Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2025;55(4):278-286
doi:10.54453/TMCD.2025.99267

Araştırma / *Research Article*

Leishmania'nın Soğuk Yolculuğu: Kriyoprezervasyon

The Cold Journey of Leishmania: Cryopreservation

İbrahim Çavuş*, Funda Seher Özalp Ateş, Yusuf Güntin***, Ahmet Batuhan Çöplü***, Mustafa Demirkıran***, Şeval Malgır***, Şevval Karabıyık***, Ahmet Özbilgin***

* Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye
** Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye
*** Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Manisa, Türkiye

Atıf/Cite as: Çavuş İ, Özalp Ateş FS, Güntin Y et al. *Leishmania*'nın soğuk yolculuğu: Kriyoprezervasyon. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(4): 278-286.

ÖZ

Amaç: *Leishmania türleri, zorunlu hücre içi protozoonlardır ve Türkiye'de kutanöz ve visseral leyişmanyaz klinik formlarına neden olmaktadır. Bu çalışmada, Leishmania tropica ve Leishmania infantum izolatlarının kriyoprezervasyon sonrası canlılık oranları ve üreme süreleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.*
Yöntem: *Kriyoprezervasyonda dimetilsülfoksit (DMSO), etilen glikol, glukoz ve etilen glikol ile glukozun farklı oranlardaki karışımları kullanılmıştır. İzolatlar sıvı azotta üç, altı ve dokuz ay saklanmış; canlılık oranları tripan mavisi ile, üreme süresi ise NNN besiyerinde logaritmik faza geçiş günü ile belirlenmiştir.*
Bulgular: *DMSO, her iki izolat için de en yüksek canlılık ve en kısa üreme süresi sağlamıştır. Glukoz ve etilen glikol grupları daha düşük canlılık ve geç üreme göstermiştir. Karışım gruplarından özellikle K3'te canlılık belirgin olarak azalmıştır. Zaman ve canlılık arasında anlamlı bir fark saptanmamış, ancak kriyoprotektanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$). DMSO, Leishmania türlerinin kriyoprezervasyonu için en etkili kriyoprotektan olarak öne çıkmaktadır.*
Sonuç: *Bu çalışma, Leishmania izolatlarının uzun süreli muhafazasına yönelik kriyoprezervasyon protokollerine katkı sunmakta ve moleküler-epidemiyolojik çalışmalar için referans kaynak oluşturma potansiyeli taşımaktadır.*

Anahtar kelimeler: *Leishmania tropica, leishmania infantum, kriyoprozervasyon, kryoprotektan*

ABSTRACT

Objective: *Leishmania species are obligate intracellular protozoa responsible for the cutaneous and visceral forms of leishmaniasis in Türkiye. In this study, the post-cryopreservation viability rates and growth durations of Leishmania tropica and Leishmania infantum isolates were compared.*
Methods: *Cryopreservation was performed using dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol, glucose, and various mixtures of ethylene glycol and glucose at different ratios. The isolates were stored in liquid nitrogen for 3, 6, and 9 months; viability was assessed using Trypan blue staining, and growth duration was determined by the day of transition to the logarithmic phase in NNN medium.*
Results: *DMSO provided the highest viability and the shortest growth time for both isolates. Glucose and ethylene glycol groups showed lower viability and delayed growth. Among the mixtures, the K3 group exhibited a notably reduced viability. While no significant difference was observed between viability and storage duration, statistically significant differences were found among the cryoprotectants ($p<0.05$). DMSO was identified as the most effective cryoprotectant for preserving Leishmania species.*
Conclusion: *This study contributes to the optimization of cryopreservation protocols for the long-term storage of Leishmania isolates. It offers valuable data for the establishment of reference parasite banks to support molecular and epidemiological research.*

Keywords: *Leishmania tropica, leishmania infantum, cryopreservation, cryoprotectant*

Alındığı tarih / Received:
18.08.2025 / 18.August.2025
Kabul tarihi / Accepted:
28.10.2025 / 28.October.2025
Yayın tarihi / Publication date:
24.12.2025 / 24.December.2025

ORCID Kayıtları

İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146
F. S. Özalp Ateş 0000-0002-0475-7612
Y. Güntin 0009-0007-3383-9864
A. B. Çöplü 0009-0006-8868-4735
M. Demirkıran 0009-0008-8042-5370
Ş. Malgır 0009-0006-7988-0814
Ş. Karabıyık 0009-0003-6247-8982
A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ icvs26@yahoo.com

GİRİŞ

Leishmania, Trypanosomatidae ailesinin *Mastigophora* alt şubesinde yer alan, kan ve dokuya yerleşen zorunlu hücre içi bir protozoondur. Parazitin yaşam döngüsünde iki morfolojik form mevcuttur: Vektör olan dişi kum sineğinin bağırsağında bulunan kamçılı formu promastigot, memeli konaklarda yerleşen kamçısız formu ise amastigot olarak adlandırılır[1]. Her iki form, morfolojik açıdan belirgin farklılıklar gösterse de hücresel yapı açısından benzer temel organizasyona sahiptir; her ikisinde de çekirdek, kinetoplast ve bazal gövdeden çıkan flagellum yapısı korunur[2].

