

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARELERDE KRONİK ENSEFALİTİK *Toxoplasma gondii*
ENFEKSİYONUNDA, KONAK-PARAZİT İLİŞKİSİ VE KONAK İMMUN
YANITININ FONKSİYONEL NÖROPATOLOJİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Tuğçe SÜMER

Veteriner Hekim

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

(DOKTORA)

DANIŞMAN

Prof. Dr. Oğuz KUL


**Bu tezin bir kısmı, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi,
Proje No:2016/ 040 ile desteklenmiştir.**


2018 – KIRIKKALE


Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

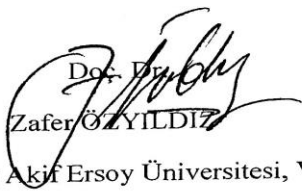
Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 13 / 07 /2018


Prof. Dr. Oğuz KUL
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Meral AYDENİZÖZ
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Üye

Prof. Dr.
Orhan Murat KOÇAK
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye


Prof. Dr.
Zafer ÖZYILDIZ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye


Dr. Öğr. Üyesi
Güngör Çağdaş DİNÇEL
Aksaray Üniversitesi Eski MYO
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	V
Simgeler ve kısaltmalar	VI
Şekiller	VII
Çizelgeler	IX
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ	3
1.1. Tarihçe ve Taksonomi	3
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> ' nin Biyolojisi	3
1.2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> ' nin Yaşam Döngüsü	4
1.2.2. <i>Toxoplasma gondii</i> Suşları ve Virulens Faktörleri	7
1.2.3. Ara Konaklarda Toksoplazmoz Patogenezi	8
1.3. <i>Toxoplasma gondii</i> ve Konak İmmun Sistemi	10
1.3.1. Merkezi Sinir Sistemi ve Sitokinler	11
1.3.1.1. Kronik Ensafalitik Toksoplazmozda Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık Hücreleri ve Sitokin Yanıtı	13
1.3.2. <i>Toxoplasma gondii</i> Enfeksiyonunda Doğal Bağışıklık	17
1.3.3. <i>Toxoplasma gondii</i> Enfeksiyonunda Kazanılmış Bağışıklık	18
1.4. Toksoplazmozda Fare Modelleri	20
1.5. <i>Toxoplasma gondii</i> ve Psikiyatrik Hastalıklar	21
1.5.1. <i>Toxoplasma gondii</i> ile Konak Nöronal Fonksiyonlarını Etkileşimi	22
1.5.1.1. Direkt Etki	22
1.5.1.2. Dolaylı Etki	23
2. GEREÇ ve YÖNTEM	25
2.1. Etik Beyanı	25
2.2. Deney Hayvanları	25
2.3. <i>Toxoplasma gondii</i> ME49 Suşu	25
2.4. <i>Toxoplasma gondii</i> Takizoitlerine GFP Transfeksiyonu	26
2.4.1. GFP İşaretli <i>Escherichia coli</i>	26
2.4.2. Plasmid İzolasyonu	26
2.4.3. GFP Tranfeksiyonu	27
2.5. <i>Toxoplasma gondii</i> Enfeksiyonu ve Deney Düzeni	27
2.6. Patolojik İncelemeler	29
2.7. İmmunoperoksidaz ve İmmunofloresan Testler	29
2.7.1. Antikorlar	29
2.7.2. İmmunoperoksidaz Test	30
2.7.3. İmmunofloresan Test	31
2.8. <i>Toxoplasma gondii</i> Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu	32
2.9. Beyin Dokularında Sitokin Ekspresyonlarının Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time- PCR) ile İncelenmesi	33
2.9.1. Beyin Dokusundan RNA İzolasyonu ve DNase Uygulaması	33
2.9.2. RNA' dan komplementer DNA (cDNA) eldesi	34
2.9.3. Kantitatif Real Time- PCR Analizi	35
2.10. Histolojik Skorlama ve İstatistik	37

3. BULGULAR	38
3.1. <i>Toxoplasma gondii</i> Takizoitlerinin Hücre Kültüründe Çoğaltılması	38
3.2. Histopatolojik Bulgular	40
3.3. İmmunoperoksidaz Bulgular	44
3.3.1. <i>Toxoplasma gondii</i> Takizoitlerinin İmmunoperoksidaz Test ile Saptanması	44
3.3.2. Merkezi Sinir Sistemindeki Bağışıklık Hücrelerinin İmmunoperoksidaz Test ile Gösterimi	46
3.3.3. Merkezi Sinir Sistemindeki Sitokinlerin İmmunoperoksidaz Test ile Gösterimi	54
3.4. İmmunofloresan Bulgular	67
3.5. <i>Toxoplasma gondii</i> Spesifik PCR	69
3.6. RNA İzolasyon	70
3.7. Sitokin Ekspresyonlarının Gerçek Kantitatif Real Time- PCR Analizi	71
3.8. İstatistiksel Analizler	72
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	74
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	106

ÖNSÖZ

Teşekkürlerin ilk ve en büyüğünü; beni bir bilim insanı olma yönünde eğiten, ileri görüşleriyle yönlendiren, umutsuzluğa kapıldığım her durumda cesaretlendiren, geleceğimin çiziminde büyük emeği olan, bir baba gibi sevgisini ve aynı oranda otoritesini hissettiren, danışmanım Prof. Dr. Oğuz KUL'a ediyorum.

Benim tezimi kendi tezi gibi görüp, o özveriyle mesai saatleri içinde ve dışında benimle birlikte çalışan, bana destek olan, kardeşim gibi sevdiğim Arş. Gör. Merve Bişkin TÜRKMEN'e,

Tezimin hem yazım hem de yapım aşaması sırasında bilgi, tecrübelerini güler yüzleriyle beraber benimle paylaşan, yardımlarını esirgemeyen ve bilfiil katkı sağlayan Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL ve Dr. Öğr. Üyesi Nüket BİLGİN'e,

Hem entelektüel hem de bilimsel anlamda beni geliştiren, bana öğreten, tezim konusunda bilgilerine ve yardımlarına sıklıkla başvurduğum tez komite üyem Prof. Dr. Orhan Murat KOÇAK'a ve yine her konuda desteğini gördüğüm tez komite üyem Prof. Dr. Meral AYDENİZÖZ'e,

Hücre kültürü ve deney hayvanları kontrolleri için neredeyse her bayram ve çoğu hafta sonu benimle laboratuvara gelen, benimle mesai yapan, bana sabır gösteren, yardım eden, yanımda olmasının beni güçlü kıldığı, bana sevgi ve ilham veren, hayat arkadaşım Vet. Hek. Sayıl Yaşam SÜMER'e

Beni bugünlere getiren, koyduğum hedeflere ulaşmam için maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, benimle duydukları gururu bana hissettiren annem Gönül ANTEPLİOĞLU ve babam Mehmet Ümit ANTEPLİOĞLU'na,

Daha karnımda benimle birlikte tüm tez stresini yaşayan, yorulan, uykusuz kalan ve bunlar için umuyorum ki onu çok seven annesini affedecek olan oğlum Metin SÜMER'e,

Bir telefonumla işini bırakıp İzmir yollarına düşen, istediğim mateyalleri elime ulaştıran, destekleyen, yardımcı olan abim Vet. Hek. Anıl Murat SÜMER'e,

Ve bu tezin olmazsa olmazları C57BL/ 6 farelerime,

Teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma ve Simge : Açıklama

AEC	: Aminoethyl carbasole
CO ²	: Karbondioksit
Cq	: Quantitation cycle
DMEM	: Modifiye Eagle Medium (EMEM'e Dulbecco modifikasyonu)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
GFP	: Green Fuorescent Protein
HE	: Hematoksilen ve Eozin
IFN	: Interferon
IL	: Inteleukin
RNA	: Ribonükleik asit
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Subs nigra	: Substantia nigra
<i>T. gondii</i>	: <i>Toxoplasma gondii</i>
TNF	: Tumor Necrosis Factor
VTA	: Ventral tegmental alan
α	: Alpha
β	: Beta
γ	: Gamma
μ l	: Mikrolitre
°C	: Santigrat derece

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. *Toxoplasma gondii*'nin yaşam döngüsü, son konak ve ara konak bulaşma yolları.

Şekil 1.2. *T. gondii*'ye karşı şekillenen immün yanıt.

Şekil 2.1. Doku takibi ve RNA izolasyonu için koronal kesit alınan bölge

Şekil 2.2. İmmunohistoperoksidaz ve immunofloresan testlerde incelenecek hedef bölgeler.

Şekil 3.1. Vero hücreleri ve *Toxoplasma gondii* ME 49 takizoitleri.

Şekil 3.2. ME 49 takizoitlerindeki pozitif GFP ışıdamaları.

Şekil 3.3. Grup I, II ve III' teki nörohistopatolojik değişiklikler.

Şekil 3.5. CD4+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi.

Şekil 3.6. CD8+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi.

Şekil 3.7. FOXP3+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi.

Şekil 3.8. CD11b+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi.

Şekil 3.9. CD11c+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi.

Şekil 3.10. GFAP+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi.

Şekil 3.11. CD19+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi.

Şekil 3.12. TNF- α 'nın gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları.

Şekil 3.13. IFN- γ 'nın gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları.

Şekil 3.14. IL-1 β 'nın gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları.

Şekil 3.15. IL-4'ün gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları.

Şekil 3.16. IL-5' in gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları.

Şekil 3.17. IL-6' nın gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları.

Şekil 3.18. IL-10' un gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları.

Şekil 3.19. IL-12' nin gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları.

Şekil 3.20. IL-18' in gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları.

Şekil 3.21. *Toxoplasma gondii* spesifik antijen varlığının gruplara göre dağılımı.

Şekil 3.22. MSS' deki bağışıklık hücrelerinin immunoreaktivitelerine göre gruplara dağılımı.

Şekil 3.23. Beyinde *T.gondii* enfeksiyonu sırasında eksprese edilen sitokinlerin immunoreaktivitelerine göre gruplara dağılımı.

Şekil 3.24. CD4+ T hücresi- IL-1 β kompozit görüntüsü.

Şekil 3.25. GfAP+ hücre- *T. gondii* takizoiti kompozit görüntüsü.

Şekil 3.26. GfAP+ hücre- *T. gondii* takizoiti kompozit görüntüsü.

Şekil 3.27. *T.gondii* B1 geninin gösterimi.

Şekil 3.28. Yükseltgenme Eğrileri.

Şekil 3.29. Yükseltgenme Eğrileri.

Şekil 3.30. IL10 ve TNF- α 30, 60 ve 180. gün ifade farklılıkları.

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Başlıca pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar sitokinler ile bunların kaynakları ve başlıca hedefleri (Tizard IR 2004).

Çizelge 2.1. Çalışma takvimi: deney gruplarının sonlandırıldığı süreler ve fare sayıları

Çizelge 2.2. Beyinde nöron, makrofaj, T ve B lenfosit alt tipleri için kullanılan immün işaretleyiciler

Çizelge 2.3. DNase uygulaması kullanılan kimyasal miktarları ve sıcaklık koşulları

Çizelge 2.4. cDNA sentez reaksiyonu kimyasal koşulları

Çizelge 2.5. Kantitatif Real time PCR sitokin primerleri ve referansları

Çizelge 2.6. Kantitatif PCR’da kullanılan kimyasal ve sıcaklık protokolü

Çizelge 3.1. Gruplara göre beyinde şekillenen nörohistopatolojik değişiklikler ve şiddetleri.

Çizelge 3.2. Çalışmada yer alan tüm sitokinler, hücre çeşitleri ve *T. gondii*’nin beyin bölgelerindeki varlıklarının gruplar arası karşılaştırmalı değerlendirilmesi.

Çizelge 3.3. Her bir fare için μ l’deki RNA miktarları ve saflık ölçütleri

Çizelge 3.4. Sitokin ekspresyonlarının gruplar arası farkları

ÖZET

Bu tez çalışmasında, kronik ensefalitik toksoplazmozun farklı dönemlerinde “*T. gondii*- etkilenen hücre tipi- sitokinsel yanıt” ın aynı anda değerlendirilmesi ve konak immun yanıtının nöropatolojik olarak araştırılması amaçlandı. Ensefalitik toksoplazmoz modeli oluşturmak için, 30 adet C57BL/ 6 fare ME49 takizoitleriyle intraperitoneal olarak enfekte edildi, 10 adet fare ise kontrol grubunu oluşturdu. Fareler sırasıyla; enfeksiyonun 30, 60 ve 180. günlerinde sakrifiye edildi ve beyin dokuları toplandı. Histopatolojik, immunohistokimyasal ve moleküler testlerle; beynin farklı bölgelerindeki *T. gondii* varlığı, konağın yangısal yanıtı (CD4+, CD8+, FOXP3+, CD11b+, CD11c+, CD19+, GFAP+ hücre popülasyonları ile IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL- 18, IL-4 ve IL-10 ekspresyonları) değerlendirildi.

Sonuç olarak; tüm gruplarda serebral korteks, amigdala, striatum ve ventral tegmental alanda *T. gondii* takizoitlerine, hem etkenin kendisinden hem de neden olduğu yangısal yanıtta etkilenen nöronlara, glial hücrelere ve astositlere rastlandı. Grup I’ in daha çok akut aşama bulgularını yansıttığı ve asıl kronik enfeksiyonun 60’ ıncı günden sonra şekillendiği görüldü. Pro-enflamatuar sitokinlerin enfeksiyonun erken döneminde özellikle CD4+ hücrelerden, anti-enflamatuar sitokinlerin ise enfeksiyonun geç döneminde özellikle CD8+ hücrelerden salındığı ve yine bunların *T. gondii* varlığının daha fazla olduğu beyin bölgeleri olduğu saptandı. İlginç olarak, enfeksiyonun kronik döneminde fazla eksprese edilmesi beklenen ve *T. gondii* enfeksiyonunu bu yönüyle psikiyatrik bozukluklarla ilişkilendiren IL-1 β ve IL-6, Grup III’ te diğer gruplara oranla daha düşük olduğu tespit edildi. Böylece bu çalışmayla; ensefalitik toksoplazmozda 30’ uncu, 60’ ıncı ve 180’ inci günlerde etkilenen bölgelerin haritası çıkarıldı ve buralarda eksprese olan sitokinler ile onları salgılayan ve onlardan etkilenen hücreler bir arada gösterilerek genel bir immunopatogenez tablosu oluşturulmuş oldu.

Anahtar Sözcükler: Ensefalitik toksoplazmoz, immunofloresan, immunoperoksiaz, sitokin, *Toxoplasma gondii*

SUMMARY

In this thesis, it is aimed to investigate “*T. gondii*- infected cell type- cytokine responses” interactions in the different stages of chronic encephalitic toxoplasmosis and host immun responses by functional neuropathology. To establish the encephalitic toxoplasmosis 30 C57BL/ 6 mice were infected intraperitoneally with ME49 tachyzoites and 10 mice splited up as controls. Groups of 10 mice were euthanized on days 30, 60, and 180 post-infection respectively and brain tissue samples were collected. *Toxoplasma gondii* in different areas on the brain and host inflammatory response (CD4+, CD8+, FOXP3+, CD11b+, CD11c+, CD19+, GFAP+ cell population and IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL- 18, IL-4 ve IL-10 expression) were evaluated by histopathologic, immunohistochemical and molecular tests.

As a result, *T. gondii* tachyzoites and neurons, glial cells and astrocytes affected by *T. gondii* itself and inflammatoy responses caused by *T. gondii* in cerebral cortex, amygdala, striatum and ventral tegmental area in all groups. There was obseved that Group I have showed that acute stage of infection more than chronic stage and chronic stage of encephalitic toxoplasmosis developed on day 60 post-infection. There were also found that pro-inflammatoy cytokines were released from CD4+ cells in early stage of infection and anti-inflammatuar cytokines released from CD8+ cells in the late chonic stage of infection. Interestingly, it was found that IL-1 β and IL-6, which are expected to overexpress in the chronic stage of infection and releated to psychiatric disease, were lower in Group III than in other two *T. gondii* infected groups. Thus with presented study, maps of the affected areas with inflammatory cells an cytokines were constructed on days 30, 60 and 180 post-infection.

Key Words: Encephalitic toxoplasmosis, cytokine, immunofluorescence, immunoperoxidase, *Toxoplasma gondi*

GİRİŞ

1.1.Tarihçe ve Taksonomi

Toxoplasma gondii; ilk defa *Leishmania* sp. üzerine araştırmalar yapan, Nicolle ve Manceaux tarafından 1908 yılında, *Ctenodactylus gundi* rodentinde, rastlantısal olarak keşfedilmiştir ve bu yeni parazit, *Leishmania gondii* olarak adlandırılmıştır (Nicolle ve Manceaux 1908). Aynı yıl, Splendore, tavşanlarda böbrek biçiminde görünen *T. gondii* etkenlerini tanımlamış ancak, herhangi bir isimlendirme yapmamıştır (Splendore 1908).

Toxoplasma gondii; aynı *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Eimeria* ve *Sarcocystis* gibi, apikal ucunda kompleks mikrotubl ve organellerin bulunduğu polarize hücre yapısına sahiptir (Dubey ve ark 1998; Black ve Boothroyd 2000). Bu yapısal özellikleri ile *Apicomplexa* şubesi (Levine 1970), *Sporozoasida* sınıfı ve *Coccidiasina* alt sınıfında yer almaktadır (Leukart 1879). Bu nedenle, Nicolle ve Manceaux 1909 yılında, paraziti keşiflerinden bir yıl sonra bu parazitin cinsini, Yunanca “yay” anlamındaki “toxon” sözcüğünden köken alan *Toxoplasma* olarak adlandırmışlar (Black ve Boothroyd 2000) ve izole edildiği kemirgenin ismine ithafen de *Toxoplasma gondii* olarak isimlendirmışlerdir (Tenter 2000).

1.2.*Toxoplasma gondii*' nin Biyolojisi

Koksidian parazitler hayvanların en önemli hastalık etkenleri arasındadır ve birbirlerine benzer yapıda olan ookist yapıları, tür düzeyinde identifikasyonda önemli rol oynamaktadır (Dubey 1993). *T. gondii*' nin yaşam döngüsünün keşfinden önce, koksidyan parazitler konak-spesifik olarak kabul edilirdi (Dubey 2010). Ancak, *T.*

gondii'nin konak-spesifik olmaması, tüm doku ve hücrelere girebilmesi ve tüm sıcakkanlı canlıları etkileyebilmesi nedeniyle, dünyadaki insan popülasyonun 1/3'ten fazlasının, hayatlarının bir döneminde tokosplazmozla karşılaştığı rapor edilmektedir (Montoya ve Liesenfeld 2004). Başta evcil kediler olmak üzere neredeyse tüm kedigiller parazitini son konağını oluştururken, insan dahil tüm sıcakkanlı canlılar da parazit için arakonak görevini üstlenmişlerdir (Şekil 1.1.) (Carruthers 2002, Dubey 2010).

1.2.1. *Toxoplasma gondii*' nin Yaşam Döngüsü

Toxoplasma gondii, dünya çapındaki tüm sıcakkanlı canlıları enfekte edebilme özelliği olan zorunlu hücre içi bir protozoondur (Lindsay ve Dubey 2014). Yaşam döngüsü temel olarak, kedigiller ailesinde şekillenen seksüel, memeli ve kanatlı hayvanlarda gerçekleşen aseksüel aşama olarak ikiye ayrılır (Frenkel ve ark 1970). Kediler, immunsupresyon, gebelik ve bazı viral enfeksiyonlarla eşzamanlı *T. gondii* enfeksiyonlarında ekstraintestinal organlarda klinik bulgularla karakterize hastalık formu da gösterebilirler ve aynı zamanda ara konak olarak kabul edilirler. *T. gondii*' nin takizoit, bradizoit ve ookist olmak üzere 3 enfeksiyöz formu vardır ve bu formlar yaşam döngüsüyle ilişkili olarak birbirleri arasında dönüşüm gösterirler (Dubey 2010). Genel olarak, ookist son konak kedigillerde, takizoit ve bradizoitler ise ara konaklarda şekillenen parazit gelişim formlarıdır. *T. gondii*' nin seksüel çoğalma aşaması; kedi bağırsak epitellerinde sırasıyla şizont, merozoit, makro ve mikrogametlerin oluşumu ve mikrogametlerin erişkin makrogameti fertilize etmesini takiben, kalın duvarlı ookistlerin oluşmasıyla gerçekleşir (Dubey ve Beattie 1988). Kediler günlük 2 ila 20 milyon ookisti dışkılarıyla dışarı atarlar ve bu ookistler çevre ve hava koşullarına bağlı olarak, 1-5 gün içerisinde sporulasyon geçirerek enfektif forma dönüşürler (Yılmaz ve Hopkins 1972).

Parazitin aseksüel çoğalma aşaması ise, arakonakta oluşan enfeksiyonun akut ya da kronik olmasına göre, takizoit ya da bradizoit formlarını kapsar (Dubey ve ark

1998). Akut enfeksiyon sırasında endodiyojeni ile hızlı bölünüp çoğalan takizoitler, adını Yunanca “hız” anlamına gelen “tachos” tan alır (Dubey ve ark 1998). Enfektif form olan takizoitler, immun sistemin artan Th1 yangısal yanıtı ile aşama dönüşümü geçirir ve bradizoitlere dönüşürler. Bradizoitler ise, adını Yunanca “yavaş” anlamına gelen “brady” den alırlar (Yap ve Sher 1999). Bradizoitler, sıklıkla kas ve merkezi sinir sistemi dokularında şekillenen doku kistleri içinde yer alırlar ve hem morfolojik hem de fonksiyonel olarak takizoitlerden belirgin derecede farklılıklar gösterirler (Dubey 1997; Montoya ve Liesenfeld 2004). Doku kistleri, doğal yolla enfekte olan kedi ve koyunlarda daha çok kas dokuda, deneysel enfekte farelerde ise MSS’nde yerleşim gösterirler (Jacobs ve ark 1963, Dubey ve ark 2004, Dubey 2010).

Bradizoitler, hücre içerisinde etraflarını çevreleyen kist duvarı sayesinde konak immun yanıtından kaçarak, konağın hayatı boyunca persiste olarak kalabilirler (Frankel 1988). Bununla birlikte, CD4⁺ T lenfosit sayısı mikrolitrede 50 hücrenin altına düştüğü immunsupresif durumlarda, parazit doku kisti duvarı yıkılarak bradizoitler, takizoitlere dönüşürler ve akut enfeksiyon formuna neden olurlar (Jones ve ark 1996, Sukthana 2006).

Son konak olan kediler, dışkılarıyla çevreye ookist saçarlar ve bu ookistler, çevre ve hava koşullarına göre 1-5 gün içerisinde sporulasyon aşaması geçirerek, arakonaklar için enfektif hale gelirler (Lindsay ve ark 1997). Hem arakonak hem de son konak olan kediler bu sporlanmış ookistlerin direkt olarak alınmasıyla enfekte olabilirler (Dubey 1998).

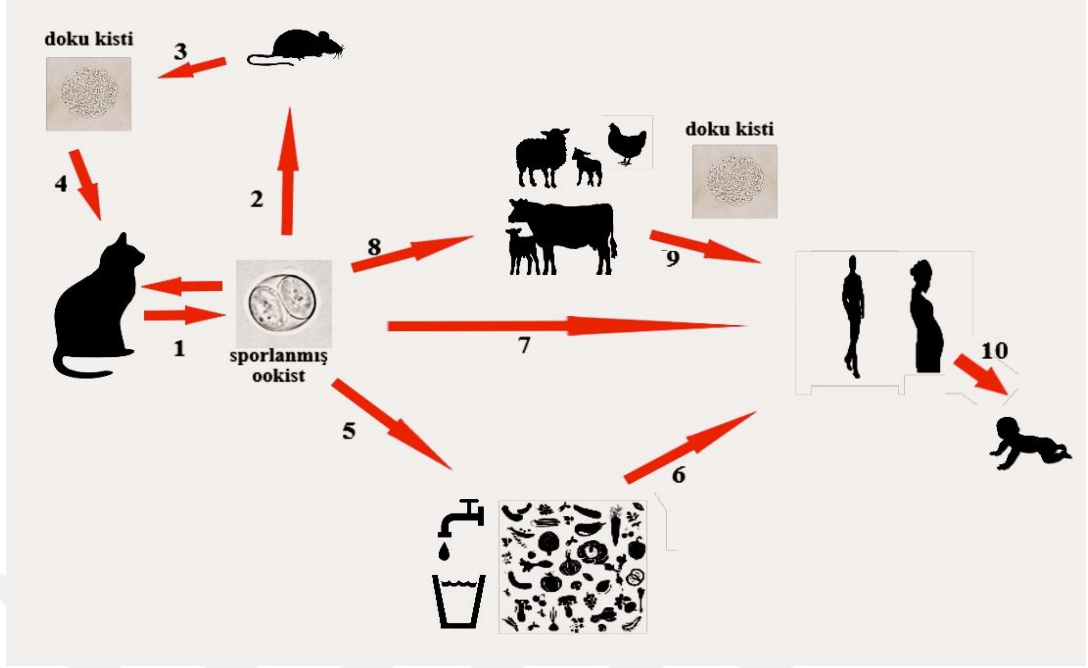
Parazitin doğal arakonağı olan kemirgenler, sporlanmış ookistle kontamine materyalleri, sindirim yoluyla almalarıyla birlikte enfekte olurlar ve bu enfeksiyonun ardından parazit daha diğer organlara ulaşmadan, farelerde ölüm görülebilir (Dubey ve ark 1997). Akut enfeksiyon sonrası yaşama şansı bulan kemirgenlerde sporozoitler, ookistin alınmasından 12- 18 saat sonrasında Lamina propria, 48- 72 saat içerisinde de enterositlerde takizoitlere dönüşmeye başlarlar (Dubey ve ark 1997). Ardından, konağın immun sisteminin de devreye girmesiyle birlikte, özellikle kas ve nöral dokularda bulunan takizoitler, parazitin konak immun sisteminden kaçabilen ve daha korunaklı formu olan doku kisti içerisinde bradizoitlere dönüşürler

(Dubey ve Frenkel 1976). Kediler de, bu doku kistlerine sahip kemirgenleri avlayarak enfekte olurlar. Yapılan çalışmalar, parazitin kendi lehine olacak biçimde, kemirgenlerde kedilere karşı korku duyusunun azaldığını, kedi kokusundan kaçmadıklarını ve böylece kedilere yem olarak üreme döngüsünü rahatça devam ettirdiğini ortaya koymuştur (Webster 2001).

Sporlanmış ookistlerin; su kaynakları, sebze ve meyveleri kontamine ettiği durumlarda bunları tüketen insanlarda da toksoplazmoz gelişebilmektedir (Smith 1991). Aynı zamanda, rastlantısal konak olan insanlar; evde baktıkları kedilerin kumlarını değiştirirken ya da ookist kontamine topraktan ookistlere direkt olarak maruz kalarak da enfekte olabilirler (Cook ve ark, 2000, Tenter 2000).

Koyun, sığır, tavuk gibi insan tüketimine sunulan arakonakların tamamı kontamine çevreden ookistleri alarak enfekte olurlar ve aynı kemirgenlerde olduğu gibi dokularında doku kistleri oluşur. Bu hayvanların etlerinin az pişmiş ya da pişmemiş olarak yenilmesiyle beraber, insanlarda hastalık gelişebilir (Hill ve ark 2007, Dubey ve Jones 2008). Her ne kadar *T. gondii*' ye esas maruziyet, az pişmiş ya da çiğ etlerle alınan bradizoitler olarak düşünülse de, yapılan çalışmalar primer enfeksiyon kaynağının yiyecek ve suyu kontamine eden ookistler olduğunu göstermiştir (Munoz-Zanzi ve ark 2010). Ayrıca, persiste enfekte koyunların %4 kadarının yavrularına *T. gondii*' yi transplasental olarak aktardıkları düşünülmektedir (Buxton ve ark 2006).

Gebelikte ortaya çıkan akut enfeksiyon, anneden yavruya transplasental olarak aktarılmaktadır (Tenter 2000). Bunların dışında; parazitemi durumundaki kan ve organ nakilleri ile de horizontal bulaşma gerçekleşebilir (Weiss ve Dubey 2009). Bu horizontal ve vertikal bulaşma yolları Şekil 1.1.' de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. *Toxoplasma gondii*' nin yaşam döngüsü, son konak ve ara konak bulaşma yolları.

1.2.1. *Toxoplasma gondii* Suşları ve Virulens Faktörleri

Toxoplasma gondii'nin Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'da tanımlanmış temel olarak 3 farklı suşu tanımlanmıştır ve suşları arasında %1 den az genetik farklılık bulunmaktadır (Grigg ve ark 2001, Howe ve Sibley 1995, Su ve ark 2003). Suşlar; virulens ve konakta meydana getirdikleri patojenitelerine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır (Araujo ve Slifer 2003, Haque ve ark 1999):

- **Tip I;** farelerde yüksek virulent tip (RH ve GT-1),
- **Tip II;** Avrupa ve Kuzey Amerikada'daki insanlarda en çok görülen avirulent tip (ME49 ve onun türevleri olan PTG, PLK ve PDS),
- **Tip III;** daha çok hayvanlarda görülen avirulent tip (CEP ve VEG), olarak ortaya konmuştur.

Tip I izolatları ya da rekombinant Tip I ve Tip III daha çok akut klinik toksoplazmozdan sorumludur (Khan ve ark 2006) ve genellikle kist oluşturmaksızın

ölümcül bir enfeksiyon tablosu şekillendirirler (Blanchard ve ark 2015). Tip II izolatların ise hem akut hem de kronik çalışmalar için kullanılabilceği gösterilmiştir. Ancak kistojenik olması dolayısıyla genellikle toksoplazmik ensefalit oluşum mekanizmalarının araştırılması ve re-aktivasyon çalışmalarında kullanılmaktadır (Saeij ve ark 2005, Blanchard ve ark 2015). Yapılan çalışmalar Tip II izolatların, IL-12 ve INF- γ ' yı Tip I'e göre daha fazla tetiklediğini göstermiştir (Mordue ve Sibley 2003, Schade ve Fischer 2001).

Tip I, II ve III suşları; vücudun doğal bariyerlerinden geçiş yapabilme kabiliyetlerine göre de farklılık gösterirler. Tip I suşları daha yüksek migrasyon yeteneğine sahipken, Tip II suşlarının migrasyon frekansları ve dendritik hücrelere tutunma oranı daha yüksektir, böylece kan beyin bariyerini Tip I suşlara göre daha rahat aşarak MSS'ne ulaşırlar (Lambert ve ark 2009).

Bu 3 suşun yanı sıra, özellikle Orta ve Güney Amerika' da ve Afrika' da görülen, farklı alellere sahip olan, atipik ya da yeni suş olarak adlandırılan bir suş (Tip X) daha ortaya konulmuştur (Pena ve ark 2008, Su ve ark 2012). Bu atipik suşla birlikte farklı klinik semptomlar dikkati çekmiştir. Örneğin; toksoplazmoz immun sistemi kuvvetli bireylerde genelde asemptomatik ilerlerken, atipik suşların sağlıklı bireylerde ateş, baş ağrısı, kusma gibi semptomlara neden olabildiği görülmüştür (De Moura ve ark 2006, Vaudaux ve ark 2010, Pomares ve ark 2011).

1.2.1. Ara Konaklarda Toksoplazmoz Patogenezi

Toxoplasma gondii enfeksiyonunda hastalığın seyri; vücuda giren etken sayısı, deney hayvanı türü, inokulasyon yolu, cinsiyet, genetik alt yapı, protozoonun gelişim aşaması ve virulensi gibi birçok faktöre bağlıdır (Roberts ve ark 1995, Su ve ark 2002, Schreiner ve Liesenfeld 2009, Dunay ve Sibley 2010).

Etken, oral yolla alınmasını takiben bağırsaklara ulaşır ve oradaki epitel hücreleri ile goblet hücrelerini enfekte eder (Barragan ve Sibley 2002). Hücre sitoplazmasında

çoğalan takizoitlerin konak hücrelerini rupture etmesi ya da konak hücreesindeki dejeneratif değişiklere bağılı olarak, *T. gondii* takizoitleri serbest hale gelerek kan ve/veya lenf damarlarına ulaşırlar (Moudy ve ark 2001, Lavine ve Arrizabalaga 2008). İnce bağırsak enterosit invazyonunun ardından, Lamina propriya ve mezenterik lenf yumrularında kolonize olan takizoitler, antijen sunan hücreleri enfekte ederler (Liesenfeld 1999). *T. gondii*, beyinde 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 taşınabilmek için de, mekanizması tam olarak bilinmeyen bir biçimde altı farklı apoptoz yolağını engeller. Böylece antijen sunan hücreleri tıpkı bir “Truva atı” gibi kullanarak konak immun sisteminden saklanırlar (Nash ve ark 1998). 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 nci gününde MSS’ ne ulaşan takizoitler, başta mikroglia 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; interleukin- 12 (IL-12), İnterferon- γ (IFN- γ) ve Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)’yı kapsayan ve takizoitlerin üremesini sınırlandıran, lokal Th-1 yanıtı indüklenir (Chardes ve ark 1994).

İmmun sistemin baskısıyla, takizoitler buldukları birçok dokuda, özellikle de kas ve beyinde (nöronlarda) aşama dönüşümü geçirerek, asemptomatik kronik aşama olan içi bradizoit dolu, doku kistlerine dönüşürler (Lyons ve ark 2002, Melzer ve ark 2010). İnsanlarda, *T. gondii*’ nin çoklu organ tutulumu olmasına karşın, belirgin klinik semptomlar genellikle gözde korioretinit ve beyinde ise özellikle kemoterapi ya da HIV enfeksiyonu sonrası immun sistemi baskılanmış bireylerde ensefalit şeklindedir (Berdoy ve ark 2000, Randall ve Hunter 2011).

Enfekte dendritik hücre ve makrofajlar, *T. gondii* takizoitlerini beyne taşırlar ve ilk başta buradaki mikroglia, astrosit ve nöronları enfekte ederek akut toksoplazmik ensefalite neden olurlar. Ardından da aşama dönüşümü geçirerek

bradizoitlere dönüşen takizoitler, nöronlarda persiste kalarak kronik toksoplazmik ensefaliti oluştururlar (Ferguson ve ark 1994). Latent aşamada, yavaş çoğalan bradizoitler konak immun sisteminden kaçarak, yaşam boyu nöronların içinde kalabilirler. Kaldıkları süre boyunca nöronların apoptozunu engelleyerek, tirozin hidroksilaz salınımını arttırarak, sitokinsel yanıtı uyararak, nöronal fonksiyonları etkiler ve böylece, davranış değişikliklerine neden olurlar (Parlog ve ark 2015). Özellikle de son yıllarda gerçekleştirilen bu konuyla ilgili klinik araştırmalar ve hayvan deneyleri ile *T. gondii* ile şizofreni, depresyon ve diğer psikiyatrik hastalıklarla bağlantıları ortaya konulmuştur (Henriquez ve ark 2009, Yolken ve ark 2009, Fekadu ve ark 2010 Groer ve ark 2011).

1.3. *Toxoplasma gondii* ve Konak İmmun Sistemi

Toxoplasma gondii enfeksiyonlarında şekillenen immun yanıtın araştırıldığı ilk çalışmalar, 1948 yılında Sabin ve Feldman' ın bu parazite karşı komplement-fikzasyon antikorlarını keşfiyle başlamıştır. Bu test, canlı *T. gondii* hücre membranının kompleman aktivasyonu ile lizisi esasına dayanmaktadır (Lelong ve Desmots 1952, Feldman 1980). Canlı takizoitler, şüpheli serum ve kompleman ile inkübe edilir ve ardından metilen mavisi eklenir. Anti- *T. gondii* antikor varlığında takizoit membran bütünlüğü korunurken, antikor yokluğunda ise membran bütünlüğü bozulan takizoit metilen mavisini geçirerek mavi renkte boyanırlar (NPHS Wales *Toxoplasma* reference laboratory 2003, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı 2008, Remington ve ark 2004). Sabin Feldman boya testi ve IgG ELISA antikor testleri ile akut ve kronik *T. gondii* enfeksiyonlarının birbirinden ayırt edilememesi açısından, IgM ölçerek akut enfeksiyon varlığını gösteren testlerden ayrılırlar (Montoya ve Liesenfeld 2004, Robert-Gangneux ve Darde 2012).

Protozoonun konağı enfekte etmesiyle birlikte ilk olarak, doğal bariyer olarak görev yapan fiziksel (epitel hücreler, bağırsak motilitesi) ve kimyasal (gastrik asit, pankreatik proteolitik enzim, mukus) bariyerler devreye girer (Buzoni-Gatel ve Kasper 2007).

Parazit virülensi, konak hücresi invazyon yeteneği ve konak tarafından oluşturulan immün yanıtın derecesi, *T. gondii*'nin apikal sekretör organellerinden salınan protein ve faktörler sayesinde parazitin kontrolünde belirlenir (Plattner ve Soldati-Favre 2008, Peixoto ve ark 2010). Parazit bunun için, konak hücre sine invazyonu sırasında salınan mikronem, dense granül ve roptri içeriklerini kullanır. Bu protein ve faktörler; konak hücre yanıtını değişikliğe uğratarak, şekillenen immün yanıtı inhibe edebilir (Lim ve ark 2012). Yine bu içerikler, paraziti hücre sel lizozomal enzimlerden koruyan, ancak konak hücre sinden temel besinleri de alınmasına izin veren “parazitofor vakuol” adı verilen lipid membranın oluşturulmasında görev alırlar (Cesbron-Delauw ve ark 2008).

