



Research Article

## Farelerde Deneysel *Toxoplasma gondii* Enfeksiyonunun Patogenezisinde Hücresel Prion Protein ve Doppel Protein'in Rollerinin Araştırılması

M.Yavuz Gülbahar<sup>1</sup>, Tolga Güvenç<sup>1</sup>, Murat Hökelek<sup>2</sup>, Murat Yarım<sup>1</sup>, Akçahan Gepdiremen<sup>3</sup>, Gülay Çiftçi<sup>4</sup>, Yonca B. Kabak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı Samsun, Türkiye. <sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. <sup>3</sup>Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bolu, Türkiye. <sup>4</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

### ÖZET

Bu çalışmada farelerde deneysel olarak oluşturulan *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunda hücresel prion protein (PrP<sup>c</sup>) ve doppel proteinin (Dpl) rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 56 adet deneme ve 40 adet kontrol olmak üzere toplam 96 adet Balb/c fare kullanıldı. Çalışmada, her grupta 7 farenin bulunduğu 8 deneme grubu ile her deneme grubu için 5 farenin bulunduğu 8 kontrol grubu oluşturuldu. Deneme grubundaki hayvanlara *T. gondii* RH suşu takizoitleri 500 takizoit/0.1ml dozda, intraperitoneal yolla verildi. Farelerde enfeksiyondan sonraki 6. ve 12. saatlerde; daha sonra 1., 2., 3., 4., 5., 6. günlerde oluşan klinik bulgular kaydedilerek, sistematik nekropsileri yapıldı. Klinik olarak, ilk 3 günde her hangi bir bulgu gözlenmezken, 6. günde üç fare ölü bulundu. Makroskopik olarak, 4. günden itibaren karaciğer ve böbrek üzerinde boz beyaz renkte odaklar ile periton boşluğunda hafif bulanık bir eksudatın varlığı dikkati çekti. Mikroskopik olarak, böbrek, karaciğer, akciğer ve beyinde mononükleer hücre infiltrasyonu ile birlikte, ölenler başta olmak üzere, özellikle 5. ve 6. günlerde beyin ve karaciğerde fokal nekrotik değişiklikler ve mononükleer hücre infiltrasyonları saptandı. İmmunohistokimyasal olarak, *T. gondii* antijeni beyin dışında böbrek, karaciğer, akciğer ve dalakta saptandı. Enfeksiyon dönemlerinde immunohistokimyasal incelemelerde PrP<sup>c</sup>, kontrollere göre merkezi sinir sistemi, dalak ve karaciğerde artan oranlarda saptanırken, Dpl artışı özellikle dalak, böbrek, karaciğerde daha belirgindi. Sonuç olarak, farelerde *T. gondii* enfeksiyonunda PrP<sup>c</sup> ve Dpl'nin dokularda ekspresyonlarının arttığı gözlemlendi ve böylece farelerde deneysel *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun patogenezisinde her iki proteinin de önemli olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Doppel protein, fare, hücresel prion protein, immunohistokimya, *Toxoplasma gondii*, Western blot.

## Investigation of Roles of Cellular Prion Protein and Doppel Protein in Pathogenesis of Experimental *Toxoplasma gondii* Infection in Mice

### ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the roles of cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) and doppel (Dpl) protein in experimental infection caused by *Toxoplasma gondii* in mice. A total of 96 mice (Balb/c), 40 of which were control and 56 was treatment group, were used for this purpose in the study. The mice in experiment group were divided into 8 groups, including 7 mice each, according to post inoculation time 6 and 12 hours, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 days. These animals were injected with 1 ml inoculum of *T. gondii* RH strain including 500 tachyzoits/0.1 ml by intraperitoneal route. At the end those times, the mice were euthanased under deep anesthesia and systematically were necropsied. Macroscopically, first lesions were detected after 4 days post inoculation. Especially, multiple gray-whitish foci were detected on the liver and kidneys. In the lung section, the frothy fluid was leaked. At the 6th days post inoculation, three mice were found died; in this group other mice had a lightly cloudy exudate in peritoneal cavity as well as the lesions in the organs mentioned. Microscopically, many organs such as liver, kidneys, lungs and brains included mononuclear cells infiltrations with necrosis. The some brains revealed necrosis and focal gliosis. Immunohistochemical studies showed the presence of *T. gondii* antigen in many organs excepting with brain tissues. In the experiment groups, PrP<sup>c</sup> and Dpl expressions increased with postinoculation days, especially in spleen, kidneys, and lungs by immunohistochemistry. In conclusion, PrP<sup>c</sup> and Dpl showed an increase in the tissues in experimental *T. gondii* infection in mice, and this study indicated that both proteins would be important in such disease.

Keywords: Cellular prion protein, Doppel protein, immunohistokimya, mice, *Toxoplasma gondii*, Western blot.

Correspondence to: M. Yavuz Gülbahar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye. mygulbahar@hotmail.com

Received: December 12, 2012 / Accepted: May 20, 2013

## Giriş

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), bütün dünyada yaygın olan obligat intrasellüler protozoal bir parazittir. Felidae familyasındaki türler son konak, insan dahil pek çok evcil ve vahşi memeli ise ara konak olup fertil oosistlerinin ağız yoluyla alınması sonucu hastalık oluşur. Etken, organizmada çoğu dokuya yayılır ancak semptom oluşturamayabilir (Dubey ve Beattie, 1988; Zachary ve McGavin, 2012).

Hüresel prion protein (PrP<sup>c</sup>) bir membran glikoproteini olup tüm memelilerde beyin başta olmak üzere pek çok dokuda bulunur. Prion hastalıkları nadir olarak görülen nörodejeneratif bozukluklardır ve hastalık PrP<sup>c</sup>'in patojen izoformu olan scrapilişikli prion protein (PrP<sup>sc</sup>)'e dönüşümüyle oluşur. PrP<sup>sc</sup>, PrP<sup>c</sup>'nin proteaz dirençli izoformudur. PrP<sup>c</sup>'nin PrP<sup>sc</sup>'ye nasıl dnşğ hakkında yayınlar yok denecek kadar azdır (Harris 2003; Resiner, 2003; Liang ve Kong, 2012). Fonksiyonu halen tam olarak bilinmemekle birlikte, PrP<sup>c</sup>'nin antioksidant, antiapoptotik ve kproenzim olarak görev aldığı bildirilmektedir (Klamt ve ark., 2001; Chiarini ve ark., 2002; Brown, 2004; Deignan ve ark., 2004). Sinir sisteminde yapılan alışmalar PrP<sup>c</sup>'in, oksidative strese uğrayan sinir hücrelerini mitokondriumdaki kaspaz ilişikli yolla oluşan apoptozisi önlediği bildirilir (Kuwahara ve ark., 1999; Kim ve ark., 2004). Bunların yanında PrP<sup>c</sup> fagosit yanıtında, dolayısıyla makrofaj fonksiyonunda da görev yapmaktadır. PrP<sup>c</sup> knockout farelerdeki fagositlerin, normallere göre daha iyi fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Almedia ver ark., 2004).

Doppel protein (downstream prion protein-like protein=Dpl), PrP<sup>c</sup>'nin homologudur ve Dpl ile PrP<sup>c</sup> antagonist olarak işlev gördükleri bildirilmektedir (Behrens ve Aguzzi, 2002). Dpl'nin aşırı ekspresyonu PrP<sup>c</sup>'nin sağladığı antiapoptotik etkiyi ortadan kaldırmaktadır (Westaway ve Carlson, 2002). Dpl özellikle testiste ve ektopik olarak beyin dokusunda da bulunmaktadır. Çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda, immunohistokimyasal ve in situ hibridizasyon yöntemlerle PrP<sup>c</sup> ve Dpl'nin merkezi sinir sistemi yanında birçok periferel organda varlığı ve doku dağılımları gösterilmiştir (Kubosaki ve ark., 2000; Liu ve ark., 2001; Ford ve ark., 2002; Kubosaki ve ark., 2003; Paltrinieri ve ark., 2004; Pimenta ve ark., 2012). Ayrıca, Dpl'nin in vitro olarak neuronal hücrelere toksik olduğu belirtilmektedir (Cui ve ark., 2003). Değişik hayvan türlerinde immün sistem hücrelerinde PrP<sup>c</sup> ve Dpl 'nin varlığı ortaya konmuş ve Dpl ile PrP<sup>c</sup>'nin doku dağılımlarında oldukça benzerlikler bulunmuştur (Paltrinieri ve ark., 2004). Yapılan alışmalarda PrP<sup>c</sup>'nin fagositoz ve yangısal infiltrasyonu ayarlama fonksiyon görmesi (Almeida ve ark., 2004) nedeniyle, her iki proteinin çeşitli hastalık durumlarındaki ekspresyonlarının belirlenmesi de önem kazanmaktadır.

