

Trichomonas vaginalis'in in vitro Üremesi Üzerine Fe⁺² İyonunun Etkisi

IN VITRO EFFECT OF FE IONS ON THE GROWTH OF TRICHOMONAS VAGINALIS

Ümit AKSOY, Bülent SARI, Çiler AKISÜ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, *Trichomonas vaginalis*'in in vitro üremesi üzerine Fe⁺² iyonunun etkisini araştırmak hedeflendi.

Gereç ve yöntem: *T. vaginalis*'in üretildiği TYM (Trypticase Yeast- Extract Maltose) besiyerine, 300 µM ve 600 µM olmak üzere iki farklı molaritede hazırlanan FeSO₄ bileşiği ilave edilerek parazitin in vitro çoğalmasına etkisi araştırıldı.

Bulgular: Fe⁺² iyonu içeren besiyerindeki *T. vaginalis*'in çoğalmasının standart besiyerine göre, 24. saatte anlamlı düzeyde arttığı görüldü.

Sonuç: Bu veriye dayanarak, kadınlarda menstruasyon sonrası *vaginaldaki* yüksek Fe⁺² konsantrasyonuna bağlı olarak *T. vaginalis*'in üremesinin hızlandığı ve böylece parazitoza bağlı yakınmaların artabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Trichomonas vaginalis*, besiyeri, Fe⁺²

SUMMARY

Objective: In this study, it was aimed to evaluate the in vitro effect of Fe⁺² ion on the growth of *Trichomonas vaginalis*.

Material and method: FeSO₄ compounds which were prepared in two different concentrations as 300 µM and 600 µM were added into TYM (Trypticase Yeast-Extract Maltose) medium that *T. vaginalis* was grown and the effects of different concentrations were evaluated.

Results: The significant increases were seen on the growth of *T. vaginalis* in the study groups at 24th hour when compared with the control group.

Conclusion: According to this result, it has been concluded that the increase in the growth of *T. vaginalis* depending on high Fe⁺² concentration in vagina in the menstruation periods of women may cause increase in complaints by this parasitosis.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, media, Fe⁺²

Ümit AKSOY

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Parazitoloji Anabilim Dalı

35340 Inciraltı-İZMİR

Tel: 0 (232) 4124544

e-posta: umit.cimli@deu.edu.tr

Cinsel yolla bulaşan önemli etkenler arasında yer alan *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), ile tüm dünyada her yıl 170 milyon kişi enfekte olmakta ve parazit ürogenital sisteme yerleşerek kadınlarda vaginit ve servisitlere yol açmaktadır. Erkeklerde ise daha çok asemptomatik olarak seyretmesine karşın, semptomatik olgularda üretrit, prostatit, balanopostit, epididimit gibi komplikasyonlara neden olmaktadır (1-3).

T. vaginalis'in tanısında en yaygın olarak direkt mikroskopik baki ve kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Direkt mikroskopik baki ucuz, pratik ve hızlı yanıt veren bir yöntem olması nedeniyle tercih edilmektedir. Kültür yöntemi ise geç yanıt vermesine, daha fazla çaba gerektirmesine karşın duyarlılığının yüksek olması ve çok az sayıda paraziti saptayabilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılır. Bu amaçla en sık kullanılan besi-

yerlerinden biri de Diamond tarafından tanımlanan TYM (Trypticase-Yeast extract-Maltose) besiyeridir (1,4).

Parazitlerin biyokimyasal reaksiyonlarında bazı metal iyonları önemli rol oynamaktadır. *T. vaginalis* oluşturduğu patojenik etkide demirin (Fe²⁺) önemli olduğu vurgulanmaktadır (5,6). Yapılan araştırmalarda Fe²⁺'nin parazitin adezin sentezi, hücreye yapışması ve kompleman lizisine karşı oluşan dirençte rol aldığı, ayrıca yüzey immunojenlerinin gen ekspresyonunda önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (7-10).

Biz bu çalışmada, TYM besiyerinde üretilen *T. vaginalis*'e, iki ayrı konsantrasyonda hazırlanmış demir sülfat (FeSO₄) bileşiğinin ilave edilmesi ile parazitin üreme hızında oluşan etkiyi araştırmayı hedefledik.

GEREÇ ve YÖNTEM

T. vaginalis suşu: *T. vaginalis* klinik suşu, vaginal akıntı yakınması ile başvuran bir hastadan izole edildi. Vajinal akıntının TYM besiyerine ekilmesinden 24 saat sonra alınan örneğin ışık mikroskopunda X20 büyütmede incelenmesi sonucunda hareketli parazitler görüldü.

Kültür: Diamond tarafından tanımlanan TYM besiyeri hazırlandı (11). Bu besiyerine FeSO₄ ilave edilenler çalışma grubunu, standart besiyerinde üretilenler ise kontrol grubunu oluşturdu.

