



Deneysel Kronik Toksoplazmoz Modelinde Erken Dönem Bağışıklık Yanıtının Değerlendirilmesi

Tuğçe Sümer, Oğuz Kul

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

Özet

Ensefalitik toksoplazmoz, *Toxoplasma gondii* tarafından oluşturulan, ölümcül sonuçları olabilen ve özellikle de immun-baskılanmış bireylerin etkilendiği bir hastalıktır. Ancak insan çalışmalarının sınırlı olmasından dolayı konak- patojen ilişki mekanizmasının aydınlatılması için en iyi alternatif, deneysel fare çalışmaları olmaktadır. C57BL/6 fareler toksoplazmoza duyarlıdır ve *T. gondii* ile oluşan enfeksiyonlarında herhangi bir immun baskılayıcı etkiye maruz kalmadan da ensefalitik toksoplazmoz geliştirebilirler. Bu nedenle de özellikle *T. gondii*' nin ME49 gibi tip II suşlarıyla oluşturulan immunopatogenez ve mekanizma çalışmalarında tercih edilmektedirler. Sunulan bu çalışmada; proinflamatuvar sitokinler; interleukin- 12 (IL-12), İnterferon- γ (IFN- γ) ve Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)' nın, ME49 suşuyla enfekte edilmiş C57BL/ 6 farelerde görülen ensefalitik toksoplazmozdaki rolü araştırılmıştır. Bunun için, enfekte fareler enfeksiyonun 30. gününde sakrifiye edilmiş, hem histopatolojik hem de immunoperoksidaz testler uygulanmıştır. Sonuç olarak, yapılan ayrı ayrı boyamalarda; beyin korteks, amigdala, striatum ve substantia nigradaki *T. gondii* immunopozitiflikleriyle, IL-12, IFN- γ ve TNF- α sitokin ekspresyonlarının birbirleriyle korelasyon içinde olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, beyinde tip I proinflamatuvar sitokinlerin *T.gondii* enfeksiyonunun erken aşamasında artış gösterdiklerini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, ensefalitik toksoplazmoz, IL-12, IFN- γ , TNF- α

Evaluation of Early Stage Immun Response in Experimental Chronic Toxoplasmosis Model

Tuğçe Sümer, Oğuz Kul

Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Kırıkkale, Turkey

Abstract

Encephalitic toxoplasmosis caused by *Toxoplasma gondii* is a disease that can cause death in immunocompromised patient. Since experimental human studies are limited, experimental murine models are the most functional way for enlightening the mechanism of the host- pathogen interactions. C57BL/ 6 mice are susceptible for the toxoplasmosis compared the other mouse species. They may develop encephalitic toxoplasmosis without any immunocompromised disease. Therefore, they generally infected with *T. gondii* for the host- pathogen interaction and immunopathogenesis studies. In present study, we investigate the role of the pro-inflammatory cytokines such as Interleukin- 12 (IL-12), Interferon- γ (IFN- γ) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in ME49 infected C57BL/6 mice. ME49 infected mice sacrificed at post-infection 30 days, then histopathological and immunoperoxidase tests applied for the cytokines and *T. gondii* antigen. Thus, there were *T. gondii* immunopositivity detected in cortex, amygdala, hippocampus, striatum and substantia nigra. IL-12, IFN- γ and TNF- α expressions showed correlation in those examined areas. In this context, it is thought that Type I proinflammatory cytokin levels are prominently increased during the early stage of encephalitic toxoplasmosis.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, Encephalitic toxoplasmosis, IL-12, IFN- γ , TNF- α

Correspondence to: Tuğçe Sümer, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye. E-mail: tugceanteplioglu@kku.edu.tr

Dipnot: Bu çalışma, çalışmayla Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü "FARELERDE KRONİK ENSEFALİTİK *Toxoplasma gondii* Enfeksiyonunda, Konak-Parazit İlişkisi Ve Konak İmmun Yanıtının Fonksiyonel Nöropatoloji İle Araştırılması" adlı doktora tez çalışmasının ön bulgularını kapsamaktadır ve Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No:2016/ 040 ile desteklenmiştir.

Giriş

Toxoplasma gondii, dünya çapındaki tüm sıcakkanlı canlıları enfekte edebilme özelliği olan zorunlu hücre içi bir protozoon parazittir (Lindsay ve Dubey, 2014). Yaşam döngüsü temel olarak kedigiller ailesinde şekillenen seksüel ve diğer memeli ve kanatlılarda gerçekleşen aseksüel aşama olarak ikiye ayrılır (Frenkel ve ark., 1970). Parazitin aseksüel çoğalma aşaması, arakonakta oluşan enfeksiyonun akut ya da kronik olmasına göre, takizoit ya da bradizoit formlarını kapsar (Dubey ve ark., 1998).

