

# Aksenik Kültürlerde *Acanthamoeba* Trofozoitleri Üzerindeki Gözlemler ve Bunların Farklı Boyalarla Boyanma Özellikleri

Zübeyde AKIN POLAT<sup>1</sup>, Semra ÖZÇELİK<sup>1</sup>, Ayşe VURAL<sup>2</sup>, Gülendame SAYGI<sup>1</sup>

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Parazitoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Sivas

**ÖZET:** *Acanthamoeba* türleri toprak ve tatlı sularda özgür yaşayan amiplerdir. Bunlardan bazıları burun ve diğer yollardan girip yerleşerek parazitik yaşama uyum sağlayabilmektedir. Bu durumda insanda granülatöz amibik ensefalit (GAE), keratit, kronik sinüzit, otit gibi parazitozlara yol açabilir. GAE ölüme yol açabilirken, *Acanthamoeba* keratitinde gözün biri veya her ikisi birden kaybedilebilir. Bu çalışma yurt dışından (Viyana, Avusturalya) getirilen *Acanthamoeba castellanii* ve *A. hatchetti* türleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her iki türün kültüründe, besleyici değeri olmayan agar ve PPYG (Proteaz Pepton- Maya Özütü-Glukoz) besiyerleri kullanıldı. Çalışmada bu türlerin trofozoit ve kist şekilleriyle ilgili olarak şu noktalar üzerinde durulmuştur: (i). Aksenik kültürlerde gözlenen morfolojik özellikler, (ii). İki trofozoit arasında, önceki çalışmalarımızda da gözlediğimiz ve diğer bazı araştırmacıların da belirttikleri konjugasyon benzeri görünümlerinin izlenmesi, (iii). Trofozoitlerin çeşitli boylarla boyanma özelliklerini inceleme. Gözlemlerimize göre: (i).. Aksenik sıvı besiyerinde birden fazla çekirdeğe sahip trofozoitlerin sayısı oldukça çoktur. (ii). Aynı besiyerinde aralarında ince bir köprü (veya kanal) oluşmuş trofozoitler gözlenmiştir. Bu birliktelik görünüşe göre en az 200 dakika sürmektedir. İnverted microscope altında sürdürülen gözlemlerde iki trofozoitle de çekirdek bölünmesinin gerçekleştiği (bu amiplerin çekirdek ve çekirdekcikleri canlı durumda görülebilmektedir) izlenimi edinilmiştir. Bu izlenim sonucunda da bu pazisyonda iki trofozoit arasında konjugasyon benzeri bir genetik materyal alış-verişi akla gelmektedir. (iii). Her iki *Acanthamoeba* türünde kullandığımız boylarla (Heidenhain'in demirli hematoksilen, Giemsa, PAS, Masson Trikrom, Toludin-O gibi) boyanabildikleri görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Acanthamoeba*, morfolojik görünüm, konjugasyon

## Observations on *Acanthamoeba* Trophozoites in Axenic Cultures and Their Staining Characteristics with Different Stains

**SUMMARY:** *Acanthamoeba* spp. are among the most prevalent protozoa found in the environment. The species of this genus are the causative agents of granulomatous amebic encephalitis (GAE), a fatal disease of the central nervous system (CNS), and amebic keratitis (AK), a painful sight-threatening disease of the eye. In this study we have used two species of *Acanthamoeba*, *Acanthamoeba castellanii* and *A. hatchetti*, both were obtained from Vienna, Austria. They were cultivated on non-nutritious agar seeded with *Escherichia coli* and PPYG (protease peptone-yeast extract-glucose) medium. Our aim was to concentrate on three points in relation to the trophozoites and cysts stages of these species as follows: (i) to observe their morphology, (ii) to confirm our previous observation of a canal between two trophozoites. The bridge-like connection between these trophozoites greatly resembled the one that can be observed in conjugation during an exchange of genetic material. Two trophozoites with a bridge-like extension between them keep their position for at least 200 minutes. (iii) to detect the reactions of trophozoites to various stains. According to our findings in regard to these three points: (i). trophozoites with more than one nucleus are often seen in axenic cultures. (ii). This resembles a type of conjugation with a transfer of genetic material between two trophozoites. Certainly, this needs further investigation using more sophisticated methods. (iii). trophozoites equally stained well with Heidenhain's iron haematoxylin, Giemsa, PAS, Masson Trichrome, and Toludin-O stains. However, our results with reticulin, PAP, Van Gison, Muscarine and Orsein stains were not satisfactory.

