüründe, besiyerinin parazitin nutrisyonel gereksinimleri karşılamasının önemi daha iyi anlaşılmaktadır (Smyth, 1981; Smyth, 1990).

1.7. Cestodlarda İn Vitro Kültivasyon ve Karşılaşılan Temel Problemler

İn vitro kültürde tüm yaşam döngüsünün tamamlandığı ilk cestod *Hymenolepis diminuta* olmuş ve bu parazit ile yapılan çalışmalar in vitro kültür tekniklerinin geliştirilmesinde bir dönüm noktası olmuştur (Berntzen, 1961; Schiller, 1965; Voge, 1975). Son yıllarda cestodların in vitro kültüründe oldukça önemli ilerlemeler sağlanmış, pek çok tür olgunlaştırılmış ya da olguna yakın bir forma getirilmiş, bazılarının ise *Hymenolepis diminuta* örneğinde olduğu gibi tüm yaşam döngüsünü in vitro kültürde tamamlaması başarılmıştır (Smyth, 1981; Smyth, 1990).

Cestodların in vitro kültüründe de diğer helmintlerde olduğu gibi çeşitli problemlerle karşılaşılmaktadır. Bu problemlerin pek çoğu trematod ve nematodlarla ortak olmasına rağmen bazıları sadece cestodlara özgüdür (Smyth, 1990).

Genel problemler: Karşılaşılan sorunlardan en önemlisi cestodların sindirim kanalına sahip olmaması, besinlerin tegümentten absorbsiyonla alınması ve yine tegüment yoluyla atık maddelerin dışarıya çıkarılmasıdır. Bu da kullanılacak besiyerinin mutlaka tegümentten absorbsiyonla geçebilecek bir formda olmasını gerektirmektedir. Omurgalıların mikroflora bakımından oldukça zengin ince bağırsaklarında yaşayan erişkin cestodların in vitro kültür için steril bir şekilde elde edilememeleri de yaşanan sorunlardan birisidir. Gentamycin, penicillin, streptomycin gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin in vitro kültürde kullanılmaları bu sorunu büyük ölçüde ortadan kaldırsa da in vitro kültürde başlangıç materyali olarak arakonaklardan steril bir şekilde elde edilen larva dönemlerinin kullanılması daha başarılı sonuçların alınmasını sağlamaktadır. Bu yaklaşım *Echinococcus* gibi pek çok cinsin in vitro kültüründe başarıyla kullanılmaktadır (Smyth, 1990).

Fizyo – kimyasal koşullar: İn vitro kültürde parazitin ihtiyaç duyduğu, uygun pH, O_2, CO_2, amino asit ve karbonhidrat seviyeleri, sıcaklık, osmotik basınç

ve iyonların konsantrasyonu gibi fizyo – kimyasal koşullarında tam olarak sağlanması gerekir. Pek çok parazit için bu bilgilerin tam olarak bilinmemesi yaşanan sıkıntılardan birisidir (Smyth, 1990).

Besinsel gereksinimler: Cestodların konaklardan karşıladıkları nutrisyonel materyal karışık bir kompozisyona sahip olup, besiyeriyle karşılamak da güçtür. Bazı türler oldukça özel besinsel gereksinimlere ihtiyaç duyarlar. Bazen aynı konakta, hatta aynı organda yaşayan cestodların bile gereksinimleri farklı olabilmektedir. Buna köpeklerin ince bağırsaklarında yaşayan *Echinococcus granulosus* en güzel örnektir. Koyun orijinli protoskolekslerle in vitro kültür başarıyla yapılırken, at orijinli protoskolekslerle başarılı sonuçlar alınamamaktadır. Bu durum, aynı parazite ait iki farklı izolatın bile değişik besinsel gereksinimlere ihtiyacı olabileceğini gösterir (Smyth, 1990).

Metabolik atıkların uzaklaştırılması: Erişkin ya da larva cestodların metabolik atıklarının uzaklaşması, konaklarda vücut sıvılarının doğal sirkulasyonuyla karşılanmaktadır. İn vitro kültür koşullarında toksik metabolik atıkların, besiyerinin yenilenmesiyle ve yenilenme sıklıklarının ayarlanmasıyla uzaklaştırılması gerekmektedir (Smyth, 1990).

Farklılaşmayı sağlayan tetikleyiciler: Cestodların in vitro kültüründe karşılaşılan bir diğer problem farklılaşmayı sağlayacak uyarımların varlığıdır. Cestodlar sonkonak ve arakonak olarak farklı canlıları kullanan, farklı larva dönemlerinin birbirini takip edebildiği oldukça karışık yaşam döngülerine sahiptir. Bir larva döneminden diğerine geçerken ya da larva döneminden erişkin forma dönerken bu farklılaşmayı sağlayacak ısı, bağırsaktaki safra konsantrasyonu gibi özel tetikleyicilere ihtiyaç duymaktadırlar. Başarılı in vitro kültür için bu tetikleyicilerin de sağlanması gerekmektedir (Smyth, 1990).

1.6.1. *Echinococcus granulosus*'un İn Vitro Kültürünün Tarihçesi

Echinococcus cinsine bağlı parazitler, özellikle de tüm dünyada en yaygın tür olan *Echinococcus granulosus,* insanlarda ve hayvanlarda sağlık ve ekonomik açıdan pek çok soruna yol açarak, zoonoz karakterdeki hidatidoz hastalığına neden olmaktadır. Bu hastalığa neden olan parazitlerin biyolojisini, epidemiyolojisini, gelişmesini, farklılaşmasını sağlayan mekanizmaları daha iyi anlayabilmek ve yeni mücadele yolları, teşhiste daha kolay, daha güvenilir yöntemler geliştirebilmek için uzun yıllardan beri in vitro kültür çalışmaları yapılmaktadır.

Echinococcus granulosus'un in vitro kültürü ile ilgili ilk çalışmalar 1925 yılında başlamış, bu yıllarda kistleri korumaya yönelik olarak koyun karaciğerinden elde edilen kist sıvısı, karaciğer ekstratı ile koyun, sığır gibi hayvanlara ait serum içeren ortamlar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda 1960'lı yıllara kadar önemli bir başarı sağlanamamış, takip eden yıllarda protoskolekslerin in vitro ortamda olgunlaşması ya da kistik hale dönüşmesinde evaginasyonun önemi anlaşıldıktan sonra gerçek anlamda başarılı çalışmalar ortaya çıkarılmıştır (Tiğin ve Umur,1989).

1960'lı yıllarda Smyth (1981), koyun orijinli protoskolekslerle yaptığı *Echinococcus* kültürleriyle oldukça başarılı sonuçlar almıştır. 1960'lı yıllardan bugüne in vitro kültür tekniğinde oldukça önemli modifikasyonlar yapılmış ve bu değişiklikler çok başarılı sonuçların alınmasını sağlamıştır (Tiğin ve Umur,1989).

Bu konuda geçmişten günümüze yapılan belli başlı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir;

a) Onkosferden kistik larvaya dönüşüm;

- Heath ve Smyth (1970), *Echinococcus granulosus*'la birlikte *Taenia*

hydatigena, *T.ovis*, *T.pisiformis* ve *T.serialis*'in de onkosferlerini in vitro kültür ortamında geliştirerek kistik forma dönüşümlerini,

- Heath ve Lawrence (1976) onkosferlerden immatür hidatik kistler elde etmeye yönelik in vitro kültür ve onkosferlerin değişimlerini,
- Heath ve Lawrence (1981) immunize edilmiş koyun serumlarının, onkosferden kist gelişimine olan etkilerini,
- Holcman ve ark. (1994) *Echinococcus granulosus* onkosferlerini kültüre ederek onkosferler ile erken dönem metacestodların ultrasütrüktürel yapılarını incelemişlerdir.

b) Protoskoleksten kistik larvaya dönüşüm;

- Smyth (1962) protoskolekslerin kültürde kistik yönde gelişimini,
- Heath ve Osborn (1976) kistik yönde gelişimde laminar membranın gelişimini,
- Rogan ve Sylvia Richards (1986) tek tırnaklı kökenli protoskolekslerin kistik yönde gelişimini,
- Casado ve Rodriguez-Caaberio (1989) in vitro kültürde geliştirilen kistlerin ultrastrüktürel yapılarını,
- Casado ve ark. (1992) kültürü takiben kistlerin farelerdeki canlılıklarını,
- Casado ve ark. (1996) in vitro kültürde geliştirilen kistlere bazı ilaç etken maddelerinin etkilerini,
- Ponce Gordo ve Cuesta Bandera (1997) insan enfeksiyonlarının kaynağının belirlenmesini,
- Zhang ve ark. (2005) *E.granulosus* protoskolekslerinin sekonder hidatidos oluşturulmak üzere farelere verilmeden önce bir süre in vitro kültürde geliştirilmelerinin kistlerin gelişimine ve canlılığına olan etkilerini, incelemek amacıyla in vitro kültürde çeşitli çalışmalar yapmışlardır.

c) Protoskoleksten strobilar yönde gelişim;

- Smyth (1967) *E.granulosus* protoskolekslerinin strobilar gelişimini,
- Smyth (1971) *E.granulosus* protoskolekslerinden in vitro kültürde monozoik formların gelişimini,
- Smyth ve Davies (1974a) koyun ve at orijinli hidatik kistlerden elde edilen protoskolekslerin in vitro kültürüyle geliştirilen *E.granulosus* fizyolojik türlerini,
- Kumaratilake ve ark. (1983) Avustralya'nın değişik coğrafi bölgelerinden elde edilen koyun orijinli *E.granulosus*'ların karşılaştırmalı strobilar gelişimini,
- Macpherson ve Smyth (1985) Kenya'dan elde edilen insan, deve, sığır, koyun ve keçi orijinli protoskolekslerle, Hindistan'dan elde edilen bufalo orijinli protoskolekslerin in vitro kültürde strobilar gelişimini,
- Hijjawi ve ark. (1992) Ürdün'de koyun ve eşek orijinli *E.granulosus*'ların strobilar dönemlerinin geliştirilmesini incelemek amacıyla in vitro kültürde çeşitli çalışmalar yapmışlardır.

Türkiye'de ise *Echinococcus granulosus*'un in vitro larval gelişimiyle ilgili ilk çalışma 2002 yılında Ertabaklar ve Altıntaş (Ertabaklar ve Altıntaş, 2002a) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar yine aynı yıl antelmentik ilaç etken maddesi olan albendazol ve mebendazolün in vitro kültürde geliştirilmiş kistler üzerine etkilerini araştırmışlardır (Ertabaklar ve Altıntaş, 2002b).

1.6.2. *Echinococcus granulosus*'da İn Vitro Kültür

Echinococcus granulosus'un in vitro kültürü enfekte köpeklerden elde edilebilecek yumurtalarla ya da enfekte arakonak hayvanlarda gelişen kist hidatiklerden elde edilebilecek protoskolekslerle yapılabilir. Yumurtaların in vitro kültüründe onkosforlerden mikrokistler geliştirilebilmekte, protoskolekslerin in vitro kültüründe ise aseksüel gelişimle (monofazik

besiyeri kullanarak) mikrokistler, seksüel gelişimle (difazik besiyeri kullanarak) ise infertil yumurtalar üreten olgun ekinokoklar geliştirilebilmektedir (Smyth, 1990).

Kistler hem steril materyalle çalışılmayı sağlaması, hem de bu formla çalışmanın daha güvenli olması nedeniyle tercih edilmektedir. Yumurtalardan yapılan kültürler ise enfekte köpekler, bu köpeklerin tutulacağı izolasyon odaları, atık filtreleme sistemleri, hava filtreleme sistemleri, duş odaları gibi masraflı yatırımlar gerektirdiğinden, ayrıca araştırıcı ve çevre için büyük risk taşıdığından fazla tercih edilmemektedir (Heath ve Lawrence, 1976).

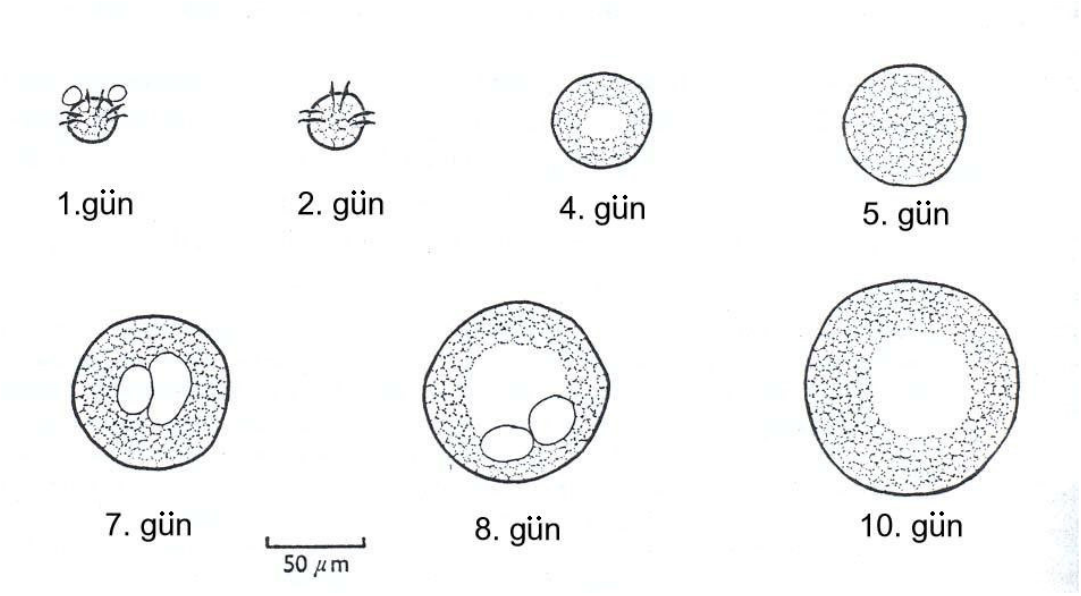
1.6.2.1. Onkosferlerin İn Vitro Kültürü

Yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı onkosferlerden in vitro kültürle gelişime yönelik çok az çalışma bulunmaktadır.

Heath ve Smyth (1970) onkosferleri in vitro kültürde 10 günden fazla tutmuş, bu süre içerisinde bir kese şekillenmiş ve organizmanın çapının 28µm 'den 120µm 'ye çıktığı gözlenmiştir (Şekil 1.6). Daha sonraki yıllarda Heath ve Lawrence'da (1976), in vitro olarak onkosferden kist gelişimini incelemişler, veziküler gelişimin 6. günden itibaren başladığı, 10. günden sonra laminal tabakanın şekillendiği bildirmişler ve 120 günlük in vitro kültür sonucunda 20 mm çapında kistler elde etmişlerdir. Holcman ve ark. (1994) in vitro kültürde inkube ettikleri onkosferlerin çapının 5. günde 52 µm'ye ulaştığını ve laminar tabakanın da gelişmeye başladığını bildirmişlerdir.

Onkosferlerin in vitro kültürünün bütün prosedürleri izolasyonlu bir odada çevreyi ve araştırıcıyı tehlikeye sokmadan yapılmalıdır. Toplanan yumurtaların onkosferleri gastrik (% 1 pepsin + % 1 HCl + % 0,85 NaCl, distile su içinde) ve intestinal (% 1 pankreatin + % 1 $NaHCO_3$ + % 5 koyun ya

da tavşan safrası, distile su içinde) solüsyonlarla aktive edilir ve kültür besiyeri doldurulmuş kültür şişelerine konur. Besiyeri olarak Parker 858, NCTC 135, RPMI 1640 ya da McCoy's 5A kullanılabilmektedir. Kültür besiyeri 3 – 4 günlük aralıklarla değiştirilir. Kültürde gaz faz olarak % 10 O_2 + % 5 CO_2 + % 85 N_2 kullanılır. Kistlerin çapları mikrometrik ölçüm yapabilen mikroskoplarla takip edilir (Heath ve Smyth, 1970; Heath ve Lawrence, 1976).

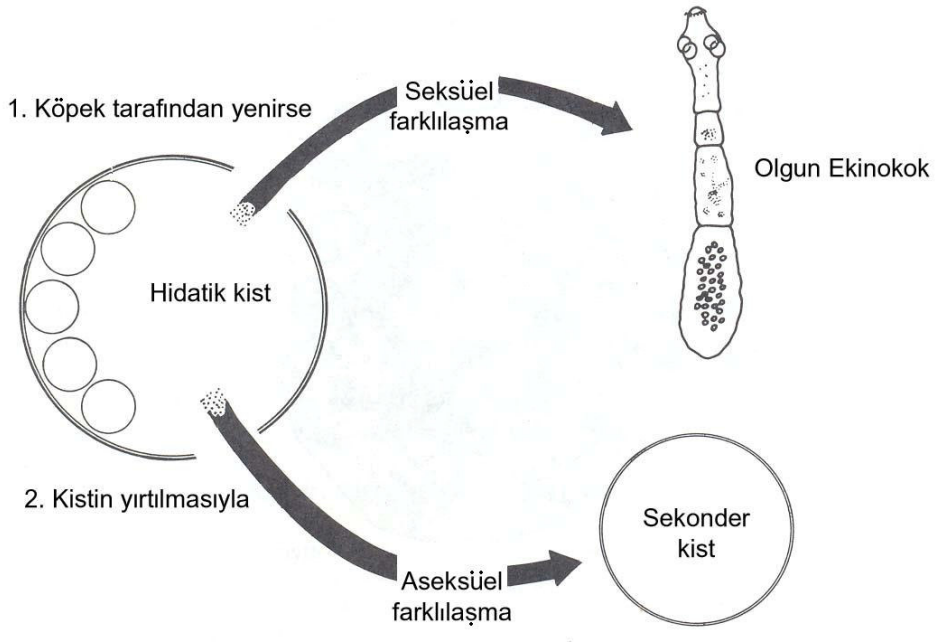


Şekil 1.6. Echinococcus granulosus onkosferlerinin in vitro kültüründe 10 gün içinde şekillenen değişiklikler. Çapı 27 µm.olan onkosferde 2. gün reorganizasyon başlamış, 4. gün bir boşluk şekillenmiş, 5. gün yeniden hücresel reorganizasyon başlamış, 7. gün iki büyük refraktil hücre şekillenmiş, 8. gün yeniden bir boşluk şekillenmiş ve 10. gün sonunda çapı 120 µm. olan minyatür kist şekillenmiştir (Heath ve Smyth, 1970).