Intrasellüler mikroorganizmaların konakçı ile ilişkisinin ortaya konması hastalığın patogenezinin anlaşılmasında önemlidir. Intrasellüler obligat bir bakteri olan *Brucella* gibi bazı bakterilerin kolesterol zengin ve lipid raftlar denen alanlar aracılığı ile makrofajlara tutundukları ve enfekte ettikleri bildirilmektedir. PrP<sup>c</sup>'de kolesterolden zengin hücre membran komponentidir ve etkenleri makrofajlara almada görev aldığı ifade edilmektedir. Zaten PrP<sup>c</sup> yoksun makrofajlarda etkenlerin hücreye girmeleri mümkün görünmemektedir (Watarai ve ark., 2002; Aguzzi ve Hardt, 2003). *T. gondii*, obligat intrasellüler parazittir ve enfeksiyon kist bulunan et veya et ürünlerinin veya sprozooit/oosist ile kontamine sıvıların ağız yolu ile alınmasıyla oluşur. Etken sindirim sistemi epitelinin enfekte ettikten sonra başta kas ve merkezi sinir sistemi olmak üzere diğer dokulara yayılır. *T. gondii* ile konakçı arasındaki ilişkide halen bilinmeyen yönler bulunmaktadır. *T. gondii* takizoitlerin alınmasıyla konakçıda ölümlle sonuçlanan şiddetli yangısal reaksiyona

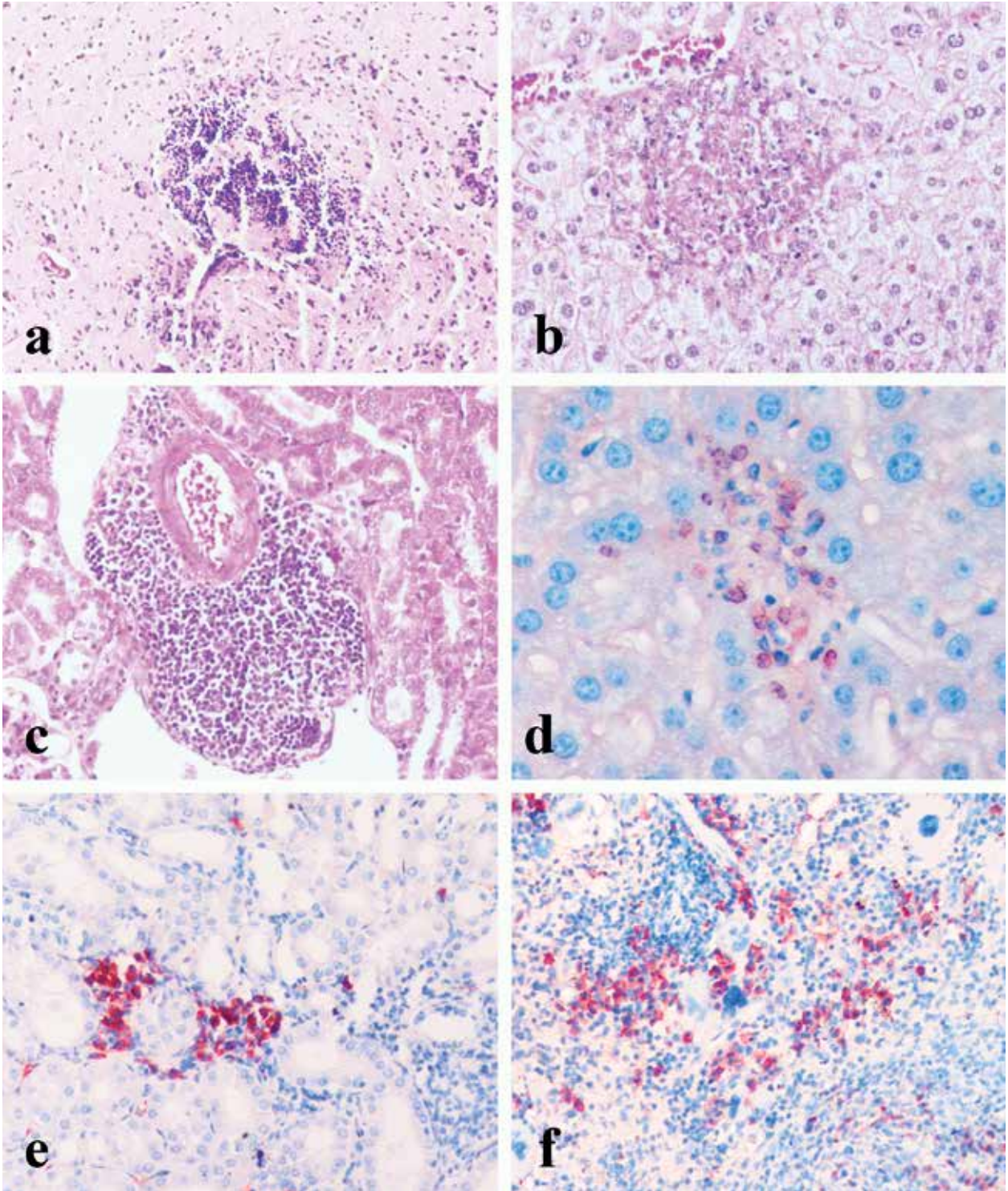
yol açmakla beraber, bazen latent olarak uzun yıllar boyunca kalabilmektedir (Bogdan ve Rllinghoff, 1999; Denkers, 1999; Lee ve ark., 1999; Heussler ve ark., 2001; Kasper ve ark., 2004; Sinai ve ark., 2004). *T. gondii* 'nin konakçıda varlığını uzun süre nasıl koruduğu henüz açıklığa kavuşmamıştır. *T. gondii* ayrıca apoptozis mekanizmalarını da çeşitli yollardan inhibe etmektedir (Kasper ve ark., 2004; Sinai ve ark., 2004). PrP<sup>c</sup>'nin de özellikle sinir sisteminde antiapoptotik özelliklerinin bulunması *T. gondii* enfeksiyonu ile prion arasındaki ilişkiyi daha da ilginç kılmaktadır. Bu amaçla yapılmış, özellikle immün sistemde saptanan PrP<sup>c</sup> ve Dpl arasındaki ilişkinin ortaya konuğu herhangi bir çalışmaya veya kayda rastlanılmamıştır.. Sunulan bu çalışmada, *T. gondii* ile enfekte çeşitli fare dokularında PrP<sup>c</sup> ve Dpl'nin ekspresyonu belirlemek suretiyle, her iki proteinin parazit ve enfeksiyon süreci ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmada 56 adedi deneme ve 40 adedi kontrol olmak üzere 96 adet erkek, erişkin BALB/C ırkı (ortalama ağırlıkları 35±3 g) fare kullanıldı. Her grupta 7 farenin bulunduğu 8 deneme grubu ile her deneme grubu için ayrı ayrı 5 farenin bulunduğu 8 kontrol grubu oluşturuldu. Deneme grubundaki farelere intraperitoneal yolla (iP) 6., 12. saatlerde; sonraki gruplara da birer günlük aralıklarla (1., 2., 3., 4., 5. ve 6. günlerde) *Toxoplasma gondii* RH suşu takizoitleri (500 takizoit/0.1 ml) verildi. Hayvanlar anestezi altında servikal dislokasyon ile tenazi edildi ve sistematik nekropsileri yapıldı. Doku örneklere (beyin, beyincik, karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, iskelet kası, kalp kası, mide ve barsaklar) %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 24 saat tespit edildikten sonra, alkol ve ksilol serilerinden geçirildi ve parafinde bloklandı. Mikrotom ile 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Rutin histopatolojik inceleme hematoksilen-eozin (HE) ile boyanan kesitlerde yapıldı. Dokulardaki *T. gondii* antijeni, PrP<sup>c</sup> ve Dpl'nin ekspresyonunun gösterilmesi için kesitler immunohistokimyasal yöntem ile boyandı. Dokuların bir kısmı, tespit edilmeksizin Western blot analiz için -20 °C de saklandı. Çalışmada kullanılan fareler için Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (28.02.2005 tarih ve DHEK/24 sayılı yazı).

