

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOYUN ORİJİNLİ POLİMORF NÜKLEER LÖKOSİTLERDE
TOXOPLASMA GONDII'YE KARŞI ŞEKİLLENEN
HÜCRE DIŞI TUZAĞIN KANTİTATİF ANALİZİNDE
PİCOGREEN VE SYTOX ORANGE BOYALARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

PERÇEM ATAN

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF.DR. KADER YILDIZ**

2017 KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOYUN ORİJİNLİ POLİMORF NÜKLEER LÖKOSİTLERDE
TOXOPLASMA GONDII'YE KARŞI ŞEKİLLENEN
HÜCRE DIŞI TUZAĞIN KANTİTATİF ANALİZİNDE
PİCOGREEN VE SYTOX ORANGE BOYALARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

PERÇEM ATAN

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF.DR. KADER YILDIZ**

**Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi
(Proje no: 2016-144)**

2017 KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Parazitoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/08/2017



Prof. Dr. Kader YILDIZ

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Juri Başkanı



Doç. Dr. Nalan ÖZDAL

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye



Yrd. Doç. Dr. Sami GÖKPINAR

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
İçindekiler	III
Önsöz	VII
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VIII
Şekiller	X
Çizelgeler	XII
ÖZET.....	XIII
SUMMARY	XIV
1.GİRİŞ	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> ve Toxoplasmosis.....	1
1.1.1. Taksonomideki Yeri.....	1
1.1.2. Morfolojik Yapı ve İşlev.....	2
1.1.2.1. Takizoit	2
1.1.2.2. Bradizoit.....	4
1.1.2.3. Ookist.....	5
1.1.3. Biyoloji.....	5
1.1.3.1. Arakonakta Gelişme.....	6
1.1.3.2. Konakta Gelişim ve Seksüel Evre.....	8
1.1.4. Bulaşma ve Epidemiyoloji	10
1.1.4.1. Kongenital Bulaşma	11
1.1.4.2. Karnivorizm ile Bulaşma	11
1.1.4.3. Fekal-Oral Yolla Bulaşma.....	12
1.1.4.4. Dünyada Yayılış.....	12

1.1.4.4.1. İnsanlarda Yayılış.....	12
1.1.4.4.2. Çiftlik Hayvanlarında Yayılış	13
1.1.4.5. Türkiye’de Yayılış	13
1.1.4.5.1. İnsanlarda Yayılış.....	13
1.1.4.5.2. Çiftlik Hayvanlarında Yayılış	14
1.1.5. Patogenez	15
1.1.6. Tanı, Tedavi ve Korunma Yolları	16
1.1.7. Genotipik Karakterizasyon.....	18
1.2. Bağışıklık Sistemi ve <i>Toxoplasma gondii</i> ’ye Karşı Şekillenen Konak Bağışıklık Yanıtı	19
1.2.1. Kazanılmış Bağışıklık	20
1.2.2. Doğal Bağışıklık	24
1.2.2.1. Toll-Benzeri Reseptörler (TLRs)	26
1.2.2.2. Sitokinler.....	27
1.2.2.2.1. İnterferonlar (IFN)	27
1.2.2.2.2. İnterleukinler (IL)	28
1.2.2.4. Kompleman Sistem	28
1.2.2.5. Antimikrobiyal Peptidler.....	29
1.2.2.6. Hücresel Savunma Mekanizmaları	29
1.2.2.6.1. Mononükleer Fagositik Sistem	29
1.2.2.6.2. Polimorf Nükleer Lökositler (PMN).....	29
1.2.2.6.3. Katil Hücreler (NK)	31
1.2.2.6.4. Mast Hücreleri.....	32
1.2.2.6.5. Dendritik Hücreler (DCs).....	32
1.3. Hücre Dışı Tuzak Oluşumu.....	32
1.3.1. NET Morfolojisi.....	34

1.3.2. Hücre Dışı Tuzak Oluşumunun İndikatörleri ve Moleküler Mekanizması.....	34
1.3.3. Hücre Dışı Tuzak Yapılarının Antimikrobiyal Aktivitesi.....	37
1.3.4. Parazitlerde Hücre Dışı Tuzak Oluşumu.....	37
1.3.5. Hücre Dışı Tuzak Yapılarının Kantitatif ve Kalitatif Yöntemlerle Belirlenmesi	40
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
2.1. Gereç	43
2.1.1. Kimyasal Maddeler	43
2.1.2. Sarf Malzemeler	43
2.1.3. Cihazlar	43
2.2. Yöntem.....	44
2.2.1. Polimorf Nükleer Lökositlerin İzolasyonu	44
2.2.1.1. İzole Edilen PMN'in Sayımı	45
2.2.1.2. İzole Edilen PMN'in Trypan Blue ile Boyanarak Canlılığının Belirlenmesi	45
2.2.1.3. İzole Edilen PMN İçinde Nötrofil Oranının Diff Quick ile Boyanarak Belirlenmesi	46
2.2.2. <i>Toxoplasma gondii</i> Takizoitlerinin Elde Edilmesi.....	46
2.2.2.1. Takizoitlerin Sayılması ve Sulandırılması	47
2.2.3. Boyaların Hazırlanması.....	47
2.2.3.1. Sytox Orange.....	47
2.2.3.2. Picogreen.....	48
2.2.4. PMN ve Takizoitlerin <i>In vitro</i> Kültürünün Yapılması.....	48
2.2.5. Ekstrasellüler DNA'nın Boyanması ve Kantitatif Ölçümü.....	49
2.2.6. İstatistiksel Analiz.....	50
3. BULGULAR.....	51
3.1. Polimorf Nükleer Lökositlerin İzolasyonu	51

3.2. İzole Edilen Hücrelerin Trypan Blue Boyama ile Canlılığının Belirlenmesi	51
3.3. İzole Edilen PMN İçindeki Nötrofil Oranının Diff Quick Yöntemiyle Belirlenmesi	52
3.4. <i>Toxoplasma gondii</i> Takizoitlerinin Sayılması	53
3.5. PMN ve Takizoitlerin <i>In vitro</i> Kültürü	54
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
KAYNAKLAR	67
EKLER.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ÖNSÖZ

Koyun orijinli polimorf nükleer lökositlerde *Toxoplasma gondii*'ye karşı şekillenen hücre dışı tuzağın kantitatif analizinde iki farklı hücre dışı DNA boyası olan Picogreen ve Sytox orange'in etkinliğinin karşılaştırılmasının amaçlandığı bu yüksek lisans tez çalışmasında; tez konusunun seçiminden, sonuçlanmasına kadar geçen süreçte isteklerimi göz önünde bulundurup bana her türlü desteği ve özveriği gösteren Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Ana Bilim Dalında bulunan tüm laboratuvarların donanımını en yüksek düzeye getirerek deney çalışmalarımı kolaylıkla tamamlamama imkan sağlayan tez danışmanım Prof.Dr. Kader YILDIZ'a, *T. gondii* takizoitlerinin temininde yardımcı olan, bilgi birikimiyle laboratuvarının kapılarını ardına kadar açan Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Parazitoloji Laboratuvarı'ndan Uzman Dr. Cahit BABÜR'e, laboratuvar çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Sami Gökpınar ve Vet. Hek. Neslihan Sürsal'a,

Bursiyer olarak görev aldığım TÜBİTAK TOVAG 2140288 nolu proje kapsamında edindiğim bilgi ve donanım ile yüksek lisans eğitimime katkı sağlayan TÜBİTAK'a,

Tezimi maddi olarak destekleyerek tamamlanmasını sağlayan Kırıkkale Üniversitesine Bilimsel Araştırmalar Koordinasyonu Birimine (Proje no:2016-144) teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

- µl:** Mikrolitre
APC: Antijen Sunan Hücreler
°C: Santigrat derece
CD: Farklılaşma Kümesi
CO: Karbonmonoksit
DAMP: Tehlike ilişkili moleküler kalıplar
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
ENO2: Enolaz izoenzim 2
ETs: Hücre dışı Tuzak Oluşumu
GRA: Yoğun Granül
GTP: Guanosine 5'-triphosphate
H: Histon
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
HOCL: Hypoklorus asit
IDO: İndolamine 2,3-dioxigenase
IFN: İnterferon
IL: Interleukin
INOS: Inducible Nitric Oxide Synthase
IRF: İnterferon Düzenleyici Faktörler
LDH1: Laktikdehidrogenaz izoenzim1
LPS: Lipopolisakkarit
MHC: Major Histocompatibility Kompleks
MIC: Mikronem
ml: Mililitre
MN_{az}: Micrococcal Nuclease
MPO: Myeloperoksidaz
mtDNA: Mitokondrial DNA
MYD: Myeloid Farklılaşma Kümesi
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NETs: Nötrofil Hücre dışı Tuzakları

NK: Doğal Öldürücü Hücreler
NO: Nitrik Oksit
PAMPs: Patojen İlişkili Moleküler Kalıplar
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyon
PHOX: Fagositik Oksidaz
PMN: Polimorf Nükleer Lökositler
PRR: Kalıp Tanıma Reseptörleri
PV: Parazitoforik Vakuol
PVM: Parazitoforik Vakuol Membranı
RNA: Ribo Nükleik Asit
ROP: Rhoptri
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
s DNA: Tek zincirli DNA
SAG1: Yüzey Antijen1
TLR: Toll Benzeri Reseptörler

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> takizoit ve bradizoit formlarının morfolojisi.	4
Şekil 1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> ookisti. a)Sporlanmamış ookist b)Sporlanmakta olan ookist; ookist duvarı, sporokist, sporozoitler c ve d)Tamamen sporlanmış ookist, sporozoitler ve residual cisim.	5
Şekil 1.3. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin ara ve son konakta gelişimi.	9
Şekil 1.4. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin genotipik karakterizasyonu.	19
Şekil 1.5. Bağışıklık sistemi hücreleri.	20
Şekil 1.6. <i>Toxoplasma gondii</i> 'de kazanılmış bağışıklık yanıtının aktivasyonu.	24
Şekil 1.7. Konakta parazite karşı şekillenen IFN γ aktivasyonu.	28
Şekil 1.8. Nötrofillerin patojenle savaşta kullandığı stratejiler.	30
Şekil 1.9. Nötrofillerde bulunan granüller ve moleküler bileşenleri.	31
Şekil 1.10. Patojenle karşılaşan nötrofilde hücre dışı tuzakların oluşum mekanizması.	33
Şekil 1.11. Hücre dışı tuzak yapılarının moleküler bileşenleri.	35
Şekil 1.12. Parazitle karşılaşan nötrofilin aktivasyonu ve netosis.	39
Şekil 1.13. <i>Toxoplasma gondii</i> ile inkübe edilen nötrofilde şekillenen hücre dışı tuzaklardaki DNA yapısının Sytox orange boyası ile boyanması sonucu fluoresans mikroskopik görünümü.	40

Şekil 3.1. Kan örneklerinin Biocoll solüsyonu ile santrifüjü sonrasında falkon tüplerinde görülen tabakalar. 51

Şekil 3.2. Trypan blue ile boyanmış PMN'in ışık mikroskopik görüntüsü (x10). 52

Şekil 3.3. Diff-quick ile boyanmış nötrofillerin ışık mikroskopik görüntüsü (x100). 53

Şekil 3.4. *Toxoplasma gondii*'ye ait takizoitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (x40). 54



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin sınıflandırılması.	2
Çizelge 2.1. Çalışmada planlanan deney grupları (G)	48
Çizelge 2.2. Fluorometrik ölçüm için örneklerin 96 kuyucuklu immunopleyde yerleştirme düzeni (G: Grup, P: Picogreen boya solüsyonu, S: Sytox orange boya solüsyonu, R: RPMI-1640, B: Blank).	49
Çizelge 3.1. Deneyde Picogreen boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının fluorometre ile kantitatif ölçümü .	55
Çizelge 3.2. Picogreen boya solüsyonu ile boyanan grupların flourometre ölçümlerinden elde edilen sonuçlara ait istatistik veriler.	56
Çizelge 3.3. Deneyde Sytox orange boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının fluorometre ile kantitatif ölçümü.	57
Çizelge 3.4. Sytox orange boya solüsyonu ile boyanan grupların flourometre ölçümlerinden elde edilen sonuçlara ait istatistik veriler.	58
Çizelge 3.5. Deney gruplarında Sytox orange boya solüsyonu ve Picogreen boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının fluorometre ile kantitatif ölçümünden elde edilen sonuçların karşılaştırılması.	59
Çizelge 3.6. Deney gruplarında Picogreen ve Sytox orange boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının fluorometre ölçümlerinden elde edilen sonuçlara ait istatistik veriler.	60

ÖZET

Koyun Orijinli Polimorf Nükleer Lökositlerde *Toxoplasma gondii*'ye Karşı Şekillenen Hücre Dışı Tuzağın Kantitatif Analizinde Picogreen ve Sytox Orange Boyalarının Karşılaştırılması

Toxoplasma gondii dünya çapında yaygın, zorunlu hücre içi zoonoz parazitik protozoondur. Vücuda giren patojenlere karşı canlıda ilk savunma hattını doğal bağışıklık yanıtı oluşturmaktadır. Bu yanıtın en önemli unsurlarından birisi polimorf nükleer lökositlerdir (PMN). PMN'i oluşturan hücrelerin büyük çoğunluğu nötrofillerdir. Nötrofil vücutta patojenle mücadelede fagositosis, degranülasyon ve netosis stratejilerini kullanır. Patojenle karşılaşan PMN'de şekillenen bir dizi reaksiyon sonrasında çekirdek ve granüler içerikler ağ biçiminde hücre dışı alana salınmaktadır. Bu tuzak yapılarının kantitatif analizinde çeşitli DNA boyaları kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında koyun PMN'inde *T. gondii* takizoitlerine karşı *in vitro* şekillenen hücre dışı tuzak yapılarının omurgasını oluşturan DNA'nın kantitatif ölçümünde iki ekstraselüler DNA boyasının (Sytox orange ve Picogreen) etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında koyunlardan izole edilen PMN ve *T. gondii* takizoitleri farklı sürelerde (30, 60, 90 ve 120 dakika) inkübe edilmiş ve reaksiyon sonucunda açığa çıkan ekstrasellüler DNA iki farklı boya ile boyanarak ölçülmüştür. Çalışma sonucunda 30 dakikalık inkubasyon dışındaki ($p=0.014$) inkubasyon sürelerinde açığa çıkan DNA'nın ölçümü bakımından iki boya arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ($p>0.05$). İki boya arasında 30. dakikadaki boyanma farklılığı önemli bulunmuştur. Bu durumun sebebinin kullanılan boyaya ait boyama özelliği ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. *In vitro* netosis çalışan araştırmacıların kısa süreli inkubasyon sonucunda şekillenen ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizinde iki farklı boya kullanmaları önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler; hücre dışı tuzak oluşumu, koyun, nötrofil, Picogreen, Sytox orange, *Toxoplasma gondii*.

SUMMARY

Comparison of Picogreen and Sytox Orange Stains in Quantitative Analysis of Extracellular Trap Formed Against *Toxoplasma gondii* in Polymorphonuclear Leukocytes from Sheep

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular zoonotic parasitic protozoan that is common in the world. Innate immunity is the first line of defense of host against pathogens entering the body. One of the most important cells of innate immunity is the polymorphonuclear leukocytes (PMN's). Neutrophils consist the majority of the PMN. Neutrophil uses several strategies including phagocytosis, degranulation, and netosis while it is fighting the pathogen in the body. Upon encountering with a pathogen, a series of reactions occur inside of PMN, then, nucleus and granular contents release extracellular area like as network structures. Various extracellular DNA dyes are used for the quantitative analysis of these trap structures. The aim of the thesis study was to compare the effectiveness of two extracellular DNA dyes (Sytox orange and Picogreen) in quantitative measurement of the DNA that forms the backbone of the extracellular trap structures released from sheep PMN's after confronted with *T. gondii* tachyzoites *in vitro*. In the study, *T. gondii* tachyzoites and PMN's isolated from the sheep were incubated at different times (30, 60, 90 and 120 min), and then extracellular DNA released after incubation was stained with two different dyes. There was no statistical significant difference between the two extracellular DNA dyes regarding the measurement of DNA released during incubation times ($p > 0.05$), except for the 30-minute incubation time in the present study. There was a statistically significant difference at 30 minutes incubation time ($p = 0.014$). It is thought that this may be explained by the staining properties of the dye. Researchers studying *in vitro* netosis are recommended to use two different extracellular DNA dyes for the quantitative analysis of extracellular DNA formed during short-term incubation.

Key words; extracellular traps formation, sheep, neutrophil, Picogreen, Sytox Orange, *Toxoplasma gondii*

1. GİRİŞ

1.1. *Toxoplasma gondii* ve Toxoplasmosis

1.1.1. Taksonomideki Yeri

Nicolle ve Manceaux 1908'de *Toxoplasma gondii*'ye ait takizoitleri Kuzey Afrika'da yaşayan *Ctenodactylus gundi* adlı kemirgene ait dalak, karaciğer ve kan örneklerinde ilk kez tanımlamış ve buldukları parazitin cins adını *Toxoplasma* olarak belirlemişlerdir (Dubey 2014). Güncel taksonomi, canlıları üç domain ve sekiz alem sistemi altında sınıflandırmıştır (Reece ve ark. 2013). Bu sınıflandırmaya göre *T. gondii* Eukaria domaini ve polifiletik* bir grup olan Protista alemi içinde yer almaktadır. Sıklıkla ribozomal RNA sekanslarına dayanan moleküler sınıflandırmada, Chromaalveolata süper grubu, Alveolata grubu (klad), Apicomlexa alt grubu (şube) ve Coccidea sınıfında yer almaktadır (Reece ve ark. 2013, Hickman ve ark. 2014, Miller ve Harley 2016). Monofiletik* bir grup olan Apicomplexa üyelerinin neredeyse tamamı hayvanların parazitidir, sporozoitlerin uç kısmında apex adı verilen ve konak hücreye girmeyi kolaylaştıran yapıya sahip olmalarından dolayı bu ismi almıştır (Reece ve ark. 2013).

***Monofiletik grup (klad);** bir takson eğer grubun en yakın ortak atasını içeriyorsa ve hepsi o atanın neslinden geliyorsa, monofiletik bir gruptan söz edilir.

***Polifiletik grup;** eğer bir grubun bütün üyelerinin en yakın ortak ataları bulunmuyorsa, bu durum grubun en azından iki ayrı evrimsel kökenden gelmesini gerektirir (Reece ve ark. 2013)

Çizelge 1.1. *Toxoplasma gondii*'nin sınıflandırılması (Miller ve Harley 2016).

Domain	<i>Eukaria</i>
Alem	<i>Protista</i>
Süper grup	<i>Chromaalveolata</i>
Grup (klad)	<i>Alveolata</i>
Alt grup (şube)	<i>Apicomplexa</i>
Sınıf	<i>Coccidea</i>
Cins	<i>Toxoplasma</i>
Tür	<i>Toxoplasma gondii</i>

1.1.2. Morfolojik Yapı ve İşlev

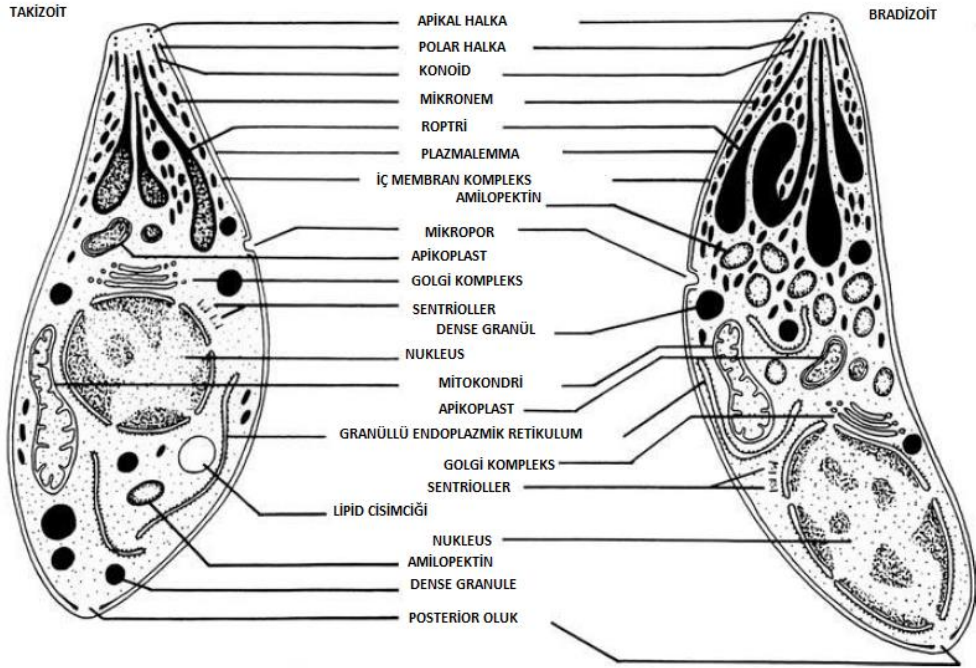
Toxoplasma gondii takizoit, bradizoit ve ookist olmak üzere üç farklı morfolojik forma sahiptir. *In vivo* ve *in vitro* ortamda çok sayıda gelişme özelliğinden dolayı en çok araştırma takizoit formu üzerine yapılmıştır (Dubey 2014).

1.1.2.1. Takizoit

Takizoit, genel olarak yarım ay biçiminde yaklaşık 2 µm genişliğinde 5-7 µm uzunluğundadır (Black ve Boothroyd 2000). Takizoit, ökaryotlarda temel olarak bulunan nükleus, golgi aygıtı, mitokondri, endoplazmik retikulum gibi organellere sahiptir (Reece ve ark. 2013). Alveolata grubuna özgü olan ve plasma zarının hemen altında yer alan, zarla çevrili alveol adı verilen keselerin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte hücre yüzeyini kararlı hale getirmeye ve su-iyon dengesini düzenlemeye yardımcı olduğu düşünülmektedir (Reece ve ark. 2013). Takizoitte bulunan hücre iskeleti; her iki uçta plasma membranının altında lokalize olmuş apikal halka ve konoid adı verilen yapıları içermektedir (Dubey 1998a). Paraziti bütünüyle

çevreleyen özelleşmiş membran kompleksi olan pelikül, plasmalemma adı verilen dış membran ve endoplazmik retikulum ile golgi aygıtından köken alan, hareket ve çoğalmada rol aldığı düşünülen veziküler yapıdaki iç zar sisteminden oluşmaktadır (Klinger ve ark. 2013).

Toxoplasma gondii'ye ait yoğun granül (GRA), mikronem (MIC) ve roptri (ROP) adlı özelleşmiş organeller, parazitin apikal bölgesinde lokalize olur ve hücre invazyonu için gerekli olan proteinleri salgılar (Carruthers 1999). Buna ek olarak bu organellerin parazitin konak hücreye penetrasyonunda, hücre içinde gelişimi için çevre oluşturulmasında ve konak hücreyi terketmesinde rol aldıkları düşünülmektedir (Ferguson 2004, Dubey 2010, Klinger ve ark. 2013). Parazitin konak hücreye girişi esnasında parazitoforik vakuol (PV) şekillenir (Gold ve ark. 2015). PV membranı (PVM) parazit ve konak hücre arasında fiziksel bir yüzey oluşturur ve parazit PV içinde konak hücreden korunarak endodiyojeni ile ikiye bölünerek çoğalır (Gold ve ark. 2015). PVM üzerinde lokalize olan *T. gondii*'ye ait salgı proteinlerinden GRA17 ve GRA23, PVM'nin moleküler temelini oluşturur ve besinlerin geçişinde rol alır, GRA17'den yoksun parazitlerin gelişiminde bazı anomaliler görülür ve bunlar apatojeniktir (Gold ve ark. 2015). Çeşitli konak molekülleri, Guanosine 5'-triphosphate (GTP)'a bağlı oligomerizasyon ve otofajiden sorumlu gen 5 (Atg5) varlığında PVM'de kümeleştirilerek yıkıma uğratılır, Atg 5 yokluğunda ise ilgili moleküller PVM yerine sitoplazmada kümeleşirler (Choi ve ark. 2014). Triptofan ve arjinin gibi aminoasitleri, bazı steroidleri ve pürinleri kendi metabolik yollarıyla sentezleyemeyen parazit, bu besinleri seçici geçirgen PVM aracılığı ile konaktan alır ve kendi metabolik atıklarını aynı yolla atar (Coppens ve ark. 2014). Roptri içeriğinin konak hücre vakuölü ve PV'de birikmesiyle oluşan veziküler yapılar ise evakuol olarak adlandırılır (Hakansson ve ark. 2001). Kalsiyum fosfat kristalleri olan asidokalsizomlar nukleus yakınında lokalize olmuştur (Miranda ve ark. 2010). Veziküler yapıdaki bitkidekilere benzer vakuoller, hayvansal glikojenden ziyade bitkisel amilopektin yapısında olan karbonhidratları içermektedirler (Coppin ve ark. 2005, Miranda ve ark. 2010). Enerji kaynağı olarak görev yaptıkları düşünülen amilopektinler, bradizoit ve sporlanmış ookist formlarında sayıca daha fazladır (Dubey ve ark. 1998a). Mikropor, sitozom benzeri yapıdadır, dış membranın invagine olmasıyla oluşur (Dubey 2010) (Şekil 1.1).