1.6.2.2. Protoskolekslerin İn Vitro Kültürü

Doğada *Echinococcus granulosus* protoskoleksleri koşullara bağlı olarak iki farklı yönde değişime uğrarlar. Arakonaklarda bulunan kistlerin yırtılmalarıyla vücut boşluğunda serbest kalan protoskoleksler seroz dokulara yapışarak kistik yönde gelişim gösterirler ve sekonder hidatik kistleri şekillendirirler. Köpek tarafından alınan protoskoleksler ise sindirim sistemi ortamında

evagine olup, strobilar yönde gelişim göstererek erişkin şeritleri oluştururlar (Şekil 1.7) (Smyth ve Davies, 1974b).



Şekil 1.7. *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin gelişimleri (Smyth, 1990).

Echinococcus granulosus ile yapılan erken dönem in vitro kültür çalışmalarının neredeyse tamamı kistik yönde gelişmeyle sonuçlanmış ve strobila yönünde gelişimi kontrol eden doğal faktörlerin araştırılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır (Smyth, 1981). Protoskolekslerin moleküler düzeyde yapılarının araştırılmalarıyla ise kültür sonuçlarını etkileyecek oldukça önemli bulgular elde edilmiştir. Protoskolekslerin skoleks bölgesinde çok sayıda mikrotriks adı verilen dikensi yapılara rastlanmış, kalan vücut bölümünün ise PAS pozitif glikokaliks yapıda olduğu ortaya konmuştur. Evagine haldeki protoskoleks çekmenlerinin altındaki bölgede bulunan mikrotrikslerin PAS pozitif katmanla kaplı olmadığı belirlenmiş ve bu oluşumların besinlerin absorbsiyonuyla ilgili olduğu ortaya konmuştur. Mikrotrikslerin vücudun sadece ön kısmında bulunması nedeniyle protoskoleksler beslenebilmek için mutlaka evagine olmalı, böylece mikrotriksler açığa çıkmalı, açığa çıkan mikrotriksler de besin maddesiyle

temas etmelidir. Bu morfolojik incelemeler protoskoleksin strobilar gelişimi için mutlaka uygun bir katı besiyeriyle temas etmesi gerektiğini açığa çıkarmıştır (Smyth, 1967; Casado ve Rodriguez-Caabeiro, 1989).

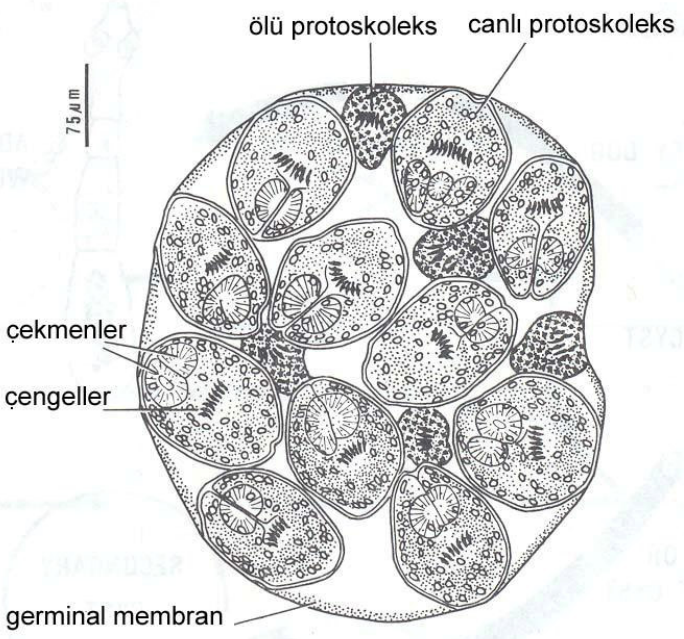
Protoskoleksler sadece sıvı faz içeren (monofazik) besiyerlerinde kültüre edilirlerse veziküler form, arka keseli formlar, daha sonra da laminar tabakanın oluşumuyla minyatür hidatik kistler şekillenir (Smyth ve Davies, 1974a; Heath ve Osborn, 1976; Smyth, 1981; Rogan ve Sylvia Richards, 1986; Casado ve Rodriguez-Caabeiro, 1989; Ponce Gordo ve Cuesta Bandera, 1997; Ertabaklar ve Altıntaş, 2002a). Protoskolekslerin in vitro kültürde difazik besiyerinde tutulmalarıyla ise infertil yumurtalar üreten olgun şeritler geliştirilmesi başarılmıştır (Smyth ve Davies,1974b). Geliştirilen yöntemlerin çoğunluğu birtakım modifikasyonlarla bugün de halen kullanılmaktadır.

Protoskolekslerin monofazik ya da difazik kültür ortamına konulmasına kadar izlenecek prosedür aynıdır. İn vitro kültürde kullanılacak hidatik kistler taze olarak elde edilmeli ve elde edilen kistler soğutucu dolaplarla vakit geçirilmeden laboratuvara ulaştırılmalıdır (Smyth ve Davies, 1974b; Smyth, 1990).

Açılacak kistin yüzeyi antiseptik bir solüsyonla temizlenir. Kiste steril bir şırınga yardımıyla girilir. Kist sıvısının %50'si çekilerek kadeh tarzı kaplara ya da ağzı vidalı kapaklı tüplere nakledilir. Daha sonra kist, üzerinden steril bir makas ya da bistüri yardımıyla açılarak çevre dokulardan ayrılır. Protoskolekslerin büyük çoğunluğu kistin dip kısmında çökmüş, taze kistlerde ise bazı protoskoleksler germinal membrana yapışık vaziyette bulunmaktadır. Tamamen çıkarılan kist membranı, kist sıvısı konulan kadehte yıkanarak içindeki protoskolekslerin kaba geçmesi sağlanır. Elde edilen protoskoleksler kendi hacminin on katı kist sıvısı içerecek şekilde ağzı vidalı kapaklı tüplere aktarılır. Tüpte bulunan çökmüş protoskolekslerin her ml.'sinin 10 – 12 kültür

hazırlanması için yeterli olduğu bildirilmektedir (Smyth ve Davies, 1974b; Smyth, 1990).

İn vitro kültürde kullanılmadan önce protoskolekslerin canlılıkları incelenmelidir. Hidatik kistler tamamen infertil kistlerden, içlerinde çok sayıda protoskoleks içeren kistlere kadar değişik varyasyonlar gösterirler. Genellikle çimlenme kapsülleri canlı protoskoleksler kadar ölü protoskoleksler de içerirler (Şekil 1.8). İyi kültürlerin hazırlanabilmesi için her bir çimlenme kapsülündeki protoskolekslerin en azından %60'ının canlı olması, sitoplazmalarının temiz olması ve alev hücrelerinin aktif olmasının gerektiği bildirilmektedir (Smyth ve Davies, 1974b; Smyth, 1990).



Şekil 1.8. Koyun hidatik kistinden elde edilen çimlenme kapsülü (Smyth, 1990).

Protoskoleksler in vitro olarak kültüre edilmeden önce pepsin ve sodium taurocholate ile muamele edilmelidir. Pepsin, protoskoleksleri çimlenme kapsülünden ayırmakta ayrıca var olan ölü protoskoleksleri uzaklaştırmakta, sodium taurocholate ise skoleksi evagine hale getirmektedir (Taylor ve Baker, 1987; Smyth, 1990).

1.6.2.2.1. Monofazik Besiyerinde Kültür (Kistik yönde gelişim)

Protoskoleksler sadece sıvı fazın olduğu monofazik ortamda kültüre edildiklerinde ilk olarak veziküler form, evagine ve invagine arka keseli formlar gelişir. Daha sonra lamina tabakasının oluşumuyla tüm bu formlar çeşitli çalışmalarda model olarak kullanılabilecek mikrokistlere dönüşürler.

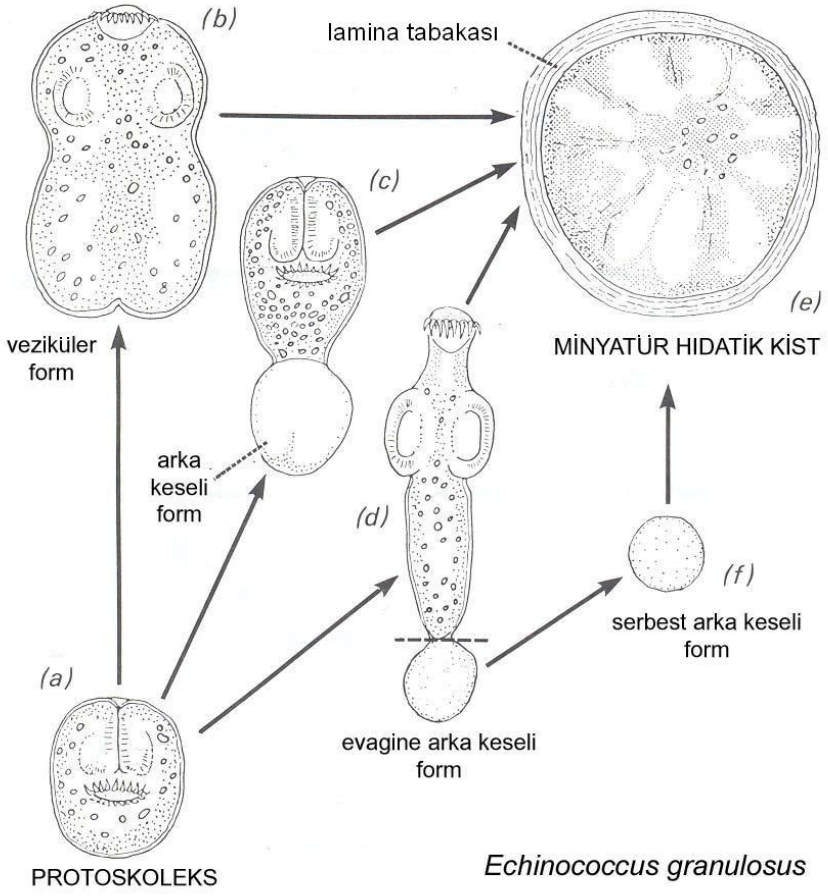
Kültür besiyeri olarak çeşitli serum, amniyon sıvısı, kist sıvısı ya da embriyo ekstratları gibi çok çeşitli doğal bileşimler kullanılabilir. Ticari olarak ise ortak özellikleri benzeyen değişik temel hücre besi yerleri (Medium 199, RPMI 1640, CMRL 1066, NCTC 135, Parker 199, Parker 858 gibi) bu amaçla kullanılmaktadır. Besi yeri glukoz, fötal buzağı serumu ile takviye edilmeli ve bakteriyel kontaminasyona karşı da penicilin, streptomycin ya da gentamycin gibi geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılmalıdır (Smyth, 1967; Smyth, 1971; Rogan ve Sylvia Richards, 1986; Casado ve Rodriguez-Caabeiro, 1989; Casado ve ark., 1992; Ponce Gordo ve Cuesta Bandera, 1997; Ertabaklar ve Altıntaş, 2002a; Zhang ve ark., 2005).

Protoskoleksler kültür şişelerine ml.'de 800 – 1000 protoskoleks olacak şekilde konulmalı ve etüvde 37℃'de, %95 O_2 + %5 CO_2 içeren ortamda inkube edilmelidir. Besi yerinin her 3 – 4 günde bir değiştirilmesine dikkat edilmelidir. (Rogan ve Sylvia Richards, 1986; Casado ve Rodriguez-Caabeiro, 1989; Ponce Gordo ve Cuesta Bandera,1997; Ertabaklar ve Altıntaş, 2002a).

Besiyerinde katı faz bulunmayan monofazik kültürlerde, protoskolekslerden etraflarında lamina tabakasının da geliştiği minyatür hidatik kistler gelişmektedir (Şekil 1.9). Bu iki yolla olabilir:

(a) Protoskoleksler şişerek veziküler bir form alırlar. Kültürün 21 – 28. günlerinden sonra etraflarında lamina tabakası şekillenir.

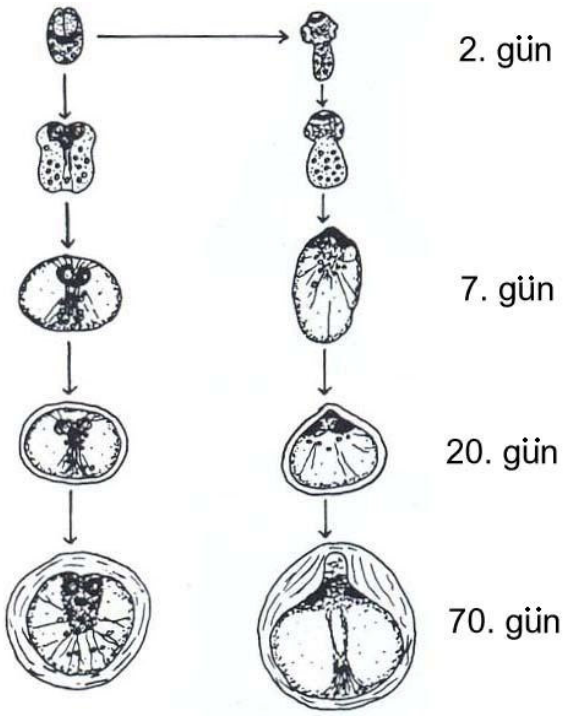
(b) Protoskoleksler küçük bir arka kese geliştirir. Bu arka kese kültürün 12. günü civarında daha sonra lamina tabakasına dönüşecek PAS pozitif yapışkan bir tabaka üretmeye başlar.



Şekil 1.9. *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin monofazik besiyerinde kültüre edilmeleriyle gelişen değişik formlar (Smyth, 1990).

Yapılan deneylerde yüksek O_2 düzeyinin, anaerobik çevrenin, düşük pH'nın ve yüksek safra seviyesinin protoskolekslerin veziküler yönde gelişimini hızlandırdığı görülmüştür (Smyth, 1967). Dolayısıyla anormal şartlarda bile veziküler gelişimin sağlanabilmesi, bu gelişimin protoskoleksi koruyucu bir fonksiyon olduğunu düşündürmektedir. Fakat lamina tabakasının gelişimi ve kistin çevre dokularla bağlantısını kısıtlaması, kistin farklılaşmasının devamını da olumsuz yönde etkilemektedir (Altıntaş,1991a).

Monofazik besiyerleriyle yapılan kültürlerde özet olarak; %10'un altında bir oranda veziküler yönde gelişim gösteren protoskoleksler hariç kalan tüm invagine ve evagine protoskoleksler arka kese geliştirirler. Sonuçta; hem veziküler formlar, hem de arka keseli invagine ve evagine formlar lamina tabakası geliştirerek kistik bir hal alırlar (Şekil 1.10) (Smyth, 1967).



Şekil 1.10. İn vitro kültürde invagine ve evagine formdaki protoskolekslerin mikrokiste dönüşümü (Rogan ve Sylvia Richards, 1986).

1.6.2.2.2. Difazik Besiyerinde Kültür (Strobilar yönde gelişim)

Erişkin *Echinococcus granulosus*'un köpeklerin bağırsaklarına tutunmasının mekanizması ve protoskolekslerin moleküler düzeyde yapısal incelenmeleri difazik besiyerinde yapılan kültürlerin temelini oluşturmuştur. Bu araştırmalardan (Casado ve Rodriguez-caabeiro, 1989) elde edilen bulgular sonucunda başarılı sonuçlar alınmaya başlanmıştır. *Echinococcus*

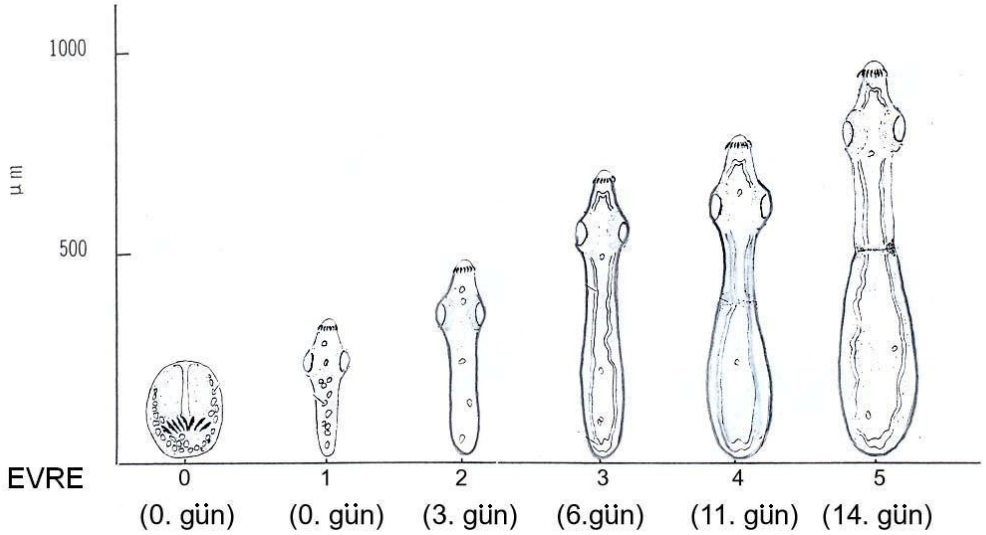
granulosus protoskolekslerinin katı besiyerine temas ettiği difazik kültürlerde infertil yumurtalar üreten erişkin şeritlerin geliştirilmesi başarılmıştır (Smyth ve Davies,1974b).

Kültürde katı faz olarak 75 – 76°C de 30 – 60 dakika tutularak koagule hale getirilen sığır serumu kullanılır. Serumun soğumasından sonra steril bir pastör pipetiyle serumun yüzeyinde ufak perforasyonlar meydana getirilir. Bu perforasyonların protoskolekslerin farklılaşmasında kritik bir öneme sahip olduğu bildirilmektedir (Smyth ve Davies, 1974b).