© 2025 Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti. Bu, Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı altında dağıtılan açık erişimli bir makaledir.
© 2025 Turkish Society of Microbiology. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Leishmaniasis, farklı *Leishmania* türlerinin neden olduğu, dişi tatarcıkların (*Phlebotomus* spp.) ısırmasıyla bulaşan, ihmal edilmiş tropikal hastalıklar grubuna dahil bir enfeksiyondur. Dünya genelinde yılda 50.000–90.000 yeni visseral leishmaniasis (VL) ve 600.000–1 milyon yeni kutanöz leishmaniasis (KL) vakası bildirildiği tahmin edilmektedir[3]. Türkiye, bu hastalık açısından endemik bölgeler arasında yer almaktadır. KL açısından 1988-2010 yılları arasında 50381 olgu bildirilmiştir[4]. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2008-2013 yılları arasında 148 VL olgusu[5], yapılan bir çalışmaya göre 2013-2022 yılları arasında 94 VL olgusu bildirilmiştir[6].

Leishmania suşlarının laboratuvar ortamında canlı tutulması için genellikle besiyeri transferleri veya deney hayvanlarında pasajlama yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler maliyetli, zaman alıcı ve kontaminasyon riskine açık olmasının yanı sıra, parazitin genetik yapısında değişimlere yol açarak araştırma sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle, parazitlerin uzun süreli ve güvenli biçimde saklanması amacıyla kriyoprezervasyon uygulamaları önem kazanmıştır.

Kriyoprezervasyon, hücrelerin biyolojik aktiviteleri durdurularak çok düşük sıcaklıklarda (genellikle -80°C veya sıvı azotta -196°C) uzun süre fonksiyonlarını kaybetmeden saklanmasını sağlayan bir yöntemdir[7]. Bu süreçte, hücreleri dondurmanın zararlı etkilerinden korumak amacıyla kriyoprotektan adı verilen koruyucu bileşikler kullanılır. Kriyoprotektanlar, buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek veya kristal boyutunu azaltarak hücresel bütünlüğün korunmasına katkı sağlar[8-10]. Kriyoprotektanlar genel olarak iki gruba ayrılır. İnternal kriyoprotektanlar (örn. Dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol (EG), propilen glikol)), hücre zarını geçerek hücre içinde osmotik dengeyi düzenler. Eksternal kriyoprotektanlar (örn. glukoz, sükroz, raffinoz) ise hücre dışı ortamda etki göstererek hücre şişmesini önler[11-12].

Bu çalışmada, DMSO'ya ek olarak internal bir kriyoprotektan olan etilen glikol (EG) ve eksternal bir kriyoprotektan olan glukoz ayrı ayrı test edilmiş; ayrıca bu iki maddenin farklı oranlardaki kombinasyonları kullanılarak en uygun kriyoprotektan seçimi ve optimum kriyoprezervasyon koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu tarafından (05.06.2024 tarih ve 2473) onaylanmıştır.

NNN Besiyerinin Hazırlanması: NNN besiyerleri, Özbilgin ve ark.'na[13] göre kanlı agar, maya özütü ve fruktoz içeren katı faz, distile suda çözündükten sonra otoklavlanarak steril hale getirildi. Sterilizasyon sonrasında, antibiyotik solüsyonları (gentamisin ve penisilin/streptomisin) ile %10 oranında tavşan kanı eklenerek homojenize edildi. Besiyeri, steril cam tüplere 5 mL hacminde dağıtıldıktan sonra, 45° açıyla soğumaya bırakılarak eğik formda dondurulduve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı. Kullanım öncesinde, her tüpe %10 fetal bovine serum, %1 gentamisin ve %1 penisilin/streptomisin içeren 1 mL RPMI-1640 sıvı fazı ilave edilerek hazır hale getirildi.

İzolatların Canlandırılması: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesindeki Parazit Bankası'nda saklanan ve sıvı azot tankında muhafaza edilen MHOM/TR/2012/CBCL-LT kodlu kutanöz leishmaniasis hastasından elde edilmiş *Leishmania tropica* izolatı ile MHOM/TR/2012/CBCL-LI kodlu visseral leishmaniasis hastasından elde edilmiş *Leishmania infantum* izolatı çıkarılarak, 37°C'ye getirilmiş su banyosu içerisinde iki dakika bekletilerek çözdürüldü. Çözdürülen izolatlar, önceden hazırlanmış NNN besiyerlerine ekildi ve besiyerleri 26°C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri, her iki günde bir üreme açısından kontrol edildi. Üreme gözlenen besiyerlerinden, içerisinde 5 mL RPMI-1640 besiyeri bulunan 25 cm^2'lik steril hücre kültür flasklarına inokülasyon yapıldı ve flasklar 26 °C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Flasklar, her gün invert mikroskop kullanılarak parazitin üreme durumu açısından kontrol edildi.