Toxoplasma gondii'ye karşı koruyucu bir bağışıklık yanıtının oluşması, enfeksiyon oluşumunun hemen ardından doğal bağışıklık sisteminin devreye girmesiyle gerçekleşir. Doğal bağışıklık da, paraziti enfeksiyon süresi boyunca kontrol altında tutan kazanılmış bağışıklık mekanizmalarıyla doğrudan bağlantılıdır (Gregg 2011).

1.3.1. Merkezi Sinir Sistemi ve Sitokinler

Sitokinler, hücreler arası iletişimde ve hücre sel aktivasyoda önemli görevleri olan çok fonksiyonlu proteinlerdir ve immün yanıtta işlevlerine göre pro-enflamatuar (Th1 tip, uyarıcı) ve anti-enflamatuar (Th2 tip, engelleyici) olarak sınıflandırılırlar (Mosmann ve ark 1986).

CD4+ yardımcı T hücreleri (Th), hücre nin mikroçevre şartlarına ve ürettiği sitokinlere bağlı olarak, Th1 ve Th2 alt kümelerine ayrılabilir (Kelso 1995, Mosmann ve ark 1986). Aynı şekilde, CD8+ sitotoksik T (Tc) hücrelerinin de, fonksiyonel olarak CD8+ T1 ve CD8+ T2 olarak alt kümelerine ayrılabilirdiği gösterilmiştir (Zedler ve ark 1999).

Th1 tip hücreler yüksek oranda IL-2, TNF- α ve INF- γ salgılayarak, özellikle hücre içi patojenlere karşı gelişen hücre-aracılı immun yanıtı uyarırlar. Th2 tip hücreler ise, anti-enflamatuar IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 salgılayarak, yangının regülasyonunu sağlarlar (Opal ve De Palo 2000).

Sitokinler MSS'ne, direkt olarak beyindeki varlıklarıyla ya da indirekt olarak hedef hücrelerine yaptıkları uyarımlarla etki edebilirler (Sternberg 1997). Kan-beyin bariyeri, beyin dokusunu immun sistemin sistemik etkisinden korumakla birlikte, özellikle hastalık durumlarında bu regülasyon bozulmaktadır (Tansey ve Wyss-Coray 2008). Periferal immun organlardan köken alan sitokinler kan beyin bariyerinden aktif taşınmayla ya da hasar görmüş bölgelerden sızıntı yoluyla aşabilir ve MSS' ne direkt olarak etki edebilirler (Watkins ve ark 1995). Bununla birlikte, kan damarlarının endotel hücrelerinde IL-1 gibi sitokinlerin aktivasyonu ile nitrik oksit (NO) ve benzeri enzimler sentezlenebilir ve böylece de sitokinler MSS üzerine dolaylı olarak etki yapmış olurlar (Wong ve ark 1995). Buna rağmen sitokinlerin MSS'nde asıl ve en önemli kaynakları nöronal hücrelerdir. Gerek hastalıklı, gerekse sağlıklı bireylerde çeşitli sitokin ve sitokin reseptörleri MSS' ne ait çeşitli hücre tiplerinde ortaya konmuştur (Sternberg 1997) (Çizelge 1.1). Transgenik farelerde yapılan in-vivo çalışmalar, nörotoksik ve nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde beyinde sentezlenen sitokinlerin artan düzeylerinin önemli rol üstlendiğini ortaya koymuştur (Campbell ve ark 1998).

Çizelge 1.1: Başlıca pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar sitokinler ile bunların kaynakları ve başlıca hedefleri (Tizard IR 2004).

Pro-enflamatuar sitokinler			Anti- enflamatuar sitokinler		
Sitokin	Üretim yeri	Hedef Hücre	Sitokin	Üretim yeri	Hedef Hücre
IL-1	Makrofaj	Th2,B lenfosit	IL- 4	Th2	T hücreleri, B lenfosit, Mast hücresi
IL- 6	Fibroblast, T lenfosit	B lenfosit	IL- 5	Th2	T lenfosit, B lenfosit
IL- 18	Makrofaj	Th1, NK hücre	IL- 10	Th2, B lenfosit	Th1
IFN-γ	Th1	Makrofaj	TGF- β	Birçok hücre hattı	Birçok hücre hattı
TNF-α	Makrofaj	Endotel			

1.3.1.1. Kronik Ensefalitik Toksoplazmozda Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık Hücreleri ve Sitokin Yanıtı

Doğal enfeksiyonlarda oral yolla bulaşmayı takiben, *T. gondii* biyolojik bariyerleri aşarak, hızlıca yayılmaya başlar (Dubey 1998). Parazit epitelyal hücreler ve kandaki lökositler de dahil olmak üzere birçok hücre tipini enfekte eder (Dobrowolski ve Sibley 1996). Etkenin konağı enfekte etmesini takiben; özellikle doğal bağışıklık elemanları olan monosit/makrofaj (Dunay ve ark 2010), nötrofil (Del Rio ve ark 2000) ve dendritik hücreler (Liu ve ark 2006) devreye girer ve parazite karşı immun yanıt oluşturmaya başlarlar. Çeşitli in vivo araştırmalar yangısal monositler ve dendritik hücrelerin (Goldszmid ve ark 2012), parazit gelişiminin kontrolünde en önemli sitokinlerden birisi olan Interleukin (IL)- 12' nin erken dönem kaynağı olduğunu göstermiştir (Dunay ve ark 2008, Mashayekhi ve ark 2011).

IL-12' nin salınımı, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık elemanları olan doğal öldürücü hücreler (NK) ve T lenfositleri uyararak, Interferon-gamma (IFN- γ) üretimini tetikler (Gazzinelli ve ark 1994, Hunter ve ark 1994, Gaddi ve Yap, 2007). IFN- γ , *T. gondii*' nin çoğalmasını önlemek ve paraziti yok etmek için, hücre içi indoleamine 2,3-dioxygenase enzimi üretimini uyararak, parazitin ihtiyacı olan triptofanı işlevsiz hale getiren temel bir sitokindir (Pfefferkorn ve ark 1986). Yapılan çalışmalar kronik toksoplazmozda, CD11c hücre belirtecine sahip dendritik hücrelerin, pro-enflamatuar IL-12'nin başlıca kaynağı olduğunu gösterirken (Fischer ve ark 2000), IFN- γ 'nın için ise başlıca kaynağının beyindeki mikroglialar (Suzuki ve ark 2005) olduğunu ortaya koymuştur.

Bununla birlikte, Yap ve ark.'ları (2000), *T. gondii* enfekte IL-12 knockout farelerde akut toksoplazmozun ölümcül sonuçlandığını ancak IL-12'nin eksojen verildiği durumlarda hayatta kaldıklarını göstermişlerdir. Ayrıca, kronik toksoplazmozda IL-12 varlığı, beyindeki doku kistlerinin kontrolünde görev alan IFN- γ salgısının devamı için de gereklidir (Suzuki ve Joh 1994). Bu veriler, IL-12 ve IFN- γ 'nın yalnızca akut enfeksiyon sırasında değil, aynı zamanda kronik latent toksoplazmozda da önemli rolleri olduğunu göstermektedir. Kronik *T. gondii* enfeksiyonunda, IFN- γ 'nın esas kaynağı tam olarak bilinmemesine karşın, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin azalması durumunda, IFN- γ 'nın azaldığı ve kist reaktivasyonu şekillendiği bildirilmiştir (Gazzinelli ve ark 1992).

Toxoplasma gondii, makrofajları Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) ve IL-12 salınması yönünde doğrudan uyarır. Aynı zamanda, sinerjistik olarak NK hücreler de IFN- γ salgılar ve bu IFN- γ makrofajları aktive eder (Li ve ark 1994). TNF- α , aktive makrofajlarda *T. gondii*'nin parazitofor vakuollerinin lizozomal füzyonunu ve degradasyonunu sağlayarak, parazitin hücre içi gelişimini inhibe eder (Andrade ve ark 2006, Sibley ve ark 1991). Yap ve ark.'ları (1998) TNF- α knockout farelerde oluşturdukları akut toksoplazmoz sırasında ölüme rastlamazlarken, enfeksiyonun 4'ncü haftasından sonra beyinde yüksek doku kisti yükü ve şiddetli ensefalitis kaynaklı ölümlerle karşılaşmışlar ve TNF- α 'nın kronik toksoplazmozda önemli bir rol üstlendiğini göstermişlerdir.

Interleukin- 15 (IL-15) de aynı IL-12 gibi, NK hücrelerinde TNF- α ve IFN- γ üretimi uyarır, T hücrelerinin proliferasyonunu sağlar ve sitotoksik aktivitesini artırır (Carson ve ark1994, Giri ve ark 1994). Khan ve ark.' ları (2002), IL- 15' in doğal bağışıklıktaki bu görevlerinin yanı sıra, *T. gondii*' ye karşı CD8+ T lenfosit yanıtının sürdürülebilmesi için gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir.

Doğal bağışıklığın ve enflamasyonun “temel düzenleyicisi” olarak anılan Interleukin- 1 β (IL-1 β) (Dinarelo 2011)' nin; *T. gondii* enfekte monositler, sünnet derisi fibroblastları ve retinal epitel hücrelerinden salındığı gösterilmiştir (Kim ve ark 2007, Nagineni ve ark 2000, Witola ve ark 2011). Gove ve ark.'ları (2013)'te, *T. gondii*' nin tip II suşu olan PRU ile oluşturdukları enfeksiyonda, IL-1 ailesi alt üyesi olan IL-1 β ve IL-18'in sirküler kanda bulunan enfekte monositlerdeki ekspresyonunu incelemişler ve IL-1 β 'nin insan monositlerinden sentezlendiğini ve salındığını göstermişlerdir. Ayrıca Hunter ve ark (1995), ve IL-1 β 'nin IL-12 aracılı *T. gondii* yanıtı için gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır.

IL-1 ailesinin diğer üyesi olan Interleukin-18 (IL-18)'in ise toksoplazmoz sırasında üretimi artmasına karşın, yokluğunda ağır kombine bağışık yetmezlikli (SCID) farelerde beklenildiği gibi artan bir duyarlılık görülmemiştir (Cai ve ark 2000). Ancak Kupffer hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücrelerde üretilen bu sitokin; diğer sitokinlerle birliktelik gösterdiğinde *T. gondii*' ye karşı bağışıklıkta önemli rolü olan IFN- γ ' nın regülasyonunda görev alır (Stoll ve ark 1997, Stoll ve ark 1998).

Toksoplazmoza karşı gelişen bağışıklıkta pro-enflamatuar IFN- γ bağımlı yanıtların hayati önemi olmasına karşın, enflamatuar sitokinlerin ve nitrik oksitin (NO) fazla üretimi doku hasarlarına yol açabilmektedir (Gavrilescu ve Denkers 2001, Mordue ve ark 2001). Serebral toksoplazmozda IFN- γ 'nın regülasyonu için astrositler ve mikroglialar; TNF- α , IL-1, IL- 4, IL- 6, ve IL-10 gibi sitokinler ile kemokinleri salgılayarak önemli görev üstlenirler (Suzuki ve ark 2007).

Interleukin-10 (IL- 10); dendritik hücreler, makrofajlar, B lenfositler ve T lenfositlerde (Th2 ve Treg) üretilen bir sitokindir (Moore ve ark 2001, Levings ve ark 2002). IL-10, IL-12 üretimini önler ve böylece fazla miktarda IFN- γ üretiminin önüne geçerek, Th1 sitokin yanıtının aşırı düzeyde doku hasarı oluşturmaya engel olur (Gazzinelli ve ark 1994, Khan ve ark 1995). Gazzinelli ve ark (1996), bunu IL-10 eksikliği olan fareleri *T. gondii* ile enfekte edip, farelerde etken kaynaklı olmayan ancak, sitokinlerin aşırı üretimi ve doku hasarı nedeniyle ölümlerin görüldüğü bir çalışma ile ortaya koymuşlardır. Buna ek olarak, Wilson ve ark (2005) IL- 10 eksikliği olan *T. gondii* enfekte farelere sulfadiazin uygulayarak erken dönem ölümlerin önüne geçmiş, ancak enfeksiyonun kronik döneminde beyinde gelişen ölümcül sitokin yanıtı engelleyememişlerdir. Tüm bunlar, özellikle de enfeksiyonun kronik dönemi için IL-10 varlığının önemine işaret etmektedir.

Suzuki ve ark.'ları (1996) Interleukin- 4 (IL- 4)'ün de *T. gondii*' ye karşı, özellikle enfeksiyonun geç dönemlerinde (6–20 nci haftalar arası), koruyucu rol üstlendiğini göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada, IL- 4 eksikliği olan fareler, kronik enfeksiyon sırasında ölmüş, beyinlerinde oldukça fazla miktarda doku kisti ve takizoitlerle birliktelik gösteren fokal reaktivasyon odaklarına rastlanmıştır (Suzuki ve ark 1996). Kronik dönemin yanı sıra, enfeksiyonun akut döneminde de IL- 4, proinflatuar sitokin üretimini azaltarak mortaliteyi önleyici görev üstlenir (Roberts ve ark 1996). Ayrıca, IL-4'ün, murin makrofajlar (Swierczynski ve ark 2000) ve insan fibroblastlarında, takizoitlerin hücre içi replikasyonunu azaltan bir aktiviteye sahip olduğu in-vitro olarak gösterilmiştir (Chaves ve ark 2001).

Interleukin-5 (IL-5) de, kronik toksoplazmoz sırasında beyinde kist sayısının kontrolünde ve kist rupturunun engellenip, akut bir ensefalit tablosunun önüne geçilmesinde önemli görevler üstlenmektedir (Zhang ve Denkers 1999). IL-5 yokuğunda dalakta, IL-12 üreten B hücrelerinin azaldığı ve IL-5'in, IL-12 üzerinden toksoplazmoza karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Suzuki ve ark 2007). IL- 5 aynı zamanda, IL-2 aracılığı ile B hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır (Swain ve arkadaşları, 1988).

Anti-mikrobiyal etkisi olan, B hücrelerinin aktivasyonunda ve farklılaşmasında görev alan ve ayrıca T hücrelerin başka sitokin salınımını uyararak (Butler ve ark 2013) Interleukin-6 (IL-6), kronik *T. gondii* enfeksiyonu sonrasında, beyinde takizoit proliferasyonunu ve kist rupturunu engelleyerek, ölümcül ensefalit tablosu oluşmasının önüne geçmektedir (Jebbari ve ark 1998). IL-6, gerek enfeksiyonun erken döneminde sistemik olarak, gerekse kronik dönemde beyinde IFN- γ üretimini uyarıp lokal olarak astrositlerde takizoit çoğalmasını engeller (Halonen ve ark 1998).

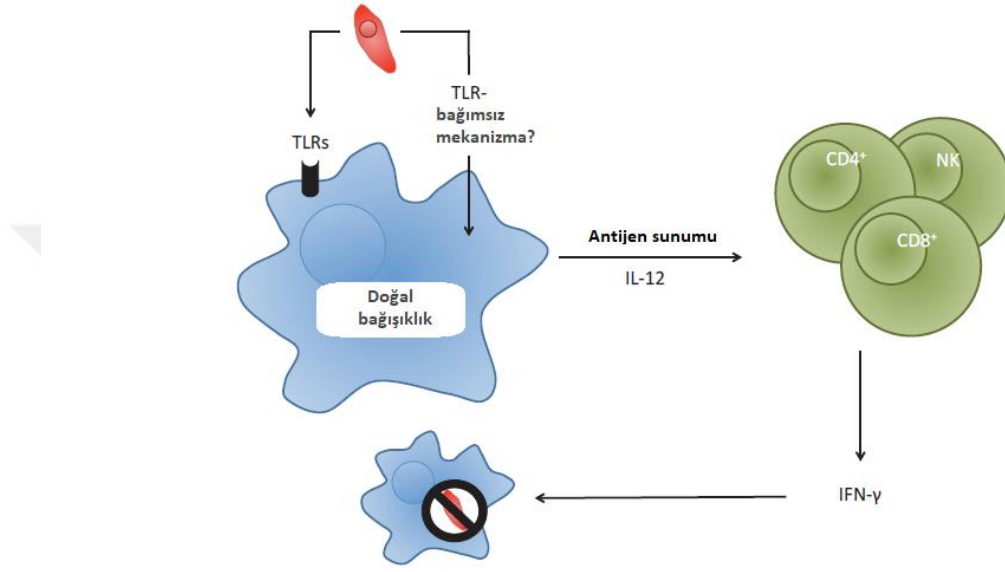
1.3.2. *Toxoplasma gondii* Enfeksiyonunda Doğal Bağışıklık

Doğal bağışıklığın temeli; patojen üzerindeki patojen ilişkili moleküler desenlerinin (PAMPs), konak hücre yüzeyindeki desen tanıma reseptörleri olan Toll benzeri reseptörler (TLR1-12) ve NOD benzeri reseptörler (NLRs) tarafından tanınması esasına dayanır (Kawai ve Akira 2006, Meylan ve ark 2006). TLR 2, 4, 9, 11 ve 12 *T. gondii*'ye karşı spesifik immün yanıtta görev alır. Bunların arasında TLR 2 ve 4 parazit yüzeyindeki glikozil fosfadilinositollerini tanıırken, TLR 11 ve 12 protozoanlarda bulunan profilin benzeri moleküllere karşı yanıt verir (Debieuvre-Grockiego ve ark 2007, Jenkins ve ark 2010, Koblansky ve ark 2013).

TLR aktivasyonunda bir adaptör protein olan miyeloid diferansiyasyon faktör 88 (MyD88) bağımlı ve bağımsız olmak üzere 2 farklı sinyal yolağı vardır. *T. gondii*'ye karşı oluşan yanıtta MyD88 bağımlı yolağı kullanılarak pro-enflamatuar IL-12 ve kemokin üretiminin artması sağlanır (Scanga ve ark 2002, Sukhumavasi ve ark 2008). IL-12 üretiminden sorumlu olan hücrelerin; yangısal monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler olduğu gösterilmiştir (Bliss ve ark 1999, Mordue and Sibley, 2003; Scanga ve ark 2002, Whitmarsh ve ark 2011).

Doğal bağışıklık hücrelerinde IL-12'nin üretimi, ardından IL-12'nin CD4+ ve CD8+ T hücrelerini IFN- γ üretimi için uyararak, *T. gondii*'ye karşı şekillenen doğal bağışıklığın en önemli fonksiyonudur (Gazzinelli ve ark 1993, Hunter ve ark

1994). Çünkü 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). (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. *T. gondii*' ye karşı şekillenen immün yanıt. *T. gondii*' ye karşı şekillenen TLR 2, 4, 11 ve 12 aracılı ve tam olarak açıklanamamış olan TLR aracısız mekanizma ile dendritik hücre/ makrofaj gibi bir doğal bağışıklı hücreninin uyarımı. Hemen ardından uyarılan hücreden IL-12 salınımı ve CD4+ ve CD8+ T hücrelerine antijen sunulumu. IL- 12' nin bu hücrelerden IFN- γ salınımını uyarmasıyla birlikte anti-paraziter mekanizmanın gelişimi. (Bu şekil Christopher David Dupont'un Roles of dendritic cells in immunity to *Toxoplasma gondii* adlı tezinden alınmıştır)

1.3.3. *Toxoplasma gondii* Enfeksiyonunda Kazanılmış Bağışıklık

Kazanılmış bağışıklığın temel elemanları, sekonder lenfoid organlarda aktive olan T ve B lenfositler ile dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerdir. Bu elemanlarla kazanılmış bağışıklığın başlatılması, takizoitlerin bradizoitlere dönüşümünün tetiklenmesinde anahtar role sahiptir (Sher ve ark 1995).

Yapılan deneysel çalışmalar, T hücre fonksiyon bozukluğu olan insanlar ve B hücresi, CD4+ veya CD8+ T hücresi eksikliği olan farelerde, akut enfeksiyon atlatılsa bile, enfeksiyonun kronik aşamalarında şiddetli bir enfeksiyon tablosu şekillendiğini göstermiştir (Kang ve ark 2000, Johnson ve Sayles 2002). CD4+ ve CD8+ T hücreleri enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında sinerjik etki göstererek bradizoit dolu doku kistlerinin reaktive olmasını engellerler (Gazzinelli ve ark 1992).

CD4+ T hücreleri; toksoplazmozun erken aşamalarında B lenfosit ve CD8+ T hücresi yanıtlarına katkı sağlarken, ilerleyen dönemlerde kronik enfeksiyonu kontrol edebilmek için yine bu hücreleri IFN- γ üretimi yönünde uyarırlar (Gazzinelli ve ark 1992, Lutjen ve ark 2006).

CD4+ T hücreleri tarafından aktif hale getirilen bazı CD8+ T hücreleri bellek geliştirirler ve antijen-spesifik hale gelirler (Williams ve Bevan 2007). John ve ark' larının 2009 yılında yaptıkları çalışmada dendritik hücrelerin antijen-spesifik CD8+ T hücrelerine antijen sundukları gösterilmiştir.

Hücre aracılı kazanılmış bağışıklığın yanı sıra, Sabin ve Feldman 1948 yılında yaptıkları çalışmayla anti- *T. gondii* antikorlarının parazit duvarını parçalayarak paraziti yok ettiğini kanıtlamışlar ve humoral bağışıklığın önemini göstermişlerdir. Ayrıca, yapılan çalışmalar B hücre eksikliği olan farelerde oluşturulan *T. gondii* enfeksiyonunda ilk başta normal IFN- γ yanıtı gerçekleşiyor gibi görünse de, enfeksiyonun 4 ncü haftasından sonra MSS'deki parazit yükünden dolayı farelerin öldüğünü göstermiştir (Kang ve ark 2000). Tüm bunlarla birlikte, antikorların koruyucu mekanizmaları; fagositoz için parazitleri opsonize etmek, parazit invazyonunu engellemek ve klasik komplemant yolağını aktive etmek biçiminde de olabilir (Schreiber ve Feldman 1980, Nakao ve Konishi 1991, Hammouda ve ark 1995).

1.4. Toksoplazmozda Fare Modelleri

İnsanlardaki ensefalitik toksoplazmozun in vivo gelişim mekanizmasının açıklanmasında, şimdiye kadar yapılan in vitro çalışmalar ve az sayıdaki insan çalışması için yetersiz kalmış ve rodent deneylerine başvurulmuştur. Bu bakımdan, av-avcı-parazit döngüsünde, son konağı kedi olan *T. gondii* için fareler oldukça önemlidir (Dubey JP 1998). Ayrıca; sığır, at ve sıçan gibi bazı türler klinik toksoplazmoza dirençliken, fare çok daha duyarlıdır. Yapılan çalışmalar 1 ookistin, hem fareyi hem sıçanı enfekte etme özelliği olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, 100 ookist fareler için öldürücü olurken, sıçanların 100,000 ookistle oluşturulan enfeksiyonda bile hayatta kalabildikleri gösterilmiştir (Dubey, 2010).

Deneysel in-vivo çalışmalar, tüm fare soylarının, *T. gondii*' ye karşı güçlü bir Th1 yanıtı geliştirdiğini göstermiştir (Denkers ve Gazzinelli 1998). Öte yandan, hem inbred hem de outbred fareler Tip I suşlarına karşı duyarlılık gösterirken, Tip II suşuyla oluşturulan enfeksiyonlarda genellikle akut enfeksiyonu atlatarak, kronik toksoplazmoz geliştirirler (Suzuki ve ark 1994, Johnson ve ark 2002). H-2^k ve H-2^b haplotiplerine sahip C57BL/6, CBA/ Ca gibi fareler toksoplazmik ensefite duyarlıyken, H-2^d haplotipine sahip BALB/c gibi fareler ise dirençlidir ve duyarlı suşlarda herhangi bir immunsupresyon olmadan öldürücü ensefalit tablosu gelişebilir (Chao ve ark 1994, Liesenfeld ve ark 1999, Wang ve ark 2004). Bu durumun Ld alleli yoluyla sunulan MHC sınıf I genotipi nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Suzuki ve ark 1994). C57BL/6 ve CBA/Ca fareler Tip II suşlarıyla oluşturulan deneysel enfeksiyonlarda yüksek düzeyde bağırsak ve beyin patolojisi gösterirler, bu nedenle patogeneze ve mekanizma araştırmaları için iyi örnek teşkil ederler (Suzuki ve ark 1994, Kasper ve ark 2004).

1.5. *Toxoplasma gondii* ve Psikiyatrik Hastalıklar

Toxoplasma gondii; birçok memelide kas doku ve merkezi sinir sistemini etkilemesiyle, yavru ölümlerine ya da ölü doğumlara yol açmaktadır. Bunun haricinde özellikle de koyun, domuz, tavşan ve maymunlarda; tremor, koordinasyon bozukluğu ve nöbet gibi nöropatolojik semptomlar da görülebilmektedir (Wastling ve ark 2000). İnsanlarda gebelik döneminde şekillenen abortlar, yavruda hidrosefalus ve koriyoretinitis ile karakterize olmuş ve immunitesi sağlam erişkin bireylerde klinik bulguya yol açmadığından çok fazla önemsenmemiştir. Ancak, son yıllarda beyinlerinde *T.gondii* doku kistleri bulunan insanların; anksiyete, trafik kazalarına karışma ve suç işleme oranları, şizofreni sıklığında artış gibi davranış değişiklikleri ile birlikte sinirbilim alanının ilgi odağı haline gelmiştir (Kavaliers ve Colwell 1995, Vyas ve ark 2007).

Yapılan çalışmalar *T. gondii* seropozitifliği ile; şizofreni, bipolar bozukluk, depresyon ve anksiyete, obsesif- kompulsif bozukluk ve intihara meyillilik gibi birçok mental bozukluk arasında ilişki olduğunu göstermiştir (Miman ve ark 2010, Groer ve ark 2011, Zhang ve ark 2012, Sutterland ve ark 2015).

Deney hayvanı *T.gondii* doku kisti modellerinde ise; korkunun azalması, cesaret ve anksiyete ilişkili davranış değişikliklerinin ortaya çıktığı kanıtlanmıştır (Hermes ve ark 2008, Kocak ve ark 2012). Normal koşullarda, fare ve sıçanların kedi idrarı ve kokusundan korkarak o bölgelere uzak durmaları beklenir (Webster 2001). Ancak, parazitin bulaşma oranını artırabilmek için konağın davranışlarını, kendi lehine olacak biçimde manüple ettiği gösterilmiştir (Vyas ve ark 2007).

1.5.1. *Toxoplasma gondii* ile Konak Nöronal Fonksiyonlarının Etkileşimi

1.5.1.1. Direkt Etki

a. Doku Kistinin Bulunduğu Bölge: Sıçanların kedi idranının kokusunu aldıklarında kaçmaları beklenirken, *T. gondii* enfekte sıçanların kedi idrarına ilgi duydukları gösterilmiştir (Berdoy ve ark 2000, Vyas ve ark 2007). Bunun da özellikle korku duygusunu determine eden amigdalar bölgesinin *T. gondii* kistleri tarafından tutulmasından dolayı olduğu düşünülmüş ve yapılan çalışmalarda bu bölgedeki doku kisti sayısının yüksekliği gösterilmiştir (Vyas ve ark 2007). Ayrıca; bulbus olfactorius, hippocampus ve kortikal bölgede de kist sayısının diğer bölgelere oranlara daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Haroon ve ark 2012, Evans ve ark 2014). Tüm bu bulguların aksine; Berenreiterova ve ark' ları (2011), latent toksoplazmozda doku kistlerinin fare beyindeki dağılımının haritasını çıkarmışlar ve ne amigdalar ve hipotalamik bölgede ne de dopaminerjik nöronların içinde daha fazla parazit doku kisti olduğuna dair bir kanıt bulamamışlardır. İnsanlarda davranış değişikliklerin, toksoplazmozlu bireylerde beyinde şekillenen doku kistleri ile MRI çalışmaları serbral toksoplazmozlu bireylerdeki lezyonlu bölgeleri, korteks ve serebellum olarak göstermiştir (Schroeder ve ark 2006).

b. Dopamin Üretimi: Gaskell ve ark (2009) *T. gondii* genomunda tirozin hidroksilazı kodlayan, iki gen olduğunu göstermişlerdir. Tirozin substrat varlığında dopaminin öncüsü olan L- DOPA' ya dönüşür ve enfekte kemirgenlerin beyinlerinde yüksek oranda dopamine rastlanmıştır (Stibbs 1985). Prandovszky ve ark.'ları ise 2011'de yaptıkları çalışmada ise nöronların içindeki tirozin hidroksilazın nöronların sitoplazmalarındaki doku kistleri kaynaklı olduğu gösterilmiştir.

c. Nöron Fonksiyonlarını Metabolik Olarak Bozulması: Yapılan çalışmalar, hem takizoitlerin hem de bradizoitlerin nöronları enfekte etmesiyle birlikte, MSS'

nin temel uyarıcı amino asiti olan glutamat uyarımının, nöronlara azalmış ya da çoğalmış Ca^{2+} girişi ile sonuçlandığını göstermiştir (Haroon ve ark 2012).

d. **Apoptozun Engellenmesi:** *Toxoplasma gondii*; kaspaz moleküllerinin aktivasyonunu azaltarak/engelleyerek, poli ADP-riboz polimeraz ekspresyonunu downregüle ederek ve Bcl-2 ile Mcl-1 gibi anti-apoptotik proteinleri upregüle ederek nöronal apoptozun önüne geçmekte, böylece kendi lehine hücreyi ölümsüzleştirmektedir (Goebel ve ark 2001, Payne ve ark 2003, Kim ve Denkers 2006).

1.5.1.2.Dolaylı Etki

Nöroenflamasyon: *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Baylisascaris procyonis* ve *Eimeria vermiformis* gibi parazitler nöronları direkt etkilemedikleri halde nöroenflamasyonla MSS' ni etkileyerek, *T. gondii*' ye benzer biçimde davranış değişikliklerine neden olurlar (Nokes ve Bundy 1994, Kavaliers ve Colwell 1995, Kaushik ve ark 2012, Langelier ve ark 2016).

Toxoplasma gondii' nin konağı enfekte etmesiyle birlikte MSS' ne ulaşmasından önce periferel hücre aracılı sitokin yanıt uyarılır ve bu yanıt, kan beyin bariyeri ile koroid pleksusu geçerek beyne ulaşabilir ve orada nöroenflamasyon başlatabilir (Wong ve ark 2004, Randall ve Hunter 2011, Hunter ve Sibley 2012, Baruch ve Schwartz 2013). Ancak esas önemli olan, *T. gondii*' ye karşı MSS' nde oluşan lokal Th1 immun yanıtıdır (Suzuki 2002, Carruthers ve Suzuki 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalar; majör depresyon, obsesif- kompulsif bozukluk ve şizofreni gibi mental bozuklukların varlığında Th1 immun yanıt elemanları olan IFN- γ , IL-12, IL-1, IL-6, and TNF artışını göstermiştir (Brietzke ve ark 2011, Mansur ve ark 2012, Najjar ve ark 2013).

Böylece; *T. gondii* enfeksiyonunun ardından gelişen kronik nöroenflamasyonla beraber, davranış değişikliklerinin ve nörolojik bozuklukların oluşması speküle edilebilir.

Toxoplasma gondii'nin Avrupa'da yaygın olan tip II kistojenik suşları insanlarda enfeksiyon oluşturduğu zaman, MSS'inde persiste kalarak konağı yaşam boyu enfekte eder (Parlog ve ark 2015). Bu çalışmada; *T. gondii* enfeksiyonunun erken kronik dönemi olan 30. gün ile geç kronik dönemleri olan 60 ve 180. günlerindeki enfeksiyon şiddetlerini, etkilenen hücre popülasyonlarını ve sitokinsel yanıtı karşılaştırarak değerlendirmek amaçlanmıştır. İnsan ve fare yaşı kıyaslandığında kronik aşamanın geç döneminin gösterildiği deneysel enfeksiyon çalışmaları oldukça azdır. Bu nedenle, enfeksiyonun 60 ve 180. günlerinde hücresel immunofenotiplendirme ve sitokinsel yanıtın birlikte araştırılması, insanlardaki toksoplazmozun aydınlatılması için önem arz etmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Etik Beyanı

Deney hayvanlarının bakımı ve tüm deneysel uygulamalar 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).

2.2. Deney Hayvanları

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ruhsatlı olan, ticari laboratuvar hayvanı üreticisi (Kobay A.Ş., Ankara) aracılığıyla sertifikalı olarak, 40 adet, 6-8 hafta yaşlı, erkek, C57BL/6 fare temin edildi. Fareler tip II long ve hepafiltreli kafeslerde, 20- 23 °C'de 12 saat ışık/12 saat karanlık döngüsüyle barındırıldı. Ticari fare yemi ve içme suları ad libitum olarak sağlandı.

2.3. *Toxoplasma gondii* ME49 Suşu

Bu çalışmada, 2009 yılında Dr. Alvaro Freyre, Toxoplasma Research Lab, Uruguay'dan yasal izinlerle getirilen ve o zamandan beri laboratuvarlarımızda düzenli olarak pasajlanan ve dondurulan ME49 suşu kullanıldı. Etken, sıvı azot

tankından çıkarıldıktan sonra, 37 °C su banyosunda çözdürülen etkenler, DMEM, %10 fötal buzağı serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren besi yerinde 3 kez yıkandı ve sonrasında 2×10^5 Vero hücresi içeren 25cm^3 flask içerisinde 37 °C' de %4 CO_2 'li etüvde kültüre edildi. 3 gün boyunca düzenli olarak besi yeri değiştirilen Vero + ME49 takizoit hücre kültürü, 3 gün sonrasında tripsinize edildi. Bu işlem yeterli takizoit sayısına ulaşana kadar, 2 kez tekrarlandı.

2.4. *Toxoplasma gondii* Takizoitlerine GFP Transfeksiyonu

2.4.1. GFP işaretli *Escherichia coli*

GFP bağlı plazmide sahip olan *Escherichia coli* (*E. coli*) kültürü, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Serap Elvan tarafından laboratuvarımıza hediye edilmiştir.

2.4.2. Plasmid İzolasyonu

GFP bağlı plazmide sahip *E. coli*' ler katı Nutrient agardan, sıvı Lysogeny broth'ta aktarıldı ve 37 °C'de 1 hafta boyunca üretildi. Ardından modifiye alkali lizis prensibiyle çalışan ticari kit (Genopure Plasmid Midi Kit, Roche) yardımıyla, üretici firma talimatlarına uygun olarak, plasmid DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA miktarını ölçmek amacıyla Qubit florometre (Invitrogen, USA) ve Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) kullanıldı. DNA miktarı 1mg/mL olana kadar aynı işlemlere devam edildi.

2.4.3. GFP Transfeksiyonu

GFP'nin plasmid aracılığıyla hücelere aktarımı, ticari plazmid DNA transfeksiyon kiti (Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Life Tech) aracılığıyla yapıldı. Bunun için öncesinde, Vero + ME49 takizoit hücre kültürü tripsinize edildikten sonra, 24kuyucuklu plaklara ekildi ve 37 °C' de %4 CO²'li etüvde, 1 gün süreyle inkübe edildi. Daha sonra üretici firmanın talimatların uygun olarak, *T.gondii* takizoitlerine plazmid DNA'sını aktarımı sağlandı. Akabinde GFP plasmid aktarılmış Vero + ME49 takizoit hücre kültürü tripsinize edildi ve 27 gauge'lik dental iğneden 20 kez geçirilerek, hücre içerisindeki takizoitler açığa çıkarıldı. Patlayan Vero hücrelerinden çıkan takizoitler, 800 rpm' de 5 dk süreyle santrifüj edilerek, Vero hücrelerinden ayrıldı. *T. gondii* plasmid aktarım başarısı %75 üzerinde olduğundan 2 günlük inkübasyon sonrasında etkenler, floresan mikroskop altında incelendi ve toplamda 100 parazit sayılarak, ¼'lük GFP ışıldaması başarı kriteri olarak değerlendirildi.

2.5. *Toxoplasma gondii* Enfeksiyonu ve Deney Düzeni

2 haftalık karantina süresinin ardından 10 haftalık yaşlı C57BL/ 6 fareler 10'arlı 4 gruba ayrıldı (Grup I: 30 günlük enfeksiyon grubu, Grup II: 60 günlük enfeksiyon grubu, Grup III: 180 günlük enfeksiyon grubu, Grup K; kontrol grubu). GFP aktarılan 1×10^4 *T.gondii* ME49 suşu takizoitleri içeren 0,5 ml inokulum intraperitoneal olarak verildi. Kontrol grubuna ise 0,5 ml fizyolojik tuzlusu yine intraperitoneal yolla uygulandı (Çizelge 2.1). Sakrifiye edilene kadar, tüm fareler düzenli olarak kontrol edildi.

Çizelge 2.1. Çalışma takvimi: deney gruplarının sonlandırıldığı süreler ve fare sayıları

Deney Grupları	<i>T.gondii</i> GFP	Fare Sayısı	İnokulum, <i>T.gondii</i> /FTS	İnokulasyon sonrası Ötenazi (Gün)
Grup I	<i>T.gondii</i> GFP	10	1x10 ⁴ <i>T.gondii</i> ME49 suşu, 0,5 ml	30
Grup II	<i>T.gondii</i> GFP	10	1x10 ⁴ <i>T.gondii</i> ME49 suşu, 0,5 ml	60
Grup III	<i>T.gondii</i> GFP	10	1x10 ⁴ <i>T.gondii</i> ME49 suşu, 0,5 ml	180
Grup K	-	10	0.5 ml Steril Serum Fizyolojik	30, 60 ve 180

Fareler 30' uncu (Grup I = 10, Grup K = 3), 60' ıncı (GrupII = 10, Grup K = 3) ve 180' inci (Grup III = 10, Grup K = 4) günlerde CO₂'li ötenazi kabinde sakrifiye edildi ve nekropsileri yapıldı. Nekropsi sonrası, beyin hızlı bir biçimde çıkarıldı ve beyin ön 1/3'ünden koronal kesitle alınan 100mg taze doku RNA izolasyonu için, *RNAlater* RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Germany) solüsyonu içine alınarak, -20 °C' ye kaldırıldı (Şekil 2.1.) Geri kalan beyin bölgeleri ve diğer doku örnekleri patolojik ve immunopatolojik incelemeler için %4'lük PBS tamponlu paraformaldehit solüsyonuna alındı.



