

HİDATİK KİSTTE CANLILIK TAYİNİNDE İDEAL BOYANMA KALİTESİ İÇİN KULLANILAN EOZİNİN KONSANTRASYONU NE OLMALI ?

What Should Be The Concentration of Eosin to Qualification of Ideal Staining for Viability Determination on Hydatid Cyst ?

Özlem MİMAN¹, Ö. Makbule AYCAN¹, Cemalettin AYDIN², Metin ATAMBAY¹

¹ İnönü Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD,
MALATYA

² İnönü Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD,
MALATYA

Geliş Tarihi: 20.04.2010
Kabul Tarihi: 12.05.2010

İletişim:
Özlem MİMAN
Aydın Kocatepe Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji AD,
AFYONKARAHİSAR
Tel : +90 272 246 33 33-1064
E-posta : ozlmiman@yahoo.com

ÖZET

Amaç: Hidatik kistte canlılık tayini, in vitro ve in vivo çalışmaların yanı sıra ilaç denemelerine yönelik çalışmalarda da önem arz etmektedir. Fertil kistlerde protoskolekslerin canlılık oranlarını saptamak amacıyla neutral red, methylene blue, eosin, Papanicolao, Giemsa, Ziehl-Neelsen, toluidine blue ve trypan blue gibi çeşitli vital ve avital boyalar kullanılmaktadır. Yaygın olarak ise eozin tercih edilmektedir. Prosedürlerde farklı konsantrasyonlarda eozin kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışma ile protoskoleks canlılığının araştırılmasında kullanılan eozinin ideal konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Protoskoleksler eozinin % 0.05, % 0.1, % 1, % 3 ve % 5'lik konsantrasyonları ile muameleye tabi tutulmuştur. Eozin boyama yöntemi ile 500 protoskoleks 0., 5., 15., 30. ve 60. dakikalarda canlılık yönünden incelenmiştir.

Bulgular: Alev hücreleri motilitesi ve kontraktilitesinin değerlendirmesine dayalı protoskolekslerin canlılık testinde kullanılacak eozin için ideal konsantrasyonlar % 0.1 ve % 1 olarak saptanmıştır. % 1'den yüksek eozin konsantrasyonlarında; canlı protoskolekslerin koyu boyanan zemin üzerinde ayırt edilmesinin zor olduğu izlenmiştir. % 0.1'den düşük konsantrasyonlarda ise; alev hücresi motilitesi ve kontraktilite olmamasına karşın, ölü protoskolekslerin "canlı" olarak hatalı bildirilebileceği belirlenmiştir.

Sonuç: Eozin ucuz, toksisitesi az, kolay hazırlanabilir ve ulaşılabilir bir boya maddesidir. Bu özellikleri nedeniyle protoskolekslerin canlılık testlerinde tercih edilen eozinin, ideal boyanma kalitesi ve doğru canlılık kararına yardımcı olabilmesi için % 0.1 ve % 1'lik konsantrasyonların kullanılması önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Hidatik kist, protoskoleks, canlılık

ABSTRACT

Objective: The viability assessment in hydatid cyst is important for both in vitro and in vivo studies, and also in drug experiments. Several vital and avital stains as neutral red, methylene blue, eosin, Papanicolao, Giemsa, Ziehl-Neelsen, toluidine blue and trypan blue have been used to assess viability of protoscoleces in fertile cysts. Of them, eosin is the most widely preferred stain. Various concentrations of eosin have been used in the dying procedures. In this study, it was aimed to determine the ideal concentration of eosin for assessing protoscoleces fertility.

Method: Protoscolexes were treated with eosin concentrations: 0.05 %, 0.1 %, 1 %, 3 %, and 5 %. A total of 500 protoscolexes were examined by eosin staining techniques with 0., 5., 15., 30. and 60.-minute intervals.

Results: Ideal concentrations of eosin which will be used for viability test to determine the motile flame cells and contractile protoscolex were found as 0.1 % and 1 %. In viability test of protoscolex, above the 1 % concentration of eosin caused difficulty in the decision of viability because of the darker background. On the otherhand, at lower concentrations of eosin less than 0.1 %, despite no flame cells motility and protoscolex contractility, dead protoscolex would be misidentified as “ alive”.

Conclusion: Eosin is a dye which is cheap, less toxic, easily prepared and available at anywhere. Because of those properties, it is preferred for the viability test of protoscolex and is recommended to use between 0.1 % and 1 % concentrations for the ideal staining to viability determination.