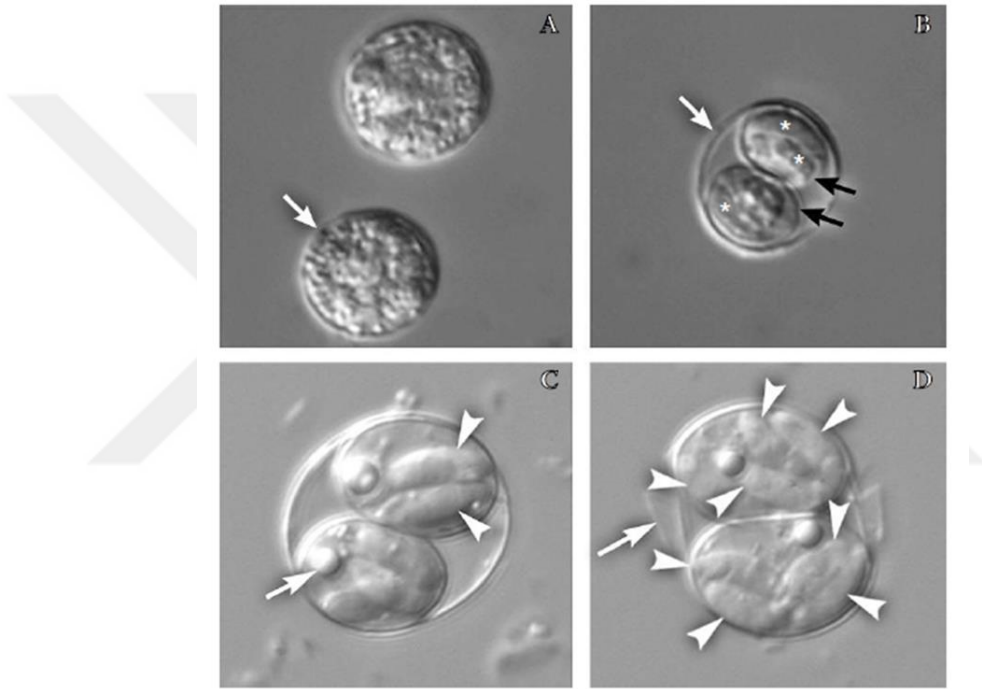
Şekil 1.1. *Toxoplasma gondii* takizoit ve bradizoit formlarının morfolojisi (Dubey 2010).

1.1.2.2. Bradizoit

Bradizoit formu konakta *Toxoplasma gondii*'ye karşı bağışıklık yanıtının gelişmesini takiben parazitin konak doku hücreleri içinde yerleşen kapsüllü formudur. Konak hücre sitoplazmasında parazite ait PV içinde bradizoitler endodiyojeni ile ikiye bölünerek çoğalır (Dubey 2010). Takizoit ve bradizoit arasında önemli farklılıklar bulunmamakla birlikte, bazı farklılıklar ifade edilmektedir. Bu farklılıklardan birisi; morfolojik olarak nükleusun, takizoitte merkezi, bradizoitte terminal pozisyonda yerleşim göstermesidir. Bir diğer farklılık ise; PAS pozitif granüller takizoitte az sayıda ya da hiç bulunmazken bradizoitte çok sayıda bulunurlar. Ayrıca bradizoitler konak hücre içinde kist duvarı ile çevrenir (Dubey ve ark. 1998). Morfolojik farklılıkların yanı sıra takizoit ve bradizoit formlarının metabolik izoenzimleri ve salgı proteinleri de farklılık gösterir. Takizoitler yüzey antijen1 (SAG1), enolaz izoenzim2 (ENO2), laktikdehidrogenaz izoenzim1 (LDH1) bakımından pozitif, buna karşın bradizoitler ise SAG1 negatif, BAG1, ENO1 ve LDH2 pozitifdir (Ferguson 2004).

1.1.2.3. Ookist

Parazitin son konağı olan kedi ince bağırsağında eşeyli üreme sonunda şekillenen formudur. Dışkıyla doğaya sporlanmamış olarak atılan ookist içerisinde şekillenen sporlanma sonucunda iki adet sporokist, her bir sporokist içinde ise dörder adet sporozoit gelişir (Dubey ve ark. 1998, Dubey 2010) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. *Toxoplasma gondii* ookisti. a) Sporlanmamış ookist (ok), b) Sporlanmakta olan ookist; ookist duvarı (beyaz ok), sporokist (siyah ok), sporozoitler (yıldızlar), c ve d) Tamamen sporlanmış ookist (ok), sporozoitler ve residual cisim (ok başı) (Dubey 2010).

1.1.3. Biyoloji

Zorunlu hücre içi yaşayan parazitik protozoon olan *Toxoplasma gondii*, takizoit, bradizoit (doku kisti içinde) ve sporozoit (ookist içinde) olmak üzere üç farklı enfektif yaşam formuna sahiptir (Frenkel ve Dubey 1972, Dubey 1998a). Heteroksen

gelişme gösteren *T. gondii* eşeyli ve eşeysiz üreme evrelerini içeren karmaşık bir yaşam çemberine sahiptir. Eşeyli üreme sadece son konak olan Felidae (kedigiller) ailesinde, eşeysiz üreme ise son konağı da kapsayan tüm sıcakkanlı omurgalılarda şekillenmektedir (Sibley ve ark. 2009, Dubey 2010). Parazitin her bir evresinde, konak şifreli ve parazite ait kinazların etkileşimi ile gerçekleşen litik döngü ve konak hücrede gizli *T. gondii* şifreli kinazlar anahtar virülens faktörler olarak tanımlanmıştır (Blader ve ark. 2013).

1.1.3.1. Arakonakta Gelişme

Arakonak canlılar tarafından ağız yoluyla alınan sporlanmış ookistlere ait kabuğun parçalanmasıyla sporozoitler, doku kistlerinin parçalanmasıyla ise bradizoitler ince bağırsak lümeninde serbest kalır ve bağırsak epitel hücrelerinde tüm çekirdekli hücreleri enfekte edebilme potansiyeline sahip olan takizoit formuna dönüşür (Dubey 1997, Dubey ve ark. 1997, Black ve Boothroyd 2000). Deneysel olarak fareye ağız yoluyla verilen sporlanmış ookistlerden serbest kalan sporozoitlerin enterosit ve goblet hücreleri gibi intestinal epitelial hücrelere girdiği ve burada eritrositler hariç tüm hücreleri enfekte edebilen ve enfeksiyonun akut dönemindeki patolojiden sorumlu olan takizoite dönüştüğü belirlenmiştir (Speer ve Dubey 1998, Speer ve Dubey 2005). Doku kisti ile gerçekleşen enfeksiyonda da bradizoitler, benzer şekilde lamina propria'ya göç ederek takizoit formuna dönüşürler (Dubey 1997, Speer ve Dubey 2005). Arakonak olan farede sporlanmış ookistle şekillendirilen deneysel enfeksiyon, bradizoitle şekillendirilen enfeksiyona göre daha başarılıdır (Dubey ve ark. 1997, Speer ve Dubey 2005).

Parazitin takizoit formu arakonağın ince bağırsak epitel hücreleri ve lenf nodüllerinde invazyon, replikasyon ve hücreden çıkışını kapsayan, tekrar eden litik döngüler aracılığı ile gelişimini tamamlar (Blader ve ark. 2013, Dubey 2014). Takizoit enfeksiyonu takiben 7-10 gün içerisinde kan ve lenf yoluyla diğer organlara geçerek hücre içinde doku kisti formuna dönüşür ve böylelikle enfeksiyonun kronik evresi başlar (Dubey 1997, Black ve Boothroyd 2000, Wilson 2012). Doku kistleri

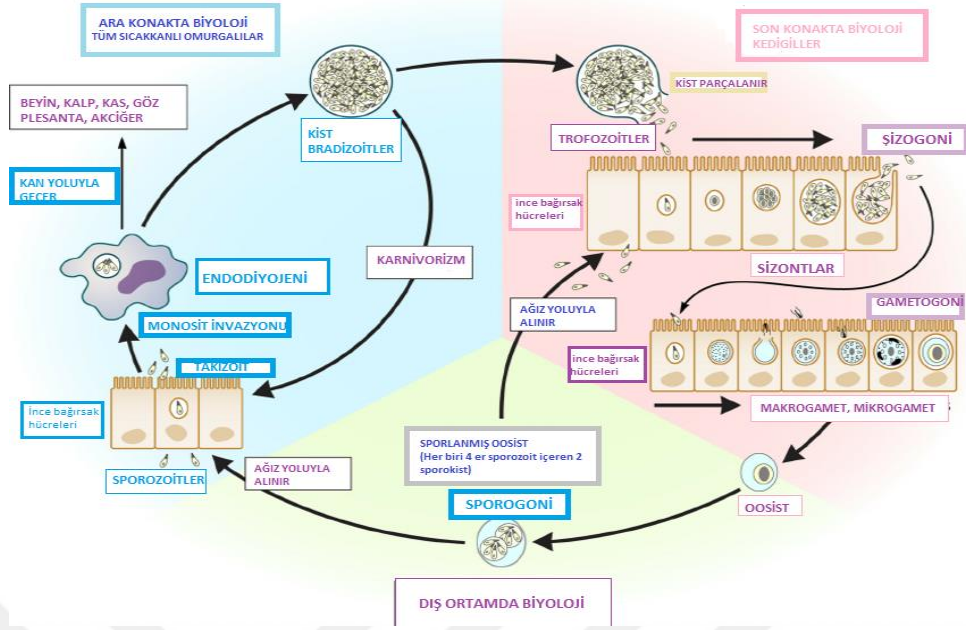
hücre sitoplazmasında PV içinde gelişir, kist içinde bulunan bradizoit formları endodiyojeni ile bölünerek çoğalırlar, bölünme her zaman eş zamanlı değildir, bazen bir kist içinde sadece iki tane bradizoit bulunurken bazen binlerce olabilmektedir (Dubey 1997). Parazite ait doku kistlerine arakonağın akciğer, karaciğer ve böbrek gibi visceral dokularında rastlanabildiği gibi beyin ve göz gibi nöral dokularda, iskelet ve kalp kası gibi muskular dokulardada rastlanabilir (Dubey 2010, Wilson 2012). İmmun yanıt, normal koşullarda dokularda kist içinde bulunan bradizoitlerin re-aktivasyonunu önlemektedir ancak çeşitli sebeplerle immün sistemi baskılanmış bireylerde enfeksiyonun reaktivasyon oranı yüksektir (Wilson 2012).

Parazitin konak hücreye invazyonunun başlangıcında veziküler tomurcuklanma ve vakuol oluşumu gerçekleşir, bunu rhoptri ve mikronem kökenli olduğu düşünülen intramembranöz molekülün oluşumu izler (Alexander ve ark. 2005). Parazitin hareketliliği plazma membranına gömülü aktin-miyozin iplikçiklerinin aktivitesine ek olarak rhoptri ve mikronem olarak adlandırılan apikal organellerde lokalize olan protein sekresyonu ile de sağlanmaktadır (Laurido ve ark. 2013). Mikronem sekresyonu, hücre içinde artan kalsiyum düzeyi aracılığı ile kontrol edilir, kalsiyum aracılı sinyalin bloke edilmesi parazitin hareketliliğini ve hücreye girişini sektete uğratar (Laurido ve ark. 2013). Mikronemal protein olan MIC2, konak ve parazitin birleşme noktasından salınmaya başlar ve hücre içine invazyonda rol alır (Carruthers ve ark. 1999). Parazit, konak hücre içinde parazitoforik vakuol içinde bulunur ve 8 saat arayla endodiyojeni adı verilen bir eşeysiz çoğalma yöntemi ile PV içinde bölünür (Ferguson ve Dubremetz 2014). Aseksüel bir süreç olan endodiyojeni parazitin gelişmesini ve iki kız hücreye bölünmesini içeren oldukça kompleks olaylar zincirinden meydana gelir ve tekrar eden çekirdek bölünmelerini içerir, sürecin sonunda ise ana hücre ortadan kaybolur (Ferguson ve Dubremetz 2014). Endodiyojeni prosesi aktin filamentlerinden ziyade mikrotübül fonksiyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir (Black ve Boothroyd 2000). Bölünmede merkezi olmayan çekirdek içi iç iplikleri rol almaktadır, mitokondri boyutunda göze çarpan artış bulunur ve apikoplastın çeşitli formlarını gözlemek mümkündür (Dubey 2014, Ferguson ve Dubremetz 2014). *Toxoplasma gondii*'de ana hücreye ait apikal kompleks ve invazyon ile ilişkili organeller endodiyojeni prosesinin sonuna kadar varlığını sürdürür, bu bakımdan diğer apikompleksa üyelerinin aseksüel

bölünmesinden farklılık gösterir (Ferguson 2004). Her endodiyojeni prosesi ile eş zamanlı olarak bir mitoz döngüsü de tamamlanır, apikomlekse mitozunun eşsiz bir özelliği de proses süresince nükleer membranın bozulmadan kalmasıdır (Ferguson ve Dubremetz 2014). *In vitro* koşullarda her biri yaklaşık 6-8 saatte tamamlanan ve tekrar eden replikasyonlar sonucu konak hücresindeki parazit sayısı 64-128 civarına ulaşır ve bulunduğu hücreyi lize ederek hücre dışı alana çıkan parazitler komşu hücreleri enfekte eder (Radke ve White 1998, Black ve Boothyrod 2000). Konak hücre ise lizozomal fizyonun yokluğu ile karakterizedir. Bu durum PV tarafından konak hücre proteinlerinin reddedilmesi ile açıklanmaktadır (Jones ve Hirsch 1972).

1.1.3.2. Konakta Gelişim ve Seksüel Evre

Parazitin biyolojisini tamamladığı tek son konağı olan kedigillerde, ince bağırsakta hem eşeysiz hem de eşeyli gelişim evreleri belirlenmiştir (Frenkel ve ark. 1969, Dubey 2014). Kedigiller, parazite ait her bir enfektif evreyi (takizoit, bradizoit ve sporozoit) oral yolla aldıklarında, dışkılarıyla ookist atabilme potansiyeline sahiptir (Dubey 1998a, Dubey 2010). Kedilerde toxoplasmosis için prepatent süre; eğer enfeksiyon doku kisti aracılığı ile gerçekleşiyse 3-10 gün, sporlanmış ookist ile gerçekleşiyse 18. gün civarında, takizoit ile gerçekleşiyse -değişkenlik göstermekle birlikte- ortalama 13. günde tamamlanır ve kedi dışkı ile doğaya ookist atmaya başlar (Dubey ve ark. 1998, Dubey 2010). Kedide bradizoitler aracılığı ile gerçekleşen enfeksiyonun etkinliği oldukça yüksek olup parazitin bu formu ile enfekte olan kedilerin neredeyse tamamı ookist atmakta iken, takizoit ve ookist ile enfeksiyonda bu oran %50'nin altındadır (Dubey 2010) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. *Toxoplasma gondii*'nin arakonak ve son konakta gelişimi (Gangneux ve Laure Dardé 2012).

Doku kistlerinin ağız yoluyla alınmasını takiben kist duvarı mide ve ince bağırsaktaki proteolitik enzimler aracılığı ile parçalanır ve kistlerden açığa çıkan bradizoit formları geniş çaplı bir hasara sebep olmaksızın ince bağırsak epitel hücrelerine penetre olur (Klinger ve ark. 2013). Penetrasyonu takiben, farklı morfolojiye sahip ve yapısal olarak takizoitlerden farklılık gösteren 5 aseksüel evreyi (A-E şizont) içeren şizogoni ve gametogoniyi kapsayan enteroepitelyal evre başlamaktadır (Dubey ve Frenkel 1972). Takizoitler özellikle lamina propria oluşurken, merontlar ve gamontlar enterositlerde gelişir (Dubey ve Frenkel 1972, Speer ve Dubey 2005). Tip B merontlar endodiyojeni ile merozoitleri oluştururken, tip C, D ve E merontlar endopoliyojeni aracılığı ile merozoitleri oluşturur (Speer ve Dubey 2005). Merogoni esnasında stoplazma bölünmesi olmaksızın iki ya da daha fazla nükleus bölünmesi görülür, merozoitler son nükleer bölünme esnasında ya da sonrasında oluşmaya başlar (Speer ve Dubey 2005). D ve E tip şizontlardan merozoitlerin salınmasını takiben gametogoni evresi başlamaktadır, yalnızca kediye özgü olan bu evrede mikrogametogoni ile çok sayıda mikrogamet, makrogametogoni ile tek bir makrogamet meydana gelir, gamontlar ince bağırsakta özellikle ileumda oluşmaktadır (Dubey ve Frenkel 1972, Dubey 2010, Lamb 2012). Mikrogametogoninin erken fazı endopoliyojeninin proliferatif fazına oldukça

benzerlik göstermektedir ve ilerleyen süreçte merogoniden nükleer heterokromatinin dağılımı bakımından farklılık gösterir (Ferguson ve Dubremetz 2014). Mikrogamet kamçıları aracılığı ile makrogamete ulaşır ve döllenme ile ookist adı verilen zigot meydana gelir. Ookist, etrafını çevreleyen dayanıklı duvarın gelişmesini takiben içinde bulunduğu hücreyi parçalayarak bağırsak boşluğunda serbest kalır ve dışkıyla dış ortama atılır. Dış ortamda uygun koşullar altında ookist içinde sporogoni safhası başlar ve sporulasyon 1 ila 5 gün arasında tamamlanır. Öncelikle ookist içerisinde sporoblastların uzamasıyla iki sporokist meydana gelir, bunu takiben mayoz ile iki sporokist içinde dörder adet sporozoit adı verilen haploid yavrular gelişir (Frenkel ve ark. 1969, Ferguson ve ark. 1979, Speer ve Dubey 1998, Dubey 2010). Ookist ve takizoitle gerçekleşen enfeksiyonlarda ise, bu formların öncelikle doku kisti formuna dönüştükleri sonrasında ise enteroepitelyal fazı başlattıkları düşünülmektedir (Dubey 2010).

1.1.4. Bulaşma ve Epidemiyoloji

Başlangıçta vektörle taşınan bir parazit olduğu düşünülen *Toxoplasma gondii*'nin, sonraki çalışmalarda; kongenital, fekal-oral ve karnivorizm olmak üzere üç farklı yolla bulaştığı belirlenmiştir (Dubey 2014). Annenin enfeksiyonla ilk kez gebelik esnasında karşılaşması durumunda takizoitlerin plasental yol ile fetusa geçmesi vertikal bulaşma, parazitin yaşam çemberinde üç farklı enfektif dönemin ağız yoluyla alınması ise horizontal bulaşma olarak adlandırılmaktadır (Tenter ve ark. 2000). Doğada sporlanarak içinde enfektif form olan sporozoitlerin geliştiği ookistler besin maddeleri ve su yoluyla alınabilirken, bradizoitler kontamine et ve sakatat ile alınmaktadır (Tenter ve ark. 2000). Takizoitler kan nakli, doku transplantasyonu ve pastörize edilmemiş koyun/keçi sütünün içilmesi ile bulaşabilir (Tenter ve ark. 2000, Camossi ve ark. 2011).

Doku kisti barındıran etlerin tüketilmesi ile vücuda giren bradizoitler konağın mide asitine (pepsin-HCl) dirençlidir, bu özelliği sebebiyle bradizoitler parazitin biyolojisinde daha büyük öneme sahip olmaktadır (Jacobs ve ark. 1960a, Dubey

1998b, Dubey 2010). Buna karşılık *Toxoplasma gondii*'nin diğer enfektif formu olan takizoitler mide asidine duyarlıdır ve sindirim yoluyla bulaşmada önemli bir rolleri yoktur (Dubey 2010). Ortamda kurumaya ve çamaşır suyuna dirençli olan ookistler ise kedi dışkısında 10 milyonun üzerinde bulunabilir, bu da çevresel kontaminasyon yoluyla parazitin ookist aracılı bulaşma oranını artırır (Dabritz ve ark. 2007, Lamb 2012).

1.1.4.1. Kongenital Bulaşma

İlk olarak 1938'de bir aylıkken ölen bir bebeğe yapılan otopside izlenen ensefalomyelitis ve retinitis lezyonlarında *Toxoplasma gondii*'ye rastlanmıştır (Wolf ve ark. 1939, Dubey 2009). Bu dokular homojenize edildikten sonra fare ve tavşanlara intraserebral olarak verilmiş ve bu hayvanlarda da ensefalitis geliştiği gözlenmiştir (Wolf ve ark. 1940). Sonraki araştırmalarda da bir çok hayvanda, özellikle koyun ve fareden kongenital bulaşma ile enfeksiyon oluşumu görülmüştür (Dubey 2010). Fareden kongenital enfeksiyonlar tekrarlayabilmekte ve enfekte fare 10 nesil boyunca enfeksiyonu kongenital olarak bulaştırabilmektedir (Beverley 1959).

1.1.4.2. Karnivorizm ile Bulaşma

Az pişmiş ya da pişmemiş etlerle toksoplazmosisin bulaşabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir (Jacobs 1960a, Cammosi ve ark. 2011, Dubey 2014). Doku kistleri içindeki enfektif form olan bradizoitlerin sindirim enzimlerine dirençli olması karnivorizm ile enfeksiyonun başarısını arttırmaktadır (Jacobs ve ark. 1960b). Desmont ve Remington (1980) tarafından çocuklar üzerinde yapılan bir araştırmada *Toxoplasma gondii*'ye yönelik antikör taşıma oranının sığır ve at eti ile beslenenlere göre koyun eti ile beslenenlerde daha yüksek olduğu bildirilmiş, bu veriler koyun etinin karnivorizm ile bulaşmada daha yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

1.1.4.3. Fekal-Oral Yolla Bulaşma

Kedi dışkısıyla atılan ookistler dış ortamda sporlanarak konak için enfektif hale gelmekte, bu da suların, otlakların, toprağın kontaminasyona neden olmakta ve otlayan çiftlik hayvanlarında, içme sularını ve toprakta yetişen bitkileri tüketen canlılarda enfeksiyonun gelişmesiyle sonuçlanmaktadır (de Moura ve ark. 2006, Dubey 2014). Hutchison (1965) ilk kez *Toxoplasma gondii* enfektivitesinin kedi dışkısıyla ilişkili olduğunu keşfetmiştir. Toksoplazmosisin, kedilerde yaşayan bir bağırsak nematodu olan *Toxocara cati* yumurtaları aracılığı ile nakledildiğini ortaya atılmıştır, ancak Frenkel ve ark. (1969) yaptığı çalışma bu hipotezi çürütmüştür.

1.1.4.4. Dünyada Yayılış

1.1.4.4.1. İnsanlarda Yayılış

Toksoplazmosis, insan ve hayvanlarda oldukça yaygın bir paraziter hastalıktır ve dünya nüfusunun % 25-30'unun bu parazitle enfekte olduğu bilinmektedir (Hill ve Dubey 2013). ABD'de besin kaynaklı patojenlerin neden olduğu ölümlerin yaklaşık dörtte birinden *Toxoplasma gondii*'nin sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Guo ve ark. 2015). ABD, Kanada ve Avrupa'da 112 000 besin kaynaklı insan hastalığının 32 700'ü *T. gondii* ile ilişkilendirilmiştir. Yılda yaklaşık bir milyon civarında insanın bu parazitin farklı formları ile enfekte olduğu ve her yıl 3 000 kadar bebeğin semptomatik oküler toksoplazmosis ile dünyaya geldiği tahmin edilmektedir (Hill ve Dubey 2013). Bölgesel olarak değişmekle birlikte insanlarda toksoplazmosis oranı % 8-22 arasındadır (Hill ve Dubey 2013).

1.1.4.4.2. Çiftlik Hayvanlarında Yayılış

Toxoplasma gondii insanın yanı sıra çiftlik hayvanlarında da yaygın bir parazittir. Hayvanlardaki yaygınlığın en önemli nedeni kedi dışkıyla kontamine olmuş otlaklardır (Innes ve ark. 2009, Guo ve ark. 2015). Parazite en çok maruz kalan çiftlik hayvanı koyunlardır (Guo ve ark. 2015). Ilıman iklim kuşağında yetiştirilen koyunlarda toksoplazmosis yaygın olarak görülen bir hastalıktır, bu durumun nedeni ılıman iklimin ookistlerin gelişimi için en uygun koşulları sağlamasıdır (Buxton ve ark. 2007). Mısır'da çiftlik hayvanlarında % 26.7 oranında seropozitivite bulunmuş ve çiftlik hayvanları arasında en yüksek oranın % 38.7 ile koyunlarda olduğu ifade edilmiştir (Fereig ve ark. 2016). Abu-Dalbouh ve ark. (2012) abort yapan koyunlara ait doku ve kan örneklerinin PCR ile analizi sonucunda *T. gondii*'ye ait DNA'ya % 29.8 oranında rastlamıştır. İtalya'da insan tüketimine sunulan at etlerinde *T. gondii* seropozitifliği % 17.6 bulunmuştur (Papini ve ark. 2015). ABD'de sığır, domuz ve tavuk etleri incelenmiş ve yaklaşık üçte birinde *T. gondii*'ye rastlanmıştır (Dubey ve ark. 2005). İsrail'de kümes hayvanları üzerinde yapılan araştırmada % 35.4 oranında toksoplazmosis seropozitifliği belirlenmiştir (Salanta ve ark. 2016). Çin'de fok balıklarında, Polonya'da ise *Ixodes ricinus* kenelerinde *T. gondii*'ye rastlanmış, Pensilvanya'da ise *Ursus americanus* türlerinde % 77 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (Dubey ve ark. 2016).

1.1.4.5. Türkiye'de Yayılış

1.1.4.5.1. İnsanlarda Yayılış

Türkiye'de çeşitli bölgelerde toksoplazmosis şüpheli insanlardan alınan kan serumu örneklerinde anti-*Toxoplasma* IgG ve anti-*Toxoplasma* IgM antikör pozitifliği çeşitli serolojik yöntemlerle incelenmiştir (Kuk ve Özden 2007, Durdu 2008, Aycan ve ark.