Kültürün sıvı fazı ise sentetik ve doğal besiyerleri belli oranlarda karıştırılarak elde edilmektedir. Sentetik olarak Parker 858, CMLR 1066 ya da NCTC 135 gibi temel hücre kültürü besiyerlerinin kullanılmasının segmentasyona izin vermesi bakımından oldukça tatmin edici sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Smyth ve Davies, 1974b). Kullanılan besiyerinin K^+ seviyesi 60 mg/100 ml'ye, glikoz seviyesi ise 5.5 mg/ml'ye yükseltilerek modifiye edilmesi köpek bağırsağındaki doğal koşullara yaklaşılmasını sağlamaktadır. Besiyerlerine kist sıvısı, fötal buzağı serumu ya da maya ekstratı gibi doğal maddeler de eklenmektedir. Gaz faz olarak % 10 0_2 + % 5 CO_2 + % 85 N_2 kullanılır. Besiyerleri 48 saatte bir değiştirilmelidir (Smyth, 1971; Smyth ve Davies, 1974b).

Köpeklerde *Echinococcus granulosus*'un ilk segmentasyonu 14. günde olmakta, genç, olgun ve gebe halkaların üçünün de şekillendiği, fertil yumurtalar üretebilen erişkin formun gelişmesi için ise en az 40 gün gerekmektedir. Hem köpeklerde, hem de in vitro kültürlerle yapılan araştırmalardan elde edilen bulgular protoskolekslerin segmentasyona kadar beş evre geçirdiklerini ortaya koymuştur. 1. evrede protoskoleksler evagine hale gelmekte, 2. evrede Ca granülleri kaybolmakta, 3. evrede boşaltım kanalları şekillenmekte, 4. evrede boğumlanma ve son evre olan 5. evrede

ise segmentasyon meydana gelmektedir (Şekil 1.11). Bu aşamalar in vitro kültürlerde biraz gecikmeyle gerçekleşmektedir (Smyth ve Davies, 1974b).



Şekil 1.11. *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin segmentasyona kadar geçirdiği evreler (Smyth ve Davies, 1974b).

Bazı kültürlerde genital organları gelişmiş fakat segmentlere ayrılmamış "monozoik" *Echinococcus granulosus*'lara da rastlanmaktadır. Monozoik formların mutant protoskolekslerden ya da in vitro kültür koşullarındaki alışılmadık değişimler sonucunda geliştiği düşünülmektedir. Kültür ortamının fizyokimyasal, biyokimyasal, nutrisyonel koşullarındaki değişiklikler ve kullanılan kimyasalların kombinasyonu monozoik formların oluşumuna neden olabilmektedir (Smyth, 1971).

Echinococcus granulosus 'un in vitro kültür çalışmaları genellikle başarılı sonuçlar vermesi nedeniyle koyun orijinli protoskolekslerle yapılmaktadır. Koyun orijinli protoskolekslerle, at orijinli protoskoleksleri in vitro kültürde gelişim bakımından karşılaştıran Smyth ve Davies (1974a), at orijinli protoskolekslerin segmentasyon aşamasına geçemediklerini ortaya koymuşlardır. Ayrıca bu çalışma (Smyth ve Davies, 1974a) koyun orijinli ve at orijinli *Echinococcus granulosus*'ların birbirlerinden farklı fizyolojik, nutrisyonel ve metabolik ihtiyaçları olduğunu ortaya koymuştur. Macpherson

ve Smyth (1985) insan, deve, sığır, koyun, keçi ve bufalo orijinli protoskoleksleri in vitro kültürde yine gelişim yönünden karşılaştırmış, orijinlerin hepsinde segmentasyonun şekillendiğini, fakat sadece deve ve sığır orijinli protoskolekslerin seksüel gelişmeyi tamamladıklarını bildirmişlerdir.

Sonkonaklarda gelişen ile in vitro kültür ortamında geliştirilen *Echinococcus granulosus*'lar arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Köpeklerde ve in vitro kültürlerde geliştirilen *E.granulosus* 'lar arasındaki ana fark in vitro kültürde yetiştirilenlerin fertil yumurtalar üretememeleridir. En iyi geliştirilen ekinokokların uteruslarının büyük hücrelerle dolu olduğu gözlenmiştir. Bu oluşumlar daha sonra yumurtaya dönmekte fakat tipik taeniidae embriyoforu gelişememektedir. Yine testislerde de spermatozoalar oluşmasına rağmen recepteculum seminisin boş olduğu gözlenmektedir. Köpek bağırsağındaki mukozaya gömülmüş ekinokoklara çevresindeki villuslar baskı yapmakta, böylece cirrus vaginaya girmekte iken, kültüre edilen ekinokoklarda ise cirrus vaginaya temas etmemektedir. Sonuç olarak döllenme meydana gelmemekte ve infertil yumurtalar üretilmektedir (Smyth ve Davies, 1974b).

1.7. Protein Yapılarının SDS – PAGE Yöntemi ile Belirlenmesi

Proteinlerin analizi için en fazla kullanılan yöntemlerden birisi sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE)'dir. SDS – PAGE proteinlerin karakterizasyonunda ve karşılaştırılmalarında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, proteinler anyonik bir deterjan olan SDS ile reaksiyona girerek negatif yüklü kompleksler oluşturup, denatüre olurlar ve çözünürlük kazanırlar. Böylece proteinler yüklerindeki ve büyüklüklerindeki farklılığa göre poliakrilamid jelin kalbura benzer yapısında elektroforez ile separasyona uğrarlar (Altıntaş, 1991b; Altıntaş ve Yolasığmaz, 1997).

Bu yöntemin parazitolojide kullanılma amaçları:

- Proteinin saf olup olmadığının belirlenmesi,
- Proteinin molekül ağırlığının saptanması,
- Protein konsantrasyonunun doğrulanması,
- Protein bileşiklerinin tanısı,
- Protein modifikasyonunun belirlenmesi,
- Antikor üretimi için protein antijenlerin konsantrasyonu ve separasyonun yapılması,
- Radyoaktif olarak işaretlenmiş proteinlerin separasyonu,
- Western blot'un birinci safhasını oluşturması olarak sıralanabilir (Altıntaş ve Yolasığmaz, 1997).

SDS – PAGE ile hidatik kist sıvısının, protoskolekslerin ve onkosferlerin protein yapısı ortaya konabilmektedir. SDS – PAGE metoduyla Kanwar ve ark. (1992) koyun, keçi, domuz ve insandan aldıkları hidatik kist sıvılarında molekül ağırlıkları 8 – 116 kDa arasında değişen en az 15 protein fraksiyonu saptadıklarını, Köksal ve ark. (1995) koyun, sığır ve insan kökenli hidatik kist sıvılarında molekül ağırlıkları 8 – 120 kDa arasında değişen 20 protein bantı belirlediklerini bildirmişlerdir. Doğanay ve ark. (2000) koyun kökenli hidatik kist protoskolekslerinin SDS – PAGE metoduyla analizinde molekül ağırlıkları 3,5 ile 116 arasında değişen 34 protein bantı belirlemişlerdir. Heath ve Lawrence (1996) ise aynı metodla *Echinococcus granulosus* yumurta onkosferlerinden 23 ve 25 kDa'luk proteinleri elde etmişlerdir.

Bu çalışmada koyun kökenli hidatik kistlerden elde edilen protoskolekslerin monofazik in vitro kültürde kistik yönde gelişiminin incelenmesi ve in vitro kültür sonucunda elde edilen mikrokistlerin protein yapılarının SDS – PAGE yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

İn vitro kültürde üretilen *Echinococcus granulosus* mikrokistleri pek çok çalışmada model olarak kullanılabilmektedir. Birçok araştırma farelerde 6 – 8 ay gibi uzun bir sürede gelişen sekonder kistlerle yapılmakta ve kistlerin gelişme süresinde birçok deney hayvanının kaybedilmesi riski söz konusu olmaktadır. *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin in vitro kültürüyle geliştirilen mikrokistlerle, bütün bu çalışmalar deney hayvanı kullanılmadan yapılabilmektedir. Geliştirilen kistlerin model olarak kullanılabilmesi, zaman zaman mezbahada arakonaklardan kist bulma zorluğunun da aşılmasını sağlayacaktır. Yine, konak baskısı olmaksızın kiste ait biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerin incelenmesi, antijen üretimi, immunodiyagnoz ve aşı geliştirme çalışmaları, patogenezde rol oynayan metabolizmaların incelenmesi, farklı kimyasal madde ve ilaçların etki mekanizmalarının analizlerinin araştırılmasında in vitro kültürden elde edilen mikrokistler başarı ile kullanılabilecektir.

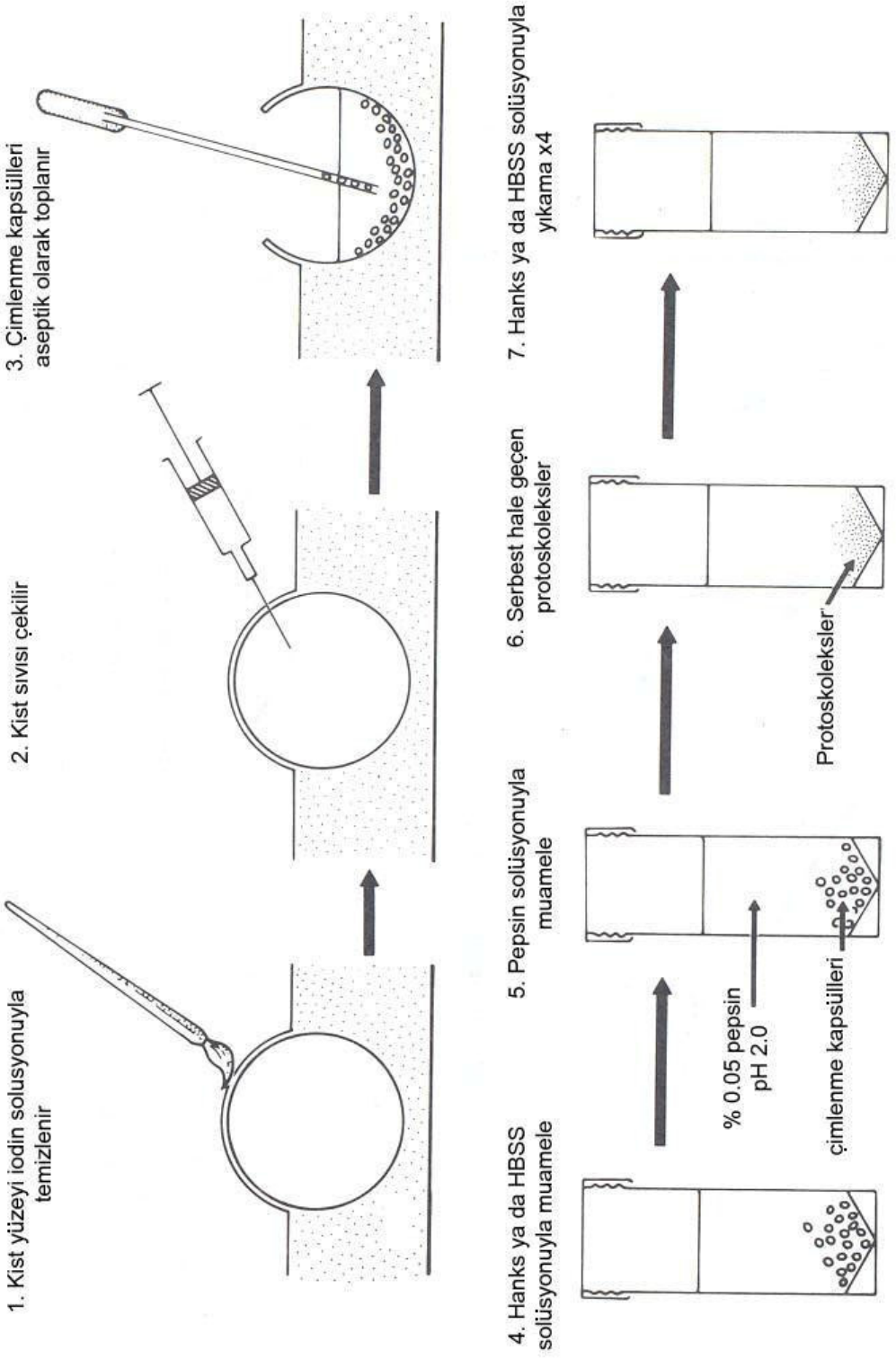
2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hidatik Kistlerin Elde Edilmesi

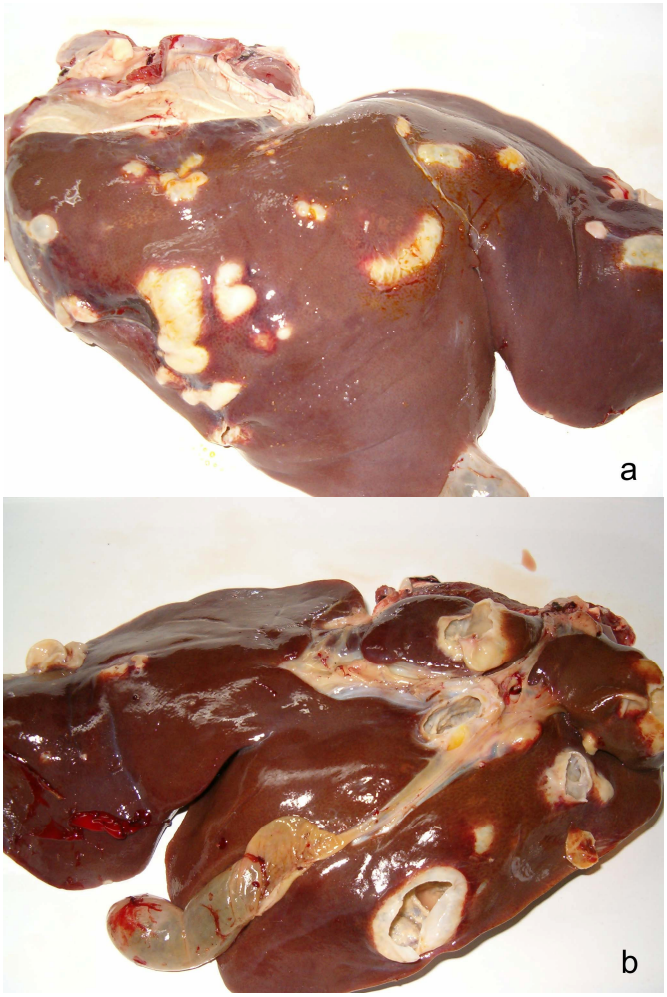
Çalışmada kullanılan koyun kökenli hidatik kistler Ankara İli Kazan İlçesi Belediye Mezbahasından, yeni kesilmiş hayvanlardan taze olarak elde edildi. Daha çok karaciğer dokusuna yerleşmiş kistler tercih edildi. Elde edilen kistler soğutucu dolaplarla (+ 4 ℃ civarı) vakit geçirilmeden laboratuvara ulaştırıldı. Aynı gün in vitro kültürün hazırlıkları yapıldı ve protoskoleksler kullanıldı.

2.2. Kistlerin Aseptik Diseksiyonu ve Monofazik Kültüre Hazırlık

Açılacak kistin yüzeyi %1'lik iyodin solusyonuyla bir fırça yardımıyla yıkandı. İyodinin kuruması beklenilip aynı işlem tekrarlandı. Daha sonra 50 ml'lik steril bir enjektör yardımıyla kiste girildi ve kist sıvısının % 50'si çekildi. Bu işlem kist sıvısının gözlere ve yüze sıçrama ihtimaline karşı büyük bir dikkatle yapıldı. Çekilen kist sıvısı ağzı vidalı kapaklı 25 ml'lik falcon tüplere nakledildi (Şekil 2.1). Daha sonra kist, steril bir makas yardımıyla açıldı ve çevre dokulardan ayrıldı (Şekil 2.2). Kist içindeki sıvı steril bir pastör pipetiyle çekilerek falcon tüplerine ilave edildi. Protoskolekslerin büyük çoğunluğunun kistin dip kısmında çökmüş bulunduğu ve taze kistlerde bazı protoskolekslerin germinal membrana yapışık bulunduğu dikkate alınarak, tamamen çıkarılan germinal membran kist sıvısı konulan tüpün içinde yıkanarak membrana yapışan protoskoleksler membrandan ayrıldı. Protoskolekslerin çökmesi için 10 dakika beklendikten sonra üstteki kist sıvısı uzaklaştırıldı. Mikropipet yardımıyla lam lamel arasına alınan protoskolekslerin kontraksiyonlarına, alev hücresi aktivitelerine, Ca granüllerinin varlığına ve genel morfolojilerine bakılarak canlılık muayeneleri yapıldı (Smyth, 1990; Smyth ve Davies, 1974b).



Şekil 2.1. İn vitro kültüre hazırlık aşamaları (Smyth, 1990).



Şekil 2.2. a. Protoskolekslerin elde edildiği hidatik kistler; b. Germinal mebranın çıkarılabilmesi için makas yardımıyla kesilen kistler.

Canlılık muayenesinin yapılmasından sonra tüplerden steril pipet yardımıyla çekilen kist sıvısı yerine 37 °C'de HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) ilave edilerek protoskoleksler yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında tüpün içindeki HBSS steril bir pipet yardımıyla çekildi ve yerine protoskolekslerin çimlenme kapsüllerinden ayrılmasını sağlamak için pepsin solüsyonu (Çizelge 2.1) ilave edildi. Protoskoleksler pepsin solüsyonuyla 40 dakika 37 °C'lik su banyosunda çalkalandıktan sonra mikropipetle lam lamel arasına alınıp protoskolekslerin serbest hale gelip gelmedikleri incelendi (Smyth ve Davies, 1974b; Smyth, 1990).

Çizelge 2.1. Hazırlanan pepsin solüsyonunun formülasyonu

Pepsin solüsyonunun* hazırlanması	
Pepsin (Sigma)	0,1 g
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma)	50 ml (37 ℃'de)
* Solüsyonun pH'sı 2M HCl ile 2'ye ayarlandı.	

Pepsin solüsyonuyla muameleden sonra protoskolekslerin tüp içerisine çökmesi beklendi. Tüp içerisindeki pepsin solüsyonu steril bir pipet yardımıyla çekildi ve yerine 37 ℃'de HBSS ilave edildi. Sonra 37 ℃'ye ayarlı su banyosunda 10 dakika çalkalanarak protoskolekslerin yıkanması sağlandı. Süre sonunda üstteki sıvı atılarak yerine yenisi ilave edildi. Bu işlem üç kere peş peşe tekrar edildi. Son yıkamada HBSS yerine 37 ℃'de formülasyona göre hazırlanmış besiyeri ilave edildi (Çizelge 2.2). 10 dakikalık yıkama sonrası besiyeri yenilendi ve 1 ml besiyerindeki protoskoleks sayısını hesaplamak için sayım yapıldı (Smyth, 1990).