Immunohistokimyasal boyamalar streptavidin-biotin kompleks peroksidaz (SABC) tekniğine uygun olarak ticari kit (Zymed Laboratories, Inc., ABD) ile yapıldı. Deparafinize kesitler testin her aşaması sonrası 2 kez, 5 dakika tris-buffer (pH 7.4) ile yıkandı. Kesitler, öncelikle formaldehitin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için sitrat tamponlu antijen retrieval solüsyonda 15 dakika kaynatıldı ve bir yıkama aşamasından sonra metanolde hazırlanmış %0.3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 10 dakika inkübe edilerek dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi giderildi. Spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için %5'lik keçi serumunda 10 dakika tutulduktan sonra, kesitler primer antikrlar; anti fare prion proteinini (PrP<sup>c</sup>) (Chemicon International, MAB5424, USA) (1:100 dilüsyon), anti tavşan doppel protein (Dpl) (Abcam, ab23701, UK) (1:500 dilüsyon) ve tavşan anti-*Toxoplasma gondii* antikru (Prof.Dr.Rıfki Hazıroğlu, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'inden sağlanmıştır, 1:1000 dilüsyon) ile + 4 °C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra kesitler biotinle konjuge edilmiş polivalan sekonder antiserum ile 30 dakika ve yine streptavidin peroxidase enzimi ile 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak kesitler kullanıma hazır diaminobenzidine (DAB) (Zymed DAB plus substrat, ABD) veya 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD) kromojen ile mikroskop altında kontrollü olarak 5-15 dakika tutulup Mayers hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldı. DAB ile boyanan kesitler entellan ile AEC ile boyanan kesitler ise su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı. Değerlendirme on ayrı bölgede sitoplazması kahverengi veya kırmızı boyanan

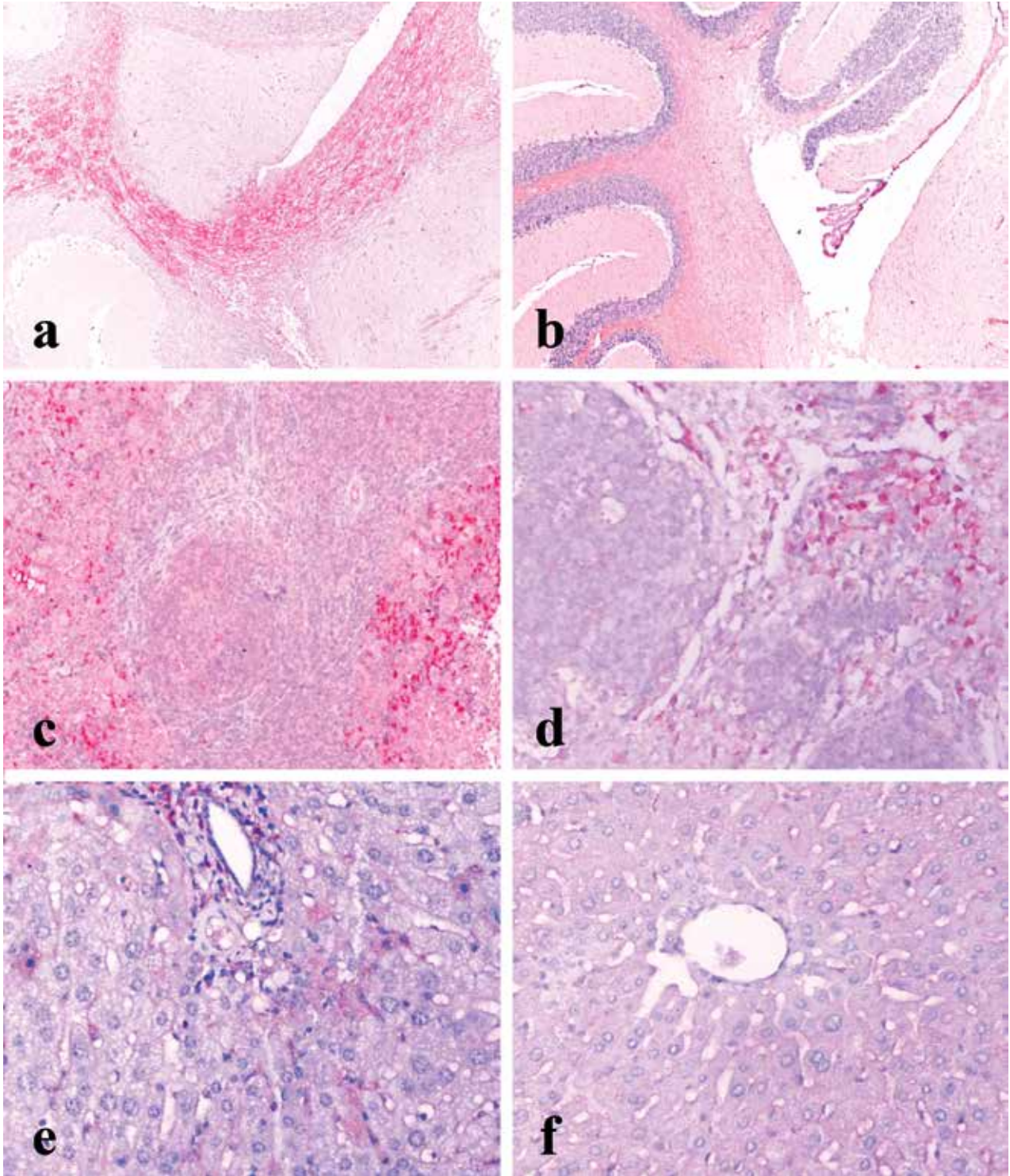




**Şekil 1a.** 3. günde beyin dokusunda nekrozla beraber fokal gliozis. HE, X80. **Şekil 1b.** 6. günde karaciğerde dejeneratif değişikliklerle beraber, fokal nekroz ve az sayıda yangısal hücreler. HE, X200. **Şekil 1c.** 2. günde böbrekte kortikomedullar bölgede perivasküler ve interstiyel mononükleer hücre infiltrasyonları. HE, X200. **Şekil 1d.** 6. saatte karaciğerde *T. gondii* antijen, SABC metot, AEC kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X320. **Şekil 1e.** 6. saatte böbrek interstiyumunda immunopozitif *T. gondii* antijeni. SABC metot, AEC kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X200. **Şekil 1f.** 24. saatte dalakta peritrabeküler ve sinuslarda *T. gondii* pozitif makrofajlar. SABC metot, AEC kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80.

**Figure 1a.** Necrosis with focal gliosis in brain at day 3 post infection. HE, X80. **Figure 1b.** Degenerative changes with focal necrosis and few inflammatory cells in liver at day 6 post-infection. HE, X200. **Figure 1c.** Perivascularly and interstitially mononuclear cells infiltrations in corticomedullary region of kidney at day 2 post-infection. HE, X200. **Figure 1d.** *T. gondii* antigens in liver at post-infection 6th day. SABC method, AEC chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X320. **Figure 1e.** *T. gondii* antigens in kidney interstitium at day 6 post-infection. SABC method, AEC chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X200. **Figure 1f.** *T. gondii*-positive macrophages in peritubercular areas and sinuses of spleen at hour 24 post-infection. SABC method, AEC chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80.





**Şekil 2a.** 6. gnde serebellum ve beyin steminde subst. ablada PrP<sup>c</sup> için belirgin immunopozitif sinir traktusları. SABC metot, DAB kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80. **Şekil 2b.** Kontrol grubunda beyincikte subst. alba'da ve 4. ventrikulusta koroid pleksusta hafif PrP<sup>c</sup> için immunopozitif boyanma. SABC metot, DAB kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80. **Şekil 2c.** 6. günde dalak dokusunda perifoliküler ve kırmızı pulpada dağılmış PrP<sup>c</sup> immunopozitif hücreler. SABC metot, AEC kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80. **Şekil 2d.** Kontrol grubundaki dalak dokusunda lenfoid folliküllerin periferinde az sayıda hücrede PrP<sup>c</sup> immunopozitif hücreler. SABC metot, AEC kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80. **Şekil 2e.** 6. günde karaciğerde az sayıda portal ve perisinuzoidal yerleşimli PrP<sup>c</sup> immunopozitif hücreler. SABC metot, AEC kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X200. **Şekil 2f.** Kontrol grubundaki karaciğer dokusunda hafif perisinuzoidal PrP<sup>c</sup> immunopozitiflik. SABC metot, DAB kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X200.