**Key Words:** *Acanthamoeba*, morphological views, conjugation

## GİRİŞ

Çevrede toprak ve tatlı sularda oldukça yaygın olarak bulunan protozoonlar arasında olan *Acanthamoeba* türleri, insan vücuduna yerleşerek çeşitli hastalıklar meydana getirebilmektedirler. Bu tür amipler, granülatöz amibik ensefalit (GAE), kutanöz acanthamoebiasis, *Acanthamoeba* keratiti ve AIDS'li hastalarda enfeksiyonun çeşitli organlara yayılmasına bağlı

Geliş tarihi/Submission date: 24 Mayıs/24 May 2006  
Düzeltilme tarihi/Revision date: 27 Ekim/27 October 2006  
Kabul tarihi/Accepted date: 05 Şubat/05 February 2007  
Yazışma /Corresponding Author: Zübeyde Akın Polat  
Tel: - Fax: -  
E-mail: zubeydeakin@yahoo.com

olarak kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirirler (2, 3, 7).

*Acanthamoeba* cinsi amiplerin yaşam döngüsünde iki dönem ayırt edilir: Birincisi, aktif olarak beslenen, büyüyen, çoğalan ve hareket eden trofozoit formu, ikincisi ise, dış çevre koşullarına daha dayanıklı olan kist formudur. *Acanthamoeba* trofozoitlerinin büyüklükleri 25–56 µm arasında değişiklik gösterir ve genellikle yavaş olan hareketlerini, parmak şeklinde olan lopopod ve akantopod (*acanthopodium*) denilen dikensi yalancı ayaklar ile sağlarlar. Büyüklükleri 13–20 µm arasında değişiklik gösteren kistler, tek çekirdekli ve yuvarlaktır, çeperleri endokist ve ektokist denilen iki tabakadan meydana gelir. Genellikle dış tabaka hafifçe kıvrık, iç tabaka polihedral bir görünümündedir (2, 3, 6, 7).

Özgür yaşayan amipler, özellikle de *Acanthamoeba* türleri üzerinde çalışan bazı araştırmacılar sıvı besiyerlerinde bu amip trofozoitleri arasında zaman zaman köprü oluşturduğunu gözlemişlerdir (1, 5). Benzer görünümleri gözleyince bu ilişkinin süresini ve her iki trofozoitteki değişimleri olanağımız içinde inverted mikroskop altında saptamayı amaçladık.

Amiplerin boyanmasında ve iç yapılarının saptanmasında en iyi sonuç klasik Heidenhain'in demirli hematoksilin boyasıyla elde edilmektedir. Bu yöntemle gerek *Entamoeba* türlerinin gerekse özgür yaşayan amiplerin gayet ayrıntılı boyandığı bildirilmiştir (5, 7). Bu yöntem uzun süre aldığından ve 1–2 basamağı kritik olduğundan daha kolay yöntemler araştırılmıştır. Bunlar arasında Giemsa ve trikrom boyaları sayılabilir. Biz de *Acanthamoeba* trofozoitlerinin farklı boyalarla boyandıklarındaki görünümünü saptamak istedik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Amip Türleri:** Çalışmamızda kullanılan *Acanthamoeba* türleri, Viyana Üniversitesi, Medikal Parazitoloji bölümünden sağlandı. Bunlar, oldukça yaygın keratit olgularından izole edilmiş olan, *Acanthamoeba castellanii* (1BU) ve *A. hatchetti* (2HH) suşlarıdır (9).

**Amiplerin Üretilmesi:** Elimize besleyici değeri olmayan agar (BDOA) ortamında üretilmiş şekilde ulaşan amip suşlarının, öncelikle, bu besiyerinde devamlılığı sağlandı. Bunun için % 1,5-2 oranında agar damıtık su içinde eritildi; otoklavda steril edildikten sonra steril koşullarda 9 cm'lik petri kutularına 10 mL olacak şekilde dağıtıldı ve bir gün bekledikten sonra pasajlar için kullanıldı. Amibin beslenme ve üremesinin gerçekleşmesi için agar yüzeyine *Escherichia coli* sürüldü ve elimizdeki türlerden, hazırlanan bu besiyerine pasajlar yapılarak monoksenik olarak devamlılık sağlandı. Sonraki basamakta aksenik kültürler hazırlandı. Bunun için tamponlu tuzlu su eriyiği (0.120 g NaCl, 3 mg MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 3 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1L Damıtık su) içinde hazır-