Çizelge 2.2. Hazırlanan besiyerinin formülasyonu

Besi yerinin * hazırlanması	
RPMI 1640 (Hepes + L glutamine) (Biological Industries)	500 ml
Foetal Bovine Serum (Biological Industries)	100 ml
Penicilline – Streptomycin (Sigma)	5 ml
* Karışımda kullanılan kimyasallar 37 ℃'lik su banyosunda ısıtıldı.	

İn vitro kültür ml.'sinde 800 protoskoleks (Ponce Gordo ve Cuesta Bandera, 1997) olan 10 flask olacak şekilde ayarlandı. Bunun için protoskolekslerin sayımı örnekleme yoluyla yapıldı ve ml'de 800 protoskoleks olacak şekilde örnekler ayarlandı ve içlerine daha önceden 37 ℃'de 15 ml. besi yeri konarak hazırlanan 20 ml'lik kültür flasklarına (Cel – Cult, Sterilin Ltd., Hounslow UK.) konuldu.

Flasklar, % 5 CO_2 içeren atmosferde ve 37 ℃ ayarlanan etüve yatık bir şekilde konuldular. Her 3 – 4 günde bir flasklar dik bir konuma getirilerek protoskolekslerin çökmesi beklendi ve besi yerinin 2/3'ü 37 ℃'de ısıtılan yeni besi yeri ile değiştirildi. Bu işlem kültür sonuna kadar her 3 – 4 günde bir tekrarlandı.

İn vitro kültürü yapılan 10 flasktan oluşan seride protoskolekslerden elde edilen mikrokistlerin gelişimi 152 gün takip edildi. Protoskolekslerin gelişimi besiyerlerinin değiştirildiği günlerde mikroskopta fotoğrafları çekilerek takip edildi. Gelişen formların ölçümleri benzer 20 formun ölçülerek ortalamasının alınması suretiyle yapıldı. Gelişim kriterleri ilgili literatürlerle karşılaştırılarak takip edildi (Smyth, 1967; Smyth, 1971; Rogan ve Sylvia Richards, 1986; Casado ve Rodriguez-Caabeiro, 1989; Casado ve ark., 1992; Ponce Gordo ve Cuesta Bandera, 1997; Ertabaklar ve Altıntaş, 2002a; Zhang ve ark., 2005).

2.3. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE)

SDS – PAGE için gerekli solusyonların hazırlanması ile elektroforez tekniği Sambrook ve ark. (1989)'nın bildirdiği şekilde yapıldı.

2.3.1. SDS – PAGE için Gerekli Kimyasallar ve Formülasyonları

Acrylamide – Bisacrylamide (%30)

- Acrylamide (Sigma) ……. 29,0 g
- Bisacrylamide (Owl Scientific) ……... 1,0 g

Deiyonize H_2O ile 100 ml'ye tamamlanır.

Resolving Gel Buffer (1,5 M, pH: 8,8)

- Tris Base (Sigma) ……..18,2 g

dH_2O ile 100 ml'ye tamamlanır. pH'sı 1N HCl ile 8,8'e ayarlanır.

Stacking Gel Buffer (pH: 6,8)

- Tris Base (Sigma) ……. 6,05 g

dH_2O ile 50 ml'ye tamamlanır. pH'sı 1 N HCl ile 6,8'e ayarlanır.

SDS (Lauryl Sulfate) (%10)

- SDS (Sigma) ……... 1,0 g

dH_2O ile 10 ml'ye tamamlanır.

APS (%10)

- Amonium persulfate (Owl Scientific) …... 1,0 g

dH_2O ile 10 ml'ye tamamlanır.

Loading Buffer

- 100 mM Tris – HCl (Sigma) …… 0,06 g
- 200 mM dithiothreitol (DTT) (Sigma) ……. 0,6 g
- SDS (Sigma) …….. 0,2 g
- Bromphenol blue (Owl Scientific) …… 0,01 g
- Glycerol (Merck) …… 1,25 ml

dH_2O ile 5 ml'ye tamamlanır.

Tris Glycine Electrophoresis Buffer (5X Stok)

- Tris Base (Sigma) …….. 7,55 g
- Glycine (Sigma) …….47,0 g
- SDS (Sigma) …… 2,5 g

dH_2O ile 500 ml'ye tamamlanır. Tankın alt kısmı için 0,5 X, üst kısmı için 1 X solüsyon, 5X'lik stok solüsyondan hazırlanır.

2.3.2. Jelin Hazırlanması, Örneklerin Hazırlanması, Örneklerin Çukurlara Konması ve Jelin Elektroforezi

% 15'lik resolving jel ve % 5'lik stacking jel çizelge 2.3'deki formülasyona göre hazırlandı ve jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklenildi.

Çizelge 2.3. Resolving ve Stacking Jelin formülasyonu

RESOLVING GEL (% 15)	
dH_2O	11,5 ml
Acrylamide – bisacrylamide (% 30)	25,0 ml
Resolving Gel Buffer 1,5 M pH: 8,8	12,5 ml
SDS (%10)	0,5 ml
Amonium per sulfate (APS) (% 10)	0,5 ml
TEMED (Sigma)	0,02 ml
STACKING GEL (% 5)	
dH_2O	6,8 ml
Acrylamide – bisacrylamide (% 30)	1,7 ml
Stacking Gel Buffer 1,5 M pH: 6,8	1,25 ml
SDS (%10)	0,1 ml
Amonium per sulfate (APS) (% 10)	0,1 ml
TEMED (Sigma)	0,01 ml

Elektroforezde kullanılacak kist sıvıları 120. günden sonra gelişen ve büyüklükleri 1000 – 2000 µm arasında değişen mikrokistlerden elde edildi. Kistler steril bir ependorfta 10 µl steril su içinde steril bir insülin enjektörüyle patlatılarak, kist sıvıları 45 µl olacak şekilde elde edildi. Elektroforezde mikrokistlerle karşılaştırmak üzere koyun karaciğerindeki kist hidatiklerden elde edilen kist sıvısı da iki ependorfa 45 µl olacak şekilde konuldu. Bu kist sıvılarının üzerine 15 µl loading buffer ilave edildi. Örnekler 100 ℃'de kaynayan su banyosunda 4 dakika bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandı.

Örnekler çukurlara protein standartı (Wide Range, Sigma), iki mikrokist, iki koyun kist hidatik sıvısı olmak üzere konuldu. Elektroforez tankının bufferları da konulduktan sonra, örnekler 25 mA'de yaklaşık 9 saat yürütüldü.

Elektroforez sonrası jel boyama kitiyle (ProteoSilver Silver Stain Kit, Sigma) boyanarak bantlar görünür hale getirildi.

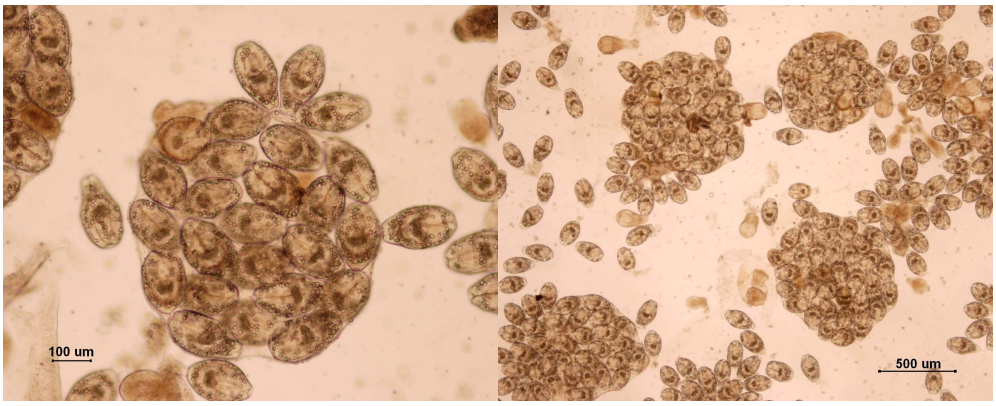
2.4. İstatistiksel Analiz ve Matematiksel Modellemeler

İn vitro ortamda monofazik besiyerinde kistik yönde gelişen protoskolekslerin çapları zamana göre regresyon analizi ile modellenmiştir. Linear, kübik ve kuadratik modellemeler yapılmış ve tanımlayıcılık (belirtme) katsayıları (R^2) her modele göre hesaplanmıştır. Bu modellere göre hazırlanan formüllerle, belirlenen bir günde kist çapının hangi büyüklüğe ulaşacağının ya da belirlenen çaptaki kistlere kültürün kaçıncı gününde ulaşılacağının hesaplanabilmesinin imkânları araştırılmıştır. Matematiksel modellemeler için "SPSS 14.0" paket programı (Lisans No: 9869264) kullanılmıştır.

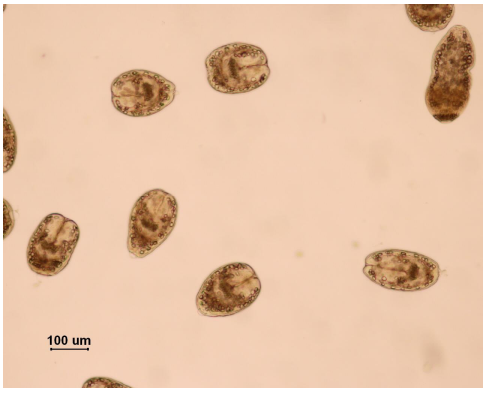
İn vitro kültürde gelişen mikrokistlerin aylara göre ortalama çaplarının ve minimum, maksimum değerlerin gösterimi box – plot grafiğiyle yapılmıştır. Bu grafik özellikle ortalama değerlerin çok altında ve çok üstünde kalan minumum ve maksimum uç değerlerin gösterilebilmesi amacıyla kullanılmıştır. Box – Plot grafiği, yüzdelikler yardımıyla veriyi özetlemekte kullanılan basit ancak çok kullanışlı bir grafik yöntemidir. Özellikle aynı birimle belirtilen birden çok değişkenin yapısını bir grafik üzerinde görmek için bu grafiklerden sıklıkla yararlanılır. Box – Plot grafiklerinde kutu yatay bir çizgi ile ikiye bölünmüştür. Bu çizgi 50. yüzdeliği (ortancayı) belirtir. Kutunun alt çizgisi 25., üst çizgisi 75. yüzdeliği gösterir. Daha sonra kutunun alt ve üst kenarlarının ortasından aşağıya ve yukarıya doğru çizgiler eklenir. Kutunun alt orta noktasından başlayan dikey çizgi dağılımdaki en küçük değere kadar inerken, kutunun üst orta noktasından başlayan çizgi dağılımdaki en büyük değere kadar çıkar (Alpar, 2001).

3. BULGULAR

Laboratuvara getirilen hidatik kistlerin yapılan incelemelerinde serbest protoskolekslerin yanı sıra, içlerinde ortalama 18 protoskoleks bulunan çok sayıda çimlenme kapsülleri de bulundu (Şekil 3.1). Hidatik kistlerden elde edilen protoskolekslerde başlangıçtaki canlılık oranı % 95 olarak saptandı. Pepsin solüsyonuyla muameleden sonra çimlenme kapsüllerinde bulunan protoskolekslerin de serbest hale gelmesiyle (Şekil 3.2) canlılık oranının % 98'e yükseldiği, protoskolekslerin bulunduğu tüpe makroskobik olarak bakıldığında ise tüp içerisinde beyaz renkte ve büyük olarak gözlenen çimlenme kapsüllerinin yerini kum tarzı serbest protoskolekslerin aldığı gözlendi.



Şekil 3.1. Pepsin solüsyonuyla muameleden önce protoskolekslerin durumu.



Şekil 3.2. Pepsin solüsyonuyla muameleden sonra protoskolekslerin durumu.

Mikroskobik incelemede, in vitro kültürün 1. günü invagine ve evagine haldeki protoskolekslerin kalsiyum granülleri gibi normal morfolojik özellikleri taşıdığı, kontraksiyon halinde oldukları ve alev hücresi aktivitesi gözlendi. Yapılan ölçümlerde protoskolekslerin ortalama 159 µm oldukları tespit edildi (Şekil 3.3, Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Kültürün 1. gününde protoskoleks.



Şekil 3.4. Kültürün 1. gününde protoskoleksler (a: invagine, b: evagine protoskoleks).

Kültürün ilk 5 gününde protoskolekslerde çok fazla değişim olmadığı, 5 gün sonunda yapılan sayımlarda ise protoskolekslerin % 2'sinin veziküler formda, % 4'ünün evagine, % 93'ünün invagine, % 1'inin ise ölü olduğu tespit edildi. Ölü protoskolekslerde rengin koyulaştığı, kontraksiyon ve alev hücresi aktivitesi bulunmadığı belirlendi. Yapılan ölçümlerde invagine protoskolekslerin ilk günkü büyüklüklerini koruduğu, ilk kez karşılaşılan veziküler formların ortalama 260 µm, evagine olmuş protoskolekslerin uzunluklarının da ortalama 220 µm olduğu gözlendi (Şekil 3.5).



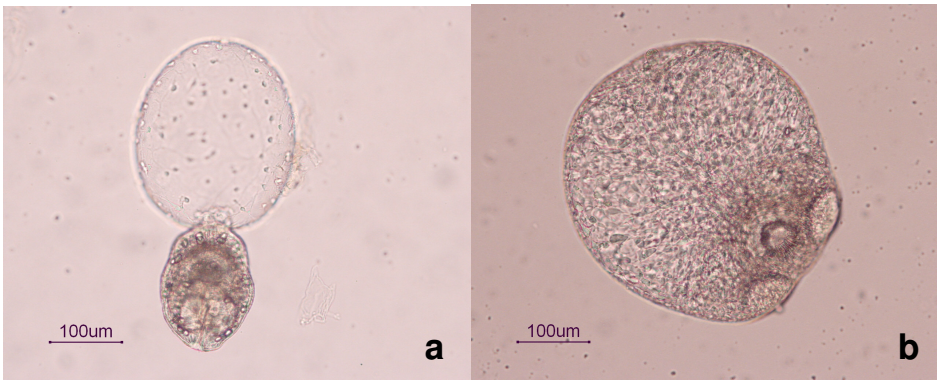
Şekil 3.5. Kültürün 5. gününde veziküler (a) ve invagine (b) formdaki protoskoleksler.

Beşinci günden 15. güne kadar olan zaman aralığında protoskolekslerin vezikülasyonlarının arttığı, ilk 5 gün karşılaşılmayan arka keseli formların da kültürde şekillenmeye başladığı belirlendi (Şekil 3.6). İnvagine arka keseli, evagine arka keseli ve veziküler protoskolekslerin dışında kültürde büyük oranda hiç gelişim göstermeyen invagine protoskolekslerin de canlılıklarını koruduğu tespit edildi.



Şekil 3.6. Kültürde 5. – 15. günler arasında karşılaşılan formlar (a: invagine, b: evagine veziküler, c: invagine veziküler, d: arka keseli invagine protoskoleks).

Kültürün 15 günlük sürecinde veziküler formdaki protoskolekslerin oranının % 8'e çıktığı, protoskolekslerin % 30'unda ise bazıları büyük bazıları küçük olmak üzere arka kese geliştiği, geriye kalan protoskolekslerin ise invagine halde gelişmeden kaldıkları belirlendi. Veziküler formların uzunluğunun bu sürede ortalama 290 µm'ye çıktığı ve bu formların premikrokist olarak adlandırılan safhaya geçerek kontraksiyon yeteneklerini kaybettikleri tespit edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Kültürün 20. günü (a: arka keseli form, b: premikrokist olarak adlandırılan veziküler form)

Protoskolekslerin in vitro kültürü birinci aya yaklaşırken veziküler formların ve arka keseli formların çeperlerinin yavaş yavaş kalınlaştığı, lamina tabakasının gelişmeye başladığı gözlendi. Birinci ayın sonunda çapları ortalama 357 µm'ye ulaşan veziküler formlarda protoskolekse ait çengellerin kaybolduğu ve lamina tabakasının tam olarak şekillendiği, bu formların artık mikrokist formuna geçtikleri belirlendi (Şekil 3.8). Arka keseli formlarda ise tam şekillenmiş lamina tabakasına rastlanmamakla birlikte, çeperin şeffaf yapısını kaybettiği ve kalınlaşmaya devam ettiği tespit edildi (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Kültürün 30. gününde lamina tabakasının da şekillendiği mikrokist.



Şekil 3.9. Kültürün 30. gününde arka keseli invagine formdaki protoskoleks.

Kültürün birinci ayı sonunda veziküler ve arka keseli protoskoleksler hariç kalan protoskolekslerin dejenerasyona uğradıkları, renklerinin koyulaştığı ve canlılık belirtisi göstermedikleri kaydedildi.

İn vitro kültürün ilk ayı boyunca gelişen protoskolekslerin minumum ve maksimum uzunluklarının ortalama değerlere yakın olduğu, uç değerlerin olmadığı belirlendi. İlk ay boyunca veziküler yönde gelişen protoskolekslerin minumum, maksimum ve ortalama uzunlukları çizelge 3.1.'de verilmiştir. Yapılan ölçümlerde arka keseli formların arka kese çaplarının da kültürün 15. gününden sonra veziküler protoskolekslerin uzunluklarıyla benzerlik gösterdiği kaydedildi.

Çizelge 3.1. Veziküler yönde gelişen protoskolekslerin 1 – 30. günler arasında minumum, maksimum ve ortalama uzunlukları.