**Figure 2a.** Prominent immunopositivity for PrP<sup>c</sup> in nerve fibers of cerebellum and brain stem at day 6 post-infection. SABC method, DAB chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80. **Figure 2b.** Slight positive immunostaining for PrP<sup>c</sup> in substantia alba of cerebellum and choroid plexus of 4th ventricle in control group. SABC method, DAB chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80. **Figure 2c.** PrP<sup>c</sup>-immunopositive cells scattered to perifollicular areas and red pulp of spleen at day 6 post-infection. SABC method, AEC chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80. **Figure 2d.** PrP<sup>c</sup> immunopositivity in few cells at periphery of lymphoid follicles in spleen tissue of control group. SABC method, AEC chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80. **Figure 2e.** A few PrP<sup>c</sup> immunopositive cells with portal and perisinusoidal location in liver. SABC method, AEC chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X200. **Figure 2f.** Slight perisinusoidal immunostaining for PrP<sup>c</sup> in liver of control group. SABC method, DAB chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X200.

hücrelerin sayısı ile hücrelerin boyanma yoğunluğu dikkate alınarak (0= Boyanma yok, 1= Hafif, 2= Orta, 3= Şiddetli) semikantitatif olarak yapıldı.

İmmunoblotting analiz (Western blotting) için gerekli primer antikor olarak, immunohistokimyasal yöntemdeki monoklonal anti-fare PrP<sup>c</sup> ve Dpl antikorları kullanıldı. Dokulardan alınan örnekler önce protein ekstraksiyonu için cell lizat içerisinde homojenize edildi. Spektrofotometrik yöntemle total protein miktarları belirlendi. Daha sonra dokulardan alınan örnekler, SDS buffer da homojenize edilerek, %12 SDS gel elektroforezde (Continental Lab Products Inc, Apollo™ 73.1010V, USA) koşuturuldu ve sonra semi-dry immunoblot (Continental Lab Products Inc, Apollo™ 1-800-456-7741, USA) ile PVDF (immobilon-P)<sup>®</sup>ye transfer edildi. PVDF normal siğir serumu ile blokama işlemine tabi tutuldular. Gruplar arasında protein ekspresyonundaki farklılıkları görebilmek üzere her elektroforez işlemi benzer dokular kullanıldı. Bu işlemden sonra bantları ortaya çıkarmak için membranlar immunohistokimyasal yöntemde kullanılan anti-mouse PrP<sup>c</sup> ve anti-Dpl antikorları ile +4 °C de 1 gece inkübe edildiler. Yıkama işleminin takiben membranlar sırasıyla biotinle işaretli link antikor ve peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG ile 30'ar dakika muamele edildikten sonra, bantlar DAB kromojen ile kolorimetrik olarak gösterildi. Oluşan bantlar digital kamera (Nikon COOLPIX4500) ile fotoğraflandı.

## Bulgular

*Toxoplasma gondii* RH suşu takizoitleri inoküle edilen farelerde klinik olarak, 3. günden itibaren durgunluk gözlenmeye başladı, 4. günden sonra kılların kabardığı, ilerleyen günlerde ise yem tüketiminde azalma dikkati çekti. Makroskopik olarak, ilk 3. günde herhangi bir lezyon gözlenmezken, 4. günden itibaren karaciğer, dalak ve böbrekler üzerinde boz beyaz renkte odaklara rastlandı; akciğerler ödemli idi. Altıncı günde 3 fare ölü bulunurken, 3. ve 4. günlerdeki iç organlarda rastlanan bulgular yanında peritonun kalınlaşmış olduğu ve karın boşluğunda hafif bulanık bir eksudatın varlığı dikkati çekti. Periton sıvısından yapılan native mikroskopik muayenede *T. gondii* takizoitleri gözlemlendi.

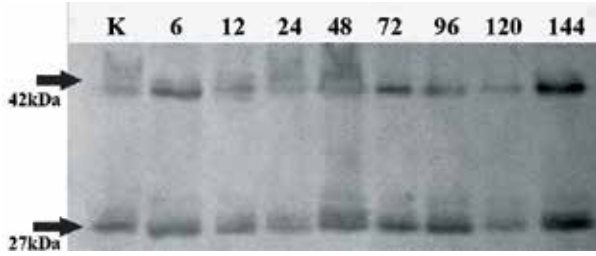
Histopatolojik incelemede, ilk 6. saatte böbreklerde lenfosit ve histiyositlerden oluşan fokal mononükleer hücre infiltrasyonları gözlemlendi. Akciğerlerde hiperemi ve ödem dikkati çekti. Karaciğerde parankim dejenerasyonu ile birlikte portal bölgede fokal mononükleer hücre infiltrasyonları ve Kupffer hücre aktivasyonu saptandı. Dalakta kontrol gruplarına göre lenfositlerde azalma ve ekstramedullar hematopoez gözlemlendi. On ikinci saatte karaciğerdeki dejeneratif değişikliklerin şiddetlendiği ve mononükleer hücrelerinin arttığı saptandı. Akciğerde ödem ve hiperemiye interalveoler septal dokuda ve peribronşiyal bölgedeki mononükleer hücre infiltrasyonlarının eşlik ettiği gözlemlendi. Böbreklerde fokal mononükleer hücre infiltrasyonları ve distal ve proksimal tubulus epitellerinde dejeneratif değişiklikler saptandı. Birinci ve 2. günlerde, 6. ve 12. saatlerdekine göre lezyonların şiddetinin arttığı görüldü. Üçüncü günde, 1. ve 2. gündeki bulgulara ek olarak beyinde submeningeal fokal mononükleer hücre infiltrasyonları ile kortekste fokal gliozis görüldü. Bağırsaklarda propria mukozada yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu belirlendi. Dördüncü günde diğer bulgulara ilave olarak dalakta lenfoid folliküllerde folliküler sentrum reaksiyonunun başladığı gözlemlendi. Beşinci ve altıncı günlerde (ölü bulunan farelerde daha belirgin olmakla beraber) beyin dokusunda fokal nekrotik odaklarla beraber gliozisin varlığı (Şekil 1a) ve karaciğerde dejeneratif değişikliklerin daha belirgin bir hal aldığı görüldü. Altıncı günde karaciğerde dissemine fokal nekroz odakları (Şekil 1b) ve bu odakların çevresinde mononükleer hücre infiltrasyonlarının

bulunduğu saptandı. Böbreklerde ise yangısal değişikliklerin korteksten medullaya doğru şiddetinin artarak yayıldığı gözlemlendi (Şekil 1c). Altıncı günde peritonun kalınlaştığı ve yoğun mononükleer hücre infiltrasyonlarının olduğu bulguları ile karşılaşıldı.

SABC tekniği ile 6. saatte *T. gondii* antijeni karaciğer ve böbreklerde tespit edildi. Karaciğerde belli bir bölge seçiciliği olmaksızın, hepatositlerin sitoplazmalarında pozitif reaksiyonlar görüldü. Böbreklerde daha çok interstisyumda makrofajların sitoplazmalarında, daha az olarak da tubulus epitel hücrelerinde immunopozitif reaksiyon belirlendi (Şekil 1d ve 1e). Dalakta 1. günde paraziter antijen, subkapsular alanlarda yaygın olarak ve özellikle makrofajların sitoplazmalarında gözlemlendi (Şekil 1f). *T. gondii* antijeni akciğerde peribronşiyal dokuda makrofajlarda ve interstisyel hücrelerde; bağırsaklarda ise lamina propria makrofajlarda ve serbest halde saptandı. Beşinci ve 6. günlerde antijen peritoneal makrofajlarda belirlendi. Tüm gruplarda beyin ve beyincik dışında antijen varlığı ortaya kondu.