İzolatların Kriyoprotektan ile Dondurulması: Farklı dondurma mekanizmalarına sahip DMSO, EG ve glukoz *L. tropica* ve *L. infantum* izolatlarının dondurulmasında kullanıldı. Her bir izolat, DMSO,

EG ve glukoz ile ayrı ayrı dondurulduu. Ayrıca, %25 EG + %75 glukoz (K1), %50 EG + %50 glukoz (K2) ve %75 EG + %25 glukoz (K3) karışımları ile dondurma işlemi gerçekleştirildi. Besiyerinde üretilen izolatların yoğunluğu Thoma lamında sayılarak hesaplandı ve seçilen kriyoprotektanlar ile dondurma işlemi yapıldı. İstenen yoğunluğa ulaşan parazitlerden internal kapaklı steril kriyo tüpüne 850 µL aktarıldı ve üzerine 150 µL kriyoprotektan çözeltisi eklendi. Tüplerin içeriği homojen olacak şekilde karıştırıldı. Bütün izolatlar ve kriyoprotektanlar için aynı işlem uygulandı. Karşılaştırma amacıyla, referans kriyoprotektan olarak DMSO kullanılarak aynı protokol uygulandı. Hazırlanan tüm kriyo tüpler cool cell kutularına yerleştirildi ve -86°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Bir gece burada bekletilen tüpler, daha sonra sıvı azot tankına nakledildi. Her bir kriyoprotektandan 10 adet olmak üzere toplamda 100 adet kriyo tüp sıvı azot tankına yerleştirildi.

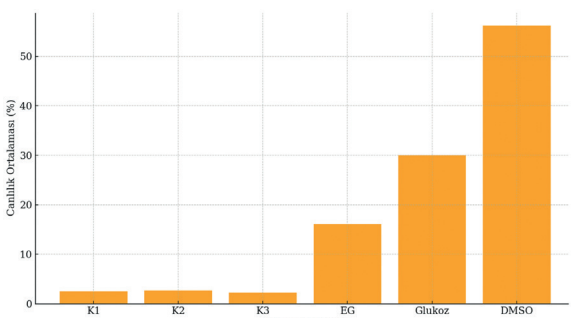
Dondurulmuş İzolatların Farklı Zaman Aralıklarında Canlandırılması ve Üreme Durumlarının Değerlendirilmesi: Sıvı azot tankına aktarılan kriyo tüpler, 3., 6. ve 9. aylarda sıvı azot tankından çıkarıldı ve 37°C'ye getirilmiş su banyosu içerisinde iki dakika bekletilerek çözdürüldü. Çözdürülen örnekler steril tüplere aktarıldı ve üzerlerine dört mL RPMI-1640 besiyeri eklendi ve karıştırıldı. Tüpler, daha sonra 3000 rpm'de iki dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst kısım uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi, üç kez tekrarlandı. Son santrifüj işleminden sonra üst kısım uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 1 mL RPMI-1640 besiyeri eklendi. Süspansiyon, pipet yardımıyla homojen hale getirildi. Canlılık oranı, tripan mavisi boyası ve Thoma lamı kullanılarak mikroskopta hesaplandı. Bu işlemler, 3., 6. ve 9. aylarda sıvı azot tankından çıkarılan kriyo tüpler için uygulandı.

İstatistiksel Analiz: Bu çalışmada, kullanılan kriyoprotektan türünden bağımsız olarak *L. tropica* ve *L. infantum* izolatlarının kriyoprezervasyon sonrası canlılık yüzdeleri ile zaman (3., 6. ve 9. aylar) arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Spearman korelasyon katsayısı hesaplandı. Ayrıca, zaman değişkeninden bağımsız olarak, farklı kriyoprotektan grupları arasında canlılık yüzdeleri bakımından anlamlı bir fark olup olmadığını incelemek amacıyla Kruskal-Wallis testi uygulandı. Tüm istatistiksel analizler, SPSS for Windows 11.5 (SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) paket programı kullanılarak gerçekleştirildi ve anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

İzolatların Canlandırılması: Çalışma kapsamında canlandırılan MHOM/TR/2012/CBCL-LT kodlu *L. tropica* izolatı ile MHOM/TR/2012/CBCL-LI kodlu *L. infantum* izolatı %10 fetal bovine serum, %1 gentamycin solüsyonu ve %1 penicillin/streptomycin solüsyonu içeren RPMI-1640 besiyerinde logaritmik faza gelinceye kadar üretilmiştir. Kriyoprezervasyon işlemi için Thoma lamı ile sayımları yapılan *L. tropica* süspansiyonu 49.10^6 promastigot/mL ve *L. infantum* süspansiyonu $13.5x10^6$ promastigot/mL olacak şekilde sayımları yapılmıştır.

Dondurulmuş İzolatların Farklı Zaman Aralıklarında Canlandırılması ve Üreme Durumlarının Değerlendirilmesi: Kriyoprezervasyon işlemi sonrası, farklı kriyoprotektanlar ile dondurulan *L. tropica* izolatlarının 3., 6. ve 9. aylardaki canlılık düzeyleri ve yüzdeleri değerlendirilmiştir (Tablo 1, Şekil 1). DMSO kullanılan grupta canlılık düzeyleri tüm zaman dilimlerinde en yüksek düzeyde olup sırasıyla %59.18, %55.10 ve %54.08 olarak hesaplanmıştır. Bunu sırasıyla glukoz (%30.61–29.18) ve EG (%16.73–15.51) grupları takip etmiştir. K1, K2 ve K3 kriyoprotektan karışımları ise %2.45'in altında kalan canlılık oranları ile en düşük değerlere sahip gruplar olmuştur. Zaman ilerledikçe tüm gruplarda canlılık oranlarında hafif azalma gözlenmiş, ancak bu düşüş DMSO ve glukoz gruplarında minimal düzeyde kalmıştır.