2009, Yaman ve ark. 2010, Çekin ve ark. 2011, Yazar ve ark. 2012, Aşcı ve Akgün 2015). İstanbul'daki Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 102 sağlıklı gebede *Toxoplasma gondii* IgG seropozitifliğinin % 50 oranında olduğu belirlenirken IgM seropozitifliğine rastlanmamıştır (Durdu 2008). Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran hastaların % 32'sinde IgG, % 0.5'inde IgM ve % 2.3'ünde hem IgG hem de IgM seropozitifliği saptanmış (Yaman ve ark. 2010), aynı yörede yapılan bir diğer araştırmada ise 1581 serum örneği çalışılmış ve % 28.8'inde IgG, % 0.5'inde IgM seropozitifliği belirlenmiştir (Yazar ve ark. 2012). Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi'nde *T. gondii* IgG seropozitifliği % 31.01, IgM seropozitifliği ise % 0.77 oranında saptanmıştır (Kuk ve Özden 2007). İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda 4 132 serum örneğinin % 37.1'i *T. gondii* IgG bakımından seropozitif bulunurken, % 1.3'ü IgM bakımından seropozitif olduğu görülmüştür (Aycan ve ark. 2009). Afyon Yöresi'nde toksoplazmosis seropozitifliğinin % 24 oranında olduğu kaydedilmiştir (Aşcı ve Akgün 2015). Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran insanlarda toksoplazmosis seropozitifliği % 33.4 olarak bildirilmiştir (Çekin ve ark. 2011).

1.1.4.5.2. Çiftlik Hayvanlarında Yayılış

Türkiye'de çiftlik hayvanlarında *Toxoplasma gondii*'nin yayılışı ile ilgili çok sayıda araştırma raporu bulunmaktadır (Karagenç ve ark. 2005, Akça ve Mor 2010, Leblebiciler ve Yıldız 2014, Yıldız ve ark. 2015). Aydın yöresinde 487 sığıra ait serum örneğinin % 45.2'si toksoplazmosis yönünden seropozitif bulunmuştur (Karagenç ve ark. 2005). Kars yöresinde 216 sığırdan 202'sinin *T. gondii* bakımından seropozitif olduğu belirlenmiştir (Akça ve Mor 2010). Afyon yöresinde koyunların % 54.65'inde *T. gondii* seropozitivitesi bildirilmiştir (Çiçek ve ark. 2004). Silopi'de koyunlarda toksoplazmosis seropozitifliğinin % 97 olduğu kaydedilmiştir (Leblebiciler ve Yıldız 2014). Ankara ve Kırıkkale yöresinde tüketime sunulan koyun etlerinin % 21.2'sinde *T. gondii*'ye ait doku kistlerine rastlanmıştır, aynı örneklerin PCR analizlerinde parazite ait DNA % 40.8 oranında belirlenmiştir (Yıldız ve ark. 2015).

1.1.5. Patogenez

Parazitin PV içinde bölünmesi ve tekrar eden replikasyonlar hücrenin lizisi ile sonuçlanır, bu nedenle takizoitlerin hücre içindeki proliferasyonu enfeksiyonla ilişkili ilk patolojiyi şekillendirir (Wilson 2012). *Toxoplasma gondii* enfeksiyonları konaklarında genelde asemptomik seyreder ancak bağışıklık sisteminin herhangi bir sebeple baskılandığı durumda doku kistlerinin re-aktivasyonundan dolayı ensefalitis ve retinokoroiditise neden olması nedeniyle klinik açıdan önemli bir hal almaktadır (Dubey 2010). İnsan ve diğer memelilerde, toksoplazmosis ile gebeliğin ilk iki trimesterinde ilk kez enfekte olan annede akut dönemde takizoitler plasenta yoluyla fetusa geçerek özellikle merkezi sinir sistemi hücrelerinde hızla çoğalmaya başlar. Bu tablo fetusta hidrosefali, mikrosefali ve anensefali gibi serebral bozukluklar şekillendirmekte ve aborta neden olabilmektedir (Desmonts ve Couvreur 1974, Dubey 2010).

Toksoplazmosis koyunlarda yaygın olan ve sürüde şekillendirdiği abortlar sebebiyle önemli ekonomik kayıplara yol açan enfeksiyöz bir hastalıktır (Buxton ve ark. 2007, Dubey 2010). Gebe koyunlarda enfeksiyonun meydana gelebilmesi için az sayıda (200 civarında) sporlanmış ookistin ağız yoluyla alınması yeterlidir (Buxton ve ark. 2007). Koyunlardaki enfeksiyon dozunu belirlemek amacıyla Mc Colgan ve ark. (1988) tarafından yapılan bir araştırmada 20 *Toxoplasma gondii* ookisti verilen koyunlarda enfeksiyon oluşmadığı, 2000 ookist verildiğinde ise yüksek ateş gözlemlendiği bildirilmiştir. Koyun çiftleşme öncesinde toksoplazmosis ile enfekte ise vücudunda parazite karşı gelişen immun yanıt sebebiyle gebelik esnasında bu parazitte re-enfeksiyona karşı koruma sağlar (Innes ve ark. 2009). Koyunlarda gebeliğin ortalarına doğru şekillenen toksoplazmosis sıklıkla ölü doğum ya da hastalıklı kuzuların doğumu ile sonuçlanır (Innes ve ark. 2009). *Toxoplasma gondii* koyunlarda arakonak olan diğer memelilerde görülen yerleşim yerleri olan reproduktif/ürogenital ve lokomotor sistemde, kas, karaciğer, akciğer, üreme sistemi ve merkezi sinir sisteminde yerleşim gösterir (Buxton ve ark. 2007). Ağır enfeksiyonda konak hücrelerinde hızla çoğalan takizoitler myokardium, akciğer, karaciğer ve beyin gibi organlarda nekroz oluşturabilir. Konakta parazite karşı

şekillenen bağışıklık sonucunda bradizoitlerin geliştiği dönem hastalığın kronik fazı olarak tanımlanır ve bu faz asemptomatik seyrederek (Taylor ve ark. 2007).

1.1.6. Tanı, Tedavi ve Korunma Yolları

Toksoplazmosisin tanısı direkt ve indirekt olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak yapılır. Direkt tanıda dışkı muayenesi, doku kesitlerinin histopatolojisi ve PCR, indirekt tanıda ise serolojik testler kullanılır (Dubey 2010, Caner ve Gürüz 2011). Dışkı muayenesi ile tanı *Toxoplasma gondii*'nin ookist formunun şekillendiği kedilerde akut toksoplazmosis esnasında yapılmaktadır. Hastalığın akut döneminde son konak kedinin dışkısı ile yoğun biçimde ookist atımı olur. Bu dönemde kedi dışkısının mikroskopik muayenesinde isosporid tipte ookistler görülür. Bu ookistlerin kedi bağırsağında parazitlenen diğer protozoon olan *Hammondia hammondi*'ye ait ookistlerden ayırt edilmesi mikroskopik olarak güçtür (Dubey 2010).

Konaktan nekropsisi sonucunda ya da biyopsi ile alınan doku örneklerinde *Toxoplasma gondii*'ye ait kistler kesitlerin Hematoxylin&Eosin gibi boyalarla boyanması ya da parazite özgü immunohistokimyasal boyanması sonucunda ışık mikroskopik olarak aranmaktadır (Dubey 2010). Arakonakta hiçbir zaman ve son konakta ise kronik toksoplazmosis esnasında dışkı ile ookist atılımı söz konusu olmadığı için bu canlılarda hastalığın tanısı moleküler ve serolojik yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Moleküler tanı yöntemleri arasında en sık kullanılan PCR'dir. Bu yöntemde spesifik primerler kullanılarak konak dokularında parazite ait DNA aranmaktadır (Dubey 2010).

Canlı hayvanda toksoplazmosis tanısında en yaygın kullanılan yol serolojidir (Dubey 2010). Serolojik testlerde kan serumu örneklerinde parazite karşı gelişmiş antikor aranmaktadır (De Boer ve ark. 1996). Konağın parazitle enfeksiyonu esnasında bağışıklık sisteminde yer alan plazma hücrelerinden parazite karşı üretilen IgM, IgG, IgA ve IgE gibi antikorlar salgılanmaktadır. Akut toksoplazmosis esnasında kanda IgM titresi artar, kronik toksoplazmosis esnasında ise IgM titresi düşerken IgG

titresi yükselmektedir. Konak yaşadığı sürece kanda IgG serolojik olarak tespit edilir (Caner ve Gürüz 2011, Wilson 2012).

Konakta toksoplasmosisin tanısında kullanılan birçok serolojik test bulunmaktadır. Bu testler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan biri parazite ait canlı takizoitlerin -antikör ve kompleman varlığında- lizisine dayanan Sabin Feldman dye testidir (Sabin ve Feldman 1948). Altın standart olarak kabul edilen bu test konakta *Toxoplasma gondii*'ye özgü IgG tespitine yöneliktir. Diğer yaygın kullanılan serolojik testler arasında direkt aglütinasyon testi, indirekt fluoresans antikör testi ve ELISA yer alır (Desmonts ve Remington 1980, Arthur ve Blewett 1988, de Boer ve ark. 1996, Zajac ve Conboy 2009). İnsan hekimliğinde toksoplasmosis yönünden seronegatif annelerin izlenmesinde yaygın olarak kullanılan ELISA testi ile şüpheli kan serumlarında hem IgM hem de IgG titrelerine bakılmakta, böylece hem akut hem de kronik toksoplasmosis antikör titreleri izlenerek takip edilebilmektedir. Ancak toksoplasmosis takiben kanda şekillenen IgM titresinin düşmesi uzun sürdüğünden konaktaki toksoplasmosis seropozitifliğin yakın zamanda geçirilmiş bir enfeksiyona bağlı olup olmadığı net biçimde anlayabilmek için anti-*T. gondii* antikörlerinin avidite değerleri belirlenmektedir (Özdemir ve ark. 2008). Konak etkenle ilk kez karşılaştığında vücudunda şekillenen IgG antikörleri enfeksiyonun başlangıcında düşük avidite gösterirken giderek olgunlaşır ve yüksek avidite kazanır (Ashburn ve ark. 1998, Beghetto ve ark. 2003, Özdemir ve ark. 2008).

Toksoplasmosisin tedavisinde, takizoitler için etkili ilaç mevcut olmasına karşın, kist içinde korunaklı konumda bulunan bradizoitler tedavi amaçlı kullanılan ilaçlara karşı dirençlidir (Dubey 1998a). Kedilerde ookist atımının olduğu dönemde ookistlere karşı etkili tedavi protokolleri mevcuttur (Dubey, 2010). Ancak ookist atılma dönemi oldukça kısa bir periyot olduğundan ve klinik olarak belirti izlenmediğinden genelde kedilerde bu dönem gözden kaçabilmektedir. Günümüzde gerek insan gerekse hayvan sağlığı için önemli olan *Toxoplasma gondii*'ye karşı etkili ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bunun için parazitte bulunan ve apikoplast adı verilen endosimbiont organel üzerine etkili olabilecek

etken maddelerin geliştirilmesi üzerinde durulmaktadır (Klinger ve ark. 2013, Reece ve ark. 2013).

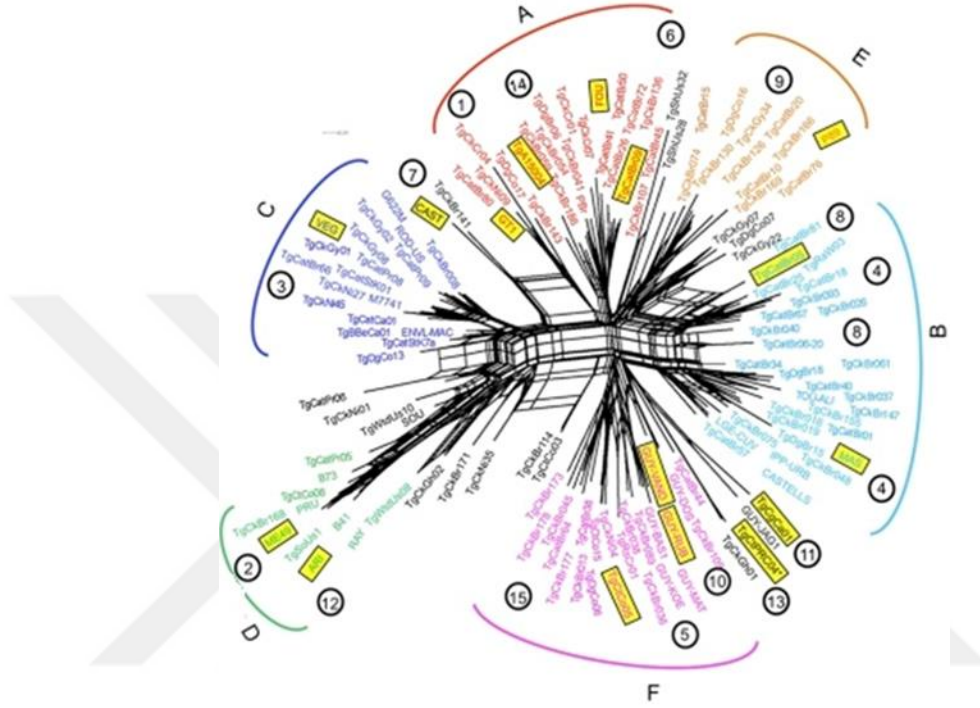
Koyunculüğün yaygın olarak yapıldığı bazı ülkelerde *Toxoplasma gondii* için geliştirilmiş aşı da kullanılmaktadır. Koyunlara çiftleşme sezonundan yaklaşık üç hafta önce uygulanan canlı aşı etkin koruma sağlamaktadır (Buxton ve Innes 1995).

Parazitin konaktaki tedavisine ilişkin uygulanacak protokollerin sınırlı olmasından dolayı konağın toksoplasmosisten korunması daha önem kazanmaktadır. Bu amaçla insanlar için; etin çiğ ya da az pişmiş biçimde tüketilmemesi, mutfakta yemek hazırlama aşamasında etin kesildiği kesme tahtası ve bıçağın sıcak su ile yıkandıktan sonra yeniden kullanılması, çiğ yenilen sebze ve meyvelerin tüketilmeden önce yıkanması, toprakla uğraştıktan sonra ellerin yıkanması önerilir. Evde kedi besleyen hayvan sahiplerine; kedilerine çiğ et/kıyma vermemesi, kedi dışkıyla çıkan ookistlerin ancak dışarıda sporlanma dönemi sonrasında enfektif hale geçmesi sebebiyle kedi kumunun günlük temizlenerek ookistin sporlanmadan dışkıyı uzaklaştırması önerilir. Toplumda oldukça yaygın olan toksoplasmosise yönelik olarak kedi kılının hastalık sebebi olmadığı hususunda farkındalık oluşturmak gerekmektedir. *Felidae* ailesinde yer alan yabani üyelerin beslenmesinde kullandıkları avlanmanın engellenmesi ise hem doğaya aykırı bir seçenektir hem de mümkün değildir.

1.1.7. Genotipik Karakterizasyon

Toxoplasma gondii, genotipik benzerliklerine rağmen farede güçlü fenotipik farklılık gösteren ve tip 1, tip 2 ve tip 3 olarak adlandırılan 3 farklı klad altında sınıflandırılmıştır (Howe ve Sibley 1995, Sibley ve ark. 2009, Szabo ve Finney 2016). Bu üç klad arasında en yüksek virülense sahip, hareket ve yayılma kapasitesi en yüksek klad tip 1'dir, buna karşılık konakta yangısal yanıtı uyarmasına rağmen tip 2 ve tip 3'ün virülensi düşüktür (Sibley ve Boothroyd 1992, Sibley ve ark. 2009, Szabo ve Finney 2016). Daha sonraki çalışmalarda Kuzey Amerika'da haplotip 12 olarak adlandırılan 4. klonal soy tanımlanmıştır (Khan ve ark. 2011). Son yapılan

çalışmalarda ise, polimorfik DNA markerları kullanılarak *T. gondii*'nin altı ana kladına ait 15 haplogrubu ve 138 özgün genotipi tanımlanmıştır (Su ve ark. 2012) (Şekil 1.4).

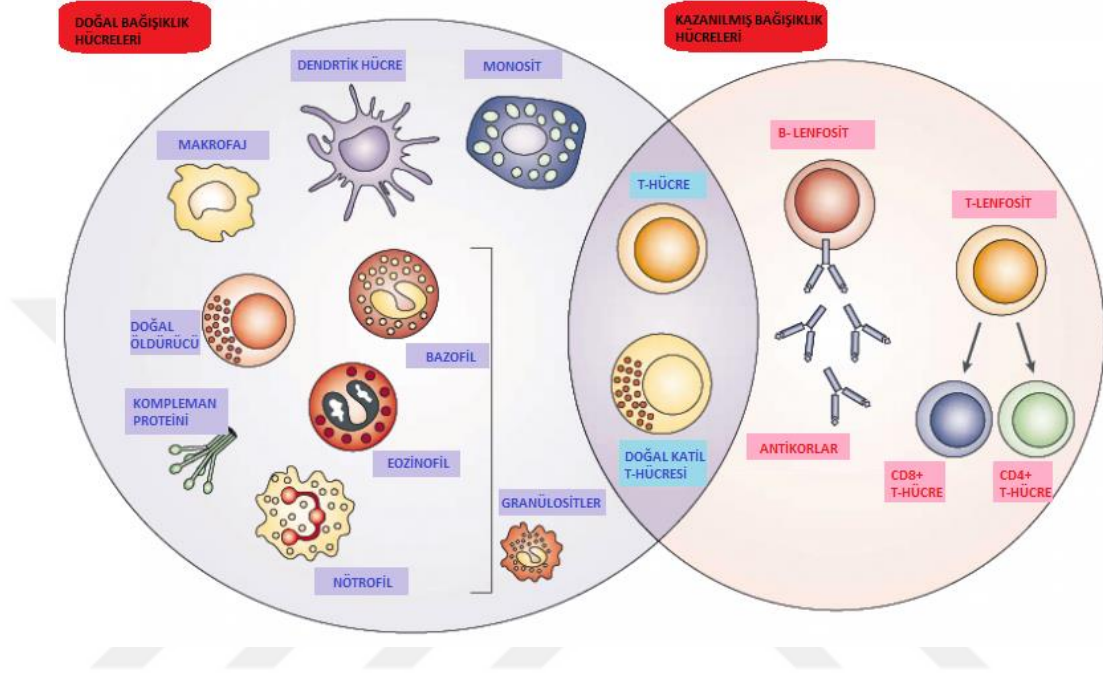


Şekil 1.4. *Toxoplasma gondii*'nin genotipik karakterizasyonu (Su ve ark. 2012).

1.2. Bağışıklık Sistemi ve *Toxoplasma gondii*'ye Karşı Şekillenen Konak Bağışıklık Yanıtı

Çok hücreli canlılar evrimleri sürecinde, mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonlardan korunmak ve hasar görmüş ya da nekroze olmuş hücrelerden arınmak için savunma mekanizmaları geliştirmiştir (Eales 2005, Abbas ve ark. 2015). Bize nefesimiz kadar yakın olan virüs, bakteri ve protozoon gibi hastalık yapıcı ajanlarla sürekli savaş halinde olan bağışıklık sistemimiz sayesinde sağışlıklı kalmaktayız (Simon ve ark. 2016). Canlılarda enfeksiyonlara karşı gelişen savunma mekanizması, ilk koruyucu tepkiyi oluşturan, hızla gelişen ancak patojen özgülüğü

olmayan doğal bağışıklık ve işleme daha geç katılan ancak, etkin özgülüğü olan ve etkin savunma sağlayan kazanılmış bağışıklıktan oluşmaktadır (Akira ve ark. 2006) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Bağışıklık sistemi hücreleri (Dranoff 2004).

1.2.1. Kazanılmış Bağışıklık

Omurgalı canlılarda, doğal bağışıklığın fiziksel ve hücresel yanıtından sonra devreye giren kazanılmış bağışıklık, organizmaya herhangi bir yolla giren patojenlere karşı gelişir (Abbas ve ark. 2015, Simon ve ark. 2016). Bağışıklık sistemi lenfositlerin olgunlaştığı ve antijene yanıt verebilecek hale geldiği üretken lenfoid organlar ve mikroplara karşı kazanılmış immün yanıtın başlatıldığı periferik lenfoid organlardan (lenf düğümleri, dalak, mukozal ve kutanöz lenfoid dokular) oluşmaktadır (Abbas ve ark. 2015). Epitelden organizmaya giren mikroorganizmalar, epitel içinde yerleşik olan dendritik hücreler (DCs) tarafından yakalanır ve hücreye bağlı antijenler en yakın lenf düğümüne taşınır. Lenfositler; her bir antijene özgü reseptörler üreten tek

hücre grubudur ve kazanılmış bağışıklıkta önemli rol oynar (Lamb 2012). Kazanılmış bağışıklık yanıtı lenfositlerde bulunan ve özgül reseptörlerine bağlanarak onları aktive edebilme potansiyeline sahip “antijen” adı verilen yabancı maddeler aracılığıyla oluşturulur (Abbas ve ark. 2015, Simon ve ark. 2016).

Kazanılmış bağışıklığı doğal bağışıklıktan ayıran en önemli özellik, immünolojik bellek oluşumudur. Yani kazanılmış bağışıklıkta görevli lenfositler bir patojenle tekrar eden karşılaşmalarda onu hatırlar ve ona özgü bir yanıt oluşturur, antijenle uyarılan lenfositlerden oluşan bu hücreler “bellek hücreleri” olarak adlandırılır (Abbas ve ark. 2015). Uzun yaşam süresine sahip olan bellek hücrelerinin, kazanılmış bağışıklığın etkinliğini arttırması, patojenle her karşılaşmada yeni bellek hücrelerin oluşmasıyla ilişkilidir, konağın yaşı ilerledikçe periferik kanında mevcut bellek hücrelerinin artması bunun kanıtıdır (Lamb 2012, Wilson 2012). Konakta bu kadar çok sayıda özgül antikor oluşabilmesinin ana sebeplerinden birisi somatik mutasyonlardır, ayrıca memeli genomunda bulunan antikor kodlayan genler organizmadaki tek bir DNA zincirinde kesintisiz biçimde bulunmamakta, genomun farklı DNA sekanslarında parça parça yer almaktadır, rekombinasyon aktive edici genler bu bilgileri biraraya getirerek özgül antikorları kodlayan bilgiyi oluşturmaktadır (Simon ve ark. 2016).

Kazanılmış bağışıklık iki temel mekanizmayı kullanarak patojenlerle savaşır, bunlar B hücreleri (lenfositler) aracılığı ile oluşturulan humoral yanıt ve T hücreleri (lenfositler) aracılığı ile oluşturulan hücre sel yanıtıdır (Wilson 2012). Her iki lenfosit hücresi de (B ve T) kemik iliğindeki kök hücrelerden üretilmekte, daha sonra ise T lenfositler timusta, B lenfositler ise kemik iliğinde olgunlaşmaktadır (Lamb 2012). Bu hücreler “farklılaşma kümesi (CD)” adı verilen yüzey proteinleri ile birbirinden ayrılmaktadır (Abbas ve ark. 2015).

Organizmadaki B hücreleri ve bu hücrelerin antijen spesifik antikorları aracılığı ile oluşturulan humoral bağışıklık yanıtı hücre dışı patojenlerle savaşmak için özelleşmiştir (Pieper ve ark. 2013). B hücreler tarafından üretilen antikorlara immünglobulin adı verilir ve B hücrelerin yüzeyinde bulunan bu antikorlar özgün antijenleri tanıyan reseptörler olarak görev yapar (Abbas ve ark. 2015). Antikorların bağışıklıkta başlıca görevleri şöyle sıralanabilir:

- 1- Mikroorganizmalara bağlanarak hücreleri enfekte etmelerini önlemek (nötrolizasyon),
- 2- Mikroorganizmaların etrafını kaplayarak onları fagositoz için hedef haline getirmek (opsonizasyon),
- 3- Kompleman sistemini aktifleştirerek mikroorganizmaların fagositozunu tetikleyen proteinleri açığa çıkarmak (aktivasyon) (Barker 2011).

B hücreleri tarafından üretilen IgA, IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 organizmadaki mikroorganizmaların toksinlerini nötralize eder, buna karşılık IgG1 ve IgG3 (farelerde IgG2a) mikroorganizmanın konak hücrelerine bağlanmasını ve invazyonunu inhibe eder, böylelikle patojeni fagositoza ve antikora bağımlı hücreler sitotoksititeye hazır hale getirir. IgE, IgD, IgM, IgG1 ve IgG3 gibi bazı immünglobulinler ise oganizmada mast hücreleri degranüle eder ve aynı zamanda komplementi de aktive eder (Wilson 2012). *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu esnasında vücutta plazma hücrelerinden IgM, IgG, IgA ve IgE gibi antikorlar salgılanmaktadır. IgM akut toksoplazmosis, IgG ise kronik toksoplazmosis göstergesidir, IgG titresi canlı yaşadığı sürece kanda izlenebilir (Caner ve Gürüz 2011, Wilson 2012). Antijen-antikor kompleksi aracılığıyla aktive olan B hücreleri antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşırlar, bu hücrelerin salgıladıkları antikorlar kan ve lenf dolaşımına taşınır, bir grup B hücreleri ise bellek hücrelerine farklılaşır (Wilson 2012).