İmmunohistokimyasal olarak PrP<sup>c</sup> (Tablo 1), beyinde mezensefalon, hipotalamus ve kortekste, ependim hücrelerinde, koroid pleksusta ve sinir traktuslarında, beyin stemindeki kranial sinir traktuslarında, beyincikte ise subs. albada nöron ve sinir tellerinde pozitif reaksiyonlar dikkati çekti. Kontrol grubuna göre, deneme gruplarında 3. günden itibaren immunoreaktivitenin daha belirgin olduğu dikkati çekti (Şekil 2a, 2b). Dalakta kontrol grubunda PrP<sup>c</sup> özellikle perifoliküler ve kırmızı pulpada az sayıda lenfosit ve makrofajlarda saptanırken, deneme gruplarında özellikle 1. günden itibaren hem kırmızı pulpada hem de beyaz pulpada daha yaygın ve yoğun olmak üzere, sinüzoidlerde ve peritrabeküler alanlarda immunopozitiflik gözlemlendi (Şekil 2c ve 2d). Karaciğerde, deneme gruplarının tümünde daha yoğun olmak üzere, tüm gruplarda kapsula ve sinüzoidler ile damar endotellerinde immunopozitiflik tespit edildi (Şekil 2e ve 2f). Hem kontrol hem de deneme gruplarındaki farelerin böbreklerinde glomerular yumakta, interstisyel hücrelerde boyanmalar saptanırken, deneme gruplarında ayrıca infiltre olan mononükleer hücrelerin sitoplazmalarında da belirgin immunopozitiflik saptandı. Böbrekte 1, 2, 3 ve 4. günlerde immunreaksiyonun daha belirgin olduğu gözlemlendi. Akciğerde tüm deney gruplarında kılcal damar endotelleri, interalveolar septal doku, bronşiyal epitellerinin apikal yüzeyleri ile peribronşiyal mononükleer hücrelerin özellikle periferinde immunopozitiflik görüldü. Beşinci ve 6. günlerde, yalnızca damar endoteli ile adventisya tabakasında immunreaktivite saptandı. Akciğerde kontrol grubunda damar endotel hücreleri, adventisya tabakası ve interalveolar septal dokuların immunoreaktif oldukları dikkati çekti. Deneme gruplarında ve kontrol grubunun mide ve bağırsakları incelendiğinde, seroza ve propria mukozadaki yangı hücreleri ile submukozadaki kapillar damar endoteli, bazı bağ doku elementleri ve yangı hücreleri, ayrıca muskuler tabakada longitudinal ve sirküler kas demetleri arasındaki bağ dokuda PrP<sup>c</sup> için pozitiflik saptandı. Pankreasın hem deneme gruplarında hem de kontrol grubundaki ekzokrin ünitelerde immunreaksiyonun olmadığı, bazı gruplarda yalnızca Langerhans adacıklarında ve stromadaki kapillar endotellerinde sınırlı kaldığı dikkati çekti. İskelet kası ve kalp kası telleri arasındaki bağ dokuda ve kapillar damar endotellerinde çok zayıf olarak boyanma hem deneme gruplarında hem de kontrol grubunda görüldü. Ayrıca kalbin endokard ve epikard altında mononükleer hücrelerde de pozitiflik saptandı. Mide-bağırsak, pankreas, kalp ve iskelet kaslarındaki kontrol ve deneme grupları arasında PrP<sup>c</sup> için yapılan immun boyanmalarda fark görülmemiş olup, semikantitatif değerlendirme sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Western blot tekniği ile dokularda PrP<sup>c</sup> molekülü 2 major protein band şeklinde 27 ve 42 kDa olarak saptandı. Özellikle dalakta ve beyinde oluşan 2 major band yoğunluklarının kontrollere göre özellikle deneme gruplarında arttığı, en fazla artışın ise 6. günde olduğu dikkati çekti (Şekil 3). Diğer organlarda ise kontrollere deneme grupları arasında farklılık gözlenmedi.



Şekil 3. Prion için Western blot analiz. Dalakta PrP<sup>c</sup> için 42kDa ve 27kDa olmak üzere major iki band oluşumu ve 6. günde (144. saat) PrP<sup>c</sup>'nin daha belirgin ekspresyonu. K= kontrol grubu.

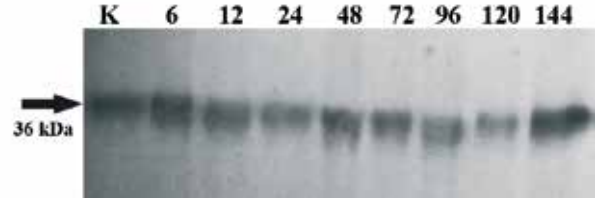
Figure 3. Western blot analyses for PrP<sup>c</sup>. Double major bands as 42kDa and 27 kDa for PrP<sup>c</sup> in spleen tissue and more prominent expression of PrP<sup>c</sup> at day 6 post-infection. K=control group.

SABC tekniği ile Dpl (Tablo 1) yönünden yapılan incelemede, özellikle 5. ve 6. günlerde beyin meninks, orta beyin, hipotalamus, kortekste ve beyin kökündeki sinir traktuslarının kontrollere göre daha yoğun immunpozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi. Nöron ve uzantılarındaki reaksiyonların zayıf olduğu dikkati çekti. Kontrol gruplarında beyin ve beyincikte meninks ve kapillar endotelinde immunreaktivite görüldü (Şekil 4a ve 4b). Dalakta, tüm gruplarda kapsüller, subkapsüller ve kırmızı pulpadaki hücreler immun pozitif. Ancak 2. günden itibaren 6. güne kadar, kırmızı pulpadaki genişlemeye paralel olarak pozitif reaksiyon gösteren hücre sayısının da arttığı dikkati çekti. Dalağın kontrol grubunda boyanma kapsüller, subkapsüller, kırmızı ve beyaz pulpada folliküler dendritik hücrelerde görüldü (Şekil 4c ve 4d). Tüm deneme gruplarında ve kontrol grubunda karaciğer kapsulası ve sinüzoidler ile damar endotelinde immunpozitiflik belirlendi. Altıncı günde karaciğerde odaklar halinde hepatositlerde ve Kupffer hücrelerinde immunpozitiflikte artış dikkati çekti (Şekil 4e ve 4f). Böbrek kapsulası, glomerulus yumağı ve interstiyel dokudaki kılcal damar endotelinin boyandığı görülürken, 1. günden itibaren glomeruluslarda boyanma şiddetinde artış ile birlikte Bowman kapsülünün pariyetal yaprağında da boyanmalara rastlandı.

Immunreaksiyon, özellikle 3, 4, 5. günlerde mononükleer hücrelerin artışı ile doğru orantılı olarak, böbreklerin korteksinde interstiyel doku ve pelviste subepitelial bölgedeki yangısal hücrelerde görüldü. Akciğerde tüm deneme ve kontrol gruplarında kılcal damar endotelinde, interalveolar septal dokuda, bronşiol epitellerinin apikal yüzeyleri ile peribronşyal hücre infiltrasyonlarında bazı mononükleer hücrelerin sitoplazmalarında immunreaktivitenin varlığı gözlemlendi. Bu reaksiyonun özellikle 1., 2., 3., 4. günlerde arttığı; 6. gün ile kontrol grubunda bronşiol epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde boyanmaya rastlanmadı. Deneme gruplarının tümünde ve kontrol grubunda mide ve barsak serozası, propria mukoza ve submukozadaki kapillar endotelini, bazı bağ doku ve yangı hücrelerinde ayrıca muskuler tabakada longitudinal ve sirküler kas demetleri arasındaki bağ dokuda immunpozitiflik tespit edildi. Pankreasın hem deneme gruplarında hem de negatif kontrollere parankiminin immunreaktif olmadığı, sadece stromadaki kapillar endotelinde pozitiflik dikkati çekti. İskelet kasi ve kalp kası telleri arasındaki bağ dokuda ve kapillar damar endotelinde boyanma deneme gruplarıyla birlikte kontrol grubunda da görüldü. Ayrıca kalpte endokard ve epikarddaki hücrelerde sitoplazmik immun boyanma gözlemlendi. Dpl için yapılan immunhistokimyasal boyamalarda, mide-bağırsak,

pankreas, kalp ve iskelet kaslarında deneme ve kontrol grupları arasında farklılık saptanmadı. Dpl'nin immunhistokimyasal olarak, doku dağılımı ve semikantitatif değerlendirme sonuçları Tablo 1' de gösterilmiştir.

