

# *Echinococcus granulosus*'un *in vitro* Kültürü

Cenk Soner BÖLÜKBAŞ<sup>1\*</sup>, Ahmet DOĞANAY<sup>2</sup>

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**ÖZET:** Hidatidosis, *Echinococcus* türlerine ait larva şekillerinin insan ve hayvanlarda oluşturduğu, insan ve hayvan sağlığı ile ekonomik yönden oldukça önemli, zoonotik bir hastalıktır. Türkiye’de gerek insanlarda, gerekse hayvanlarda hidatidosisden sorumlu tür olan *Echinococcus granulosus*’la ilgili geçmişten günümüze yapılan çalışmalarla parazitin biyolojisi, fizyolojisi ve biyokimyasal özellikleriyle ilgili pek çok bulgu ortaya konmuş, antijen üretimi, aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarında da sıklıkla *in vitro* kültür metodları kullanılmıştır. Bu makalede *E. granulosus*’un *in vitro* kültürü çeşitli başlıklar altında irdelenecektir.

**Anahtar Sözcükler:** *Echinococcus granulosus*, *in vitro* kültür.

## ***In vitro* Cultivation of *Echinococcus granulosus***

**SUMMARY:** Hydatidosis is a zoonotic disease that is caused by larva of *Echinococcus* species. It affects animals and humans and is very important from the aspect of health and economy. There have been many studies concerning the biology, physiology and biochemistry of *Echinococcus granulosus* which is responsible for hydatidosis in both humans and animals in Turkey. Frequently *in vitro* culture methods have been used in antigen production, vaccine and drug development. In this article, the *in vitro* culture of *E. granulosus* has been examined under various headings.

**Key Words:** *Echinococcus granulosus*, *in vitro* cultivation

## **GİRİŞ**

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. Parazitolojide *in vitro* kültür; konak kullanmadan larva dönemlerinin ve erişkin parazitlerin elde edilmeye çalışılmasında, konak etkisi olmaksızın parazit gelişim dönemlerine ait biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerin incelenmesinde, antijen üretimi ve aşı geliştirme çalışmalarında, patogeneze rol oynayan metabolizmaların incelenmesinde, farklı kimyasal madde ve ilaçların etki mekanizmalarının analizlerinde kullanılmaktadır (1, 4, 6, 18, 30, 31).

Bir paraziti ya da gelişme dönemini *in vitro* üretilen geliştirebilmek için parazitin biyolojisi, gereksinim duyduğu biyolojik ortam tam olarak bilinmeli ve parazit için optimal koşullarda bir ortam hazırlanmalıdır (30). Çok hücreli olan helmintlerin çoğu kompleks yaşam döngüsüne sahiptir. Bazı türlerin bir, bazı türlerin birden fazla ara konak kullanması, her gelişme

döneminde farklı fiziko – kimyasal çevrede bulunmaları ve buna bağlı olarak gereksinim duyulan besin maddelerinin değişmesi nedeniyle helmintlerin *in vitro* kültüründe tek hücrelilerin kültüründe görülmeyen pek çok problem ortaya çıkmaktadır (25).

## **Tarihçe ve günümüze kadar yapılan belli başlı çalışmalar**

*Echinococcus granulosus*’un *in vitro* kültürü ile ilgili ilk çalışmalar 1925 yılında başlamış olup bu yıllarda hidatik kistler karaciğer ekstratı, kist sıvısı, koyun, sığır gibi hayvanlara ait serum içeren ortamlarda korunmaya çalışılmıştır. 1960’lı yıllara kadar yapılan çalışmalarda önemli bir başarı sağlanamamış, takip eden yıllarda protoskolekslerin *in vitro* ortamda olgunlaşması ya da kistik hale dönüşmesinde evaginasyonun önemi anlaşıldıktan sonra ise gerçek anlamda başarılı çalışmalar ortaya çıkarılmıştır (30).

1960’lı yıllarda Smyth (25), 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 (30).

Bu konuda geçmişten günümüze yapılan belli başlı çalışmalar Tablo 1’de özetlenmiştir.