lanan %1 protease peptone, % 1 maya özütü (yeast extract) ve %1 glukozdan oluşan PPYG besiyeri kullanıldı (4, 8). Hazırlanan bu besiyerinin pH'sı, 7 olacak şekilde ayarlandı; otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi; içerisine steril koşullarda 500 IU/mL Penicilline G ve 0.5 mg/mL Streptomycine eklendi ve hücre kültürü şişelerine 15–20 mL olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra, BDOA ortamındaki kistler toplandı ve üç kez yıkandı; üzerine %3'lük HCl çözeltisinden eklendi, bir gece bekletilerek bakteriler elimine edildi. Ertesi gün HCl içindeki kistler üç kez yıkanarak HCl çözeltisi uzaklaştırıldı. Son yıkama sonrasında, çöküntü vortekslenildikten sonra, içinde PPYG besiyeri bulunan hücre kültürü şişelerine aktarıldı; ekim yapıldıktan birkaç gün sonra başlamak üzere, inverted mikroskopta amip üremesinin olup olmadığı takip edildi. İlerleyen günlerde amip üremesinin fazla olduğu kültürlerden pasajlar yapıldı.

**Amiplerin Canlı ve Boyanarak İncelenmesi:** Üretilen amipler canlı olarak ve çeşitli boyalarla boyanarak iki şekilde incelendiler:

- Canlı İnceleme:** Agar yüzeyindeki ve PPYG besiyeri içindeki canlı trofozoit ve kistler mikroskopta incelendi, gerektiğinde mikrofotografları çekildi. Agar plakları açılmadan alt kısımları üstte olarak 10x objektif altında trofozoit ve kistlerin yoğun olduğu bölgeler işaretlendi. Sonra steril koşullarda plaklar açıldı; işaretli bölgelerden kesilen agar parçaları lam üzerine aktarıldı; üzerine lamel kapatıldı ve 10x ve 40x objektiflerde incelendi. PPYG besiyeri içindeki kistler ve trofozoitlerin hareketleri inverted mikroskopta 10, 20 ve 40'luk büyütmelemlerde incelenerek mikrofotografları çekildi.
- Boyalı Örneklerin İncelenmesi:** Amiplerin boyanmasında Heidenhain'in demirli hematoksilin boyası, Giemsa, PAP, PAS, Van Gison, Masson Trikrom, Orsein, Retikülin, Toludin-O, Musicarmin boyaları kullanıldı. Boyama işlemine geçmeden önce, agar plaklarında amip üremesi olan bölgeler belirlendi; bu bölgeler kesilerek plaktan çıkarıldı ve üst yüzeyleri lam yüzeyine gelecek şekilde ters-yüz edilerek lama yerleştirildi. Amiplerin lam yüzeyine geçmesi için 1-1.5 saat bekletildi; Schaudinn fiksatifinde tespit edildikten sonra boyandı (5).

## BULGULAR

Viyana Üniversitesi, Medikal Parazitoloji Bölümünden BDOA ortamında gönderilen amiplerin devamlılığı aynı besiyerinde kolaylıkla gerçekleştirildi. Bu besiyerinde üretilmiş amipler erken dönemlerdeki incelemelerde, çekirdek ve kontraktıl vakuollerinin görünümü ile, daha geç dönemde ise tipik kist morfolojileri ile ayırt edildiler. Şekil 1'de *A. castellanii* trofozoitlerinin agar üzerindeki yoğunluğu ve trofozoitlerin

çekirdek ve kontraktıl vakuollerinin yapısı görülürken, Şekil 2'de yine agar üzerinde canlı kistler tipik şekilleriyle görülmektedir. Daha sonra bu besiyerindeki kistlerin toplanıp, yıkanıp, bir gece %3'lük HCl çözeltisinde bekletilmesi ile çok yoğun olarak bulunan bakteriler elimine edildi ve kontaminasyon olmadan her iki *Acanthamoeba* türü de PPYG besiyerinde başarılı bir şekilde üretildi. PPYG besiyerindeki trofozoitler ve kistler inverted mikroskopta incelendi. Bu incelemede, trofozoitlerin çok kısa bir zamanda, hücre kültürü şişelerinin tabanını tamamen kaplayacak şekilde çok yoğun bir şekilde ürettiği görüldü (Şekil 3-A, B, C). Sıvı haldeki kültürlerde fazla sayıda, çok çekirdekli trofozoitler saptandı (Şekil 4, 5). Bunun yanında, sıvı besiyerinde sıklıkla iki amibin aralarında köprü oluşturarak konjugasyon benzeri görünüm oluşturdukları gözlemlendi. Şekil 6'da ilk görüldüğü andan itibaren izlenen iki trofozoitin şekillerinde ve çekirdeklerinde meydana gelen değişiklikler takip edildi ve belli aralıklarla mikrofotografı çekildi. Bu gözlemlerimiz aşağıda kısaca özetlenmiştir:

İki trofozoitin ince bir köprü veya kanal ile birbiriyle bağlantılı olan iki trofozoitten sağdakinin çekirdeği ve içindeki büyük çekirdekcik rahatlıkla görülürken (Şekil 6A), soldakinden çekirdek/çekirdekcik görülmedi. İzleyen dakikalarda 1. trofozoitin çekirdeğinin bölündüğü (belki de birden fazla olarak); bu sırada aradaki kanalın kalınlaştığı, bu kalınlaşma pozisyonunun zamanla değiştiği ve 40. dakikada her iki trofozoit içinde de ikişer çekirdek/çekirdekcik görüldüğü saptandı (Şekil B-E). Bundan sonraki aşamalarda da aradaki kanalın kalınlaşma bölgesinin 1. trofozoite yaklaştığı (Şekil F,G), bu bölgede çekirdek/çekirdekcik benzeyen yuvarlak bir yapı gözlemlendi (Şekil 6H). Şekil 6 I ve J'de ise yine benzer değişiklikler görüldü ve süre 95 dakikayı buldu. 105. dakikadan başlayarak 200 dakikaya kadar olan sürede (Şekil 6 K-T) her iki trofozoit ve aralarındaki bağlantı farklı görünüm sergilediler. İlginç olan nokta iki trofozoitin 150. dakikada birleşmesi (Şekil 6 O) ve bunu izleyerek boğumlu bir görünüm aldıktan sonra 170. dakikada 3 kısma ayrılmalardır (Şekil 6 R-S). Bu gözlemin son noktası, 200. dakikada, iki trofozoitin ayrılmalardır (Şekil 6 T).

Amiplerin boyanmasında kullandığımız boyalardan HHDH, Giemsa, PAS, Mason Trikróm, Toludin-O boyaları, amiplerin hücre yapılarından, çekirdeklerini, çekirdekciklerini, kontraktıl vakuollerini, ektoplazma ve endoplazmalarını ayırt edecek şekilde boyadı. Şekil 7'de *A. castellanii* trofozoitleri, Şekil 8'de ise kisti HHDH ile boyanmış durumda görülürken, Şekil 9'da Giemsa, Şekil 10'da PAS, Şekil 11'de Toludin-O, Şekil 12'de ise Mason Trikróm ile boyanmış trofozoitler görülmektedir. Retikülin, PAP ve Van Gison boyaları ile boyanmış amipler, zeminle ayırt edilemeyecek kadar soluk renkte boyanırken,