Key Words: Hydatid cyst, protoscolex, viability

GİRİŞ

Kistik ekinokokkozis ülkemiz açısından önemli bir halk sağlığı problemi olarak değerlendirilen zoonozlardan biridir. Bu hastalık *Echinococcus granulosus*'a ait larval formun (hidatik kist) insan ve hayvanlarda oluşturduğu bir paraziter hastalıktır. Ekinokokkozis, benign karakterli olmasına rağmen, özellikle tanının geç konması durumlarında; gerek komplikasyonları gerekse yaptığı doku harabiyetleri ile ciddi sonuçlar doğurabilmektedir (1). Hastalığın epidemiyolojisinde, çeşitli ara konaklardaki fertilitate oranlarının çok büyük önemi vardır. Bu canlılık ara konağın türü ve yaşı, coğrafik bölge ile parazit suşu gibi çeşitli faktörlere göre değişiklik göstermektedir (2, 3). Kistlere karşı in vitro ve in vivo yapılmış çok sayıda skolosidal ajan/ilaç deneme çalışmaları vardır (4-8). Bu tip skolosidal madde denemelerine yönelik çalışmalarda canlılık (viabilite) oranının belirlenmesi çok önemlidir. Canlılık testlerinde protoskoleksin kontraktilesi ve alev hücrelerinin (flame cell) motilitesinin belirlenmesi yanında çeşitli vital/avital karakterli boyama yöntemleri de kullanılmaktadır. Protoskolekslerin canlılık oranlarını saptamak amacıyla neutral red, methylene blue, eosin, Papanicolao, Giemsa, Ziehl-Neelsen, toluidine blue ve trypan blue gibi çeşitli vital ve avital boyalar kullanılmaktadır (9, 10). Skolosidal madde çalışmaları ve diğer literatürler araştırılmış, canlılık testlerinde

en sık kullanılanın tekniğın eozin boyama olduğu saptanmıştır (8, 11, 12). Ancak canlılık çalışmalarında kullanılan eozinin tercih edilen konsantrasyonları arasında % 0,01 ile % 5 arasında değişen belirgin farklar olduğu gözlenmiştir (6, 7, 11, 13-15).

Bu çalışma ile fertil kistlerde canlılık oranını saptamak amacı ile yaygın olarak kullanılan eozinin değişik konsantrasyonlarının boyama kalitesi ve canlılığın ortaya konması açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Malatya merkez ve ilçelerinde bulunan mezbahalarda, kesim sonrası enfekte olduğu saptanan koyunlara ait karaciğer örnekleri kullanılmıştır. *E. granulosus* protoskoleksleri, bu doğal enfekte koyunların karaciğer hidatik kistlerinden steril enjektörle çekilen kist sıvısından elde edilmiştir. Kist sıvısı steril deney tüplerine aktarılmış ve 1- 2 saat kadar bekletilerek hidatik kum çökeltisi elde edilmiştir.

Eozinin % 0.05, % 0.1, % 1, % 3 ve % 5'lik solüsyonları salin (%0.85 tuzlu su) içinde hazırlanmıştır. Protoskoleksler eozinin değişik konsantrasyonları ile değişen sürelerde muamele edilmiştir. Diğer taraftan, yalnızca kist sıvısı ve distile su içeren bir deney tüpü