Enfektif form olan takizoitler, immün sistemin artan Th1 yanıtı ile aşama dönüşümü geçirir ve bradizoitlere dönüşürler. Bradizoitler, morfolojik olarak takizoitlerle benzer olmalarına karşın, fonksiyonel olarak farklılıklar gösterebilirler ve kendileri gibi yüzlerce hatta binlerce bradizoitin bulunduğu doku kistleri içinde yer alırlar (Montoya ve Liesenfeld., 2004). Konaktan konağa değişebilmekle birlikte, doku kistleri daha çok kas doku ve merkezi sinir sisteminde (MSS) lokalize olurlar (Dubey, 1997). Doku kistleri, doğal yolla enfekte olan kedi ve koyunlarda daha çok kas dokuda, deneysel enfekte farelerde ise MSS'nde yerleşim gösterir (Dubey ve ark., 2004; Dubey, 2010, Jacobs ve ark., 1963). Latent aşamada, yavaş çoğalan bradizoitler konak immün sisteminden kaçarak, yaşam boyu nöronların içinde kalabilirler ve böylece, nöronal fonksiyonları etkileyerek, davranış değişiklikleri ve nöropsikiyatrik hastalıklara neden olurlar (Kocak ve ark., 2012; Parlog ve ark., 2015). Bununla birlikte, CD4⁺ T lenfosit sayısı mikrolitrede 50 hücrenin altına düştüğü immünsupresif durumlarda, doku kisti duvarı yıkılır ve bradizoitler takizoitlere dönüşerek öldürücü toksoplazmik ensefalit tablosunu oluştururlar (Jones ve ark., 1996; Sukthana, 2006).

İnsanlardaki ensefalitik toksoplazmozun in vivo mekanizmasının açıklanmasında, şimdiye kadar yapılan in vitro çalışmalar ve az sayıdaki insan çalışması yetersiz kalmış ve rodent deneylerine başvurulmuştur. Bu bakımdan, av-avcı parazit döngüsünde, son konağı kedi olan *T. gondii* için fareler oldukça önemli konaklardır (Dubey JP, 1998). Yapılan çalışmalar, temel doku-uyumluluk kompleksi (MHC) haplotiplerine karşı duyarlılığı olup olmadığı fark etmesizin tüm fare soylarının, *T. gondii*' ye karşı güçlü bir Th1 yanıtı geliştirdiğini göstermektedir (Denkers ve Gazzinelli, 1998). Ancak, H-2^b ya da H-2^k haplotipleri olan C57BL/6

gibi fare türleri enfeksiyonun geç dönemlerinde nekrotize ensefalitik toksoplazmoz geliştirirler ve ensefalit modellemesi için daha uygun görülmektedirler (Suzuki, 2002). Ensefalit modellemesi, patogenezi ve tedavisi için genellikle, *T. gondii*' nin tip II suşu olan ME49 kullanılmıştır (Araujo ve ark., 1997). Yapılan çalışmalar Tip II izolatların, interleukin- 12 (IL-12) ve İnterferon- γ (INF- γ)' yı Tip I'e göre daha fazla tetiklediğini göstermiştir (Mordue ve Sibley, 2003; Schade ve Fischer, 2001).

Zorunlu hücre içi protozoon olan *T. gondii*, antijen sunan hücreler olan astrosit ve gliaların anti-paraziter etkisini engellemek için, INF- γ aracılığı ile gerçekleşen MHC sınıf II hücre-yüzey moleküllerinin ekspresyonunu azaltır (Luder ve ark., 2003). Bununla birlikte, makrofajlar tarafından daha uzun süre taşınmak için de, mekanizması tam olarak bilinmeyen bir biçimde altı farklı apoptoz yolacağını engellerler. Böylece antijen sunan hücreleri tıpkı bir "Truva atı" gibi kullanarak konak immün sisteminden saklanırlar (Nash ve ark., 1998). Sonrasında ise hem kan ve lenf damarları hem de makrofaj/dendritik hücre içerisinde Truva atı gibi serbestçe taşınan takizoitler; akciğer, karaciğer, dalak, göz, plesenta, beyin ve kaslara göç etmeye başlarlar (Lieberman ve Hunter, 2002). Enfeksiyonun 7. günde MSS' ne ulaşan takizoitler, başta mikrogliya ve astrositler olmak üzere bölgedeki tüm çekirdekli hücreleri enfekte edebilirler (Hunter ve ark., 1992, Wilson ve Hunter, 2004). Bu dönemde, enfeksiyonun akut fazını kontrol eden proinflamatuvar sitokinler; IL-12, INF- γ ve Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)'yı kapsayan ve takizoitlerin üremesini sınırlandıran, lokal Th-1 yanıtı indüklenir (Chardes ve ark., 1994).

Bu çalışmayla, C57BL/6 farelerde ME49 suşuyla ensefalitik toksoplazmoz oluşturularak, beyin ve karaciğerde etkilenen bölgelerin ve bu etkinin ne düzeyde olduğunun gösterilmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte; hem ayrı bir sitokin sel yanıt mekanizması olan beyin dokusunda ve generalize yanıtta etkilenen karaciğerde, toksoplazmoza karşı şekillenen immün yanıtta öncü görev alan IL-12, TNF- α ve INF- γ ' nın ensefalitik toksoplazmozun patogeneziindeki yerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Aynı zamanda, yine bu çalışmayla Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü "Farelerde kronik ensefalitik *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunda, konak-parazit ilişkisi ve konak immün

Tablo1. Deneysel *T. gondii* enfeksiyonu oluşturulan farelerin beyin dokusunda semikantitatif histopatolojik skorlama.

Table1. Semiquantitative histopathological scores in the brain tissue of the mouse infected with *T. gondii*.