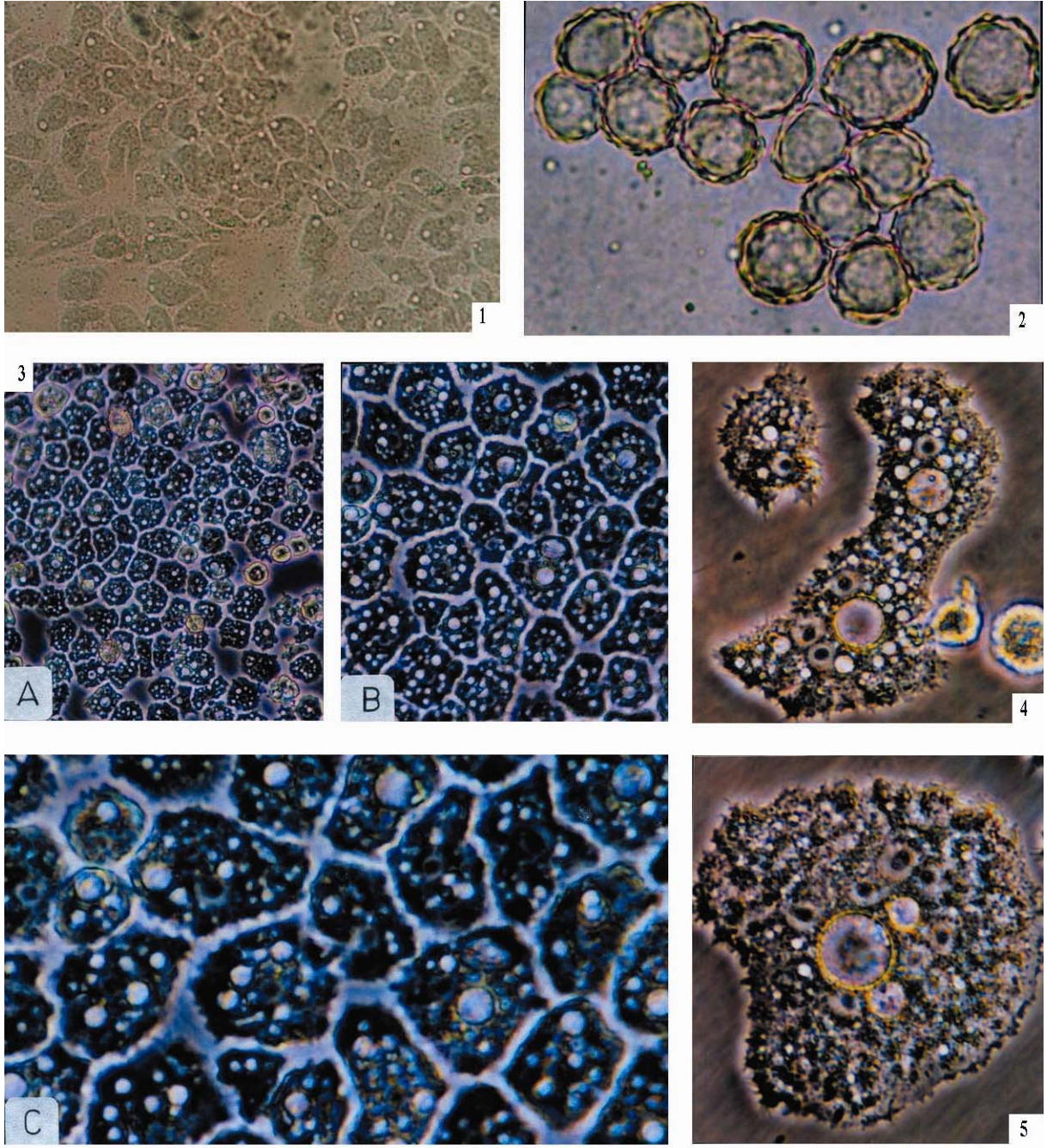
Musicarmin ve Orsein boyaları ile trofozoitlerin hücre yapıları ayırt edilemedi.

## TARTIŞMA

Viyana Üniversitesi, Medikal Parazitoloji Bölümünden BDOA içerisinde gönderilen *A. castellanii* ve *A. hatchetti* türleri çalışmamızda kullanıldı. Walochnik ve arkadaşları bizim de çalışmamızda kullandığımız iki amip türünün içinde bulunduğu, klinik ve klinik olmayan örneklerden izole ettikleri 13 *Acanthamoeba* suşunun morfolojik, moleküler biyolojik ve fizyolojik karakterlerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, ilerlemiş keratit olgularından izole ettikleri, çalışmamızda kullandığımız iki amip türünün kist morfolojisi ve büyüklüğüne göre II. grupta yer aldığını belirlemişlerdir. Bunun yanında, iki türün de aksenik kültürde çok iyi ürediğini, agar üzerindeki hareketlerinin oldukça iyi olduğunu ve 30, 34, 37, 40 °C'lerde çok iyi ürerken, 42 °C'de üreme hızının daha yavaş olduğunu çalışmalarında belirtmişlerdir. Bunun yanında *A. hatchetti*'nin sitopatik etkisinin *A. castellanii*'ye göre daha güçlü olduğunu ve her iki türün de sekans tiplerinin T4 olduğunu bulmuşlardır (9).