T hücreleri aracılığıyla gelişen yanıt hücre içi patojenlerle savaşmak için özelleşmiş bir hücreler bağışıklık yanıtıdır. Antijenlere doğrudan bağlanmayan T-hücreleri antijen sunan hücreler (APC) ve major histocompatibility kompleks (MHC) molekülü yardımıyla antijenin kendilerine sunulması ile aktive olur (Bach ve ark. 1976, Abbas ve ark. 2015). Tüm türlerde birçok polimorfik gen bulunduran MHC lokusu; MHC1 ve MHC2 olmak üzere iki ana sınıfa sahiptir. MHC2; DCs, mononükleer fagositler, B hücreleri, endotel hücreler ve timüs epitelinde bulunur ve CD4⁺ T hücrelerde yanıt oluşturur (Lamb 2012). Etkin CD4⁺ T hücreleri sitokin üreterek bağışıklığa katkı sağlar (Wilson 2012).

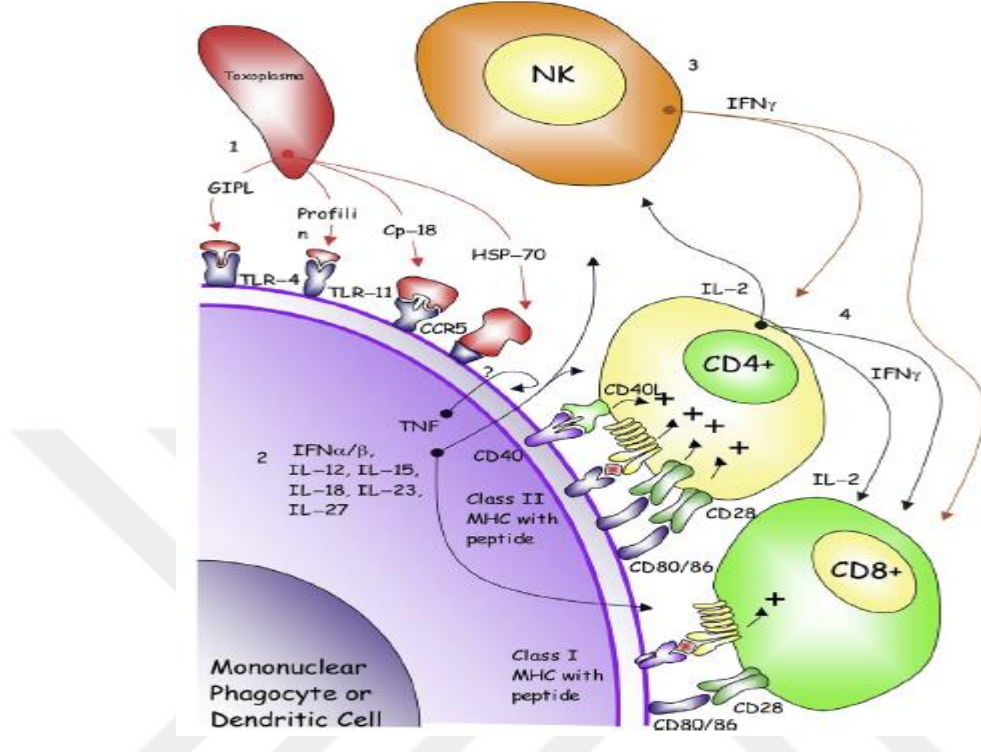
Toxoplasma gondii'nin eksojen antijenlerinin MHC2 aracılığı ile CD4⁺ T hücrelere sunulması sonucunda bu hücreler aktive olur (Wilson 2012). Endoplazmik

retikulumda bulunan MHC2 molekülleri, golgi aracılığıyla endositik kompartımana geçer, endozomlarda bulunan *T. gondii* kökenli peptidler MHC2 ile birleşir, bu peptidler MHC'den antijen sunan hücrelerin yüzeyine aktarılır ve α/β T hücre spesifik reseptör (TCR) ve CD4 yüzey molekülleri aracılığı CD4⁺ T hücrelerine sunulur (Denkers ve Gazzinelli 1998). CD3 kompleksi α/β TCR ile ilişkilidir ve aktive olan sinyalleri iletmek için tirozin kinazlar gibi davranır (Roberts ve ark. 2014). CD28, T hücre yüzeyinde CD80 ya da CD86 ile etkileşime girerek APC üzerinde eş zamanlı stimülasyonunu sağlar (Khan ve ark. 1996). CD40 temel olarak DCs de ifade edilir ve T hücre yüzeyinde bulunan ligandına bağlanarak T hücreyi aktive eder. Bu durum CD 80/86'nın DCs'lerde aktivitesini artırır ve T hücrenin eş zamanlı stümüasyonu genişletir (Roberts ve ark. 2014). CD40, DCs'yi aktive eder, DCs aracılı IL-12 gibi sitokinlerin üretimi, CD4⁺ T hücrelerinin Th1'e doğru farklılaşmasını tetikler, bu durum IFN γ üretimi ile karakterizedir (Şekil 1.6.) (Denkers ve Gazzinelli 1998).

MHC1 ise, tüm çekirdekli hücrelerde sergilenir ve CD8⁺ T hücrelerinde yanıt oluşturur (Lamb 2012). Sitotoksik CD8⁺ T hücreleri, sitoplazmasında herhangi enfeksiyöz etken barındıran hücreleri, hedef hücreye sıkıca bağlanarak ve zarı delik oluşumuna yol açan protein salgılayarak etkisiz hale getirir (Abbas ve ark. 2015). *Toxoplasma gondii*'de CD8⁺ T lenfositler farklı olarak endojen antijenlerin MHC1 aracılığı ile sunulması sonucunda aktive olmaktadır, CD8⁺ tarafından salınan IFN γ hedef hücrede indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) ve inducible nitric oxide synthase (iNOS)'ın salınımını tetikler ve böylelikle parazitin etkin biçimde öldürülmesini sağlar (Denkers ve Gazzinelli 1998, Roberts ve ark. 2014).

Yardımcı T hücreleri ise fagozomlarına alınan mikroorganizmaları yok etmeleri için fagositik hücreleri uyararak mikrobisidal etkinliklerini artırır, lökositleri enfeksiyon bölgesine toplar ve epitelin engelleyici işlevini artırır (Simon ve ark. 2016). B hücrelerin antikor üretmesine yardım eden yardımcı T hücreleri ayrıca makrofajların aktive edilmesinde, yangının yönetilmesinde, B ve T hücrelerin aktivasyonunda (proliferasyon ve farklılaşma) görev alır (Abbas ve ark. 2015). *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu esnasında organizmadaki yardımcı T hücreler sitokin sekresyonu ile ilişkilidir. Th1 yanıtı IFN γ üretiminden sorumludur ve hücre

aracılı immün yanıtta rol alırken, Th2 yanıtı ise interleukin üretimini uyararak aşırı duyarlılık reaksiyonlarını tetikler (Wilson 2012). (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. *Toxoplasma gondii*'de kazanılmış bağışıklık yanıtının aktivasyonu (Robert ve ark. 2014).

1.2.2. Doğal Bağışıklık

Çok hücreli organizmada vücuda giren patojene karşı şekillenen doğal bağışıklık tepkileri yangı, antiviral savunma ve doğal immün yanıtların düzenlenmesi olmak üzere üç temel başlık altında toplanır (Abbas ve ark. 2015). Doğal bağışıklık sistemi, konak hücrede bulunmayan fakat çeşitli mikroorganizma sınıflarında ortak olarak bulunan ve organizmanın canlılığı için mutlak gerekli olan unsurları tanır ve patojenle her karşılaşmasında aynı yanıtı verir (Abbas ve ark. 2015). Doğal bağışıklık sisteminin mikroorganizma için elzem yapılara karşı reaksiyon vermesi mikroorganizmanın mutasyon şekillendirerek bu bağışıklık yanıtından kaçma şansını azaltmaktadır (Simon ve ark. 2016). Enfeksiyon etkenleri üzerinde yer alan ve doğal

bağışıklığı uyaran mikrobiyal moleküller pek çok mikroorganizma üzerinde bulunduğu için bu yapılara “patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMPs)” adı verilmektedir. Lipopolisakkaritler gibi bakteriyal karbonhidratlar, mannoz, bakteriyal ya da viral DNA veya RNA gibi nükleik asitler, peptidoglikanlar, lipoproteinler ve fungal glukanlar bu molekülleri oluşturmaktadır (Abbas ve ark. 2015). Vücuda giren patojene ait bu moleküler kalıpları tanıyan doğal bağışıklık reseptörleri ise kalıp tanıma reseptörleri (PRRs) olarak bilinen bağışıklık sistemi hücrelerince üretilen proteinlerdir (Akira ve ark. 2006). Aynı zamanda organizmada hasara uğramış ya da nekroze olmuş hücrelerden açığa çıkan hasar ilişkili endojen stres sinyalleri molekülleri de “tehlike ilişkili moleküler kalıplar (DAMPs)” olarak adlandırılır ve doğal bağışıklık unsurları bu molekülleri de tanıyarak onları yok edecek doku onarım mekanizmalarını harekete geçirir (Barker 2011, Abbas ve ark. 2015).

Vücuda mikroorganizmaların girmesini engelleyen doğal bağışıklık sisteminin fiziksel bariyerleri organizmanın ilk savunma hattını oluşturur (Abbas ve ark. 2015). Burun deliklerinde yer alan kıllar, dış ortama açık olan solunum ve üreme sistemindeki hücreler tarafından salgılanan mukus ve dış kulak yolunda üretilen salgı ve epitel hücreler arasında teşkil etmiş sıkı bağlantılar patojenin vücuda girmesini engellemek için fiziksel bir bariyer görevi görür (Abbas ve ark. 2015, Simon ve ark. 2016). Bunlara ek olarak ter, tükürük ve gözyaşında bulunan enzimler, mide ve vaginadaki asit ortam, sindirim kanalındaki hidrolitik enzimler patojenlerle savaşta ilk savunma hattının kimyasal bileşenlerini oluşturur (Hickman ve ark. 2014, Simon ve ark. 2016). Patojenler bu ilk fiziksel savunma hattını atlatmayı başardığında devreye giren ikinci savunma hattı olan hücresel savunma fagositoz ve antimikrobiyal proteinlerinin aktivitesiyle patojenle mücadele eder (Hickman ve ark. 2014).

Canlı *Toxoplasma gondii* ile enfekte olduğunda ilk olarak konağa ait doğal bağışıklık sistemi unsurları ile karşılaşır. Doğal bağışıklık hücrelerinde ve dokulara özgü hücrelerde bulunabilen PRRs, *T. gondii*'ye ait PAMP'ları tanır (Wilson 2012). Parazitin enfektif formu mukozada değişiklikler şekillendirir ve bunu NKs, T-hücreler, epitelyal ve intraepitelyal lenfositler ve enterositlerin başlangıçtaki doğal immün yanıtta katkıda bulunması izler (Mordue ve Huntery 2014). Konakta parazite

karşı şekillenen bu yanıtlara rağmen parazit, intestinal bariyeri geçerek, yangısal monositlerin oluşturduğu mukozal bağışıklıktan kaçabilmekte ve dokulara yayılabilmektedir (Mordue ve Sibley 2003). Genel olarak toksoplasmosis ile enfeksiyon şekillenmesini takiben bir hafta sonra vücutta parazitemi yüksektir, bağışıklık sisteminin parazite karşı yanıt geliştirmeye başlamasıyla -yaklaşık üç hafta sonunda- parazit dokularda hücre içi kist formu geliştirir (Wilson 2012). Konakta parazite karşı hücrel immunitenin gelişmesini takiben takizoit hücre içinde daha pasif form olan bradizoite dönüşür, hastalık böylece kronik döneme geçer. Konakta gelişen bağışıklık sisteminin herhangi bir sebeple zayıflaması sonucunda doku kisti içinde bulunan bradizoitler re-aktive olarak hızla konak hücrelerinde çoğalmaya başlar ve konak için ölümcül olabilen tablo gelişir (Dubey ve ark. 1998, Dubey 2010). Bradizoitlerin reaktivasyonunun engellenmesi için organizmada bağışıklık yanıtının aktif olması gerekmektedir (Wilson 2012).

1.2.2.1. Toll-Benzeri Reseptörler (TLRs)

Bu reseptörler *Drosophila*'da gelişimde ve savunmada rol alan toll adı verilen proteinlerin homologudur (Akira ve ark. 2006). Endozom ve hücre yüzeyinde yerleşim gösteren TLRs, patojenleri ve onlara ait molekülleri tanır (Aderem ve Ulevitch 2000, Hickman ve ark. 2014, Abbas ve ark. 2015). TLRs oluşturdukları sinyaller ile fagositlerin etkinleşmesini sağlar, ayrıca sitokin üretimini uyararak TLRs, transkripsiyon faktörleri ile yangıda rol oynayan bazı enzim ve proteinlerin ifadesini oluşturur (Akira ve ark. 2006, Abbas ve ark. 2015).

Toxoplasma gondii'nin konak hücrelerine girişinde ve hareketliliğinde rol alan aktin bağımlı profilin molekülüne bağlanan TLR11 endozomlarda MYD88 (myeloid farklılaşmış öncül yanıt proteini) oluşturur, MYD88 ise interferon regülatory faktör 8 (IFN γ)'i aktive ederek IL12 üretimini uyarır (Koblansky ve ark. 2013). Konakta *T. gondii*'ye karşı gelişen direncin temelini TLR11 aracılı MYD88 aktivasyonu oluşturur, aynı zamanda Th1 hücrelerin IL12 bağımlı aktivasyonunu sağlar, NK hücrelerden IFN γ üretimini uyararak birçok biyokimyasal tepkimenin başlatıcısı

olduğu görülür (Wilson 2012, Yarovsky 2014). TLR4 ve TLR2 parazite ait GPI'n (glikozil fosfatidil inozitol) tanınmasında rol oynamaktadırlar (Yarovsky ve ark. 2005).

1.2.2.2. Sitokinler

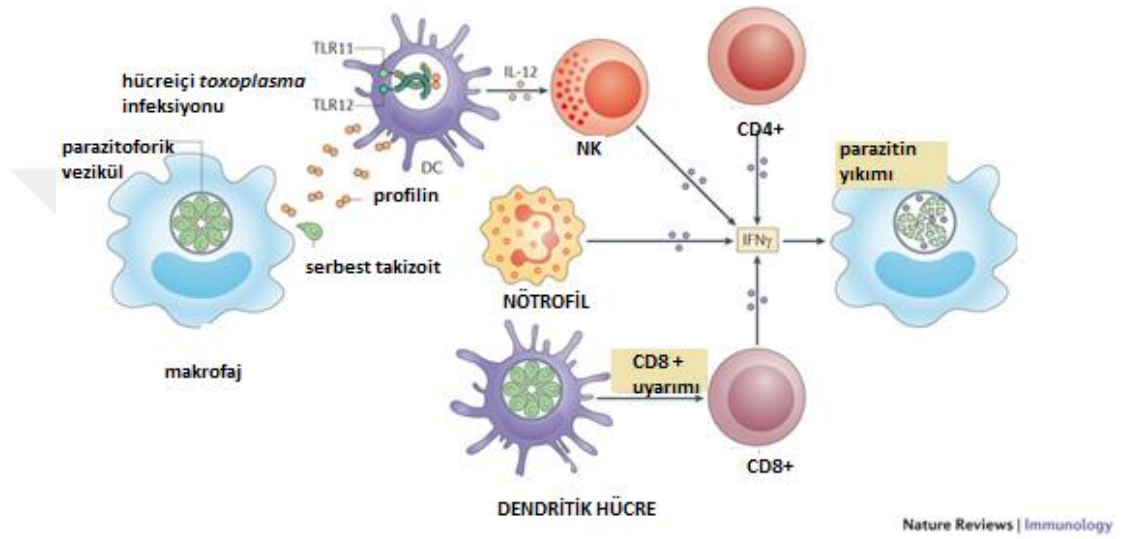
Konakta öncelikle makrofaj ve dendritik hücreler olmak üzere çeşitli hücre gruplarından salgılanan bağışıklık ve yangıyı yöneten proteinler olan sitokinler, kemokinler ile birlikte yangı esnasında şekillenen yanıtta kompleks sinyal ağları oluşturur, aynı zamanda konak hücrelerin aktive olmasını sağlar ve lökositleri yangı bölgesine gelmesi yönünde uyarır (Folds 2008, Abbas ve ark. 2015).

1.2.2.2.1. İnterferonlar (IFN)

Özellikle konaktaki viruslarla savaşan ve konak hücresindeki viral replikasyonu bloke etme yeteneğine sahip sitokinlerdir (Kadowaki ve ark. 2000). Bununla birlikte toksoplazmosis esnasında rol oynadıkları görülür. IFN γ reaktif oksijen türleri aracılı oksidatif yanıt (ROS) indükleyerek hücre içinde yerleşen patojenlere karşı antimikrobiyal etkinliği sağlar (Mordue ve Huntery 2014). IFN γ aynı zamanda makrofajlarda, paraziter triptofanın yıkımını uyararakIDO (indolamin 2,3-dioksigenaz) ile ve parazitin bölünmesi için gerekli arjinin yıkımını uyararak INOS (Nitrik oksit sentaz uyarıcı) sentezini aktive ederek parazitin gelişimini inhibe etmektedir (Mordue ve Huntery 2014) (şekil 1.7).

1.2.2.2. İnterleukinler (IL)

Konakta *Toxoplasma gondii*'ye karşı NK ve T-hücreler aracılığı ile üretilen IFN γ , IL12 üretimini tetikler, IL12 enfeksiyonun kontrolünde etkilidir (Mordue ve Huntery 2014).



Şekil 1.7. Konakta parazite karşı şekillenen IFN γ aktivasyonu (Yarovinsky 2014).

1.2.2.4. Kompleman Sistem

Hem kazanılmış hem de doğal bağışıklıkta C3 adı verilen plazma proteinin aktivasyonu ile işlev gören kompleman sistem patojenlerin dış yüzeyindeki polisakkaritler tarafından aktive olur ve böylelikle vücuda giren patojeni parçalayan olaylar dizisini başlatır, patojeni fagositoz edilebilmesi için etiketler (opsonizasyon) ve yangı bölgesine lenfositleri çekerek yangıyı artırır (Beutler 2004, Hickman ve ark. 2014, Abbas ve ark. 2015).

1.2.2.5. Antimikrobiyal Peptidler

Vücutta herhangi bir patojenle temas anında salınan antimikrobiyal peptidler patojenin hücre zarını parçalayarak ya da sinyal yollarını inhibe ederek onu etkisiz hale getirir (Akira ve ark. 2006).

1.2.2.6. Hüresel Savunma Mekanizmaları

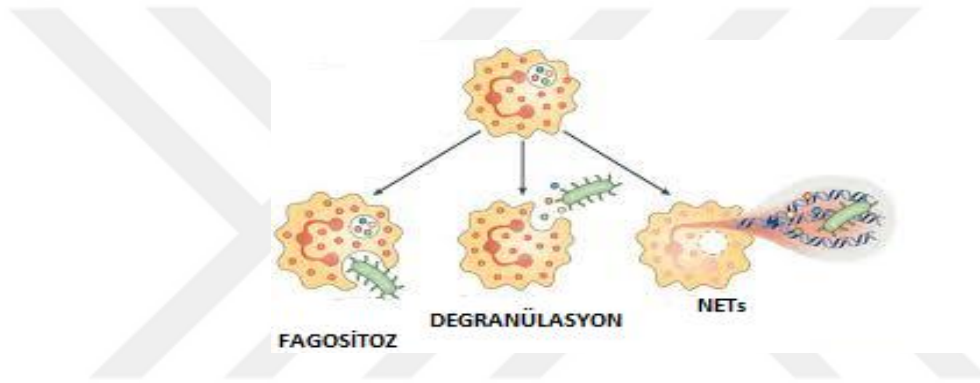
1.2.2.6.1. Mononükleer Fagositik Sistem

Kemik iliğindeki kök hücrelerden farklılaşarak dolaşıma geçen monositler farklılaşarak makrofajları oluşturur. Tüm vücut dokularına yayılan makrofajlar yerleştiği dokuda özel isimleri ile anılır (karaciğer dokusunda kupffer hücreleri, beyinde mikroglia, deride Langerhans hücreleri, alveollerde alveolar makrofajlar, böbrekte mezenkimal hücreler ve kemikte osteoklastlar) (Hickman ve ark. 2014, Abbas ve ark. 2015). Makrofajlar yangıyı düzenleyen bazı sitokinleri üretir, mikroorganizmaları fagosite ederek uzaklaştırır ve hasarlı dokuda doku onarım sürecini başlatır (Beutler 2004).

1.2.2.6.2. Polimorf Nükleer Lökositler (PMN)

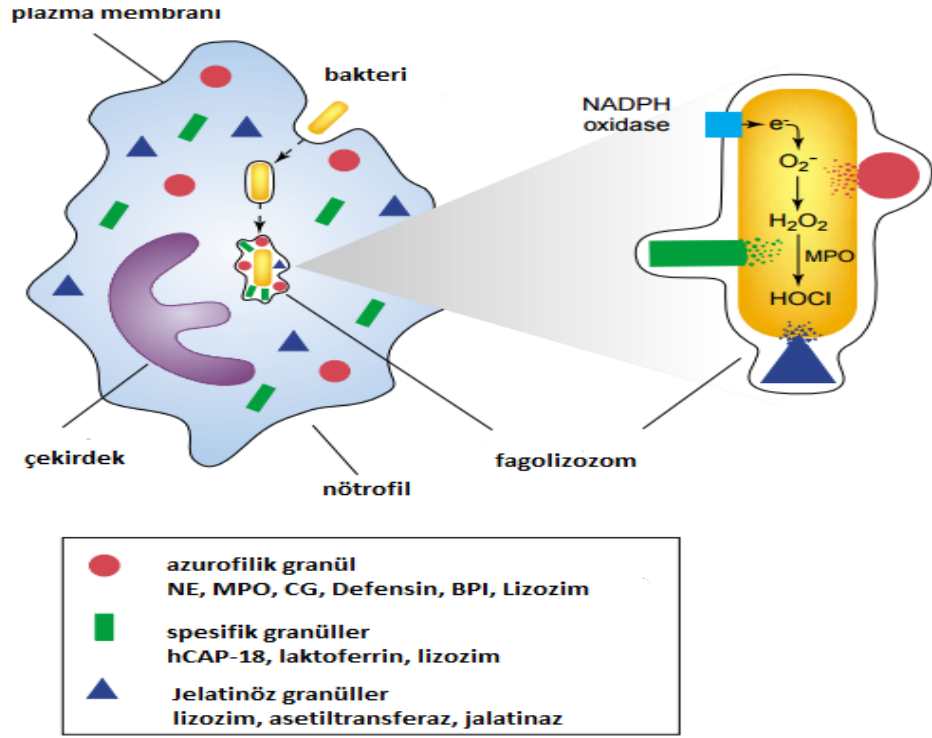
Granülositler olarak da adlandırılan ve parçalı çekirdeğe sahip olan PMN içinde üç farklı hücre grubu bulunur (nötrofil, eozinofil ve bazofil) (Nathan 2006, Hickman ve ark. 2014). İnsan ve diğer memelilerin kan dolaşımında en fazla sayıda bulunan (% 60-70) lökositler olan nötrofiller yangı bölgesine ilk ulaşan hücrelerdir (Nathan 2006). Nötrofiller kısa ömürlü hücrelerdir, dolaşımdaki ömürleri 6-8 saattir (Nathan 2006, Yıldız 2016). Akut enfeksiyonda patojene karşı konakta şekillenen ilk yanıtta kritik rol oynayan nötrofiller doğal bağışıklığın önemli bileşenleridir (Nathan 2006,

Appelberg 2007, Phillipson ve Kubes 2011). Konak vücuduna patojen girdiğinde gelişen akut yangı esnasında patojen ya da konak hücreler tarafından salınan bazı kemotaktik faktörlerle ilgili olarak kan damarlarındaki nötrofiller damar duvarından geçerek etkilenen dokuya ulaşır (Phillipson ve Kubes 2011). Nötrofillerde patojene karşı şekillenen temel antimikrobiyal yanıt mekanizması fagositoz, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve granüllerden mikrobisidal moleküllerin salınımını (degranülasyon) içerir (Kaplan ve Radic 2012). Bununla birlikte Brinkmann ve ark. (2004) tarafından nötrofillerin patojenle savaşta hücre dışı tuzaklar geliştirdiği belirlenmiştir (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Nötrofillerin patojenle savaşta kullandığı stratejiler (Kolaczowska ve Kubes 2013).

Vücuda giren patojene ait moleküler kalıpların (PAMPs), konağa ait kalıp tanıma reseptörleri aracılığı ile tanınması sonucunda fagosite edilir (Ofek ve ark. 1995). Fagosite edilen mikroorganizmalar nötrofil içinde oksidatif ve non-oksidatif mekanizmalar aracılığı ile öldürülür (Soehnlein 2009). Oksidatif mekanizma NADPH oksidaz enzim kompleksinin aktivitesi süresince reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini kapsarken, non-oksidatif mekanizma antimikrobiyal peptidlerin ve proteazların salınması ile fonksiyon gösterir (Segal 2005). Non-oksidatif mekanizma esnasında nötrofilde bulunan üç farklı granül tipinin (azurofilik, spesifik ve jelatinöz granüller) degranülasyonu şekillenir (Borregaard ve Cowland 1997, Borregaard 2010). Azurofilik granüller; myeloperoksidaz (MPO), elastaz (NE), katepsin G, proteinaz 3, defensins ve lizozim, spesifik granüller; kollagenaz, jelatinaz, lizozim, sistein ve laktoferrin, jelatinöz granüller ise jelatinaz, lizozim ve ve arginazları içermektedirler (Borregaard ve ark. 2007, Abi Abdallah ve ark. 2012). (Şekil 1.9).