0= Yok, 1= Hafif, 2= Orta Şiddette, 3= Şiddetli

	Nöron Dejenereasyon/			Perivasküler Mononükleer Hücre		Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu		Vaskülit
	Nekroz	Gliozis	Satellitosis	İnfiltrasyonu	Meningit	İnfiltrasyonu		
1	3	2	2	1	1	2	1	
2	1	1	1	0	0	1	1	
3	2	1	2	0	1	1	1	
4	2	2	2	0	0	1	1	
5	2	1	1	1	0	1	1	
6	2	2	1	1	1	1	1	
7	3	2	2	1	0	1	1	
8	2	1	1	1	0	1	2	
9	1	1	0	0	0	1	1	
10	3	2	1	1	1	1	1	

yanıtının fonksiyonel nöropatoloji ile araştırılması” adlı doktora tez çalışmasının ön bulgularının sunulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Etik Beyanı

Deney hayvanlarının bakımı ve tüm deneysel prosedürler Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından ruhsatlandırılmış olan, Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deney Hayvanları Ünitesi’nde yapıldı. Çalışma süresince uygulanan tüm bu prosedürler ve deneysel aşamalar için, Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu’ndan onay alındı (25.02.2016, 16/23 nolu Etik Kurul Raporu).

Deney Hayvanları

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ruhsatlı olan, ticari laboratuvar hayvanı üreticisi (Kobay A.Ş., Ankara) aracılığıyla sertifikalı olarak, 20 adet, 6-8 hafta yaşlı, erkek, C57BL/6 fare temin edildi. Fareler tip II long ve hepa filtreli kafeslerde, 20- 23 °C’de 12 saat ışık/12 saat karanlık döngüsüyle barındırıldı. Ticari pelet yem ve içme suları ad libitum olarak sağlandı. 2 haftalık karantina süresinin ardından 10 haftalık fareler 10’arlı 2 gruba ayrıldı. Enfeksiyon grubuna (n=10), *T. gondii*’nin 2009 yılında Dr.Alvaro Freyre, Toxoplasma Research Lab, Uruguay’dan yasal izinlerle

Patolojik İncelemeler

Doku kisti inokulasyonundan 30 gün sonra fareler CO₂ kabini- de ötenazi edildi ve doku örnekleri %4’lük PBS tamponlu paraformaldehit solüsyonu içerisinde 48 saat süreyle tespit edildi. Rutin doku takip işlemlerinde dereceli alkol (70°, 80°, 90°, 96° ve 99.5°) ve ksilol serilerinde işlem gördükten sonra parafinde bloklandı. Parafin bloklardan hem hematoksilin ve eozin (HE) boyama, hem de immunohistokimyasal boyamalar için 4-5µm kalınlığında seri kesitler alındı. Rutin olarak hematoksilin ve eozin (HE) ile boyanan kesitler, histopatolojik yönden incelendi ve lezyon şiddeti yönünden histopatolojik olarak skorlandı.

Antikorlar

Bu çalışmada, ticari anti- TNF-α anti-fare antikoruna (Santa Cruz, sc 52746, CA, USA), anti-IL12 anti-fare antikoruna (Abcam, ab106270, CA, USA), anti- IFN- γ (Abgent, AP52068, CA, USA) ile Hazıroğlu ve ark., tarafından 2003’te gösterildiği gibi hazırlanan poliklonal anti-*T. gondii* antikoruna kullanıldı.

İmmunoperoksidaz Testler

Tüm immunohistokimyasal analizler ticari immunoperoksidaz kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), AEC kromojen ve karşıt boyama için Mayer’s hematoksilin kullanıldı. Ne-

Tablo2. Deneysel *T.gondii* enfeksiyonu oluşturulan farelerin karaciğer dokusunda semikantitatif histopatolojik skorlama.

Table 2. Semiquantitative histopathological scores in the liver tissue of the mouse infected with *T.gondii*.

0= Yok, 1= Hafif, 2= Orta Şiddette, 3= Şiddetli

	Hepatosit Dejenerasyonu	Multifokal Nekroz Odakları	Fokal/ Sinuzoidal Hücre İnfiltrasyonu	Vakuolasyon	Perivasküler Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu
1	3	3	1	3	1
2	2	2	1	2	0
3	3	3	1	2	1
4	2	2	1	2	0
5	3	2	2	2	1
6	0	0	0	0	0
7	2	3	1	3	1
8	3	3	0	3	1
9	2	2	0	1	0
10	1	1	1	1	0

Tablo3. Beyin bölgelerine göre, IL12, IFN-γ ve TNF-α immunopozitif boyanmalar.