Şekil 2.1. Doku takibi ve RNA izolasyonu için koronal kesit alınan bölge

2.6. Patolojik İncelemeler

Beyin örnekleri %4'lük PBS tamponlu paraformaldehit solüsyonu içerisinde 48 saat süreyle tespit edildikten sonra, incelenmesi hedeflenen 4 bölge; amigdala, kornu ammonis, prefrontal cortex ve bulbus olfactorius içerecek şekilde koronal 2 mm kalınlığında kesitler alındı ve akan çeşme suyu altında 6 saat yıkandı. Rutin doku takip işlemlerinde dereceli alkol (70°, 80°, 90°, 96° ve 99,5°) ve ksilol serilerinde işlem gördükten sonra parafinde bloklandı. Parafin bloklardan, lamlara 4-5µm kalınlığında yedekli seri kesitler alındı. Rutin olarak hematoksilin ve eozin (HE) ile boyanan kesitler, histopatolojik yönden incelendi ve lezyon şiddeti yönünden Hermes ve ark (2008)'e göre aşağıdaki şekilde semikantitatif skorlandı:

Perivasküler hücre infiltrasyonu; 1-2 sıra +1, 3-5 sıra +2, 6-10 sıra +3, , Gliozis; 3-4 hücre +1, 5-10 hücre +2, 10 hücre üzeri +3, Meningitis; +1 Hafif, +2 Orta, +3.









2.7. İmmunoperoksidaz ve İmmunofloresan Testler

2.7.1. Antikorlar

Bu çalışmada; ticari TNF- α (Abcam, USA), IFN- γ (Abgent, USA), IL- 1 β (Abcam, USA), IL- 4 (Abcam, USA), IL- 5 (Santa Cruz, USA), IL- 6 (Santa Cruz, USA), IL- 10 (Abcam, USA), IL- 12 (Abcam, USA), IL- 15 (Abgent, USA) ve IL- 18 (Santa Cruz, USA) pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar sitokinler ile merkezi sinir sistemi nöronlar, glial hücreler ve yangı hücrelerinin immunofenotiplendirilmesi

için Çizelge 2.2.'de belirtilen antikorlar kullanıldı. Ayrıca, *T. gondii* varlığının gösterilmesi için; Hazıroğlu ve ark tarafından 2003'te gösterildiği gibi hazırlanan poliklonal anti- *T. gondii* poliklonal antikorunu kullanıldı.

Çizelge 2.2. Beyinde nöron, makrofaj, T ve B lenfosit alt tipleri için kullanılan immun işaretleyiciler

Konak Hücresi	Hücre Reseptörü	Antikor- Ticari antikor
Nöron 	NSE	Abcam; ab79757
Astroisit 	GFAP	Abcam; 10062
Kemik İliği Kökenli Makrofaj 	CD11b	Santa Cruz; sc133357
Dendritik Hücre 	CD11c	Santa Cruz; sc33483
Yardımcı T Hücresi 	CD4 ⁺ /CD8 ⁻	Santa Cruz; CD4 Antibody sc13573
Sitotoksik T Hücresi 	CD8 ⁺ /CD4 ⁻	Santa Cruz; CD8- α Antibody sc-18913
Regülatör T Hücresi 	CD4 ⁺ /FOXP3 ⁺	Santa Cruz; FOXP3 Antibody sc-31739
B Lenfosit 	CD19	Abcam; ab210210

2.7.2. İmmunoperoksidaz Test

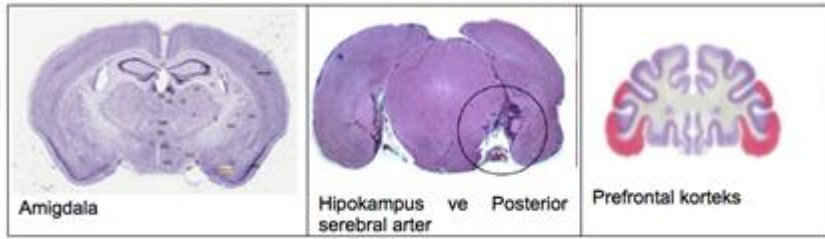
Tüm immunohistokimyasal analizler ticari immunoperoksidaz kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), AEC kromojen ve karşıt boyama için Mayer's hematoksilen kullanıldı. Negatif kontrol için de aynı prosedürler uygulandı ancak, primer antikor yerine normal fare serumu kullanıldı. Pozitif kontrol olarak, daha önceki çalışmalardan elde edilen *T. gondii* enfekte fare dokuları kullanıldı.

Kesitler üç ksilol serisinde 5'er dakika deparafinize edilip ve absölü alkol, % 95 ve % 70'lik alkol ve distile suda 5'er dakika tutularak rehidre edildi. Antijen geri alma işlemi için; sitrat solüsyonda (pH 6. 0) 30 dakika kaynatılan dokular, %1'lik hidrojenperoksit içerisinde 15 dakika muamele edildi ve böylece endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi. Daha sonra kesitler, 10 dakika süreyle protein bloke edici serumla (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) inkübe edildi. Sonrasında sırasıyla, 1 saat oda ısısında primer antikorlarla (anti- TNF- α , anti- IFN- γ , anti- IL- 1 β , anti- IL- 4, anti- IL- 5, anti- IL- 6, anti- IL- 10, anti- IL- 12, anti- IL- 15, anti- IL- 18, anti- GFAP, anti- CD11b, anti- CD11c, anti- CD4, anti- CD8, anti- FOXP3, anti- CD19 ve anti- *T. gondii*), 30'ar dakika da sekonder antikor ve streptavidin-peroksidaz enzimi 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, mikrofotografları çekildi.

2.7.3.İmmunofloresan Test

Belirteçlerin gösterilmesi amacıyla ticari Texas-Red, FITC ve DAPI ile konjuge edilmiş anti-mouse IgG ve anti-rabbit IgG seconder antikorları kullanılarak indirekt immunofloresan tekniği kullanıldı. Buna göre; aynı immunohistokimyasal boyamalarda olduğu gibi, kesitler üç ksilol serisinde 5'er dakika deparafinize edilip ve absölü alkol, % 95 ve % 70'lik alkol ve distile suda 5'er dakika tutularak rehidre edildi. Ardından spesifik olmayan parıldamaların ve özellikle ertirositlerde gözlenen otofloresanı önüne geçmek amacıyla kesitler, amoyum klorid ile 10 dakika muamele edildi. % 0,1'lik proteinase K ile 37 °C'de enzimatik digesyon uygulandı ve protein bloke edici serumda (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) 10 dakika bekletildi. Sonrasında her bir doku kesiti, farklı konaktan elde edilmiş primer antikorlar ile oda ısısında 1saat süreyle sırasıyla inkube edildi ve her bir primer antikor uygulamasından sonra PBS ile yıkandıktan sonra ikinci ve üçüncü primer antikor uygulandı. Florokrom boyalarla işaretli anti-mouse, rat, rabbit sekonder

antiserumlar (Vector Labs.) havuzlanarak (1/100 dilüsyon) 20 dakika tutulduktan sonra, kesitler gliserin ile kapatılarak floresan mikroskop altında incelendi. Çekirdek boyaması amacıyla ise DAPI kullanıldı. Boyanan kesitler, floresan ataçmanlı upright araştırma mikroskobu (Leica DM 5000 ve LAS analiz yazılımı) altında görüntüledi ve çekilen dijital mikrofotografılar kaydedildi. Aynı ayrı kromojenlerle farklı dalga boylarında çekilen fotoğraflar, Overlay tekniği ile görüntü birleştirmesi yapıldı ve aynı mikroskop alanında immunopozitif bölgeler farklı renklerle temsil edildi.



Şekil 2.2. İmmunohistoperoksidaz ve immunofloresan testlerde incelenecek hedef bölgeler.

2.8. *Toxoplasma gondii* Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Toxoplasma gondii genomunda 35 kopyaya sahip olan B1 geni, toksoplazmozun hızlı ve hassas tanısı için kullanılmaktadır (Buchbinder ve ark 2003, Lin ve ark 2000).

Bu nedenle bu çalışmada, herbir beyin örneğinden, High Pure PCR hazırlama kitindeki (Roche Applied Sciences, Germany) protokole uygun olarak DNA izole edildikten sonra, Nested PCR ile *T. gondii*'nin B1 geni (GenBank no. AF179871) ortaya konuldu. İlk primerler, 287 baz çiftlik gen fragmenti Nested PCR'da 5_-TCAAGCAGCGTATTGTCGAG-3_ [20 nükleotid (nt), oligo 1, forward primer] ve 5_-CCGCAGCGACTTCTATCTCT-3_ (20 nt, oligo 2, reverse primer) ilk reaksiyonda çoğaldı, ikinci primerler 194 baz çiftlik gen fragmenti 5_-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3_ (21nt, N1, forward primer) ve 5_-

TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3 (20 nt, C1, reverse primer) ikinci Nested PCR reaksiyonunda çoğaltıldı. İlk 50 L'lik çoğaltılmış reaksiyon miktarının, 25 L'sini putrifiye DNA taslağı, GoTaq DNA polymerase'ın 1 µM primerleri (oligo 1 ve oligo 2), 1.25 U (5 U/µL; Promega, United States), 1 µM GoTaq reaction buffer (Promega) ve 0.2 mM deoksiribonükleotid trifosfat Invitrogen, United States) oluşturdu. PCR çoğaltma reaksiyonları 94°C'de 30 saniye denatürasyon aşaması, onu takiben 94°C'de 15 saniye, 45°C'de 30 saniye ve 72°C'de 45 saniye 50 kez döngü yaptıktan sonra, son olarak 72°C'de 10 dakika bağlanma aşaması şeklinde uygulandı. İkinci 50 L'lik çoğaltılmış reaksiyon miktarını da; 1 L kadarını ilk PCR reaksiyon ürünleri, 1.25 U of GoTaq DNA polimerazın 0, 2 µM primerleri (C1 and N1), (5 U/µL), 1 µM GoTaq reaksiyon solüsyonu ve 0, 2 mM deoksiribonükleotid trifosfat oluşturdu. PCR çoğaltma reaksiyonları 94°C'de 30 saniye denatürasyon aşaması, onu takiben 94°C'de 15 saniye, 45°C'de 30 saniye ve 72°C'de 45 saniye 50 kez döngü yaptıktan sonra, son olarak 72°C'de 10 dakika bağlanma aşaması şeklinde uygulandı. PCR ürünleri %2' lik agaroz jel elektroforezi ile görünür hale getirildi.

2.9. Beyin Dokusunda Sitokin Ekspresyonlarının Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz ZincirReaksiyonu (Real Time- PCR) ile İncelenmesi

2.9.1. Beyin Dokusundan RNA İzolasyonu ve DNase Uygulaması

RNA later solüsyonu içindeki beyin dokusu, çıkarılıp, steril bistiği ucu ve doku homojenizatörü (FastPrep®-24, MP biomedicals, ABD) yardımıyla oldukça homojenize edildi. Total RNA ekstraksiyonu için PureZOL RNA Isolation Reagent (Bio Rad, CA, USA) solüsyonu kullanıldı ve üretici firmanın belirttiği talimatlara ek olarak PureZOL içindeki homojenize dokular bir gece -80 °C'de bekletildi ardından RNA eldesi sağlandı. Nükleazdan arı su ile sulandırılan RNA'lar spektrofotometrik

olarak (Nanodrop C1000, Thermo, Almanya) miktarı ölçüldü. RNA bütünlüğü safeview ile boyanmış %1'lik agarose jel ile 100V elektrik akımı altında elektroforezde yürütüldü ve ultra viole (UV) ışık altında görüntülenerek kontrol edildi. Elde edilen RNA'larda DNA kontaminasyonun önlenmesi için örnekler DNase ile muamele edildi. DNase enziminin etkinliği 65 °C'de sonlandırılarak ve RNA kalıntılarının parçalanması için EDTA eklendi (Çizelge 2.3.)

Çizelge 2.3. DNase uygulaması kullanılan kimyasal miktarları ve sıcaklık koşulları

Kimyasal	Miktar	Sıcaklık	Süre
RNA	3000ng	37°C	30dk
DNase I	3µl		
10X reaksiyon bufferı	3µl		
Nükleaz ari su	30µl'ye tamamlanır		

2.9.2. RNA'dan komplementer DNA (cDNA) Eldesi

Komplementer DNA (cDNA) eldesi, iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, CA, ABD) yardımıyla, üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak yapıldı. Buna göre; 20µL iScript reaction mix, 5µL iScript reverse transcriptase, 75µL RNA ile toplam 100 µL karışım hazırlandı. Hazırlanan bu karışım; 25 °C' de 5 dakika, 42 °C' de 30 dakika, 85 °C' de 5 dakika ve 4 °C' de bir süre, ısı döngüleyicide inkübe edildi (CFX96, Biorad CA, ABD) ve ardından elde edilen cDNA'nın spektrofotometrik olarak (Nanodrop C1000, Thermo, Almanya) miktarı ölçüldü (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. cDNA Sentez Reaksiyonu Kimyasal Koşulları

Kullanılan kimyasal	Miktarı
5X Reaksiyon Miksi	16µl
Reverse transkriptaz enzimi	3µl
Kalıp RNA (yoğunluğuna göre)	15-30µl
Nükleaz içermeyen su	60µl'ye tamamlandı

2.9.3. Kantitatif Real Time- PCR Analizi

Kantitatif eş zamanlı PZCR'da incelenecek gen bölgelerine özgü primerler mRNA üzerinde bulunan ekzonlara göre tasarlandı. Bu amaçla Genbank veri tabanından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ilgili genlere ait genomik DNA ve kodlanan DNA (coding DNA, cDNA) dizileri indirildi, Genscript (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>) ve BiSearch (Aranyi vd. 2006) primer tasarım araçları kullanıldı.

Bu primerlerin bağlanma sıcaklıkları ve özgünlükleri gradient konvansiyonel PCR ile belirlendi ve ardından SybrGreen kiti ile bağlanma sıcaklığı uygunluğu kontrol edilerek, belirlenen sıcaklık tüm örnekler üzerine uygulandı (Çizelge 2.6.). Her örnek için 2 teknik tekrar yapıldı ve elde edilen döngü eşik değeri (Cycle Threshold, CT) ve gruplar arası farklılıklar incelendi.

Çizelge 2.5. Kantitatif Real time PCR sitokin primerleri ve referansları

	F	R	Referans
TNF-α	5'- GATCTCAAAGACAACCAA CATGTG -3'	5'- CTCCAGCTGGAAGACTCCT CCCAG -3'	Shi ve ark 2010
IFN-γ	GGA ACT GGC AAA AGG ATG GTG AC	GCT GGA CCT GTG GGT TGT TGA C	Jones ve ark 2010
IL-12	5'- GACCATCACTGTCAAAGA GTTTCTAGAT-3'	5'- AGGAAAGTCTTGTTTTTGA AATTTTTTAA-3'	Mashayekhi ve ark 2011
IL-4	TCG GCA TTT TGA ACG AGG TC	GAA AAG CCC GAA AGA GTC TC	Jones ve ark 2010
IL-10	5'- GGGTTGCCAAGCCTTATCG GAAAT -3'	5'- TCTTCAGCTTCTCACCCAG GGAAT -3'	Shi ve ark 2010
β-actin	5'-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G-3'	5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3'	Zhang ve ark 2003

İfadesi ölçülecek genlerin K-PCR primer bağlanma sıcaklığı β - actin, TNF- α , IFN- γ , IL4, IL10 ve IL12 genleri 60 °C olarak belirlendi. İncelenen örneklerde ifade farklılıklarının belirlenebilmesi amacıyla gruplarda ölçülen döngü eşiği değerleri referans gene göre incelenerek delta delta ct değerleri (Pfaffl, 2001), bunlara göre de gen ifadesi değişiklikleri hesaplandı.

Çizelge 2.6. Kantitatif PCR'da kullanılan kimyasal ve sıcaklık protokolü

Kimyasal	Miktar	Sıcaklık (C°)	Süre (dk)	Döngü
iTaq Green	Syber 10 μ l	95	10:00	1
F primer	1 μ l			
R primer	1 μ l	95	00:10	49
cDNA	3 (100ng) μ l	60-62*	00:30**	
Nükleaz ari su	5 μ l			

2.10. Histolojik Skorlama ve İstatistik

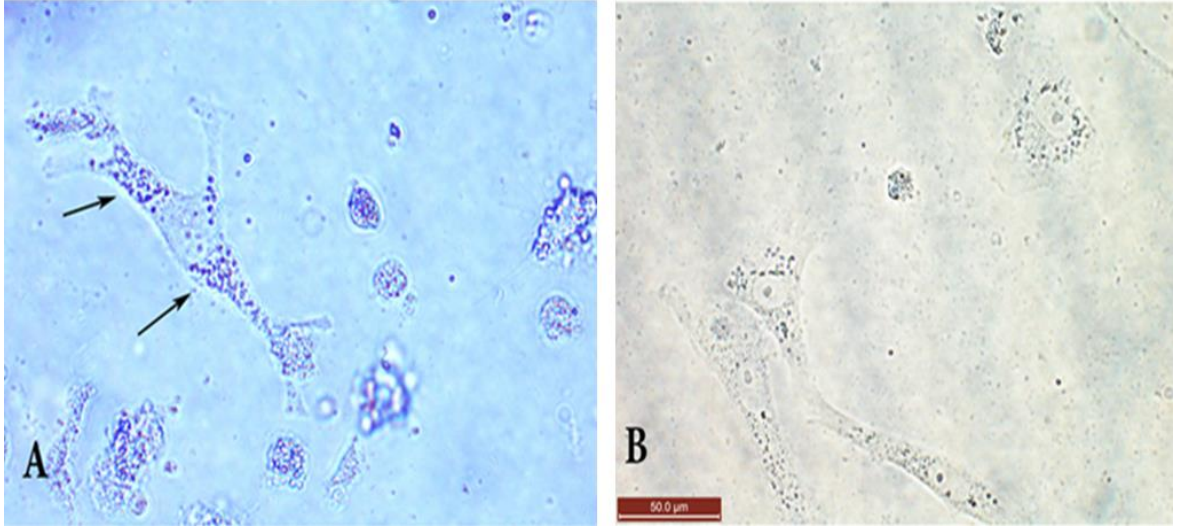
Leica DM 5000 kamera eklentili ışık mikroskobu ile immunohistokimyasal ve immunofloresan bulgular görüntüledi ve her bir hayvanın protokol numarasına göre tek tek dijital mikrofotografı çekildi. İmmüno pozitif boyanmalar, antijenin yoğunluğuna ve birim fotoğraf alan pozitif boyanmasına göre aşağıdaki şekilde semikantitatif olarak skorlandı. Buna göre; 0= Yok, 1= Hafif, 2= Orta şiddetli ve 3= Şiddetli olarak belirlendi.

Üç grubun bağımlı değişkenler, Real time PCR datası ve immünpatoloji ölçümü açısından karşılaştırılmasında, ötenazi günü (30, 60 ve 180) aynı olanlar Kruskal Wallis testiyle yapıldı.

BULGULAR

3.1. *Toxoplasma gondii* Takizoitlerinin Hücre Kültüründe Çoğaltılması

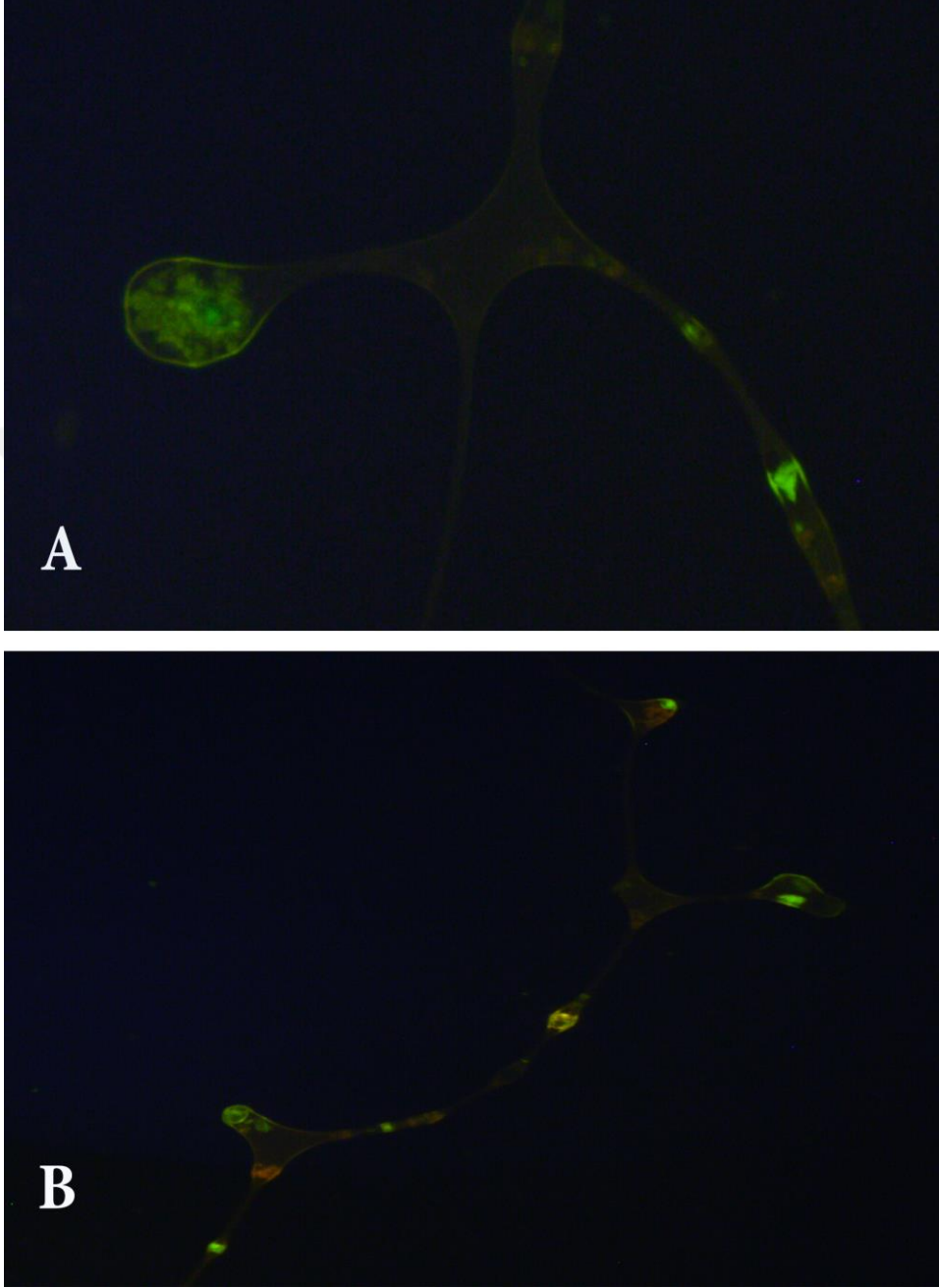
Vero hücre kültürüne eklenen GFP işaretli takizoitlerin 1 saat içinde hücreyi enfekte ettikleri gözlemlendi ve besi yerleri değiştirildi. 2ⁿ biçimde çoğalan takizoitlerin, üç günlük inkubasyon süresinin ardından yeterli sayıya ulaştıkları ve bazı vero hücrelerini patlattıkları gözlemlendi ve bunun üzerine tripsinize edilip, yeni flasklara ekimleri yapıldı (Şekil 3.1. A ve B). 10 güne kadar besi yeri değiştirilmeyen ve az besin ve oksijenle üzerlerinde stres oluşturulan flasklarda, takizoitlerin doku kisti benzeri yapılar aldıkları gözlemlendi.



Şekil 3.1. Vero hücreleri ve *Toxoplasma gondii* ME 49 takizoitleri (A) *Toxoplasma gondii* ME 49 takizoitleri (oklar) ve onlar tarafından enfekte edilmiş Vero hücreleri (2. Pasaj, 10. gün). (B) Takizoit enfekte Vero hücreleri (3. Pasaj, 3. gün).

Tripsinize edilen hücreler, serum fizyolojik ile sulandırıldı ve lamalar üzerine alınarak, floresan kamera eklentili mikroskopta GFP ışıltaması yönünden

değerlendirildi. Parlak yeşil ışıldamalar pozitif olarak kabul edildi (Şekil 3.2. A ve B).



Şekil 3.2. A ve B. ME 49 takizoitlerindeki pozitif GFP ışıldamaları.

3.2.Histopatolojik Bulgular

Araştırmada histopatolojik olarak beyin, karaciğer ve dalakta şekillenen değişiklikler gruplara göre aşağıda açıklanmıştır. Buna göre;

Kontrol Grubu (Grup K) (n=10); Başta serebral korteks olmak üzere beyin tüm bölgeleri özellikle de amigdalar bölge, orta beyin, talamus, hippocampus ve beyincik normal yapıda değerlendirildi. Nöronlarda; çekirdek, çekirdekçik ve sitoplazmada herhangi bir dejenerasyon/ nekroz dikkat çekmemiş olup, glial hücreler de normal yapıda gözlemlendi. 2 olguda karşılaşılan çok hafif nöron dejeneasyonu ve 1 olgudaki vaskülitis haricinde beyin hiçbir bölümünde yangısal ya da vasküler bir değişikliğe rastlanmadı.

Karaciğer örneklerinde; gerek periportal bölgede gerekse periasiner bölgede herhangi bir değişikliğe rastlanmamış olup, terminal portal venin etrafındaki safra kanalları normal yapıdaydı. Hepatositlerin stoplazma ve çekirdek büyüklükleri normal görünümde, Kupffer hücreleri sinüzoidal boşluklarda yer almaktaydı. Disse aralıkları, Remark kordonları ve sinüzoidal boşluklar normal görünümdeydi. Bunlarla birlikte, iki olguda vena centralis çevresinde hafif vakuoler dejenerasyon saptandı.

Dalak örneklerinde ise; lenfoid foliküller ve Malpighi korpusküllerinde normal yapı saptanmıştır. Sadece bir olguda, Malpighi korpusküllerinde hafif derecede hiperplazi dışında hiçbir patolojik değişikliğe rastlanmadı.

Grup I ve Grup II' de birbirine oldukça benzer histopatolojik bulgular elde edilirken, Grup III' te diğer gruplara oranla daha hafif nöropatolojik değişikliklere rastlandı.

Kontrol hariç tüm gruplarda başlıca; nöron dejenerasyon ve nekrozu, gliozis, satellitoz, perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları, non-purulent meningitis ve vasküler olarak da vaskülitis ve kapillar endotel hipertrofisine rastlandı. Bununla birlikte; grupların hiçbirinde doku kistiyle karşılaşılmadı. Bu lezyonlar daha çok

beynin; serebral korteks, talamus, kaudat- putamen (striatum), amigdala, hippocampus ve substantia nigra bölgelerinde yer alırken, serebellumda Grup I'de 1, Grup II'de 1 ve Grup III'te 2 olmak üzere sadece dört olguda histopatolojik değişikliklere rastlandı.

Grup I(n=10)' de; beyinde özellikle talamik bölge ve orta beyinde orta şiddetten şiddetliye değişen nöronal dejenerasyon ve nekrozlara ve bu nöronların etrafında da hafiften ortaya değişen glial hücre birikimine (satellitosis) rastlandı. Bununla birlikte bu gruptaki olguların tamamında vasküler değişikliklere (Şekil 3.3. A ve B) rastlanırken, meningitis ve perivasküler hücre infiltrasyonlarıyla bazı vakalarda karşılaşıldı (Çizelge 3.1.).

Karaciğerde; orta ve şiddetli biçimde hem hepatohüresel hem de multifokal sentrilobuler nekroz odaklarıyla karşılaşıldı. Ayrıca, yine tüm olgularda hepatositlerde vakuolasyon, sinüzoidal boşluklarda ve fokal odaklar halinde ortadan şiddetliye değişen derecelerde, makrofaj ve lenfositlerce zengin, mononükleer hücre infiltrasyonları gözlemlendi.

Dalakta; çok fazla bir histopatolojik değişikliğe rastlanmazken, olguların çoğunda lenfoid folikül hiperplazisi, hafif derecede sinüzoidal makrofaj infiltrasyonu ve hemoraji dikkat çekti.

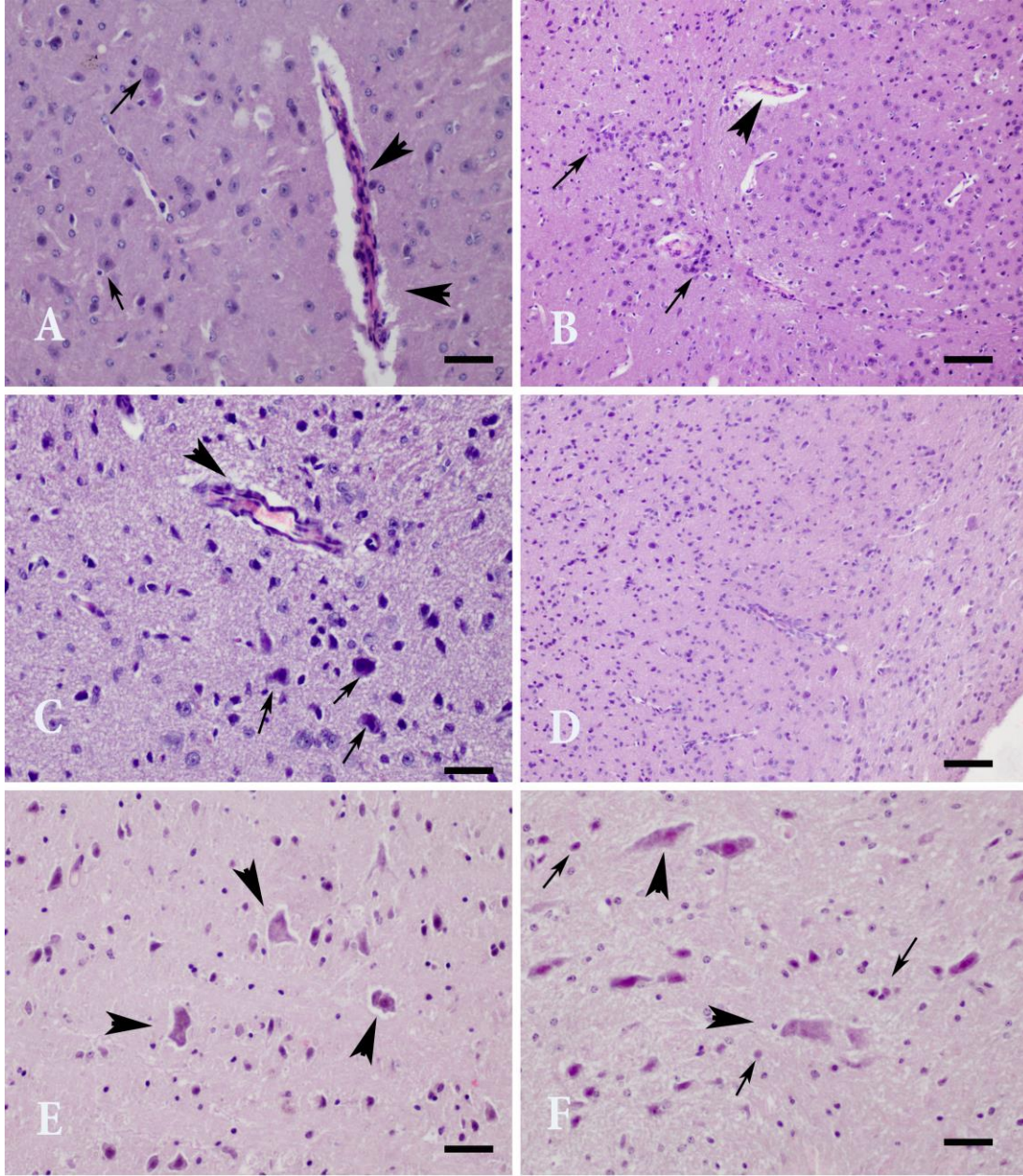
Grup II' de ve Grup III' te Grup I' dekine benzer bölgelerde ve benzer şiddetlerde nöronal dejenerasyon ve nekrozu, satellitosis ve gliozise rastlandı (Şekil 3.3. C-F)Grup II' de Grup I ve III' e göre daha şiddetli bir meningitis tablosu şekillenirken, yine tüm gruplarda bazı olgularda hafiften ortaya değişen şiddette perivasküler hücre infiltrasyonları tespit edildi (Çizelge 3.1.).

Grup II karaciğer örneklerinde yine Grup I ile benzer histopatolojik bulgular saptanırken, bunlara ek olarak 7 olguda, şiddetli biçimde konjesyonlara ve kanamalara rastlandı.

Dalak örneklerinde, lenfoid hiperplazisi yanı sıra, Malpighi korpuskülleri ve sinüzoidlerde ödem ile 6 olguda beyaz pulpada multifokal kanamalara rastlandı.

Çizelge 3.1. Gruplara göre beyinde şekillenen nörohistopatolojik değişiklikler ve şiddetleri. Lezyon şiddeti; Yok: 0, Hafif: 1, Orta: 2, Şiddetli:3 olarak değerlendirildi.

		Nöron Dejenerasyon/ Nekroz	Gliozis	Satellitosis	Perivas. Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	Meningit	Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	Vaskülit
Grup I	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
Grup II	1	2	2	1	1	2	1	1
	2	2	2	1	0	0	1	1
	3	2	1	1	0	0	1	1
	4	2	1	1	1	2	1	1
	5	2	1	1	0	0	0	1
	6	2	1	1	0	1	1	1
	7	2	2	2	1	1	0	1
	8	2	1	1	0	0	0	1
	9	2	2	2	1	0	1	2
	10	1	1	1	0	0	0	2
Grup III	1	2	2	2	1	1	0	0
	2	1	1	1	0	0	0	1
	3	1	1	1	0	0	1	1
	4	1	1	1	0	0	0	1
	5	2	1	1	0	0	1	1
	6	2	1	1	0	0	1	1
	7	1	1	2	1	1	0	1
Grup K	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	1	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	1
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	1	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0



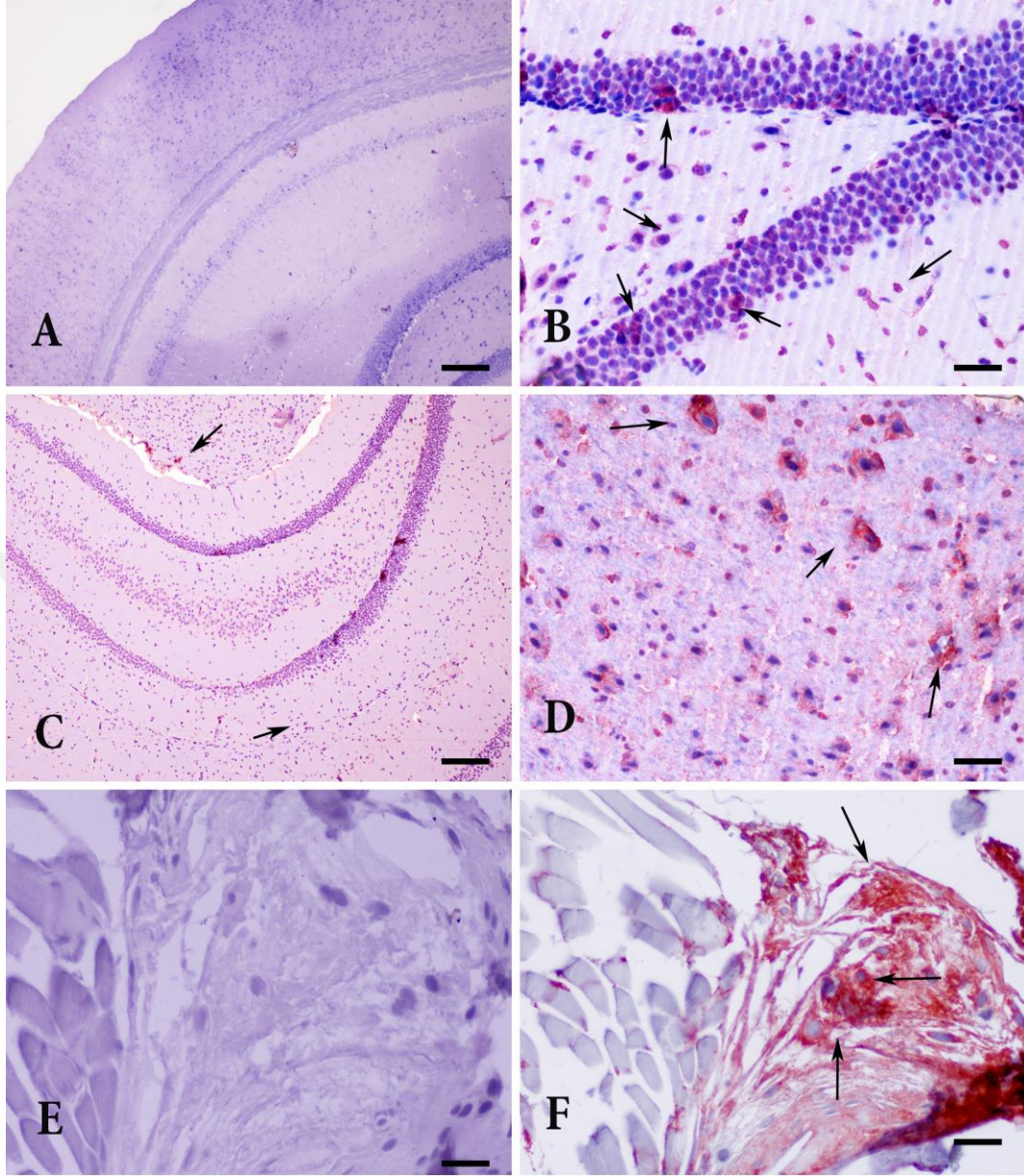
Şekil 3.3. Grup I, II ve III' teki nörohistopatolojik değişiklikler. (A) Amigdalar bölge. Grup I' de nöronal dejenerasyon (ok) ile vaskülitis ve endotelial hipertrofi, HE, Bar = 100µm **(B)** Striatum. Grup I' de fokal mononükleer hücre infiltrasyonları (ok başı), HE, Bar = 200µm. **(C)** Talamus. Grup II' de vaskülit ve hafif şiddette perivasküler hücre infiltrasyonu (ok başı), nöron dejenerasyon ve nekrozları (ok), HE, Bar = 100µm. **(D)** Serebral korteks. Grup II' de vaskülit, perivasküler hücre infiltrasyonları, nöron dejenerasyonları ve gliosis odakları, HE, Bar = 200µm. **(E)** Amigdala. Grup III' te Çekirdekleri kaybolmuş, eozinofilik, nekrotik nöronlar (ok başı), HE, Bar = 100µm. **(F)** Ventral tegmental alan. Grup III' te dejenerasyona ve nekroza uğramış nöronlar (ok başı), mikoglia aktivasyonu (ok), HE, Bar = 100µm.