Dpl için yapılan Western blot analizlerinde, belirtilen dokularda molekül ağırlığının yaklaşık olarak 34-38 kDa arasında olduğu belirlendi. Organlar arasında Western blot bulguları açısından çok belirgin farklılık gözlenmezken, dalak dokusunda 6. günde Dpl ekspresyonunda hafif artış gözlemlendi (Şekil 5).



Şekil 5. Western blot analiz. Beyin dokusunda Dpl için 36 kDa tek major band oluşumu ve 6. günde Dpl ekspresyonunda hafif artış.

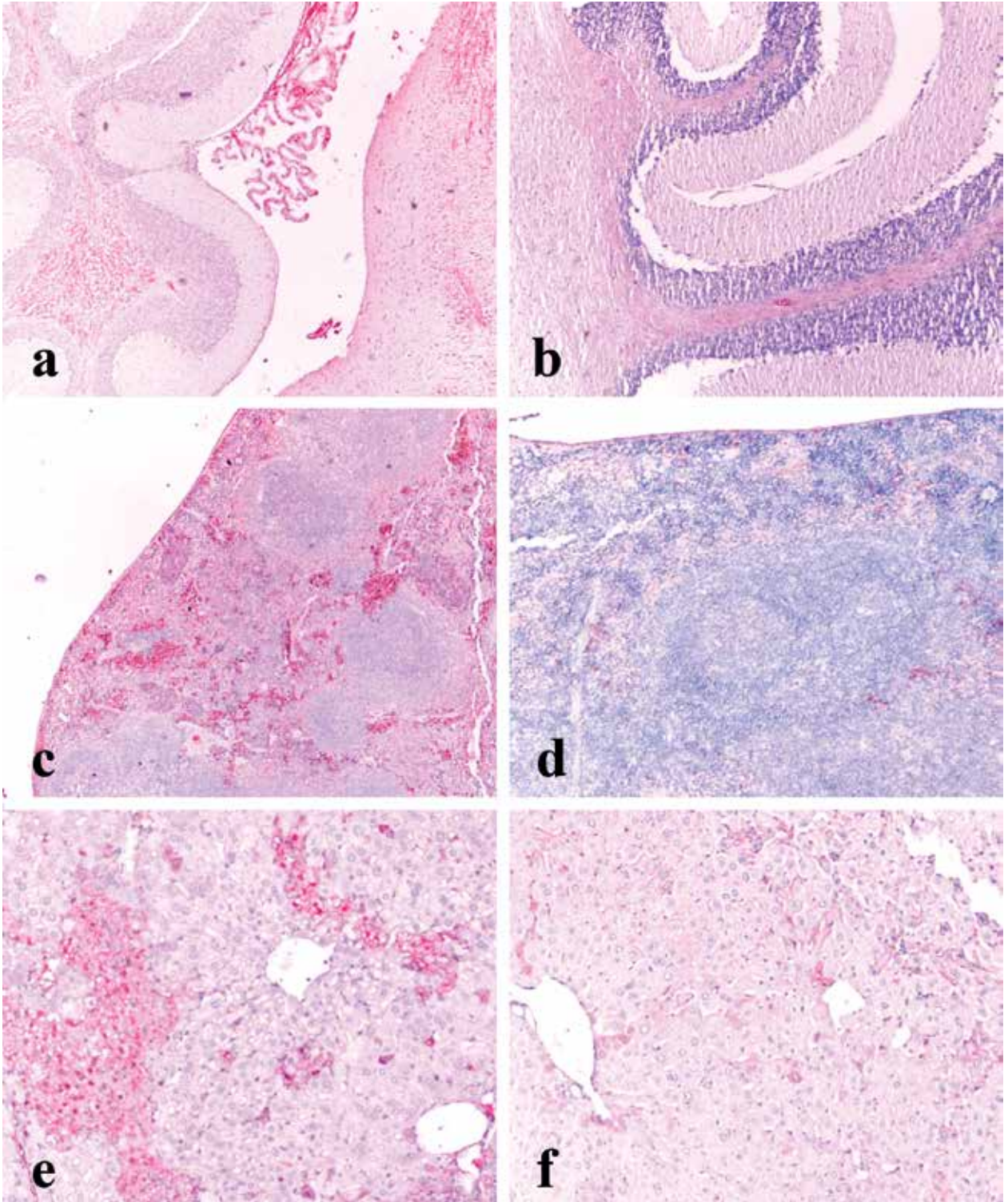
Figure 5. Western blot analyses for Dpl. Single major band 36 kDa for Dpl in brain tissue and mild increase in expression of Dpl at day 6 post-infection.

## Tartışma

Sunulan bu çalışmada gözlenen klinik ve makroskobik bulguların, farelerde az sayıda yapılmış benzer çalışmalarda bildirilen bulgular ile benzer olduğu (Eissa ve ark., 1990), akut toksoplazmozis oluşturulan gruplarda 6-8. günde (Villard ve ark., 1997; Dubey ve ark., 1999) tüm farelerin öldükleri bildirilmektedir. Deney hayvanlarında oluşan hastalık tablosunun deney hayvanı ve parazitin suşuyla da ilişkili olduğu rapor edilmektedir (Lee ve ark., 1995). T. gondii RH suşunun farelerde akut toksoplazmozise neden olduğu ve bu suşun oosit oluşturma kapasitesinde olmadığı bildirilmiştir (Dubey ve ark., 1999; Sukthana ve ark., 2003). Bu suşun fareye adapte edilmesinden sonraki yaklaşık 25 yıldır patojenitesini halen koruduğu saptanmıştır (Dubey ve Beattie, 1988). Aslında RH suşunun diğer Beverley, RRA, DEG, ME49, C56 gibi avirulent suşlara göre çok daha yüksek oranda patojen olduğu, nonimmune farelerde 1 takizoitin bile 8 gün içerisinde farelerde ölüm oluşturabileceği bildirilmektedir (Dubey ve Beattie, 1988; Dubey ve ark., 1999; Derouin ve Garin, 1991; Appleford ve Smith, 2000). Ayrıca farelerde toksoplazmozise genetik direncin, parazitin suşuyla ilgili olduğu ifade edilmektedir (Suzuki ve ark., 1995). Belirtilen parazit suşu ve deney hayvanı özellikleri dikkate alındığında, farelerde kolaylıkla hastalık tablosunun oluşturulabilmesi ve enfekte hayvanların uzun süre takibe ihtiyaç duyulmaması nedeniyle, sunulan bu çalışmada T. gondii RH suşu tercih edildi ve fareler intraperitoneal yolla (500 takizot/ml) enfekte edildi.

Bu çalışmada saptanan bulgular önceki araştırmalarla (Eissa ve ark., 1990; Waree ve ark., 2007) uyumlu bulunmakla birlikte, kalp ve çizgili kaslarda toksoplazmozise ilişkin bulguya rastlanmamıştır. Makroskobik olarak karaciğer, böbrek ve dalakta rastlanan lezyonlar histopatolojik bulgularla doğrulanmıştır. Ayrıca merkezi sinir sistemi bulgularına da az oranda rastlanmıştır. Özellikle beyinde daha hafif şiddette lezyonların olması kullanılan T. gondii suşunun sinir sistemine affinitesinin düşüklüğü ile açıklanabilir. T. gondii antijenin PCR, kültür ve immunohistokimyasal olarak saptanmasına yönelik yapılan çalışmalarda beyinde antijene ve doku kistlerine enfeksiyon sonrası 4. ve 6. günlerde rastlanmıştır (Lee ve ark., 1995; Lee ve ark., 1999; Waree ve ark., 2007). Sunulan bu çalışmada 3. günden sonra beyin ve menisklerde minimal





**Şekil 4a.** 5. günde serebellum ve koroid pleksuslarda Dpl immunopozitif alanlar. SABC metot, DAB kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80. **Şekil 4b.** Kontrol grubunda şekil 3a daki boyanmaya göre daha belirgin Dpl immunopozitif serebellar subst alba da sinir telleri. SABC metot, DAB kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80. **Şekil 4c.** 5. günde dalakta özellikle kırmızı pulpada dağılım gösteren yoğun Dpl immunopozitif hücreler. SABC metot, DAB kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80. **Şekil 4d.** Kontrol grubu dalakta perifoliküler ve kırmızı pulpada dağılımı olarak az sayıda Dpl immunopozitif hücreler. SABC metot, DAB kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80. **Şekil 4e.** 6. günde karaciğerde multifokal ve yaygın Dpl immunopozitif hücreler. SABC metot, DAB kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80. **Şekil 4f.** Kontrol grubunda karaciğerde belirgin bir yerleşim göstermeyen az sayıda Dpl immunopozitif hücreler. SABC metot, DAB kromojen, Mayers hematoksilen karşıt boyama, X80.