Current Opinion in Microbiology

Şekil 1.9. Nötrofillerde bulunan granüller ve moleküler bileşenleri (Averhoff ve ark. 2008).

IL12'nin ilk kaynağını teşkil eden ve sitokinlerin oluşumunu sağlayan nötrofiller konakta *Toxoplasma gondii*'ye karşı şekillenen doğal bağışıklık yanıtında önem arz etmektedir (Wilson 2012). *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu esnasında Gr1 adı verilen antikörler nötrofil yüzeyinde bulunan Ly6G molekülüne ve monositlerin yüzeyinde bulunan Ly6C molekülüne bağlanarak bu hücreleri aktive eder ve konakta bağışıklık yanıtını oluşturur (Dunay ve ark. 2008).

1.2.2.6.3. Katil Hücreler (NK)

Yoğun granüllere ve özgün yüzey proteinlerine sahip olan katil hücreler konakta enfekte hücre ile temas etmesini takiben yoğun granül içeriklerini hücre dışına boşaltırlar ve bu proteinler enfekte hücreye girerek apoptosiz sürecini başlatan enzimleri uyarırlar (Lanier ve Phillips 1992). NK, IFN_γ üreterek makrofajları aktive eder (Miller ve ark. 2008). Antikor bağımlı ve hücre aracıli sitotoksitite reaksiyonları ile vücuda giren patojeni etkisiz hale getirir (Hickman ve ark. 2014). Konakta doğal

başışıklık hücrelerinin aktivasyonunda ve immün yanıtın polarizasyonunda kritik role sahip olan NK, *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu süresince IL1 ve IL18 üretimini sağlar ve kısa süre içinde enfeksiyon bölgesine ulaşır (Khan ve ark. 2006). Ayrıca ürettikleri sitolitik enzimler ile enfekte hücreyi öldürürler (Wilson 2012).

1.2.2.6.4. Mast Hücreleri

Kemik iliğinden köken alan, deri ve mukozal epitelde bulunan mast hücreleri çok sayıda sitoplazmik granül taşır (Wedemeyer ve ark. 2000). Vücutta yangı gelişimini sağlayan sitokinleri salgırlar. Helmintlere karşı savunmada rol alır, ayrıca vücutta şekillenen alerjik reaksiyonlarda klinik belirtilerin ortaya çıkmasından sorumludur (Hickman ve ark. 2014, Abbas ve ark. 2015).

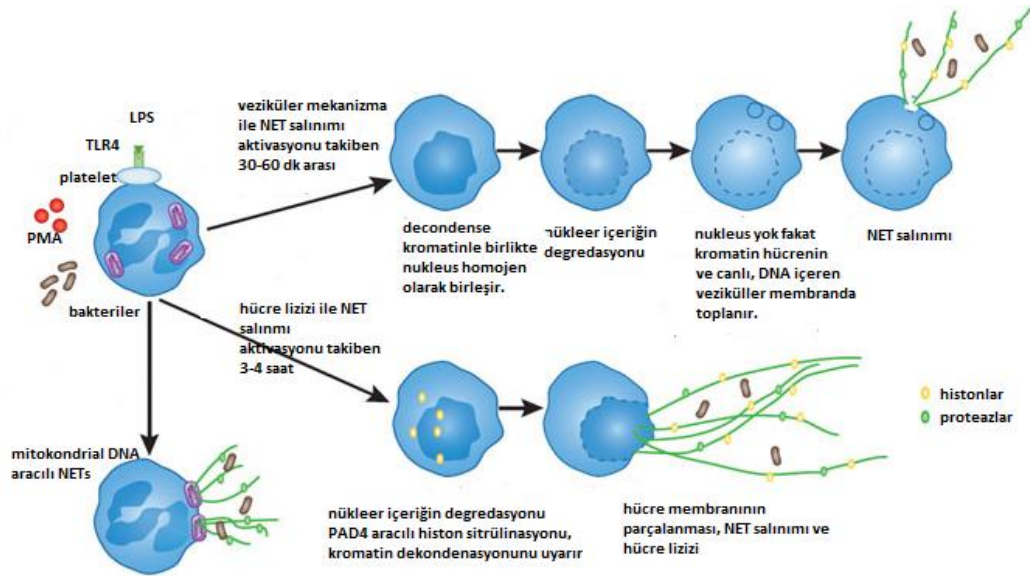
1.2.2.6.5. Dendritik Hücreler (DCs)

Doğal ve kazanılmış başışıklık arasında köprü görevi gören dendritik hücreler akut toksoplazmosis esnasında takizoitlerin bağırsaktan kan-beyin bariyerine ve merkezi sinir sistemine doğru taşınması ile ilişkilidir. Dendritik hücrelerin temel ve ayırıcı rolü T-hücrelerine antijen sunmaları ve parazite karşı T hücre yanıtı oluşturmalarıdır (Wilson 2012).

1.3. Hücre Dışı Tuzak Oluşumu

Hücre dışı tuzak oluşumu (ETs), organizmada şekillenen yangısal durumlarda ve patojenlere karşı polimorf nükleer lökositler ve makrofaj, monosit gibi mononükleer fagositlerde, hücreye ait DNA, histonlar, granüler proteazlar, diğler sitoplazmik ve nükleer proteinleri katıldığı doğal başışıklık mekanizmasıdır (Brinkman ve ark. 2004, Wartha ve ark. 2007, Brinkman ve Zychlinsky 2012). Nötrofiller dolaşımda en bol bulunan lökositler olduğundan bu antimikrobiyal aktivite daha çok nötrofillerle

özleştirilmiş olsa da (NETs), mast hücreleri (MCETs), eozinofil (EETs) ve makrofaj (METs) gibi diğer bağışıklık sistemi hücrelerinde de hücre dışı tuzak oluşumu gözlenmiştir (Goldman ve Medina 2013, Sungmo ve ark. 2016). Çeşitli omurgalılarda, böceklerde ve kanatlı heterofillerinde hücre dışı tuzak oluşumlarına rastlanmıştır (Chuammitri ve ark. 2009, Kaplan ve Radic 2012). ETosis olarak da adlandırılan bu proseste bağışıklık sistemi hücreleri aracılığı ile hücre dışı tuzak yapıları salınır ve patojenler hücre dışı alanda etkisiz hale getirilir (Pisanu ve ark. 2015). Brinkman ve ark. (2004), IL-8, LPS ve önemli bazı kemo-atraktanlar ile muamele sonucunda nötrofillerde hücre dışı tuzak yapılarının geliştiğini belirlemiş ve bu yapıların histon, granül proteinleri, decondense DNA ipliklerinden oluştuğunu bildirmiştir (Şekil 1.10). Önceleri netosisin hücre ölümü ile sonuçlanan bir proses olduğu düşünülmüş olsa da daha sonra yapılan çalışmalar, netosis sonrası bazı hücrelerin canlılığını ve hatta antimikrobiyal aktivitesini devam ettirdiğini göstermiştir (Yousefi ve ark. 2009, Pilszczek ve ark. 2010, Yıldız 2016). Antimikrobiyal avantajlarına rağmen bazı otoimmün ve kronik yangısal hastalıklarda tetikleyici rol üstlenmesi, bu savunma sistemini organizma için dezavantajlı hale getirebilmektedir (Kaplan ve Radic 2012, Arelaki ve ark. 2016).



Şekil 1.10. Patojenle karşılaşan nötrofilde hücre dışı tuzakların oluşum mekanizması (Phillipson ve Kubes 2011).

1.3.1. NET Morfolojisi

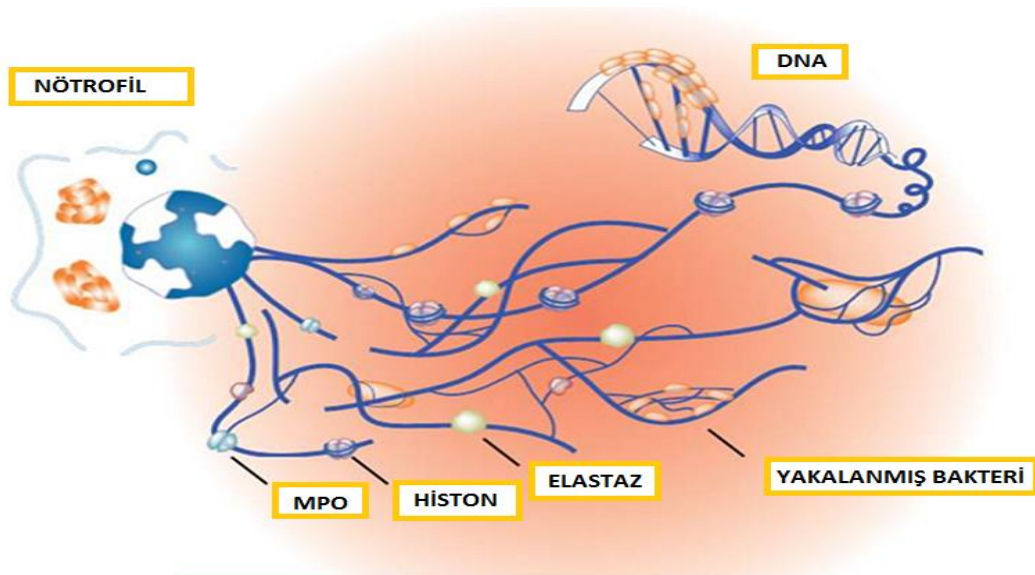
Hücre dışı tuzak gelişimi yönünde aktive olan nötrofiller önemli bazı morfolojik değişikliklere maruz kalırlar (Brinkman ve ark. 2004). Aktivasyondan dakikalar sonra hücreler yassılaştır ve zamanla çekirdeklerin tipik görünümü gözden kaybolur, kromatin dekondense olur, granüllerin bütünlüğü bozulur, bir saat sonra nükleer zarf veziküllerin içine dağılır ve nukleoplazma ile sitoplazma homojen bir kütle formuna gelir, nihayet hücre membranı parçalanır ve hücre içeriğinin hücre dışına fırlatılmasıyla hücre dışı tuzak gelişim prosesi başlar (Brinkman ve Zychlinsky 2007, Fuchs ve ark. 2007). Dekondanse kromatin ağları granüllerdeki diğer antimikrobiyal içerikle birlikte hücrenin normal büyüklüğünün 10-15 katı kadar yer kaplayan bulutumsu bir görünüme sahip hücre dışı tuzak yapılarını şekillendirir (Brinkman ve Zychlinsky 2012). Hücre dışı tuzaklar için önemli karakterlerden birisi hücre dışı alanda, nötrofile ait, yaklaşık 17 nm çapında DNA iplikçiklerinin varlığıdır (Urban ve ark. 2009, Zawrotinak ve Rapala-Kozik 2013).

Netosis, organizmada şekillenen diğer hücre ölüm şekillerinden (apoptosis ve nekrosis) morfolojik olarak oldukça farklıdır (Brinkmann ve Zychlinsky 2007, Fuchs ve ark. 2007, Yıldız 2016).

1.3.2. Hücre Dışı Tuzak Oluşumunun İndikatörleri ve Moleküler Mekanizması

Netosis bakteri, mantar, virüs ve protozoon gibi patojenler ile temas sonrası, TLR4 ve çeşitli konak faktörlerle aktive edilmiş platelet, yangısal uyarılar, ROS benzeri hidrojen peroksit (H_2O_2), antikorlar, antikor-antijen kompleksleri gibi fizyolojik faktörler, bakteriyal lipopolisakkarit, *Leishmania*'a ait lipofosfolikan gibi mikrobiyal komponentler aracılığı ile indüklenir (Brinkman ve ark. 2004, Fuchs ve ark. 2007, Guimaraes Costa ve ark. 2009, Kessenbrock ve ark. 2009, Neeli ve ark. 2009, Zawrotniak ve Rapala-Kozik 2013, Sorensen ve Borregard 2016). Çoğu granül kökenli, bir kısmı ise çekirdek ve sitoplazma kökenli olan proteinler hücre dışı tuzakların oluşumunda rol almaktadır (Urban ve ark. 2009).

Ökaryotlarda, DNA ve çekirdek histonları (H2A, H2B, H3 ve H4) DNA yapısındaki fosfatların negatif yükü ve histonların pozitif yükü sayesinde sıkıca birbirlerine bağlanarak nukleozom denen yapıları oluşturur, çok sayıda nukleozomlar ise kromatin yapısını meydana getirir. Kromatin normal fizyolojik durumda replikasyon ve transkripsiyon prosesleri sırasında decondense olmaktadır (Klug ve ark. 2011, Reece ve ark. 2013). Netosis prosesinde ilk olarak granüllerden salınan ve çekirdeğe göç eden NE, histonların degradasyonunu ve kromatin decondensasyonunu uyarır, daha sonra olaya katılan MPO ise decondensasyonu artırıcı etkiye sahiptir (Metzler ve ark. 2011, Papayannopoulos ve ark. 2011). Netosis başlangıcında NADPH aracılığıyla büyük miktarda ROS üretilir (Fuchs ve ark. 2007, Nishinaka ve ark. 2011). Genellikle fagositik oksidaz (PHOX) olarak adlandırılan NADPH enzim kompleksi hücre içinde ya da fagozomal membranda bulunur, moleküler oksijen NADPH'dan elektron transfer ederek süperoksitlere dönüşür, süperoksit ise geri-mutasyon yoluyla hidrojen peroksit (H₂O₂) dönüşür, H₂O₂, nötrofilin granüllerinde bol bulunan bir enzim olan MPO için substrat görevi görür, MPO ve H₂O₂ reaksiyonu sonucu meydana gelen hypoklorus asit (HOCL) hücre dışı tuzak salınımı için elzemdir (Palmerl ve ark. 2012, Nauseff 2014). NE, MPO ve HOCL aktivitesi olmaksızın hücre dışı tuzakların oluşumu gözlenmemektedir (Papayannopoulos ve ark. 2011) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Hücre dışı tuzak yapılarının moleküler bileşenleri (Je ve ark. 2016)

Histonlar, NE aracılı kısmi degradasyona ek olarak, kromatin yapısının dekonde olmasý için daha ileri modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Nötrofil çekirdeğinde lokalize olan ve yoğun olarak salınan PAD4 enziminin Ca⁺² aracılı aktivasyonu, H3 ve H4 çekirdek histonlarındaki arjinin kalıntılarının sitriline dönüşümünü katalizlemektedir (Soransen ve Borregard 2016). Sitrulinasyon adı verilen bu mekanizma ile PAD4 aracılı heterokromatin dekondeasyonu, histonların güçlü pozitif yükünü indirger ve histon-DNA bağlarını zayıflatır, bu da nukleozomların çözülmesini ve NET oluşumunun ön koşullarını gerçekleşmesini sağlamaktadır (Neeli ve ark. 2008, Wang ve ark. 2009, Soransen ve Borregard 2016). PMA aracılı histon deiminasyonu insan nötrofillerinde bulunan kalsiyum ionoforları ile indüklenmektedir (Neeli ve Radic 2013).

Netosis histon hipersitrulinasyonunu gerektirdiğinden diğer hücre ölümü formları olan apoptozis ve nekrosisten farklıdır (Cheng ve Palaniyar 2013). Son çalışmalarındaki kanıtlar netosis sonrası nötrofilin canlılığını koruyabildiği yönündedir (Yousefi ve ark. 2009, Pilszczek ve ark. 2010). Yipp ve ark. (2012), netosis geçiren nötrofillerin canlı kaldığı ve fagosite etme yeteneğini kaybetmediğini göstermiş ve bu prosesi vital netosis olarak adlandırmıştır. Vital netosisin küçük nötrofil alt kümeleri tarafından üstlenilen proses olduğu düşünülmektedir, bu proses nukleer membranın seperasyonu ile başlar ve kromatin dekondeasyonu şekillenir, nukleustan tomurcuklanma ile ayrılan kromatinler ile antimikrobiyal proteinleri içeren veziküller, plazma membranının yakınında kümeleşir ve içeriklerini hücre dışı alana bırakır (Manda ve ark. 2014). Eozinofil ve nötrofillerin mitokondrial DNA'ları aracılığı ile de hücre dışı tuzak yapılarını oluşturabildikleri ve bu prosesin hücre ölümü ile sonuçlanmadığı gözlenmiştir (Yousefi ve ark. 2008, Yousefi ve ark. 2009). Hücre dışı tuzak yapıları DNaz1'e duyarlıdır ve netosis prosesi DNaz1 ile inhibe edilebilmektedir (Brinkman ve ark. 2004, Hakkim ve ark. 2010).

1.3.3. Hücre Dışı Tuzak Yapılarının Antimikrobiyal Aktivitesi

Hücre dışı tuzak yapıları bakteri, virüs, protozoan ve mantar gibi patojenler üzerinde etkinliğe sahiptir (Manda ve ark. 2014). Bu yapılar içerdikleri DNA iplikçikleri sayesinde enfeksiyon bölgesindeki, patojenlerin vücutta yayılmasını engellemekte, NE, MPO ve histonlar catepsin G, proteinaz 3, laktoferrin, kalprolektin, defensinler ve peptid kökenli antimikrobiyal proteinler gibi nötrofil granüler içeriklerinin patojen üzerine antimikrobiyal etkinliklerini arttırmakta ve patojenlere ait virülens faktörlerini inaktive etmektedir (Brinkman ve Zychlinsky 2012, Yıldız 2016).

1.3.4. Parazitlerde Hücre Dışı Tuzak Oluşumu

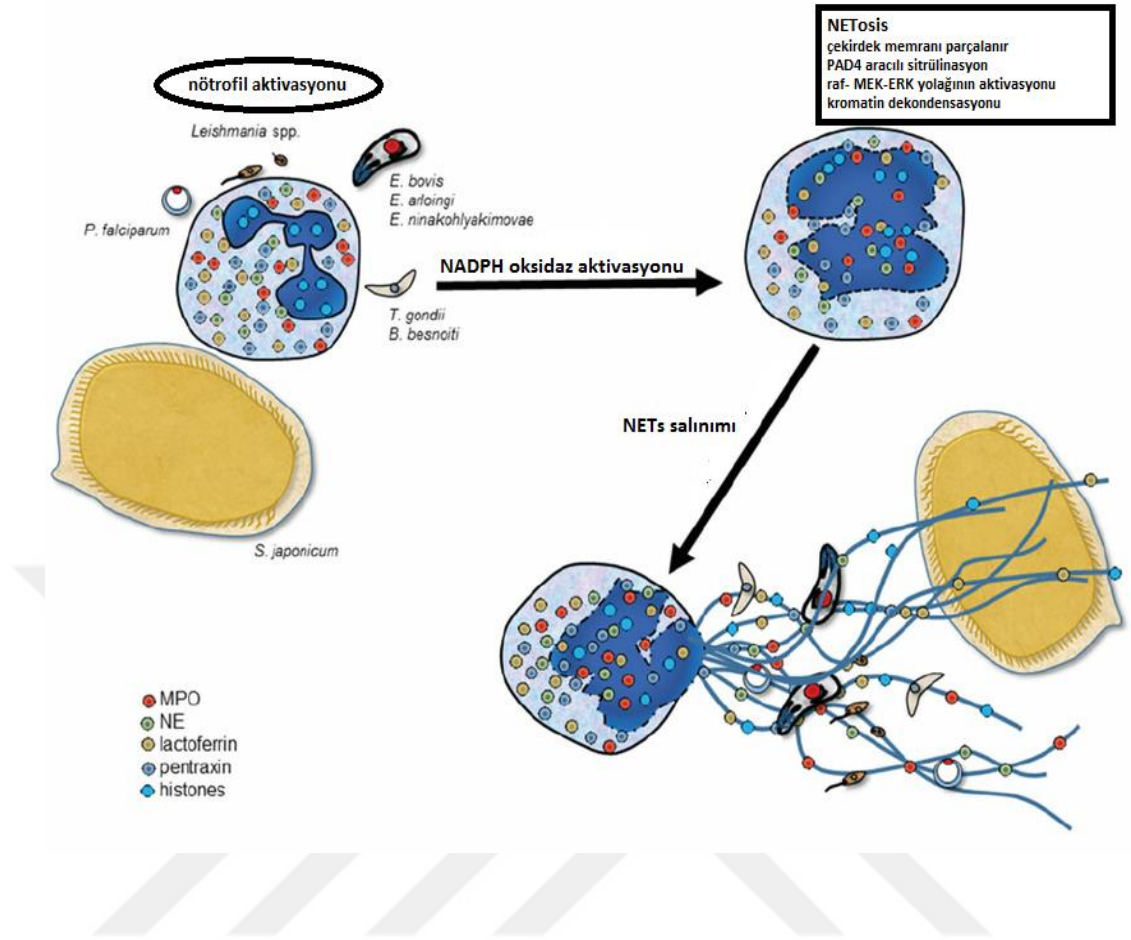
Hücre dışı tuzaklar parazitlere karşı da şekillenmektedir (Baker ve ark. 2008, Guimaraes-Costa ve ark. 2009, Behrendt ve ark. 2010, Gabriel ve ark. 2010, Abi Abdallah ve ark. 2012, Munoz Caro ve ark. 2014a, Munoz Caro ve ark. 2014b, Silva ve ark. 2014, Morgado ve ark. 2015, Munoz Caro ve ark. 2015a, Munoz Caro ve ark. 2015b, Reichel ve ark. 2015, Avila ve ark. 2016, Silva ve ark. 2016, Wei ve ark. 2016, Yıldız ve ark. 2017) (Şekil 1.12). İlk kez *Plasmodium falciparum* trofozoitleri ile enfekte çocuklardan alınan kan örneklerinde, parazit ve eritrositlere yapışık olarak hücre dışı tuzak yapılarına rastlanmıştır (Baker ve ark. 2008).

Eimeria bovis'e ait sporozoitler, sığırdan izole edilen PMN ile *in vitro* ortamda karşılaştırılmış ve şekillenen ekstraselüler DNA, Sytox orange boya kullanılarak gözlenmiştir, çalışmada canlı sporozoitlerin, homojenize ya da ölü parazitlere göre daha etkin biçimde tuzak oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir (Behrendt ve ark. 2010). Keçi PMN'inin *Eimeria arloingi* sporozoitleri ve ookistlerine karşı hücre dışı tuzak yapılarını oluşturduğu kantitatif ve kalitatif olarak gözlenmiştir (Silva ve ark. 2014). *Cryptosporidium parvum* ookistleri ve sporozoitleri, sığır PMN'inde hücre içi kalsiyum konsantrasyonuna bağımlı bir prosesle netosisi tetiklemiştir, ayrıca ERK ½ ve P38 MAPK aracılı sinyal yollarında netosisi uyardığı belirtilmiştir (Munoz Caro ve ark. 2015a).

Leishmania amozensis promastigotlarının, *in vitro* ortamda insan nötrofillerinde netosisi tetiklediği belirlenmiş, histon, MPO ve NE gözlenmiştir (Guimaraes-Costa ve ark. 2009). Kutanöz leishmaniasisli insanlardan alınan biyopsi örneklerinde DNA tuzakları ve elastaz tespit edilmiştir (Guimaraes-Costa ve ark. 2009). *Leishmania donovani* promastigotları ile insan kanından izole edilen nötrofillerle *in vitro* inkübasyonunda hücre dışı tuzak yapıları belirlenmiştir (Gabriel ve ark. 2010). *Leishmania braziliensis*'in neden olduğu deri leishmaniosisli hastaların deri lezyonlarından alınan örnekler çeşitli işlemlerden geçirilerek mikroskopik olarak incelenmiş ve hücre dışı tuzak yapılarına rastlanmıştır (Morgado ve ark. 2015).

Sığır PMN'i, *Besnoitia besnoiti* takizoitleri ile *in vitro* ortamda uyarıldığında netosis gözlemlenmiştir (Munoz Caro ve ark. 2014a). *B. besnoiti* takizoitlerinin *in vitro* ortamda sığır monositlerinde de hücre dışı tuzak oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir (Munoz Caro ve ark. 2014b). *Neospora caninum* takizoitlerinin köpek kanından izole edilen PMN'de *in vitro* olarak netosisi tetiklediği belirlenmiştir (Wei ve ark. 2016). *Entamoeba histolytica* trofozoitleri ve lipopeptidofosfolikanının *in vitro* ortamda, insan PMN'de netosis oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir (Avila ve ark. 2016).

Toxoplasma gondii takizoitleri insan ve fare PMN'i ile *in vitro* ortamda karşılaştırıldığında hücre dışı tuzak gelişimi gözlenmiştir (Abi Abdallah ve ark. 2012). Şekillenen hücre dışı tuzakların *T. gondii* suşuna bağlı olmadığı ifade edilmiştir (Abi Abdallah ve ark. 2012). *Phoca vitulina* (fok) dan izole edilen monosit ve PMN'ler *T. gondii* takizoitleri ile *in vitro* ortamda muamele edildiğinde, hücre dışı tuzakların geliştiği gözlenmiştir (Reichel ve ark. 2015). Koyun ve sığır PMN'inin *in vitro* ortamda *T. gondii* takizoitlerine karşı netosis şekillendirdiği belirlenmiştir (Yildiz ve ark. 2017). Sığır PMN-takizoitin birlikte kültüründe, koyuna göre MPO aktivitesinin daha yüksek olduğu ve koyun PMN'inin oluşturduğu hücre dışı tuzak yapılarının parazitin mekanik olarak hareketsiz kalmasını sağlarken, sığırdan salınan hücre dışı tuzakların öldürücü olabileceği belirlenmiştir (Yildiz ve ark. 2017).