Şekil 1. *Leishmania tropica* canlılık ortalama grafiği
EG: Etilen glikol; DMSO: Dimetilsülfoksit.

Tablo 1. *Leishmania tropica* kriyoprezervasyon sonra canlılık durumları

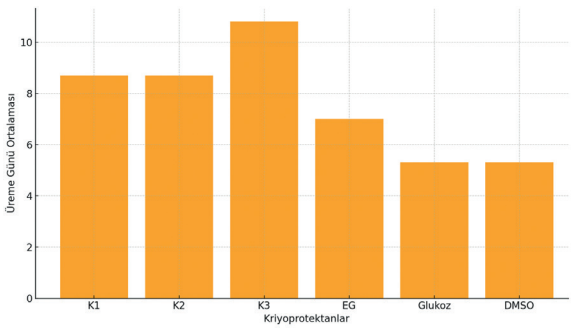
Leishmania tropica	3. Ay		6. Ay		9. Ay	
	10^6/mL	%	10^6/mL	%	10^6/mL	%
K1	1.10	2.24	1.00	2.04	0.96	1.96
K2	1.20	2.45	1.14	2.33	1.10	2.24
K3	0.90	1.84	0.85	1.73	0.84	1.71
EG	8.20	16.73	7.80	15.92	7.60	15.51
Glukoz	15.00	30.61	14.70	30.00	14.30	29.18
DMSO	29.00	59.18	27.00	55.10	26.50	54.08

EG: Etilen glikol; DMSO: Dimetilsülfoksit.

Tablo 2. *Leishmania tropica* NNN besiyerine ekim sonrası mikroskopik üreme gözlemleri

Leishmania tropica	3. Ay Üreme (Gün)	6. Ay Üreme (Gün)	9. Ay Üreme (Gün)
DMSO	4.	5.	5.
Glukoz	4.	5.	5.
EG	6.	7.	7.
K1	8.	9.	9.
K2	8.	9.	9.
K3	10.	11.	11.

EG: Etilen glikol; DMSO: Dimetilsülfoksit.

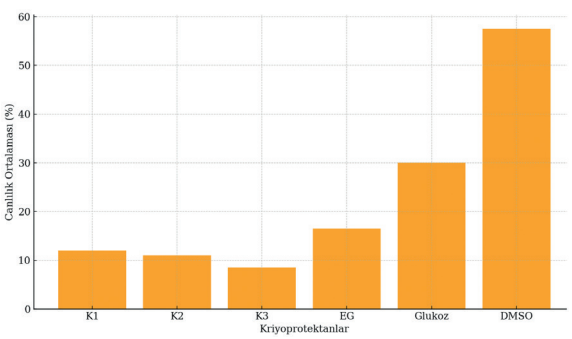


Şekil 2. *Leishmania tropica* üreme günleri ortalama grafiği
EG: Etilen glikol; DMSO: Dimetilsülfoksit.

Her kriyoprotektan grubundan alınan örneklerin NNN besiyerine ekimi sonrası mikroskobik olarak yapılan üreme gözlemlerinde, yüksek canlılıkla paralel şekilde erken üreme gözlenmiştir (Tablo 2, Şekil 2). DMSO ve glukoz gruplarında 3. ayda 4. günde üreme başlarken, bu süre K1 ve K2 için 8. gün, K3 için ise 10. gün olarak tespit edilmiştir. 6. ve 9. aylarda da benzer bir eğilim sürmüş; canlılığı yüksek olan gruplarda daha erken üreme gözlenmiştir.

Korelasyon analizinde, canlılık oranı ile üreme süresi arasında negatif yönlü bir ilişki belirlenmiş; canlılığı yüksek olan izolatların daha erken ürediği gösterilmiştir.

Kriyoprezervasyon işleminden sonra farklı kriyoprotektanlar ve bunların kombinasyonları kullanılarak dondurulan *L. infantum* izolatlarının 3., 6. ve 9. aylardaki canlılık düzeyleri ve yüzdeleri karşılaştırılmıştır (Tablo 3, Şekil 3). En yüksek canlılık oranları tüm zaman noktalarında DMSO grubunda gözlenmiş olup, sırasıyla %60.00, %56.30 ve %55.56 olarak hesaplanmıştır. DMSO'yu sırasıyla glukoz (%31.11–28.89) ve EG (%17.78–15.56) izlemiştir. K1, K2 ve K3 gibi kriyoprotektan karışımları ise %13'ün altında kalan canlılık oranları ile daha düşük başarı göstermiştir. Zamanla tüm gruplarda canlılık oranlarında kısmi azalma tespit edilmiştir; ancak DMSO ve glukoz gruplarında bu düşüş minimal düzeyde kalmıştır.



Şekil 3. *Leishmania infantum* canlılık ortalama grafiği
EG: Etilen glikol; DMSO: Dimetilsülfoksit.