3.3.İmmunoperoksidaz Bulgular

3.3.1.*Toxoplasma gondii* Takizoitlerinin İmmunoperoksidaz ile Saptanması

Yapılan testlerde kontrol grubunda, *T. gondii* antijenine karşı hiçbir immunoreaksiyon gözlenmezken, diğer grupların tamamında özellikle serebral korteks, hippocampus, amigdalar bölge, striatum ve substantia nigrada ortadan şiddetliye değişen immunopozitifliklere rastlandı (Şekil 3.4. A- D).

Şiddetli immunopozitifliklere; hippocampusta piramidal nöronlarda (Şekil 3.4. B), substantia nigrada glial hücreler ve astrositler (Şekil 3.4. C) ve amigdalada dejenere nöronlar ile astrositlerde (Şekil 3.4. D) rastlandı. Diğer bölgelerde ise daha hafif ve orta şiddette immunoreaksiyonlara rastlandı. Bunlarla birlikte, enfekte hücrelerin olduğu bölgelerde gliozis ve mononükleer hücre infiltrasyonları da dikkat çeken bulgular arasında yer aldı.



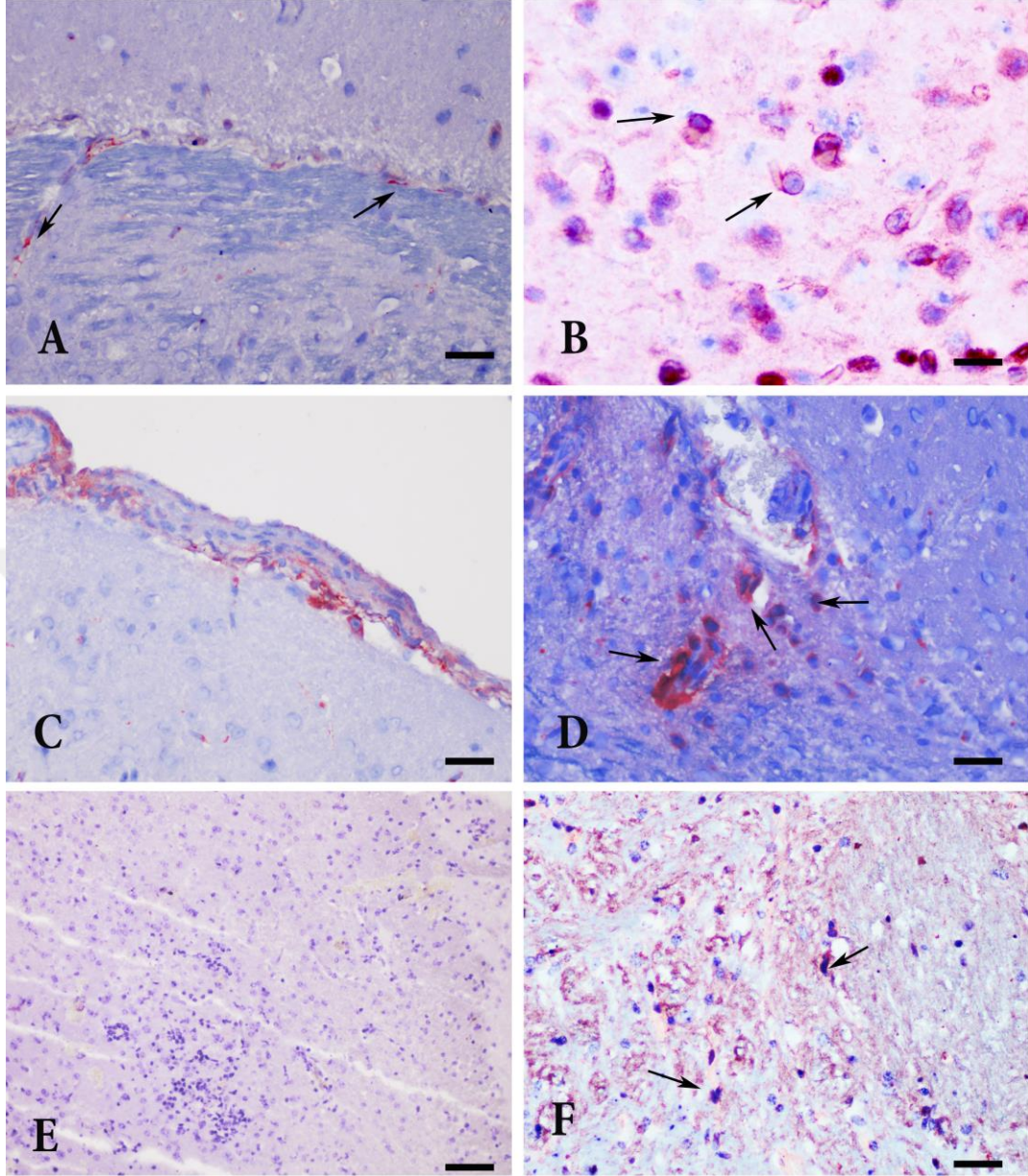
Şekil 3.4. *Toxoplasma gondii* spesifik antijenlerin tüm gruplarda gösterilmesi. (A) Hippocampus ve neokorteks. İmmunoreaktivite göstermeyen Grup K, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test, AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm (B) Hippocampus. Grup I, nöronlarda orta şiddette immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm (C) Subs. nigra ve hippocampus. Grup II’ de orta şiddette immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm (D) Amigdala. Grup III’ te nöron ve astrositlerde şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm (E) ME49 enfekte fare- kas dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm (F) ME49 enfekte fare- kas dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm.

3.3.2. Merkezi Sinir Sistemindeki Başışıklık Hücrelerinin İmmunoperoksidaz ile Gösterimi

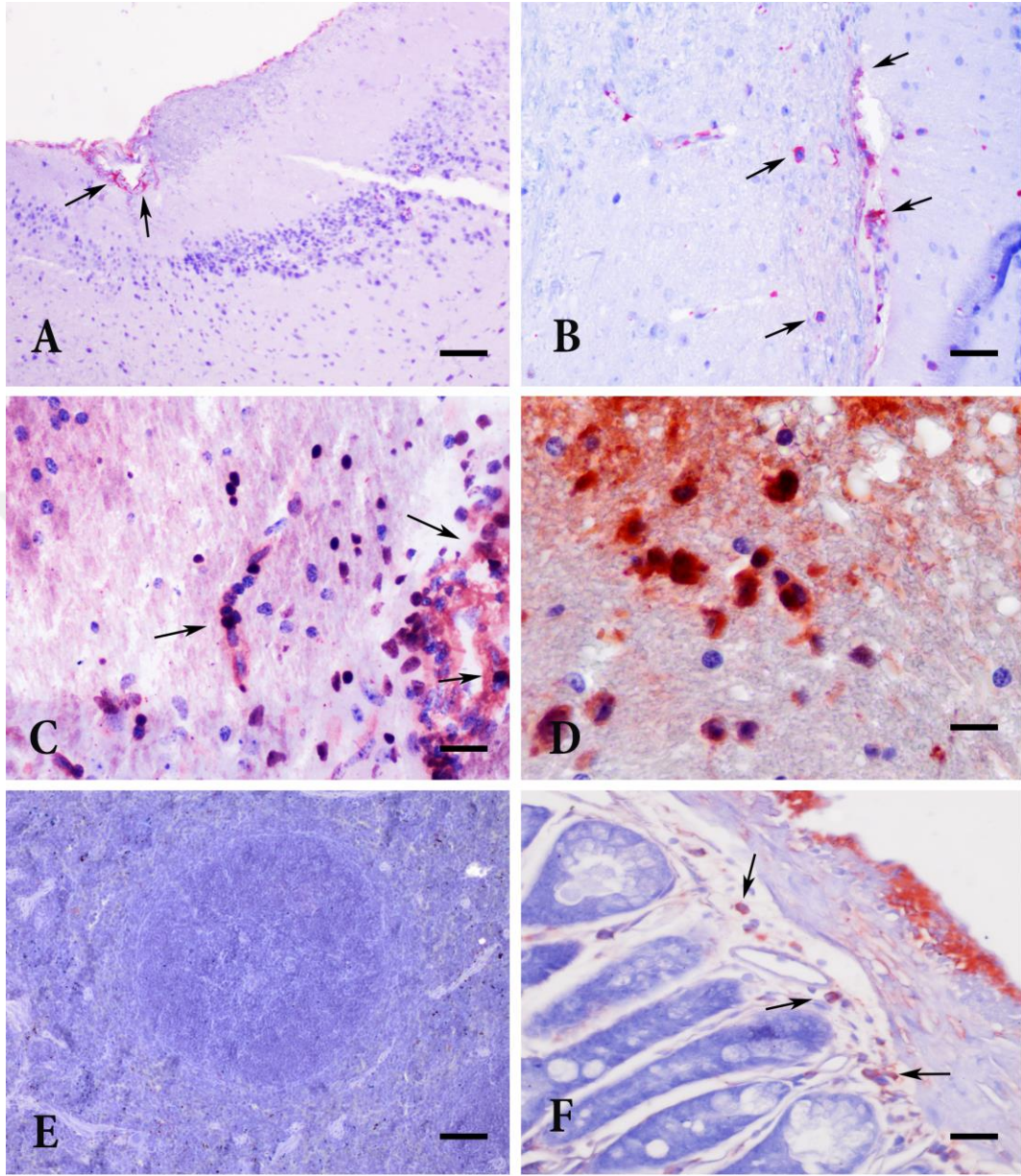
Bu çalışmada kronik toksoplazmozda önemli rol oynadığı düşünölen CD4+, CD8+, FOXP3+, CD11b+, CD11c+ hücreler ile astrositler ve B lenfositler değerlendirildi.

Tüm gruplar değerlendirildiğinde, Grup K' deki yangı hücresi popülasyonu diğer gruplara göre çok daha düşük olmakla beraber, B lenfosit miktarı Grup I ile eşdeğerdi. CD4+ hücre varlığıyla en sık Grup II' de karşılaşıldı. Grup II' de yine CD4+ hücre ve CD8+ hücre yoğunlukları benzerlik gösterirken, CD8+ hücrelerin en çok Grup III te gözlendi. FOXP3+ hücre düzeyi Grup III hariç tüm grupta oldukça düşüktü. CD11b+ ve CD11c+ hücrelere ise kontrol grubu hariç diğer tüm gruplarda hemen hemen aynı miktarlarda rastlandı (Grafik 3.2.).

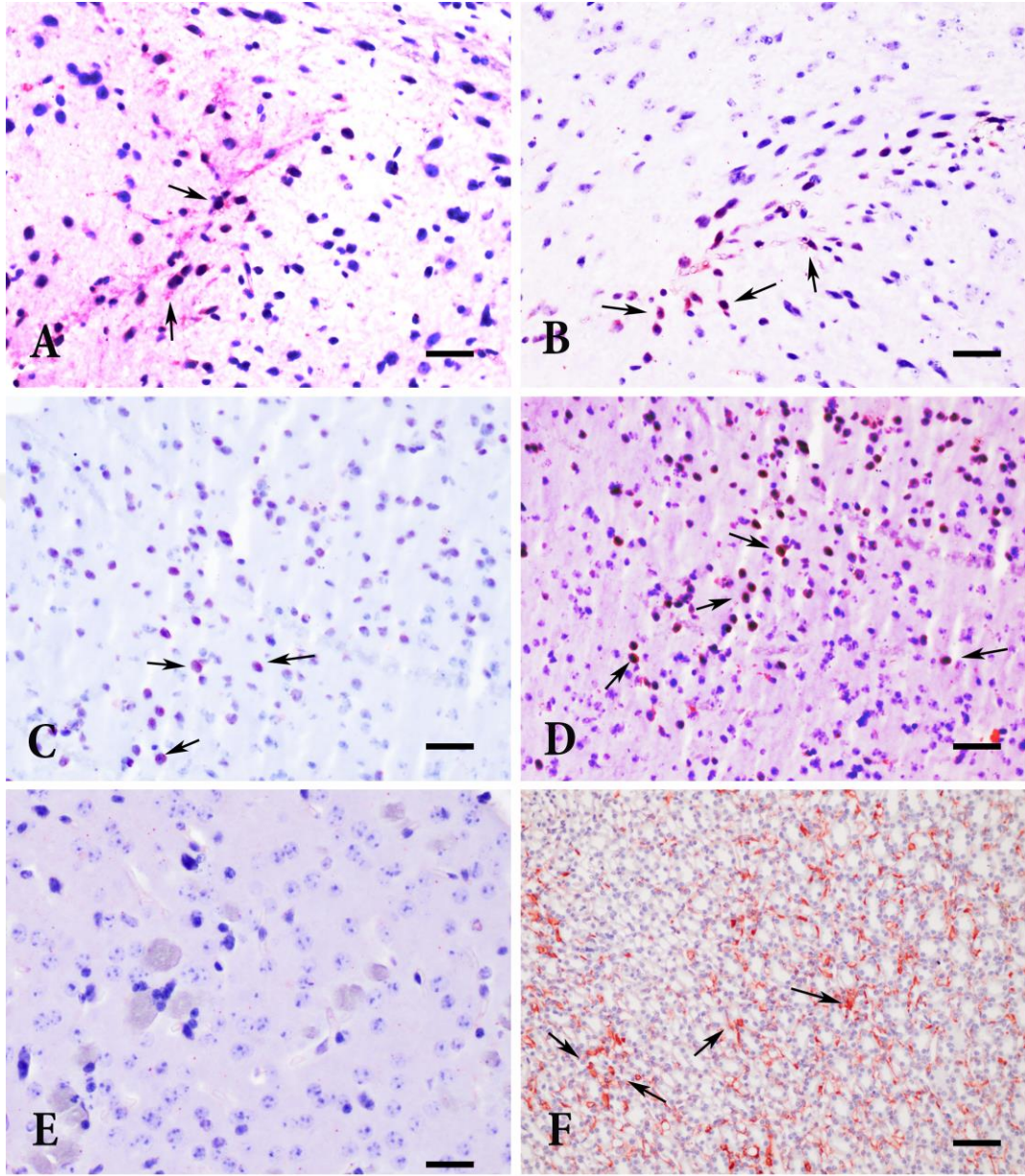
CD4+ hücrelere, Grup I ve II' de beynin hemen her bölgesinde rastlanırken, Grup III' te daha çok striatum, amigdala ve ventral tegmental alanda rastlandı (Şekil 3.5.). CD8+ hücrelere tüm gruplarda ventral tegmental alan ve substantia nigrada daha fazla rastlanırken (Şekil 3.6.), CD11b+ ve CD11c+ hücre yoğunlukları serebral korteks, talamus ve yine beynin basalinde daha yoğundu (Şekil 3.8. ve 3.9.) (Çizelge 3.2.). FOXP3+ hücre popülasyonu da daha çok ventral tegmental alan ile substantia nigrada yoğunlaşmış biçimdeydi (Şekil 3.7.). Tüm bunlarla beraber, tüm çalışma gruplarında beynin neredeyse her bölgesinde yoğun GFAP immunoreaktivitesine rastlandı (Şekil 3.10.).



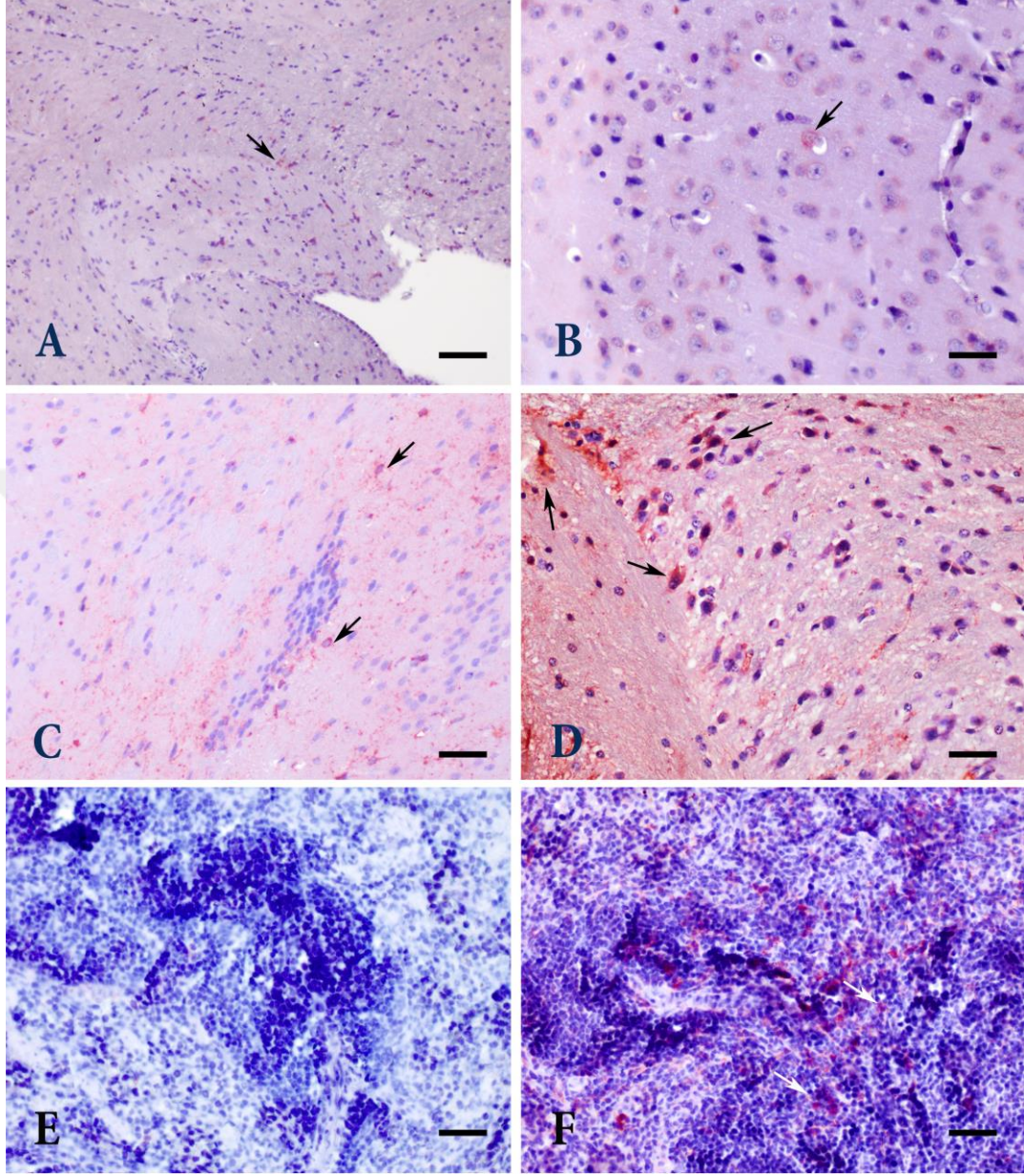
Şekil 3.5. CD4+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi (A) Striatum. Grup K, hafif immunopozitiflikler, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(B)** Amigdala. Grup I, orta şiddette immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 50µm. **(C)** Serebal korteks. Grup II' de meningslede ve damar duvarında duvara entegre olmuş CD4+ hücrelerde orta şiddette immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(D)** Ventral tegmental alan. Grup III' te orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(E)** ME49 enfekte fare-beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(F)** ME49 enfekte fare-beyin dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm.



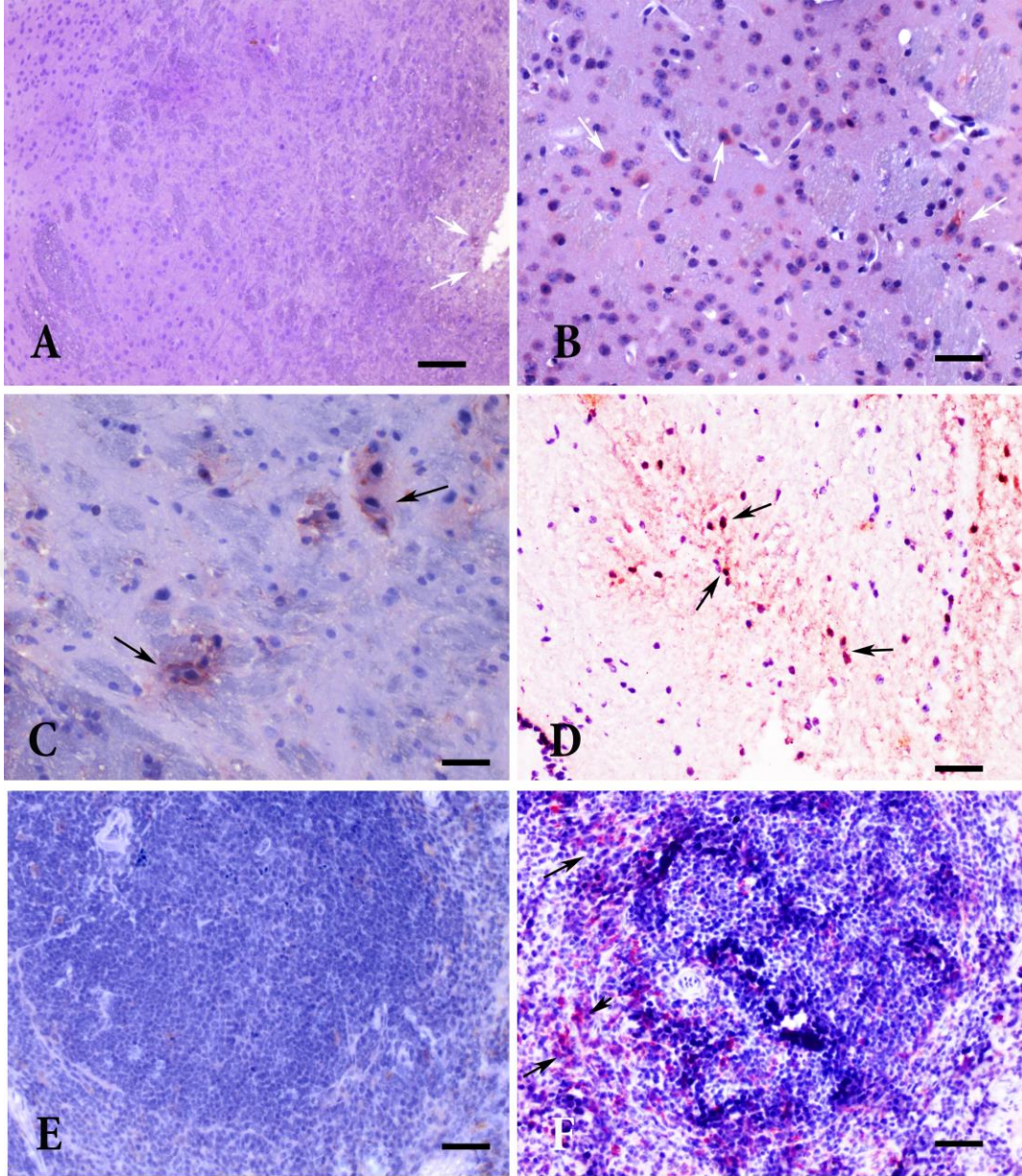
Şekil 3.6. CD8+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi (A) Hippocampal fisür. Grup K, hafif immunopozitiflikler, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(B)** Kaudat. Grup I, hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(C)** Talamus. Grup II' de orta şiddette immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(D)** Substantia nigra. Grup III' te şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 50µm. **(E)** ME49 enfekte fare- dalak dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(F)** ME49 enfekte fare-bağırsak dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm.



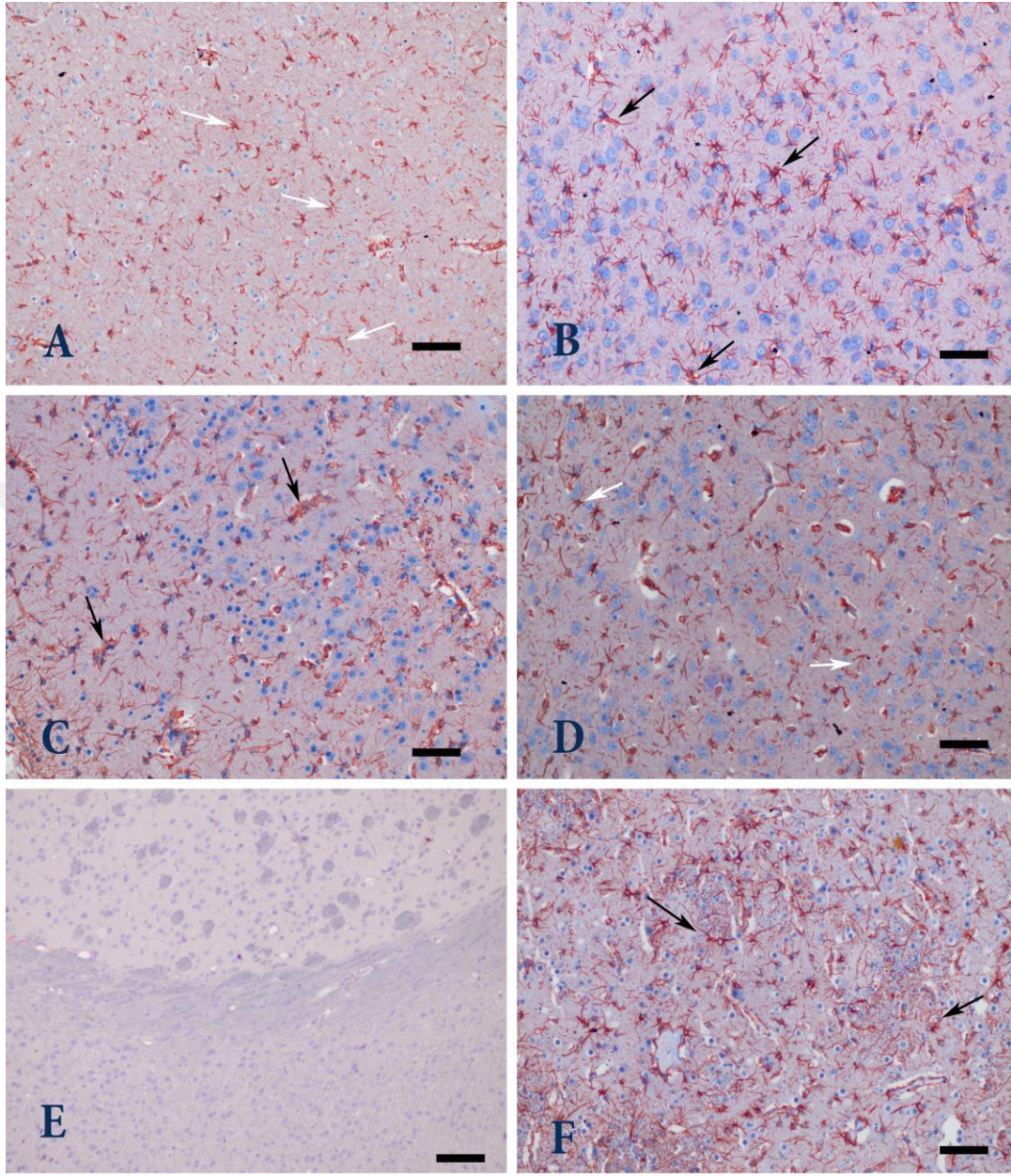
Şekil 3.7. FOXP3+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi (A) Striatum. Grup K, hafif immunopozitiflikler, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. (B) Serebral korteks. Grup I, hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. (C) Talamus. Grup II' de hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. (D) Talamus. Grup III' te orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. (E) ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. (F) ME49 enfekte fare-böbek dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm.



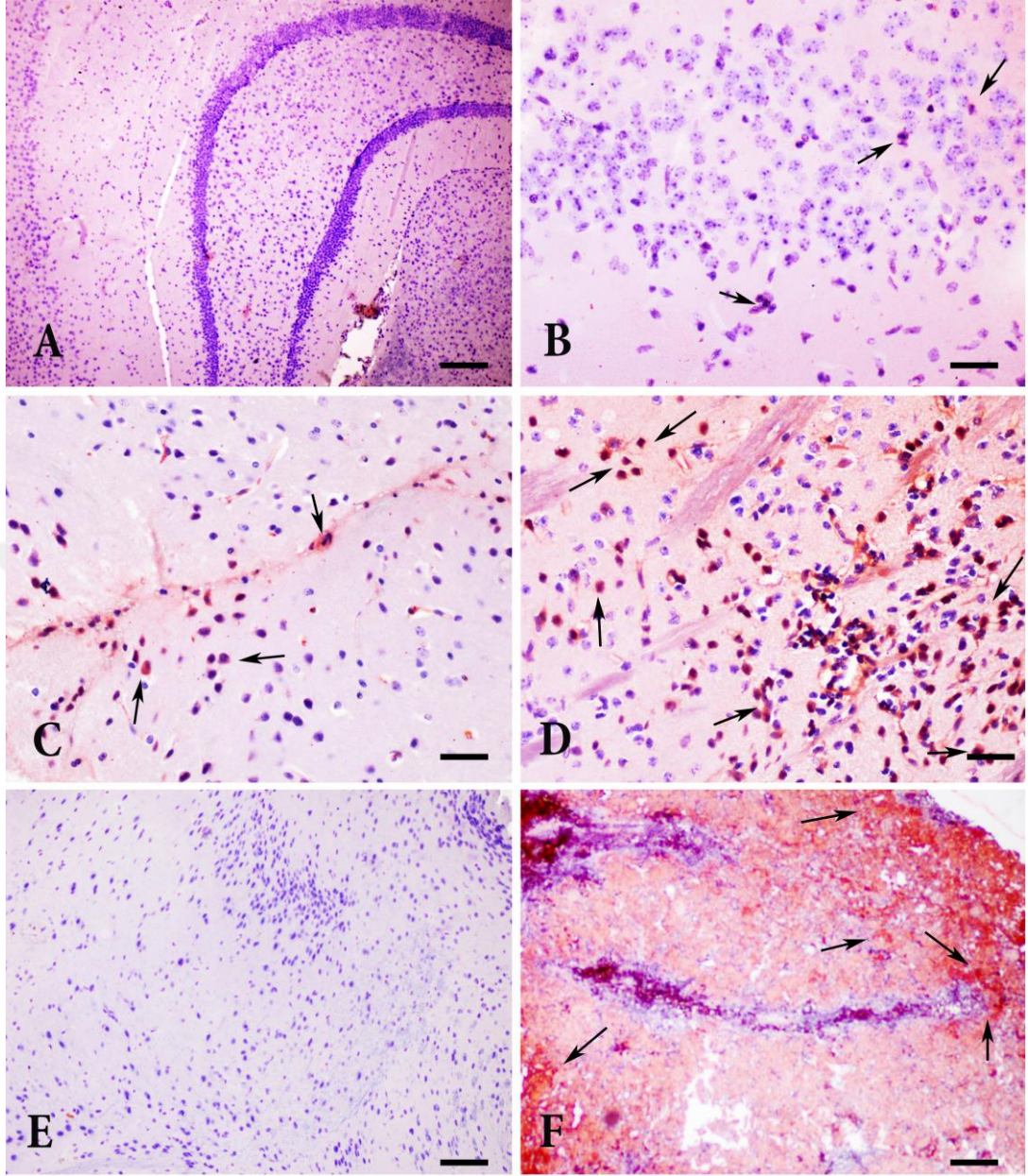
Şekil 3.8. CD11b+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi (A) Substantia nigra Grup K, hafif immunopozitiflikler, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(B)** Serebral korteks. Grup I, orta derecede immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(C)** Striatum. Grup II' de hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(D)** Talamus. Grup III' te şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(E)** ME49 enfekte fare- dalak dokusu. Negatif kontrol, AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, 200X **(F)** ME49 enfekte fare-dalak dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm.



Şekil 3.9. CD11c+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi (A) Orta beyin Grup K, oldukça hafif immunopozitiflikler, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(B)** Serebral korteks. Grup I, orta derecede immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(C)** Striatum. Grup II' de hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(D)** Ventral tegmental alan. Grup III' te orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(E)** ME49 enfekte fare- dalak dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(F)** ME49 enfekte fare-dalac dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm.



Şekil 3.10. GFAP+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi (A-D) Sırasıyla Grup K, Grup I, Grup II ve Grup III'te şiddetli immunopozitivite gösteren astrositler, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, (A) Bar = 200µm. (B-D) Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 100µm. (E) ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 200µm. (F) ME49 enfekte fare-beyin dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 100µm.



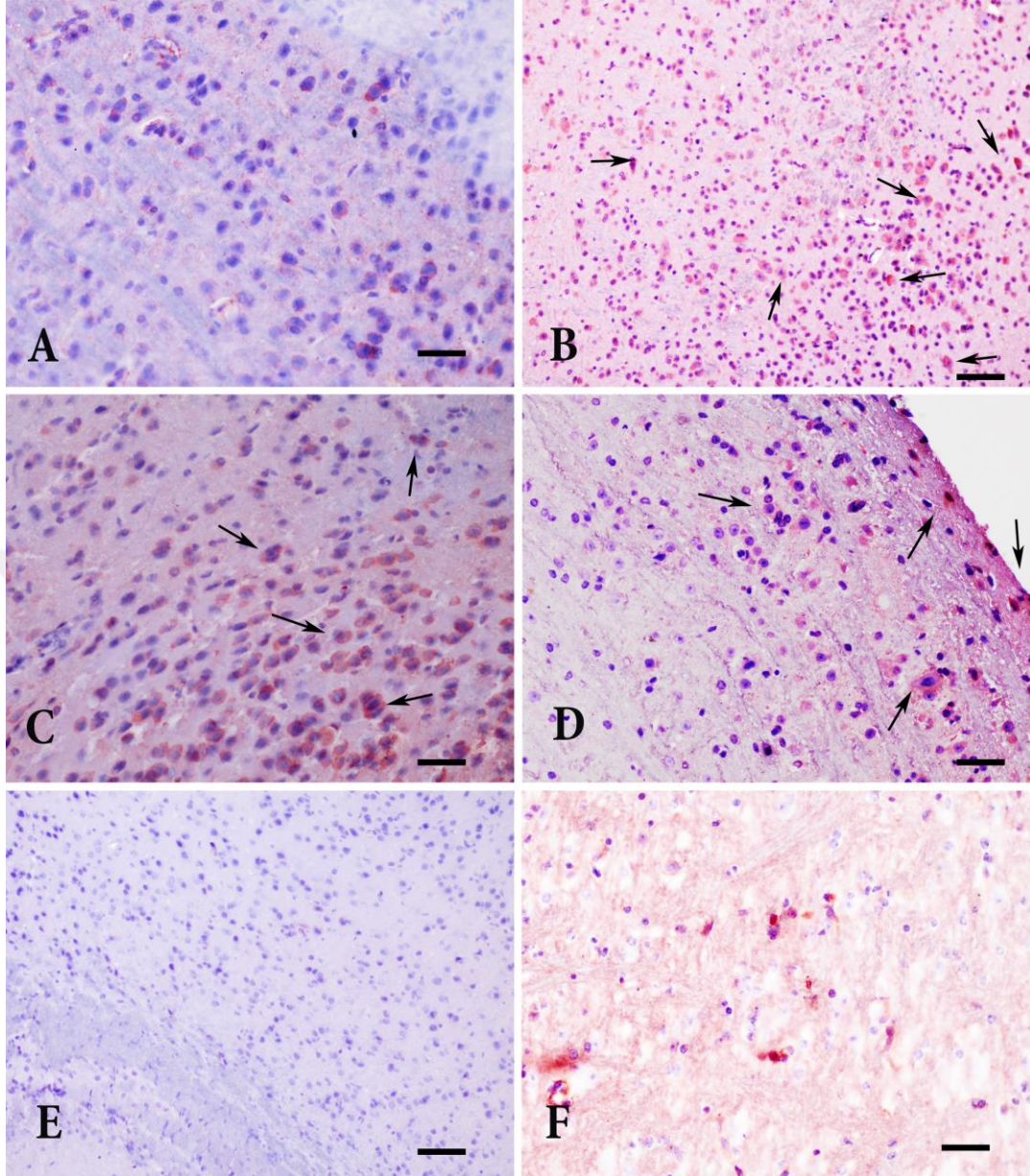
Şekil 3.11. CD19+ hücrelerin immunoreaktivitelerinin gruplara göre gösterimi (A) Hippocampal alan Grup K, oldukça hafif immunopozitiflikler, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(B)** Hippocampus. Grup I, orta derecede immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(C)** Striatum. Grup II’ de hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(D)** Substantia nigra. Grup III’ te orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(E)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(F)** ME49 enfekte fare-dalac dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm.