**Figure 4a.** Dpl immunopositive areas in cerebellum and choroid plexus at day 5 post-infection. SABC method, DAB chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80. **Figure 4b.** More prominent immunopositive nerve fibres in subst. alba of cerebellum than those of figure 3a in control group. SABC method, DAB chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80. **Figure 4c.** Dense Dpl immunopositive cells scattered in red pulp of spleen at day 5 post-infection. SABC method, DAB chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80. **Figure 4d.** Few Dpl immunopositive cells scattered in perifollicular areas and red pulp of spleen. SABC method, DAB chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80. **Figure 4e.** Multifocally dispersed Dpl immunopositive cells in liver at day 6 post-infection. SABC method, DAB chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80. **Figure 4f.** Few immunopositive cells for Dpl with uncertain localization in liver of control group. SABC method, DAB chromogen, Mayers hematoxylin counterstain, X80.

**Tablo 1:** IHC yöntemle PrP<sup>c</sup> ve Dpl pozitifliğinin çeşitli dokulardaki dağılımı.  
**Table 1:** Immunolabeling scores of PrP<sup>c</sup> ve Dpl with IHC method in organs.

|          | Böbrek           |     | Karaciğer        |     | Pankreas         |     | Akciğer          |     | Kalp             |     | Beyin-<br>beyincik |     | Dalak            |     | İskelet kası     |     | Mide-<br>barsak  |     |
|----------|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|--------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|
|          | PrP <sup>c</sup> | Dpl | PrP <sup>c</sup> | Dpl | PrP <sup>c</sup> | Dpl | PrP <sup>c</sup> | Dpl | PrP <sup>c</sup> | Dpl | PrP <sup>c</sup>   | Dpl | PrP <sup>c</sup> | Dpl | PrP <sup>c</sup> | Dpl | PrP <sup>c</sup> | Dpl |
| 6. saat  | 1                | 1   | 2                | 1   | 1                | 1   | 2                | 1   | 1                | 1   | 1                  | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   |
| 12. saat | 1                | 1   | 2                | 1   | 1                | 1   | 2                | 1   | 1                | 1   | 1                  | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   |
| 1. gün   | 2                | 2   | 2                | 1   | 1                | 1   | 2                | 2   | 1                | 1   | 1                  | 1   | 2                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   |
| 2. gün   | 2                | 2   | 2                | 1   | 1                | 1   | 2                | 2   | 1                | 1   | 1                  | 1   | 2                | 2   | 1                | 1   | 1                | 1   |
| 3. gün   | 2                | 2   | 2                | 1   | 1                | 1   | 2                | 2   | 1                | 1   | 2                  | 1   | 2                | 2   | 1                | 1   | 1                | 1   |
| 4. gün   | 2                | 2   | 2                | 1   | 1                | 1   | 2                | 2   | 1                | 1   | 2                  | 1   | 2                | 2   | 1                | 1   | 1                | 1   |
| 5. gün   | 1                | 2   | 2                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   | 2                  | 2   | 2                | 2   | 1                | 1   | 1                | 1   |
| 6. gün   | 1                | 2   | 2                | 2   | 1                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   | 2                  | 2   | 2                | 2   | 1                | 1   | 1                | 1   |
| Kontrol  | 1                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   | 1                  | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   | 1                | 1   |

yangısal değişiklikler, 5 ve 6. günlerden sonra ise nekroza eşlik eden fokal mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlanmıştır. Bununla beraber ilk 6 saatte karaciğer ve böbrekte; daha sonraki dönemlerde ise dalak ve bağırsaklarda makrofajlar içerisinde antijenin varlığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. *T. gondii* antijenlerine sinir sisteminde immunohistokimyasal olarak rastlanmamasına rağmen, beyinde gözlenen bulguların parazitin direkt etkisinden ziyade, etkilenen diğer dokulardan salınan yangısal-immun mediyatörlerden kaynaklanan sistemik bir etkinin, merkezi sinir sistemindeki bulguların bir nedeni olabileceğini akla getirmektedir (Ringer ve ark., 2011; Denes ve ark., 2010).

Hüresel prion protein mRNA'sı dokularda özellikle de nöronlarda yaygın olarak ekspresyona sahipken, prion protein ekspresyonu immunohistokimyasal bulgulara göre daha sınırlı olarak bulunur (Ford ve ark., 2002). Sunulan çalışmada in situ hibridizasyon yöntemi kullanılmamakla beraber, PrP<sup>c</sup> immunohistokimyasal olarak, hem deneme hem de kontrol grubundaki farelerde bazı organlarda artan düzeylerde gösterilmiştir. PrP<sup>c</sup> özellikle lenfoid organlardan dalakta germinal merkezlerde tek tük dağınık halde, beyaz pulpada ise yaygın olarak B-lenfositlerde ve dendritik hücrelerde varlığı gösterilmiştir (Ford ve ark., 2002; Paltrinieri ve ark., 2004). Bu çalışmada PrP<sup>c</sup>, artan düzeylerde dalak ve böbrek gibi organlarda lenfoid hücrelerin sitoplazmalarında lenfosit ve makrofajlarda gösterilmiştir. Aynı şekilde PrP<sup>c</sup> deneme gruplarında artan düzeylerde beyin ve beyincikte özellikle subst. alba'da görülmüştür. Bu pozitiflik aynı şekilde western blot tekniği ile de desteklenmiştir. Yine beyin dokularında immunohistokimyasal olarak *T. gondii* antijenine rastlanmamış olmakla birlikte, PrP<sup>c</sup> ekspresyonundaki artışın nedeni, muhtemelen parazitin sistemik etkisinin bir sonucudur.

Dpl ise PrP<sup>c</sup>'nin %25 homoloğu olmakla beraber, iki proteinin yapısal özellikleri oldukça benzerdir (Legname ve ark., 2002). Dpl'nin özellikle testiste ekspresyonu bildirilmekle beraber (Legname ve ark., 2002; Paltrinieri ve ark., 2004), daha az oranda beyin, dalak, kalp, iskelet kası, böbrek, karaciğer ve akciğerde de varlığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, Dpl ekspresyonlarının PCR ve Western blot analizlerde dağılımlarının insan, sığır ve farelerde benzer oldukları saptanmıştır (Sakaguchi ve ark., 1996; Moore ve ark., 1999; Tranulis ve ark., 2001; Rondona ve ark., 2005). Sığırlarda yapılan bir çalışmada Dpl'nin varlığı dalak ve lenf yumrularında lenfoid folliküllerin merkezlerinde, B ve dentritik hücrelerde, kemik iliğinde ve dolaşımdaki myeloid prekürsörlerde, en fazla ise dolaşımdaki granülositlerde belirlenmiştir (Paltrinieri ve ark., 2004). Sunulan bu çalışmada Dpl için beyin ve beyincikte hafif şiddette boyanma saptanırken,

özellikle dalak ve diğer organlarda bulunan lenfoid folliküllerin çevresindeki mononükleer hücrelerde yoğun immunpozitiflik saptanmıştır. Ayrıca immunohistokimyasal Dpl ekspresyonu ile western blot sonuçları arasında enfeksiyonun ileri dönemlerindeki bulgular dışında, diğer günler için belirgin bir korelasyon bulunamamıştır.

Toksoplazmoziste hüresel immunitenin varlığı, gecikmiş tip aşırı duyarlılık ile açıklanmıştır. Konak *T. gondii* ile karşılaştığında makrofajlardan IL12 salgılanır. IL12 sadece enfeksiyonun başlangıç döneminde antijene özgün hücre oluşumunda gereklidir. Daha sonra CD4 ve CD8 T lenfositlerden IFN-  $\gamma$  salınarak koruyucu immunité gelişir (Özcel ve ark., 2007). Bu çalışmada konakta gelişen yangısal reaksiyona bağlı olarak, yangı hücrelerinde hem sayısal artış hem de PrP<sup>c</sup> ve Dpl ekspresyonlarında artış olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, sunulan bu çalışmada, farelerde deneysel *T. gondii* enfeksiyonun, özellikle dalak, böbrek, akciğer, karaciğer ve daha az oranda da beyin dokusunda enfeksiyon süresinin artışına bağlı olarak, hem PrP<sup>c</sup> ve hem de Dpl'in ekspresyonunu artırdığı; kalp kası, iskelet kası, mide-barsak ve pankreasta ise artışın olmadığı saptandı. Bu sonucun organlarda gelişen yangısal reaksiyonla paralellik göstermesi, her iki proteinin de toksoplazmozis ya da başka enfeksiyonların değişik dönemlerinde hüresel immunitédeki rollerinin belirlenmesi bakımından önem teşkil edebileceği kanaatine varıldı.