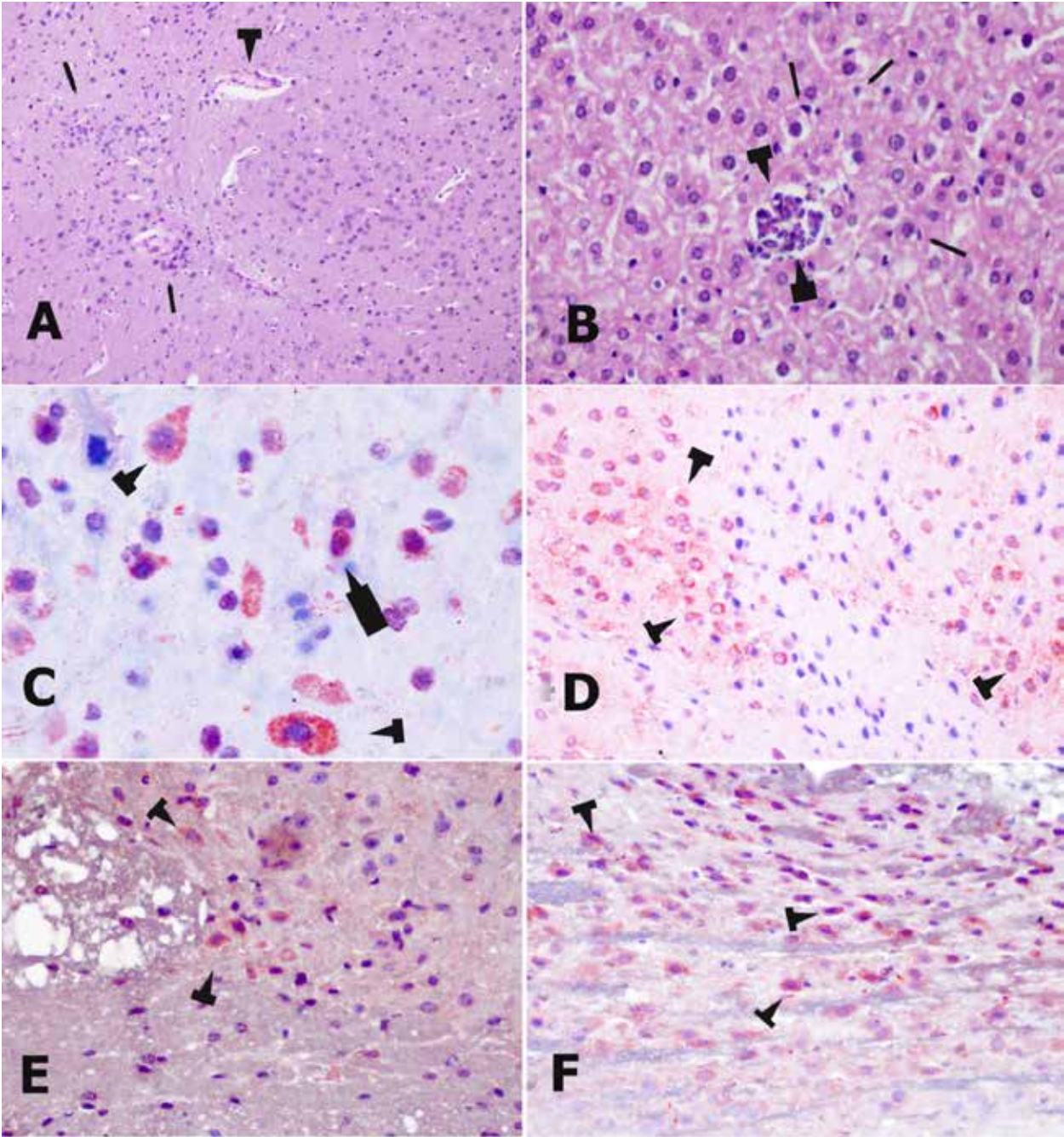
Table 3. Immunopositive scores in the brain tissues of the infected mouse.

	Serebral korteks	Hipokampus	Striatum	Talamus	Amigdala	VTA	Subs. Nigra
<i>T. gondii</i>	2	2	3	2	2	2	1
TNF-α	3	1	2	1	2	2	2
IFN-γ	3	2	3	2	1	1	2
IL-12	3	1	2	1	2	3	2

0= Yok, 1= Hafif, 2= Orta Şiddette, 3= Şiddetli

getirilen ve o zamandan buyana laboratuvarlarımızda düzenli olarak pasajlanan ME49 suşu oral yolla yaklaşık 10µm çapında 15 adet doku kisti içerecek biçimde hazırlanmış 0,5 ml beyin süspansiyonu verildi. Kontrol grubuna (n=10) ise 0,5 ml fizyolojik tuzlusu yine oral yolla uygulandı. Sakrifiye edilene kadar, tüm farelerin sağlıkları düzenli olarak kontrol edildi.

gatif kontrol için de aynı prosedürler uygulandı ancak, primer antikor yerine normal fare serumu kullanıldı. Pozitif kontrol olarak, daha önceki çalışmalardan elde edilen *T. gondii* enfekte fare dokuları kullanıldı. Kesitler; ksilende deparafinize, dereceli alkollerde de rehidre edildikten sonra, sitrat solüsyonda (pH6.0) 30 dakika kaynatılarak antijen-geri alma işlemi yapıldı.



Şekil 1. (A) Striatumda orta şiddette fokal mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar) ve hafif perivasküler hücre infiltrasyonu (ok başı), HE, 100X büyütme. (B) Karaciğerde fokal mononükleer hücre infiltrasyonu (ok başı) ve Kupffer hücre proliferasyonu (ok), HE, 200X büyütme. (C) Amigdalar bölgesinde, nöronlarda (ok başı) ve glial hücrelerde (ok) *T. gondii* immunopozitif reaksiyonlar, HE, 400X büyütme. (D-E-F) *T. gondii* immunopozitif reaksiyonlar (ok başları), HE, 200X büyütme. Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test.

Figure 1. (A). focal (arrows) and perivascular (arrowheads) mononuclear cell infiltrations in striatum of the brain.(B) mononuclear cell infiltrations (arrowheads) and Kupffer cell proliferations(arrows) in the liver.(C) Immunopositive reactions for *T. gondii* in neurons(arrowheads) and glial cells(arrows) of the amigdala.(D-E-F) Immunopositive reactions(arrowheads) for *T. gondii* in neurons. Avidin–Biotin Complex Indirect Peroxidase Test.