Türkiye’de ise *E. granulosus*’un *in vitro* larval gelişimiyle ilgili ilk çalışma 2002 yılında Ertabaklar ve Altıntaş (6) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar yine aynı yıl antelmentik olan albendazol ve mebendazolün *in vitro* kültürde geliştirilmiş kistler üzerine etkilerini araştırmışlardır (7). Bölükbaş (2)

Makale türü/Article type: **Derleme / Review**

Geliş tarihi/Submission date: 16 Mayıs/16 May 2008  
Düzeltilme tarihi/Revision date: 27 Haziran/27 June 2008  
Kabul tarihi/Accepted date: 15 Eylül/15 September 2008  
Yazışma /Corresponding Author: Cenk Soner Bölükbaş  
Tel: (+90) (362) 312 19 19 Fax: -  
E-mail: cbolukbas@omu.edu.tr

\***Şimdiki adres:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 55139 Kurupelit, Samsun

**Tablo 1.** *E. granulosus*'un *in vitro* kültürü konusunda geçmişten günümüze yapılan belli başlı çalışmalar.

Yıl	Araştırmacılar	Çalışma	Kaynak
<b>Onkosferden kistik larvaya dönüşüm</b>			
1970	Heath ve Smyth	<i>E. granulosus</i> , <i>Taenia hydatigena</i> , <i>T. ovis</i> , <i>T. pisiformis</i> ve <i>T. serialis</i> onkosferlerinin <i>in vitro</i> kültür ortamında geliştirilmesi ve kistik forma dönüşüm.	8
1976	Heath ve Lawrence	Onkosferlerden immatür hidatik kistler elde etmeye yönelik <i>in vitro</i> kültür yapılması ve onkosferlerin değişimlerinin incelenmesi.	9
1981	Heath ve Lawrence	İmmunize edilmiş koyun serumlarının, onkosferden kist gelişimine olan etkilerinin incelenmesi.	10
1994	Holeman ve ark.	Onkosferler ile <i>in vitro</i> kültürde geliştirilen erken dönem metacestodların ultrastrüktürel yapılarının incelenmesi.	14
<b>Protoskoleksten kistik larvaya dönüşüm</b>			
1962	Smyth	<i>In vitro</i> kültürde protoskolekslerin kistik yönde gelişimi.	22
1976	Heath ve Osborn	<i>In vitro</i> kültürde laminar membranın gelişimi.	11
1986	Rogan ve Sylvia Richards	<i>In vitro</i> kültürde tek tırnaklı kökenli protoskolekslerin kistik yönde gelişimi.	20
1989	Casado ve Rodriguez-Caaberio	<i>In vitro</i> kültürde geliştirilen kistlerin ultrastrüktürel yapılarının incelenmesi.	3
1992	Casado ve ark.	<i>In vitro</i> kültürü takiben kistlerin farelerdeki canlılıklarının incelenmesi.	5
1996	Casado ve ark.	<i>In vitro</i> kültürde geliştirilen kistlere bazı ilaç etken maddelerinin etkilerinin incelenmesi.	4
1997	Ponce Gordo ve Cuesta Bandera	<i>In vitro</i> kültürde veziküler gelişimle İspanyol suşunun karakterizasyonu.	19
2005	Zhang ve ark.	Protoskolekslerin sekonder hidatidoz oluşturmak üzere farelere verilmeden önce bir süre <i>in vitro</i> kültürde geliştirilmelerinin kistlerin gelişimine ve canlılığına olan etkilerinin incelenmesi.	32
<b>Protoskoleksten strobilar yönde gelişim</b>			
1967	Smyth	Protoskolekslerin strobilar yönde gelişimi.	23
1971	Smyth	Protoskolekslerden <i>in vitro</i> kültürde monozoik formların gelişimi.	24
1974	Smyth ve Davies	Koyun ve at orijinli hidatik kistlerden elde edilen protoskolekslerin <i>in vitro</i> kültürüyle farklı <i>E. granulosus</i> fizyolojik suşlarının ortaya konması.	27
1983	Kumaratilake ve ark.	Avustralya'nın değişik coğrafi bölgelerinden elde edilen koyun orijinli <i>E. granulosus</i> 'ların karşılaştırmalı strobilar gelişimi.	16
1985	Macpherson ve Smyth	Kenya'dan elde edilen insan, deve, sığır, koyun ve keçi orijinli protoskolekslerle, Hindistan'dan elde edilen bufalo orijinli protoskolekslerin <i>in vitro</i> kültürde strobilar gelişimi.	17
1992	Hijjawi ve ark.	Ürdün'de koyun ve eşek orijinli <i>E. granulosus</i> 'ların strobilar dönemlerinin geliştirilmesi.	13