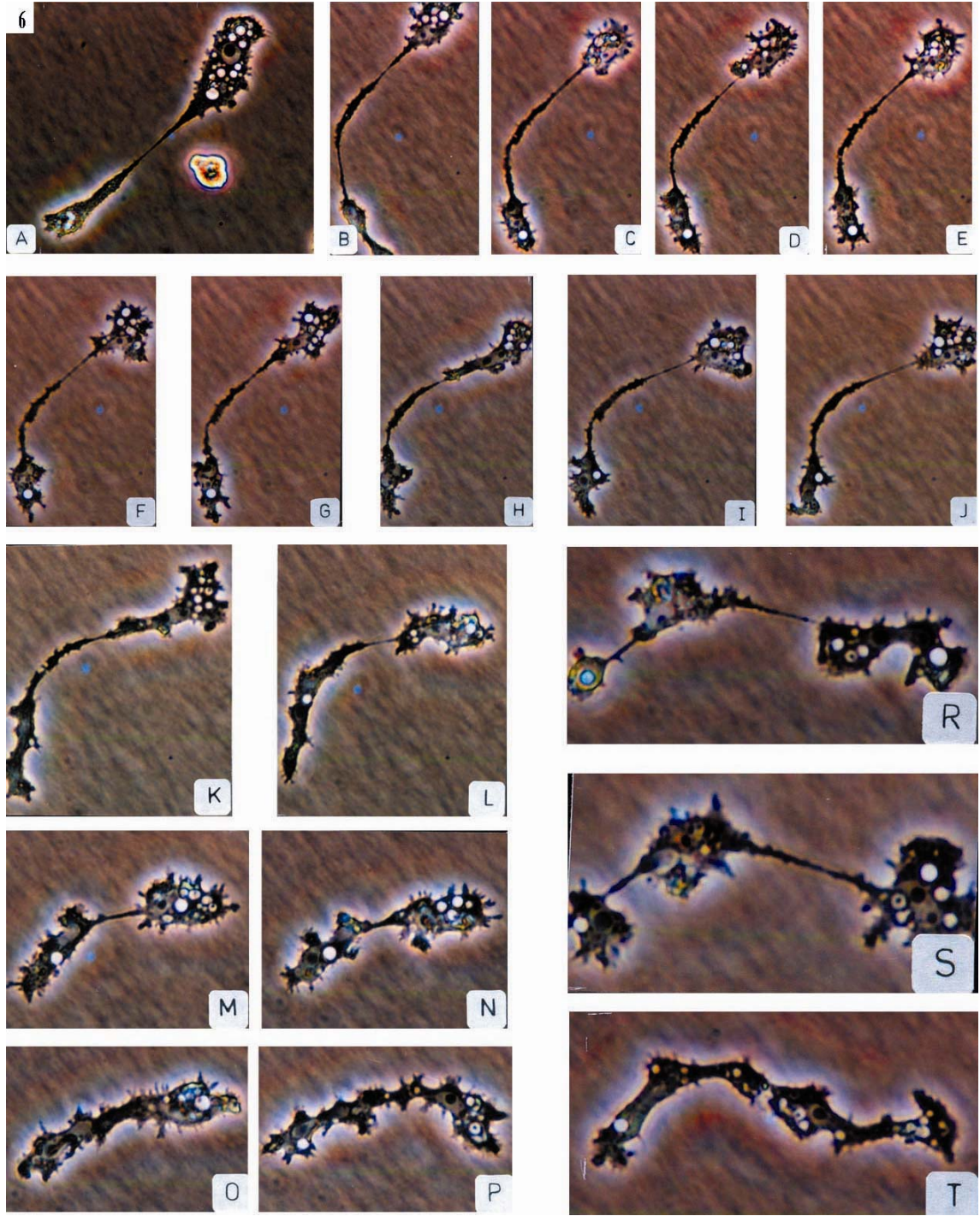
Çalışmamızda sıvı besiyerinde sıklıkla iki, üç veya dört amibin karşılıklı olarak aralarında köprü kurdukları, görünümünün konjugasyon olayını çağrıştırdığı gözlemlendi. Saygı, 1971 yılında yaptığı doktora tez çalışmasında, buna benzer olayları gözlemiş fakat herhangi bir açıklama getirmemiştir (5). John da 1993 yılında yayınlanan "Parasitic Protozoa" adlı kitabın içinde bulunan, "Opportunistically Pathogenic Free-Living Amebae" başlıklı bölümde aksenik kültürlerde, aralarında köprülerle bağlantı kuran üç trofozoitin, scanning elektron mikroskobunda çekilen fotoğrafını yayınlamış ve amipler arasında genetik bir değişim olabileceğini belirtmiştir (1). Inverted mikroskopta uzun süre gözlediğimiz ve aralarında bir bağlantı olan iki trofozoitte çekirdek bölünmesini, genetik materyal alış-verişini çağrıştıran pozisyonlar dikkatimizi çekti (Şekil 6 A-T). Gözlemlerimizin trofozoitler arasında genetik madde değişimine işaret edebileceği kanısındayız. Fakat bu durumun açıklığa kavuşturulabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır. Ayrıca da bu işin hiç de kolay olmadığı bir gerçektir.