Tablo 3. *Leishmania infantum* kriyoprezervasyon sonra canlılık durumları

Leishmania infantum	3. Ay		6. Ay		9. Ay	
	10^6/mL	%	10^6/mL	%	10^6/mL	%
K1	1.70	12.59	1.60	11.85	1.50	11.11
K2	1.50	11.11	1.40	10.37	1.40	10.37
K3	1.20	8.89	1.10	8.15	1.10	8.15
EG	2.40	17.78	2.20	16.30	2.10	15.56
Glukoz	4.20	31.11	4.00	29.63	3.90	28.89
DMSO	8.10	60.00	7.60	56.30	7.50	55.56

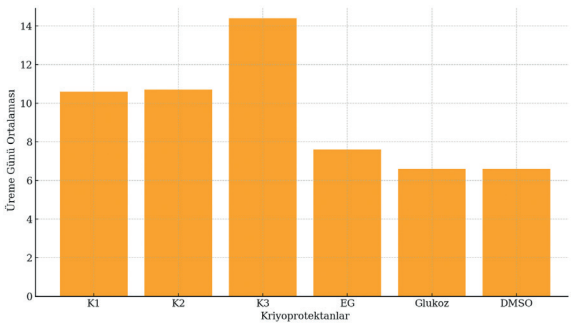
EG: Etilen glikol; DMSO: Dimetilsülfoksit.

Tablo 4. *Leishmania infantum* NNN besiyerine ekim sonrası mikroskopik üreme gözlemleri

Leishmania tropica	3. Ay Üreme (Gün)	6. Ay Üreme (Gün)	9. Ay Üreme (Gün)
DMSO	6.	7.	7.
Glukoz	6.	7.	7.
EG	7.	8.	8.
K1	10.	11.	11.
K2	10.	11.	11.
K3	13.	15.	15.

EG: Etilen glikol; DMSO: Dimetilsülfoksit.

Her tüpten yapılan NNN besiyeri ekimlerinin mikroskobik değerlendirmesiyle üreme günleri belirlenmiş ve canlılık düzeyleriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 4, Şekil 4). En erken üreme DMSO ve glukoz gruplarında 3. ayda 6. günde başlamış, bunu EG takip etmiştir. Kriyoprotektan karışımları ise daha geç üremeyle karakterize edilmiş; K3 grubunda üreme ancak 13. günde başlamıştır. Altıncı ve dokuzuncu aylarda da benzer bir sıra korunmuştur.



Şekil 4. *Leishmania infantum* canlılık ortalama grafiği
EG: Etilen glikol; DMSO: Dimetilsülfoksit.

Korelasyon analizinde, canlılık oranı arttıkça üremenin daha erken başladığı, yani bu iki parametre arasında belirgin negatif korelasyon olduğu gözlemlenmiştir.

Leishmania tropica izolatında, kriyoprotektan türü ayırt edilmeksizin yapılan analizde kriyoprezervasyon sonrası canlılık yüzdeleri ile zaman arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (*Spearman r*=-0.171, *p*=0.499). Zaman faktöründen bağımsız olarak farklı kriyoprotektan grupları arasında canlılık yüzdeleri bakımından anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir (*Kruskal-Wallis* testi, *p*=0.006). Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, K3 grubu ile DMSO ve Glukoz grupları arasında anlamlı fark gözlenmiştir. K3 grubunda canlılık yüzdesi, DMSO ve Glukoz gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Leishmania infantum izolatında da benzer şekilde, kriyoprotektan türü ayırt edilmeksizin yapılan analizde canlılık yüzdeleri ile zaman arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (*Spearman r*=-0.158, *p*=0.532). Zaman faktöründen bağımsız olarak kriyoprotektanlar arasında canlılık yüzdeleri bakımından anlamlı farklılık

saptanmıştır (*Kruskal-Wallis* testi, *p*=0.005). İkili karşılaştırma analizlerine göre, K3 grubu ile DMSO ve Glukoz grupları arasında anlamlı fark belirlenmiştir. *L. infantum* için de K3 grubunda canlılık yüzdesi, DMSO ve Glukoz gruplarına kıyasla belirgin şekilde daha düşüktür.

TARTIŞMA

Kriyoprotektanlar hücrelerin donmaya bağlı oluşabilecek hasarlardan koruyarak canlı kalma oranlarını yükseltmektedir. Kriyoprotektanların etkinliği ise uygulanan kriyoprezervasyon protokolüne, kriyoprezervasyon yöntemine ve kriyoprezervasyon uygulanacak parazit türüne göre değişiklik göstermektedir[8,14].