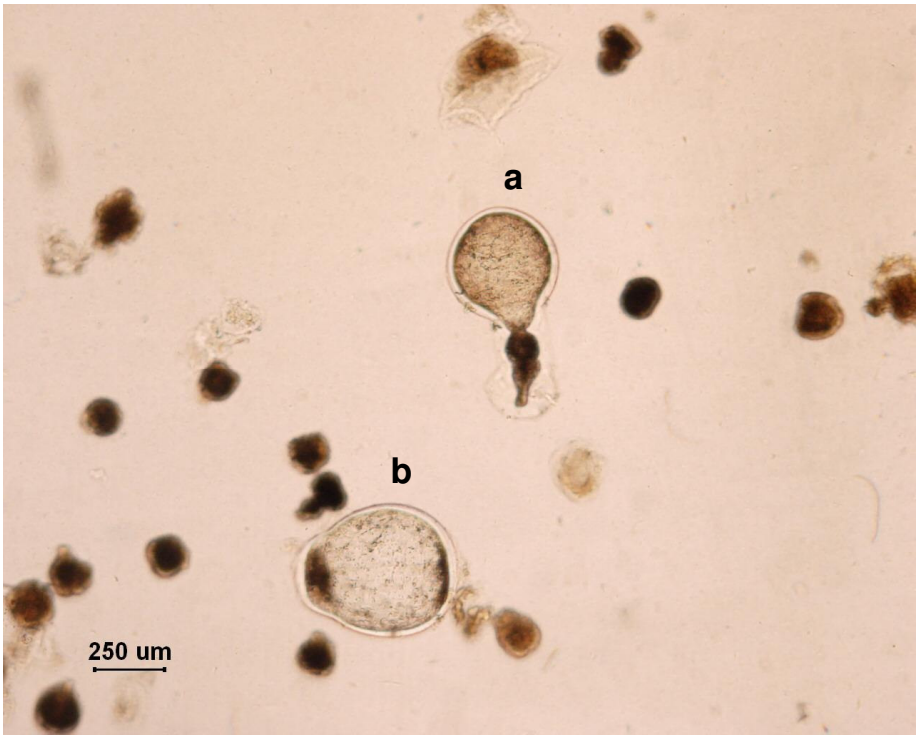
GÜN	MİNUMUM (µm)	MAKSİMUM (µm)	ORTALAMA (µm)
1.	159	160	159
4.	210	240	220
8.	225	255	240
12.	252	275	265
16.	285	310	294
20.	290	320	305
24.	309	335	317
28.	345	358	353
32.	357	369	365

Kültürün ikinci ayı boyunca artık mikrokist olarak adlandırılan laminar tabakası gelişmiş veziküler formların büyümeye devam ettiği ve ikinci ay sonlandığında çaplarının ortalama 520 µm'ye ulaştığı gözlendi (Şekil 3.10).



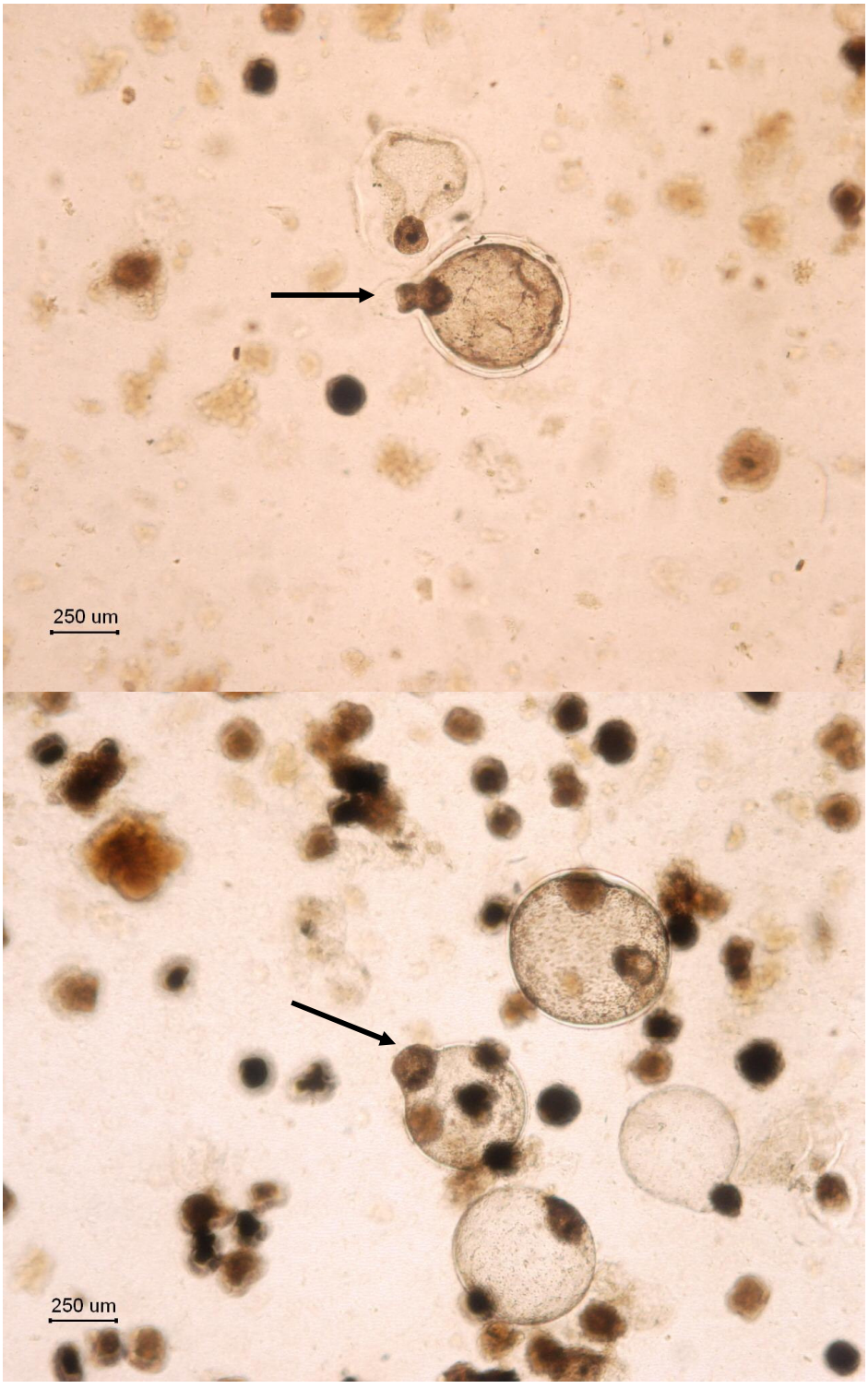
Şekil 3.10. Kültürün 60. gününde mikrokist.

İkinci ay boyunca arka keseli formlarda, lamina tabakası arka keseden rostellar bölgeye doğru, daha sonra da tüm formu kaplayacak şekilde gelişti ve 60. gün sonunda tamamen belirgin hale geldi. Lamina tabakasının tamamen geliştiği bu formların da artık mikrokist haline geldiği gözlendi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Mikrokiste dönüşmüş arka keseli (a) ve veziküler (b) formlar.

Arka keseli formlarda 60. – 90. günler arasında lamina tabakası geliştikçe, protoskoleks kısmının giderek küçüldüğü ve tabakanın tam şekillenip tüm formu kaplamasıyla absorbsiyona uğrayarak mikrokist formunun içinde kaldığı tespit edildi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Mikrokiste dönüşmüş arka keseli formlar (→: arka keseli formun giderek küçülen protoskoleks kısmı).

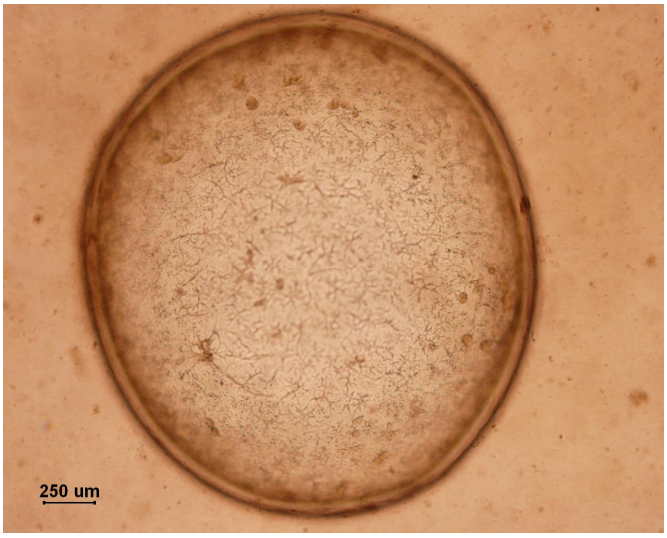
Gelişmeye devam eden mikrokistlerin çapı 90. günün sonunda ortalama 1020 µm'ye, 120. günün sonunda ortalama 1581 µm'ye, 150. günün sonunda ise ortalama 2561 µm'ye ulaştı. Kistlerin 90., 120. ve 150. günlerde çekilen fotoğrafları şekil 3.13, şekil 3.14 ve şekil 3.15'de verilmiştir.



Şekil 3.13. Kültürün 90. gününde mikrokist.



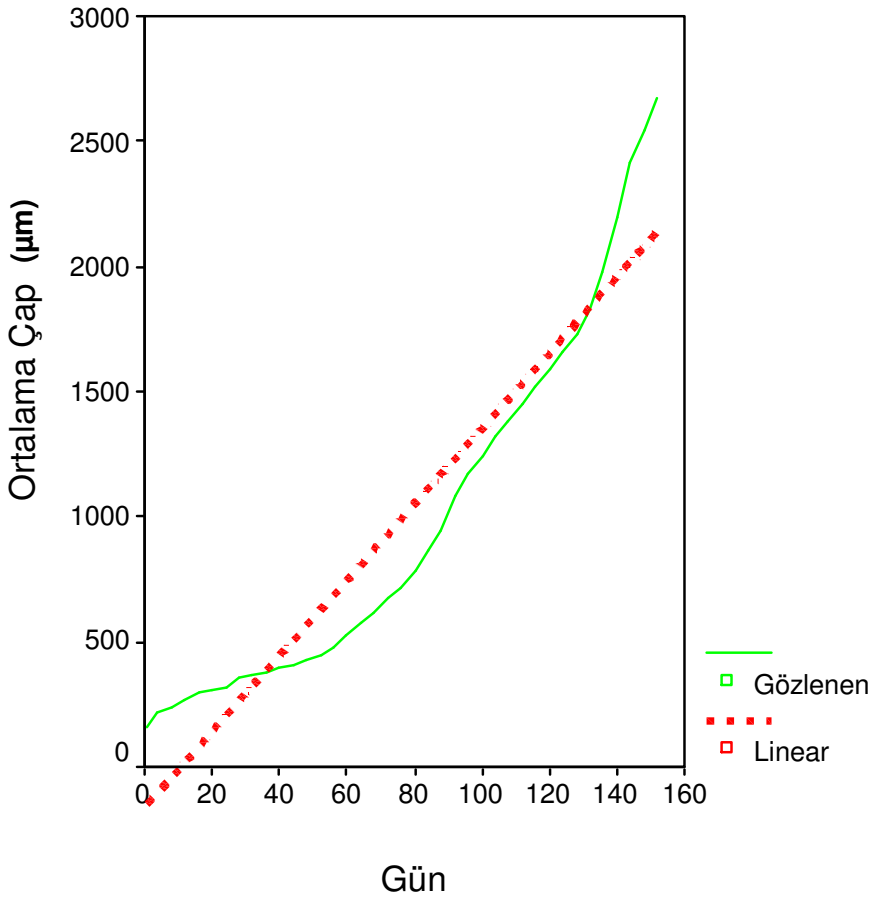
Şekil 3.14. Kültürün 120. gününde mikrokist.



Şekil 3.15. Kültürün 150. gününde mikrokist.

İn vitro ortamda monofazik besiyerinde kistik yönde gelişen protoskolekslerin çaplarının zamana göre regresyon analizi ile üç farklı modellemesi yapılmış ve modellerin gösterimi Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'de verilmiştir. Kullanılan linear, kuadratik ve kübik modellemelerle birlikte üç farklı formül elde edilmiş ve bu formüllerle belirlenen bir kültür gününde kist çapının ortalama kaç µm olacağı ya da belirlenen bir kist çapına kültürün yaklaşık kaçıncı gününde ulaşılacağının hesaplanabildiği görülmüştür. Formüllerden en güvenilir olanının kübik model olduğu, bunu sırasıyla kuadratik ve linear modelin izlediği kaydedilmiştir. Matematiksel modellere göre hazırlanan formüller ilgili çizelgelerin altında verilmiştir.

Çizelge 3.2. Mikrokistlerin in vitro kültürde gelişiminin ortalama değerlere göre linear modelle gösterimi.

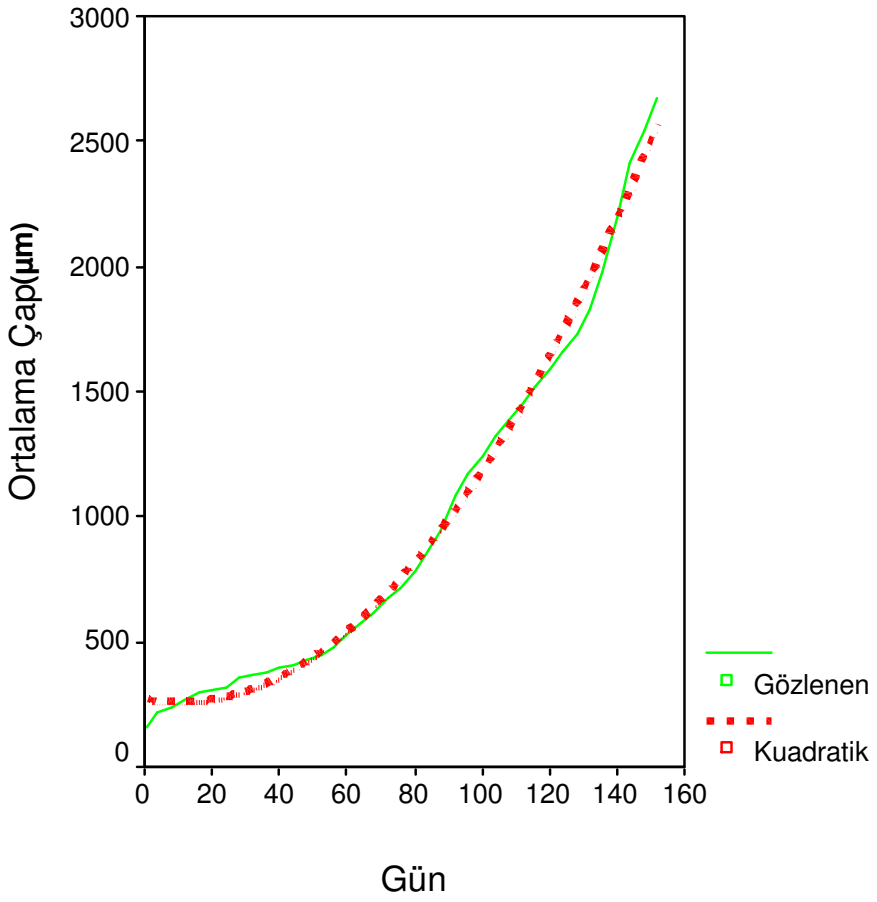


Mikrokistlerin in vitro kültürde gelişiminin linear modelle ortaya konmasında tanımlayıcılık (belirtme) katsayısı R^2= 0,90 olarak bulunmuştur (P<0,001). Linear modele göre elde edilen formül aşağıdadır.

y= -161,06 + 15,12.x

(y= çap, x= gün)

Çizelge 3.3. Mikrokistlerin in vitro kültürde gelişiminin ortalama değerlere göre kuadratik modelle gösterimi.

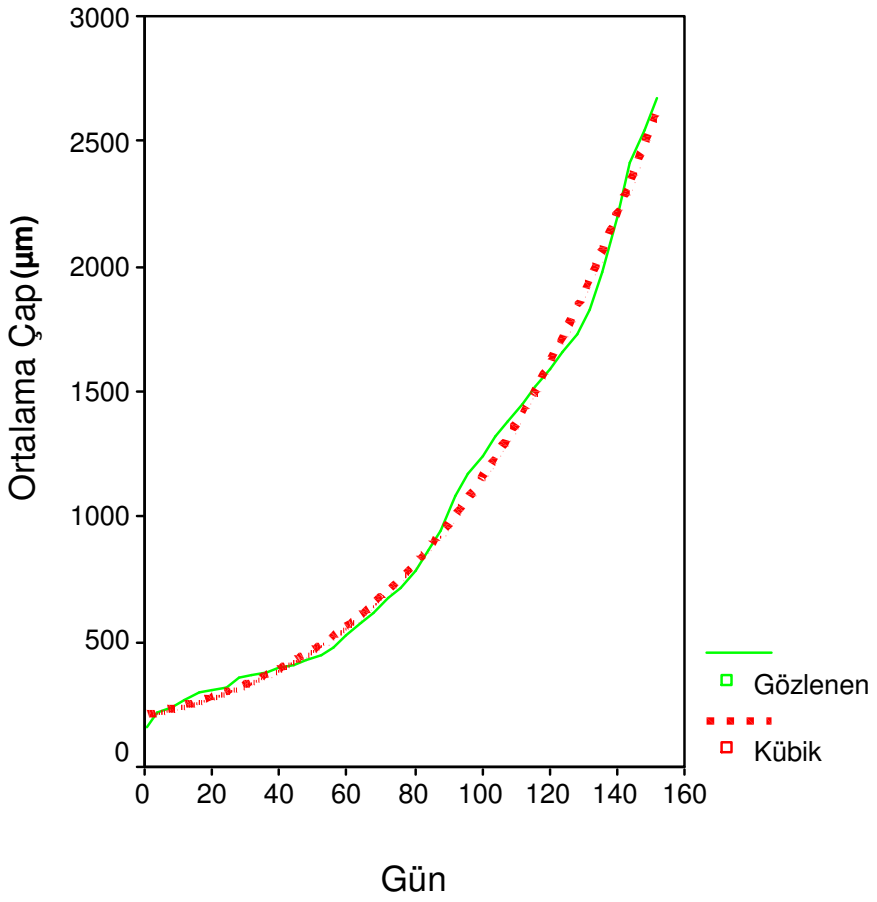


Mikrokistlerin in vitro kültürde gelişiminin kuadratik modelle ortaya konmasında tanımlayıcılık (belirtme) katsayısı R^2= 0,993 olarak bulunmuştur (P<0,001). Kuadratik modele göre elde edilen formül aşağıdadır.

$$y= 272,75 – 240.x + 0,115. x^2$$

(y= çap, x= gün)

Çizelge 3.4. Mikrokistlerin in vitro kültürde gelişiminin ortalama değerlere göre kübik modelle gösterimi.