## Teşekkür

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Proje Yönetim Ofisi (BAP, VET-022 nolu proje) tarafından desteklenmiştir. *T. gondii* suşunu sağlayan Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı-Ankara Kurumuna ile *T. gondii*'ye karşı primer serumu sağlayan Prof. Dr. Rifki Haziroğlu'na katkılarından dolayı teşekkürü borç biliriz.

## Kaynaklar

- Aguzzi A, Hardt W-D (2003). Dangerous liaisons between a microbe and the prion protein. *Journal Experimental Medicine* 198, 1-4.
- Almeida CJG, Chiarini LB, da Silva JP, e Silva MR, Martins MA, Linden R (2004). The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *The Journal of Leukocyte Biology* 77, 1-9.
- Appleford PJ, Smith JE (2000). Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. *The International Journal for Parasitology* 30, 1187-91.
- Behrens A, Aguzzi A (2002). Small is not beautiful: antagonizing functions for the prion protein PrPc and its homologue Dpl. *Trends in*



- Neurosciences 25, 150-154.
- Bogdan C, Rölinghoff M (1999). How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology Today*, 15, 22-28.
- Brown DR (2004). Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes. *Neurobiology of Disease* 15, 534-543.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO Journal* 21, 3317-26.
- Cui T, Holme A, Sassoon J, Brown DR (2003). Analyses of doppel protein toxicity. *Cellular and Molecular Neurobiology* 23, 144-155.
- Deignan ME, Prior M, Stuart LE, Comerford EJ, McMahon HEM (2004). The structure function relationship for the prion protein. *The Journal of Alzheimer's Disease* 6, 283-289.
- Dénes A, Humphreys N, Lane TE, Grecnis R, Rothwell N (2010). Chronic systemic infection exacerbates ischaemic brain damage via a CCL5 (RANTES) mediated proinflammatory response in mice. *Journal of Neuroscience* 30, 10086-10095.
- Denkers EY (1999). T lymphocyte-dependent effector mechanism of immunity to toxoplasma gondii. *Microbes and Infection* 1, 699-708.
- Derouin F, Garin YJ (1991). *Toxoplasma gondii*: blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. *Exp Parasitol* 73(4), 460-468.
- Dubey JP, Beattie CP (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Inc., Florida.
- Dubey JP, Shen SK, Kwok OC, Frenkel JK (1999). Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. *Journal of Parasitology*, 85, 657-662.
- Eissa MH, Antonious SN, Salama MM, Fikry AA, Morsy TA (1990). Histopathological studies of acute, chronic and congenital infections of toxoplasmosis in mice. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 20, 805-816.
- Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall MS (2002). Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 113, 177-192.
- Harris DA (2003). Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *British Medical Bulletin* 66, 71-85.
- Heussler VT, Küenzi P, Rottenberg S (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *The International Journal of Parasitology*, 31, 1166-1176.
- Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Buzoni-Gatel D (2004). *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *The International Journal for Parasitology* 34, 401-409.
- Kim B-H, Lee H-g, Choi J-K, Kim J-I, Choi E-K, Carp RI, Kim Y-S (2004). The cellular prion protein (PrPc) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Molecular Brain Research* 124, 40-50.
- Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML JR, Walz R, Andrades ME, da Silva EG, Brentani RR, Izquierdo I, Fonseca Moreira JC (2001). Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1137-1144.
- Kubosaki A, Nishimura-Nasu Y, Nishimura T, Yusa S, Sakudo A, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T (2003). Expression of normal cellular prion protein (PrP(c)) on T lymphocytes and the effect of copper ion: Analysis by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307, 810-813.
- Kubosaki A, Ueno A, Matsumoto Y, Doi K, Saeki K, Matsumoto Y, Onodera T (2000). Analysis of prion protein mRNA by in situ hybridization in brain and placenta of sheep. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273, 890-893.
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999). Prions prevent neuronal cell death. *Nature* 400, 225-226.
- Lee YH, Kim KY, Kang MS, Shin DW (1995). Detection of *Toxoplasma* antigens and antibodies in mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Korean Journal of Parasitology* 33, 201-210.
- Lee YH, Channon JY, Matsuura T, Schwartzman JD, Shin DW, Kasper LH (1999). Functional and quantitative analysis of splenic T cell immune responses following oral *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Experimental Parasitology* 91, 212-221.
- Legname G, Nelken P, Guan Z, Kanyo ZF, DeArmond SJ, Prusiner SB (2002). Prion and doppel proteins bind to granule cells of the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 16285-16290.
- Liang J, Kong Q (2012).  $\alpha$ -Cleavage of cellular prion protein. *Prion* 6, 453-460.
- Liu T, Zwingman T, Li R, Pan Tao, Wong B, Petersen RB, Gambetti P, Herup K, Sy M (2001). Differential expression of cellular prion protein in Mouse brain as detected with multiple anti-PrP monoclonal antibodies. *Brain Research* 896, 118-129.
- Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A et al. (1999). Ataxia in prion protein (PrP-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *Journal of Molecular Biology* 292, 797-817.
- Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E (2007). *Tıbbi ve Veteriner immunoparazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:21, Meta Basım, İzmir.*
- Paltrinieri S, Comazzi S, Spagnolo V, Rondena M, Ponti W, Ceciliani F (2004). Bovine Doppel (Dpl) and Prion Protein (PrP) expression on lymphoid tissue and circulating leukocytes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 52, 1639-1645.
- Pimenta J, Dias FM, Marques CC, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Barbas JP, Soares R, Mesquita P, Cabrita E, Fontes CM, Prates JA, Pereira RM (2012). The prion-like protein Doppel enhances ovine spermatozoa fertilizing ability. *The Reproduction in Domestic Animals* 47, 196-202.
- Riesner D (2003). Biochemistry and structure of PrPc and PrPsc. *British Medical Bulletin* 66, 21-33.
- Rondena M, Ceciliani F, Comazzi S, Pocacqua V, Bazzocchi C, Luvoni C, Chigioni S, Paltrinieri S (2005). Identification of bovine doppel protein in testis, ovary and ejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 63, 1195-1206.
- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for disrupted PrP gene. *Nature* 380, 528-531.
- Sinai AP, Payne TM, Carmen JC, Hardi L, Watson SJ, Molestina RE (2004). Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *The International Journal for Parasitology* 34, 381-91.
- Sukthana Y, Waree P, Pongponratn E, Chaisri U, Riganti M (2003). Pathologic study of acute toxoplasmosis in experimental animals. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 34, 16-21.
- Suzuki Y, Yang Q, Remington JS (1995). Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology* 81, 1032-1034.
- Ringer TM, Axer H, Bernd F.M. Romeike BFM, Zinke J, Brunkhorst F, Witte OW, Günther A (2011). Neurological sequelae of sepsis: I) Septic encephalopathy. *The Open Critical Care Medicine Journal* 4, 2-7.
- Tranulis MA, Espenes A, Comincini S, Skretting G, Harbitz I (2001). The PrP-like protein Doppel gene in sheep and cattle: cDNA sequence and expression. *Mammalian Genome* 12, 376-379.
- Villard O, Candolfi E, Ferguson DJ, Marcellin L, Kien T (1997). Loss of oral infectivity of tissue cysts of *Toxoplasma gondii* RH strain to outbred Swiss Webster mice. *The International Journal for Parasitology* 27, 1555-1559.
- Waree P, Ferguson DJ, Pongponratn E, Chaisri U, Sukthana Y (2007). Immunohistochemical study of acute and chronic toxoplasmosis in experimentally infected mice *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 38, 223-231.
- Watarai M, Makino S, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S, Shirahata T. (2002). Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. *Infection and Immunity* 70, 4818-25.
- Westaway D, Carlson GA. (2002). Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 301-307.
- Zachary ve McGavin (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 5th Edition.