Dimetilsülfoksit, hücre zarını kolaylıkla geçebilen küçük moleküler yapısı sayesinde etkili bir internal kriyoprotektan olarak görev yapmaktadır. Hücre içine penetre olarak buz kristali oluşumunu engellemekte, aynı zamanda donma noktasını düşürerek soğuğa bağlı hücresel hasarın önüne geçmektedir[14]. Kriyoprezervasyon uygulamalarında DMSO genellikle %5–15 final konsantrasyon aralığında tercih edilmektedir[8]. Çavuş ve ark.[15] tarafından yürütülen çalışmada, DMSO ile kriyoprezerve edilen *Leishmania* promastigotlarının çözülmesini takiben yaklaşık %60–65 oranında canlılığın korunduğu ve NNN besiyerine yapılan ekim sonrası yedinci günde logaritmik büyüme fazına ulaşıldığı bildirilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada ise benzer şekilde DMSO kullanılarak *L. tropica* ve *L. infantum* izolatlarının kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiş ve örnekler 3., 6. ve 9. aylarda çözülerek canlılık oranları ile NNN besiyerine yapılan ekim sonuçları değerlendirilmiştir. *L. tropica* izolatında canlılık oranları sırasıyla %59.18, %55.10 ve %54.08; *L. infantum* izolatında ise %60.00, %56.30 ve %55.56 olarak saptanmıştır. Ayrıca, NNN besiyerine yapılan ekim sonrasında *L. tropica* izolatının dördüncü, beşinci ve beşinci günlerde; *L. infantum* izolatının ise altıncı, yedinci ve yedinci günlerde logaritmik büyüme fazına ulaştığı gözlemlenmiştir. Her iki çalışmanın bulguları genel olarak benzer canlılık oranları ve NNN besiyerindeki üreme performansları ortaya koymakla birlikte, çalışmamızda örneklerin farklı zaman noktalarında değerlendirilmiş olması, kriyoprezervasyonun uzun dönem etkilerine yönelik daha kapsamlı bir analiz sağlamaktadır. Ayrıca, logaritmik büyüme fazına ulaşma süresinin *L. tropica* izolatında daha kısa, *L. infantum* izolatında ise daha uzun olması, türler arası farklılıkların DMSO'nun etkinliği üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Dimetilsülfoksitin ardından, bu çalışmada test edilen bir diğer internal kriyoprotektan olan EG'nin etkinliği değerlendirilmiştir. EG, düşük molekül ağırlığına sahip, hücre içine nispeten hızlı şekilde penetre olabilen bir internal kriyoprotektandır. Küçük moleküler yapısı ve içerdiği iki hidroksil grubu sayesinde su ile kolayca karışmakta, buz kristallerinin oluşumunu engellemekte ve hem hücre içi hem de hücre dışı ortamın aşırı konsantre hale gelmesini önleyerek donmaya bağlı hücresel hasarı azaltmaktadır[14]. DMSO'dan farklı olarak sülfoksit grubu içermemekle birlikte, kriyoprotektif etkisini moleküler boyutu ve hidrojen bağları oluşturma kapasitesi aracılığıyla göstermektedir. EG, birçok mikroorganizma için etkili olduğu gösterilmiş olan DMSO ile birlikte en yaygın kullanılan internal kriyoprotektanlar arasında yer almaktadır. İnsan sperm hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, 1 M EG'nin, benzer konsantrasyondaki gliserolden yaklaşık dört kat daha yüksek membran geçirgenliğine sahip olduğu bildirilmiş; bu da daha düşük hacimsel stres ve sonuç olarak dondurma sonrası daha yüksek canlılık oranları ile ilişkilendirilmiştir[16]. Benzer şekilde, *Theileria parva* sporozoitlerinin kriyoprezervasyonuna yönelik yapılan bir başka çalışmada, test edilen tüm kriyoprotektanlar arasında DMSO ve EG'nin en yüksek canlılık sonuçlarını verdiği; gliserol için ise optimal konsantrasyonun %7.5 olduğu rapor edilmiştir[17]. Bizim çalışmamızda ise EG ile kriyoprezerve edilen *L. tropica* izolatında canlılık oranları sırasıyla %16.73, %15.92 ve %15.51; *L. infantum* izolatında ise %17.78, %16.30 ve %15.56 olarak saptanmıştır. Ayrıca, NNN besiyerine yapılan ekim sonrasında *L. tropica* izolatının üçüncü ayda altıncı günde, altıncı ve dokuzuncu aylarda ise yedinci günde; *L. infantum* izolatının ise üçüncü ayda yedinci günde, altıncı ve dokuzuncu aylarda sekizinci günde logaritmik büyüme fazına ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, EG'nin her iki *Leishmania* türü üzerinde canlılık koruyucu etkisinin sınırlı olmakla birlikte, kültürde yeniden üremenin

mümkün olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, elde edilen canlılık oranlarının DMSO ile elde edilen değerlere göre daha düşük olması, EG'nin bu türlerde kriyoprotektan olarak sınırlı etkinliğe sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Dimetilsülfoksit ve EG'nin ardından, bu çalışmada eksternal bir kriyoprotektan olarak değerlendirilen glukozun etkileri incelenmiştir. Glukoz, hücre zarından geçemeyen yapısı nedeniyle eksternal kriyoprotektan olarak sınıflandırılmaktadır. Hücre dışı ortamda etki göstererek, donmaya bağlı hücresel hasarı azaltmaya katkı sağlar. Glukozun kriyoprotektif etkisi büyük ölçüde ozmoprotektan özelliğinden kaynaklanmaktadır[14]. Kriyoprezervasyon öncesinde hücre dışı ortama eklendiğinde, hücreden su çıkışını teşvik ederek hücre içi sıvısının kontrollü şekilde azalmasını sağlar. Bu kontrollü dehidrasyon, donma sırasında hücre içinde buz kristali oluşumunu azaltmakta ve hücre zarının yırtılmasını önlemektedir. Ayrıca glukoz, donma sürecinde çözünmüş tuzların aşırı yoğunlaşmasını engelleyerek tuz kaynaklı zararlı etkilerin önüne geçebildiği bildirilmiştir[14]. Önceki çalışmalarda, Alsever solüsyonu gibi hafif hipertonik tampon sistemleri ve %5–10 glukoz içeren karışımların, *Trypanosoma brucei* promastigotlarının -196°C'de başarılı şekilde saklanmasında etkili olduğu bildirilmiştir[14]. Wen ve ark.[18] ise, *T. brucei*'nin kan formunu %5 gliserol ile birlikte 0.4 M trehaloz içeren kriyoprotektan çözeltisi ile dondurarak, tek ajanlı koşullara kıyasla belirgin şekilde daha yüksek canlılık ve enfektivite oranları elde etmişlerdir. Çalışmamızda ise yalnızca glukoz kullanılarak kriyoprezervasyonu yapılan *L. tropica* izolatının canlılık oranları sırasıyla %30.61, %30.00 ve %29.18; *L. infantum* izolatının ise %31.11, %29.63 ve %28.89 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, NNN besiyerine yapılan ekim sonrasında *L. tropica* izolatının üçüncü ayda dördüncü günde, altıncı ve dokuzuncu aylarda ise beşinci günde; *L. infantum* izolatının ise üçüncü ayda altıncı günde, altıncı ve dokuzuncu aylarda yedinci günde logaritmik büyüme fazına ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, glukozun dış ortamda etkili olarak hücre bütünlüğünü koruyabildiğini ve her iki *Leishmania* türü için kültürde üremesini sürdürebilecek düzeyde canlılık sağladığını ortaya koymaktadır.