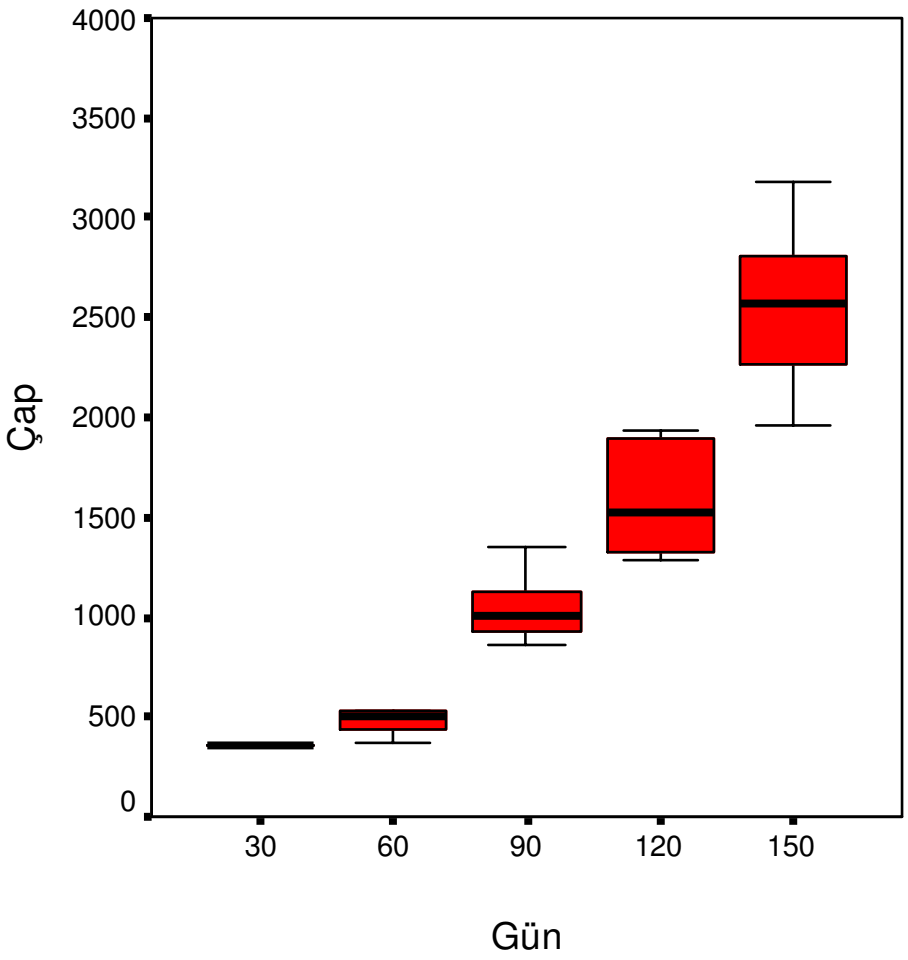
Mikrokistlerin in vitro kültürde gelişiminin kübik modelle ortaya konmasında tanımlayıcılık (belirtme) katsayısı R^2= 0,995 olarak bulunmuştur (P<0,001). Kübik modele göre elde edilen formül aşağıdadır.

$$y = 207,89 + 2,3.x + 0,26.\ x^2 + 0,004.\ x^3$$

(y= çap, x= gün)

İn vitro kültürde gelişen mikrokistlerin aylara göre minimum, maksimum ve ortalama çaplarının box – plot grafiğiyle gösterimi çizelge 3.5'de, minimum, maksimum ve ortalama değerler ise çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. İn vitro kültürde gelişen mikrokistlerin aylara göre minimum, maksimum ve ortalama çaplarının box – plot grafiğiyle gösterimi.

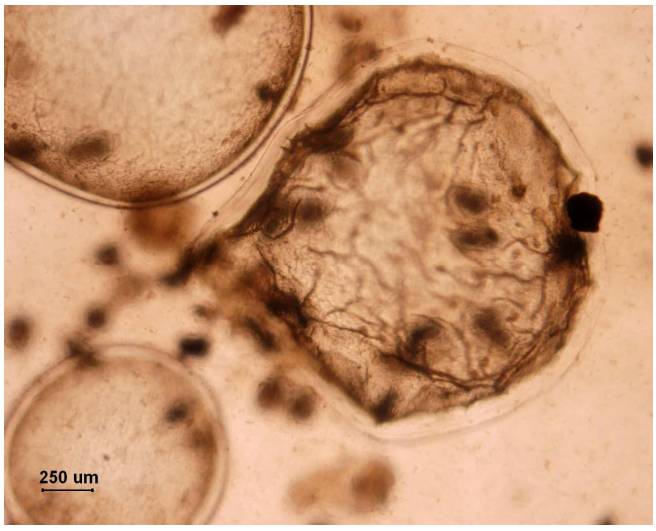


Çizelge 3.5'deki box – plot grafiğinde de gözlendiği üzere ortalama değerler 120. güne kadar minumum değerlere yakın seyrederken 120. günden sonra ortalama değer maksimum değere yaklaşmıştır.

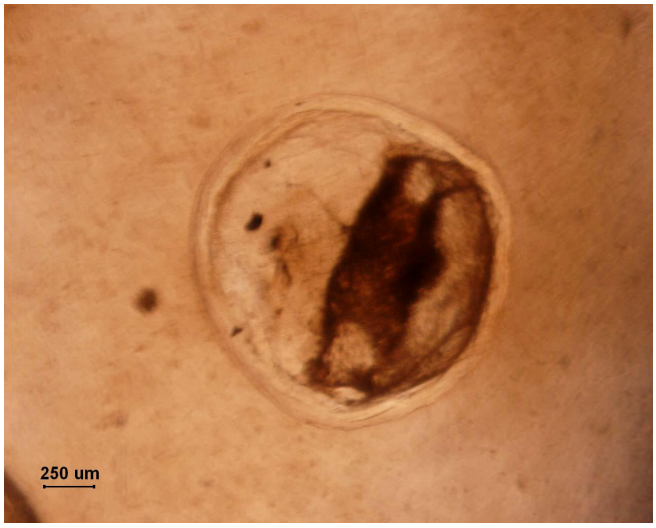
Çizelge 3.6. İn vitro kültürde gelişen mikrokistlerin minimum, maksimum ve ortalama ($\overline{X} \pm S_{\bar{x}}$)çapları (µm).

GÜN	MiN	MAX	$\overline{X} \pm S_{\bar{x}}$
30.	355,00	360,00	356,83 ± 1,01
60.	367,00	526,00	520,37 ± 53,44
90.	490,00	1716,00	1020,11 ± 66,86
120.	1281,00	1939,00	1581,84 ± 72,55
150.	1962,00	3179,00	2561,45 ± 106,93

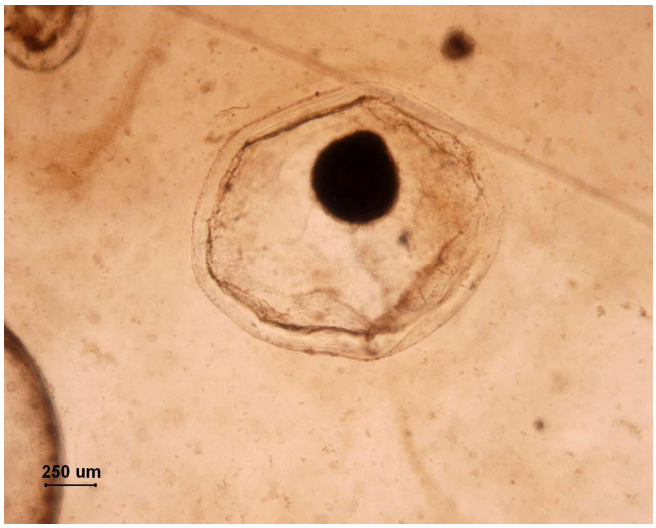
Kültürün 90. gününden sonra kültürde bazı kistlerin normal morfolojilerini kaybettikleri, kist sıvısının kaybıyla şişkinliklerinin azaldığı, içteki germinal tabakanın büzüşmeye başladığı ve sonunda kistin merkezinde ufak bir alanı kaplayacak kadar küçüldüğü gözlendi (Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18).



Şekil 3.16. Normal morfolojisini kaybetmeye başlamış mikrokist.



Şekil 3.17. Germinal membranı ufalmaya başlayan mikrokist.

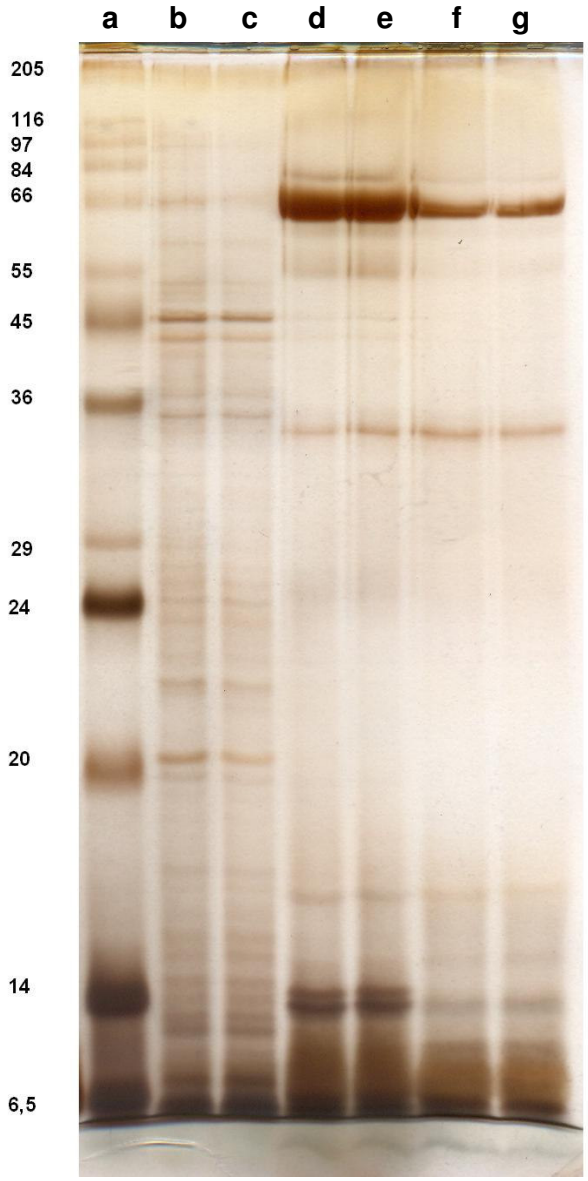


Şekil 3.18. Germinal membranı kistin merkezinde ufak bir alanı kaplayan, dejenere olmuş mikrokist.

Kültür sonlandırıldığında kültürdeki toplam protoskolekslerin yaklaşık % 7 'sinin mikrokiste dönüştüğü tespit edildi.

120. günden sonra büyüklükleri 1000 – 2000 µm arasında değişen mikrokistlerden elde edilen kist sıvılarıyla, koyun kökenli kist hidatiklerden elde edilen kist sıvılarının SDS – PAGE yöntemiyle yapılan elektroforezi

sonucu elde edilen jel silver staining yöntemiyle boyanmış ve jelin görüntüsü Şekil 3.19'da verilmiştir.



Şekil 3.19. SDS – PAGE yöntemiyle yapılan elektroforez sonuçları

a: Marker

b, c: Mikrokist sıvısına ait protein bantları

d, e, f, g: Koyun kist hidatik sıvısına ait protein bantları

Yapılan elektoforezle mikrokistlerden elde edilen antijenden 8, 12, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 17, 19.5, 20, 22, 23.5, 24.5, 26, 27, 29, 34.5, 36,

41.5, 45, 55, 58, 68, 97, 116 kDa molekül ağırlığına sahip olan 26 protein bantı elde edilmiştir. Koyun kist hidatik sıvısından ise 8, 14, 14.5, 15, 16, 19.5, 20, 24.5, 26, 34, 41.5, 45, 55, 68, 77.5, 97, 116 kDa molekül ağırlığına sahip ve 15'i mikrokistlerden elde edilen bantlarla ortak olan 17 protein bantı elde edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Echinococcus cinsine bağlı türlerden, tüm dünyada en yaygını olan *Echinococcus granulosus,* insanlarda ve hayvanlarda sağlık ve ekonomik açıdan pek çok soruna yol açan hidatidozis hastalığına neden olmaktadır. Türkiye'de hastalık özellikle fertil kistler taşıyan koyunlarla evcil köpekler arasında seyir göstermektedir (Güralp, 1981).

Hidatidozis hastalığına neden olan bu parazitin biyolojisini, epidemiyolojisini, gelişmesini ve farklılaşmasını sağlayan mekanizmaları daha iyi anlayabilmek, ayrıca yeni mücadele yolları, teşhiste daha kolay ve daha güvenilir yöntemler geliştirebilmek için in vitro kültür çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar son yıllarda özellikle antijen üretimi, aşı geliştirme, immunodiyagnoz, farklı kimyasal madde ve ilaçların etki mekanizmalarının analizleri üzerine yoğunlaşmıştır (Tiğin ve Umur, 1989; Smyth, 1990; Altıntaş,1991a; Casado ve ark., 1996; Yoneva ve Mızınska-Boevska, 2001; Ertabaklar ve Altıntaş, 2002a; Öge ve ark.,2004).

Echinococcus granulosus'la ilgili yapılan çalışmaların daha çok parazitin larva formu olan hidatik kist üzerine yoğunlaşmış olması, in vitro kültür çalışmalarının da kistik yönde gelişim üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur (Smyth, 1962; Heath ve Osborn, 1976; Casado ve Rodriguez-Caaberio, 1989; Casado ve ark., 1992; Casado ve ark., 1996; Zhang ve ark., 2005). Bu yüzden her ne kadar parazitin strobilar yönde gelişimini incelemeye yönelik çalışmalar (Smyth, 1967; Smyth, 1971; Smyth ve Davies, 1974a; Kumaratilake ve ark., 1983; Macpherson ve Smyth, 1985; Hijjawi ve ark., 1992) olsa da araştırmaların daha çok kistik yöndeki gelişim üzerine odaklandığı görülmektedir.

Doğal enfekte arakonaklarda bulunan kistlerin yırtılmalarıyla vücut boşluğunda serbest kalan *E. granulosus* protoskoleksleri seroz dokulara

yapışarak kistik yönde gelişim gösterirler ve sekonder hidatik kistleri şekillendirirler (Smyth ve Davies, 1974b). Kist üzerinde yapılan değişik çalışmalarda iyi bir model olan bu kistleri geliştirebilmek için in vitro kültür ortamında monofazik besiyeri kullanmak gerekmektedir. Monofazik in vitro kültür ortamında protoskolekslerden kist gelişimi iki farklı yoldan olabilmektedir. Bunlardan birincisinde protoskoleksler veziküler bir form alırlar. İkincisinde ise posterior kısımlarında bir arka kese geliştirirler. Her iki form da daha sonra lamina tabakası geliştirerek kiste dönüşürler (Smyth, 1962; Rogan ve Sylvia Richards, 1986; Casado ve Rodriguez-Caabeiro, 1989).

Hidatik kistler tamamen infertil kistlerden, içlerinde çok sayıda protoskoleks içeren kistlere kadar değişik varyasyonlar gösterirler. Genellikle çimlenme kapsülleri canlı protoskoleksler kadar konağın verdiği immun yanıt sonucu ölen protoskoleksleri de içerebilirler (Coltorti ve Varela-Diaz, 1972; Smyth ve Davies, 1974b). İyi kültürlerin hazırlanabilmesi için her bir çimlenme kapsülündeki protoskolekslerin en azından %60'ının canlı olması, sitoplazmalarının temiz olması ve alev hücrelerinin aktif olmasının gerektiği değişik araştırıcılar tarafından bildirilmektedir (Smyth ve Davies, 1974b; Smyth, 1990). Bu çalışmada hidatik kistlerden elde edilen çimlenme kapsüllerinde ortalama 18 protoskoleks olduğu sayılmış ve bu protoskolekslerin % 95'inin canlı olduğu tespit edilmiştir.

Protoskolekslerin çimlenme kapsüllerinden ayrılmasını sağlamak için pepsin solüsyonuyla muamele edilmeleri gerekmektedir (Smyth, 1990; Ponce Gordo ve Cuesta Bandera, 1997; Zhang ve ark., 2005). Bu çalışmada da çimlenme kapsüllerinin pepsin solusyonuyla yıkanmasından sonra kapsüllerdeki protoskolekslerin serbest hale geçtiği ve canlılık oranının da %98'e yükseldiği saptanmıştır.

Veziküler formların kültürde ilk şekillenme zamanları ile ilgili farklı bildirimler bulunmaktadır. Smyth (1962) kültürde birkaç gün içinde, Ponce Gordo ve Cuesta Bandera (1997) 2 – 4 gün içinde veziküler gelişimin başladığını, buna karşın Heath ve Osborne (1976) kültürün ilk 14 günü içinde veziküler gelişimin olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada da protoskolekslerdeki farklılaşmanın ve gelişmenin kültürün ilk günlerinden itibaren başladığı gözlenmiş, ancak gelişen ilk veziküler formlara in vitro kültürün 5. gününde rastlanılmış ve kültürün 15. gününe kadar veziküler formların oranının arttığı belirlenmiştir.

Heath ve Osborne (1976) in vitro kültürün ilk 14 gününde vezikülasyonun yanında arka keseli formların da şekillendiğini ve bu süre sonunda protoskolekslerin % 50'sinin arka keseli forma dönüştüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmada da kültürün 15 günlük sürecinde protoskolekslerin yaklaşık % 30'unda büyük veya küçük olmak üzere arka kese geliştiği saptanmıştır.