Yöntem: Bu amaçla; kontrol grubu ve iki ayrı molaritedeki çalışma grubu olmak üzere her grup için 5'er tüp besiyeri hazırlandı. Çalışma grubunda demir sülfat (FeSO₄), 300 µM ve 600 µM olacak şekilde hazırlanarak TYM besiyerine ilave edildi. *T. vaginalis*'ler ilk ekim yapıldığı besiyerinden alınıp, standart ve demir sülfat (FeSO₄) ilaveli TYM besiyerine, erken üreme fazı için uygun olduğu bildirilen 20x10⁷/ml tane olacak şekilde ekildi ve 37°C'de inkübe edildi.

Ekimden ½, 1, 3, 5, 24 ve 48 saat sonra besiyerinden alınan örnekte bulunan parazitler Thoma lamina aktarıldı. Işık mikroskopunda X20 büyütmede sadece canlı parazitler sayıldı ve elde edilen sonuçlar kaydedildi.

İstatistiksel analiz: Farklı molaritede FeSO₄ içeren TYM besiyerinde kültüre edilen *T. vaginalis*'ler ile standart TYM besiyerinde kültüre edilenlerin üreme hızları arasındaki farklılıklar, non parametrik Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

TYM besiyerine 20x10⁷/ml konsantrasyonunda ekilen parazitlerin belirli saatlerde sayımı yapıldı. Kontrol grubunda ve iki ayrı konsantrasyonda (300 µM, 600 µM) FeSO₄ ilave edilen çalışma grubunda üreme düzeyleri Tabloda gösterilmiştir.

Tablo. TYM besiyerine ekilen parazitlerin çalışma ve kontrol grubunda üreme hızları

Gruplar	Üreme Hızı (x 10 ³)					
	30dk	1 saat	3 saat	5 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	20	20	22	32	210	2
	22	23	25	30	200	3
	20	22	22	31	204	1
	21	22	26	34	208	1
	20	21	22	35	200	1
300µM FeSO ₄	20	21	22	35	256	0
	20	21	26	37	260	1
	20	20	25	38	280	0
	21	22	25	36	288	0
	22	22	28	32	260	0
600µM FeSO ₄	21	21	32	38	288	0
	20	22	30	35	270	0
	20	23	30	39	288	0
	21	21	31	38	288	1
	20	22	28	40	328	0

Bu verilere dayanarak, kontrol grubunda *T. vaginalis*'lerin çoğalmasının 5. saatten itibaren anlamlı artış gösterdiği ($p<0,01$), 24. saatte bu artışın hızlandığı ve 48. saatte ise düşük oranda da olsa canlı kalabildikleri gözlemlendi. Çalışma grubunda da, 5. saatte parazit sayısındaki artışın anlamlı olduğu ($p<0,01$), 24. saatte en üst düzeye eriştiği ve 48. saatte ise nadiren canlı kalabildiği görüldü.

Çalışma grubu ile kontrol grubundaki *T. vaginalis*'lerin üreme hızlarını karşılaştırdığımız zaman, 24. saatte Fe²⁺ içeren gruptaki parazitin üremesindeki artışın anlamlı olduğu görüldü ($p<0,01$). Diğer saatlerdeki üreme hızları arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Ayrıca, FeSO₄'ün 300 µM ve 600 µM düzeyleri arasında da parazitin üreme hızı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

TARTIŞMA

T. vaginalis'in tanıında sıkça kullanılan ve duyarlığı yüksek yöntemlerden birisi de in vitro kültürdür. Bu amaçla en sık kullanılan besiyerleri TP-S 1, CPLM, Modifiye CPLM ve TYM'dir (12,13). Biz de ön çalışmamızda *T. vaginalis*'leri üretmede TYM besiyerinin başarılı olduğunu gördük.

Fe²⁺ iyonunun *T. vaginalis*'in üremesi üzerine etkisi ve patojenitedeki rolüne yönelik çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Alderete ve ark (14), *T. vaginalis*'e ait ap51 adhezin proteininin sentezini incelediklerinde, ap51-1 ve ap51-3 proteinlerini sentezleyen genlerin transkripsiyonunun Fe²⁺ tarafından düzenlendiğini bildirdiler. Lehker ve ark'un (8) yaptıkları çalışmada, bu metal iyonunun kompleks bir besiyerinde sito-adherans değerini iki kat veya daha fazla artırdığı, aynı araştırmacının bir başka çalışmasında ise, demir oranı kısıtlanmış besiyerinde Fe²⁺'nin *T. vaginalis*'in protein sentezini %80 azalttığı bununla beraber laktoferin bağlama kapasitesini artırdığı bildirilmiştir (9). Biz de çalışmamızda Fe²⁺'nin *T. vaginalis* çoğalması üzerine etkili olduğunu, FeSO₄ ilaveli besiyerinde, kontrol grubuna kıyasla üremenin belirgin oranda arttığını saptadık.