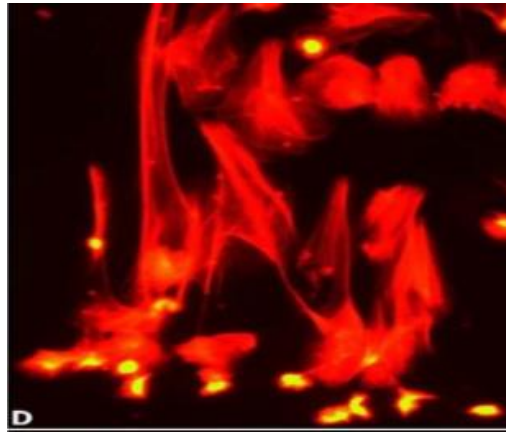
Şekil 1.12. Parazitle karşılaşan nötrofilin aktivasyonu ve netosis (Hermosilla ve ark. 2014).

Netosis helmintlere karşı da şekillenmektedir (Chuah ve ark. 2013, Bonne-Annee ve ark. 2014, Munoz Caro ve ark. 2015b). Farelerde *Strongyloides stercoralis* larvaları ile enfeksiyonu takiben *in vivo* hücre dışı tuzak oluşumu indüklenir ve parazitin mikro çevrede hapsedilerek etkisiz hale getirilmesini uyarır (Bonne-Annee ve ark. 2014). Ayrıca larvalar *in vitro* insan nötrofil ve makrofajları ile kültür edildiğinde de hücre dışı tuzak oluşumu gözlenmiş, ancak parazitin ölümü ile sonuçlanmamıştır (Bonne-Annee ve ark. 2014). *Schistosoma japonicum* ile enfekte fare karaciğerinden elde edilen granulozlarda hücre dışı tuzaklar mikroskopi ile gözlenmiş ve insan nötrofilleri *S. japonicum* yumurtaları ile *in vitro* inkübe edildiğinde netosis şekillendiği belirlenmiştir (Chuah ve ark. 2013). *Haemonchus contortus*'un üçüncü larva evresi (L3), koyun PMN'de *in vitro* hücre dışı tuzak oluşumunu tetiklemektedir (Munoz Caro ve ark. 2015b)

1.3.5. Hücre Dışı Tuzak Yapılarının Kantitatif ve Kalitatif Yöntemlerle Belirlenmesi

Şekillenen hücre dışı tuzaklar çeşitli görüntüleme cihazları ile saptanabilmektedir. Bu cihazlar arasında taramalı elektron mikroskobu ve floresans mikroskobu bulunmaktadır (Brinkman ve ark. 2004, Pural 2004). Brinkman ve ark. (2004), hücre dışı tuzakları ilk kez elektron mikroskobu ile izlemiştir. Ancak bu yolda NET'in fibrin iplikçiklerinden ayırt edilmesi oldukça güçtür ve bunun yanı sıra bu yöntem için çok fazla laboratuvar donanımı gerekmektedir. Bununla birlikte hücre dışı tuzak yapıları oluşturan histonlar, MPO ve kromatin iplikçikleri gibi unsurları bu mikroskopla ayırt etmek mümkün olmamaktadır (Brinkman ve ark. 2004)

Diğer bir görüntüleme cihazı olan floresans mikroskop numuneden spesifik görüntü veya sinyal almak için daha uygundur ve hücre dışı tuzakların kalitatif analizinde başarıyla kullanılmaktadır (Şekil 1.13). Floresans boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatinini dolayısıyla çekirdeğini görünür hale getirirler (Henry ve ark. 2013). Hücre dışı tuzakları ortaya koyabilmek için bu yapıyı oluşturan histonlar, MPO, kromatin iplikçikleri gibi unsurların tespiti gereklidir. Bu amaçla bu unsurlar ilgili floresans işaretli antijenler ve spesifik boyalar kullanılarak görünür hale getirilir. Hücre dışı tuzaklar arasında bulunan patojen de ayrı boyama yapılarak görünür hale getirilir (Yildiz ve ark 2017).



Şekil 1.13. *Toxoplasma gondii* ile inkube edilen nötrofilde şekillenen hücre dışı tuzaklardaki DNA yapısının Sytox orange boyası ile boyanması sonucu floresans mikroskobik görünümü (Yildiz ve ark. 2017).

In vitro ortamda şekillenen hücre dışı tuzakların kantitatif analizinde fluorometre ve flowsitometre gibi cihazlar kullanılabilir. Bu cihazlar özel fluoresans boya ile boyanmış protein, RNA ve DNA konsantrasyonundaki fluoresans ışımaya ölçen cihazlardır (Pural 2004)

Netosis esnasında şekillenen hücre dışı tuzak yapılarının omurgasını teşkil eden ekstrasellüler DNA'nın hem fluoresans mikroskopik incelenmesinde hem de kantitatif ölçülmesinde çeşitli DNA boyaları kullanılmaktadır (Abi Abdallah ve ark. 2012, Yıldız ve ark. 2017). DNA boyaları temelde canlı hücreye bağlanabilen ve ölü hücreye bağlanabilen boyalar olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Netosis sıklıkla hücre ölümü ile sonuçlanan bir proses olduğundan canlı olmayan hücrelere affinitesi yüksek boyalar tercih edilmektedir. Bu boyalardan birisi olan DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), Adenin-Timin bakımından zengin sekanslara bağlanır, ayrıca çift sarmallı nükleik asitler ile fluoresans olmayan interkalasyon komplekslerini oluşturan DNA spesifik probdur (Kasyanenko ve ark. 2016). Diğer bir boya olan osmium ammine boyama, hücrede nükleus içinde bulunan DNA'nın belirlenmesi için spesifiktir, serbest aldehit gruplarını oluşturmak için asit hidrolizine dayanır (Masiello ve Bigglogera 2017). Hoechst 33342 hücredeki mitokondriyal membran ve nükleustaki lokalize proteinleri maviye boyar (Henry ve ark. 2013). Annexin ve P1, apoptotik ve nekrotik hücre ayırımında kullanılan iki boyadır (Henry ve ark. 2013). YOYO-1 ve YO-PRO-1, Picogreen, flowsitometrik analizler için uygun, mavi ışıkta uyarılan fluoresans nükleik asit boyalarıdır (Blotta ark. 2005). Fluoresans nükleik asit boyası olan Picogreen hücre dışı alana çıkan DNA miktarını ölçmede kullanılır. Fluorometre tarafından 480/520 excitatation/emissionda okunan Picogreen boya parlak yeşil fluoresans görünüm vermektedir (Invitrogen). Sytox boyaları canlı olmayan hücre indikatörü olarak fluoresans ışımaya yapan boyalardır. Bu boyalar hücre dışı alana çıkmış DNA'ya yüksek affiniteyle bağlanabilen ve bütünlüğü bozulmamış hücreye bağlanamayan boyalardır (Yousefi ve ark. 2008). NET'in ana yapısal bileşeni DNA olduğu için fluoresans DNA boyaları olan Sytox green ve Sytox orange nötrofilden salınan hücre dışı tuzakların fluorometrik ölçümü için kullanılmaktadır. Her iki Sytox boyası nükleik asitlere oldukça affinite gösterir ve sadece plazma membranı yırtılmış hücrelere penetre olur, canlı hücrelere giremez. Her iki boya

fluorometre tarafından okunabilir, Sytox green parlak yeşil renkte boyama sağlarken, Sytox orange ise parlak turuncu renkte görülmektedir (Invitrogen).

Hücre dışı tuzak gelişimi üzerine çalışan araştırmacıların *in vitro* deneylerde şekillenen netosis esnasında gelişen tuzakların kantitatif analizinde farklı DNA boyaları kullandıkları görülmektedir (Baker ve ark. 2008, Guimaraes-Costa ve ark. 2009, Behrendt ve ark. 2010, Gabriel ve ark. 2010, Abi Abdallah ve ark. 2012, Munoz Caro ve ark. 2014a, Munoz Caro ve ark. 2014b, Silva ve ark. 2014, Morgado ve ark. 2015, Munoz Caro ve ark. 2015, Reichel ve ark. 2015, Avila ve ark. 2016, Silva ve ark. 2016, Wei ve ark. 2016, Yildiz ve ark. 2017). Konuyla ilişkin literatürde hücre dışı tuzakların kantitatif analizinde kullanılan bu boyaların etkinliğinin karşılaştırıldığı yayına rastlanmamıştır. Bu yüksek lisans tezinde koyundan izole edilen polimorf nükleer lökositlerde *in vitro* ortamda *Toxoplasma gondii* takizoitlerine karşı şekillenen hücre dışı tuzak yapılarındaki DNA'nın kantitatif analizi için kullanılan iki farklı floresans boyanın (Sytox orange ve Picogreen) etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kimyasal Maddeler

PBS tablet (Sigma), Biocoll Separating Solution (Merck), Hank's Balanced Salt Solution (x10, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), Trypan blue dye (Sigma), Diff Quick boya seti (Bio Optica), Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen), Sytox® Orange Nucleic Acid Stain (Invitrogen), Micrococcal Nuclease Solution (NEB), Zymosan (Sigma).

2.1.2. Sarf Malzemeler

15 ml hacimde steril falcon tüp, 50 ml hacimde steril falcon tüp, steril Pasteur pipetleri, Neubauer sayım kamarası, 1.5 ml hacimde mikrosantrifüj tüpü, 96 kuyucuklu immunopleyt (Nunc, Sigma), çeşitli hacimlerde tek kullanımlık serolojik pipetler, çeşitli hacimlerde otomatik pipet uçları.

2.1.3. Cihazlar

Tip II Biyogüvenlik kabini (NÜVE MN120), CO₂'li inkubatör (Nüve EC160), santrifüj (Thermo Scientific SL16R), fluorometre (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific), ışık mikroskopu (Leica DM750), otomatik pipet seti, pipet tabancası, otoklav, sterilizatör, sıcak su banyosu, buz makinası, ultra saf su cihazı ve hassas terazi.

Deneydeki bütün laboratuvar çalışmaları UV ile steril edilen ortamda tip 2 biyogüvenlik kabini altında gerçekleştirilmiştir. Çalışma öncesinde kullanılacak bütün alet, ekipman ve solüsyonlar steril hale getirilmiştir. Çalışma esnasında koyunlara yapılan uygulamalar için Kırıkkale Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır (02.02.2016 tarih ve 16/07 sayı). (Ek 1)

2.2. Yöntem

2.2.1. Polimorf Nükleer Lökositlerin İzolasyonu

Klinik olarak sağlıklı görünen 1 yaş üzeri koyunların (n=5) *Vena jugularis*'inden usulüne uygun şekilde EDTA'lı kan tüplerine 10 ml kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri bekletilmeden 10 ml % 0.2'lik PBS-EDTA solüsyonu ile karıştırılmıştır. 50 ml'lik hacme sahip steril falkon tüplere 18 ml Biocoll solüsyonu yerleştirilmiştir. Bu solüsyonun üzerine kan örnekleri tek kullanımlık steril Pasteur pipet yardımı ile tabaka oluşturacak şekilde yavaşça damlatılarak eklenmiştir. Bu tüpler daha sonra 22 C°de 800×g hızda 35 dak. süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası falkon tüplerinde en üstteki sıvı steril pastör pipeti ile çekilerek uzaklaştırılmıştır. PMN hücreleri arasındaki eritrositleri hemolize etmek için tüplere 25 ml ultra saf su eklenmiştir. Eritrositlerin patlaması için 30 sn bekletildikten sonra tüplerdeki ozmotik dengeyi düzenleyebilmek için 3 ml HBSS (10X) ilave edilmiş ve tüpler yeniden santrifüj edilmiştir (4 °C, 400×g, 10 dak.). Eritrositleri tamamen uzaklaştırabilmek için bu işlem üç kez tekrarlanmıştır.

Üçüncü santrifüj işleminin ardından falkon tüplerindeki üstteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra sedimente 10 ml RPMI-1640 solüsyonu eklemiş ve tüpler tekrar santrifüj edilmiştir (4 °C, 400×g, 10 dak.).

2.2.1.1. İzole Edilen PMN'in Sayımı

RPMI-1640 ile santrifüj sonrası tüpteki sediment nazik hareketlerle homojen hale getirilmiştir. İzole edilen PMN sayısını belirlemek amacıyla otomatik pipet kullanılarak hücre süspansiyonundan alınan 10 µl hacimde örnek 90 µl RPMI-1640 içinde sulandırılmıştır. Daha sonra bu hücre sulandırmasından alınan 10 µl hacimde örnek Neubauer hücre sayım kamarasının her iki gözüne eklenmiştir. Işık mikroskobu altında incelenen kamaranın her iki gözünde 16'lık dört kare içinde yer alan hücreler sayılarak ortalaması alınmış ve sulandırma oranı ile çarpılarak tüpteki hücre süspansiyonunun 1 ml'sinde mevcut PMN sayısı belirlenmiştir. Koyun kanından izole edilen PMN solüsyonu RPMI-1640 kullanılarak 1 ml'lik hacimde 10^6 PMN olacak şekilde sulandırmıştır. Deneylerde bu oranda PMN solüsyonu kullanılmıştır.

2.2.1.2. İzole Edilen PMN'in Trypan Blue ile Boyanarak Canlılığının Belirlenmesi

Trypan Blue boya solüsyonu hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılmaktadır, canlı olmayan hücreler solüsyona karşı geçirgendir ve ışık mikroskopisinde mavi renkte görülürler, canlı hücreler ise solüsyonu geçirmez ve renksiz görünürler. Bu amaçla 10 µl PMN solüsyonu 10 µl Trypan Blue boya solüsyonu ile mikrosantrifüj tüpüne alınmış, pipetaj edildikten sonra alınan örnekler Neubauer sayım kamarasının her iki gözüne yerleştirilmiş ve ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Boyayı içine alarak mavi renkte görünen hücreler ölü, diğerleri canlı olarak kabul edilmiştir. Kamaranın her iki gözünde 16'lık dört kare içinde yer alan ölü ve canlı hücreler sayılarak ortalaması alınmış ve izole edilen PMN içinde canlı hücrelerin oranı belirlenmiştir.

2.2.1.3. İzole Edilen PMN İçinde Nötrofil Oranının Diff Quick ile Boyanarak Belirlenmesi

Diff-Quick kandaki granülositlerin ayırımında kullanılan bir boyama kitidir. Bu boya kitinde üç farklı solüsyon bulunur:

Solüsyon 1: 1.22 g/l eozin Y içeren fosfat buffer solüsyonu (pH 6,6).

Solüsyon 2: 1.1 g/l tiazin içeren fosfat buffer solüsyonu (pH 6,6).

Solüsyon 3: Metanol içinde fast green (0,002 g/l) içeren fiksasyon solüsyonu.

Bu boyama sonucunda nötrofil çekirdeği koyu mavi, eozinofil granülleri kırmızı-turuncu, bazofil granülleri ise koyu pembe boyanmaktadır, monositler ise mor renkte boyanır.

Boyama işlemine başlamadan önce PMN solüsyonundan alınan 50 µl örnek lam üzerine yayılarak kurutulmuştur. Bu preparat daha sonra 20 sn süreyle fiksatif solüsyonu, takibinde 20 sn süreyle solüsyon 1’de tutulmuştur. Bu süre sonunda solüsyon 2’de 20 sn tutulan preparat etanol ile ya da havada kurutulmuştur. Boyalı preparat immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskobu altında x100 objektif kullanılarak incelenmiştir.

2.2.2. *Toxoplasma gondii* Takizoitlerinin Elde Edilmesi

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’nda insanlarda toksoplazmosis tanısında rutin olarak uygulanan Sabin-Feldman Dye testi için *Toxoplasma gondii* Rh suşuna ait takizoitler Swiss albino farelere seri pasajlanmaktadır. İntraperitoneal yolla farelere verilen takizoitler pasaj işleminden 48-50 saat sonra geri alınmaktadır. Bunun için karbonmonoksit (CO) ile uyutulan deneysel enfekte farelere steril serum fizyolojik kullanılarak intraperitoneal yıkama yapılmıştır. Takizoitler içeren bu sıvı içinde bulunan hücrelerin uzaklaştırılması için steril salin solüsyonu kullanılarak sanrifüj edilmiştir. Steril cryovial içine alınan takizoit solüsyonu bir saat içerisinde kırıkale

Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı İmmunoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir.

2.2.2.1. Takizoitlerin Sayılması ve Sulandırılması

Takizoit solüsyonundaki parazit sayısını belirlemek için Neubauer sayım kamarası kullanılmıştır. Takizoitlerin sayımı 2.2.1.1.'de anlatılan PMN sayımı yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bunun için takizoit solüsyonundan alınan 10 µl hacimde örnek 90 µl RPMI-1640 içinde sulandırılmıştır. Daha sonra bu takizoit sulandırmasından alınan 10 µl hacimde örnek Neubauer hücre sayım kamarasının her iki gözüne eklenmiştir. Işık mikroskobu altında incelenen kamaranın her iki gözünde 16'lık dört kare içinde yer alan takizoitler sayılarak ortalaması alınmış ve sulandırma oranı ile çarpılarak takizoit solüsyonunun 1 ml'sinde mevcut takizoit sayısı belirlenmiştir. Deneylerde kullanılacak takizoit oranı (1:1) dikkate alınarak RPMI-1640 kullanılarak sulandırmıştır.

2.2.3. Boyaların Hazırlanması

2.2.3.1. Sytox Orange

Derin dondurucuda -18 °C'de muhafaza edilen Sytox orange stok boyası su banyosunda hızla 37 °C'ye getirilmiştir. Daha sonra stok boyadan alınan 1µl boya örneği 9 µl ultra saf su içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Pipetaj yapıldıktan sonra boya solüsyonu kullanılıncaya dek karanlıkta saklanmıştır.

2.2.3.2. Picogreen

Buzdolabında +4 °C’de muhafaza edilen Picogreen stok boyası ticari firmanın belirlendiği şekilde hazırlanmıştır. Bunun için öncelikle kit içinde bulunan bufferdan alınan 50 µl’lik örnek 950 µl ultra saf su bulunan mikrosantrifüj tüpüne eklenmiştir. Bu buffer sulandırmasından mikropipet yardımıyla 5 µl çekilerek atılmış ve Picogreen boya stoğundan 5 µl buraya ilave edilmiştir. Hazırlanan boya solüsyonu kullanılıncaya dek karanlıkta saklanmıştır.

2.2.4. PMN ve Takizoitlerin *In vitro* Kültürünün Yapılması

Deney için yapılan gruplar ve deney dizaynı Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada planlanan deney grupları (G).

İnkubasyon süresi (dakika)	PMN:Takizoit kültürü	PMN:Zyosan kültürü (pozitif kontrol)	Sadece PMN (negatif kontrol)
30	G1	G2	G3
60	G4	G5	G6
90	G7	G8	G9
120	G10	G11	G12

Takizoitle inkube edilen koyun PMN’inde şekillenen ekstrasellüler DNA miktarını belirlemek amacıyla öncelikle koyun kanından izole edilen ve sayılarak 10^6 /ml konsantrasyonda olacak şekilde RPMI-1640 ile sulandırılan PMN solüsyonundan mikropipet yardımıyla alınan 100 µl’lik örnekler steril reaksiyon tüpler içine alınmıştır. Üzerine daha önceden sayılarak 10^6 /ml takizoit olacak şekilde sulandırılmış parazit süspansiyonundan 100 µl eklenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak zyosan ile aktive edilen PMN kullanılmıştır. Bunun için PMN solüsyonundan alınan 100 µl’lik örnek üzerine 1 µl zyosan eklenmiştir. Deneyde PMN solüsyonundan alınan 100 µl hacminde örnek ise negatif kontrol olarak

kullanılmıştır. Steril reaksiyon tüpleri içine alınan negatif kontrol -üzerine takizoit solüsyonu eklenmeden- deney grupları ile aynı şartlar altında inkübe edilmiştir. Çalışmada reaksiyon tüpleri ile negatif ve pozitif kontrol örnekleri 37° C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren steril inkübatöre alınmıştır. Reaksiyon tüpleri (PMN : takizoit kültürü, pozitif ve negatif kontrol) 30, 60, 90 ve 120 dak. süreyle inkübe edilmiştir.

2.2.5. Ekstrasellüler DNA'nın Boyanması ve Kantitatif Ölçümü

Koyun PMN'i ve takizoit kültürlerinin (1:1 oranda) her bir inkübasyon süresinin bitiminde reaksiyon tüplerine 10'ar µl MNase (5 U) eklenmiş ve 15 dak. süreyle aynı koşullarda inkübatörde tutulmuştur. Bu süre sonunda reaksiyon tüpleri santrifüj edilmiştir (4° C, 300×g, 7 dak.). Santrifüj sonrasında her bir reaksiyon tüpündeki süpernatant 96'lık immunpleyitin kuyucuklarına aktarılmıştır. Her bir reaksiyon tüpünden çift kuyucuk çalışılmıştır (Çizelge 2.2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	G1 P	G2 P	G3 P	G4 P	G5 P	G6 P	G7 P	G8 P	G9 P	G10 P	G11 P	G12 P
B	G1 S	G2 S	G3 S	G4 S	G5 S	G6 S	G7 S	G8 S	G9 S	G10 S	G11 S	G12 S
C	R	R	B	B								
D												
E												
F												
G												
H												

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

Çizelge 2.2. Fluorometrik ölçüm için örneklerin 96 kuyucuklu immunopleyite yerleştirme düzeni (G: Grup, P: Picogreen boya solüsyonu, S: Sytox orange boya solüsyonu, R: RPMI-1640, B: Blank).

İnkubasyon esnasında açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın kantitatif ölçümü için ilgili kuyucukların her birine deneyde hemen önce hazırlanan Sytox orange boya solüsyonundan 1µl, Picogreen boya solüsyonundan 50µl eklenmiştir. Pleyt 10 dak süreyle ışık görmeyecek ortamda inkübe edildikten sonra fluorometreye yerleştirilmiş ve 355/460 excitation/emmision ve 485/538 excitation/emmision aralığında okutulmuştur. Bu çalışma farklı zamanlarda beş kez tekrarlanmıştır.

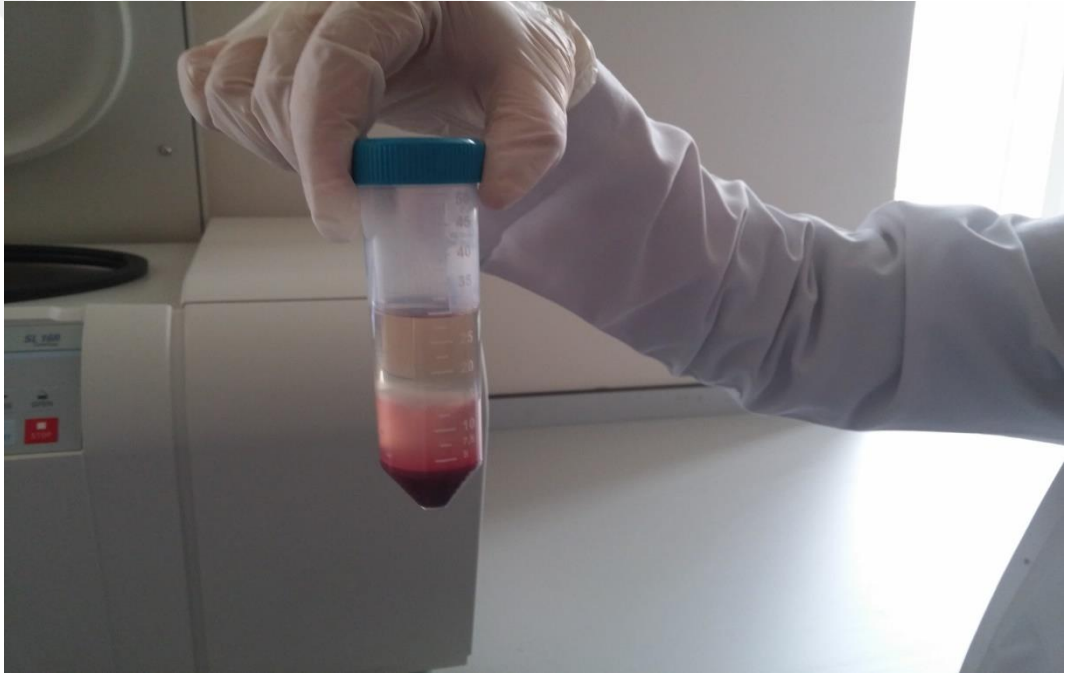
2.2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen veriler tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) ile değerlendirilmiştir. Hesaplamalar için SPSS (IBM SPSS for Windows, Ver.21) İstatistik paket programı ve NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U test, üç ve üzeri grup karşılaştırmalarında ise Kruskall Wallis test kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin takiplerinin incelenmesinde de Friedman test ve ikili karşılaştırmalarında Wilcoxon Signed Ranks test kullanılmıştır, $p < 0.05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Polimorf Nükleer Lökositlerin İzolasyonu

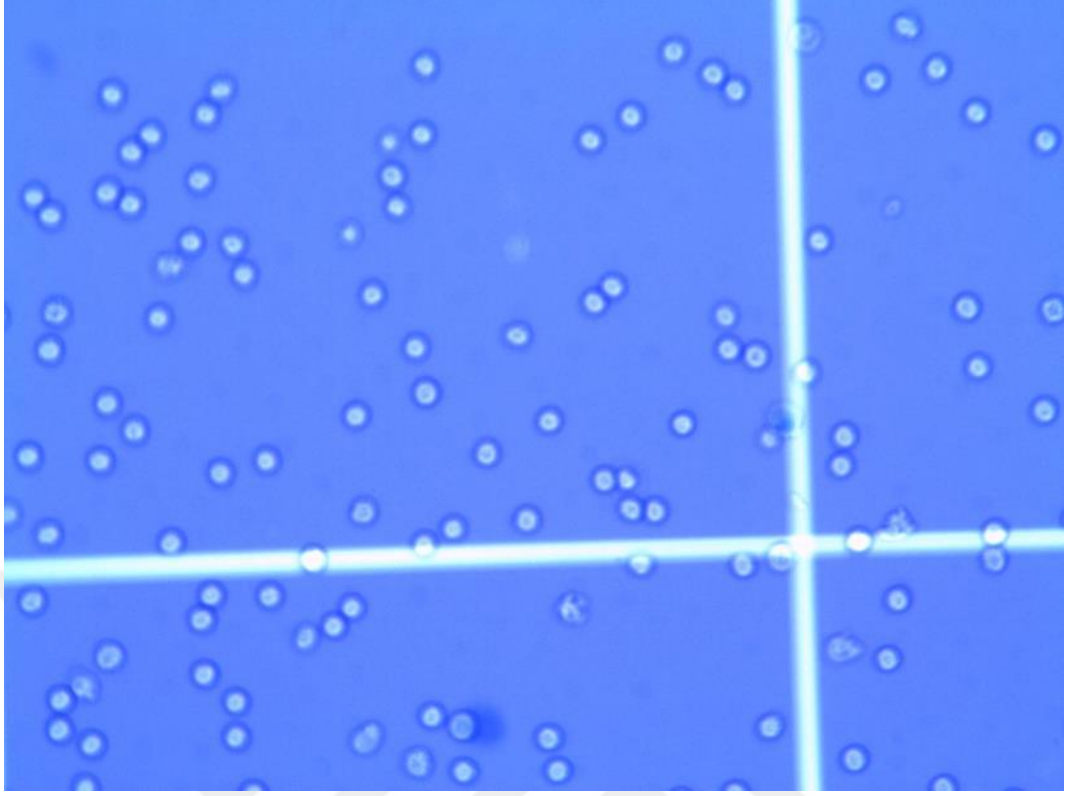
Klinik olarak sağlıklı görünen koyunların *Vena jugularis*'inden alınan kan örneklerinin Biocoll solüsyonu ile santrifüjü sonrasında falkon tüplerinde kan hücreleri tabakalandırılmış ve eritrositler patlatıldıktan sonra PMN izole edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kan örneklerinin Biocoll solüsyonu ile santrifüjü sonrasında falkon tüplerinde görülen tabakalar.