3.3.3. Merkezi Sinir Sistemindeki Sitokinlerin İmmunoperoksidaz ile Gösterimi

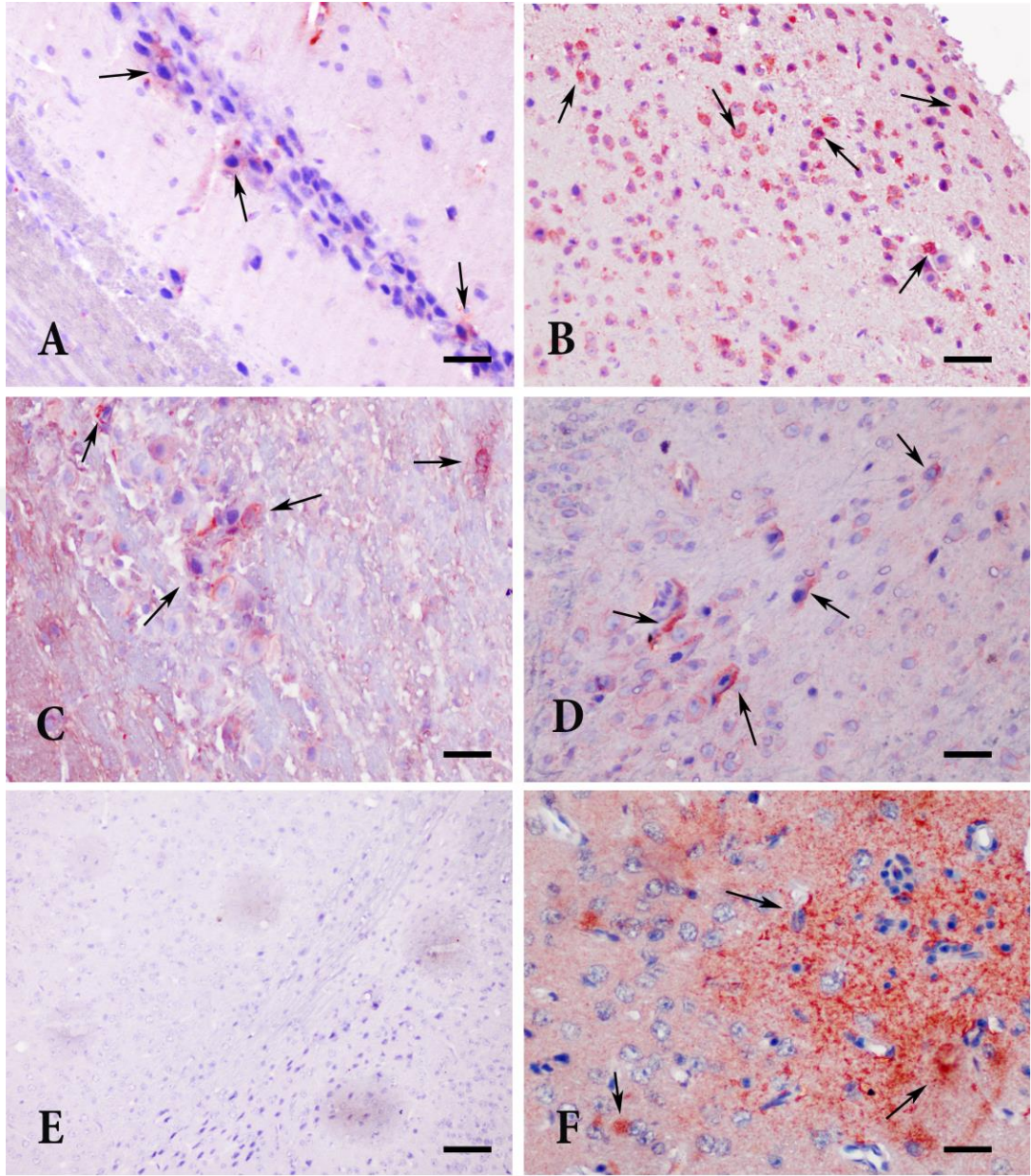
Toxoplasma gondii varlığının ve etkilediği MSS hücrelerinin yanı sıra ensefalitik toksoplazmozun patogeneğinde önemli yeri olabilecek sitokinler olan; TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 ve IL-18 değerlendirildi.

Buna göre; TNF- α , IFN- γ ve IL-12 proenflamatuar sitokin ekspresyonlarının Grup I' den Grup III' e gelindikçe zamanla azaldığı tam aksine anti-enflamatuar sitokinler olan IL-4 ve IL-10'un ise arttığı gözlemlendi. IL-1 β ve aynı gruptan olan IL-18'in Grup I' de en fazla, grup III' te ise en az olduğu tespit edildi (Grafik 3.3.).

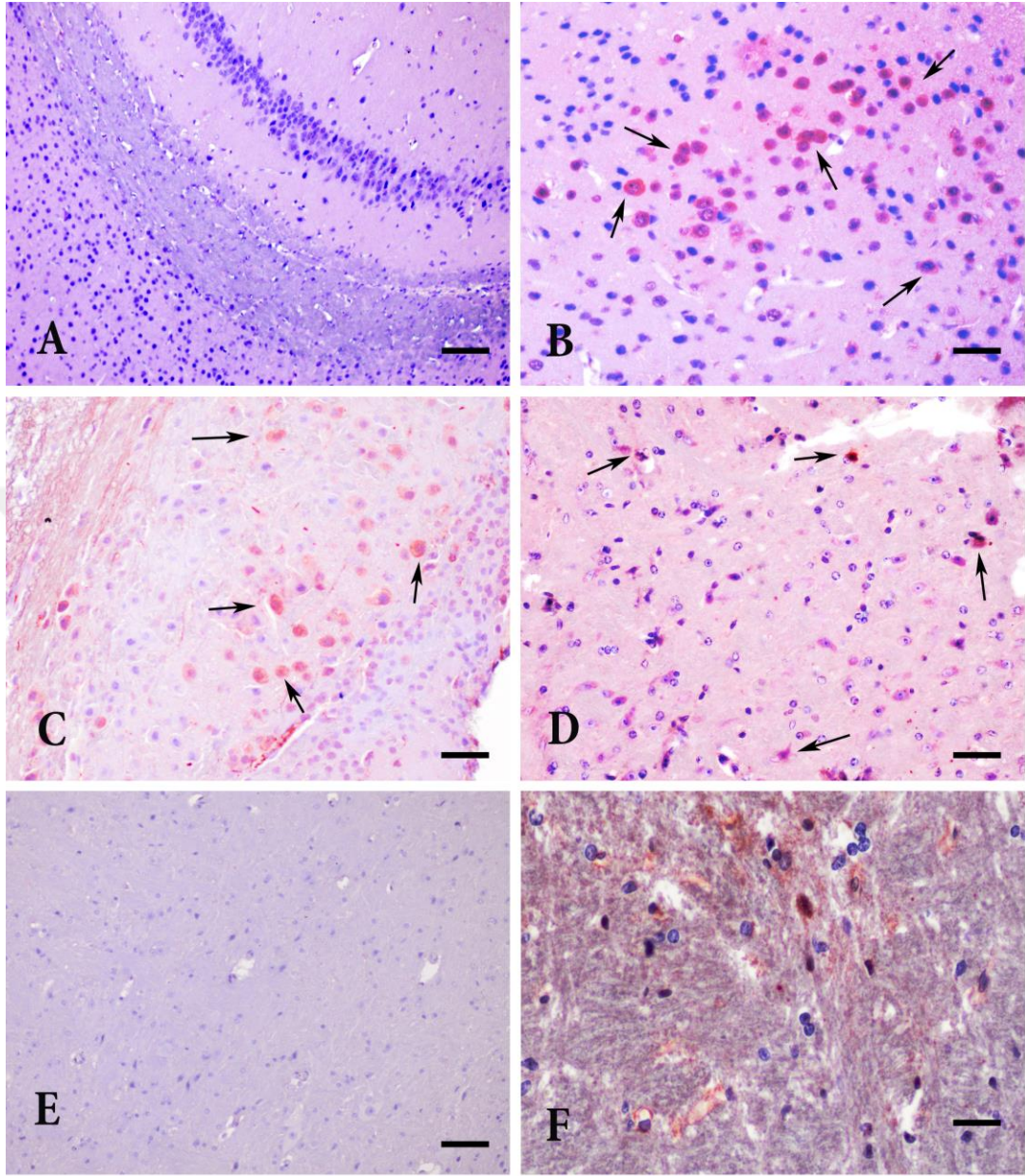
TNF- α , IFN- γ ve IL-12 ekspresyonlarının Grup K hariç, tüm gruplarda en fazla beynin serebral korteksinde, striatumunda ve amigdalar bölgesinde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.12., 3.13. ve 3.19). IL-5 ve IL-6' nın hemen hemen aynı bölgelerde aynı hücrelerden salındığı ve yine benzer oranlarda dikkati çekmiştir (3.16. ve 3.17). IL-4 ve IL-10'nun daha çok orta beyinden eksprese edildiği dikkat çekmiştir (3.12. ve 3.18.).



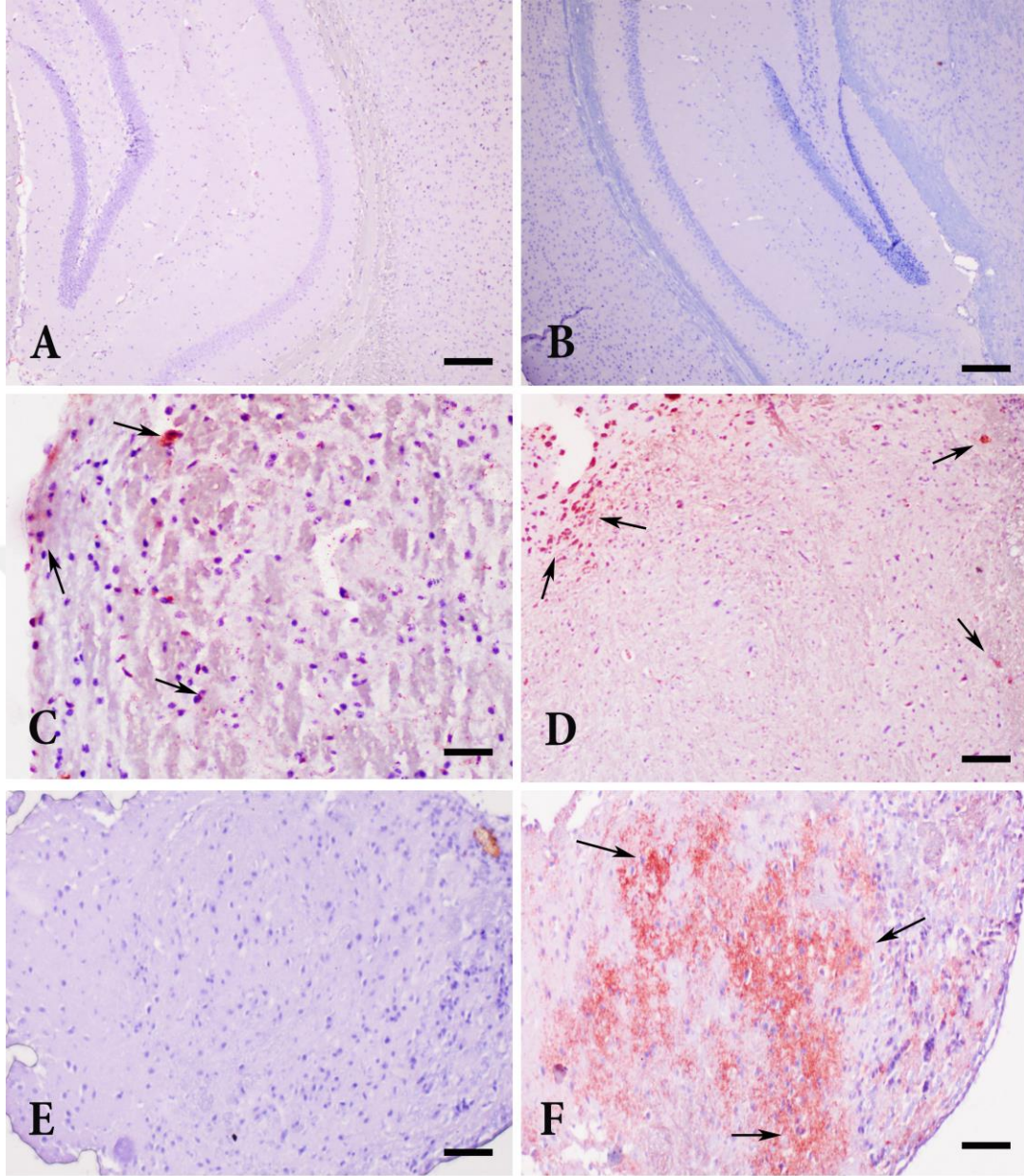
Şekil 3.12. TNF- α ' nın gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Talamus. Grup K hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100 μ m. **(B)** Serebral korteks. Grup I, şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200 μ m. **(C)** Serebral korteks. Grup II' de şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100 μ m. **(D)** Neokorteks. Grup III' te nöron ve astrositlerde şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200 μ m. **(E)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200 μ m. **(F)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100 μ m.



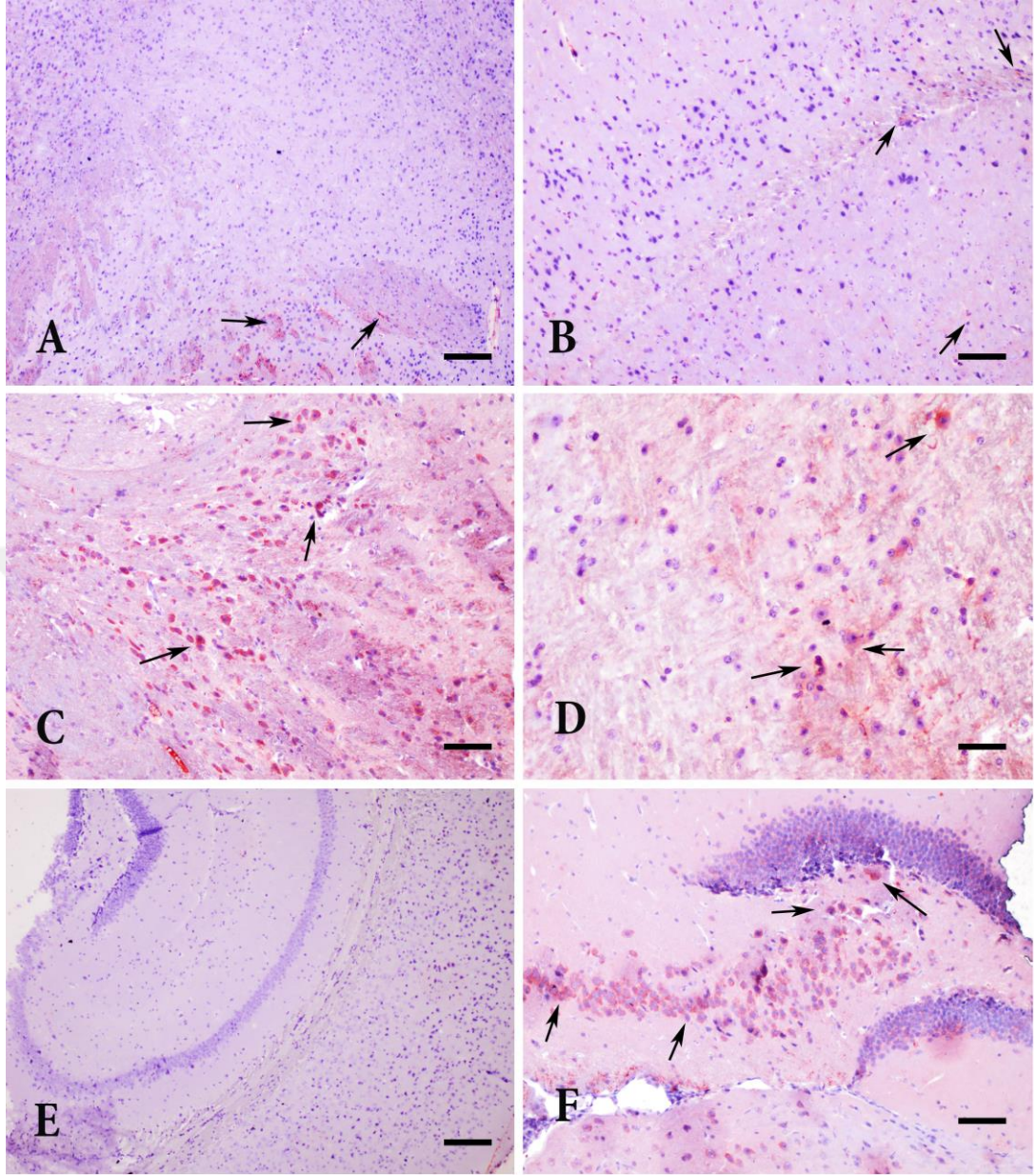
Şekil 3.13. IFN- γ ' nın gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Hippocampus. Grup K hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100 μ m. **(B)** Serebral korteks. Grup I, şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200 μ m. **(C)** Striatum. Grup II' de orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100 μ m. **(D)** Amigdala. Grup III' te orta derecede immunopozitiflik, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100 μ m. **(E)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200 μ m. **(F)** ME49 enfekte fare-beyin dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100 μ m.



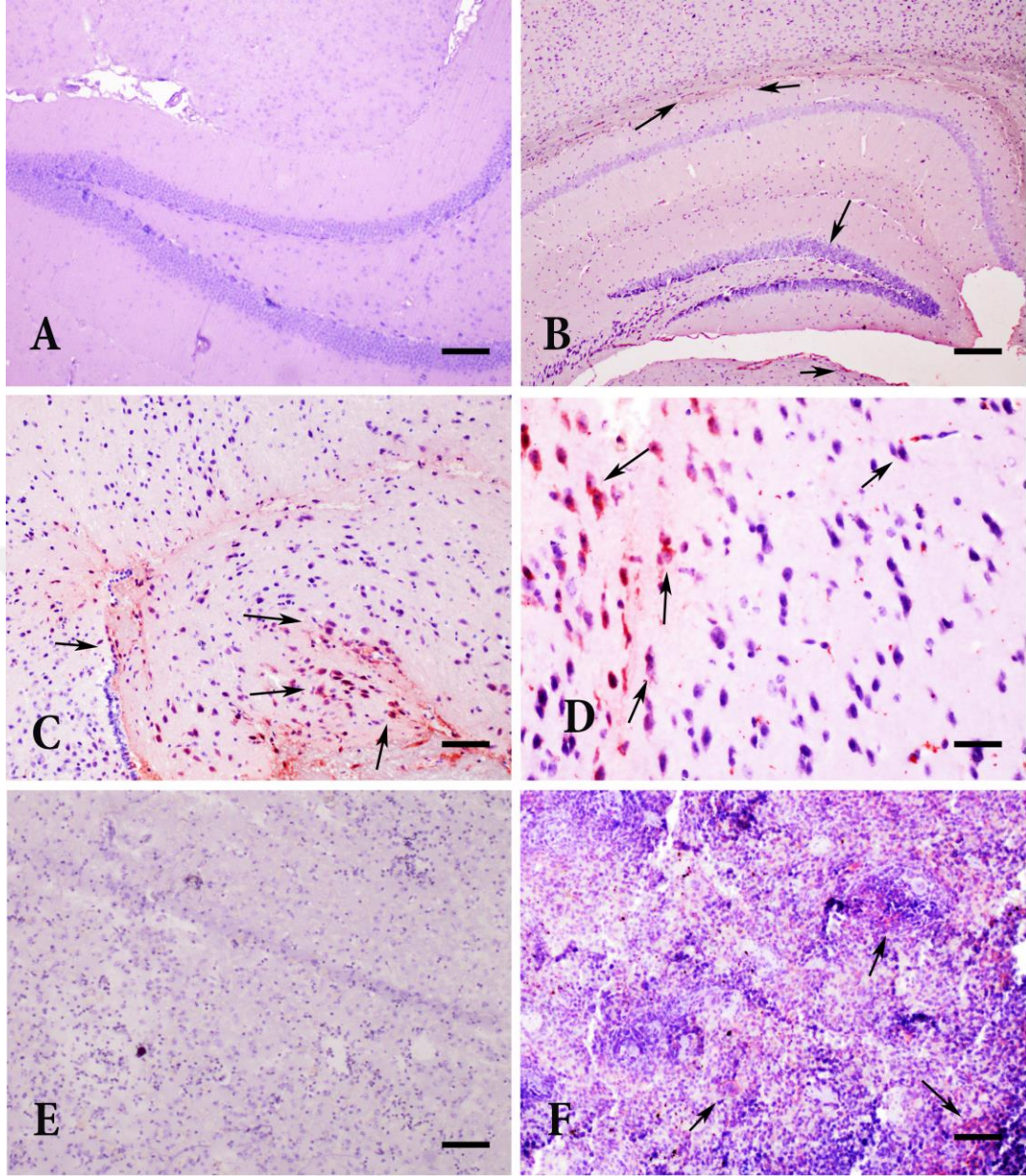
Şekil 3.14. IL-1 β ' nın gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Hippocampus. İmmun reaksiyon vermeyen Grup K, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 100 μ m. **(B)** Striatum. Grup I, orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 200 μ m. **(C)** Ventral tegmental alan. Grup II' de orta derecede immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 200 μ m. **(D)** Subst. nigra. Grup III' te hafif immunopozitiflik, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 200 μ m. **(E)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, 100X **(F)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 100 μ m.



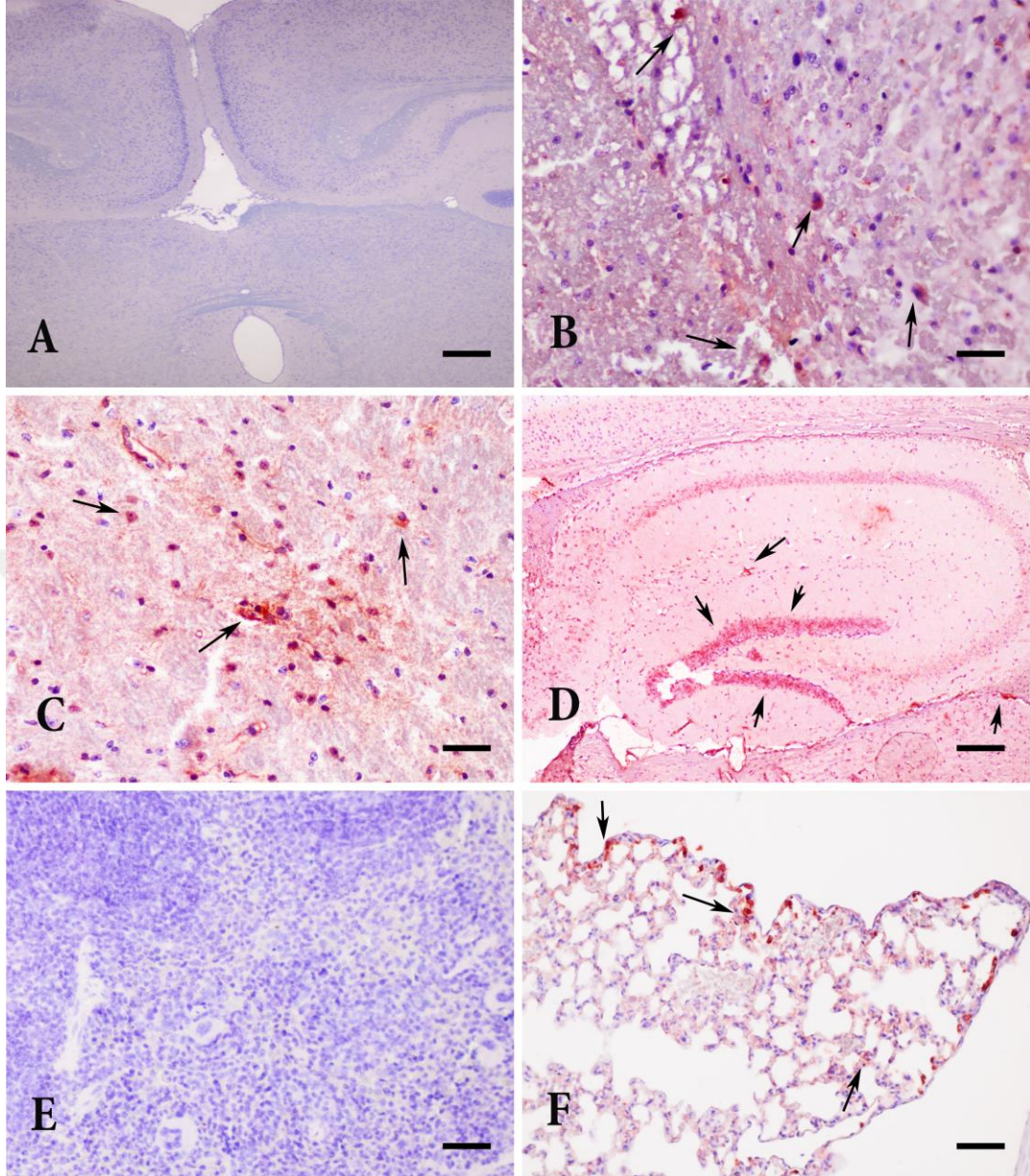
Şekil 3.15. IL-4' ün gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Hippocampal bölge. İmmun reaksiyon vermeyen Grup K, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(B)** Hippocampal bölge. İmmun reaksiyon vermeyen Grup I, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(C)** Amigdala. Grup II' de orta derecede immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(D)** Subst nigra. Grup III' te orta derecede immunopozitiflik, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(E)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(F)** ME49 enfekte fare-beyin dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm.



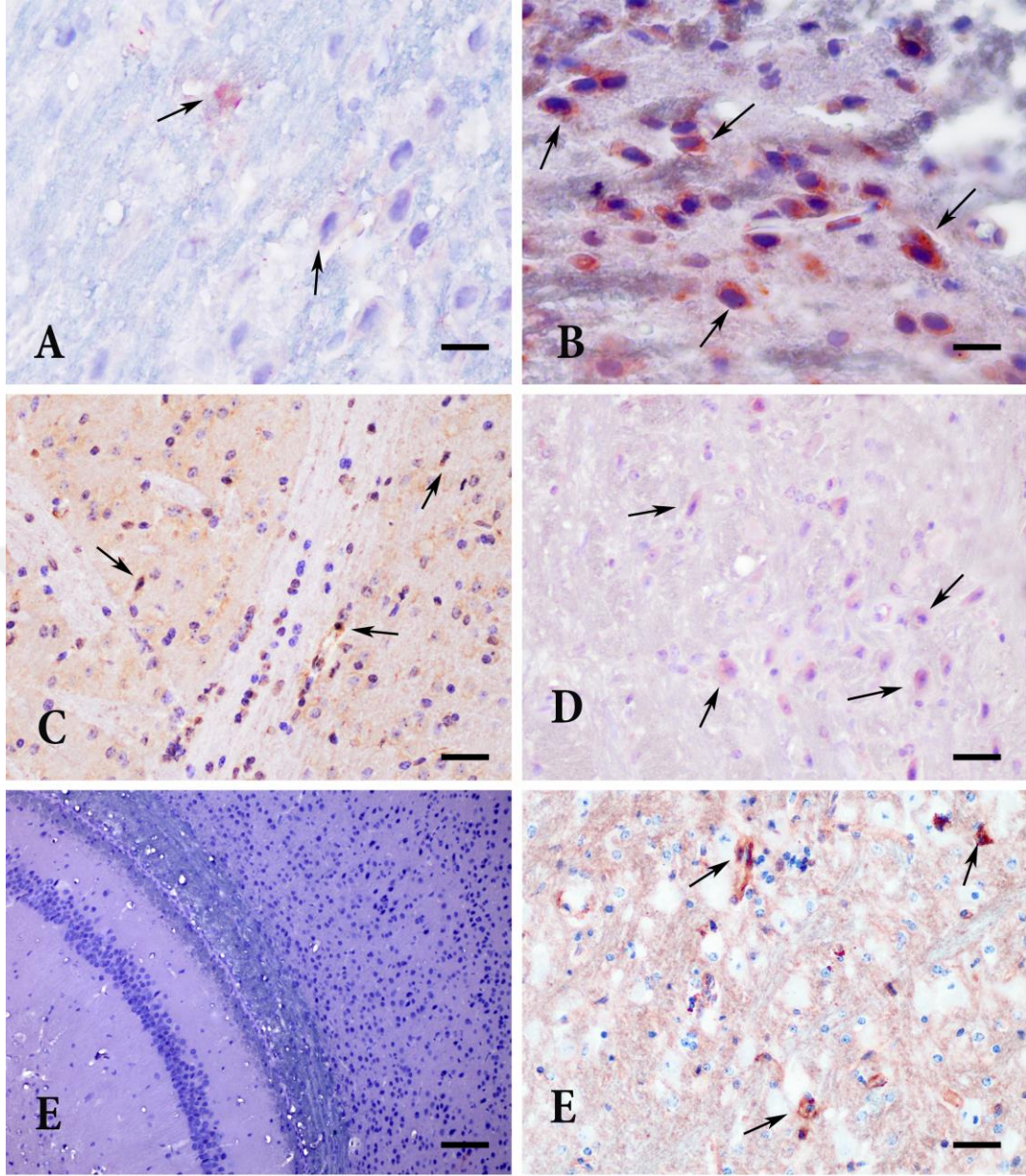
Şekil 3.16. IL-5' in gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Hipotalamus. Grup K, hafif immunopozitif reaktivite, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(B)** Hippocampal bölge. Grup I, hafif immunopozitif reaktivite, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(C)** Hipotalamus. Grup II' de şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(D)** Talamus. Grup III' te orta derecede immunopozitiflik, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 400µm. **(E)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(F)** ME49 enfekte fare-beyin dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 400µm.



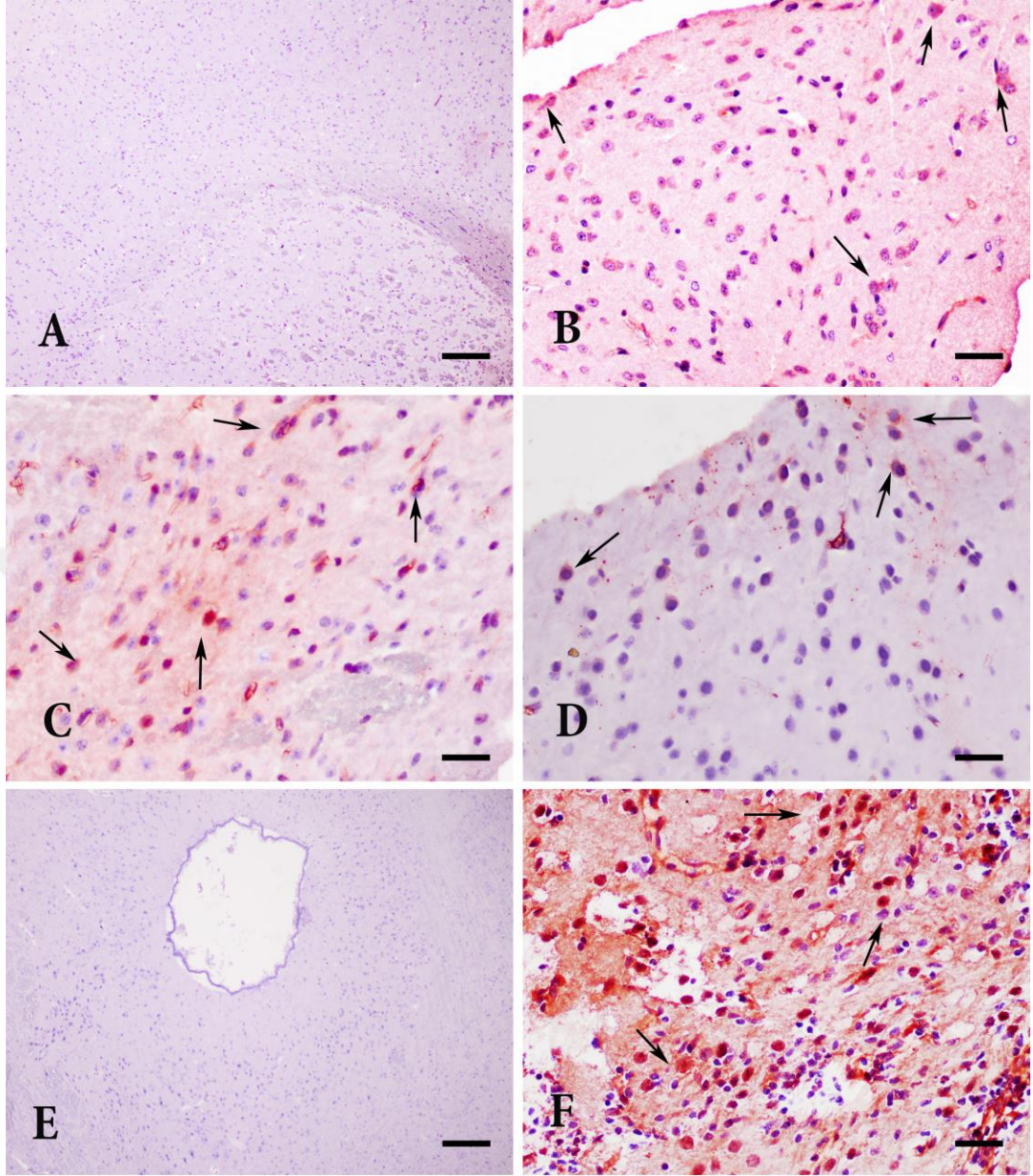
Şekil 3.17. IL-6' nın gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Hippocampal bölge. İmmun reaktivite vermeyen Grup K, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 400µm. (B) Hippocampal bölge. Grup I, hafif immunopozitif reaktivite, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 400µm. (C) Striatum. Grup II' de orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. (D) Amigdala. Grup III' te orta derecede immunopozitiflik, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. (E) ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. (F) ME49 enfekte faredalak dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 400µm.



Şekil 3.18. IL-10' un gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Beyin. İmmun reaktivite vermeyen Grup K, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 400µm. **(B)** Ventral tegmental alan. Grup I, hafif immunopozitif reaktivite, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(C)** Talamus. Grup II' de orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(D)** Hippocampal bölge. Grup III' te hafif immunopozitiflik, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 400µm. **(E)** ME49 enfekte fare- dalak dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(F)** ME49 enfekte fare- akciğer dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 400µm.



Şekil 3.19. IL-12' nin gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Serebral korteks. Grup K hafif immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(B)** Subst nira. Grup I, şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 100µm. **(C)** Ventral tegmental alan. Grup II' de orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(D)** Talamus. Grup III' te hafif immunopozitiflik, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(E)** ME49 enfekte fare-beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm. **(F)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoxilen karşıt boyama, Bar = 200µm.

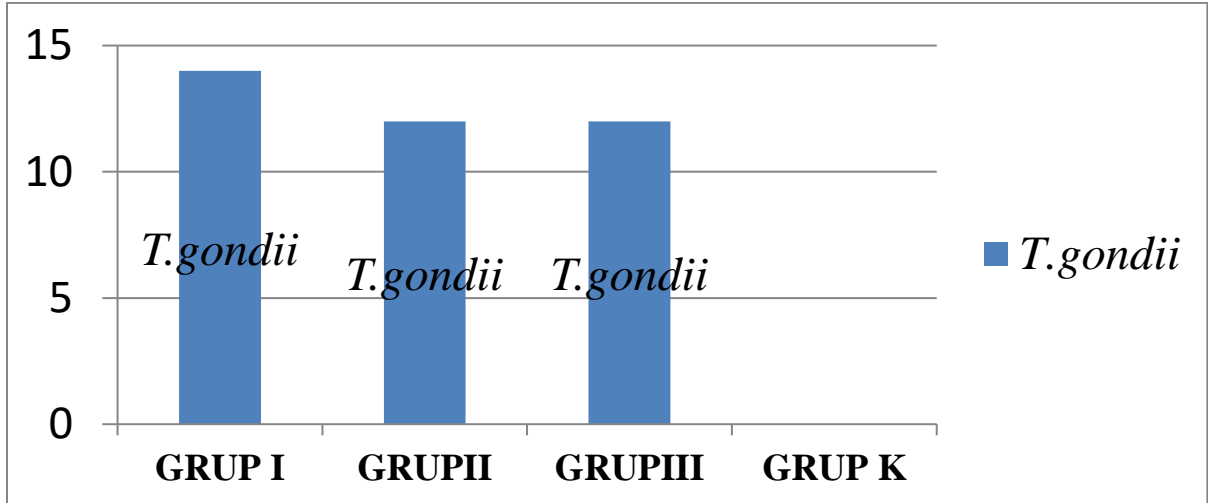


Şekil 3.20. IL-18' in gruplara ve beyin bölgelerine göre immunoreaksiyonları. (A) Beyin. Grup K immunopozitiflik yok, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 400µm. **(B)** Neokorteks. Grup I, orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 200µm. **(C)** Hipotalamus. Grup II' de orta şiddetli immunopozitif reaksiyon, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 100µm. **(D)** serebral korteks. Grup III' te hafif immunopozitiflik, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 100µm. **(E)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Negatif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 400µm. **(F)** ME49 enfekte fare- beyin dokusu. Pozitif kontrol, Avidin – Biotin Kompleks İndirekt Peroksidaz Test AEC kromojen ve hematoksilin karşıt boyama, Bar = 200µm.