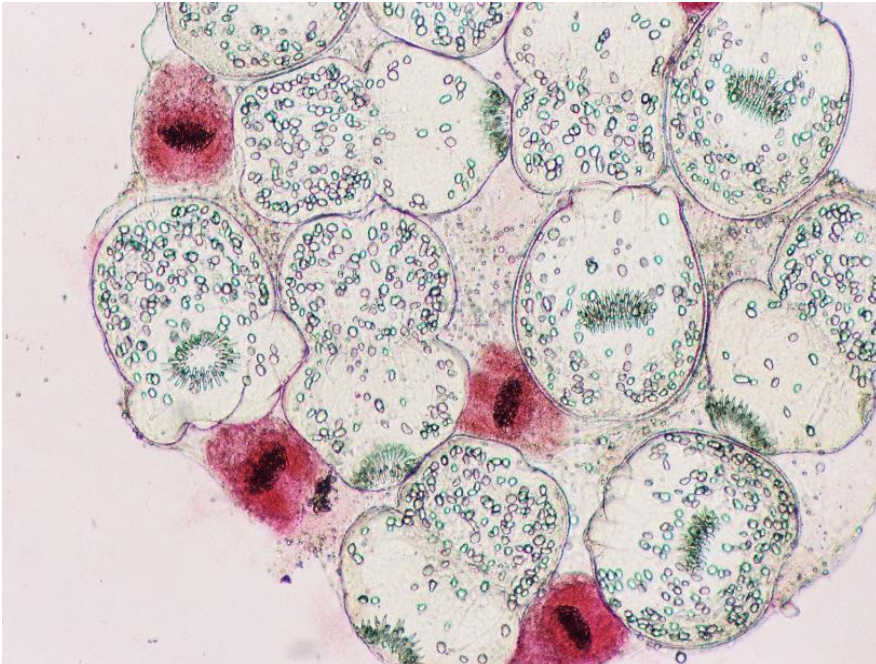
hazırlanmış ve bu preparasyon ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bir konsantrasyondaki boyama yöntemi ile 500 protoskoleks canlılık yönünden ışık mikroskobu altında incelenerek boyanma kalitesi açısından değerlendirilmiştir.

Tüplerdeki karışımlarda protoskolekslerin 0. 10. 30. 45. ve 60. dakikalardaki canlılıkları, eozinin hazırlanmış olan değişik konsantrasyonları ile kontrol edilmiştir. Protoskoleks kontraktilesinin ve alev hücre motilitesinin kaybolması gibi subjektif bulguların yanında protoskolekslerin elipsoid şekillerini kaybederek yuvarlaklaştığı, vakuoler dejenerasyon oluştuğu ve içlerine eozin aldığı gözlemlendiğinde canlılıklarını kaybettiklerine karar verilmiştir. Mikroskop alanındaki canlı protoskoleksler sayılarak canlılıkları yüzde olarak kaydedilmiştir.

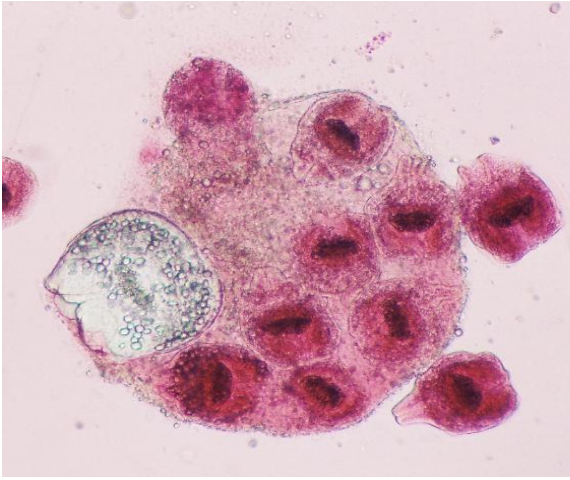
BULGULAR

Çalışmanın 0. dakikasında alanlarda çok az sayıda deforme ve canlılığını yitirmiş protoskolekslerin

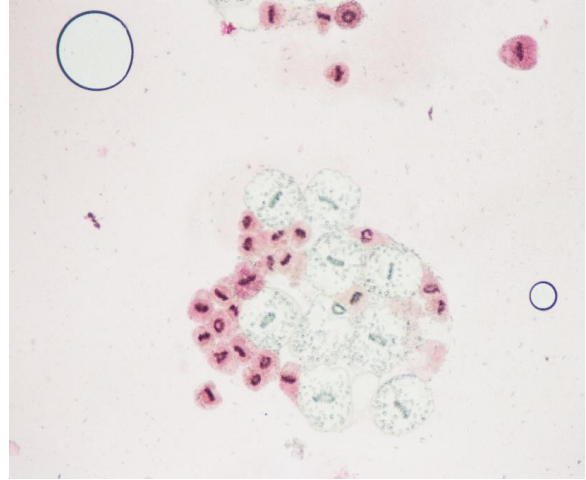
bulunduğu, % 95 oranında canlılıklarını korudukları belirlenmiştir (Şekil 1). Ortamda çokça invajine protoskoleks az oranda da veziküler tip protoskoleksler izlenmiştir. Canlılık oranlarının eozinin % 0.05, % 0.1, % 1, % 3 ve % 5'lik konsantrasyonlarına göre sırasıyla % 100, % 95, % 85-80, % 60 ve % 60 olduğu saptanmıştır. Canlılık testinde bire bir oranda kullanılan boya miktarı (damla sayısı) arttırıldığında ise son iki konsantrasyonun, zeminin koyu boyanması sonucu alev hücrelerinin motil ve protoskolekslerin kontraktil olmasına rağmen boyalı izlenimi vermesi dolayısıyla canlılık kararına varmayı olumsuz etkilediği izlenmiştir. 30. dakika gözlemlerinde canlılık sırasıyla % 95, % 85, % 80, % 40, % 40 olarak bulunmuştur (Şekil 2). 60. dakika sonunda incelendiklerinde ise canlılığın sırasıyla % 80, % 40, % 40, % 20 ve % 20 olduğu saptanmıştır (Şekil 3-6). Ayrıca ortamda invajine protoskoleks ile veziküler tip protoskolekse rastlanma oranının tersine döndüğü ve bunlara posterior kesesi olmayan evajine protoskoleks yapılarının eşlik ettiği gözlenmiştir. Protoskolekslerin hiç kontraktilite ve