ise 2007 yılında *E. granulosus* protoskolekslerinin monofazik *in vitro* kültürde gelişimini 152 gün boyunca takip etmiş ve kültür sonunda çapları ortalama 2561 µm olan mikrokistler elde etmiştir. Çalışmada ayrıca kültürde geliştirilen mikrokistlerin kist sıvısı ve koyunlardan elde edilen hidatik kistlerin sıvısı SDS – PAGE yöntemiyle elektroforeze tabi tutulmuş ve iki kist formunun protein yapıları karşılaştırılmıştır.

#### ***Echinococcus granulosus*'da *in vitro* kültür**

*E. 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 ergin ekinokoklar geliştirilebilmektedir (26).

Kistler, steril materyalle çalışabilmemizi sağlaması ve 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 istemesi ve araştırıcı ile çevre için büyük risk taşıdığından fazla tercih edilmemektedir (9).

#### **A. Onkosferlerin *in vitro* kültürü**

Yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı, onkosferlerin *in vitro* kültürle gelişimine yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır (8-10, 14).

1970 yılında Heath ve Smyth (8) onkosferleri *in vitro* kültürde 10 günden fazla tutmuş, bu süre içerisinde bir kese şekillendiğini ve organizmanın çapının 28µm'den 120µm'ye çıktığını gözlemişlerdir. Daha sonraki yıllarda Heath ve Lawrence (9) *in vitro* olarak onkosferden kist gelişimini incelemişler, veziküler gelişimin 6. günden itibaren başladığını, 10. günden sonra laminal tabakanın şekillendiğini bildirmiş ve 120 günlük *in vitro* kültür sonucunda 20 mm çapında kistler elde etmişlerdir. Holcman ve ark. (14) ise, *in vitro* kültürde inkübe ettikleri onkosferlerin çapının 5. günde 52 µm'ye ulaştığını ve laminal tabakanın da gelişmeye başladığını bildirmişlerdir.

**Teknik:** 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<sub>3</sub> + % 5 koyun ya da tavşan safrası, distile su içinde) solüsyonlarla aktive edilir ve onkosferler besiyeri doldurulmuş kültür şişelerine konur. Besiyeri olarak Parker 858, NCTC 135, RPMI 1640 ya da McCoy's 5A kullanılabilir. Kültür besiyeri 3 – 4 günlük aralıklarla değiştirilir. Kültürde gaz faz olarak % 10 O<sub>2</sub> + % 5 CO<sub>2</sub> + % 85 N<sub>2</sub> kullanılır. Kistlerin çapları mikrometrik ölçüm yapabilen mikroskoplarla takip edilir (8 – 10).