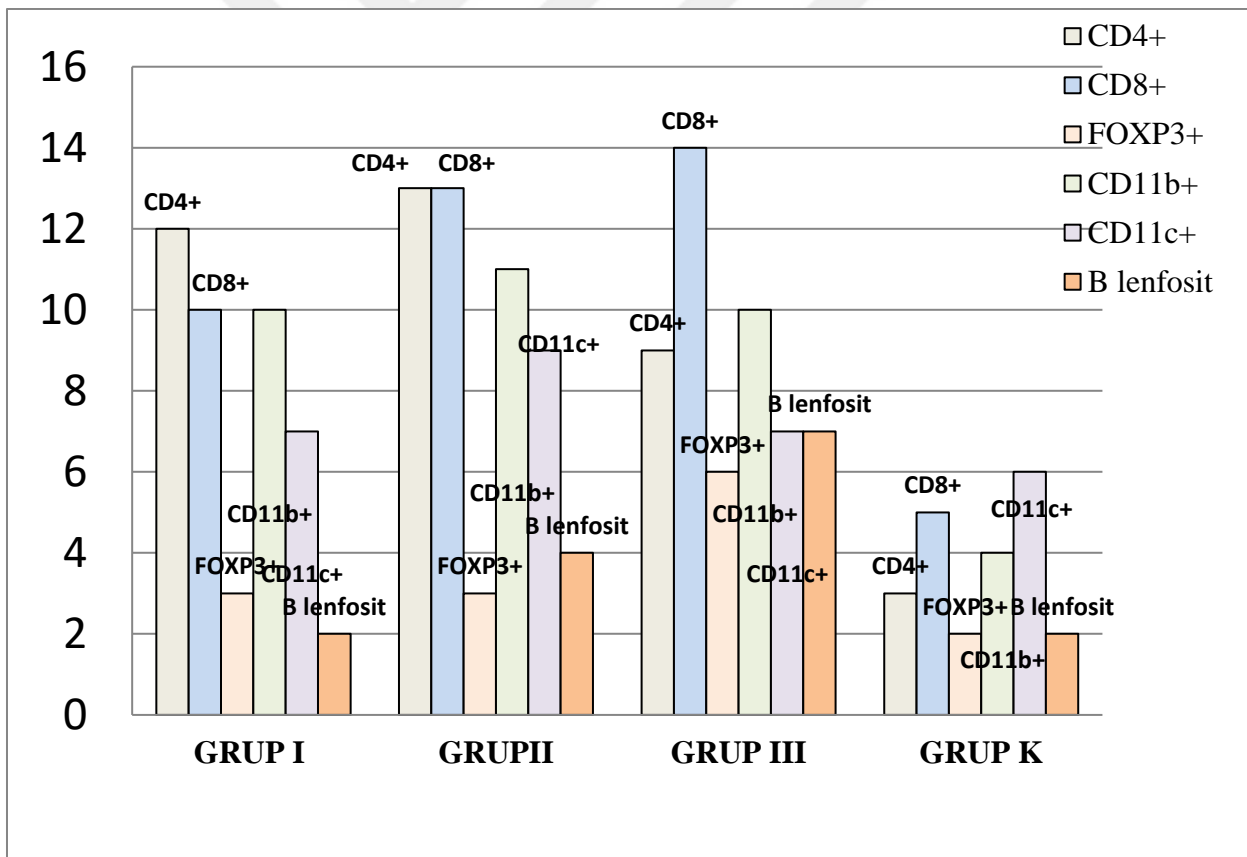
Çizelge 3.2. Çalışmada yer alan tüm sitokinler, hücre çeşitleri ve *T. gondii*' nin beyin bölgelerindeki varlıklarının gruplar arası karşılaştırmalı değerlendirilmesi. Boyanma dereceleri ve boyanan bölge alanı; Yok: 0, Hafif: 1, Orta: 2, Şiddetli:3 olarak değerlendirildi.

		Serebral korteks	Hippocampus	Striatum	Talamus	Amigdala	VTA	Subs. Nigra
Grup I	T. gondii	2	2	3	2	2	2	1
	CD4+	3	1	2	2	2	1	1
	CD8+	2	0	2	1	1	2	2
	FOXP3+	1	0	0	0	0	1	1
	CD11b+	2	1	2	1	1	1	2
	CD11c+	2	0	1	0	1	2	1
	B Lenfosit	0	1	1	0	0	0	0
	TNF-α	3	1	2	1	2	2	2
	IFN-γ	3	2	3	2	1	1	2
	IL-1β	1	0	2	1	0	1	1
	IL-4	1	0	1	0	0	0	0
	IL-5	0	1	1	1	0	0	0
	IL-6	1	1	1	0	0	1	0
	IL-10	1	0	1	0	1	1	0
	IL-12	3	1	2	1	2	3	2
IL-18	2	0	1	1	0	0	1	
		Serebral korteks	Hippocampus	Striatum	Talamus	Amigdala	VTA	Subs. Nigra
Grup II	T. gondii	1	2	2	2	2	2	1
	CD4+	2	1	2	2	1	3	2
	CD8+	1	2	2	2	3	2	1
	FOXP3+	0	0	1	1	0	1	0
	CD11b+	2	1	2	2	1	2	1
	CD11c+	1	1	1	2	2	1	1
	B Lenfosit	0	0	1	1	0	1	1
	TNF-α	2	1	2	1	3	2	1
	IFN-γ	3	1	2	2	2	1	2
	IL-1β	1	0	0	1	0	1	1
	IL-4	1	1	2	1	1	0	0
	IL-5	0	1	2	1	1	2	0
	IL-6	2	1	2	1	0	1	0
	IL-10	1	1	1	2	1	1	0
	IL-12	2	1	2	1	1	2	2
IL-18	1	0	1	0	0	1	1	
		Serebral korteks	Hippocampus	Striatum	Talamus	Amigdala	VTA	Subs. Nigra
Grup III	T. gondii	2	2	2	2	1	2	1
	CD4+	1	1	2	1	2	1	1
	CD8+	2	1	2	1	3	2	3

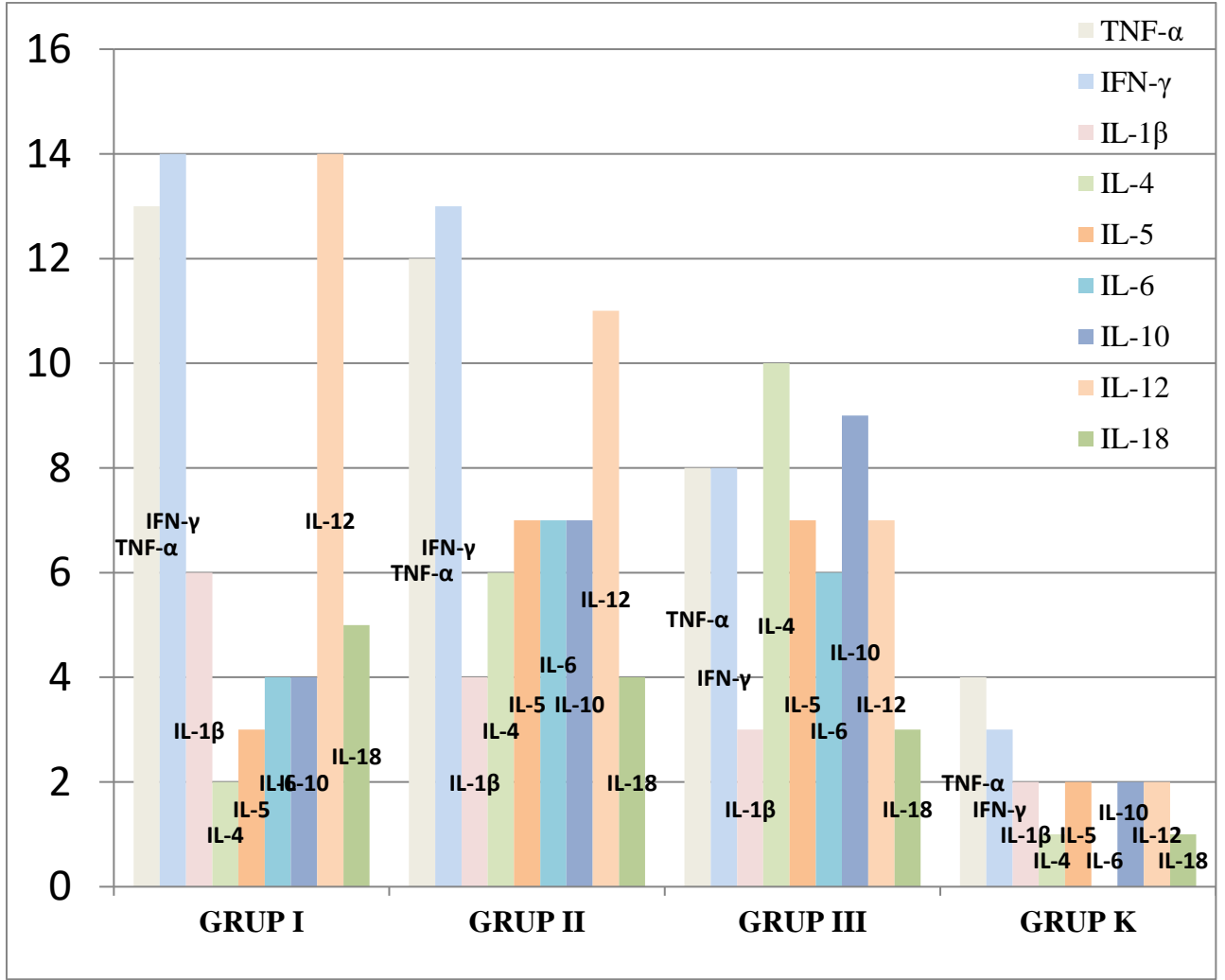
	FOXP3+	1	0	0	2	1	1	1
	CD11b+	2	0	2	1	1	2	2
	CD11c+	1	1	1	1	1	1	1
	B Lenfosit	0	1	1	1	0	2	2
	TNF-α	2	1	1	1	1	1	1
	IFN-γ	2	1	2	1	1	1	0
	IL-1β	1	0	0	0	0	1	1
	IL-4	1	1	2	2	1	1	2
	IL-5	1	0	1	1	2	2	0
	IL-6	1	1	1	0	2	1	0
	IL-10	2	2	1	2	1	1	0
	IL-12	1	1	1	1	1	1	1
	IL-18	1	0	1	0	0	1	0
		Serebral korteks	Hippocampus	Striatum	Talamus	Amigdala	VTA	Subs. Nigra
Grup K	T. gondii	0	0	0	0	0	0	0
	CD4+	0	1	1	1	0	0	0
	CD8+	1	1	1	1	0	0	1
	FOXP3+	0	0	1	1	0	0	0
	CD11b+	1	0	1	0	1	0	1
	CD11c+	1	0	2	0	1	1	1
	B Lenfosit	0	1	0	1	0	0	0
	TNF-α	1	0	2	1	0	0	0
	IFN-γ	0	1	1	1	0	0	0
	IL-1β	1	1	0	0	0	0	0
	IL-4	1	0	0	0	0	0	0
	IL-5	1	0	0	0	0	0	1
	IL-6	0	0	0	0	0	0	0
	IL-10	1	0	1	0	0	0	0
IL-12	1	0	0	0	1	0	0	
IL-18	0	1	0	0	0	0	0	



Şekil 3.21. *Toxoplasma gondii* spesifik antijen varlığının gruplara göre dağılımı



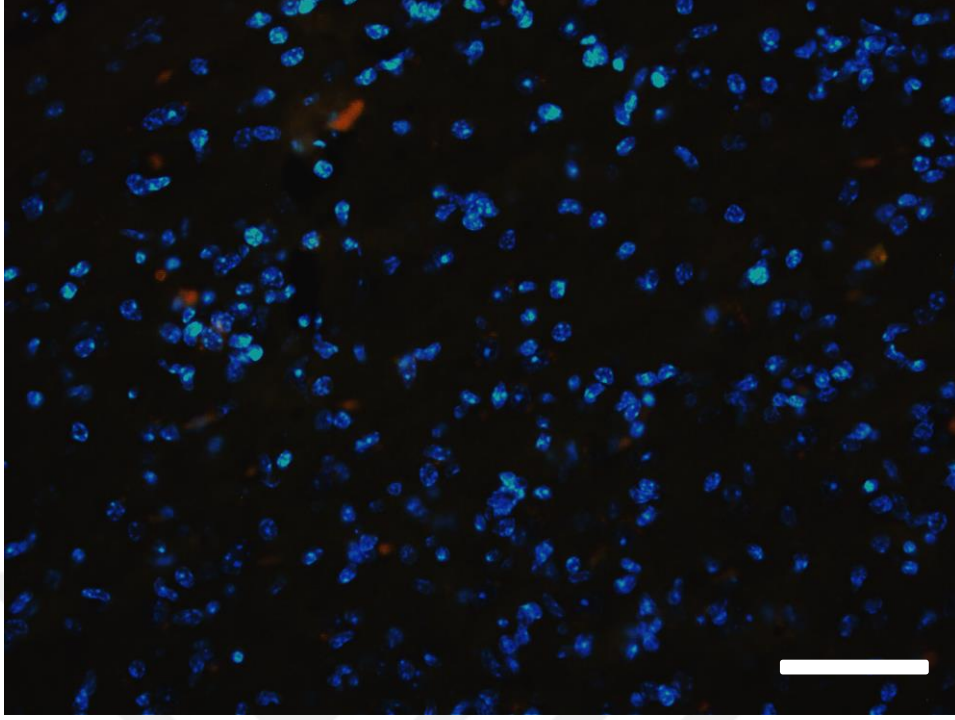
Şekil 3.22. MSS' deki bağışıklık hücrelerinin immunoreaktivitelerine göre gruplara dağılımı



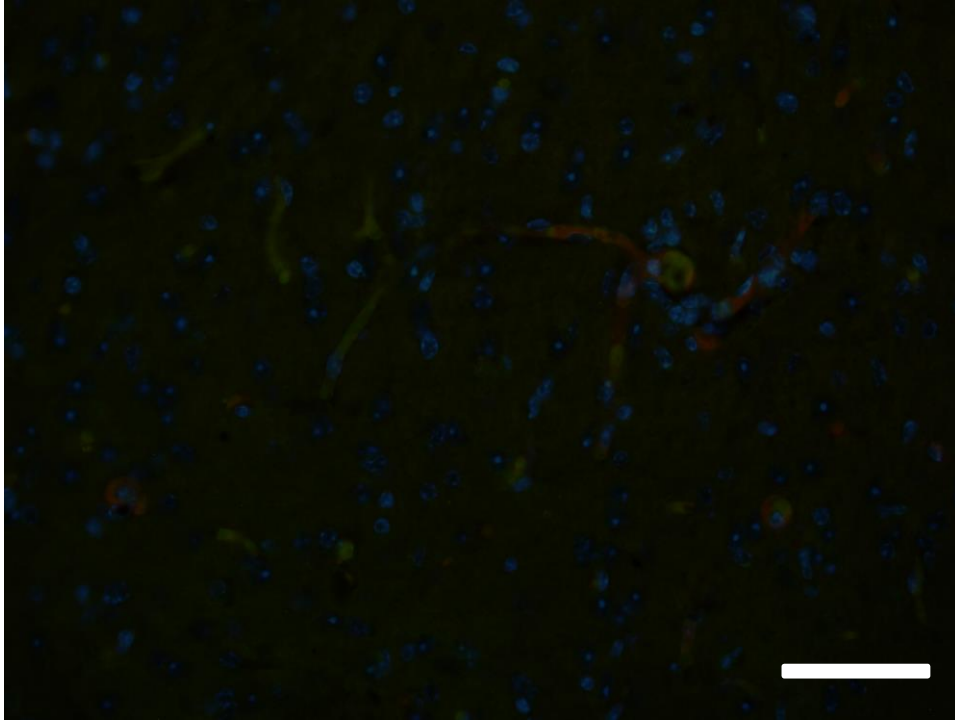
Şekil 3.23. Beyinde *T.gondii* enfeksiyonu sırasında eksprese edilen sitokinlerin immunoreaktivitelerine göre gruplara dağılımı

3.4. İmmunofloresan Bulgular

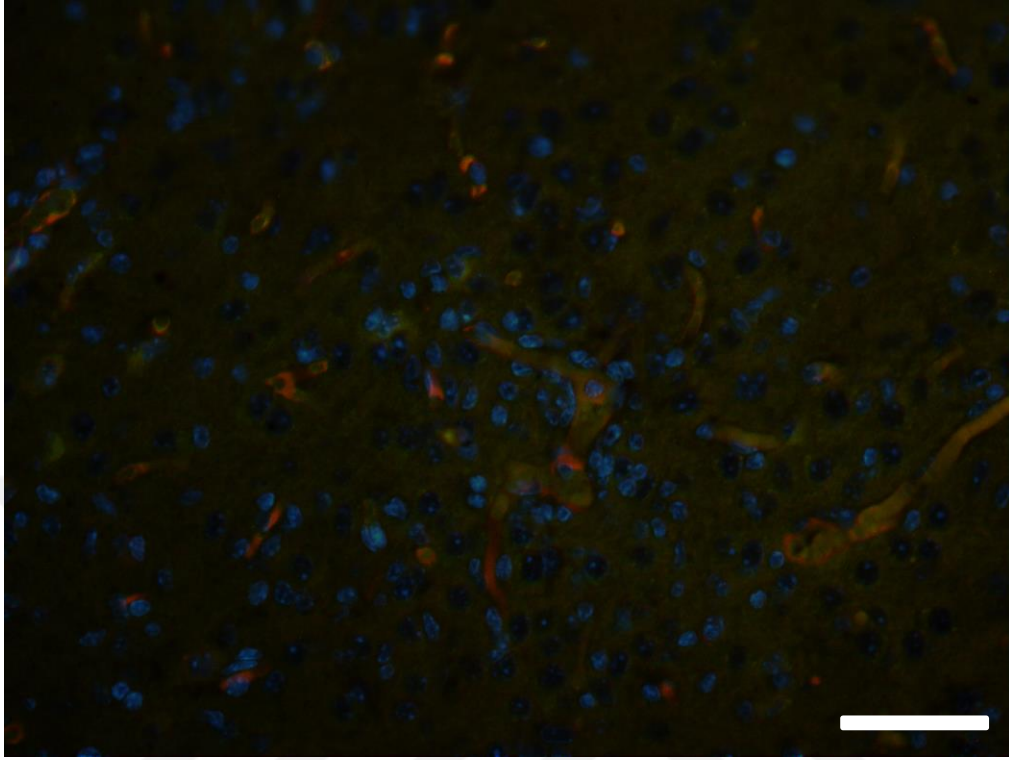
Bu çalışmada, immunoperoksidaz testlerle ayrı ayrı değerlendirilen sitokinler, yangı hücreleri ve *T. gondii* antijeni çoklu immunofloresan testleri ile birarada değerlendirildi.



Şekil 3.24. CD4+ T hücresi- IL-1 β kompozit görüntüsü. Direkt immunofloresan boyama, Grup I' de IL- 1 β 'nın (FITC) eksprese eden CD4+ T hücresi (Texas Red), arka plan çekirdek boyası DAPI, Bar = 50 μ m.



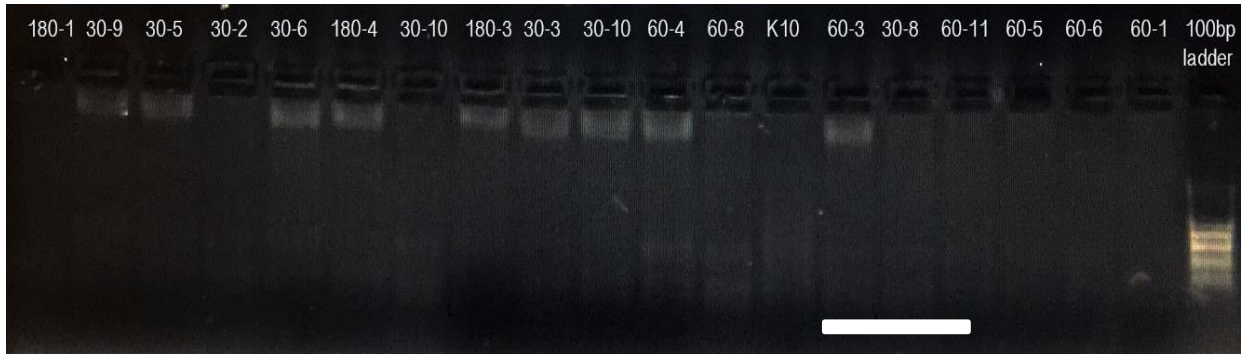
Şekil 3.25. GFAP+ hücre- *T. gondii* takizoiti kompozit görüntüsü. Grup II' de *T. gondii* (GFP) ile enfekte astrositlerin (Texas Red) birlikte gösterimi, arka plan çekirdek boyası DAPI, Bar = 50 μ m.



Şekil 3.26. GFAP+ hücre- *T. gondii* takizoiti kompozit görüntüsü. Grup III' te *T. gondii* (GFP) ile enfekte astrositlerin (Texas Red) birlikte gösterimi, arka plan çekirdek boyası DAPI, Bar = 50µm.

3.5. *Toxoplasma gondii* Spesifik PCR

Toxoplasma gondii için spesifik olan B1 geni kontrol grubunda negatifken, diğer gruplarda immunohistokimyasal bulguları doğrular biçime ortaya konuldu.



Şekil 3.27. *T.gondii* B1 geninin gösterimi.

3.6. RNA İzolasyonu

Tüm beyin örneklerinden ayrı ayrı total RNA elde edildi ve μl 'deki oranları hesaplandı ve 260/280 absorbans açısından saflıkları değerlendirildi (Çizelge 3.3).

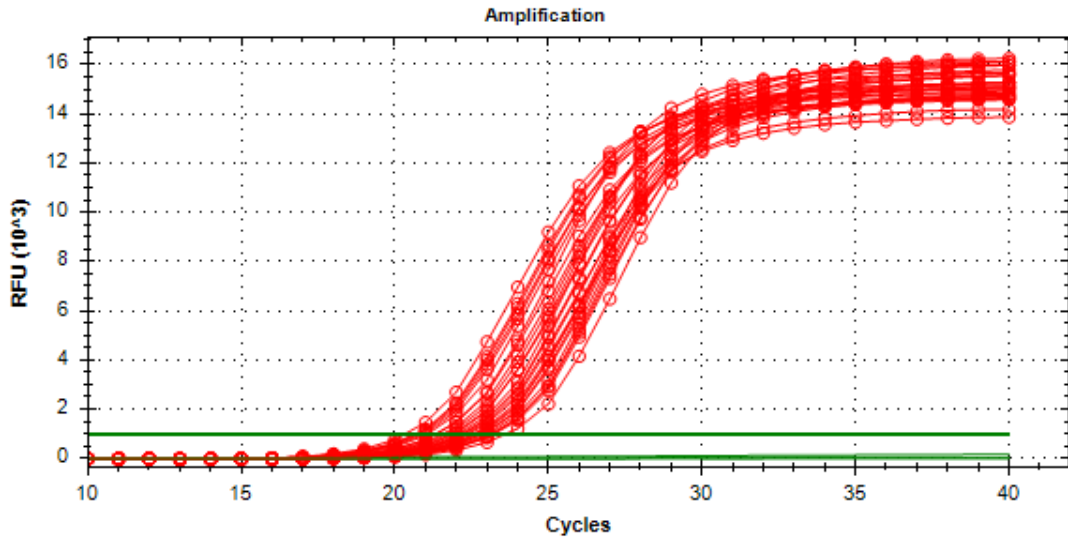
Çizelge 3.3. Her bir fare için μl 'deki RNA miktarları ve saflık ölçütleri

#	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	Y3	1112.2	ng/ μl	1.98	1.52	RNA	40
2	K6	2498.4	ng/ μl	1.96	1.67	RNA	40
3	Y7	5.8	ng/ μl	1.74	0.23	RNA	40
4	C4	3255.1	ng/ μl	2.06	2.08	RNA	40
5	Y6	741.1	ng/ μl	1.97	0.96	RNA	40
6	Y60-3	1946.9	ng/ μl	2	1.44	RNA	40
7	Y9	2498.4	ng/ μl	1.99	2.02	RNA	40
8	K9	460.5	ng/ μl	1.92	0.84	RNA	40
9	Y60-6	1576.1	ng/ μl	1.96	1.61	RNA	40
10	Y60-7	2242.5	ng/ μl	1.97	2.03	RNA	40
11	K7	2329.7	ng/ μl	1.98	1.83	RNA	40
12	K8	1712.3	ng/ μl	1.96	1.91	RNA	40
13	C2	2160.4	ng/ μl	1.97	1.55	RNA	40
14	Y5	1599.4	ng/ μl	1.97	1.1	RNA	40
15	C1	2341.8	ng/ μl	2.01	1.72	RNA	40
16	C7	2600.1	ng/ μl	1.93	1.29	RNA	40
17	K11	53.1	ng/ μl	1.88	0.29	RNA	40
18	K12	685.1	ng/ μl	2.01	1.62	RNA	40
19	Y60-8	1950.7	ng/ μl	1.96	1.31	RNA	40
20	C3	2450.9	ng/ μl	2	1.68	RNA	40
21	Y8	2112.3	ng/ μl	2.01	1.77	RNA	40
22	Y60-2	1666.1	ng/ μl	1.89	1.06	RNA	40
23	C6	2733.4	ng/ μl	2.04	1.87	RNA	40
24	Y2	2213.4	ng/ μl	2.01	1.84	RNA	40
25	Y60-4	2180.9	ng/ μl	1.96	1.76	RNA	40
26	Y60-9	1891.3	ng/ μl	1.97	1.48	RNA	40
27	Y4	2786.9	ng/ μl	2.04	2.14	RNA	40
28	C5	2645.5	ng/ μl	2.03	1.84	RNA	40
29	K10	852.7	ng/ μl	2.04	1.98	RNA	40
30	K5	1985.6	ng/ μl	1.98	1.78	RNA	40
31	Y10	2503	ng/ μl	1.98	1.91	RNA	40

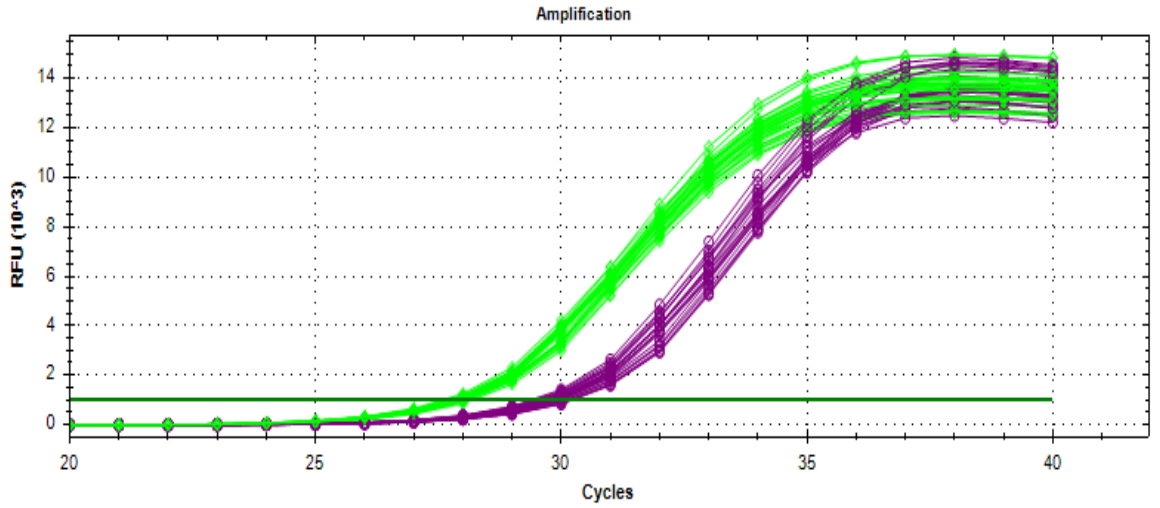
32	Y60-11	2066.9	ng/ μ l	1.96	1.83	RNA	40
33	Y60-10	2256.2	ng/ μ l	1.98	1.69	RNA	40
34	Y60-1	1913.4	ng/ μ l	2.02	1.86	RNA	40
35	Y60-5	1221.7	ng/ μ l	1.95	1.48	RNA	40
36	Y1	244.6	ng/ μ l	2.04	0.35	RNA	40

3.7. Sitokin Ekspresyonlarının Gerçek Kantitatif Real Time- PCR Analizi

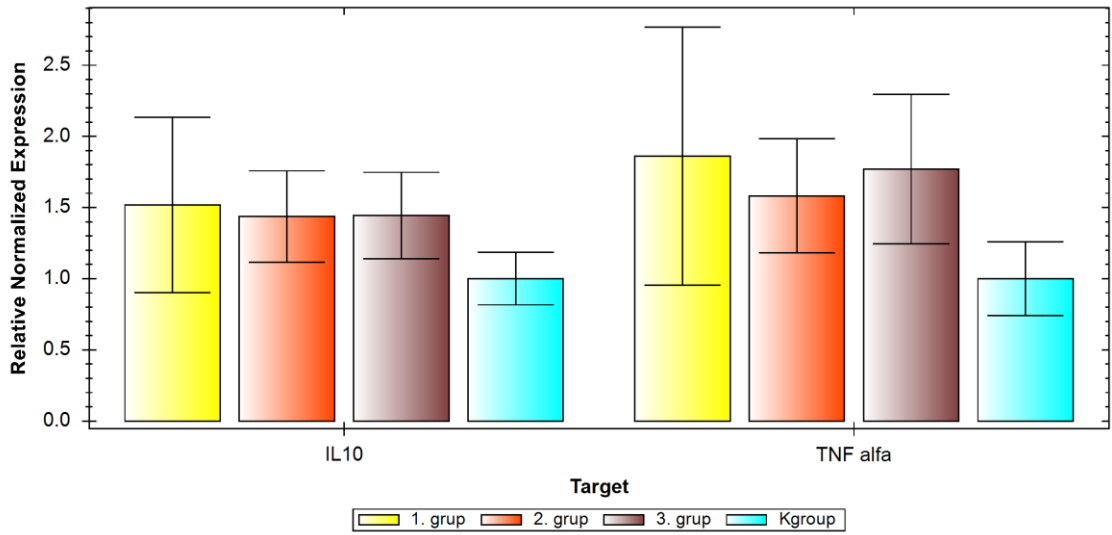
β -actin, IL-10 ve TNF- α genlerinde Grup I, Grup II ve Grup III' te kontrol grubuna göre artış belirlendi, ancak istatistiksel olarak $p > 0,05$ bulunduğu için, anlamlı bir fark belirlenemedi. Değerlendirilen diğer sitokinlerde ise gruplar arası ifade farklılıkları değerlendirilemedi.



Şekil 3.28. Yükseltgenme Eğrileri. β -actin genine ait Cq değerleri



Şekil 3.29. Yükseltgenme Eğrileri. IL-10 (mor) ve TNF- α (yeşil) genlerine ait Cq değerleri



Şekil 3.30. IL10 ve TNF- α 30, 60 ve 180. gün ifade farklılıkları. Grafikte sarı bar 30. gün, turuncu bar 60.gün, kahverengi bar ise 180. güne ait ifade artışlarını göstermektedir. Kontrol grubu gen ifadesi mavi ile gösterilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analiz

Histopatolojik değişiklikler (nöron dejenerasyon/ nekrozu, gliosis, satellitozis, perivasküler hücre infiltrasyonu, meningitis, fokal mononükleer hücre

infiltrasyonu, vaskülit) için yapılan Kruskal Wallis testi sonucu, fokal mononükleer hücre infiltrasyonu hariç diğer tüm değişiklikler için gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulundu.

İmmunohistokimyasal testlerde değerlendirilen; *T. gondii* antijeni, sitokinler ekspresyonları (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18) ve hücre populasyonları (CD4+, CD8+, FOXP3+, CD11b+, CD11c+, CD19+) için gruplar arasında fark olup olmadığı yine Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Buna göre, bakılan her bir değer için, beynin yedi farklı bölgesi için ayrı ayrı değerlendirildi ve daha sonra bunlar toplanarak, her bir hayvan için analize sokuldu. Yapılan karşılaştırmalar arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı farklar çıktı.

Kontrol grubunun bütün karşılaştırmalarda anlamlı olarak en küçük değere sahip olduğu saptandı. Bundan dolayı, kontrol grubu çıkarıldı ve diğer 3 çalışma grubu arasındaki ilişki değerlendirildi. Bunun için, yine bu 3 grup Kruskal Wallis testine tabi tutulmuştur. CD8+, CD11b+ ve *T. gondii* dışındaki tüm değişkenlerin gruplar arasında anlamlı farka ($P < 0, 05$) sahip olduğu saptandı.

3 grup arasından Kruskal Wallis testi ile saptanan bu farkın, hangi grup ya da gruplarca oluştuğunu saptamak için Mann Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Mann Whitney U için anlamlılık değeri $p < 0, 005/3 = p < 0,0017$ olarak belirlendi.

Buna göre Grup I ve Grup II arasında; CD11c+, CD19+, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6 düzeyleri arasında anlamlı ($p < 0,0017$) farklılıklar saptanmıştır.

Grup I ve Grup III arasında; FOXP3+, CD19+, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 düzeyleri arasında anlamlı ($p < 0,0017$) farklılıklar saptanmıştır.

Grup II ve Grup III arasında; CD4+, FOXP3+, CD19+, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-12 düzeyleri arasında anlamlı ($p < 0,0017$) farklılıklar saptanmıştır.

Çizelge 3. 4. Sitokin ekspresyonlarının gruplar arası farkları

Sitokinler	Gruplar Arası Farklar		
	1 ve 2	1 ve 3	2 ve 3
IL-12	yok	var	var
TNF- α	yok	var	var
IFN- γ	yok	var	var
IL-1 β	var	var	yok
IL-18	yok	var	yok
IL-5	var	var	var
IL- 6	var	var	yok
IL-4	var	var	var
IL-10	yok	var	yok

TARTIŞMA ve SONUÇ

Toxoplasma gondii, insan ve hayvanlarda ölümcül sonuçlanabilen akut ve sistemik enfeksiyonlar ile karakterize Apikompleksa anacına dahil bir protozoon parazittir (Dubey 1998). Toksoplazmozis tüm dünyada hem hayvan hem de insan popülasyonu içerisinde yaygın bir hastalık olarak bilinir ve toplam dünya nüfusunun yarısının *T. gondii* seropozitif bireylerden oluştuğu tahmin edilmektedir (Hill ve ark 2007). Benzer durum, serbest dolaşıma sahip koyun ve keçiler, yaban hayvanları ve sokak kedileri için de geçerlidir (Jacobs 1963, Dubey 2004). Epidemiyolojik açıdan bakıldığında, insanlar parazitin yaşam döngüsünü sürdürebileceği eşsiz bir konak konumunda oldukları; hem subklinik toksoplazmozlu koyun, keçi ve yaban hayvanlarının doku kistlerini içeren etlerinin yenilmesi, hem de kedilerin gaitalarından saçılan ookist ile kontamine ettiği gıdalar yoluyla etkeni alabilecekleri görülmektedir (Black ve Boothroyd 2000). Buna rağmen insanlar, parazitin yaşam döngüsünde neredeyse son basamakta yer alırlar ve parazitin hasta bir insandan sonra yaşamını sürdürebilmesi için çok az seçenek mümkün görünmektedir. Bu nedenle, toksoplazmozlu bir bireyin akut enfeksiyon sonrası ölmesi, hem parazitin evrimsel gelişim süreci, hem de epidemiyolojik açıdan olumsuz bir sonuç olarak kabul edilebilir ve kısaca, parazit için son konak konumundaki bireyler ne kadar uzun süre hayatta kalırlarsa, parazit de o kadar uzun süreyle hayatına devam edebilir şeklinde bir yorum yapılabilir. Bu noktada; özellikle insanlarda *T.gondii*'nin oldukça ılımlı ve subklinik enfeksiyon periyodu şekillendirmesi, immun-yeterli bireylerde kısa süreli bir lenfadenopati ve yüksek ateş sonrasında hayatları boyunca kalıcı olabildikleri doku kisti formuna dönüşmeleri bu görüşü destekler niteliktedir. Yalnızca, AIDS ve organ transplantasyonu yapılan bireylerde ölümle sonuçlanabilen akut toksoplazmoz raporları bulunmaktadır (Weiss ve Dubey 2009) Yine hamilelik döneminde alınan yüksek patojeniteye sahip *T.gondii* suşları yavruya geçerek erken dönemlerde abort ve geç dönemde ise retinopati, hidrosefalus gibi sekillere yol açabildiği bilinmektedir (Tenter 2000) Yine de, toksoplazmozun klinik belirtilerle seyrettiği olguların sayısı, hayatlarının bir döneminde *T.gondii* ile karşılaşan bireylerin toplam

sayısına göre oldukça düşük bir orandadır. Bu durum ise ancak konak immün yanıtı, organizmaya giren parazit sayısı ve parazit patojenitesi arasındaki denge ile açıklanabilir. Kısaca, eğer konak immün yanıtı yeterli düzeyde, düşük patojeniteli bir parazit az sayıda etken ile enfeksiyon oluşturursa, klinik olarak konakta herhangi bir belirti görülmez, etken spesifik humoral ve hücreli bir bağışıklık yanıtı şekillenir (Su ve ark 2003, Schreiner ve Liesenfeld 2009). Bu tür enfeksiyonlarda, parazitin doku ve organlara envazyon derecesine bağlı olarak, protozoonun MSS bariyerlerini geçerek konağın sistemik immün yanıtından korunduğu ve büyük oranda MSS’nde lokal olarak yeniden şekillenen “parazit-spesifik hücreli immün yanıt” ile karşılaştığı ensefalitik bir enfeksiyon formu şekillenir (Chardes ve ark 1994, Wilson ve Hunter 2004). Bu dönemde, başlıca dalak, kemik iliği ve lenf düğümü kökenli parazit spesifik sistemik immün yanıtı oluşturan immünglobulin, sitokin yanıt ürünleri ve/veya lökositler kan-beyin bariyerini geçemezler ve MSS enfeksiyonunda etkisiz kalırlar. MSS’ nde ise, parazite özgü lokal immün yanıt parazitin beyne ilk ulaştığı andan itibaren yeniden şekillenir. Bu çalışmada, farelere deneysel olarak *T.gondii* ME49 suşu takizoitleri verilerek beyinde *T. gondii*’ ye karşı şekillenen immün yanıtın değerlendirilmesi, MSS’ nde parazit ilişkili sitokin yanıtı ve immün yanıt katılan hücre gruplarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın başlıca hedeflerinden birisi de, *T. gondii* ile enfekte olan bireylerin beyinlerinde meydana gelebilecek nöropatolojik değişikliklerin fare modeli üzerinde açıklanmaya çalışılmasıdır. Çünkü insanlarda şekillenen doğal enfeksiyonların ne kadarında bu MSS formunun geliştiği bilinmemekte ve beyinde şekillenen patolojik değişikliklerin değerlendirilmesi de kolaylıkla mümkün görünmemektedir.