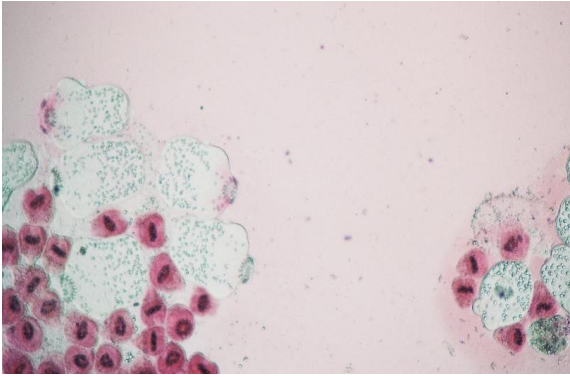
Şekil 1. %1'lik eozin ile 0. dakikada protoskolekslerin görünümü. (%85 viabilite) (x40) Ortamda çokça invajine protoskoleks az oranda da veziküler tip protoskoleksler izlenmiştir. Çengeller ve kalkerli cisimcikler çok belirgin olarak görülmekte, ancak çekmenler o kadar belirgin görülmemektedir.



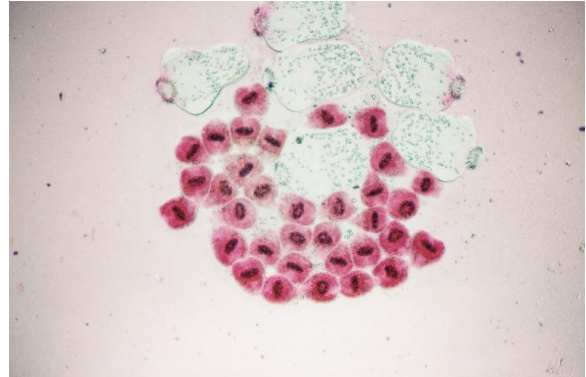
Şekil 2. 30. dakikada % 3 eozin ile protoskolekslerin görünümü. (% 40 viabilite) (x40)



Şekil 3. % 0.05'lik eozin ile protoskoleksler 60. dakikada (x20)



Şekil 4. % 0.1'lik eozinle 60. dakika (% 40 viabilite) (x20)



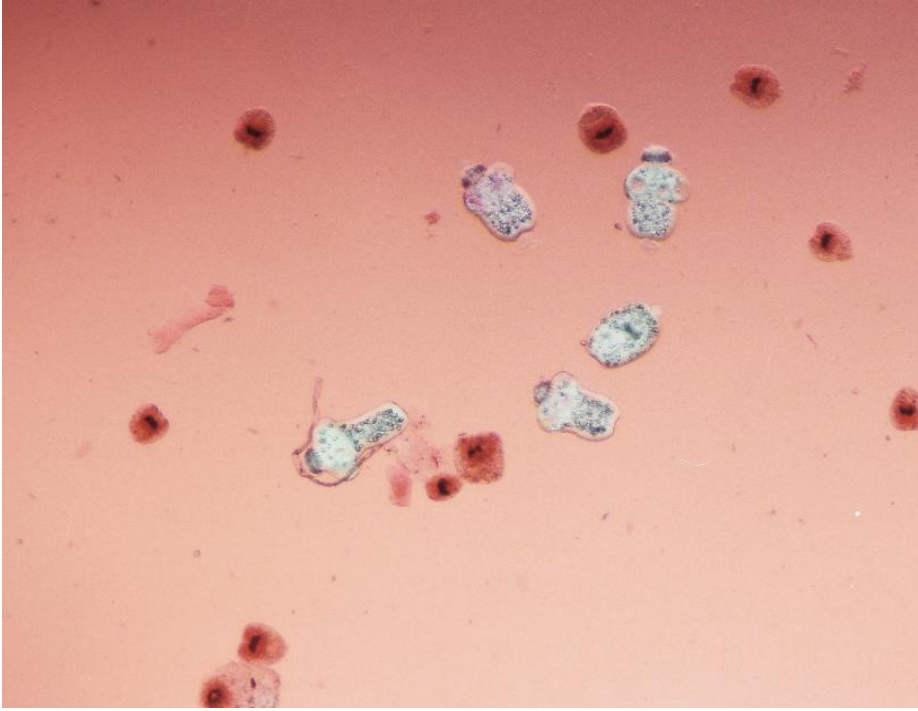
Şekil 5. % 1'lik eozinle 60. dakika (% 40 viabilite) (x20)