3.2. İzole Edilen Hücrelerin Trypan Blue Boyama ile Canlılığının Belirlenmesi

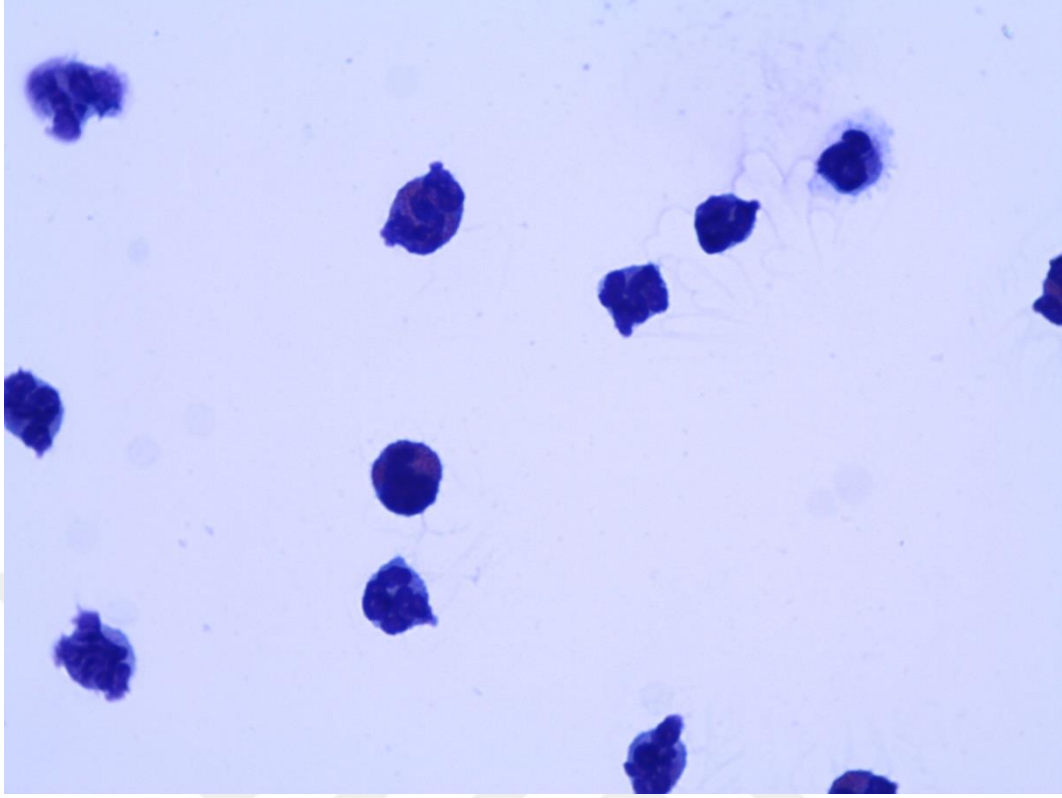
Koyunlara ait kan örneklerinden izole edilen PMN'in canlılık oranının belirlenmesi amacıyla yapılan trypan blue solüsyonu ile boyanma sonrasında izole edilen PMN'in % 95 oranında canlı olduğu ışık mikroskopik olarak gözlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Trypan blue ile boyanmış PMN'in ışık mikroskopik görüntüsü (x10).

3.3. İzole Edilen PMN İçindeki Nötrofil Oranının Diff Quick Yöntemiyle Belirlenmesi

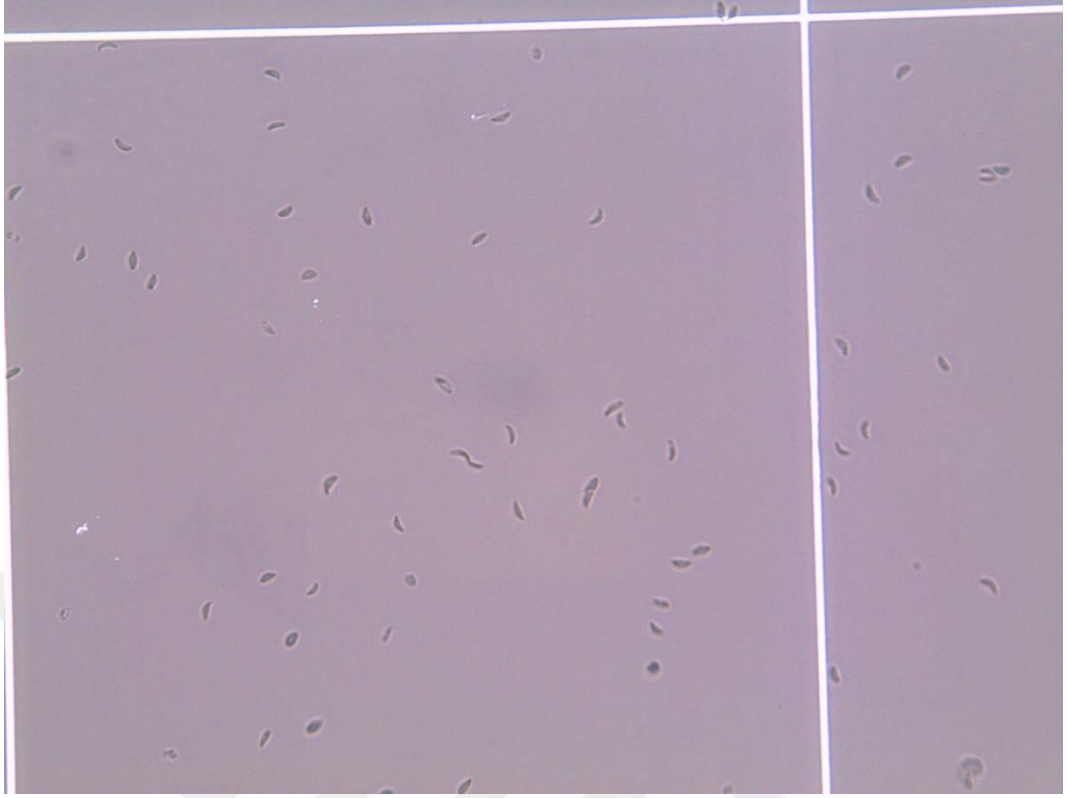
Koyun kan örneklerinden izole edilen PMN içinde nötrofillerin oranını belirlemek amacıyla alınan hücre örnekleri Diff-Quick boya kiti ile boyanmış ve ışık mikroskopik olarak incelenmiştir. Boyalı PMN preparatlarında koyu mavi renkte boyanmış parçalı çekirdeğe sahip nötrofillerin koyun kan örneğinden izole edilen PMN stoğunda hakim olduğu belirlenmiştir (% 97) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Diff-quick ile boyanmış nötrofillerin ışık mikroskopik görüntüsü(x100)

3.4. *Toxoplasma gondii* Takizoitlerinin Sayılması

Swiss albino farelerin steril serum fizyolojik kullanılarak elde edilen peritoneal yıkama sıvısındaki takizoit sayısını belirlemek amacıyla alınan örnekler Neubauer lam içinde ışık mikroskobu kullanılarak sayılmıştır (Şekil 3.4). Her deneyde yaklaşık olarak aynı sayıda takizoit elde edilmiş olup ortalama 4.3 milyon/ml olarak belirlenmiştir. Peritoneal yıkama sıvısının ml'sinde 10^6 takizoit olacak şekilde RPMI-1640 solüsyonu ile sulandırılmıştır.



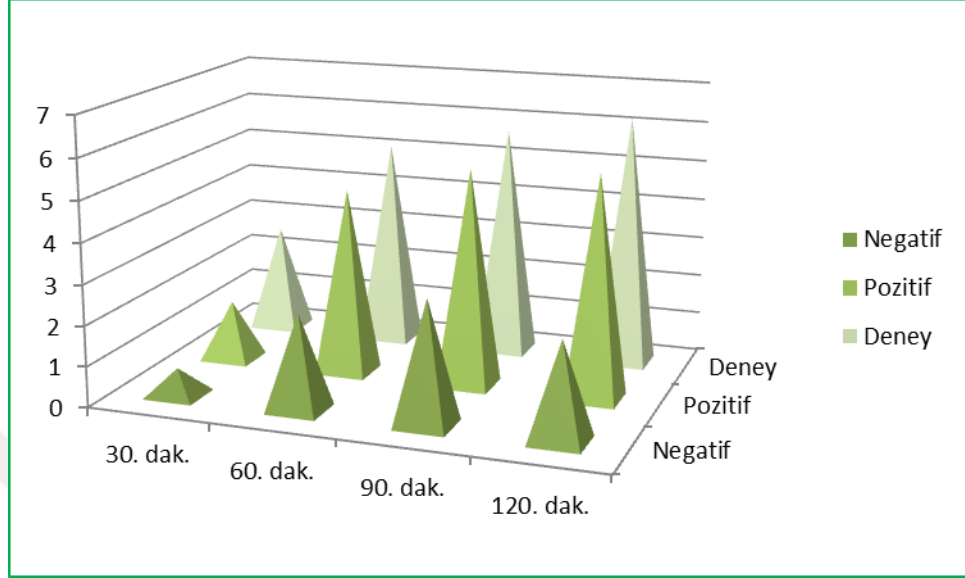
Şekil 3.4. *Toxoplasma gondii*'ye ait takizoitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (x40)

3.5. PMN ve Takizoitlerin *In vitro* Kültürü

Farklı sürelerde (30, 60, 90 ve 120 dak.) inkube edilen PMN ve takizoit kültürü üzerine açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın kantitatif ölçümünde etkinliğinin belirlenmesinin amacıyla Sytox orange ve Picogreen boya solüsyonu gruplardaki tüm kuyucuklara (deney grubu, pozitif ve negatif kontrol) ayrı ayrı eklendikten sonra fluorometre aracılığıyla 355/460 excitation/emmission ve 485/538 excitation/emmission dalga boyunda okutulmuştur.

Picogreen boya solüsyonun kullanıldığı gruplardaki ekstrasellüler DNA'nın fluorometre ölçüm sonuçları Çizelge 3.1'de, ilgili deney grubu sonuçlarının ortalama (ort), standart sapma (ss), minimum ölçülen değer (min), maksimum ölçülen değer (mak) ve medyan değerleri ile istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneyde Picogreen boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının fluorometre ile kantitatif ölçümü.



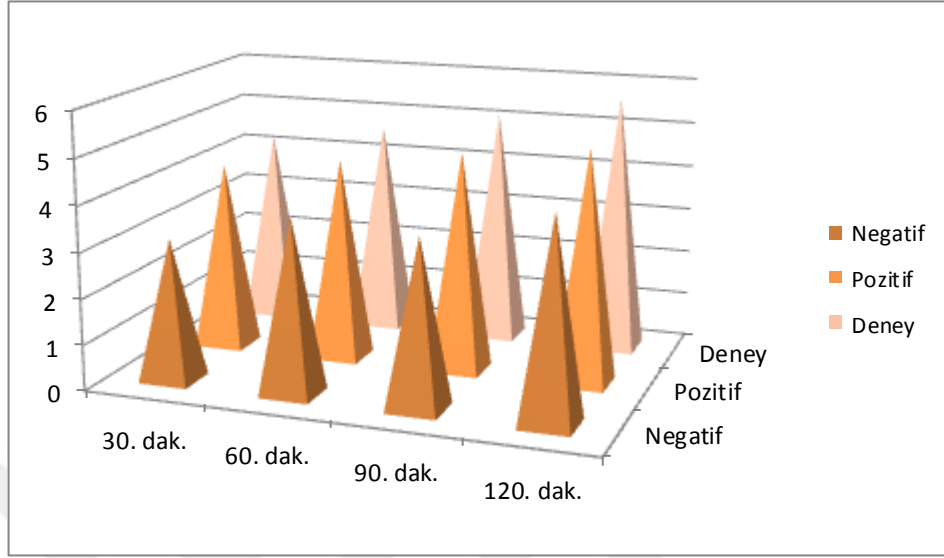
	30. dak.	60. dak.	90. dak.	120. dak.
Negatif	0.668	2.366	3.036	2.418
Pozitif	1.468	4.628	5.4	5.53
Deney	2.659	5.134	5.755	6.262

Picogreen boya solüsyonu kullanılarak yapılan kantitatif analizde; negatif kontrol ile kıyasla, tüm inkubasyon sürelerinde takizoit : PMN kültüründe (deney grubu) açığa çıkan ekstrasellüler DNA miktarının yüksek olduğu tespit edilmiştir, elde edilen sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Benzer durum takizoit : PMN kültürünün pozitif kontrol ile kıyaslanması sonucunda da saptanmıştır ($p < 0.05$).

Çizelge 3.2. Picogreen boya solüsyonu ile boyanan grupların fluorometre ölçümlerinden elde edilen sonuçlara ait istatistik veriler.

<i>P yöntemi</i>		Negatif grup	Pozitif grup	Deney grubu	<i>^bp</i>
30.dk	<i>Min-Mak</i> (<i>Medyan</i>)	0.289-1.118 (0.632)	1.120-1.846 (1.452)	1.509-3.942 (2.592)	0.012
	<i>Ort±Ss</i>	0.668±0.362	1.468±0.391	2.659±1.032	
60.dk	<i>Min-Mak</i> (<i>Medyan</i>)	1.272-3.266 (2.462)	3.667-5.620 (4.612)	3.969-6.363 (5.101)	0.018
	<i>Ort±Ss</i>	2.366±0.946	4.628±0.980	5.134±1.332	
90.dk	<i>Min-Mak</i> (<i>Medyan</i>)	2.573-3.644 (2.964)	4.437-6.484 (5.340)	4.868-6.338 (5.908)	0.023
	<i>Ort±Ss</i>	3.036±0.500	5.400±0.842	5.755±0.702	
120.dk	<i>Min-Mak</i> (<i>Medyan</i>)	1.812-2.853 (2.504)	5.027-6.896 (5.099)	4.534-7.706 (6.403)	0.021
	<i>Ort±Ss</i>	2.418±0.518	5.530±0.911	6.262±1.566	
<i>^ap</i>		0.038	0.044	0.048	
<i>^aFriedman Test</i>		<i>^bKruskall Wallis Test</i>		<i>*p<0.05</i>	

Çizelge 3.3. Deneyde Sytox orange boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının fluorometre ile kantitatif ölçümü.



	30. dak.	60. dak.	90. dak.	120. dak.
Negatif	3.106	3.813	3.678	4.402
Pozitif	4.142	4.456	4.82	5.159
Deney	4.29	4.712	5.166	5.701

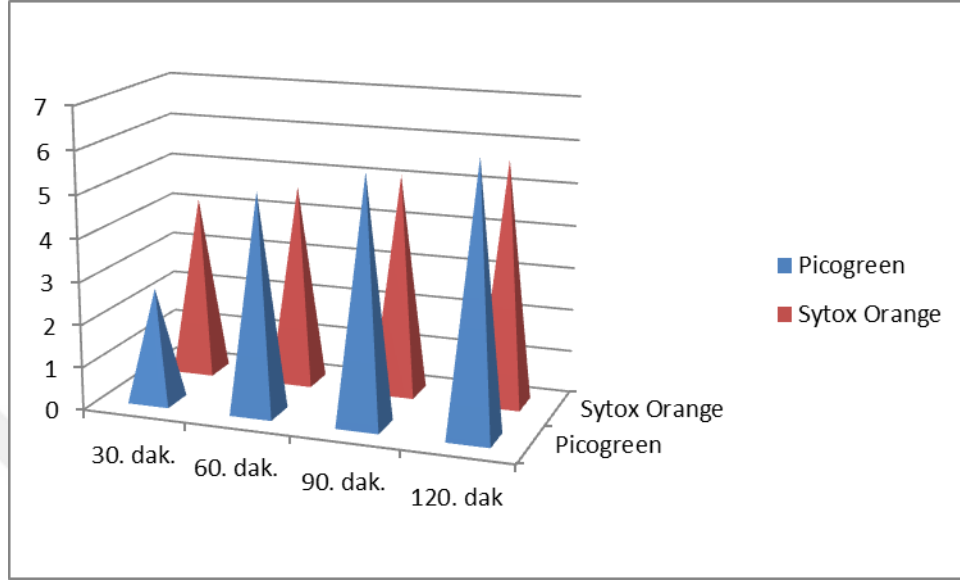
Sytox orange boya solüsyonun kullanıldığı gruplardaki ekstrasellüler DNA'nın fluorometre ölçüm sonuçları Çizelge 3.3'te, ilgili deney grubundan elde edilen sonuçlara ait ortalama (ort), standart sapma (ss), minimum ölçülen değer (min), maksimum ölçülen değer (mak) ve medyan değerleri ile istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Sytox orange boya solüsyonu kullanılarak yapılan kantitatif analizde; negatif kontrol ile kıyasla, takizoit : PMN kültüründe (deney grubu) açığa çıkan ekstrasellüler DNA miktarının tüm inkubasyon sürelerindeki ölçümlerde yüksek olduğu saptanmış, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Benzer durum pozitif kontrol ile, takizoit : PMN kültürü kıyaslandığında da tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 3.4. Sytox orange boya solüsyonu ile boyanan grupların flourometre ölçümlerinden elde edilen sonuçlara ait istatistik veriler.

Sytox Orange		Negatif grup	Pozitif grup	Deney grubu	^b p
30.dk	<i>Min-Mak</i>	1.620-3.710	3.906-4.262	4.036-4.512	<i>0.007</i>
	<i>(Medyan)</i>	(3.338)	(4.207)	(4.251)	
	<i>Ort±Ss</i>	3.106±0.846	4.142±0.142	4.209±0.193	
60.dk	<i>Min-Mak</i>	2.615-6.155	3.315-6.575	4.140-6.586	<i>0.014</i>
	<i>(Medyan)</i>	(3.348)	(4.171)	(4.340)	
	<i>Ort±Ss</i>	3.813±1.366	4.456±1.237	4.712±1.052	
90.dk	<i>Min-Mak</i>	2.907-4.195	4.131-5.876	4.215-6.379	<i>0.008</i>
	<i>(Medyan)</i>	(3.671)	(4.295)	(4.817)	
	<i>Ort±Ss</i>	3.678±0.495	4.820±0.847	5.166±1.030	
120.dk	<i>Min-Mak</i>	1.288-6.433	4.006-6.525	4.555-6.873	<i>0.007</i>
	<i>(Medyan)</i>	(3.991)	(4.550)	(5.445)	
	<i>Ort±Ss</i>	4.402±2.212	5.159±1.223	5.701±0.962	
		^a <i>p</i> 0.526	0.053	0.014	
^a <i>Friedman Test</i>		^b <i>Kruskall Wallis Test</i>	[*] <i>p</i> <0.05	^{**} <i>p</i> <0.01	

Çizelge 3.5. Deney gruplarında Sytox orange boya solüsyonu ve Picogreen boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının fluorometre ile kantitatif ölçümünden elde edilen sonuçların karşılaştırılması.



	30. dak.	60. dak.	90. dak.	120. dak.
Picogreen	2.659	5.134	5.755	6.262
Sytox Orange	4.209	4.712	5.166	5.701

Çalışmada farklı sürelerde inkube edilen koyun orijinli PMN : takizoit kültüründe açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın tespiti amacıyla aynı örnek iki farklı boya (Sytox orange ve Picogreen) ile boyanmıştır. Bu aşamada fluorometre kullanılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.5'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre farklı sürelerde açığa çıkan DNA miktarının ölçülmesinde Sytox orange ve Picogreen kullanılması sonucunda elde edilen sonuçlarda istatistiksel farklılık (30 dakikalık inkubasyon yapılan deneyler haricinde) görülmemiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Deney gruplarında Picogreen ve Sytox orange boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının flourometre ölçümlerinden elde edilen sonuçlara ait istatistik veriler.

İnkubasyon süresi		Picogreen	Sytox Orange	^c p
30.dk	<i>Min-Mak</i>	1.509-3.942	4.036-4.512	<i>0.014</i>
	<i>(Medyan)</i>	(2.592)	(4.251)	
	<i>Ort±Ss</i>	2.659±1.032	4.290±0.193	
60.dk	<i>Min-Mak</i>	3.969-6.363	4.140-6.586	<i>0.624</i>
	<i>(Medyan)</i>	(5.101)	(4.340)	
	<i>Ort±Ss</i>	5.134±1.332	4.712±1.052	
90.dk	<i>Min-Mak</i>	4.868-6.338	4.215-6.379	<i>0.327</i>
	<i>(Medyan)</i>	(5.908)	(4.817)	
	<i>Ort±Ss</i>	5.755±0.702	5.166±1.030	
120.dk	<i>Min-Mak</i>	4.534-7.706	4.555-6.873	<i>0.624</i>
	<i>(Medyan)</i>	(6.403)	(5.455)	
	<i>Ort±Ss</i>	6.262±1.566	5.701±0.962	

^cMann Whitney U Test

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Konak vücuduna giren patojenlere karşı öncelikle sahip olduğu doğal bağışıklık elemanları ile mücadele etmeye çalışır (Akira ve ark 2006). Vücuda patojenin girmesini takiben canlıda şekillenen ilk yanıtta PMN kritik rol oynar (Nathan 2006). PMN’i nötrofil, eozinofil ve bazofil oluşturmakla birlikte nötrofiller büyük çoğunluğu teşkil eder (Hickman ve ark. 2014). Patojen ajanın canlıya girdiği yere öncelikle ulaşan hücreler nötrofillerdir (Nathan 2006). Vücutta patojene karşı şekillenen yangı esnasında açığa çıkan bazı kemotaktik faktörler dolaşımında bulunan nötrofilleri yangı bölgesine çeker (Phillipson ve Kubes 2011). Yangı alanına gelen nötrofil mevcut patojene karşı sahip olduğu savaşma stratejileri (fagositosis, degranülasyon ve netosis) ile mücadele etmeye çalışır (Brinkmann ve ark. 2004, Kaplan ve Radic 2012, Yıldız 2016). Kemik iliğinde üretilen nötrofilin yaşam süresi oldukça kısa olsa da (6-8 saat civarında), yangı alanına geldiğinde bu süre 1-2 güne uzayabilmektedir (Nathan 2006, Yıldız 2016).

Nötrofil patojenle savaşta hücre dışı tuzak gelişimi yönünde aktive olmuşsa hücrede çekirdek ve granüler içerik birbiri ile karışmakta ve şekillenen reaksiyon sonucunda üzerinde granüler enzimleri taşıyan dekonpanse kromatin ağları hücre dışı alana fırlatılmaktadır (Brinkman ve ark. 2004). Dekonpanse kromatin ağları granüllerdeki diğer antimikrobiyal enzim içeriği ile birlikte hücrenin normal büyüklüğünün 10-15 katı kadar yer kaplayan bulutumsu bir görünüme sahip hücre dışı tuzak yapılarını şekillendirmektedir (Brinkman ve Zychlinsky 2012). Hücre dışı tuzaklar için önemli karakterlerden birisi hücre dışı alana, nötrofile ait, yaklaşık 17 nm çapında DNA iplikçiklerinin yayılmasıdır (Urban ve ark. 2009, Zavrotinak ve Rapala-Kozik 2013). Diğer bir önemli özellik ise bu DNA iplikçiklerinin nötrofil granüler içeriklerinden olan elastaz ve myeloperoksidaz gibi enzimleri içermesidir (Urban ve ark. 2009).