#### **B. Protoskolekslerin *in vitro* kültürü**

Doğada *E. 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 kistler şekillendirirler. Köpek tarafından alınan protoskoleksler ise sindirim sistemi ortamında evagine olup, strobilar yönde gelişim göstererek erişkin şeritler halini alırlar (28). *E. granulosus* ile yapılan erken dönem *in vitro* kültür girişimlerinin neredeyse tamamı kistik yönde gelişimle sonuçlanmış ve strobila yönünde gelişimi kontrol eden doğal faktörlerin araştırılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır (25). Protoskolekslerin moleküler düzeyde yapısının araştırılmalarıyla kültür sonuçlarını etkileyecek oldukça önemli bulgular elde edilmiştir. Protoskolekslerin skoleks bölgesinde çok sayıda mikrotriki denen dikensi yapıları rastlanmış, kalan vücut bölümünün ise PAS pozitif glikokaliks yapıda olduğu ortaya konmuştur. Evagine haldeki protoskoleks çekmenlerinin altındaki bölgede bulunan mikrotrikilerin PAS pozitif katmanla kaplı olmadığı belirlenmiş ve bu oluşumların besinin absorpsiyonuyla ilgili olduğu ortaya konmuştur. Mikrotrikilerin vücudun sadece ön kısmında bulunması nedeniyle protoskoleksler beslenebilmek için mutlaka evagine olup, mikrotrikiler açığa çıkmalı, açığa çıkan mikrotrikiler de besin maddesiyle temas etmelidir. Bu morfolojik incelemeler, protoskoleksin strobilar gelişimi için mutlaka uygun bir katı besiyeriyle temas etmesi gerektiğini açığa çıkarmıştır (3, 23).

Protoskoleksler sadece sıvı faz içeren monofazik besiyerlerinde kültüre edilirse veziküler form, arka keseli formlar, daha sonra da laminal tabakanın oluşumuyla minyatür hidatik kistler şekillenmektedir (3, 6, 11, 19, 20, 25, 27, 28). Protoskolekslerin *in vitro* kültürde difazik besiyerinde tutulmalarıyla infertil yumurtalar üreten olgun şeritler geliştirilmiştir (28). Geliştirilen yöntemlerin çoğu bazı modifikasyonlarla bugün de halen kullanılmaktadır.

**Teknik:** Protoskolekslerin monofazik ya da difazik kültür ortamına konulmasına kadar izlenecek prosedür aynıdır. *In vitro* kültürde kullanılacak hidatik kistler taze olarak elde edilmeli ve elde edilen kistler soğutucu dolaplarla vakit geçirilmeden laboratuvara ulaştırılmalıdır (26, 28). Kistlerden 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 (26, 28).

Protoskoleksler *in vitro* kültürde kullanılmadan önce 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. İyi kültürlerin hazırlanabilmesi için, her bir çimlenme kapsülündeki protoskolekslerin en azından %60'ının canlı olması, sitoplazmalarının temiz olması ve alev hücrelerinin aktif olması gerekmektedir (26, 28).

Protoskoleksler *in vitro* olarak kültüre edilmeden önce pepsin ve sodyum torokolat ile muamele edilmelidir. Pepsin, protoskoleksleri çimlenme kapsülünden ayırmakta, ayrıca var olan ölü protoskoleksleri uzaklaştırmakta, sodyum torokolat ise skoleksi evagine hale getirmektedir (26, 29).

**Monofazik Besiyerinde Kültür (Kistik yönde gelişim):** Kültür besiyeri olarak çeşitli serum, amniyon sıvısı, kist sıvısı ya da embriyo ekstratları gibi çok çeşitli doğal bileşimler kullanılabilir. Ticari olarak ise ortak özellikleri birbirine benzeyen değişik temel hücre besiyerleri (Medium 199, RPMI 1640, CMRL 1066, NCTC 135, Parker 199, Parker 858 gibi) bu amaçla kullanılmaktadır. Besiyeri glukoz, fetal buzağı serumu ile takviye edilmeli ve bakteriyel kontaminasyona karşı da penisilin, streptomisin ya da gentamisin gibi geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılmalıdır (3, 5, 6, 19, 20, 23, 24, 32). Protoskoleksler kültür şişelerine ml.'de 800 – 1000 protoskoleks olacak şekilde konulmalı ve etüvde 37°C'de, %95 O<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmelidir. Besiyeri her 3 – 4 günde bir yenilenmelidir (3, 6, 19, 20).