*Acanthamoeba* trofozoitlerinin boyanmasında, Heidenhain'ın demirli hematoksilin boyası, Giemsa, PAP, PAS, Van Gison, Mason Trikróm, Orsein, Retikülin, Toludin-O ve Musicarmin boyaları kullanıldı. Bu boyalardan, HHDH, Giemsa, PAS, Masson Trikróm, Toludin-O boyaları, amip trofozoitlerinin çekirdek, çekirdekcik, ektoplazma, endoplazma ve kontraktıl vakuollerini belirgin bir şekilde boyadı. Bu nedenle, amiplerin bu boyalarla boyanmasının uygun olduğu, diğer boyaların ise amiplerin boyanmasında kullanışlı olmadığı kanısındayız.



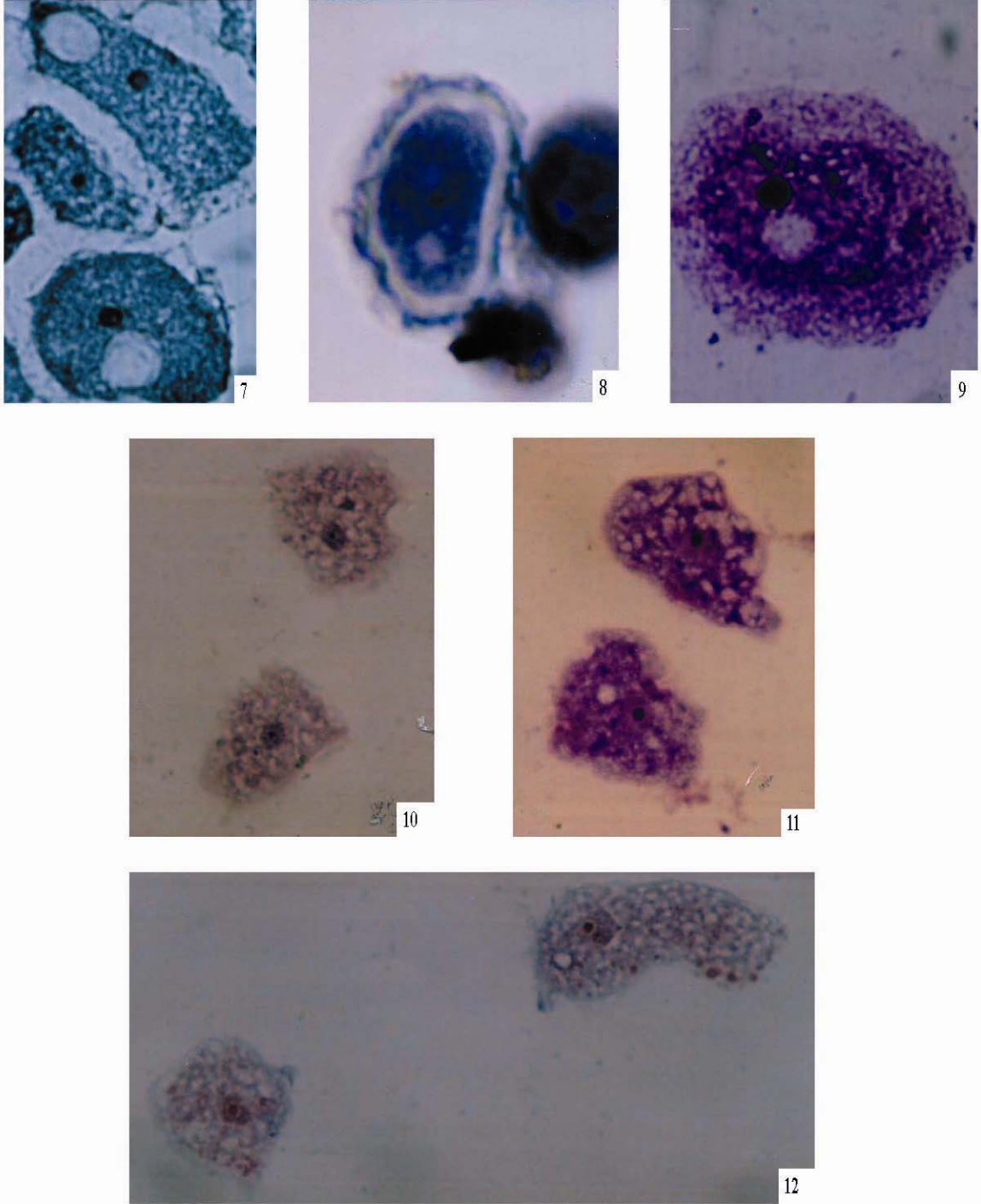
**Şekil 1.** Agar yüzeyinde *A. castellanii* trofozoitlerinin görünümü.(x100);  
2. Agar üzerindeki *A. castellanii* kistlerin tipik şekilleri (x400);  
3. Sıvı besiyerinde trofozoitlerin, inverted mikroskoptaki görünümleri (**A:** x10), (**B:** x20), (**C:** x40);  
4 ve 5. Sıvı besiyerinde çok çekirdekli trofozoitlerin, inverted mikroskoptaki görünümleri (40x)