Kriyoprezervasyon çalışmamızda, yalnızca tek başına kullanılan kriyoprotektanlara ek olarak, hem internal (EG) hem de eksternal (glukoz) kriyoprotektanları birlikte içeren karışımların potansiyel sinerjik etkileri değerlendirilmiştir. Bu kombinasyonların, farklı mekanizmalarla etkili olan kriyoprotektanların bir araya getirilmesiyle donma kaynaklı hasarı daha etkin şekilde azaltabileceği hipoteziyle hazırlanmıştır. Ancak elde edilen bulgular, bu karışımların canlılık oranları açısından tek ajanlı uygulamalara kıyasla belirgin bir avantaj sağlamadığını göstermektedir. *L. tropica* izolatında K1, K2 ve K3 karışımlarıyla yapılan kriyoprezervasyon işlemleri sonucunda canlılık oranları sırasıyla %2.24, %2.04, %1.96 (K1); %2.45, %2.33, %2.24 (K2); ve %1.84, %1.73, %1.71 (K3) olarak tespit edilmiştir. NNN besiyerindeki üreme durumları ise K1 ve K2 için sekizinci–dokuzuncu günlerde, K3 için ise 10.–11. günlerde logaritmik faza ulaşıldığını göstermiştir. *L. infantum* izolatında ise canlılık oranları K1'de %12.59, %11.85, %11.11; K2'de %11.11, %10.37, %10.37; ve K3'te %8.89, %8.15, %8.15 olarak belirlenmiş; NNN besiyerindeki üreme durumu ise K1 ve K2'de 10.–11. günlerde, K3'te ise daha geç, 13.–15. günlerde gerçekleşmiştir. Bu bulgular, karışım grubundaki internal ve eksternal kriyoprotektanların birlikte kullanımının bazı türlerde sınırlı bir koruyuculuk sağladığını; ancak genel olarak canlılık oranlarının düşük kaldığını ortaya koymuştur. Özellikle *L. infantum*'da K1 ve K2 karışımlarıyla nispeten daha yüksek canlılık ve daha erken üreme gözlemlenirken, *L. tropica*'da bu kombinasyonların etkisi sınırlı kalmıştır. Bu durum, türler arası kriyoprotektan yanıt farklarını ve karışımların sinerjik etki yaratma potansiyelinin her parazit türü için geçerli olmayabileceğini göstermektedir. Ayrıca, düşük canlılık oranları, kullanılan karışımlardaki bileşenlerin bazı antagonistik etkilerin ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.

İstatistiksel analizler sonucunda, saklama süresine bağlı olarak canlılık oranlarında anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0.05$). Buna karşın, kullanılan kriyoprotektan tipinin canlılık üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu saptanmıştır (*L. tropica* için $p=0.006$; *L. infantum* için $p=0.005$). Özellikle DMSO ile K3 grubu arasındaki farkın anlamlı olması, DMSO'nun üstün etkinliğini desteklemektedir. Ayrıca,

canlılık oranı ile üreme süresi arasında anlamlı negatif korelasyon olduğu belirlendi. Bu ilişki, yüksek canlılık oranlarının daha erken kültür pozitifliği ile bağlantılı olduğunu ortaya koydu.

Dimetilsülfoksitin *Leishmania* izolatlarının kriyoprezervasyonunda en etkili kriyoprotektan olduğu gösterildi. EG, glukoz ve bu bileşiklerin karışımları, canlılık ve kültüre alınabilirlik açısından daha düşük etkinlik gösterdi.

Leishmania türlerinin kriyoprezervasyonunda DMSO, standart kriyoprotektan olarak tercih edilmelidir. EG ve glukoz gibi alternatif kriyoprotektanların karışım oranları ve konsantrasyonlarının optimize edilmesi gereklidir. Kriyoprezervasyon sonrası canlılık ve üreme sürelerinin iyileştirilmesi için hücre geçirgenliğini artıracak yeni kriyoprotektan bileşenleri araştırılmalıdır. Bu çalışma, *Leishmania* türlerinin uzun süreli ve güvenli biçimde saklanabilmesi için kullanılabilecek protokollerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı ayrıca, referans parazit bankalarının oluşturulması ve bu izolatların moleküler ya da epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere saklanması açısından değerli bir temel oluşturduğu düşünülmüştür.