Besiyerinde katı faz bulunmayan monofazik kültürlerde, protoskolekslerden etrafında laminar tabakanın da geliştiği minyatür hidatik kistler gelişmektedir. Bu iki yolla olabilmektedir:

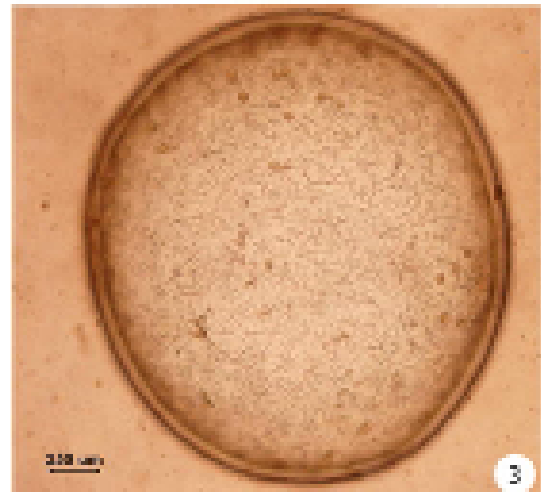
(a) Protoskoleksler şişer ve veziküler bir form alırlar. Kültürün 21 – 28. günlerinden sonra etraflarında laminar tabaka şekillenir (Şekil 1).

(b) Protoskoleksler küçük bir arka kese geliştirir (Şekil 2) ve bu arka kese kültürün 12. günü civarında laminar tabakaya dönüşecek PAS pozitif yapışkan bir tabaka üretmeye başlar.

Yüksek O<sub>2</sub> düzeyinin, anaerobik çevrenin, düşük pH'nın ve yüksek safra seviyesinin protoskolekslerin veziküler yönde gelişimini hızlandırdığı görülmüştür (23). Anormal şartlarda bile veziküler gelişimin sağlanabilmesi, bu gelişimin protoskoleksi koruyucu bir fonksiyon olduğunu göstermektedir. Fakat laminar tabakanın gelişimi ve kistin çevre dokularla bağlantısını kısıtlaması, kistin farklılaşmasının devamını da olumsuz yönde etkilemektedir (1).

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 3) (23).

**Difazik Besiyerinde Kültür (Strobilar yönde gelişim):** Kültürde katı faz olarak, 75 – 76°C de 30 – 60 dakika tutularak koagüle 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 (28). 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



**Şekil 1.** Kültürün 20. gününde veziküler form (Orijinal);  
2. Kültürün 20. gününde arka keseli form (Orijinal);  
3. Kültürün 150. gününde mikrokist (Orijinal).

segmentasyona izin vermesi bakımından oldukça tatmin edici sonuçlar verdiği bildirilmiştir (28). Kullanılan besiyerinin K<sup>+</sup> seviyesi 60 mg/100 ml 'ye ve glikoz seviyesi ise 5.5 mg/ml 'ye yükseltilecek şekilde modifiye edilmesi köpek bağırsağındaki doğal koşullara yaklaşımını sağlamaktadır. Besiyerlerine kist sıvısı, fetal buzağı serumu ya da maya ekstratı gibi doğal maddeler de eklenmektedir. Gaz faz olarak % 10 O<sub>2</sub> + % 5 CO<sub>2</sub> + % 85 N<sub>2</sub> kullanılır. Besiyerleri her 48 saatte bir değiştirilmelidir (24, 28).

Köpeklerde *E. 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<sup>++</sup> granülleri kaybolmakta, 3. evrede boşaltım kanalları şekillenmekte, 4. evrede boğumlanma ve son evre olan 5. evrede ise segmentasyon meydana gelmektedir. Bu aşamalar *in vitro* kültürlerde biraz gecikmeli olarak gerçekleşmektedir (28).

Bazı kültürlerde genital organları gelişmiş, fakat segmentlere ayrılmamış "monozoik" *E. 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 (24).