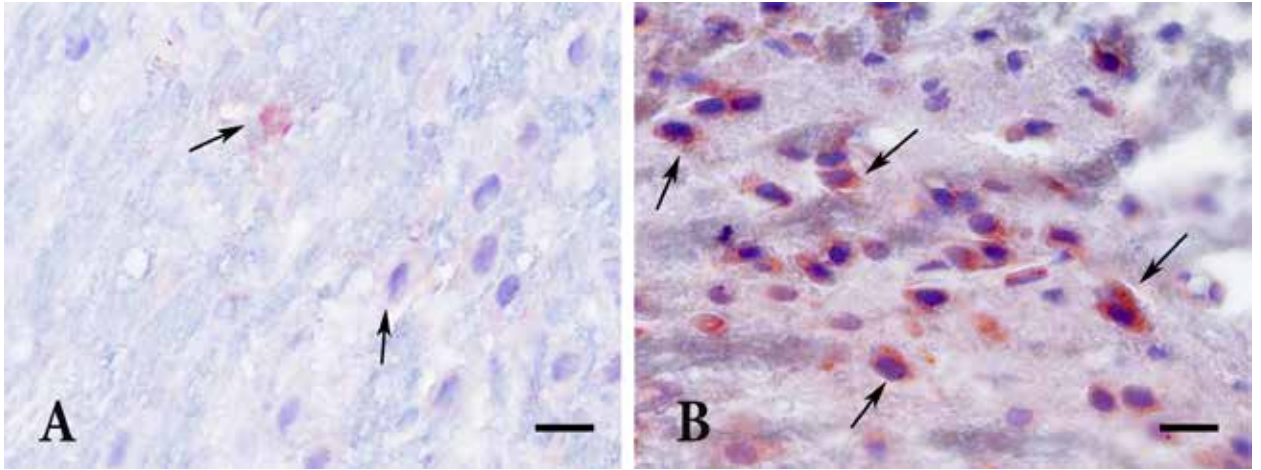
Ardından dokular, %1'lik hidrojen peroksit 10 dakika muamele edilerek endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi ve 10 dakika süreyle normal keçi serumuyla inkübe edildi. Akabinde sırasıyla, 1 saat oda ısısında primer antikorlarla (anti- TNF- α , anti-IFN- γ , anti-IL12 ve anti- *T. gondii*), 30'ar dakika da sekonder antikor ve streptavidin-peroksidaz ile inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitler, AEC kromojen ve Mayer's hemotoksilenle boyanarak, su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı. DP25 kamera eklentili Olympus BX51 (Japonya) mikroskop ile boyanmalar değerlendirilerek,

mikrofotografaları çekildi. Beyin dokusunda gözlenen değişiklikler semikantitatif histopatolojik skorlama yöntemiyle 0= Yok, 1= Hafif, 2= Orta Şiddette, 3= Şiddetli olacak şekilde yapıldı.

Bulgular

Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik olarak beyinde; özellikle prefrontal korteks ve



Şekil 2. IL-12' nin gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. **(A)** Serebral korteks. Kontrol grubu, hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 100µm. **(B)** Subst nigra. 30. gün fareler, şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 100µm.

Şekil 2. The distributions of the immunopositive reactions for IL-12 to groups and brain sections. **(A)** Cerebral cortex. Control group, slight immunopositive reactions, Bar = 100µm. **(B)** Subst nigra. 30. day of mice, strong immunopositive reactions, Bar = 100µm. Avidin–Biotin Complex Indirect Peroxidase Test, AEC chromogen.

striatumda hafiften orta şiddete değişen, çekirdeğini kaybetmiş dejenerere ve nekrotik nöronlar, satellitozis ve gliozise rastlandı (Şekil 1A). Yine hafif bir non-purulent meningit tablosu ve orta beyin bölgesinin tamamında vaskülitisle karşılaşıldı. Vakaların hiç birinde doku kisti gözlenmedi (Tablo 1).

Karaciğerde ise multifokal sentrilobuler nekroz odakları ile hepatositlerde vakuolasyon, dejenerasyon ve nekrozla karşılaşıldı. Sinuzoidal boşluklarda Kupffer hücreleri ve mononükleer hücrelerde proliferasyon gözlendi (Şekil 1B)(Tablo 2). Kontrol grubu farelerin karaciğer beyinlerinde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı.

İmmunoperoksidaz Test Bulguları

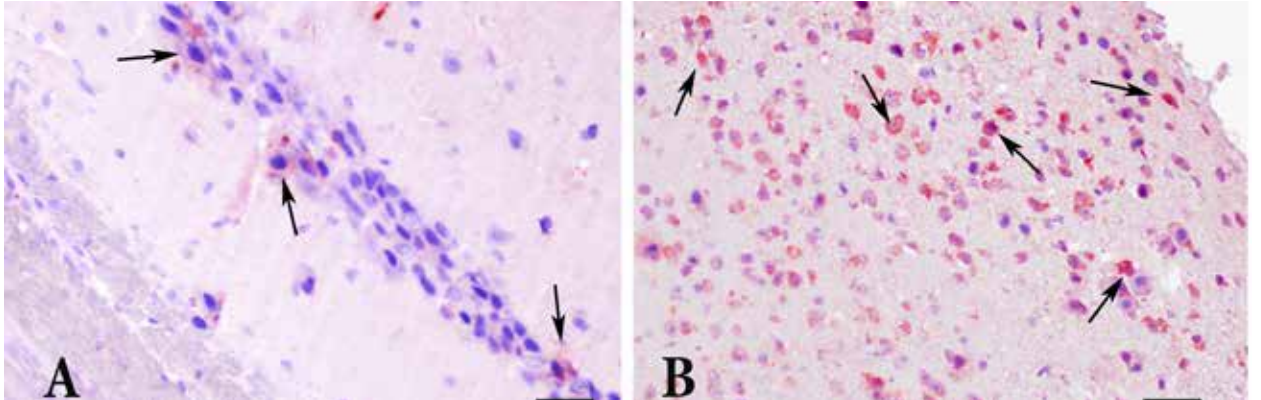
Yapılan testlerde kontrol grubunda, *T.gondii* antijenine karşı hiçbir immunoreaksiyon gözlenmezken, araştırma grubunda özellikle serebral kortekste, hippocampusta, amigdalar bölgede (Şekil 1C), striatumda (Şekil 1D) ve substantia nigrada (Şekil 1E) ortadan şiddetliye değişen immunopozitifliklere rastlandı (Tablo 3). Ayrıca, enfekte hücrelerin olduğu bölgelerde gliozis ve mononükleer hücre infiltrasyonları da dikkat çeken bulgular