alev hücre motilitesi göstermemelerine rağmen % 0.05'lik konsantrasyondaki eozin ile miktar arttırılmış olsa da hiç boyanmamış olmalarının hatalı canlılık kararına yol açtığı saptanmıştır.

TARTIŞMA

Kistik ekinokokkozis prevalansı ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına karşın hidatik kistlerin fertilitate ve canlılık oranları üzerine yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Yıldız ve

Gürcan (16) çalışmalarında, kist hidatikli koyunlarda fertilitate oranını karaciğer ve akciğerdeki kistler için sırasıyla % 81,5 ve % 76,5 olarak kaydetmişlerdir. Bizim çalışmamızda koyun karaciğer kistlerinden faydalanılmış ve açılan tüm kistlerin fertil olduğu gözlenmiştir. Farkın, kistlerin elde edildiği hayvanın yaşından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çünkü yapılan çalışmalarla genç koyunlarda hidatik kistlerin fertilitate oranının düşük (% 10) olduğu, yaşla beraber fertilitate oranının % 97,14'lere kadar yükseldiği rapor edilmiştir (17, 18).



Şekil 6. % 5'lik eozin ile evajine protoskoleksler 60. dakikada(x10).

Fertil kistlerde skolosidal madde denemelerine yönelik çalışmalarda canlılık oranının belirlenmesi çok önemlidir. Bu amaçla değişik canlılık kriterleri kullanılmakla birlikte daha sıklıkla kullanılan yöntem boyalardır (9, 10). Bu boyama yöntemlerinden trypan blue, methylen blue ve eosin boyamanın canlılık tayininde benzer sonuçlar verdikleri, aralarındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu bildirilmiştir (19).

Canlılık testlerinin yapıldığı birçok çalışmada ise kolay hazırlanabilirliği ve toksisitesinin de az olmasından dolayı eosin boyamanın seçildiği bilinmektedir (6,7,11,12). Ancak canlılık çalışmalarında kullanılan eozinin tercih edilen konsantrasyonları arasında % 0,01 ile % 5 arasında değişen belirgin farklar olduğu gözlenmiştir. Kayaalp (6) % 0.01'lik; Ertabaklar (7), Esmе (11), Özçelik (20), Diker (21)

ve Besim (13) % 0.1'lik; Çiftçi (14) % 1'lik; Tsimoyiannis ve arkadaşları (15) ise % 5'lik eozin konsantrasyonları ile çalışmışlardır. Canlılık çalışmalarında kullanılan eozinin standardize bir konsantrasyonda kullanılmayışından doğabilecek olası hataların bertaraf edilebilmesi için en doğru konsantrasyonun tespit edilebilmesi amacı ile bu çalışma planlanmıştır. Çalışmamızda literatürde rastlanan % 0.01 - % 5 aralığındaki eozin konsantrasyonları kullanılmıştır. Ayrıca en çok çalışılan % 0.1'lik konsantrasyon yarısı kadar daha seyreltilerek çalışmaya alınmıştır.