*E. granulosus* 'un *in vitro* kültür çalışmaları genellikle başarılı sonuçlar vermesi nedeniyle koyun orijinli protoskoleksler ile yapılmaktadır. Smyth ve Davies (27) koyun kökenli protoskoleksler ile at orijinli protoskoleksleri *in vitro* kültürde gelişim bakımından karşılaştırmış ve at orijinli protoskolekslerin segmentasyon aşamasına geçemediklerini ortaya koymuşlardır. Ayrıca bu çalışma bize koyun orijinli ve at orijinli *E. granulosus* 'ların birbirlerinden farklı fizyolojik, nutrisyonel ve metabolik ihtiyaçları olduğunu göstermiştir. MacPherson ve Smyth (17) insan, deve, sığır, koyun, keçi ve bufalo orijinli protoskoleksleri *in vitro* kültürde yine gelişim yönünden karşılaştırmış, kökenlerin hepsinde segmentasyonu başarmış, fakat sadece deve ve sığır orijinli protoskolekslerin seksüel gelişmeyi gerçekleştirebildiğini bildirmişlerdir.

Son konaklarda gelişen ile *in vitro* kültür ortamında geliştirilen *E. 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 gelişmemektedir. Yine testislerde de spermatozoalar oluşmasına rağmen, recepteculum seminis boş olduğu gözlenmektedir. Köpek bağırsağındaki mukozaya

gömülmüş ekinokoklara çevresindeki villuslar baskı yapmakta, böylece sirus vaginaya girmekte iken, kültüre edilen ekinokoklarda ise sirus vaginaya temas etmemektedir. Sonuç olarak dölleme meydana gelmemekte ve infertil yumurtalar üretilmektedir (28).

*E. granulosus* protoskolekslerinin *in vitro* kültürüyle seksüel olarak olgun fakat infertil yumurtalar üreten parazitler elde edilmektedir. İstenmeyerek elde edilen bu sonuç güvenlik açısından çok önemli avantajlar sunmaktadır. Bu laboratuvarında insanı enfekte edemeyecek olgun *Echinococcus* 'lar üretebilmemizi, dolayısıyla onlarla güvenli bir şekilde fizyolojik, immunolojik ve diğer tüm araştırmaları rahatlıkla yapabilmemizi sağlamaktadır.

### Sonuç

Sonuç olarak, *E. granulosus*'un *in vitro* kültüründe elde edilecek başarılı sonuçlar önümüze parazitin ergin ve larvası ile ilgili pek çok bilimsel çalışma olanağı sunabilecektir. *Echinococcus* türlerinin insan ve hayvan sağlığına olan etkileri ile ekonomik önemi de dikkate alındığında, geçmişten günümüze kadar yapılan araştırmalara, gelişen teknoloji ve artan imkânlarımızla, olanca hızıyla devam etmemiz gerekmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Altıntaş N, 1991. Ekinokokların *in vitro* üretilmesi. Unat E.K. ve ark., ed. *İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik* (Echinococcosis). Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:10, s.43-54.
2. Bölükbaş CS, 2007. *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin *in vitro* ortamda gelişimi ve protein yapılarının SDS – PAGE yöntemi ile belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enst., Parazitoloji Programı. Ankara.
3. Casado N, Rodriguez-Caabeiro F, 1989. Ultrastructural study of *in vitro* larval development of *Echinococcus granulosus* protoscolex. *Int J Parasitol*, 19: 21 – 28.
4. Casado N, Perez-Serrano J, Denegri G, Rodriguez-Caabeiro F, 1996. Development of a chemotherapeutic model for the *in vitro* screening of drugs against *Echinococcus granulosus* cysts: The effects of an albendazole – albendazole sulphoxide combination. *Int J Parasitol*, 26: 59 – 65.
5. Casado N, Criado A, Jimenez A, De Armas C, Brasa C, Prez-Serrano J, Rodriguez-Caabeiro F, 1992. Viability of *Echinococcus granulosus* cysts in mice following cultivation *in vitro*. *Int J Parasitol*, 22: 335 – 339.
6. Ertağlar H, Altıntaş N, 2002. *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin *in vitro* larval gelişiminin gözlenmesi. *Türkiye Parazit Derg*, 26: 183 – 185.
7. Ertağlar H, Altıntaş N, 2002. Albendazole ve mebendazole'ün *Echinococcus granulosus*'un minyatür kistleri üzerindeki *in vitro* etkisinin araştırılması. *Türkiye Parazit Derg*, 26: 396 – 399.
8. Heath DD, Smyth JD, 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.