arasında yer aldı.

Tartışma

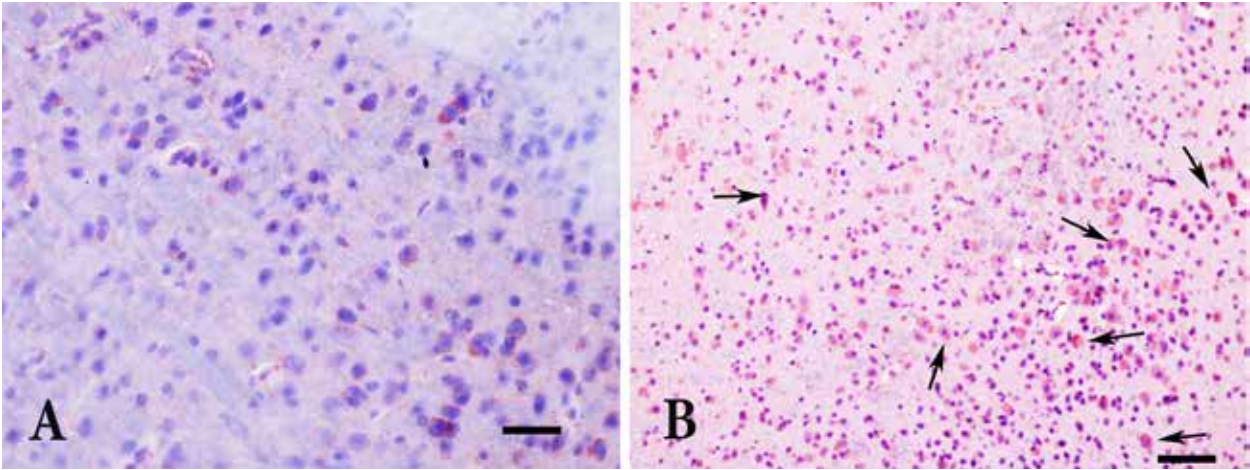
Toxoplasma gondii'nin keşfedildiği günden bu zamana kadar konak-parazit ilişkisini, konağın etkene karşı oluşturduğu immün yanıt mekanizmasını araştıran birçok çalışma yapılmıştır (Dupont ve ark., 2012). Ancak hala aydınlatılması gereken noktalar bulunmaktadır. Bu nedenle de, bu çalışmayla beyin ve karaciğerde *T. gondii* enfekte alanlarla, yine bu bölgelerde eksprese olan pro-enflamatuvar sitokinler IL12, TNF- α ve IFN- γ 'nin varlıkları ekspresyon oranları semikantitatif olarak değerlendirildi. Ayrıca, kontrol grubu ile erken kronik toksoplazmik ensefalit grubunun histopatolojik bir karşılaştırması yapıldı.

Sitokinler, immün yanıtta işlevlerine göre pro-enflamatuvar (Th1 tip, uyarıcı) ve anti-enflamatuvar (Th2 tip, engelleyici) olarak sınıflandırılırlar (Mosmann ve ark 1986). Th1 tip hücreler, yüksek oranda IL-12, TNF- α ve INF- γ salgılayarak, özellikle hücre içi patojenlere karşı gelişen hücre-aracılı immün yanıtı uyarırlar (Opal ve De Palo 2000).Yapılan çalışmalar; parazitin konağı enfekte etmesinin IL-12 üretimini uyardığını, IL-12 salı-



Şekil 3. IFN- γ 'nin gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. **(A)** Hippocampus. Kontrol grubu, hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 100µm. **(B)** Serebral korteks. 30. gün fareler, şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 200µm.

Şekil 3. The distributions of the immunopositive reactions for IFN- γ to groups and brain sections. **(A)** Hippocampus. Control group, slight immunopositive reactions, Avidin–Biotin Complex Indirect Peroxidase Test, AEC chromogen, Bar = 100µm. **(B)** Cerebral cortex. 30. Day of mice, strong immunopositive reactions, Avidin–Biotin Complex Indirect Peroxidase Test, AEC chromogene, Bar = 200µm.



Şekil 4. TNF- α 'nın gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Talamus. Kontrol grubu, hafif immunopozitif reaksiyon, Bar = 100 μ m. (B) Serebral korteks. 30. gün fareler, şiddetli immunopozitif reaksiyon. Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen, Bar = 200 μ m.