Toxoplasma gondii’ nin keşfedildiği günden bu zamana kadar konak-parazit ilişkisini, konağın etkene karşı oluşturduğu immün yanıt mekanizmasını araştıran in-vitro ve in-vivo birçok deneysel çalışma yapılmıştır (Hökelek ve ark 2002, Meylan ve ark 2006, Dupont ve ark, 2012). Bir asırdan uzun süre önce ilk kez keşfedilen bu protozoon parazitle ilgili, bu süre içerisinde yapılmış 20.000’e yakın bilimsel araştırma bulunmaktadır (Tenter 2000). Enfektif 3 farklı formunun bulunması, farklı suşlarına ait farklı virulens faktörlerinin oluşması, geniş konak yelpazesi ve enfeksiyon oluşumunda, patogenezinde ve sonuçlanmasında konaklar arası farklılıklar olması, farklı bir takım hastalıklara predispozisyon oluşturması gibi

nedenlerle *T. gondii*' nin patogenezi ve konaklarıyla olan ilişkisi hala tam olarak anlaşılammış ve etkin bir tedavi ya da aşı geliştirilememiştir (Montoya 2004, Dubey 2010, Lindsay ve Dubey 2014).

Yapılan immunopatogenez çalışmaları genelde bir/birkaç yangısal hücre tipine, bir ya da küçük bir grup sitokinsel yanıtı veya *T. gondii*' nin konak hücrelerini enfekte ederek verdiği direkt hasara ayrı ayrı odaklanmıştır (Gazzinelli ve ark 1992, Giri ve ark 1994, Suzuki ve ark 2005, Haroon ve ark 2012, Parlog ve ark 2015). Sunulan bu çalışmada; tip II ME49 suşuyla kronik ensefalitik toksoplazmoz oluşturulmuş ve önem arz edebilecek olan 9 farklı sitokin (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 ve IL-18) ile 6 farklı yangı hücresi (CD4+, CD8+, FoxP3+, CD11b+, CD11c+ ve CD19+ hücreler) seçilmiştir. Her bir hücre popülasyonu, sitokin ekspresyonu ve parazit için ayrı ayrı immunoperoksidaz, histopatolojik ve moleküler testler yapılmıştır. Böylece, ensefalitik toksoplazmozda beyinde en çok etkilenen bölgelerin haritası çıkarılmış, bu bölgelerdeki yangısal ve sitokinsel yanıtla birlikte *T. gondii* varlığı değerlendirilmiştir.

Toksoplazmoz yavru kayıplarına sebep olması, dünya çapında oldukça yaygın olması ve zoonoz olması nedeniyle oldukça önemlidir (Tenter 2000). İnsan çalışmaları, *T. gondii*' nin in-vivo patogenezinin açıklanmasında yeterli olamadığı için hayvan deneyleri ve deney tasarlanması önem kazanmıştır (Dubey 1998). Ensefalitik toksoplazmoz modellemesi, patogenezi ve tedavisi çalışmaları için genellikle, *T. gondii*' nin ME49 suşu kullanılmaktadır (Araujo ve ark 1997, Suzuki ve Remington 2000). Nitekim Avrupa' da özellikle de ensefalitik toksoplazmoza sahip AIDS hastalarından en çok izole edilen suşlar; ME49, Ptg, Pru gibi *T. gondii* tip II suşlardır (Howe ve ark 1997, Montoya 2004). Ancak, Türkiye' de yapılan deneysel çalışmaların çoğunda *T. gondii*' nin tip I suşu olan RH kullanılmış ve akut toksoplazmoz modelleri oluşturulmuştur (Kul ve Hazıroğlu 2001, Atasever ve ark 2017). Sunulan bu çalışmada, *T. gondii* ME49 takizoitleri duyarlı fare türü olan C57BL/ 6 farelere normal enfeksiyon dozunun altında ($<1 \times 10^5$) inokule edilerek, ölümcül olmayan kronik toksoplazmik ensefalit modeli oluşturulmuş ve özellikle farklı dönemlerde kurban edilen gruplarla kontrol grubu karşılaştırılarak, gruplar arasındaki patolojik değişiklikler değerlendirilmiştir. Buna göre; en çok görülen

histopatolojik değişiklikler nöron dejenerasyon ve nekrozları, gliozis, satellitozis, fokal mononükleer hücre infiltrasyonları, non-purulentmeningitis ve vaskülitis olarak karşımıza çıkmıştır. Kontrol grubu, enfeksiyon gruplarının tümüyle karşılaştırıldığında anlamlı olarak ($p < 0,05$) daha az çıkmış, dolayısıyla oluşturulan enfeksiyonun başarısı gösterilmiştir. RH suşuyla yapılan çalışmalarda akut öldürücü toksoplazmoz geliştirilmiş, ME49 suşuyla yapılanlara ise latent kistojenik modeller oluşturulmuştur (Kul ve Hazıroğlu 2001, Kocak ve ark 2012). Sunulan bu çalışmada ise bunlardan farklı olarak, hiçbir grupta doku kistine rastlanmamıştır. Böylece klinik semptom oluşturmadan oluşan ensefalitik toksoplazmozdan etkilenen hücre tipleri ve konağın sitokinsel yanıtları değerlendirilmiştir.

C57BL/6 fareler toksoplazmik ensefalite duyarlıdırlar ve genelde mekanizma çalışmaları için tercih edilen tür olarak bilinirler ve herhangi bir immunsupresyon olmadan öldürücü ensefalit tablosu geliştirebilirler (Suzuki ve ark 1994, Liesenfeld ve ark 1999, Wang ve ark 2004). *T. gondii*' nin tip II suşu olan ME49'la enfekte edilerek kronik latent toksoplazmoz oluşturulmuş BALB/c farelerin beyinlerinde, histopatolojik olarak; fokal gliozis odakları, perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları ve non-supuratif bir meningit ile birlikte doku kistleri dikkati çeker (Hermes ve ark 2008, Atmaca ve ark,2014). Sunulan bu çalışmada, toksoplazmoza dayanıklı BALB/c farelere yüksek dozda takizoit verilerek oluşturulan latent toksoplazmozdan farklı olarak, daha duyarlı tür olan C57BL/6 fareler ile yine kronik ancak öldürücü olmayan bir ensefalit tablosu oluşturulmuştur. Duyarlı C57BL/ 6 farelere inoküle edilen düşük dozdaki takizoitler, sağlıklı bireylerde görülen hafif ensefalitis tablosuna yakın bir hastalık gelişmiş, böylece doğal bir enfeksiyon taklit edilerek, konağın parazite olan immunopatolojik yanıtı araştırılmıştır. Çalışmada, doku kisti varlığına rastlanmazken, yukarıda belirtilen değişikliklere ve bu değişikliklerin olduğu bölgelerde anti- *T. gondii* immunoreaktivitelerine rastlanmıştır.

FOXP3+ T hücrelerinin bir biçimde enflamasyonun etkilerini azalttığı ileri sürülmüştür ancak bu mekanizmayı ortaya çıkaracak yeterli bilgi mevcut değildir (Lowther ve Hafler 2012). Bununla birlikte, özellikle enfeksiyöz bir durumda MSS' indeki görevi halen bilinmemektedir (O'Brien ve ark 2017). Sunulan çalışmada, FOXP3+ hücre popülasyonu Grup I ve II' de benzer oranda ve kontrol grubuna

yakınken, Grup III' te diğer grupların iki katı sayıda tespit edilmiştir. İstatistiki olarak da FOXP3+ T lenfosit sayısının Grup I ve II'den anlamlı biçimde farklı olduğu belirlenmiştir. FOXP3+ T hücreler ile beraber CD8+ T hücrelerin de Grup III' te fazla olması yine aynı grupta IL-10 ve IL-4 sitokin ekspresyonlarının diğer tüm gruplardan fazla olmasını açıklayabileceği düşünülmektedir. Bunu destekler nitelikte, yine Grup III' te FOXP3+ T hücrelerin bulunduğu serebral korteks, talamus, amigdala, VTA ve substnigrada IL-10 ve IL-4 ekspresyonları daha fazla olarak karşımıza çıkmıştır. Bu sonuçlara ek ve oldukça önemli olarak; CD4+ T hücrelerinin Grup III' te Grup I ve II' ye göre daha düşük olması, FOXP3+ hücrelerin ensefalitik toksoplazmozun ileri kronik döneminde CD4+ Th1 hücreleri yerine IL-10 sentezleyip, CD4+ Th1 hücre popülasyonunun yerini almış olabileceği düşünülmüştür. Bunların yanısıra; periferal regülatör T hücreler (pTreg) ile timus kökenli regülatör T hücrelerin (tTreg) FOXP3+ olduğu bilinmektedir (Workman ve ark 2009). Çeşitli enfeksiyonlar, pro-enflamatuar sitokinler, nitrik oksit gibi stres kaynaklarının olduğu durumlarda açığa çıkıp, stres faktörünü ortadan kaldırmaya çalışan ısı şok proteinlerinin ise T hücre aracılı özellikle de Treg aracılı immun yanıtı arttırdığı bilinmektedir (Kapinga ve ark 2009, Jin ve ark 2012). *T. gondii*' nin ısı şok proteini 70 (TgHSP70) ekspresyonunun, immunsupresyon durumunda takizoit sayısının artmasıyla orantılı biçimde arttığı, ısı şok proteini 90 (TgHSP90)' ın ise bradizoit gelişimini, konak hücresi içinde invazyonunu ve çoğalmasını sağladığı gösterilmiştir (Barenko ve ark 2014, Sun ve ark 2017). Sunulan bu çalışmada, 180' inci günde sakrifiye edilen gruplarda FOXP3+ hücre sayısının diğer gruplara göre 2 kat fazla olması immun yanıtın, FOXP3+ hücrelerce devam ettirilerek, enfeksiyonun kronikleştirildiğini düşündürmüştür. Bu sonuçlara göre, enfeksiyon süresinin 180 günden daha uzun tutulduğu çalışmalar yapıp, FOXP3+ hücreler ile *T. gondii* ısı şok proteinleri arasındaki bağlantı daha detaylı incelenmelidir.

İnsanlarda yapılan elektronmikroskopik çalışmalarda da toksoplazmik ensefalite sahip bireylerin nöron ve glial hücrelerinde çoğalan takizoitler gösterilmiştir (Powell ve ark 1978). Deneysel modellerde *T.gondii*' nin beyne ilk ulaşabildiği dönem 10-20' nci günler olarak değerlendirilmekle birlikte, etkenin kan beyin bariyerine verdiği hasarla birlikte ilk konak immun yanıtı beyin dokusunda başlatılmaktadır (Wilson ve Hunter 2004). İleride meydana gelecek ensefalit tablosu

ve enfeksiyonun şiddetini ise; MSS lokal immun yanıtı ve etkenin miktar ve patojenitesi arasında denge belirler (Parlog ve ark 2015). Sunulan çalışmada, deneysel olarak enfekte edilen farelerin beyinlerinde tüm gruplarda *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 dokuları ve beyin omurilik sıvısında bulunan sitokinlerin büyük bölümü, kan beyin bariyeri ve choroid plexus nedeniyle, genelde de novo şekillenirler ve sistemik sitokin seviyesinden bağımsız olarak enfeksiyonun şiddetini ve patogenezi belirlerler (Campbell ve ark 1998). Sunulan çalışmada, tüm gruplar karşılaştırıldığında; 30' uncu günde sakrifiye edilen Grup I' de en şiddetli histopatolojik değişikliklere rastlanmıştır. Bu değişikliklerin şiddeti sırasıyla Grup II, Grup III ve kontrol grubunda azalarak devam etmiştir. Grup II ve Grup III sonuçları ise birbirine oldukça yakındır. *T. gondii*-spesifik immunoperoksidaz testi de bu sonuçları destekler nitelikte karşımıza çıkmıştır. Her ne kadar, gruplar arası istatistiki olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamış olsa da, Grup I' deki *T. gondii* immunoreaktivitesi Grup II ve III' e göre daha yüksek gözlemlenirken, Grup II ve III' te hemen hemen aynı oranda bulunmuştur. Kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında ise; kontrol grubunda hiç *T. gondii* immunoreaktivitesine rastlanmazken ve buna paralel olarak hem yangısal hücre popülasyonları hem de sitokin salınımları kontrol grubunda diğer gruplara oranla bazal seviyede tespit edilmiştir. Bu da oluşturulan ensefalitik toksoplazmoz modelinin oldukça başarılı olduğunu ve elde edilen sonuçların hastalık mekanizması için aydınlatıcı olacağını kanıtlar niteliktedir. Pro- enflamatuar sitokinler olan IL-12, TNF- α ve INF- γ ekspresyonları, yine bu sonuçları destekler nitelikte Grup I' de en yüksek oranda karşımıza çıkmıştır. İstatistiki analiz sonuçlarına göre; Grup I ve II'deki IL-12, TNF- α ve INF- γ ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir farka rastlanmazken, Grup I ve III/ Grup II ve III arasında rastlanmıştır. Enfeksiyonun daha çok akut döneminde salgılanan kronik dönemde ise daha düşük miktarlarda olması beklenen Th1 yanıtı ait bu sitokinlerin gösterimi, sadece enfeksiyon sonrası 30' uncu gününün değil aynı zamanda 60' ıncı günün de enfeksiyonun erken dönemini temsil ettiğini göstermektedir. Yine yapılan kantitatif PCR analizinde; Grup I' de diğer gruplara oranla belirgin TNF- α ekspresyon fazlalığıyla karşılaşılmış, ancak grup içi örnek sayısı azlığı ve standart sapma

nedeniyle istatistiki olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır ($p>0,05$). Yapılan başka çalışmalara göre de, *T. gondii* enfeksiyonunun ardından, IL-12 üretimi uyarılır ve artan IL-12 düzeyi de T lenfositleri uyararak, IFN- γ ve TNF- α üretimini tetikler (Hunter ve ark 1994, Gaddive Yap, 2007). Bu bağlamda, bu çalışmada Grup I' de özellikle serebral kortekste, striatumda, talamusta, amigdalada ve ventral tegmental bölgede gösterilen CD4+ hücre popülasyonunun diğer gruplara oranla yüksek olması ve yine Grup I' de bu bölgelerde *T. gondii* takizoit varlığının diğer beyin bölgelerine göre daha fazla olması, IL-12, TNF- α ve INF- γ ekspresyon düzeylerinin yüksekliğini açıklamaktadır. IL-12' nin uyarımıyla; TNF- α parazitin hücre içi gelişimini engeller, IFN- γ ise çeşitli mekanizmaları devreye sokarak parazitin yok edilmesini sağlar (Sibley ve ark, 1991, Gazzinelli ve ark 1994, Andrade ve ark 2006). Ancak yapılan bu çalışma göstermiştir ki, *T. gondii* enfekte hücrelerin bulunduğu yerlerde Grup I' de Th1 sitokinsel yanıt artıyor olsa da, histopatolojik değişiklikler şekillenmeye devam etmiş ve olan IL-12, TNF- α ve INF- γ nin artan düzeydeki ekspresyonları tek başına bunu engelleyememiş görünmektedir.

Sunulan bu çalışmada; hem doğal (CD11b+, CD11c+, CD4+ Th1 hücreler) hem de kazanılmış bağışıklığa (CD4+ ve CD8+ Th2 hücreler) ait hücre popülasyonunun en yüksek olduğu grup, Grup II olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna göre 60' ıncı gün; aslında enfeksiyonun kronik aşamasını tam olarak karşılamaktan ziyade, daha çok doğal bağışıklıkla kazanılmış bağışıklık arası köprü oluşturan bir subakut dönem gibi düşünülebilir. Buna karşın, yapılan kronik deneysel çalışmalar, genelde 60. güne kadar kadar yapılmakta hatta 30- 60 gün arası dönemde sonlandırılmaktadır (Ferguson ve ark 1994, Möhle ve ark 2014, Hwang ve ark 2018). Kist oluşumlu latent toksoplazmoz için doğru olabilese de, özellikle insanlardaki ensefalitik toksoplazmoz modellemesinde aslında insan yaşına ve insanlardaki kronik toksoplazmoza iyi bir model oluşturmadığı düşünülebilir. Sunulan bu çalışmadaki 180 günlük kronik dönem grubu bu bakımdan önem kazanmaktadır. 30' uncu günde sakifiye edilen gruba göre 180'inci günde sakrifiye edilen grupta takizoit sayısı azalmıştır. Ancak, hem hüresel hem de humoral yanıtın devam ettiğini gösteren CD8+ hücreler, FOXP3+ hücreler ve CD19+ B lenfositlerin popülasyonu ile salgıladıkları sitokinler artmıştır. Bu da göstermektedir ki, enfeksiyon artık asemptomatik kronik bir form almış olmakla birlikte, herhangi bir immunbaskılayıcı

duruma ya da enfeksiyona tekrar maruziyete karşı MSS' ni koruma altına almış olabilir. *T. gondii*' nin doğal ara konağı olan fareleri kendi lehine olacak biçimde manipüle ettiği, yaşam çemberini devam ettirebilmek adına farelerde kediye korku duyusunu azalttığı bilinmektedir (Vyas ve ark 2007). Bu bağlamda düşünecek olursak, insanın hayatını kaybetmesi durumunda parazit yaşam çemberini devam ettiremeyeceği için, bu şekilde MSS' nde takizoit sayısı azalmış olsa bile her an yeni ya da daha güçlü bir enfeksiyonla karşılaşabileceğini düşünerek, immun yanıt mekanizmasını hazırda bekletiyor olabilir.

Ayrıca bu çalışmada; Grup III' ün aksi biçimde CD4+ T hücrelerin en yüksek olduğu kronik enfeksiyonun erken aşaması Grup I' de IL-1 β en yüksek seviyede bulunmuş ve Grup II ile Grup III' te sırasıyla azalarak eksprese edildiği görülmüştür. IL-1 β doğal bağışıklığın ve enflamasyonun temel düzenleyicisi olarak bilinmektedir (Dinarello 2011) ve dolayısıyla bu sonuç hiç de şaşırtıcı değildir. Ancak, yapılan başka çalışmalar göstermiştir ki; IL-1 β ' nin ratlarda mezensefalik progenitor hücreleri dopaminerjik nöronlara dönüştürmektedir ve böylece şizofreni etiyojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Kabiersch ve ark 1998, Potter ve ark 1999). Ayrıca bipolar, anksiyete gibi psikolojik bozuklukların geliştiği düşünülen kronik toksoplazmozda, klinik semptom gösteren bireylerde yüksek seviyelerde tespit edilmiştir (Söderlund ve ark 2011). Dolayısıyla, IL-1 β ' in de TNF- α gibi aslında sadece doğal bağışıklığın bir düzenleyici olmakla kalmayıp, enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde de görev aldığı bilinmektedir (Hunter ve ark 1992). Ancak sunulan çalışmada, Grup I ve III arasında IL-1 β ekspresyonu açısından anlamlı ($p < 0,0017$) bir düşüş gözlenmiştir ve IL-1 β düzeyinin özellikle 180' inci günde sakrifiye edilen Grup III' te bazal seviyeye yakın sentezlenmesi, kist oluşumu ile karakterize olmayan bu kronik ensefalitik toksoplazmoz modeli ile sitokinsel yanıtta kaynaklanan psikiyatrik bozukluklar arasındaki bağlantının çok da güçlü olmadığını düşündürmüştür.

IL-6'nın fetal beyinde serotonerjik nöronların hayatta kalmasını engelleyerek, şizofreni gelişiminde etkili olan nörotransmitter sistemi etkilediği düşünülmektedir (Jarskog ve ark 1997). Aynı zamanda bazı çalışmalar *T. gondii* seropozitivitesi, IL-6 düzeyi ve bipolar bozukluk arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermişlerdir (Hamdani ve ark 2015). Ancak sunulan çalışmada, IL-6 ekspresyonunun Grup I' de

Grup II ve III'ten daha az olmasına karşın, Grup I ve II ile Grup II ve III arasından anlamlı farklar gözlenmemiştir.

Diğer yandan IL-6 ve IL-5' in B lenfositlerin aktivasyonunda, proliferasyonunda ve farklılaşmasında görev aldıkları bilinmektedir (Takatsu 1988, Butler ve ark 2013). Sunulan çalışmada, Grup II ve Grup III' te Grup I'e göre az da olsa artış gösteren bu sitokinlerin, CD19+ hücre popülasyonunu sırasıyla bu gruplarda arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca yine, bu gruplarda B lenfositlerin bulunduğu serebral korteks, talamus ve ventraltegmental alanda IL-5 ve IL-6 sitokinsel salınımının fazla olması bulguları destekler niteliktedir.

IL-18, doğal öldürücü hücreleri IFN- γ salgılaması yönünde uyarıcı etki yapar ve IFN- γ da CD11b+ ve CD11c+ hücreleri aktive eder (Goldszmid veTrinchieri 2012). Sunulan bu çalışmada, sırasıyla Grup I, Grup II ve Grup III'te IL-18 ekspresyon düzeyleri azalmıştır. Aynı biçimde IFN- γ ve IL-12 de en yüksek oranda Grup I'de salınırken, en düşük oranda yine Grup III'te bulunmuştur. Ancak CD11b+ ve CD11c+ hücre popülasyonunda aynı düşüş gözlenmemiş, böylece aktive olan hücre sayısı ile toplam hücre sayısı arasında bir korelasyon olmadığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak;

- Sunulan çalışma metodolojisiyle enfeksiyona duyarlı C57BL/ 6 farelerde ME49 suşuyla iyi bir ensefalitik toksoplazmoz modeli oluşturulabileceği gösterilmiş,
- Ensefalitik toksoplazmozda 30' uncu, 60' ıncı ve 180' inci günlerde etkilenen bölgelerin haritası çıkarılmış ve buralarda eksprese olan sitokinler ile onları salgılayan ve etkilenen hücreler bir arada gösterilerek genel bir patogeneze tablosu oluşturulmuş,
- İnsan yaşı – fare yaşı düşünüldüğünde ve çalışma sonuçlarına bakıldığında aslında esas kronik enfeksiyonun 60' ıncı günden sonra geliştiği saptanmış,
- Th1 yanıtın literatürle paralellik gösterdiği gözlenmiş,
- Henüz tam olarak fonksiyonları gösterilmemiş olan FOXP3+ hücrelerin, kronik ensefalitik toksoplazmozda upregüle olduğu gösterilmiş ve

enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında CD4+ hücrelerinin yerini almış olabileceği speküle edilmiş,

- Kronik ensefalitik toksoplazmoz modelinde; latent toksoplazmoz modelinde ya da şizofeni, bipolar bozukluk, anksiyete gibi nöropsikiyatrik hastalıklarda artış gösteren sitokinlerin ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiş dolayısıyla, nöropsikiyatrik hastalıklarla toksoplazmoz arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için iyi bir model oluşturmayabileceği belirlenmiştir.

Böylece sunulan çalışmayla, konak- patojen ilişkisinin aydınlatılması yolunda bir adım daha atılmıştır ancak daha detaylı bir sitokinsel mekanizma ile incelenmesi ve bağışıklığın diğer elemanlarıyla birlikte değerlendirildiği çalışmalarla, insanların beyinlerinde meydana gelen toksoplazmozis ilişkili nöropatolojik değişikliklerin daha iyi anlaşılabilmesi mümkün olabilecektir.

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.

ANONİM (2003) NPHS Wales *Toxoplasma* reference laboratory, SOPs, Swansea-UK.

ANONİM (2008) Toksoplazmoz Tanısı için Sabin-Feldman Dye testi ve ELISA Testinin Standart Uygulama Prosedürü Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara. p.279-80.

ARAUJO FG, KHAN AA, SLIFER TL, BRYSKIER A, REMINGTON JS (1997) The ketolide antibiotics HMR 3647 and HMR 3004 are active against *Toxoplasma gondii* in vitro and in murine models of infection, *Antimicrob. Agents Chemother*, 41, 2137–2140.

ARAUJO FG, SLIFER T (2003) Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice, *Infect. Immun*, 71, 4171–4174.

ATASEVER A, BABUR C, INCI A, EKEBAS G, ICA A (2017) Experimental Toxoplasmosis in Japanese Quails (*Coturnix coturnix japonica*), *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 41, 62-70.

BARENCO PVC, LOURENÇO EV, CUNHA-JÚNIOR JP, ALMEIDA KC, ROQUE-BARREIRA MC, SILVA DAO, ARAÚJO ECB, COUTINHO LB, OLIVEIRA MC, MINEO TWP, MINEO JR, SILVA NM (2014) *Toxoplasma gondii* 70 kDa Heat Shock Protein: Systemic Detection Is Associated with the Death of the Parasites by the Immune Response and Its Increased Expression in the Brain Is Associated with Parasite Replication, *PLoS One*, 9, e96527.

BARRAGAN A, SIBLEY LD (2002) Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence, *J Exp Med*, 195, 1625–33.

BARUCH K, SCHWARTZ M (2013) CNS-specific T cells shape brain function via the choroid plexus, *Brain Behav Immun*, 34, 11–16.

- BERDOY M, WEBSTER JP, MACDONALD DW (2000) Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*, *Proc. Biol. Sci.* 267, 1591-1594.
- BERENREITEROVÁ M, FLEGR J, KUBĚNA AA, NĚMEC P (2011) The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: implications for the behavioral manipulation hypothesis, *PLoS One.* 6, e28925.
- BLACK MW, BOOTHROYD JC (2000) Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 607-623.
- BLANCHARD N, DUNAY IR, SCHUTLER D (2015) Persistence of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system: a fine-tuned balance between the parasite, the brain and the immune system, *Parasite Immunol*, 37, 150–158.
- BLISS SK, MARSHALL AJ, ZHANG Y, DENKERS EY (1999) Human polymorphonuclearleukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens, *Journal of immunology*, 162, 7369- 7375.
- BRIETZKE E, STABELLINI R, GRASSI-OLIVEIRA R, LAFER B (2011) Cytokines in bipolar disorder: recent findings, deleterious effects but promise for future therapeutics, *CNS Spectr*, 16, 157–168.
- BUCHBINDER S, BLATZ R, RODLOFF AC (2003) Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii* *Diagn Microbiol Infect Dis*, 45, 269-271.
- BUTLER NS, HARRIS TH, BLADER IJ (2013) Regulation of immunopathogenesis during Plasmodium and Toxoplasma infections: more parallels than distinctions?, *Trends in Parasitology*, 29, 593- 602
- BUXTON D, RODGER SM, MALEY SW, WRIGHT SE (2006) Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission, *Small Ruminant Research*, 62, 43–46.
- BUZONI-GATEL D and KASPER LH (2007) Innate Immunity to *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. Ed. LM WEISS AND K KIM, Elsevier, London UK, p: 593.
- CAI G, KASTELEIN R, HUNTER CA (2000) Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*, 68, 6932-8.

- CAMPBELL IL, STALDER AK, AKWA Y, PAGENSTECHER A, ASENSIOVC (1998) Transgenic models to study the actions of cytokines in the central nervous system, *Neuroimmunomodulation*, 5, 126–135.
- CARRUTHERS VB (2002) Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*, *Acta Trop*, 81, 111-122.
- CARRUTHERS VB, SUZUKI Y (2007) Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain, *Schizophr Bull*, 33, 745–751.
- CARSON WE, GIRI JG, LINDEMANN MJ, LINETT ML, AHDIEH M, PAXTON R, ANDERSON D, EISENMANN J, GRABSTEIN K, CALIGIURI MA (1994) Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor, *J Exp Med*, 180, 1395-403.
- CESBRON-DELAUW MF, GENDRIN C, TRAVIER L, RUFFIOT P, MERCIÈR C (2008) Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole, *Traffic*, 9, 657–664.
- CHAO CC, GEKKER G, HU S, PETERSON PK (1994) Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines, *J. Immunol*, 152, 1246-1252.
- CHARDES T, BUZONI-GATEL D, LEPAGE A, BERNARD F, BOUT D (1994) *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8⁺/Thy-1⁺ gutintraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes, *J Immunol*, 153, 4596–603.
- CHAVES AC, CERAVOLO IP, GOMES JA, ZANI CL, ROMANHA AJ, GAZZINELLI RT (2001) IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma, *Eur. J. Immunol*, 31, 333–344.
- COOK A, HOLLIMAN R, GILBERT R, BUFFOLANO W, ZUFFEREY J, PETERSEN E, JENUM P, FOULON W, SEMPRINI A, DUNN D (2000) Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control studyCommentary: Congenital toxoplasmosis—further thought for food. *Bmj*, 321, 142-147.
- DE MOURA L, BAHIA-OLIVEIRA LM, WADA MY, JONES JL, TUBOI SH, CARMO EH, RAMALHO WM, CAMARGO NJ, TREVISAN R, GRACA RM, DA SILVA AJ, MOURA I, DUBEY JP, GARRETT DO (2006) Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene, *Emerg Infect Dis*, 12, 326–329.

- DEBIERRE-GROCKIĞGO F, CAMPOS MA, AZZOUZ N, SCHMIDT J, BIEKER U, RESENDE MG, MANSUR DS, WEINGART R, SCHMIDT RR, GOLENBOCK DT, GAZZINELLI RT, SCHWARZ RT (2007) Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*, *J Immunol*, 179, 1129-1137.
- DEL RIO L, BENNOUNA S, SALINAS J, DENKERS EY (2001), CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection, *J Immunol*, 167, 6503-6509.
- DENKERS EY, GAZZINELLI RT (1998) Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection, *Clin Microbiol Rev*, 11, 569-588.
- DINARELLO CA (2011) A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation, *Eur. J. Immunol*, 41, 1203-1217.
- DOBROWOLSKI JM, and SIBLEY LD (1996) *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite, *Cell*, 84, 933-939.
- DUBEY JP (1993) *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals In: Parasitic Protozoa. Ed. JP KREIER, Academic Press, New York, USA, p: 1-158.
- 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, BEATTIE CP (1988) *Toxoplasmosis of animals and man*, CRC Press, Florida, p: 1-220.
- DUBEY JP, FRENKEL JK (1976) Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts, *J Protozool*, 23, 426- 435.
- DUBEY JP, JONES JL (2008) *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*, 38, 1257-1278.
- DUBEY JP, LINDSAY DS, AND SPEERCA (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts, *Clin Microbiol Rev*, 11, 267-299.

- 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.
- DUBEY JP, SPEER CA, SHEN SK, KWOK OCH, BLIXT JA (1997) Oocyst induced murine toxoplasmosis life cycle pathogenicity and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts, *J Parasitol*, 83, 769- 771.
- DUNAY IR, DAMATTA RA, FUX B, PRESTI R, GRECO S, COLONNA M, SIBLEY LD (2008) Gr1⁺ inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*, *Immunity*, 29, 306–317.
- DUNAY IR, FUCHS A, SIBLEY LD (2010) Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice, *Infect Immun*, 78, 1564-1570.
- DUNAY IR, SIBLEY LD (2010) Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*, *Current Opinion in Immunology*, 22, 461–466.
- DUPONT CD (2014) Roles of dendritic cells in immunity to toxoplasma gondii. Doktora Tezi. Faculties of the University of Pennsylvania.
- EVANS AK, STRASSMANN PS, LEE IP, SAPOLSKY RM (2014) Patterns of *Toxoplasma gondii* cyst distribution in the forebrain associate with individual variation in predator odor avoidance and anxiety-related behavior in male Long-Evans rats, *Brain Behav Immun*, 37, 122–133.
- FEKADU A, SHIBRE T, CLEARE AJ (2010) Toxoplasmosis as a cause for behaviour disorders overview of evidence and mechanisms, *Folia parasitologica*, 57, 105–113.
- FELDMAN HA (1980) To establish a fact: Maxwell Finland lecture, *J. Infect. Dis*, 141, 525–529.
- FERGUSON DJ, HUSKINSON-MARK J, ARAUJO FG, REMINGTON JS (1994) A morphological study of chronic cerebral toxoplasmosis in mice: comparison of four different strains of *Toxoplasma gondii*, *Parasitology research*, 80, 493–501.

- FISCHER HG, BONIFAS, REICHMANN G (2000). Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*, *J. Immunol.* 164, 4826–4834.
- FRANKEL JK (1988) Pathophysiology of toxoplasmosis, *Parasitol Today*, 4, 273-278.
- 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.
- GASKELL EA, SMITH JE, PINNEY JW, WESTHEAD DR, MCCONKEY GA (2009) A unique dual activity amino acid hydroxylase in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One*, 4, e4801.
- GAVRILESCU LC, DENKERS EY (2001) IFN- γ overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection, *J Immunol*, 167, 902-909.
- GAZZINELLI R, XU Y, HINY S, CHEEVER A, SHER A, (1992) Simultaneous depletion of CD4₊ and CD8₊ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*, *J Immunol*, 149,175–180.
- GAZZINELLI RT, HAYASHI S, WYSOCKA M, CARRERA L, KUHN R, MULLER W, ROBERGE F, TRINCHIERI G, SHER A (1994) Role of IL-12 in the initiation of cell mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide, *J Eukaryot Microbiol*, 41, 9.
- GAZZINELLI RT, HIENY S, WYNN TA, WOLF S, SHER A(1993) Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts, *Proc Natl Acad Sci U S A*,90, 6115-6119.
- GAZZINELLI RT, WYSOCKA M, HAYASHI S, DENKERS EY, HIENY S, CASPAR P, TRINCHIERI G, SHER A (1994) Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*, *J Immunol*, 153, 2533–2543.
- GAZZINELLI RT, WYSOCKA M, HIENY S, SCHARTON-KERSTEN T, CHEEVER A, KUHN R, MULLER W, TRINCHIERI G, SHER A (1996) In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal

immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha, *J Immunol*, 157, 798–805.

GIRI JG, AHDIEH M, EISENMAN J, SHANEBECK K, GRABSTEIN K, KUMAKI S, NAMEN A, PARK LS, COSMAN D, ANDERSON D (1994) Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15, *EmboJ*, 13, 2822-30.

GOEBEL S, GROSS U, LÜDER CGK (2001) Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression, *Journal of Cell Science*, 114, 3495-3505.

GOLDSZMID RS, CASPAR P, RIVOLLIER A, WHITE S, DZUTSEV A, HIENY S, KELSALL B, TRINCHIERI G, SHER A (2012) NK Cell-Derived Interferon-gamma Orchestrates Cellular Dynamics and the Differentiation of Monocytes into Dendritic Cells at the Site of Infection, *Immunity*, 36, 1047–1059.

GOLDSZMID RS, TRINCHIERI G (2012) The price of immunity, *Nat Immunol*, 13, 932-938.

GOV L, KARIMZADEH A, UENO N, LODOEN MB (2013) Human innate immunity to *Toxoplasma gondii* is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15, *MBio.*, 4, 1-11.

GREGG BS (2011) *Toxoplasma gondii* - Antigen Presentation and Interactions in the Intestinal Mucosa. Doktora Tezi. University of Pennsylvania.

GRIGG ME, BONNEFOY S, HEHL AB, SUZUKI Y, BOOTHROYD JC (2001) Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries, *Science*, 294, 161–165.

GROER MW, YOLKEN RH, XIAO JC, BECKSTEAD JW, FUCHS D, MOHAPATRA SS, SEYFANG A, POSTOLACHE TT (2011) Prenatal depression and anxiety in *Toxoplasma gondii*-positive women, *American journal of obstetrics and gynecology*.

GROER MW, YOLKEN RH, XIAO JC, BECKSTEAD JW, FUCHS D, MOHAPATRA SS, SEYFANG A, POSTOLACHE TT (2011) Prenatal depression and anxiety in *Toxoplasma gondii*-positive women, *Am. J. Obstet. Gynecol*, 204, 1–7.

HALONEN SK, CHIU F, WEISS, LM (1998) Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes, *Infect. Immun*, 66, 4989–4993.