Bu deneysel çalışma sonucunda ideal boya kalitesi ve doğru canlılık kararlarının verilebilmesi için % 0.1 ve % 1'lik eozin konsantrasyonların seçilmesinin ve bire bir oranlarda kullanılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Bogitsh BJ, Carter CE, Oeltmann TN. Human Parasitology. Third edition, USA, 2005; 288-96.
2. Dalimi A, Motamedi GH, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, Ghaffari Far F. Echinococcosis / Hydatidosis in Western Iran. Vet Parazitol, 2002; 105: 161-7.
3. Khan AH, El-Buni AA, Ali MY. Fertiity of te cysts of *Echinococcus granulosus* in domestic herbivores from Benghazi, Libya, and the reactivity of antigens produced from them. Ann Trop Med Parasitol, 2001; 95: 337-42.
4. Perez-Serano J, Casado N, Denegri G, Rodriguez-Caabeiro F. The effects of albendazole and albendazole sulphoxide combnation-therapy on *Echinococcus granulosus* in vitro. Int J Parasitol, 1994; 24: 219-24.
5. Walker M, Rossignol JF, Torgerson P, Hempbill A. In vitro effects of nitazoxanide on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. J Antimicrob Chemother, 2004; 54: 609-16.
6. Kayaalp C, Balkan M, Aydın C, Özgürtaş T, et all. Hypertonik saline in hydatid disease. World J Surg, 2001; 25: 975-9.
7. Ertabaklar H, Altıntaş N. In vitro efficacies of albendazole and mebendazole against miniature cysts of *Echinococcus granulosus*. Türkiye Parazitol Derg, 2002; 26 (4): 396-9.
8. Hokelek M, Erzurulu K, Uyar Y, Birinci A. The effect of praziquanel as ascolicidal agent on the protoscolices of *Echinococcus granulosus*. Turk Hij Den Biol Derg, 1999; 56: 129-34.
9. Freshney R. Culture of Animal Cells: A Manuel of Basic Technique, Alan R. Liss, Inc., New York, 1987; 117.
10. Gori S, Campatelli A, Luchi S, Paladini A, Savalli E, Scasso A. Cytology in the percutaneous treatment of hydatid cysts. A report of four cases. Acta Cytol, 1993; 37(3): 423-6.
11. Esmé H, Çiftçi İH, Solak O, Dilek ON. Akciğer hidatik kistlerinde usnik asit, betadine, savlosol ve desderman'ın protoskolekler üzerine germisid etkinliğinin araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2007; 31 (2): 101-4.
12. Hökelek M, Uyar Y, Erzurumlu K. *Echinococcus granulosus* protoskoleks viabiliteleri üzerine albendazol sülfoksid solüsyonunun etkinliğinin araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2001; 25(1): 41-4.
13. Besim H, Karayalçın K, Hamamcı O, Güngör C, Korkmaz A. Scolicidal agents in hydatid cyst surgery. HPB Surg, 1998; 10(6): 347-51.
14. Ciftci İH, Esmé H, Sahin DA, Solak O, Sezer M, Dilek ON. Effect of octenidine dihydrochloride on viability of protoscoleces in hepatic and pulmonary hydatid diseases. J Natl Med Assoc, 2007; 99(6): 674-7.
15. Tsimoyiannis EC, Siakas P, Glantzounis G, Tsimoyiannis JC, Karayianni M, Gossios KJ. Intracystic pressure and viability in hydatid disease of the liver. Int Surg, 2000; 85(3): 234-6.
16. Yıldız K, Gürcan S. Prevalence og hydatidosis and fertility of hydatid cysts in sheep in Kırkkale, Turkey. Acta Vet Hung, 2003; 51: 181-7.
17. Güralp N, Doğru C. Ankara mezbahasında kesilen değişik yaşlardaki koyun ve sığırların organlarında görülen ekinokok kistlerinin fertilité durumları. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 1971; 18: 195-205.
18. Şenlik B. Bursa yöresi koyunlarında hidatidoz'un yaygınlığı ve yaş, ırk, cinsiyet ile ilişkisi. Türkiye Parazitol Derg, 2000; 24: 304-8.
19. Yıldırım A, İça A, Düzlü Ö, İnci A. Kistik echinococcosisde canlılık tayininde kullanılan çeşitli boyama yöntemlerinin istatistiksel analizi. Türkiye Parazitol Derg, 2007; 31(2): 105-8.
20. Özçelik S, Sümer Z, Değertli S, Ozan F, Sökmen A. Sarımsak (*Allium sativum*) özütü skolisidal ajan olarak kullanılabilir mi? Türkiye Parazitol Derg, 2007; 31(4): 318-21.
21. Diker AI, Tinar R, Senlik B. Viability of *Echinococcus granulosus* protoscolices at different conditions. Vet Parasitol, 2007; 150(1-2): 84-7.