Şekil 4. The distributions of the immunopositive reactions for TNF- α to groups and brain sections. (A) Thalamus. Control group, slight immunopositive reactions, Bar = 100 μ m. (B) Cerebral cortex. 30. day of mice, strong immunopositive reactions, Avidin–Biotin Complex Indirect Peroxidase Test, AEC chromogene, Bar = 200 μ m.

nının artmasının da, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık elemanları olan doğal öldürücü hücreler (NK) ve T lenfositlerinden IFN- γ ve TNF- α üretimini tetiklediğini göstermiştir (Gazinelli ve ark 1994, Hunter ve ark 1994, Gaddi ve Yap, 2007). Yapılan bu çalışmayla da, beyin serebral korteks, amigdala, hipokampus, striatum, ventral tegmental alan ve substantia nigra bölümlerinin parazit tarafından yerleşim yeri olarak seçildiği gözlenmiş, yine bu bölgelerde IL-12, TNF- α ve INF- γ sitokin düzeylerinin beyin diğer bölümlerine ve kontrol grubuna göre daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Böylece *T. gondii* ve pro-enflamatuar sitokinler olan IL-12, TNF- α ve INF- γ arasında pozitif korelasyon gösterilmiştir.

Toxoplasma gondii'nin tip II suşu olan ME49'la enfekte edilerek kronik latent toksoplazmoz oluşturulmuş BALB/c farelerin beyinlerinde, histopatolojik olarak; fokal gliosis odakları, perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları ve non-supuratif bir meningeit dikkati çeker (Hermesve ark 2008; Atmaca ve ark.,2014). Sunulan bu çalışmada, toksoplazmoza dayanıklı BALB/c fareler ile oluşturulan latent toksoplazmozdan farklı olarak, daha duyarlı tür olan C57BL/6 fareler ile yine kronik ancak öldürücü olmayan derecede bir ensefalit tablosu oluşturulmuştur. Buna göre histopatolojik olarak; gliosis odakları, nöron dejenerasyon ve nekrozları, satellitöz ve fokal mononükleer hücre birikimine karşın doku kisti varlığına rastlanmamıştır. Bunun nedeni olarak, enfeksiyonun 30 ncu gününde parazitin henüz kan beyin bariyerini geçmesi ve MSS dokularında konak immün sistemiyle ilk karşılaştıkları dönem olarak değerlendirilebilir. Bunların yanı sıra bu lezyonların bulunduğu yerlerde *T. gondii* immunoreaktivitelerine de rastlanmıştır.

Deneysel modellerde *T. gondii*'nin beyne ilk ulaşabildiği dönem 15-20'nci günler olarak değerlendirilmekle birlikte, etkenin kan beyin bariyerine verdiği hasarla birlikte ilk konak immün yanıtı beyin dokusunda başlatılmaktadır. İleride meydana gelecek ensefalit tablosu ve enfeksiyonun şiddetini ise; MSS lokal immün yanıtı ve etkenin miktar ve patojenitesi arasında denge belirler (Parlog ve ark.,2015). Sunulan çalışmada, deneysel olarak enfekte edilen farelerin beyinlerinde 30 ncu günde *T. gondii* spesifik antijenler tespit edilmiş ve kan beyin bariyerini geçerek nöron ve nöroglial hücreleri enfekte ettikleri gösterilmiştir. Bu aşamada, enfekte MSS hücrelerinden salınan Th1 bağışıklık yanıtının değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Çünkü, MSS doku-

ları ve beyin omurilik sıvısında bulunan sitokinler, kan beyin bariyeri nedeniyle, yalnız de novo şekillenirler ve sistemik sitokin seviyesinden bağımsız olarak enfeksiyonun şiddetini ve patogenezini belirlerler. Bu çalışma kapsamında her ne kadar, *T. gondii* enfekte hücrelerden salınan Th1 yanıtı eşzamanlı olarak gösterilmediyse de, histopatolojik olarak lezyonların bulunduğu alanlarda sitokin ekspresyonlarının da daha yüksek oranda şekillendiği gösterilmiştir. Bu durum, deneysel olarak enfekte edilen farelerde, konak beyinlerinde oluşan erken Th1 yanıtının, aşırı parazit replikasyonunu önleyecek şekilde etki gösterdiği yönünde değerlendirilebilir. Yine de bu önerinin desteklenebilmesi için aynı anda hem *T. gondii* antijeni, hem de Th1 yanıtını oluşturan sitokinlerin ikili immün boyama teknikleri ile aynı hücre içerisinde gösterilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Sunulan çalışma sonuçları, beyinde *T. gondii* enfeksiyonunda şekillenen sitokin yanıtının inceleneceği oldukça kapsamlı bir doktora tez çalışmasının ön bulguları niteliğindedir. İleriki çalışmalarda, *T. gondii* ve diğer sitokin ekspresyonlarının immunofloresan teknik ile ikili boyamalarının yapılması planlanmaktadır.

TNF- α , aktive makrofajlarda *T. gondii*'nin parazitofor vakuollerinin lizozomal füzyonunu ve degradasyonunu sağlayarak, parazitin hücre içi gelişimini inhibe eder (Sibley ve ark., 1991; Andrade ve ark., 2006). IFN- γ , *T. gondii*'yi öldürmek ya da çoğalmasını engellemek için çoklu hücre içi mekanizmaları uyarır (Gazzinelli ve ark., 1994). Direkt antimikrobiyal mekanizmaları uyarmasını yanı sıra, antijen sunan hücreleri de antijenleri sunmak üzere uyararak doğal bağışıklık ile kazanılmış bağışıklık arasında bir köprü kurar (Kawai ve Akira; 2006). Ancak yapılan bu çalışma göstermiştir ki, *Toxoplasma gondii* enfekte hücrelerin bulunduğu yerlerde sitokinsel yanıt artıyorsa da, histopatolojik bulgular şekillenmeye devam etmiştir. Bu bağlamda, etkenin dozu düşük olduğundan sitokinler tek başlarına kronik toksoplazmoz oluşmadan, enfeksiyonun önüne geçememektedirler. Bu sonuçlar, üç önemli pro-enflamatuar sitokinin kronik ensefalitik toksoplazmozun *T. gondii*'yle korelasyon oluşturduğunu gösterse de, konak-parazit ilişkisini açıklığa kavuşturmak için daha detaylı bir sitokinsel mekanizma incelenmeli ve bağışıklığın diğer elemanlarıyla da birlikte değerlendirilmelidir.