Çalışmanın sınırlılıkları arasında yalnızca iki Leishmania türü ile sınırlı kalınması, kullanılan kriyoprotektan oranlarının sabit olup doz optimizasyonunun yapılmamış olması ve deney sayısının artırılamaması sayılabilir. Bu sınırlamalar, sonuçların genellenebilirliğini kısıtlamaktadır.

Bu çalışmada, *L. tropica* ve *L. infantum* izolatlarının farklı kriyoprotektanlar kullanılarak sıvı azot koşullarında kriyoprezervasyonu sonrasında canlılık oranları ve kültür ortamındaki logaritmik üreme süreleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bulgular, en yüksek canlılık oranlarının ve en erken üreme sürelerinin DMSO ile elde edildiğini göstermiştir. Buna karşılık glukoz, EG ve bu bileşiklerin kombinasyonları, daha düşük canlılık düzeyleri ve geç üreme başlangıcı ile daha sınırlı etkinlik sergilemiştir. Elde edilen veriler, DMSO'nun *Leishmania* izolatlarının uzun süreli ve güvenli biçimde korunmasında halen en etkili kriyoprotektan olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, kriyoprotektan etkinliğinin türler arasında farklılık gösterebildiği ve bu farklılıkların kriyobiyolojik yanıtlar üzerinde belirleyici olabileceği gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda, *Leishmania* izolatlarının parazit bankalarında uzun dönemli saklanması amacıyla DMSO'nun öncelikli olarak tercih edilmesi önerilmektedir.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu tarafından (05.06.2024 tarih ve 2473) onaylanmıştır.
Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.
Finansman: Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 2024-087).

Ethics Committee Aproval: This research was conducted with the approval of Manisa Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Health Sciences Ethics Committee (06.05.2024; 2473).
Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.
Funding: This study was supported by the Manisa Celal Bayar University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project Number: 2024-087).

KAYNAKLAR

1. Kima PE. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. Int J Parasitol. 2007;37(10):1087-96. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003
2. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. Open Biol. 2017;7(9):170165. https://doi.org/10.1098/rsob.170165
3. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis – Fact sheet. Geneva: WHO; 2025. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis] (Accessed on: 09.July.2025).
4. Harman M. Kutanöz Leishmaniasis. Turkderm Turk J Dermatol. 2015;9:168-76. https://doi.org/10.4274/tdd.2880

5. T.C. Sağlık Bakanlığı. Leishmaniasis sürveyans ve epidemiyoloji kongresi raporu. 14 Nisan 2014. [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/bulasici-hastaliklar-ve-erken-uyari-db/Birimler/Saha_Epidemiyolojisi_ve_Erken_Uyari/16-leish_surv_epi_kongresi__14.04.2014.pdf] (Erişim tarihi: 09.Temmuz.2025).
6. Şakru N, Özbel Y, Töz S. Refugees/immigrants and leishmaniasis in the world's largest hosting country, Türkiye: A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2025;19(4):e0012947. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012947
7. Wetzels AMM, Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Zeilmaker GH. Laboratory aspects of in vitro fertilization. Cryopreservation/Theory. 1996:229-44.
8. Miyake Y, Karanis P, Uga S. Cryopreservation of protozoan parasites. Cryobiology. 2004;48(1):1-7. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.004
9. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN, editors. Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2nd ed. Totowa: Humana Press; 2007:39-59.
10. Sanger WG, Olson JH, Sherman JK. Semen cryobanking for men with cancer-Criteria change. Fertil Steril. 1992;58(5):1024-7. https://doi.org/ 10.1016/s0015-0282(16)55454-5
11. Delilbaşı L. Tüp bebek yardımcı üreme tekniklerinde laboratuvar yöntemleri. İstanbul: Baysed Yayıncılık; 1997:229-52.
12. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. Cryobiology. 1993;30(1):32-44. https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1005
13. Özbilgin A, Tünger Ö, Inanır I, Çavuş İ, Perk NE, Özel Y. Layşmanyaz tanısı için karaciğer ekstreli besiyerinin Novy-MacNeal-Nicolle besiyeri ve moleküler yöntemle karşılaştırılması. Klimik Derg. 2020;33(2):137-41. https://doi.org/10.5152/kd.2020.29
14. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003;46(3):205-29. https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4
15. Çavuş İ, Ocak F, Kaya T, Özbilgin A. Cryopreservation of *Leishmania* species in Manisa province. Türkiye Parazitol Derg. 2017;41(3):152-5. https://doi.org/10.5152/tpd.2017.5267
16. Best BP. Cryoprotectant toxicity: Facts, issues, and questions. Rejuvenation Res. 2015;18(5):422-36. https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656
17. Kimbita EN, Silayo RS, Dolan TT. Comparison of cryoprotectants in the preservation of *Theileria parva* sporozoites using an in vitro infectivity assay. Trop Anim Health Prod. 2001;33(1):29-41. https://doi.org/10.1023/a:1010329409637
18. Wen YZ, Su BX, Lyu SS, Hide G, Lun ZR, Lai DH. Trehalose, an easy, safe and efficient cryoprotectant for the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. Acta Trop. 2016;164:297-302. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.024