- HAMDANI N, DABAN-HUARD C, LAJNEF M, GADEL R, LE CORVOISIER P, DELAVEST M, CARDE S, LÉPINE JP, JAMAIN S, HOUENOU J (2015) Cognitive deterioration among bipolar disorder patients infected by *Toxoplasma gondii* is correlated to interleukin 6 levels, *J. Affect. Disord*, 179, 161–166.
- HAMMOUDA NA, ABO EL-NAGA I, HUSSEIN ED, RASHWAN EA (1995) Opsonization and intracellular killing of *Toxoplasma gondii* by human mononuclear phagocytes, *J Egypt Soc Parasitol*, 25, 11-17.
- HAQUE S, HANNA S, GHARBI S, FRANCK J, DUMON H, Haque A (1999) Infection of mice by a *Toxoplasma gondii* isolate from an AIDS patient: virulence and activation of hosts' immune responses are independent of parasite genotype, *Parasite Immunol*, 21, 649–657.
- HAROON F, HANDEL U, ANGENSTEIN F, GOLDSCHMIDT J, KREUTZMANN P, LISON H, FISCHER KD, SCHEICH H, WETZEL W, SCHLÜTER D, BUDINGER E (2012) *Toxoplasma gondii* actively inhibits neuronal function in chronically infected mice, *PLoS One*, 7, e35516.
- HAZIROĞLU R, ALTINTAS K, ATASEVER A, GULBAHAR MY, KUL O, TUNCA R (2003) Pathological and immunohistochemical studies in rabbits experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, *Turk J Vet Anim Sci*, 27, 285–293.
- HENRIQUEZ SA, BRETT R, ALEXANDER J, PRATT J, ROBERTS CW (2009) Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection, *Neuroimmunomodulation*, 16, 122–133.
- 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.
- HILL DE, CHIRUKANDOTH S, DUBEY JP (2007) Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*, 6, 41-61.
- HOKELEK M, KUL O, ALTINTAŞ K, HAZIROĞLU R (2002) Deneysel toxoplazmosiste patolojik bulgular, *T. Parazitol. Derg*, 26, 17-19.
- HOKELEK M, KUL O, ALTINTAŞ K, HAZIROĞLU R (2002) Deneysel toxoplazmosiste patolojik bulgular. *T. Parazitol. Derg.*, 26: 17-19.

- HOWE DK, HONORE S, DEROUÏN F, SIBLEY LD (1997) Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis, *J Clin Microbiol*, 35, 1411–1414.
- HOWE DK, SIBLEY LD (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease, *J Infect Dis*, 172, 1561–1566.
- HUNTER CA, CHIZZONITE R, REMINGTON JS (1995) IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens, *J. Immunol*, 155, 4347–4354.
- 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, SIBLEY LD (2012) Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors, *Nat Rev Microbiol*, 10, 766–778.
- 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.
- HWANG YS, SHIN JH, YANG JP, JUNG BK, LEE SH, SHIN EH (2018) Characteristics of Infection Immunity Regulated by *Toxoplasma gondii* to Maintain Chronic Infection in the Brain, *Front Immunol*, 5, 158.
- JACOBS L, MOYLE GG, RIS RR (1963) The prevalence of toxoplasmosis in New Zealand sheep and cattle, *Am. J. Vet. Res*, 24, 673–675.
- JARSKOG LF, XIAO H, WILKIE MB, LAUDER JM, GILMORE JH (1997) Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival *in vitro*, *Int. J. Dev. Neurosci*, 15, 711–716.
- JEBBARI H, ROBERTS CW, FERGUSON DJ, BLUETHMANN H, ALEXANDER J (1998) A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*, *Parasite Immunol*, 20, 231–239.
- JENKINS MC, TUO W, FENG X, CAO L, MURPHY C, FETTERER R (2010) Neosporacanicum: cloning and expression of a gene coding for cytokine-inducing profilin, *Exp Parasitol*, 125, 357–362.

- JIN B, SUN T, YU XH, YANG YX, YEO AE (2012) The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation, *Clin Dev Immunol*, 836485.
- JOHN B, HARRIS TH, TAÏT ED, WILSON EH, GREGG B, NG LG, MRASS P, ROOS DS, DZIERSZINSKI F, WENINGER W, HUNTER CA (2009) Dynamic Imaging of CD8(+) T cells and dendritic cells during infection with *Toxoplasma gondii*, *PLoS Pathog*, 5, e1000505.
- JOHNSON JJ, ROBERTS CW, POPE C, ROBERTS F, KIRISITS MJ, ESTES R, MUI E, KRIEGER T, BROWN CR, FORMAN J, MCLEOD R (2002) In vitro correlates of Ld restricted resistance to toxoplasmic encephalitis and their critical dependence on parasite strain, *J Immunol*, 169, 966-973.
- JOHNSON LL, SAYLES PC (2002) Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice, *Infection and immunity*, 70, 185–191.
- 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.
- JONES LA, ROBERTS F, NICKDEL MB, BROMBACHER F, MCKENZIE ANJ, HENRIQUEZ FL, ALEXANDER, ROBERTS CW (2010) IL-33 receptor (T1/ST2) signalling is necessary to prevent the development of encephalitis in mice infected with *Toxoplasma gondii*, *Eur. J. Immunol*, 40, 426–436.
- KABIERSCH A, FURUKAWA H, DEL REY A, BESEDOVSKY H O (1998) Administration of interleukin-1 at birth affects dopaminergic neurons in adult mice, *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 840, 123–127.
- KAMPINGA HH, HAGEMAN J, VOS MJ, KUBOTA H, TANGUAY RM, BRUFORD EA, CHEETHAM ME, CHEN B, HIGHTOWER LE (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins, *Cell Stress Chaperones*, 14, 105–111.
- KANG H, REMINGTON JS, SUZUKI Y (2000) Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase, *J Immunol*, 164, 2629- 2634.
- KASPER L, COURRET N, DARCHE S, LUANGSAY S, MENNECHET F, MINNS L, RACHINEL N, RONET CBUZONI-GATEL D (2004) *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity, *Int J Parasitol*, 34, 401-409.

- KAUSHIK M, LAMBERTON PHL, WEBSTER JP (2012) The role of parasites and pathogens in influencing generalised anxiety and predation-related fear in the mammalian central nervous system, *Horm Behav*, 62, 191–201.
- KAVALIERS M, COLWELL DD (1995) Decreased predator avoidance in parasitized mice: neuromodulatory correlates, *Parasitology*, 111, 257-63.
- KAWAIT T, AKIRA S (2006) TLR signaling, *Cell Death Differ*, 13, 816-825.
- KELSO A (1995) Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today*, 16, 374–379.
- KHAN A, JORDAN C, MUCCIOLI C, VALLOCHI AL, RIZZO LV, BELFORT RJR, VITOR RW, SILVEIRA C, SIBLEY LD (2006) Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil, *Emerg Infect Dis*, 12, 942–949.
- KHAN IA, MORETTO M, WEI XQ, WILLIAMS M, SCHWARTZMAN JD, LIEW FY (2002) Treatment with soluble interleukin-15 exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8+ T cell response. *J Exp Med*, 195. 1463-70.
- KHAN IA, MATSUURA T, KASPER LH (1995) IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice, *Parasite Immunol*, 17, 185–195.
- KIM L, DENKERS EY (2006) *Toxoplasma gondii* triggers G_i-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis, *Journal of Cell Science*, 119, 2119-2126.
- KIM SK, FOUTS AE, BOOTHROYD JC (2007) *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN- γ -inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling; *J. Immunol*, 178, 5154–5165.
- KOBLANSKY AA, JANKOVIC D, OH H, HIENY S, SUNGNAK W, MATHUR R, HAYDEN MS, AKIRA S, SHER A, GHOSH S (2013) Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*, *Immunity*, 38, 119-130.
- KOCAK OM, ATMACA HT, TERZİ OS, BUYUKKAYAER S, OZDEMIR H, UZUNALIOGLU 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.

- KUL O, HAZIROĞLU R (2001) Kobaylarda deneysel *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunda patolojik bulgular. *Etlik Vet. Mikrob. Derg.*, 12: 23-38.
- LAMBERT H, VUTOVA PP, ADAMS WC, LORE K, BARRAGAN A (2009) The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype, *Infect Immun*, 77, 1679–1688.
- LANGELIER C, REID MJ, HALABI C, WITEK N, LARIVIERE A, MAULIK SHAH, WILSON M, CHIN-HONG P, DOUGLAS V, KAZACOS KR, BABIK JM (2016) Baylisascaris procyonis-Associated Meningoencephalitis in a Previously Healthy Adult, California, USA, *Emerg Infect Dis*, 22, 1480–1484.
- LAVINE MD, ARRIZABALAGA G (2008) Exit from host cells by the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* does not require motility, *Eukaryot Cell*, 7, 131–140.
- LELONG M, DESMONTS G (1952) Sur la nature de phénomène de Sabin et Feldman, *C R Seances Soc Biol Fil*, 146, 207–209.
- LEUKART R (1879) Die Parasiten des Menschen, und die von ihnen herriihrenden Krankheiten, 2nd ed, Winter'sche Verlagshandlung, Leipsiz, Vol 1.
- LEVINE ND (1970) Taxonomy of the sporozoa, *J Parasitol*, 56, 208-209.
- LEVINGS MK, BACCHETTA R, SCHULZ U, RONCAROLO MG (2002) The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells, *Int Arch Allergy Immunol*, 129, 263–276.
- LI ZY, MANTHEY CL, PERERA PY, SHER A, VOGEL SN (1994) *Toxoplasma gondii* soluble antigen induces a subset of lipopolysaccharide-inducible genes and tyrosine phosphoproteins in peritoneal macrophages, *Infection and immunity*, 62, 3434–3440.
- 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.
- LIESENFELD O (1999) Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut, *Immunobiology*, 201, 229–39.
- LIESENFELD O, KANG H, PARK D, NGUYEN TA, PARKHE CV, WATANABE H, ABO T, SHER A, REMINGTON JS, SUZUKI Y (1999) TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected per orally with *Toxoplasma gondii*, *Parasite Immunol*, 21, 365–376.

- LIM DC, COOKE BM, DOERIG C, SAEIJ JP (2012) Toxoplasma and Plasmodium protein kinases: roles in invasion and host cell remodelling, *International journal for parasitology*, 42, 21–32.
- LIN MH, CHEN TC, KUO TT, TSENG CC, TSENG CP (2000) Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii* *J Clin Microbiol*, 38, 4121-4125.
- LINDSAY D, BLAGBURN B, DUBEY J (1997) Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst, *Compendium on Continuing Veterinary Medical Education*, 19,448–461.
- 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.
- LIU CH, FAN YT, DIAS A, ESPER L, CORN RA, BAFICA A, MACHADO FS, ALIBERTI J (2006), Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice, *J Immunol*, 177, 31-35.
- LOWTHER DE, HAFLER DA (2012) Regulatory T cells in the central nervous system, *Immunol. Rev*, 248, 156–169.
- LUDER CG, LANG C, GIRALDO-VELASQUEZ M, ALGNER M, GERDES J, GROSS 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.
- LUTJEN S, SOLTEK S, VIRNA S, DECKERT M, SCHLUTER D (2006) Organ- and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells, *Infection and immunity*, 74, 5790–5801.10.1128.
- LYONS RE, MCLEOD R, ROBERTS CW (2002) *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion, *Trends Parasitol*, 18, 198–201.
- MANSUR RB, ZUGMAN A, ASEVEDO EDM, DA CUNHA GR, BRESSAN RA, BRIETZKE E (2012) Cytokines in schizophrenia: possible role of anti-inflammatory medications in clinical and preclinical stages, *Psychiatry Clin Neurosci*, 66, 247–260.
- MASHAYEKHI M, SANDAU MM, DUNAY IR, FRICKEL EM, KHAN A, GOLDSZMID RS, SHER A, PLOEGH HL, MURPHY TL, SIBLEY LD, MURPHY KM (2011) CD8 α ⁺ dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites, *Immunity*, 35, 249–259.

- MASHAYEKHI M, SANDAU MM, DUNAY IR, FRCKEL EM, KHAN A, GOLDSZMID RS, SHER A, PLOEGH HL, MURPHY TL, SIBLEY LD, MURPHY KM (2011) CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites, *Immunity*, 35, 249–259.
- MELZER TC, CRANSTON HJ, WEISS LM, HALONEN SK (2010) Host cell preference of *Toxoplasma gondii* cysts in murine brain: a confocal study, *J Neuroparasitology*, 1, 1–6.
- MEYLAN E, TSCHOPP J, KARIN M (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response, *Nature*, 442, 39-44.
- MİMAN O, MUTLU EA, OZCAN O, ATAMBAY M, KARLİDAG R, UNAL S, (2010) Is there any role of *Toxoplasma gondii* in the etiology of obsessive-compulsive disorder?, *Psychiatry Res*, 177, 263–265.
- MOHLE L, PARLOG A, PAHNKE J, DUNAY IR (2014) Spinal cord pathology in chronic experimental *Toxoplasma gondii* infection, *Eur J Microbiol Immunol*, 4, 65-75.
- MONTOYA JG, LIESENFELD O (2004) Toxoplasmosis, *Lancet*, 363, 1965-1976.
- MOORE KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL, O’GARRA A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor, *Annu Rev Immunol*, 19, 683–765.
- MORDUE DG, MONROY F, LA REGINA M, DINARELLO CA, SIBLEY LD (2001) Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines, *J Immunol*, 167, 4574–4584.
- 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.
- MOUDY R, MANNİNG TJ, BECKERS CJ (2001) The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*, *J Biol Chem*, 276, 41492–41501.
- MUNOZ-ZANZI CA, FRY P, LESINA B, HILL D (2010) *Toxoplasma gondii* oocyst-specific antibodies and source of infection, *Emerg Infect Dis*, 16, 1591–1593.

- NAGINENI CN, DETRICK B, HOOKS JJ (2000) *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells, *Infect. Immun*, 68, 407–410.
- NAJJAR S, PEARLMAN DM, ALPER K, NAJJAR A, DEVINSKY O (2013) Neuroinflammation and psychiatric illness, *J Neuroinflammation*, 10, 1–24.
- NAKAO M, KONISHIE (1991) Proliferation of *Toxoplasma gondii* in human neutrophils invitro, *Parasitology*, 103, 23-27.
- 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.
- NICOLLE C, MANCEAUX L (1909) Sur un protozoaire nouveau du gondi, *C R Seances Acad. Sci*, 148, 369–372.
- NOKES C, BUNDY DA (1994) Does helminth infection affect mental processing and educational achievement? *Parasitol Today*, 10, 14–18.
- O'BRIEN CA, OVERALL C, KONRADT C, O'HARA HALL AC, HAYES NW, WAGAGE S, JOHN B, CHRISTIAN DA, HUNTERAND CA, HARRIS TH (2017) CD11c-Expressing Cells Affect Regulatory T Cell Behavior in the Meninges during Central Nervous System Infection, *J Immunol*, 7, 1601581.
- 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.
- PAYNE TM, MOLESTINA RE, SINAI AP (2003) Inhibition of caspase activation and a requirement for NF- κ B function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis, *Journal of Cell Science*, 116, 4345-4358.
- PEIXOTO L, CHEN F, HARB OS, DAVIS PH, BEITING DP, BROWNBACK CS, OULOGUEM D, ROOS DS (2010) Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses, *Cell host Microbe*, 8, 208-218.

- PENA HFJ, GENNARI SM, DUBEY JP, SU C (2008) Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil, *International Journal for Parasitology*, 38, 561–569.
- PEYRON F, LOBRY JR, MUSSET K (2006) Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect*, 8, 2333–2340.
- PFEFFERKORN ER, REBHUN S, ECKEL M (1986) Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts, *J Interferon Res*, 6, 267–279.
- PLATTNER F, SOLDATI-FAVRE D (2008) Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa, *Annu Rev Microbiol*, 62, 471-487.
- POMARES C, AJZENBERG D, BORNARD L, BERNARDIN G, HASSEÏNE L, DARDÉ ML, MARTY P (2011) Toxoplasmosis and horse meat, France, *Emerging Infectious Diseases*, 17, 1327–1328.
- POTTER ED, LING ZD, CARVEY PM (1999) Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons, *Cell Tissue Res*, 296, 235–246.
- POWELL HC, GIBBS CJ JR, LORENZO AM, LAMPERT PW, GAJDUSEK DC (1978) Toxoplasmosis of the central nervous system in the adult. Electron microscopic observations, *Acta Neuropathol*, 41, 211–216.
- PRANDOVSKY E, GASKELL E, MARTIN H, DUBEY JP, WEBSTER JP, MCCONKEY GA (2011) The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism, *PLoS One*, 6, e23866.
- RANDALL LM, HUNTER CA (2011) Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis, *Eur J Microbiol Immunol*, 1, 3-9.
- REMINGTON JS, THULLIÉZ P, MONTOYA JG (2004) Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 42, 941-5.
- ROBERT-GANGNEUX F, DARDE ML (2012) Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*, 25, 264-96.
- ROBERTS C, CRUICKSHANK S, ALEXANDER J (1995) Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production, *Infect Immun*, 6, 2549–55.

- ROBERTS CW, FERGUSON DJ, JEBBARI H, SATOSKAR A, BLUETHMANN H, ALEXANDER J (1996) Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection, *Infect. Immun*, 64,897–904.
- SABIN AB and FELDMAN (1948) Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a protozoan Parasite (*Toxoplasma*), *Science*, 108, 660-663.
- SAEIJ JPI, BOYLE JP, BOOTHROYD JC(2005) Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host, *TRENDS in Parasitology*, 21, 476-481.
- SCANGA CA, ALIBERTI J, JANKOVIC D, TILLOY F, BENNOUNA S, DENKERS EY, MEDZHITOV R,SHER A (2002) Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii*infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells, *Journal of immunology*,168, 5997-6001.
- SCHADE B, FISCHER HG (2001) *Toxoplasma gondii* induction of interleukin-12is associated with acute virulence in mice and depends on the host genotype, *Vet. Parasitol*, 100, 63–74.
- SCHREIBER RD, FELDMAN HA(1980) Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway, *The Journal of infectious diseases*,141, 366-369.
- SCHREINER M, LIESENFELD O (2009) Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: review of 70 reports from the literature, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 221–233.
- SCHROEDER PC, POST MJD, OSCHATZ E, STADLER A, BRUCE-GREGORIOS J, THURNHER MM (2006) Analysis of the utility of diffusion-weighted MRI and apparent diffusion coefficient values in distinguishing central nervous system toxoplasmosis from lymphoma, *Neuroradiology*, 48, 715–720.
- SHER A, DENKERS EY, GAZZINELLI RT (1995) Induction and regulation of host cell-mediated immunity by *Toxoplasma gondii*,*Ciba Found Symp*,195, 95–104.
- SHI J, JOHANSSON J, WOODLING NS, WANG Q, MONTINE TJ, ANDREASSON K (2010) The Prostaglandin E2 E-Prostanoid 4 Receptor Exerts Anti-Inflammatory Effects in Brain Innate Immunity, *J Immunol*, 184, 7207-18.
- SIBLEY LD, ADAMS LB, FUKUTOMI Y, KRAHENBUHL JL (1991) Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages, *J Immunol*, 147, 2340–2345.

- SMITH JL (1991) Foodborne toxoplasmosis. *Journal of food safety*, 12,17-57.
- SODERLUND J, OLSSON SK, SAMUELSSON M, WALTHER-JALLOW L, JOHANSSON C, ERHARDT S, LANDÉN M, ENGBERG G (2011) Elevation of cerebrospinal fluid interleukin-1 β in bipolar disorder. *J. Psychiatry Neurosci*, 36, 114–118.
- SPLENDORE A (1908) Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo, *Rev Soc Sci Sao Paulo*, 3, 109–112.
- STERNBERG EM (1997) Neural-immune interactions in health and disease, *J Cli. Invest*, 100, 2641–2647.
- STIBBS HH (1985) Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in *Toxoplasma gondii* infected mice, *Ann Trop Med Parasitol*, 79, 153–157.
- STOLL S, JONULEIT H, SCHMITT E, MÜLLER G, YAMAUCHI H, KURIMOTO M, KNOP J, ENK AH (1998) Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development, *Eur J Immunol.*, 28, 3231-9.
- STOLL S, MÜLLER G, KURIMOTO M, SALOGA J, TANIMOTO T, YAMAUCHI H, OKAMURA H, KNOP J, ENK AH (1997) Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes, *J Immunol*, 159, 298-302.
- SU C, EVANS D, COLE RH, KISSINGER JC, AJIOKA JW, SIBLEY LD (2003) Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission, *Science*, 299, 414–416.
- SU C, HOWE DK, DUBEY JP, AJIOKA JW, SIBLEY LD (2002) Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*, *Proc Natl Acad Sci*, 99, 10753–58.
- SU C, KHAN A, ZHOU P, MAJUMDAR D, AJZENBERG D, DARDE ML, ZHU XQ, AJIOKA JW, ROSENTHAL BM, DUBEY JP, SIBLEY LD (2012) Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 5844–5849.
- SUKHUMAVASI W, EGAN CE, WARREN AL, TAYLOR GA, FOX BA, BZIK DJ, DENKERSEY (2008) TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite, *Journal of immunology*, 181, 3464-3473.

- SUKTHANA Y (2006) Toxoplasmosis: beyond animals to humans, *Trends Parasitol*, 22, 137–42.
- SUN H, ZHUO X, ZHAO X, YANG Y, CHEN X, YAO C, DU A (2017) The heat shock protein 90 of *Toxoplasma gondii* is essential for invasion of host cells and tachyzoite growth, *Parasite.*, 24, 22.
- SUTTERLAND AL, FOND G, KUIN A, KOETER MW, LUTTER R, VAN GOOL T, YOLKEN R, SZOKE A, LEBOYER M, DE HAAN L (2015) Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis, *Acta Psychiatr. Scand*, 132, 161–179.
- SUZUKI Y (2002) Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis, *J Infect Dis*, 186, 234–240.
- SUZUKI Y, JOH K, KWON OC, YANG Q, CONLEY FK, REMINGTON JS (1994) MHC class I gene(s) in the D/L region but not the TNF-alpha gene determines development of toxoplasmic encephalitis in mice, *J Immunol*, 153, 4649-4654.
- SUZUKI Y, CLAFLIN J, WANG X, LENGI A, KIKUCHI T (2005) Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*, *Intl J. Parasitol*, 35, 83–90.
- SUZUKI Y, HALONEN S, WANG X, WEN X (2007) Cerebral Toxoplasmosis: Pathogenesis and Host Resistance, In: *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Ed. LOUIS M. WEISS and Kami Kim, Chapter 21.
- SUZUKI Y, JOH K (1994) Effect of the strain of *Toxoplasma gondii* on the development of toxoplasmic encephalitis in mice treated with antibody to interferon-gamma, *Parasitol Res*, 80, 125–130.
- SUZUKI Y, REMINGTON JS (2000) Immunopathogenesis of CNS toxoplasmosis In: New concepts in the immunopathogenesis of CNS infections. Ed PK PETERSON, JS REMINGTON, Blackwell Science, Boston, p:143-162.
- SUZUKI Y, YANG Q, YANG S, NGUYEN N, LIM S, LIESENFELD O, KOJIMA T, REMINGTON JS (1996) IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis, *J. Immunol*, 157, 2564–2569.
- SWAIN, SL, MCKENZIE, DT, DUTTON RW, TONKONOGY SL, ENGLISH M (1988) The role of IL4 and IL5: characterization of a distinct helper T cell subset that makes

IL4 and IL5 (Th2) and requires priming before induction of lymphokine secretion, *Immunol. Rev*, 102, 77–105.

SWIERCZYNSKI B, BESSIERES MH, CASSAING S, GUY S, OSWALD I, SEQUELA JP, PIPY B (2000) Inhibitory activity of anti-interleukin-4 and anti-interleukin-10 antibodies on *Toxoplasma gondii* proliferation in mouse peritoneal macrophages cocultured with splenocytes from infected mice, *Parasitol. Res*, 86, 151–157.

TAKATSU K, TOMINAGA A, HARADA N, MITA S, MATSUMOTO M, TAKAHASHI T, KIKUCHI Y, YAMAGUCHI N (1988) T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties, *Immunol. Rev*, 102, 107-135.

TANSEY MG, WYSS-CORAY T (2008) Cytokines in CNS Inflammation and Disease. In: Central Nervous System Diseases and Inflammation Eds. LANE TE, CARSON M, BERGMANN C, WYSS-CORAY T Springer, Boston, p: 59- 106.

TENTER AM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans, *International Journal for Parasitology*, 30, 1217-1258.

TIZARD IZ (2004) *Veterinary Immunology*, 7th ed, Elsevier Health Sciences, chapter 12.

VAUDAUX JD, MUCCIOLI C, JAMES ER, SILVEIRA C, MAGARGAL SL, JUNG C, DUBEY JP, JONES JL, DOYMAZ MZ, BRUCKNER DA, BELFORT R, JR, HOLLAND GN, GRIGG ME (2010) Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil, *J Infect Dis*, 202, 1226–1233.

VYAS A, KIM SK, GIACOMINI N, BOOTHROYD JC, SAPOLSKY RM (2007) Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 104, 6442-6447.

VYAS A, KIM SK, GIACOMINI N, BOOTHROYD JC, SAPOLSKY RM (2007) Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 6442-7.

WANG X, KANG H, KIKUCHI T, SUZUKI Y (2004) Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease, *Infect. Immun*, 72, 4432-4438

WASTLING J, HEAP S, FERGUSON D (2000) *Toxoplasma gondii*—keeping our guests under control, *Biologist*, 47, 234–8.

- WATKINS LR, MAIER SF, GOEHLER LE (1995) Cytokine-to-brain communication: A review & analysis of alternative mechanisms, *Life Sci*, 57, 1011–1026.
- WEBSTER JP (2001) Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behaviour, *Microbes Infect*, 3, 1037–1045.
- WEBSTER JP (2001) Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behaviour, *Microbes Infect*, 3, 1037–1045.
- WEISS LM, DUBEY JP (2009) Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol*, 39, 895–901.
- WHITMARSH RJ, GRAY CM, GREGG B, CHRISTIAN DA, MAY MJ, MURRAY PJ, HUNTER CA (2011) A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*, *Cell Host Microbe*, 10, 224–236.
- WILLIAMS MA, BEVAN MJ (2007) Effector and Memory CTL Differentiation. *Annu Rev Immunol*, 25, 171–192.
- WILSON EH, HUNTER C (2004) The role of astrocytes in the immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis, *Int J Parasitol*, 34, 543–548.
- WILSON EH, WILLE-REECE U, DZIERSZINSKI F, HUNTER CA (2005) A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis, *J. Neuroimmunol*, 165, 63–74.
- WONG D, DOROVINI-ZIS K, VINCENT SR (2004) Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier, *Exp Neurol*, 190, 446–455.
- WONG ML, BONGIORNO PB, GOLDPW, LICINIO J (1995) Localization of interleukin-1 beta converting enzyme mRNA in rat brain vasculature: Evidence that the genes encoding the interleukin-1 system are constitutively expressed in brain blood vessels. Pathophysiological implications, *Neuroimmunomodulation*, 2, 141–148.
- WORKMAN CJ, SZYMCZAK-WORKMAN AL, COLLISON LW, PILLAI MR, VIGNALI DA (2009) The development and function of regulatory T cells, *Cell Mol Life Sci*, 66, 2603–22.
- WTOLA WH, MUI E, HARGRAVE A, LIU S, HYPOLITE M, MONTPETIT A, CAVAILLES P, BISANZ C, CESBRON-DELAUW MF, FOURNIE GJ, MCLEOD R (2011) NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells, *Infect. Immun*, 79, 756–766.

- YAP G, PESIN M, SHER A (2000) Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*, *Immunol*, 165, 628–631.
- YAP GS, SCHARTON-KERSTEN T, CHAREST H, SHER A (1998) Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo, *J Immunol*, 160, 1340–1345.
- YAP GS, SHER A (1999) Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function, *Immunobiology*, 201, 240-247.
- YILMAZ SM, HOPKINS SH (1972) Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts, *J Parasitol*, 58, 938–939.
- YOLKEN RH, DICKERSON FB, FULLER TORREY E (2009) *Toxoplasma* and schizophrenia, *Parasite immunology*, 31, 706–715.
- ZEDLER S, BONE RC, BAUE AE, VON DONNERSMARCK GH, FAIST E (1999) T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns, *Crit Care Med*, 27, 66–72.
- ZHANG GX, GRAN B, YU S, LI J, SIGLIENTI I, CHEN X, KAMOUN M, ROSTAMI A (2003) Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system, *J Immunol*, 170, 2153-60.
- ZHANG Y, DENKERS, EY (1999) Protective role for interleukin-5 during chronic *Toxoplasma gondii* infection, *Infect. Immun*, 67, 4383–4392.
- ZHANG Y, TRASKMAN-BENDZ L, JANELIDZE S, LANGENBERG P, SALEH A, CONSTANTINE N, OKUSAGA O, BAY-RICHTER C, BRUNDIN L, POSTOLACHE TT (2012) *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies and nonfatal suicidal self-directed violence, *J. Clin. Psychiatry* 73, 1069–1076.

ÖZGEÇMİŞ

Ad- Soyad: Tuğçe Sümer

Unvan: Araştırma Görevlisi

İletişim Bilgileri:

- **Adres:** Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
- **Telefon:** 6027
- **E-posta:** tugceantepioglu@kku.edu.tr

Makaleler:

1. Astrocytes, microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic Toxoplasma gondii infection. HT Atmaca, O Kul, E Karakuş, OS Terzi, S Canpolat, **T Antepioglu**. Neuroscience 269, 184-191.
2. Protective effect of resveratrol on sodium fluoride-induced oxidative stress, hepatotoxicity and neurotoxicity in rats. N Atmaca, HT Atmaca, A Kanici, **T Antepioglu**. Food and chemical toxicology 70, 191-197.
3. Patolojide Doku Mikroarray Teknolojisi: Zaman ve Bütçe Avantajları. HT Atmaca, O Kul, S Canpolat, **T Antepioglu**. Animal Health Prod and Hyg 4 (1), 364-367.
4. Neospora caninum: the first demonstration of the enteroepithelial stages in the intestines of a naturally infected dog. O Kul, HT Atmaca, **T Antepioglu**, N Ocal, S Canpolat. Journal of comparative pathology 153 (1), 9-13.
5. Coccidiosis due to Eimeria arloingi infection in a Saanen Goat Kid. AN Gazyagci, **T Antepioglu**, S Canpolat, HT Atmaca. Res. J. Vet. Pract 3 (2), 29-32.
6. Effects of Supplemental Epigallocatechin Gallate in the Diet of Broilers Exposed to Fluoride Intoxication. İ Aydoğan, MA Karşlı, M Başalan, E Yıldırım, M Çınar, G Şen, **T Sümer**. Biological trace element research, 1-9.

7. Deneysel Kronik Toksoplazmoz Modelinde Erken Dönem Bağışıklık Yanıtının Değerlendirilmesi. **T Sümer**, O Kul. Animal Health Prod and Hyg- Basım Aşamasında

Uluslararası Bildiriler

1. Neurohistopathological Study on Neospora caninum Infected Calves: Special Emphasis to Dopaminergic Activity. **T Sümer**, MB Turkmen, N Ocal, KG Imrak, O Kul. II International Congress on Advances in Veterinary Sciences and Technics- 2017.
2. Fatal Canine Parvovirus Infection in Newborn Puppies: Appropriate Vaccination Time Based on Maternally Derived Antibody Levels. MB Turkmen, **T Sümer**, O Ozdemir, O Kul. II International Congress on Advances in Veterinary Sciences and Technics- 2017.
3. Neospora caninum Infection with Granulomatous Panophthalmitis in Dog: Rarely systemic and Enteroepithelial Neosporosis. LC Bayram, **T Sümer**, N apaydın, O Aslan, O Kul, G Ekebas. I International Congress on Advances in Veterinary Sciences and Technics- 2016.
4. Relation of tissue cyst number, histopathology score and systemic acute phase proteins in mice infected experimentally with Toxoplasma gondii (ME49 Strain). HT Atmaca, AN Gazyagci, GC Dincel, S Canpolat, OS Terzi, O Kul, **T Antepiöglu**. 2nd Joint European Congress of The ESVP, ESTP and ECVP Cutting Edge Pathology- 2014.
5. Co-existing systemic and intestinal neosporosis in a naturally infected dog. O Kul, HT Atmaca, **T Antepiöglu**, N Ocal, S Canpolat. 2nd Joint European Congress of The ESVP, ESTP and ECVP Cutting Edge Pathology- 2014.

Ulusal Bildiriler

6. Saanen Keçi Yavrusuna Eimeria arloingi Enfeksiyonuna Bağlı Nodüler Hiperplastik Enterit ile Seyreden Coccidiosis Vakası. AN Gazyagci, **T Antepiöglu**, S Canpolat, HT Atmaca. VII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi- 2014.
7. Van Kedilerinde Doku Mikroarray Tekniği ile Nörohistopatolojik ve Patogenetik Araştırmalar. **T Sümer**, S Yıldırım, C Ozkan, HT Atmaca, D Okatan, O Kul. VIII Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi- 2016.

8. Sanal Preparat (Virtual Slide) Uygulamasının Veteriner Patolojide Kullanılması. HT Atmaca, O Kul, **T Sumer**. VIII Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi-2016.
9. Toxoplasma gondii İzolasyonu: Klinik Patoloji, Hücre Kültürü, Moleküler ve İn-vivo Araştırmalar. O Kul, **T Sumer**, M Biskin, İS Cetin. VIII Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi-2016.

Ödüller

The Young Researcher of The Year. II International Congress on Advances in Veterinary Sciences and Technics- 2017.

Alınan Sertifikalar

1. İmmunohistokimya Kursu. TC Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları.Kırıkkale/Türkiye. No: S2014/07. Tarih: 28/05/2014- 30/05/2017.
2. ECVF/ESVP Summer School in Veterinary Pathology. Bologna/ İtalya. Tarih: 14/07/2014- 25/07/2014.
3. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu. Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Denepleri etik Kurul Başkanlığı. Tarih: 05/05/2016-13/05/2016.

Davetli Konuşmacı

Buzağı Hastalıkları Sempozyumu. Buzağılarda Neospora caninum Enfeksiyonlarında Klinik ve Patolojik Bulgular konulu sunum. Van/ Türkiye. Tarih: 26/04/2017-29/04/2017.

Projeler

<i>Proje Başlığı</i>	<i>Proje Yürütücüsü</i>	<i>Proje Yardımcısı</i>	<i>Durumu</i>
Leishmania Major ile Deneysel Olarak Enfekte Edilen BALB/c Farelerde IL-4, IL-10, TNF- α ve IFN- γ Düzeylerinin Araştırılması. (Kırıkkale Üniversitesi, BAPB, 2013/72, Yardımcı Araştırmacı)	Prof. Dr .Meral AYDENİZÖZ	Yrd.Doç.Dr. A.Nuriye GAZYAĞCI, Arş.Gör. Tuğçe SÜMER	Tamamlandı
Toxoplasma gondii takizoitlerine GFP aktarımı, farelerde kronik ensefalitik Toksoplazmozda konak-	Prof. Dr. Oğuz	Arş. Gör. Tuğçe	Devam

parazit ilişkisinin çoklu immunofloresan boyama tekniği ile araştırılması (Kırıkkale Üniversitesi, BAPB, 2016/40, Yardımcı Araştırmacı)	KUL	SÜMER, Arş. Gör. Merve BİŞKİN, Yük Lis Öğrencisi Damla OKATAN	Ediyor
Broyler ırkı kanatlılarda izole duedenum, jejenum, ileum düz kası, oksidatif stres, bazı biyokimyasal, hematolojik ve immunolojik parametreler üzerine florfenikolun etkisinin araştırılması (Kırıkkale Üniversitesi, BAPB, 2014/117, Yardımcı Araştırmacı)	Doç. Dr. Ebru YILDIRIM	Doç Dr Ebru YILDIRIM, Prof Dr Emine BAYDAN, Yrd Doç Dr Hüsamettin EKİCİ, Prof Dr Miyase ÇINAR, Araş Gör Enes GÜNCÜM, Doç Dr İlkay AYDOĞAN, Prof Dr Arzu YİĞİT, Araş Gör Tuğçe SÜMER	Tamamlandı
Flor toksikasyonu oluşturulan broylerlerde rasyona epigallokateşin-3-gallat ilavesinin etkisi. (Kırıkkale Üniversitesi, BAPB, 2014/126, Yardımcı Araştırmacı)	Doç. Dr. İlkay AYDOĞAN	Prof. Dr. Mehmet Akif KARSLI, Prof. Dr. Mehmet BAŞALAN, Doç. Dr. Ebru YILDIRIM, Doç. Dr. Miyase ÇINAR, Arş. Gör. Gökhan ŞEN, Arş. Gör. Tuğçe SÜMER	Tamamlandı
Akut ve Subkronik Bakır Zehirlenmesinde (Kırıkkale Üniversitesi, BAPB, 2014/122, Yardımcı Araştırmacı)	Prof Dr Miyase ÇINAR	Doç. Dr. Ebru YILDIRIM, Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ, Dr. Öğr. Üyesi Ruhi KABAKÇI, Arş. Gör. Tuğçe SÜMER	Tamamlandı
Kuzu ve Oğlakların Yenidoğan İshallerinde Rotavirus, Coronavirus ve <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un İmmunopatoloji, FFPE PCR ve Doku Mikroarray Teknikleri ile Tespiti (TAGEM)	Yusuf AKPINAR	Prof Dr oğuz KUL, Dr Ayşe Funda YÜZBAŞIĞİL, Arş. Gör. Tuğçe SÜMER, Muammer İNANÇ, Serdar DURSUN	Devam ediyor