Mikrokistlerin lamina tabakasının gelişimiyle ilgili farklı bildirimler bulunmaktadır. Smyth (1962) veziküler formlarda in vitro kültürün 46. gününde lamina tabakasının şekillenmiş olduğunu, Heath ve Osborne (1976) 28. günde lamina tabakasının gözlenmesiyle birlikte tabakanın tam şekillenmesinin 4 – 8 hafta arasında olduğunu, Ponce Gordo ve Cuesta Bandera (1997) 25 – 37 günler arasında mikrokistlerin lamina tabakalarının tam şekillendiğini, Casado ve Rodriguez – Caaberio (1989) ise lamina tabakasının 9. günden itibaren gelişmeye başladığını ve 29. günde gelişimin tamamlandığını bildirmektedir. Bu çalışmada da in vitro kültürün 30. gününe yaklaşılırken veziküler formlarda lamina tabakasının gelişmeye başladığı ve 30. gün ve sonrasında bu formlarda lamina tabakasının tam olarak şekillendiği gözlenmiştir.

Arka keseli formlarda lamina tabakasının gelişimi veziküler formlara göre daha geç şekillenmektedir. Smyth (1962) arka keseli formlarda in vitro kültürün 46. gününden sonra lamina tabakasının tüm formu kaplayarak görünür hale geldiğini bildirmiştir. Bu çalışmada kültürde 30. günden sonra arka keseli formların lamina tabakası geliştirmeye başladığı, 60. günden sonra ise bu formlarda lamina tabakasının tam olarak şekillendiği tespit edilmiştir.

Yapılan in vitro kültür çalışmalarında veziküler formların lamina tabakası geliştirerek mikrokist formuna dönüşmelerinin kültürün yaklaşık 30. günü civarında gerçekleştiği değişik araştırıcılar (Casado ve Rodriguez – Caaberio, 1989; Ponce Gordo ve Cuesta Bandera, 1997) tarafından bildirilmekle birlikte, Heath ve Osborne (1976) bu sürenin yaklaşık 60. güne kadar uzayabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada veziküler formların mikrokist formuna kültürün yaklaşık 30. günü civarında geçtikleri tespit edilmiştir. Arka keseli formlardan mikrokist şekillenmesinin ise 46. günden sonra olduğu Smyth (1962) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada ise arka keseli formların mikrokist formuna dönüşmelerinin kültürün yaklaşık 60. günü civarında olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan in vitro kültür çalışmalarında araştırıcılar mikrokist gelişimini farklı günlere kadar takip etmişler ve değişik çapta kistler elde etmişlerdir. Zhang ve ark. (2005) in vitro kültürün 56. günü sonunda mikrokistlerin ortalama çapının 329 µm'ye ulaştığını, Smyth (1962) in vitro kültürün 80. günü sonunda mikrokistlerin ortalama çapının 547 µm'ye ulaştığını, Casado ve ark. (1992) in vitro kültürün 90. günü sonunda mikrokistlerin ortalama çapının 880 µm'ye ulaştığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada mikrokist gelişimi 152 gün boyunca takip edilmiş, in vitro kültürün 56. gününde mikrokistlerin ortalama çapı 481 µm, 80. gününde 789 µm, 90. gününde 1020 µm, 120. gününde 1581 µm, 152. gün sonunda ise 2670 µm olarak ölçülmüştür. Elde ettiğimiz mikrokistlerin ortalama çapı diğer çalışmalarda (Smyth, 1962; Casado ve ark., 1992; Zhang ve ark., 2005) elde edilenlerden nispeten daha

fazla olmuştur. Kullanılan besi yerinin ve kültür koşullarının diğer çalışmalarla benzerlik göstermesine rağmen bu çalışmada nispeten daha büyük kistler gelişmesinin manipülasyonlarla ve kültür koşullarının sabit tutulmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Ponce Gordo ve Cuesta Bandera (1997), 50 günlük in vitro kültür sonunda protoskolekslerden gelişen mikrokist oranının % 1 – 10 arasında olduğunu, Zhang ve ark. (2005) ise bu oranın 56 günlük kültür sonunda % 10 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise 150 günlük kültür sonucu protoskolekslerin yaklaşık % 7'si mikrokist formuna dönüşmüştür. Bu oranın kültür koşullarıyla ilişkili olduğu, besiyerinin uzun süre değiştirilmemesi, pH'sının yükselmesi ya da kültür ortamının gaz fazındaki değişimler gibi durumların gelişen mikrokist oranına yansıdığı düşünülmektedir.

Çalışmada in vitro ortamda kistik yönde geliştirilen protoskolekslerin büyüme grafikleri hazırlanmış ve çaplarının zamana göre regresyon analizi ile üç farklı modellemesi yapılmıştır. Yapılan literatür taramasında *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin in vitro kültür ortamında kistik yönde gelişimiyle ilgili hazırlanan herhangi bir matematiksel modele rastlanmamıştır. Bu çalışmada kullanılan linear, kuadratik ve kübik modellemelerle birlikte üç farklı formül elde edilmiş ve bu formüllerle belirlenen bir kültür gününde kist çapının ortalama kaç µm olacağı ya da belirlenen bir kist çapına kültürün yaklaşık kaçıncı gününde ulaşılacağının hesaplanabildiği görülmüştür. Bu formüllerin benzer koşullarda *E. granulosus* protoskoleksleriyle in vitro kültür çalışmaları yapacak araştırıcılara yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

Hidatik kist sıvılarından elde edilen antijenlerin elektroforezi ve elektroforezi takiben yapılan western blotla hidatidozun rahatça teşhisi yapılabilmektedir. Yine ELISA gibi çeşitli teşhis metotlarında bu antijenler kullanılmaktadır. Teşhis metotlarının yanında aşı geliştirme çalışmalarında da

kist sıvısından elde edilen antijenlerden yararlanılmaktadır. Koyun kökenli kist hidatik sıvısının SDS – PAGE yöntemiyle elektroforezi sonucu çeşitli araştırıcılar, değişik moleküler ağırlığa sahip protein bantları tespit etmişlerdir. Şimşek ve Köroğlu (2004) bu yöntemle 29, 45, 58, 68, 98 ve 116 kDa'luk bantlar, Kanwar ve ark. (1992) 8, 29, 45, 66 ve 116 kDa'luk bantlar, Maddison ve ark. (1989) 6, 8, 14, 20, 29, 42, 66, 97, 116 ve 200 kDa'luk bantlar, Çelik (2006) ise 6.5 – 8, 14.2, 20, 29, 45, 50, 66, 116, 120, 205, 215 kDa'luk bantlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada koyun kökenli kist hidatik sıvısından 8, 14, 14.5, 15, 16, 19.5, 20, 24.5, 26, 34, 41.5, 45, 55, 68, 77.5, 97, 116 kDa molekül ağırlığına sahip 17 protein bantı elde edilmiştir.

İn vitro kültürde geliştirilen mikrokistlerin elektroforezi sonucunda ise 8, 12, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 17, 19.5, 20, 22, 23.5, 24.5, 26, 27, 29, 34.5, 36, 41.5, 45, 55, 58, 68, 97, 116 kDa molekül ağırlığına sahip olan 26 protein bantı elde edilmiştir. Elde edilen protein bantı sayısının koyun kökenli kist sıvısına göre çok olmasının, kullanılan besiyeri ve besiyerine ilave edilen fötal bovin serumu ile kist sıvısı arasında gerçekleşen alışverişe bağlı olduğu düşünülmektedir. Mikrokistlerden elde edilen protein bantlarının sayısı koyun kökenli kist sıvısına göre çok olmakla birlikte Çelik (2006) tarafından hastalığa spesifik bulunan 8, 20, 45, 116 kDa ve Burgu ve ark. (2000) tarafından hastalığa spesifik bulunan 8, 68 ve 116 kDa'luk bantlara sahip olması elde edilen mikrokistlerin antijenik değerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlarla in vitro kültürde geliştirilen mikrokistlerin geliştirilen teşhis metotlarında ve bir adım sonrasında aşı geliştirme çalışmalarında iyi bir antijen kaynağı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada koyun kökenli *Echinococcus granulosus* protoskoleksleri in vitro kültürde kistik yönde geliştirilerek mikrokistler elde edilmiştir. Geliştirilen kistler 5 ay boyunca takip edilerek büyüme grafikleri çıkarılmış, 5. ay sonunda kistlerin minumum çapları 1962 µm, maksimum çapları ise 3179 µm olarak kaydedilmiştir. Elde edilen mikrokistler; konak baskısı olmaksızın kiste ait biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerin incelenmesi, antijen üretimi, immunodiyagnoz ve aşı geliştirme çalışmaları, patogenezde rol oynayan metabolizmaların incelenmesi, farklı kimyasal madde ve ilaçların etki mekanizmalarının analizleri gibi pek çok değişik çalışmada kullanılabilecek bir model oluşturmaktadır. Ayrıca geliştirilen bu model kistler arakonaklardan zaman zaman kist bulma zorluğunun da aşılmasını ve deney hayvanı kullanımının azalmasını sağlayacaktır.

Geliştirilen kistlerin SDS – PAGE yöntemiyle yapılan elektroforezinde daha önceki çalışmalarda hastalığa spesifik olarak bulunan 8, 20, 45, 68, 116 kDa'luk protein bantlarına rastlanılması, in vitro kültürde elde edilen mikrokistlerin de antijenik değerinin yüksek olduğunu ve çeşitli teşhis metotlarında ve aşı geliştirme çalışmalarında iyi bir antijen kaynağı olarak bu kistlerin kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Yapılan in vitro kültür çalışmasının ve protein analizinin bundan sonra Echinococcus cinsiyle ya da diğer helmint türleriyle yapılacak in vitro kültür çalışmalarına ışık tutacağı kanısındayız. Ayrıca elde edilen mikrokistlerin iyi bir antijen kaynağı olarak kullanılabileceğini, bundan sonraki çalışmalarda daha kısa sürede, daha büyük mikrokistler geliştirilmesinin hedeflenebileceğini, dolayısıyla elde edilecek antijen miktarlarında da artma sağlanabileceği düşüncesindeyiz.

ÖZET

Echinococcus granulosus Protoskolekslerinin İn Vitro Ortamda Gelişimi ve Protein Yapılarının SDS – PAGE Yöntemi ile Belirlenmesi

Hidatidozis, *Echinococcus* cinsine ait türlerin larva şekillerinin (metacestod) insan ve hayvanlarda oluşturduğu, hem sağlık hem de ekonomik yönden oldukça önemli, zoonotik bir hastalıktır. Türkiye'de hidatidozdan sorumlu Ekinokok türlerinden en yaygın olanı *Echinococcus granulosus*'dur.

Bu çalışmada koyun kökenli hidatik kistlerden elde edilen protoskolekslerin monofazik in vitro kültürde kistik yönde gelişiminin incelenmesi ve in vitro kültür sonucunda elde edilen mikrokistlerin protein yapılarının SDS – PAGE yöntemiyle belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada in vitro kültür ortamında protoskolekslerden veziküler ve arka keseli formların geliştiği, daha sonra bu iki formunda etrafında laminar tabakanın şekillenerek formların mikrokist haline geldikleri gözlendi. İn vitro kültürde gelişen formlar 152 gün boyunca takip edildi ve kültür sonunda çapları ortalama 2561 µm olan mikrokistler elde edildi. Çalışmada kültürde geliştirilen mikrokistlerin kist sıvısı ve koyunlardan elde edilen hidatik kistlerin sıvısı SDS – PAGE yöntemiyle elektroforeze tabi tutularak protein yapıları ortaya kondu ve iki kist formunun protein yapıları karşılaştırıldı. İn vitro kültürde geliştirilen mikrokistlerin elektroforezinde daha önceki çalışmalarda hastalığa spesifik olarak bulunan ve koyun kökenli hidatik kistlerde de bulunan 8, 20, 45, 68, 116 kDa'luk protein bantlarına rastlanılması, in vitro kültürde elde edilen mikrokistlerin de antijenik değerinin yüksek olduğunu ve çeşitli teşhis metotlarında ve aşı geliştirme çalışmalarında iyi bir antijen kaynağı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca pek çok çalışmada model olarak kullanılabilecek in vitro kültürde geliştirilmiş bu kistler arakonaklardan kist bulma zorluğununda aşılmasını ve deney hayvanı kullanımının azaltılmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Echinococcus granulosus*, protoskoleks, in vitro kültür, SDS – PAGE.

SUMMARY

Development of *Echinococcus granulosus* Protoscoleces *in vitro* and determination of protein structures by SDS – PAGE.

Hidatidosis is economically very important zoonotic disease and also at medical aspects that is occured by larval stages of Echinococcus spp. In Turkey, *Echinococcus granulosus* is the most common species releated to hidatidosis.

In this study it's aimed that inspection of cystic development of protoscoleces in monophasic in vitro culture and determination of protein structures extracted from microcysts at the end of the in vitro culture by SDS-PAGE. It's monitored that vesicular and posterior bladder forms are developed from protoscolex in vitro culture, and these two forms are developing to microcysts by covering with laminated membran. Developing forms in vitro culture were observed 152 days and end of the culture, microcysts were obtained with 2561 µm awarage diameter. In the study, the protein structure of cystic fluid of microcysts developed in vitro culture and of hidatic cysts develop in sheeps were determined by SDS-PAGE and their protein aspects were compared. In the protein structure analysis of microcysts, the protein bands in 8, 20, 45, 68, 116 kDa weight were seemed observed also in hidatic cysts of sheeps exemined in the several researchs; this result indicated that microcysts are very important antigenic source that can be used for investigation of detection methods and vaccination programs. In addition, microcysts production by in vitro cultivation provide easier alternative to cyst production in laboratory animals and to cysts collection from intermediated hosts that has mostly difficulty in these aspect.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, protoscoleces, in vitro cultivation, SDS – PAGE.

KAYNAKLAR

ALPAR, R. (2001). Spor Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik. 2. Basım. Ankara: Nobel Yayınevi.

ALTINTAŞ, N. (1991a). Ekinokokların in vitro üretilmesi. Unat E.K. ve ark., ed. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis). Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:10, s: 43 – 54.

ALTINTAŞ, N. (1991b). SDS – Polyacrylamide gel elektroforezi ile proteinlerin seperasyonu. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **15**: 119 – 129.

ALTINTAŞ, N., YOLASIĞMAZ, A. (1997). Proteinlerin analizi ve SDS – PAGE. Özcel, M.A., Altıntaş, N., Ed. Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15, s: 321 – 341.

ASLAN, M. Ö.,UMUR, Ş. (1997). Erzurum mezbahalarında kesilen koyun ve sığırlarda hidatidozun yayılışı ve ekonomik önemi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.,* **3**: 167 – 171.

ATAŞ, D. A., ÖZÇELİK, S., SAYGI, G. (1997). Sivas sokak köpeklerinde helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. *Türkiye Parazitol. Derg*., **21**: 305 – 309.

AYÇİÇEK, H., SARIMEHMETOĞLU, H.O., TANYÜKSEL,M., ÖZYURT, M., GÜN, H. (1998). Ankara sokak köpeklerinde görülen bağırsak helmintlerinin yayılışı ve bunların halk sağlığı bakımından önemi. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **22**: 156 -158.

AYDENİZÖZ, M. (1997). Konya yöresi köpeklerinde helmintolojik araştırmalar. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **21**: 429 – 434.

BERNTZEN, A. K. (1961). The in vitro culture of tapeworms. I. Growth of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *J. Parasitol*., **47**: 351.

BURGU, A., DOĞANAY, A., GÖNENÇ, B., SARIMEHMETOĞLU, O., KALINBACAK, F. (2000). Analysis of fluids of hydatid cysts from sheep by SDS – PAGE and determination of spesific antigens in protein structure by western blotting. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.,* **24**: 493 – 500.

CASADO, N., RODRIGUEZ – CAABEIRO, F. (1989). Ultrastructural study of in vitro larval development of *Echinococcus granulosus* protoscolex*. Int. J. Parasitol.,* **19**: 21 – 28.

CASADO, N., PEREZ-SERRANO, J., DENEGRI, G., RODRIGUEZ-CAABERIO, F. (1996). Development of a chemotherapeutic model for the in vitro screening of drugs againts *Echinococcus granulosus* cysts: The effects of an albendazole – albendazole sulphoxide combination. *Int.J.Parasitol.,* **26**: 59 – 65.

CASADO, N., CRIADO, A., JIMENEZ, A., DE ARMAS, C., BRASA, C., PREZ-SERRANO, J., RODRİGUEZ - CAABERIO, F. (1992). Viability of *Echinococcus granulosus* cysts in mice following cultivation in vitro. *Int.J.Parasitol.,* **22**: 335 – 339.

CELEP, A., AÇICI, M., ÇETİNDAĞ, M., COŞKUN, Ş. Z., GÜRSOY, S. (1990). Samsun yöresi sığırlarında helmintolojik çalışmalar. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.,* **6**: 117 – 130.

COLTORTI, E.A., VARELA-DIAZ, V.M. (1972). IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *J. Parasitol*., **58**: 753 – 756.

CROSS, J.H. (1994). Nematode – Cestode Zoonoses. Ed:Chowdhury N, Tada I. Helmintology. New Delhi: Springer Verlag – Narosa.

ÇELİK, T. (2006). *Echinococcus granulosus* Antijenlerinin İzolasyonu ve Tanıdaki Değerlerinin Araştırılması. Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enst., Doktora Tezi, Ankara.

ÇİVİ, S., GÜLER, S., KESKİ, S., (1995). Konya EBK ve KONET tesisleri kayıtlarına göre kist hidatid nedeniyle oluşan ekonomik kayuplar. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **19**: 237 – 242.

DALDAL, N. (2001). Malatya' da ekinokokkozis. 1. Ulusal Hidatidoloji Kong., 8 Haziran, Kuşadası. Özet kitabı. s: 29.

DEĞER, S., AYAZ, E., GÜL, A., ERASLAN, E. (2001). Van yöresinde hidatidozis. 1. Ulusal Hidatidoloji Kong., 8 Haziran, Kuşadası. Özet kitabı. s: 42.

DİK, B., CANTORAY, R., HANDEMİR, E., (1992). Konya et ve balık mezbahasında kesilen küçük ve büyükbaş hayvanlarda hidatidozun yayılışı ve ekonomik önemi. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **16**: 91- 99.

DİK, B., SEVİNÇ, F., KÖSE, M. (1999). Koyunlarda kistik ekinokokozun indirekt hemaglutinasyon testi ile teşhisi. 11. Ulusal Parazitol. Kong., 6 – 10 Eylül, Sivas. Özet kitabı. s: 131.

DOĞANAY, A. (1983). Ankara köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.,* **30**: 550 – 561.