9. **Heath DD, Lawrence SB**, 1976. *Echinococcus granulosus*: development *in vitro* from oncosphere to immature hydatid cyst. *Parasitology*, 73: 417 – 423.
10. **Heath DD, Lawrence SB**, 1981. *Echinococcus granulosus* cysts: early development *in vitro* in the presence of serum from infected sheep. *Int J Parasitol*, 11: 261 – 266.
11. **Heath DD, Osborn PJ**, 1976. Formation of *Echinococcus granulosus* laminated membrane in a defined medium. *Int J Parasitol*, 6: 467 – 471.
12. **Herd RP, Ko L, Weisbrode SE, Heath DD**, 1984. Sequential morphologic changes in adult *Echinococcus granulosus* during complement – mediated lysis *in vitro*. *Int J Parasitol*, 14: 141 – 149.
13. **Hijjawi NS, Abdel-Hafez SK, Al-Yaman FM**, 1992. *In vitro* culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* of sheep and donkey origin from Jordan. *Parasitol Res*, 78: 607 – 616.
14. **Holcman B, Heath DD, Shaw RJ**, 1994. Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacestode development of *Echinococcus granulosus*. *Int J Parasitol*, 24: 623 – 635.
15. **Kumaratilake LM, Thompson RCA**, 1981. Maintenance of the life cycle of *Echinococcus granulosus* in the laboratory following *in vivo* and *in vitro* development. *Z Parasitenkd*, 65: 103 – 106.
16. **Kumaratilake LM, Thompson RCA, Dunsmore JD**, 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.
17. **Macpherson CNL, Smyth JD**, 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.
18. **Oge S, Sarmehmetoğlu 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.
19. **Ponce Gordo F, Cuesta Bandera C**, 1997. *Echinococcus granulosus*: characterization of the Spanish strains using *in vitro* vesicular development. *J Helminthol*, 71: 61 – 67.
20. **Rogan MT, 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.
21. **Sakamoto T, Gemmell MA**, 1975. Studies on effects of drugs upon protoscoleces of *Echinococcus granulosus in vitro*. *Jap J Vet Res*, 23: 81 – 94.
22. **Smyth JD**, 1962. Studies on tapeworm physiology, X. Axenic cultivation of the hydatid organism. *Echinococcus granulosus*; establishment of a basic technique. *Parasitology*, 52: 441 – 457.
23. **Smyth JD**, 1967. Studies on tapeworm physiology, XI. *In vitro* cultivation of *Echinococcus granulosus* from the protoscoleces to the strobilate stage. *Parasitology*, 57: 111 – 133.
24. **Smyth JD**, 1971. Development of monozyotic forms of *Echinococcus granulosus* during *in vitro* culture. *Int J Parasitol*, 1: 121 – 124.
25. **Smyth JD**, 1981. *Introduction to Animal Parasitology*. London: Hodder and Stoughton. p. 423 – 446.
26. **Smyth JD**, 1990. *In vitro cultivation of parasitic helminths*. Florida: CRC Pres. p. 124 – 137.
27. **Smyth JD, Davies Z**, 1974. 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.
28. **Smyth JD, Davies Z**, 1974. *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.
29. **Taylor AER, Baker JR**, 1987. *In Vitro Methods for Parasite Cultivation*. Florida: Academic Pres. p. 298 – 305.
30. **Tiğın Y, Umur Ş**, 1989. *Echinococcus granulosus* ve *E.multilocularis*'in *in vitro* kültürü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 36: 775 – 781.
31. **Yoneva A, Mızinska-Boevska Y**, 2001. *In vitro* cultivation of helminths and establishment of cell culture. *Exp Pathol Parasitol*, 4: 3 – 8.
32. **Zhang W, Jones MK, Li J, McManus DP**, 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.