Bilgilendirme: Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No:2016/ 040 ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, STRIEPEN B, Subauste CS (2006). CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest*, 116, 2366–2377.
- Araujo FG, Slifer T (2003). Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice. *Infect. Immun*, 71, 4171–4174.
- Atmaca HT, Kul O, Karakus E, Terzi OS, Canpolat S, Anteplioglu T (2014). Astrocytes, microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroscience*, 269, 184–191.
- Barr BC, Anderson ML, Blanchard PC, Daft BM, Kinde H, Conrad PA (1990). Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Veterinary Pathology*, 27, 354–361.
- Chardes T, Buzoni-Gatel D, Lepage A, Bernard F, Bout D (1994). *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8⁺/Thy-1⁺ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. *J Immunol*, 153, 4596–603.
- Denkers EY, Gazzinelli RT (1998). Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*, 11, 569–588.
- Dubey JP (1997). Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology*, 115, 15–20.
- Dubey JP (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 28, 1019–1024.
- Dubey JP (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2nd ed, CRC Press Taylor & Francis Group, Beltsville, Maryland, USA, p: 1-29.
- Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, Vianna MC, Kwok OC, Shen SK, Thulliez P, Lehmann T. (2004). *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol*, 90, 721–726.
- Dupont CD, Christian DA, Hunter CA (2012). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol*, 34, 793–813.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 167, 893–896.
- Gaddi PJ AND Yap GS (2007) Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol Cell Biol*, 85, 155-159.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 153, 2533–2543.
- Hermes G, Ajoka JW, Kelly KA, Mui E, Roberts F, Kasza K, Mayr T, Kirisits MJ, Wollmann R, Ferguson DJ, Roberts CW, Hwang JH, Trendler T, Kennan RP, Suzuki Y, Reardon C, Hickey WF, Chen L, McLeod R (2008). Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection. *J Neuroinflammation*, 5, 48..
- Hunter CA, Roberts CW, Murray M, Alexander J (1992). Detection of cytokine mRNA in the brains of mice with toxoplasmic encephalitis. *Parasite Immunol*, 14, 405–413.
- Hunter CA, Subauste CS, Van Cleave VH, Remington JS (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*, 62, 2818–2824.
- Jacobs L, Moyle GG, RIS RR (1963). The prevalence of toxoplasmosis in New Zealand sheep and cattle. *Am. J. Vet. Res*, 24, 673–675.
- Jones JL, Hanson DL, Chu SY, Ciesielski CA, Kaplan JE, Ward JW, Navin TR (1996). Toxoplasmic encephalitis in HIV-infected persons: Risk factors and trends. *AIDS*, 10, 1393–1399.
- Kawai T, Akira S (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13, 816–825.
- Kocak OM, Atmaca HT, Terzi OS, Buyukkayaer S, Ozdemir H, Uzunalioğlu T, Dincel GC, Bal E, Kul O (2012). Experimental Chronic Toxoplasmosis Model in Mice: Brain Lesions and Related Behavioral Changes, *Archives of Neuropsychiatry*, 49, 139-144.
- Lieberman LA, Hunter CA (2002). The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Int Rev Immunol*, 21, 373–403.
- Lindsay DS, Dubey JP (2014). Toxoplasmosis in wild and domestic animals In: *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan*. Ed. LM WEISS, K KIM, 2nd ed, Elsevier, Amsterdam. The Netherlands, p: 194-209.
- Luder CG, Lang C, Giraldo-Velasquez M, Algner M, Gerdes J, Grosz U (2003). *Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. *J Neuroimmunol*, 134, 12–24.
- Montoya JG, Liesenfeld O (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, 363, 1965-1976.
- Mordue DG, Sibley LD (2003). A novel population of Gr-1+ activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J Leukoc Biol*, 74, 1015-1025.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol*, 136, 2348–2357.
- Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ (1998). *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol*, 160, 1824–30.
- Opal SV, Depalo VA (2000). Anti-Inflammatory Cytokines. *CHEST* 117, 1162–1172.
- Parlog A, Schluter D, Dunay IR (2015). *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. *Parasite Immunol*, 37, 159–170.
- Schade B, Fischer HG (2001). *Toxoplasma gondii* induction of interleukin-12 is associated with acute virulence in mice and depends on the host genotype. *Vet. Parasitol*, 100, 63–74.
- Sibley LD, Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL (1991). Tumor necrosis factor- α triggers antitoxoplasmal activity of IFN- γ primed macrophages. *J Immunol*, 147, 2340–2345.
- Sukthana Y (2006). Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends Parasitol*, 22, 137–42.
- Suzuki Y (2002). Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J Infect Dis*, 186, 234–240.
- Wilson EH, Hunter C (2004). The role of astrocytes in the immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *Int J Parasitol*, 34, 543–548.