Ryu ve ark (10), FeSO₄ ilaveli TYM besiyeri ile eser miktarda demir içeren standart TYM besiyeri ve Fe²⁺'den yoksun TYM besiyerinden oluşan kontrol gruplarını karşılaştırdıklarında; FeSO₄ ilaveli TYM besiyerinde üretilen *T. vaginalis*'lerin farelerde subkutan apse geliştirdiği, standart TYM'de üretilenler ile de subkutan apse oluştuğu ancak apse boyutunun daha küçük olduğu, buna karşın demirden yoksun besiyerinde üretilen *T. vaginalis*'lerin farelerde herhangi bir oluşuma yol açmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar bu çalışma ile Fe²⁺'nin parazitin patojenitesini artırıcı etkisini ortaya koymuşlardır. Fe²⁺'nin parazit üzerine etkileri ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada ise, ortamda bulunan Fe²⁺ konsantrasyonunun *T. vaginalis*'in komplemana direng geliştirmesinde önemli olduğu vurgulanmıştır (7).

Çalışmamızda, bu iyonun parazitin çoğalmasını olumlu yönde etkilediğini ve bu farklılığın kontrol grubuna göre anlamlı olduğunu gözlemledik. Lehker ve ark (15), artan parazit sayısının hastalığın patojenitesi ile bağlantısını araştırdıklarında; kadınlarda menstruasyon döneminden sonra *T. vaginalis* enfeksiyonunun görülme sıklığının arttığı ve klinik bulguların şiddetlendiği sonucuna varmışlardır. Buna, parazitin menstruasyonla beraber kaybedilen kanda bulunan eritrositlerin içindeki Fe²⁺'yi metabolik faaliyetlerinde kullanmasının yol açtığını ileri sürmüşlerdir. Elde ettiğimiz verilerde, farklı konsantrasyonlarda besiyerine eklenen Fe²⁺'nin ilk 24 saatte *T. vaginalis*'in üremesini anlamlı olarak artırdığı görülmektedir. Üreme hızındaki bu artışın, *T. vaginalis*'lerin Fe²⁺ iyonunu metabolik faaliyetlerde kullanmalarına bağlı olarak gelişmesi olasıdır.

Bu durum, menstruasyon dönemindeki kadınlarda açığa çıkan Fe²⁺ iyonuna bağlı olarak *T. vaginalis* enfeksiyonunun şiddetinin arttığı yönündeki bulguları destekler niteliktedir.

Sonuç olarak; Fe²⁺ elementinin, *T. vaginalis*'in in vitro üremesi üzerine artırıcı etkisi olduğu ve bu etkinin 24 saat içinde en üst düzeye ulaştığı görülmektedir. Gelecekte planlanacak çalışmalarda, *T. vaginalis*'in metabolik ve biyokimyasal birçok fonksiyonunu yerine getirmesinde Fe²⁺'nin rolünün detaylı incelenmesiyle,

bu protozoonun fizyopatolojisinin daha iyi aydınlanacağı inancındayız.

KAYNAKLAR

1. Rein MF. *Trichomonas vaginalis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin P, editors. Principles and practice of infectious diseases. Fourth ed. Churchill Livingstone; 1995. p. 2493-2496.
2. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Sanıstı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı. Cerrahpaşa Tıp Fak Vakfı Yayınları, 15, 1995, 555-558.
3. World Health Organization. An overview of selected curable sexually transmitted diseases. In Global program on AIDS. World Health Organization, Geneva, Switzerland 1995; 2-27.
4. Garber GE, Sibau L, Ma R, Proctor EM, Shaw CE, Bowie WR. Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1987; 25:1275-1279.
5. Gelbart SM, Thomason JL, Osypowsky PJ, Keller AV, James JA, Broekhuizen FF. Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media. J Clin Microbiol 1990; 962-964.
6. Heine P, Mc Gregor JA. *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. Clin Obstet Gynecol 1993; 36:137-144.
7. Alderete JF, Provenzano D, Lehter MW. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. Microb Pathog 1995;19: 93-100.
8. Lehter MW, Arroyo R, Alderete JF. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. Mol Microbiol 1991; 174: 311-318.
9. Lehter MW, Alderete JF. Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and expression of immunogenic trichomonad proteins. Mol Microbiol 1992; 1: 123-132.
10. Ryu JS, Choi HK, Min DY, Ha SE, Ahn MH. Effect of iron on virulence of *Trichomonas vaginalis*. J Parasitol 2001; 87: 457-460.
11. Daldal N, Özensoy S, Aksoy Ü, Akisü Ç, Besiyeri ve hayvan inokulasyonları. Özcel MA, Alıntaş N editorler: Parazit Hastalıklarında Tanı, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15; 1997; 149-182.
12. Abd el Ghaffar FM, Azab ME, Salam SA, Habib KI, Maklad KM, Habib FS. Evaluation of two cultural media (CPLM and TYM) for isolation and maintenance of *Trichomonas vaginalis* stocks in the laboratory. J Egypt Soc Parasitol 1994; 24: 611-619.
13. Dağcı H, Atambay M, Taşer S, Özbilgin A, Daldal N, Alkan MZ. *Trichomonas vaginalis*'in çeşitli *in vitro* besiyerlerinde üretilmesi üzerine çalışmalar. Türk Parazitoloji Derg 1994;18: 426-430.
14. Alderete JF, Enghring J, Lauriano CM, O'Brien JL. Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. Microb Pathog 1998; 24:1-16.
15. Lehter MW, Chang TH, Dailey DC, Alderete JF. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. J Exp Med 1990; 171: 2165-2170.