Şekil 6 – A-T. Sıvı besiyerinde görülen ve inverted mikroskopta x40'lık objektifte ve yaklaşık 200 dakika gözlenen, bu gözlem süresince zaman zaman mikrofotografını çekilen iki *Acanthamoeba* trofozoitinin birbirleriyle olan ilişkileri A-T'de görülmektedir.

A. Birbiriyle ince bir köprüyle bağlı iki trofozoit (veya şekilde görüldüğü şekilde uzamış tek trofozoit) sağdaki büyük trofozoitin (1. trofozoit) çekirdek ve çekirdekteği bariz olarak görülürken 2. trofozoitte (soldaki) bunlar görülmemekte; B. 5. dakikadaki görüntü; C. 25. dakikadaki görüntü; D. 30. dakikadaki görüntü; E. 40. dakikadaki görüntüde iki trofozoit arasındaki köprünün kalınlaşmış kısmının 2. trofozoite yaklaştığı saptandı; F, G. 42. dakikadaki görünüm; H. 75. dakikadaki görünüm; I, J. 85. dakika – 2. trofozoitin iki çekirdeği kayboldu (J) ve 95. dakikada çekirdeği uzamaya başladı (J); K. 105. dakikadaki görünüm; L. 120. dakikadaki görünüm; M. 130. dakikadaki görünüm; N. 140. dakikadaki görünüm; O. 150. dakikadaki görünüm - ; iki trofozoit birleşti; P. 160. dakikadaki görünüm; R. 170. dakikadaki görünüm; S. 180. dakikadaki görünüm; T. 200. dakikadaki görünüm - ; iki trofozoit birbirinden ayrıldı.



**Şekiller.** *A. castellanii* trofozoitlerinin farklı boyalarla boyanmış görünümü

**Şekil 7.** HHDH ile boyanmış trofozoitler (100x); **8.** HHDH ile boyanmış bir kist (100x); **9.** Giemsa ile boyanmış trofozoit (100x); **10.** PAS ile boyanmış trofozoitler (40x); **11.** Toludin-O ile boyanmış trofozoitler (40x); **12.** Masson Trichrom ile boyanmış trofozoitler (40x)

## KAYNAKLAR

1. **John DT**, 1993. Opportunistically pathogenic free-living amebae. *Parasitic Protozoa*, 2<sup>nd</sup> ed, vol 3, eds Kreier JP, Baker JR, Academic Press, San Diego, p.143-246.
2. **John DT**, 1998. Opportunistic Amoebae. "Topley & Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*" içinde. 9<sup>th</sup> ed. Vol. 5. Edward Arnold Ltd. London. p. 179-192.
3. **Marciano-Cabral F, Cabral G**. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*, 12(2): 273-307.
4. **Neff RJ**, 1957. Purification, axenic cultivation and description of a soil amoeba, *Acanthamoeba* sp. *J Protozool*, 4: 176-182.
5. **Saygi G**, 1971. Studies on Free-Living Amoebae Ph.D. Thesis. Liverpool University.
6. **Saygi G, Polat Z**, 2003. Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitozlar (Primer amibik meningoensefalit-Granülatöz amibik ensefalit-Keratit). *CÜ Tıp Fak Derg*, 25(3): 140-149.
7. **Saygi G**, 2002. Temel Tıbbi Parazitoloji. 2. Baskı. Es-Form Ofset Ltd Şti. Sivas.
8. **Schuster FL**, 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev*, 15(3): 342-354.
9. **Walochnik J, Obwaller A, Aspöck H**. 2000. Correlations between morphological, molecular biological and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol*, 66(10): 4408-4413.