DOĞANAY, A., KARA, M. (1998). Hayvan sağlığı yönünden ekinokokkozun Türkiye'de ve dünyadaki epidemiyolojisi ve profilaksisi. *T. Klin. J. Surgery,* **3**: 171 – 181.

DOĞANAY, A., BURGU, A., GÖNENÇ, B., SARIMEHMETOĞLU, O. (2000). Koyun kist hidatik protoskolekslerinin protein yapısının analizi ve spesifik antijenlerin saptanması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.,* **47**: 63 – 71.

DUNN, A.M. (1978). Veterinary Helmintology. Second ed. London: William Heineman Medical Books Ltd, p: 119 – 120.

EBK istatistikleri; 1993 - 2003 yılları arası kesim sonuçları.

ECKERT, J., FRIEDHOFF, K.T., ZAHNER, H., DEPLAZES, P. (2005). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Stuttgart: Enke Verlag.

ERTABAKLAR, H., ALTINTAŞ, N. (2002a). *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin in vitro larval gelişiminin gözlenmesi. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **26**: 183 – 185.

ERTABAKLAR, H., ALTINTAŞ, N. (2002b). Albendazole ve Mebendazole'ün *Echinococcus granulosus*'un minyatür kistleri üzerindeki in vitro etkisinin araştırılması. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **26**: 396 – 399.

ESATGİL, M. U. (2001). Trakya' da kasaplık hayvanlarda hidatidozun yaygınlığı. 12. Ulusal Parazitol. Kong., 24 – 28 Eylül, Elazığ. Özet kitabı. s: 77.

GICIK, Y., ARSLAN, M.Ö., KARA, M., KÖSE, M. (2004). Kars İlinde kesilen sığır ve koyunlarda ekinokokkozisin yaygınlığı. *Türkiye Parazitol. Derg.* **28**: 136 – 139.

GÜRALP, N. (1981). Helmintoloji. 2. baskı. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayın, 368/266. A. Ü. Basımevi, s: 221 – 239.

HASSLİNGER, M. A., BURGU, A., EL-SEİFY, M.A., EL-ASSALY, T.(1993). Comparative studies of the helminth status of stray dogs human health consequences. *Tierarztliche Umaschau,* **48**: 596 – 606.

HEATH, D.D., LAWRENCE, S.B. (1976). *Echinococcus granulosus*: development in vitro from oncosphere to immature hydatid cyst. *Parasitology,* **73**: 417 – 423.

HEATH, D.D., LAWRENCE, S.B. (1981). *Echinococcus granulosus* cysts: early development in vitro in the presence of serum from infected sheep. *Int.J.Parasitol.,* **11**: 261 – 266.

HEATH, D.D., LAWRENCE, S.B. (1996). Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of proctetive molecules. *Parasite Immunol.*, **18**: 347 – 357.

HEATH, D.D., OSBORN, P.J. (1976). Formation of *Echinococcus granulosus* laminated membrane in a defined medium. *Int.J.Parasitol.,* **6**: 467 – 471.

HEATH, D.D., SMYTH, J.D. (1970). In vitro cultivation of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *T.ovis*, *T.pisiformis* and *T.serialis* from oncosphere to cystic larva. *Parasitology,* **61**: 329 – 343.

HIJJAWI, N.S., ABDEL – HAFEZ, S.K., AL – YAMAN, F.M. (1992). In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* of sheep and donkey orijin from Jordan. *Parasitol. Res.,* **78**: 607 – 616.

HOLCMAN, B., HEATH, D.D., SHAW, R.J. (1994). Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacestode development of *Echinococcus granulosus. Int. J. Parasitol.,* **24**: 623 – 635.

HÖKELEK, M. (1999). Samsun yöresinde echinococcosis sorunu. 11. Ulusal Parazitol. Kong., 6 – 10 Eylül, Sivas. Özet kitabı. s: 75-76.

HÖKELEK, M. (2001). Samsun yöresinde echinococcosis sorunu. 12. Ulusal Parazitol. Kong., 24 – 28 Eylül, Elazığ. Özet kitabı. s: 46.

KANWAR, J.R., KAUSHIK, S.P., SAWHNEY, I.M.S., KAMBOJ, M.S., MEHTA, S.K., VINAYAK, V.K. (1992). Spesific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. *J. Med. Microbiol.*, **36**: 46 – 51.

KAPLAN, M., GÖDEKMERDAN, A., KUK, S., BURMA. S. (2001). 1998-2000 Yılları arasında Elazığ ilinde saptanan uniloküler kistik ekinokokkoz olguları. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **25**: 139-141.

KÖKSAL, F., SERİN, M.S., KEKEÇ, Y., SADR, Y.E. (1995). İnsan ve hayvan kökenli kist hidatik sıvılarının SDS – PAGE metoduyla analizi ve Westernblot metodunun klinik önemi. *Türkiye Parazitol. Derg.*, **19**: 221 – 229.

KUMARATILAKE, L.M., THOMPSON, R.C.A., DUNSMORE, J.D. (1983). Comparative strobilar development of *Echinococcus granulosus* of sheep origin from different geographical areas of Australia in vivo and in vitro. *Int. J. Parasitol.,* **13**: 151 – 156.

LAPAGE, G. (1968). Veterinary Parasitology. Second ed. Edinburg and London: Olivier and Boyd Ltd., p: 429 – 435.

MACPHERSON, C.N.L., SMYTH, J.D. (1985). In vitro cultivation of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* from protoscoleces of human, camel, cattle and goat origin from Kenya and buffalo origin from India. *Int. J. Parasitol.,* **15**: 137 – 140.

MADDISON, S.E., SLEMENDA, S.B., SCHANTZ, P.M. (1989). A spesific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **40**: 377 – 383.

MERDİVENCİ, A. (1976). Türkiye'de Hidatik Kist Hastalığı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. No: 2145.

MERDİVENCİ, A., AYDINLIOĞLU, K. (1982). Hidatidoz (Hidatik Kist Hastalığı). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları No:2972.

MİMİOĞLU, M., GÜRALP, N., SAYIN, F. (1959). Ankara köpeklerinde görülen parazit türleri ve bunların yayılış nisbeti. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.,* **6**: 53 – 68.

MORRIS, D.L., RICHARDS, K.S. (1992). Hydatid Disease. Oxford: Butterworth Heinemann.

ÖGE, S., SARIMEHMETOĞLU, O., BURGU, A. (2004). Echinococcus türlerinin in vitro ve in vivo kültürleri. Altıntaş,N., Tınar, R., Çoker,A., ed. Echinococcosis. Hidatidoloji Derneği Yayın no:1, s: 55 – 74.

ÖGE, H., KALINBACAK, F., GICIK, Y., YILDIZ, K., (1990). Ankara yöresinde kesilen koyun, keçi, ve sığırlarda bazı metasestodların (Hidatik kist, *Cysticercus tenuicollis, Cysticercus bovis*) yayılışı. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **45**: 123 – 130.

ÖZBEK, A. (1999). Erzurum'da uniloküler ve multiloküler hydatid tanısı konmuş hastaların Ocak 1997 – Nisan 1999 yılları arasında dağılımı ve 1998 yılı için

Erzurum EBK'da kesim yapılan hayvanlarda tespit edilen Echinococcus hydatidosis oranı. 11. Ulusal Parazitol. Kong., 6 – 10 Eylül, Sivas. Özet kitabı. s: 82.

ÖZCAN, K. (2001). Adana ve Mersin yöresinde kistik ekinokokoz. 1. Ulusal Hidatidoloji Kong., 8 Haziran, Kuşadası. Özet kitabı. s: 30.

ÖZÇELİK, S., SAYGI, G., (1990). Sivas mezbahasında kesilen koyun ve sığırlarda kist hidatik görülme oranları. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **1**: 41 – 44.

PONCE GORDO, F., CUESTA BANDERA, C. (1997). *Echinococcus granulosus*: characterization of the Spanish strains using in vitro vesicular development. *J. Helminthol.,* **71**: 61 – 67.

ROBERTS, L.S., JANOVY, J. (2006). Foundations of Parasitology. Seventh Edition. New York: McGraw-Hill.

ROGAN, M.T., SYLVIA RICHARDS, K. (1986). In vitro development of hydatid cysts from posterior bladders and ruptured brood capsules of equine *Echinococcus granulosus*. *Parasitology,* **92**: 379 – 390.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANNIATIS, T. (1989). Molecular Coloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor. p: 18.47 – 18.76.

SAYGI, G., ÖZÇELİK, S., TEMİZKAN, N. (1990). Sivas sokak köpeklerinin ince bağırsaklarında bulduğumuz helmintler. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **1**: 81 – 93.

SCHANTZ, P.M. (1982). Echinococcosis. Steele, J.H. eds. CRC Handbook Series in Zoonoses. Section C: Parasitic Zoonoses Volume I. Florida: CRC Press. p: 231 – 277.

SCHILLER, E.L. (1965). A simplified method for the in vitro cultivation of the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *J.Parasitol*., **51**: 516.

SMYTH, J.D. (1962). Studies on tapeworm physiology, X. Axenic cultivation of the hydatid organism. *Echinococcus granulosus;* establishment of a basic tecnique. *Parasitology,* **52**: 441 – 457.

SMYTH, J.D. (1967). Studies on tapeworm physiology, XI. In vitro cultivation of *Echinococcus granulosus* from the protoscolex to the strobilate stage. *Parasitology,* **57**: 111 – 133.

SMYTH, J.D. (1971). Development of monozoic forms of *Echinococcus granulosus* during in vitro culture*. Int. J. Parasitol.,* **1**: 121 – 124.

SMYTH, J.D. (1976). Introduction to Animal Parasitology. Second Ed. London: Hadder and Stoughton.

SMYTH, J.D. (1981). Introduction to Animal Parasitology. London: Hodder and Stoughton, p: 423 – 446.

SMYTH, J.D. (1990). In Vitro Cultivation of Parasitic Helminths. Florida: CRC Press.

SMYTH, J.D., DAVIES, Z. (1974a). Occurrence of physiological strains of *Echinococcus granulosus* demonstrated by in vitro culture of protoscoleces from sheep and horse hydatid cysts. *Int. J. Parasitol.,* **4**: 443 – 445.

SMYTH, J.D., DAVIES, Z. (1974b). In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): A review of basic problems and results. *Int. J. Parasitol.,* **4**: 631 – 644.

SOULSBY, E.J.L. (1982). Helmints, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Seventh Ed. London: The English Language Book Society and Bailliere Tindall.

ŞAHİN, I., EKİNCİ, N., ŞEN, I., ÖZCAN, M., GÖDEKMERDAN, A. (1993). Kayseri yöresi köpeklerinde Echinococcus granulosus (Batsch,1876) ve diğer parazitlerin yayılışı. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **17**: 69 – 76.

ŞENLİK, B. (2000). Bursa yöresi koyunlarında hidatidoz' un yaygınlığı ve yaş, ırk, cinsiyet ile ilişkisi. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **24**: 304 – 308.

ŞENLİK, B. (2004). Echinococcus Türlerinin Gelişmeleri. Ed: Altıntaş, N., Tınar, R., Çoker, A. Echinococcosis. Hidatidoloji Derneği Yayın No:1, s: 31 – 44.

ŞENLİK, B., DİKER, A.İ. (2004). Echinococ'ların Taksonomisi ve Morfolojisi. Ed: Altıntaş, N., Tınar, R., Çoker, A. Echinococcosis. Hidatidoloji Derneği Yayın No:1, s: 13 – 30.

ŞİMŞEK, S., KÖROĞLU, E. (2004). Evaluation of enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme – linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid disease in sheep. *Acta Tropica*, **92**: 17 – 24.

TAYLOR, A.E.R., BAKER, J.R. (1987). In Vitro Methods for Parasite Cultivation. Florida: Academic Pres.

TENTER, A.M., SCHNIEDER, T. (2006). Erreger von Parasitosen: Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale. Schnieder, T. eds. Veterinärmedizinische Parasitologie. Stuttgart: Parey. p: 26 – 59.

THOMAS, C. C. (1974). General Parasitology. Second Press. London: Academic Press, Inc. Ltd. p: 510 – 515.

TINAR, R. (2004). Echinococcosisin tarihçesi. Ed: Altıntaş, N., Tınar, R. Echinococcosis. Hidatidoloji Derneği Yayın No:1, s: 1 – 13.

TINAR, R., COŞKUN, Ş.Z. (1991). Hayvanlarda kist hidatik (Echinococcoses). İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis), ed.: Unat E.K. ve ark. Türkiye Parazitoloji Dern. Yayın., No.10, s: 157 – 196.

TİĞİN, Y., UMUR, Ş. (1989). *Echinococcus granulosus* ve *E.multilocularis*'in in vitro kültürü. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **36**: 775 – 781.

TİĞİN, Y., BURGU, A., DOĞANAY, A. (1991). Hayvanlarda ekinokok türleri (*Echinococcus* sp.). İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis), ed: Unat E.K. ve ark. Türkiye Parazitoloji Dern. Yayın. No.10, s: 129 – 155.

TOPARLAK, M., GÜL, Y. (1989). Van ili belediye mezbahasında kesilen hayvanlarda hidatidozun yayılışı. *Ankara Üniv. Vet. Fak.Derg.,* **1**: 129 – 137.

TUĞRUL, M. (1999). Hidatidozun Trakya' daki durumu. 11. Ulusal Parazitol. Kong., 6 – 10 Eylül, Sivas. Özet kitabı. s: 45.

TUĞRUL, M. (2001). Hidatidozun Trakya' daki epidemiyolojisi. 12. Ulusal Parazitol. Kong., 24 – 28 Eylül, Elazığ. Özet kitabı. s: 75 – 76.

TÜRKMEN, H. (1992). Mandalarda (Bubalus bubalıs Linnaeus, 1758) hydatidosis. *Türkiye Parazitol. Derg.* **16**: 31 – 45.

UMUR Ş. (2003). Prevalence and economic importance of hydatidosis in slaughtered ruminants in Burdur. *Turkey. J. Vet. Med.,* **50**: 247 – 252.

UMUR, Ş., ASLANTAŞ, Ö., (1993). Kars belediyesi mezbahasında kesilen ruminantlarda hidatidazun yayılışı ve ekonomik önemi. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **17**: 27 – 34.

UMUR, Ş., ARSLAN M.Ö. (1998). Kars yöresi sokak köpeklerinde görülen helmint türlerinin yayılışı. *Türkiye Parazitol. Derg.,* **22**: 188 – 193.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J., DUNCAN, J.L., DUNN, A.M., JENNINGS, F.W., (1996). *Veterinary Parasitology.* Second Ed. Oxford: Alden Press.

ÜNER, A. (1989). İzmir ve civarında köpeklerde *E. granulosus* (Batsch, 1786) üzerindeki araştırmalar. *Türkiye Parazitol. Derg*., **1**: 103 – 112.

VOGE, M. (1975). Axenic development of cysticercoids of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *J. Parasitol*., **61**: 563.

YAMAGUTİ, S. (1959). Systema Helminthum. Volume II. The Cestodes of Vertebrates. New York: Interscience Publishers Inc. p: 441 – 443.

YILMAZ, H., ÇİÇEK, M. (2001). Van yöresinde hidatidoz. 12. Ulusal Parazitol. Kong., 24 – 28 Eylül, Elazığ. Özet kitabı. s: 43.

YONEVA, A., MIZINSKA-BOEVSKA, Y. (2001). In vitro cultivation of helminths and establishment of cell culture. *Exp. Pathol. Parasitol.,* **4**: 3 – 8.

ZEYBEK, H., TOKAY, A. (1990). Ankara yöresinde evcil ve yabani canidae'lerde Echinococcus türlerinin yayılışı, cyst şekillerinin ensidansı ve kontrol olanaklarının araştırılması. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg*., **6**: 1 – 19.

ZHANG, W., JONES, M.K., LI, J., McMANUS, D.P. (2005). *Echinococcus granulosus*: Pre-culture of protoscoleces in vitro significantly increases

development and viability of secondary hydatid cyst in mice. *Exp.Parasitol.,* **11**: 88 – 90.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Cenk Soner

Soyadı: BÖLÜKBAŞ

Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa 05.07.1978

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Bekar

Askerlik Durumu: Tecilli

İletişim Adresi ve Telefonu: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı 06110 Dışkapı / Ankara
GSM: 0533 2819466

II. Eğitimi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2002)
Ankara Anıttepe Lisesi (1994)
Konya Karma Ortaokulu (1991)
Konya Yavuz Sultan Selim İlkokulu (1988)

Yabancı Dil: İngilizce (İYİ DÜZEYDE), Almanca (ORTA DÜZEYDE)

III. Ünvanları

Veteriner Hekim (2002)
Araştırma Görevlisi (2005)

IV. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türkiye Parazitoloji Derneği

V. Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları

Bölükbaş CS, Avcıoğlu H, Öge S. (2006). Geviş getiren hayvanlarda önemli nematod hastalıkları. Vilsan Derg., 3: 14 – 15.

Bölükbaş CS, Doğanay A. (2007). Helmint Enfeksiyonlarında Alternatif kontrol yaklaşımları. Türkiye Parazitol Derg. (Baskıda).

Avcıoğlu H, **Bölükbaş CS**, Öge S. (2007). Geviş getiren hayvanlarda önemli trematod, cestod hastalıkları ve sağaltım seçenekleri. Vilsan Derg., 7: 16 – 17.

Kongre Bildirileri

Burgu A, Doğanay A, Öge S, Sarımehmetoğlu O, Gönenç B, **Bölükbaş CS**. (2006). Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde Echinococcosis Çalışmaları. (Yuvarlak Masa 2) 3.Ulusal Hidatidoloji Kongresi 6 – 9 Eylül, Samsun.

VI. Bilimsel Etkinlikleri

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yürütülen projelere, rutin laboratuvar tetkiklerine ve teorik, pratik derslere katılım.

Katıldığı Kongreler

2. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 15 – 18 Eylül 2004, Bursa
14. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 18 – 25 Eylül 2005, İzmir
3.Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 6 – 9 Eylül 2006, Samsun

Verdiği Seminerler

1. Helmint Enfeksiyonlarında Alternatif Kontrol Yöntemleri
2. Echinococcus granulosus'un İn Vitro Kültürü

VII. Diğer Bilgiler

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Müzik Topluluğu Üyeliği