Araştırmacılar netosis esnasında şekillenen reaksiyonları daha iyi inceleyebilmek için *in vitro* çalışmalar yapmaktadır (Papayannopoulos ve ark. 2011, Abi Abdallah ve ark. 2012). Bu çalışmalarda çeşitli hayvan türlerine ait ya da insan kanından izole edilen PMN ile farklı enfeksiyöz ajanlar (parazitler, bakteriler ve

viruslar) uygun koşullarda inkube edilmekte ve bu enfeksiyöz etken : PMN kültürlerinde şekillenen hücre dışı tuzak yapıları çeşitli cihazları kullanılarak saptanabilmektedir. Bu cihazlar arasında yer alan taramalı elektron mikroskobu ve floresans mikroskobu hücre dışı tuzakların görülmesine yardımcı olmaktadır (Brinkmann ve ark. 2004, Pural 2004). Özellikle hücre dışı tuzakları oluşturan DNA ve granüler enzimlerin floresans işaretli uygun antijenler ve spesifik boyalar kullanılarak görünür hale getirildiği floresans mikroskopik analiz çeşitli araştırmacılarca başarı ile kullanılmaktadır (Guimaraes-Costa ve ark. 2009, Behrendt ve ark. 2010, Yıldız ve ark. 2017).

Floresans mikroskopi *in vitro* gelişen hücre dışı tuzakların izlenmesinde başarı ile kullanılmasına rağmen bu tuzak yapılarının kantitatif analizinin yapılması gerekmektedir. Bu analiz özel floresans boya ile boyanmış DNA konsantrasyonundaki floresans ışımaya ölçen fluorometre ve flowsitometre gibi cihazlar aracılığıyla yapılabilmektedir. Fluorometrik analizde *in vitro* dizayn edilen enfeksiyöz etken : PMN kültürlerinde inkubasyon esnasında şekillenen netosis reaksiyonunda hücre dışı alana çıkan DNA'nın kantitatif ölçülmesinde Picogreen, Sytox orange ve Sytox green gibi çeşitli ekstrasellüler DNA boyaları kullanılmaktadır (Behrendt ve ark. 2010, Silva ve ark. 2014, Wei ve ark. 2016). Bunlar hücre dışı alana çıkmış DNA'ya yüksek affiniteyle bağlanabilen, buna karşılık bütünlüğü bozulmamış hücreye bağlanamayan nitelikteki boyalardır (Yousefi ve ark. 2008).

Çeşitli araştırmacılar tarafından *in vitro* dizayn edilen deneysel çalışmalarda çeşitli protozoon ve helmintlere karşı şekillendiği saptanan hücre dışı tuzakların omurgasını oluşturan ekstrasellüler DNA miktarının kantitatif ölçümü amacıyla farklı boyalar kullanılmıştır (Baker ve ark. 2008, Guimaraes-Costa ve ark. 2009, Behrendt ve ark. 2010, Gabriel ve ark. 2010, Abi Abdallah ve ark. 2012, Munoz Caro ve ark. 2014a, Munoz Caro ve ark. 2014b, Silva ve ark. 2014, Morgado ve ark. 2015, Munoz Caro ve ark. 2015a, Reichel ve ark. 2015a, Avila ve ark. 2016, Silva ve ark. 2016, Wei ve ark. 2016, Yıldız ve ark. 2017). Bu çalışmalarda farklı protozoonlar ile ilgili deneylerde kullanılan ekstrasellüler DNA boyalarından birisi Picogreendir (Guimaraes-Costa ve ark. 2009, Gabriel ve ark. 2010, Munoz Caro ve ark. 2014a, Munoz Caro ve ark. 2015a, Silva ve ark. 2014.). Floresans nükleik asit boyası olan

Picogreen hücre dışı alana çıkan DNA miktarının fluorometrik ölçümünde kullanılmaktadır (Invitrogen). Guimaraes-Costa ve ark. (2009), insandan elde ettikleri PMN’i *Leishmania amazonensis* promastigotları ile *in vitro* kültüre etmeleri sonucunda ortamda açığa çıkan DNA miktarını Picogreen kullanarak tespit etmiştir. Benzer şekilde *Leishmania donovani* promastigotları ile inkube edilen PMN’de şekillenen netosis reaksiyonunda ekstrasellüler DNA miktarı Picogreen ile belirlenmiştir (Gabriel ve ark. 2010). Keçi PMN’i ile inkube edilen *Eimeria arloingi* sporozoitleri ve ookistlerine karşı gelişen hücre dışı tuzak yapıları Picogreen ile boyanarak ekstrasellüler DNA fluorometrik olarak ölçülmüştür (Silva ve ark. 2014). *Besnoitia besnoiti* takizoitleri ile inkube edilen sığır orijinli PMN’de gelişen tuzak yapılarındaki hücre dışı DNA da Picogreen boya kullanılarak analiz edilmiştir (Munoz Caro ve ark. 2014a). Benzer şekilde *Cryptosporidium parvum* ookistleri ve sporozoitleri ile *in vitro* kültüre edilen sığır PMN’inde şekillenen hücre dışı tuzakları oluşturan temel unsur olan DNA Picogreen boya ile boyanarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Munoz Caro ve ark. 2015a).

Diğer ekstrasellüler DNA boyalarından olan Sytox orange ve Sytox green de protozoon-netosis çalışmalarında kullanılmaktadır (Behrendt ve ark. 2010, Wei ve ark. 2016). Hücre dışı tuzakların ana yapısal bileşeni olan DNA Sytox green ve Sytox orange kullanılarak fluorometrik ölçülebilmektedir. Bu iki floresans DNA boyası nükleik asitlere oldukça affinite göstermekte, sadece plazma membranı yırtılmış hücreleri boyamaktadır (Invitrogen). *Eimeria bovis*’e ait sporozoitler, sığırdan izole edilen PMN ile *in vitro* ortamda karşılaştırılmış ve şekillenen ekstrasellüler DNA, Sytox orange kullanılarak fluorometrik olarak ölçülmüştür (Behrendt ve ark. 2010). *In vitro* inkube edilen köpek orijinli PMN’de *Neospora caninum* takizoitlerin tetiklediği hücre dışı tuzak yapılarındaki ekstrasellüler DNA miktarının kantitatif analizi Sytox green ile yapılmıştır (Wei ve ark. 2016).

Protozoonlar dışında helmintlerle yapılan *in vitro* netosis deneylerinde bahsi geçen ekstrasellüler DNA boyaları kullanılmaktadır (Bonne-Annee ve ark. 2014, Munoz Caro ve ark. 2015b). *Strongyloides stercoralis* larvası ile inkube edilen fare ve insan PMN’inde açığa çıkan hücre dışı DNA miktarı Picogreen ile analiz edilmiştir (Bonne-Annee ve ark. 2014). Benzer şekilde Picogreen, *Haemonchus contortus*

larvası ile kültüre edilen sığır PMN'inde şekillenen hücre dışı tuzaklardaki DNA'yı kantitatif ölçmekte kullanılmıştır (Munoz Caro ve ark. 2015b).

Toxoplasma gondii'nin *in vitro* inkube edilen farklı canlılara ait PMN'lerde hücre dışı tuzak gelişimini tetiklediği bilinmektedir (Abi Abdallah ve ark. 2012, Reichel ve ark. 2015, Yıldız ve ark. 2017). Fare ve insandan izole edilen PMN'de *T. gondii*'ye karşı şekillenen hücre dışı tuzak yapısının öğelerinden birisi olan ekstrasellüler DNA miktarı Picogreen kullanılarak kantitatif ölçülmüştür (Abi Abdallah ve ark. 2012). Picogreen, fokdan izole edilen PMN ve monosit hücrelerinde *T. gondii*'ye karşı açığa çıkan hücre dışı DNA miktarının fluorometrik ölçümünde de kullanılmıştır (Reichel ve ark. 2015). *T. gondii*'nin arakonakları arasında en önemlilerinden olan koyun ve sığır PMN'inde *in vitro* ortamda bu parazite ait takizoitlere karşı gelişen netosis reaksiyonunda açığa çıkan hücre dışı tuzak yapılarının omurgasını teşkil eden DNA miktarı Sytox green kullanılarak fluorometrik olarak analiz edilmiştir (Yıldız ve ark. 2017). Araştırmacılar (Baker ve ark. 2008, Behrendt ve ark. 2010, Guimaraes-Costa ve ark. 2009, Gabriel ve ark. 2010, Abi Abdallah ve ark. 2012, Munoz Caro ve ark. 2014a, Munoz Caro ve ark. 2014b, Silva ve ark. 2014, Morgado ve ark. 2015, Munoz Caro ve ark. 2015a, Reichel ve ark. 2015, Avila ve ark. 2016, Silva ve ark. 2016, Wei ve ark. 2016, Yıldız ve ark. 2017) netosise ilişkin kurguladıkları *in vitro* deneylerinde kullandıkları ekstrasellüler boya tercihlerinde herhangi bir kriter ya da özellik belirtmemiştir. Bu tez çalışmasında ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizi amacıyla kullanılan boyalar olan Picogreen ve Sytox orange'ın boyama etkinliğinin ortaya konulması ve elde edilen sonuçların kıyaslanması amaçlanmıştır ve çalışma sonucunda *T. gondii* takizoitleri ile *in vitro* ortamda inkube edilen koyun PMN'inde açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın fluorometrik ölçüm sonuçları değerlendirilmiştir.

Toxoplasma gondii takizoitleri ile kültüre edilen PMN'de şekillenen hücre dışı tuzaklar inkubasyon zamanına bağlı olarak artmaktadır (Yıldız ve ark. 2017). Bu tez çalışmasında koyun kanından elde edilen PMN ile takizoitler farklı periyotlar (30, 60, 90 ve 120 dak.) boyunca inkubatorde tutulmuş ve bu inkubasyon sürelerinde şekillenen ekstrasellüler DNA miktarı iki farklı boya kullanılarak ölçülmüş ve iki boyadan elde edilen sonuçlar birbiri ile kıyaslanmıştır. Çalışma sonucunda

inkubasyon süresine bağlı (30 dak. periyot hariç) açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın kantitatif ölçümünde iki boyanın etkinliği bakımından istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Deneyde PMN : takizoit kültürünün 30. dakikasında açığa çıkan DNA miktarının Sytox orange boya solüsyonu kullanılarak ölçüldüğünde aynı deney sonuçlarının Picogreen boya solüsyonu ile ölçümüne göre daha yüksek veriler elde edilmiş, sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p=0.014$). Bu durumun sebebinin kullanılan boyaya ait boyama özelliği ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Çalışmada seçilen her iki boya ölü hücrelere affinite gösteren floresans boyalardır. PMN'de hücre dışı tuzaklar patojenle karşılaşmayı takiben yaklaşık 10 dakika içinde şekillenmeye başlamaktadır (Yıldız 2016). Bu aşamada patojenle reaksiyona girerek tuzak oluşturmaya başlayan PMN aktive olmaktadır. Çalışmada kullanılan Sytox orange'ın inkubasyonun başlangıcında patojenle karşılaşmasını takiben hücre dışı tuzak oluşturma yönünde ilerleyen ve böylelikle ölüm sürecine giren hücreleri boyamada Picogreen'den daha etkin olduğu kararına varılmıştır.

Çalışmada kullanılan Picogreen ve Sytox orange deneyde kullanılmak üzere hazırlanması bakımından birbiriyle kıyaslandığında şu sonuç ortaya çıkmaktadır: *In vitro* netosis deneylerinde ekstrasellüler DNA'nın tespitinde kullanılan Sytox orange stok solüsyonundan boya solüsyonunun hazırlanması Picogreen'e göre nispeten daha pratiktir. $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen Sytox orange stok boyası su banyosunda hızla $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye getirilir ve alınan 1 μl boya örneği 9 μl ultra saf su içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Picogreen boya solüsyonunun hazırlanması için öncelikle kit içinde bulunan buffer ultra saf su ile 1:20 oranında sulandırılır, daha sonra Picogreen boya stoğundan buraya 5 μl ilave edilir.

Netosis çalışmalarında hücre dışı tuzaklardaki DNA miktarını belirlemek amacıyla her bir kuyucuğa eklenmesi gereken boya miktarı bakımından değerlendirildiğinde Sytox orange boya solüsyonundan 1 μl , Picogreen'den ise 50 μl eklenmektedir. Her iki boyada ışığa duyarlı olduğundan pleyte ekleme aşamasının karanlıkta yapılması gerekmektedir. Bu durum, çalışma esnasında 1 μl gibi küçük hacimlerin pipetasyonunda hata riskini artırabilmektedir. İki boya ekonomik olarak değerlendirildiğinde 1 vial DMSO içindeki 5 mM Sytox orange solüsyonu 219

ABD dolarıdır ve 250 µL boya stok solüsyonu içerir. 1 vial boya ile maksimum 2 500 örnek değerlendirilebilir. Picogreen boya stoğu ticari olarak iki farklı biçimde bulunur. Birisi; 100 µl Picogreen boya stoğu içeren 10 viallik kittir, diğeri ise 1 ml Picogreen boya stoğu bulunan tek viallik kittir. Kullanım bakımından 100 µl'lik 10 vial içeren kit daha pratik ve güvenilirdir. Picogreen boya stoğu 400 ABD dolarıdır ve her bir kit ile maksimum 2 000 örnek değerlendirilebilir. Örnek başına maliyet değerlendirildiğinde ekstraselüler boyası olarak Sytox orange daha cazip görülmektedir.

Sonuç olarak canlının vücuduna giren patojen ajanlara mücadele ettiği yollardan birisi olan netosis ve bu esnada şekillenen hücre dışı tuzak yapılarının mekanizmasının anlaşılması güncel ve araştırmacıların üzerinde durduğu önemi giderek artan bir konudur. Farklı parazitlerin çeşitli canlı türlerine ait PMN'de şekillendirdiği hücre dışı tuzaklara ilişkin bazı kantitatif sonuçlar verilmektedir. Bu sonuçlar üzerine deneylerde kullanılan ekstraselüler DNA boyasının etkisi olup olmadığı hakkında bilgi literatürde mevcut değildir. Bu tez çalışması sonucunda parazitlerle ilişkili *in vitro* netosis çalışmalarında yaygın kullanılan iki floresans özellikte DNA boyasının (Sytox orange ve Picogreen) etkiliği araştırılmış ve deneyin 30 dakikalık inkubasyon periyodu dışındaki sürelerde boyamalar arasında istatistiksel önemli bir farklılığa rastlanmamıştır. İki boya arasında 30. dakikadaki boyanma farklılığı önemli bulunmuştur. *In vitro* netosis çalışan araştırmacıların kısa süreli inkubasyon sonucunda şekillenen ekstraselüler DNA'nın kantitatif analizinde iki farklı boya kullanmaları önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S (2015) Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System. Temel İmmünoloji İmmün Sistemin İşlevleri ve Bozuklukları. 4th ed. Çeviren: CAMCIOĞLU Y ve DENİZ G, Güneş Tıp Kitapevleri Ankara s:17-40.
- ABI ABDALLAH DS, LIN C, BALL CJ, KING MR, DUHAMEL GE, DENKERS EY (2012) *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun*, 80, 768-777.
- ABU-DALBOUH MA, ABABNEH MM, GIADINIS ND, LAFI SQ (2012) Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. *Trop Anim Health Prod*, 44, 49-54.
- ADEREM A, ULEVITCH RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406, 782-787.
- AKÇA A, MOR N (2010) Seroprevalance of *Toxoplasma gondii* in cattle in province of Kars, Turkey as determined by ELISA. *Int J Parasitol*, 5, 876-878.
- AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Elsevier Inc*, 124, 783-801.
- ALEXANDER DL, MITAL J, WARD GE, BRADLEY PJ, BOOTHROYD JC (2005) Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *Plos Patho*, 1, 137-149.
- APPELBERG R (2007) Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol*, 15, 87-92.
- ARELAKI S, ARAMPATZIOGLOU A, KAMBAS K, PAPAGORAS C, MILTIADES P, ANGELIDOU I, MITSIOS A, KOTSIANIDIS L, SKENDROS P, SIVRIDIS E, MAROULAKOU L, GIATROMANOLAKI A, RITIS K (2016) Gradient infiltration of neutrophil extracellular traps in colon cancer and evidence for their involvement in tumour growth. *PLoS One*, 11, e0154484.
- ARTHUR MJ, BLEWETT DA (1988) IFAT detection of IgG specific to *Toxoplasma* in thoracic fluids from aborted lambs: evaluation on routine diagnostic submissions. *Vet Rec*, 122, 29-31.

ASHBURN D, JOSSAWL, PENNINGTON TH, HO-YEN DO (1998) IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of *Toxoplasma* infection in pregnancy. *J Clin Pathol*, 51, 312-315.

AŞCI Z, AKGÜN S (2015) Afyon İli'nde bir seroloji laboratuvarına *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) antikorları araştırılması amacıyla başvuran olgulara ait sonuçların değerlendirilmesi. *Turkiye Parazitol Derg*, 39, 9-12.

AVERHOFF P, KOLBE M, ZYCHLINSKY A, WEINRAUCH Y (2008) Single residue determines the specificity of neutrophil elastase for *Shigella* virulence factors. *J Mol Biol*, 377,1053-1066.

AVILA EE, SALAIZA N, PULIDO J, RODRIGUEZ MC, DIAZ-GODINEZ C, LACLETTE JP, BECKER I, CARRERO JC (2016). *Entamoeba histolytica* trophozoites and lipopeptidophosphoglycan trigger human neutrophil extracellular traps. *PLoSOne*, 11, e0158979.

AYCAN ÖM, MİMAN Ö, ATAMBAY M, KARAMAN Ü, ÇELİK T, DALDAL N (2009) Hastanemizdeki son yedi yıllık *Toxoplasma gondii* seropozitifliğinin araştırılması. *Turgut Özal Tıp Merk Derg*, 15, 199-201.

BACH FH, BACH ML, SONDEL PM (1976) Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. *Nature*, 259, 273-281.

BAKER VS, IMADE GE, MOLTA NB (2008) Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar J*, 7, 41-32.

BARKER SJ (2011) Modulation of the Immune Response by Current and Novel Treatments for Hepatitis C Virus. Doktora Tezi. University of Southampton Liver Group, Division of Infection, Inflammation and Repair School of Medicine.

BEGHETTO E, BUFFOLANO W, SPADONI (2003) Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J Clin Microbiol*, 41, 5414-5418.

BEHRENDT JH, RUIZ A, ZAHNER H, TAUBERT, A, HERMOSILLA C (2010) Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. *Vet Immun Immunopathol*, 133, 1-8.

- BEUTLER B (2004) Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, 40,845-859.
- BEVERLEY JKA (1959) Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. *Nature*, 183, 1348-1349.
- BLACK MW, BOOTHROYD JC (2000) Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii* biology and molecular biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 607-623.
- BLADER IJ, ARRIZABALAG AG, SULLIVAN WJ (2013) The Role of Host and Parasite Encoded Kinases in *Toxoplasma* Host Interactions. In: Protein Phosphorylation in Parasites: Novel Targets for Antiparasitic Intervention. Ed. DOERIG C, SPEATH G, WIESE M, SELZER PM, USA, Chapter:3.
- BLOTTA I, PRESTINACI F, MIRANTE S, CANTAFORA A (2005) Quantitative assay of total dsDNA with PicoGreen reagent and real-time fluorescent detection. *Ann Ist Super Sanita*, 41, 119-123.
- BONNE-ANNE S, KEREPEZI LA, HESS JA, WESOLOWSKI J, PAUMET F, LOK JB, NOLAN TJ, ABRAHAM D (2014) Extracellular traps are associated with human and mouse neutrophil and macrophage mediated killing of larval *Strongyloides stercoralis*. *Microbes Infect*, 16, 502-511.
- BORREGAARD N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33, 657-670.
- BORREGAARD N, COWLAND JB (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89, 3503-3521.
- BORREGAARD N, SORENSEN OE, MONCHK T (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*, 28, 340-345.
- BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, WEINRAUCH Y, ZYCHLINSKY A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-1535.
- BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*, 5, 577-582.
- BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A (2012) Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin. *J Cell Biol*, 198, 773-783.

- BUXTON D, INNES EA (1995) A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitol*, 110, 11-16.
- BUXTON D, MALEY SW, WRIGHT SE, RODGER S, BARTLEY P, INNES EA (2007) *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. *Vet Parasitol*, 149, 25-28.
- CAMOSSI LG, GRECA-JUNIOR H, CORREA AP, RICHINI-PEREIRA VB, SILVAR C, SILVA AV AND LANGONI H (2011) Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. *Vet Parasitol*, 177, 256-261.
- CANER A, GÜRÜZ AY (2011) Türkiye’de klinik önemi olan paraziter enfeksiyonlarda tanısal yaklaşım. Parazitolojide Laboratuvar. Ed. KORKMAZ M ve OK ÜZ, Meta basım İzmir s:261-285.
- CARRUTHERS VB (1999) Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol Int.* 48, 1-10.
- CARRUTHERS VB, GIDDINGS OK, SIBLEY LD (1999) Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol*, 1, 225-235.
- CHENG OZ, PALANIYAR N (2013) NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Frontiers Immunol*, 4, 1-13.
- CHOI J, PARK S, BIERING SB, SELLECK E, LIU CY, ZHANG X, FUJITA N, SAITOH T, AKIRA S, YOSHIMORI T, SIBLEY LD, HWANG S, VIRGIN HW (2014) The parasitophorous vacuole membrane of *Toxoplasma gondii* is targeted for disruption by ubiquitin-like conjugation systems of autophagy. *Immunity*, 40, 924-35.
- CHUAH C, JONES MK, BURKE ML, OWEN HC, ANTHONY BJ, MCMANUS PN, RAMM GA, GOBERT GN (2013) Spatial and temporal transcriptomics of *Schistosoma japonicum*-induced hepatic granuloma formation reveals novel roles for neutrophils. *J Leukoc Biol*, 94, 353-365.
- CHUAMMITRI P, OSTOJIC J, ANDREASEN CB, REDMOND SB, LAMONT SJ, PALIC D (2009) Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol*, 129, 126-131.
- COPPENS I, ASAIY T, TOMAVO S (2014) Biochemistry and Metabolism of *Toxoplasma gondii*: Carbohydrates, Lipids and Nucleotides. *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan Perspectives and Methods. Ed. LM WEISS ve K KIM, 2nd, Academic Press is an Imprint of Elsevier, USA, Chapter.8.

- COPPIN A, VARRE JS, LIENARD L, DAUVILLEE D, GUERARDEL Y, SOYER-GOBILLARD MO, BULEON A, BALL S, TOMAVO S (2005) Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *J Mol*, 60, 257-267.
- ÇEKİN Y, KIZILATEŞ F, GÜR N, ŞENOL Y (2011) Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesine son dört yılda başvuran gebe kadınların *Toxoplasma gondii* seropozitifliğinin araştırılması. *Turkiye Parazitol Derg*, 35, 184-4.
- ÇİÇEK H, BABÜR C, KARAER Z (2004) Afyon yöresinde Sabin-Feldman (SF) boya testi ile koyunlarda *Toxoplasma gondii* seroprevalansı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51, 229-231.
- DABRITZ HA, MILLER MA, ATWILL ER, GARDNER IA, LEUTENEGGER CM, MELLI AC, CONRAD PA (2007) Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst. *J Am Vet Med Assoc*, 231, 1676-84.
- DE BOER JH, VERHAGEN C, BRUINENBERG M (1996) Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. *Am J Ophthalmol*, 121, 650-658.
- DE MOURA L, BAHIA-OLIVEIRA LMG, WADA MY, JONES JL, TUBOI SH, CARMO EH, RAMALHO WM, CAMARGO NJ, TREVISAN R, GRAÇA RMT, SILVA AJ, MOURA I, DUBEY JP, GARRETT DO (2006) Waterborne outbreak of toxoplasmosis in Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*, 12, 326-329.
- DENKERS EY, GAZZINELLI RT (1998) Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin Microbiol*, 11, 569-588.
- DESMONTS G, COUVREUR J (1974) Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med*, 290, 1110-1116.
- DESMONTS G, REMINGTON JS (1980) Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*, 11, 562-568.
- DRANOFF G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Can*, 4, 11-22.
- DUBEY JP, FRENKEL JK (1972) Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool*, 19, 155-177.
- 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, 870-882.

- DUBEY JP (1997) Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol*, 44, 592-602.
- DUBEY JP (1998a) Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 17, 908-913.
- DUBEY JP (1998b) Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet Parasitol*, 74, 75-77.
- DUBEY JP, LINDSAY DS, SPEER CA (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Chn Microbiol Rev*, 11, 267-299.
- DUBEY JP, HILL DE, JONES JL, HIGHTOWER AW, KIRKLAND E, ROBERTS JM, MARCET PL, LEHMANN T, VIANNA MCB, MISKA K, SREEKUMAR C, KWOK OCH, SHEN SK, GAMBLE HR (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *J Parasitol*, 91, 1082-1093.
- DUBEY JP (2009) History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 39, 877-882.
- DUBEY JP (2010) *Toxoplasmosis in Animals and Humans*, 2nd Ed, CRC Press, Boca Raton, FL, p: 1-313.
- DUBEY JP (2014) The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan Perspectives and Methods. Ed. LM WEISS ve K KIM, 2nd, Academic Press is an Imprint of Elsevier, USA, Chapter.1
- DUBEY JP, BROWN J, TERNENT M, VERMA SK, HILL DE, CERQUEIRA-CEZAR CK, KWOK OCH, CALERO-BERNAL R (2016) Seroepidemiologic study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. infections in black bears (*Ursus americanus*) in Pennsylvania, USA. *Vet Parasitol*, 229, 76-80.
- 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.
- DURDU B (2008) Sağlıklı Gebelerde Toksoplazma Seropozitifliği, IgG Avidite Değerlerinin İncelenmesi ve Seropozitifliğe Etki Eden Çeşitli Risk Faktörlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi.

EALLES JC (2005) Immunology for Life Scientists, 2nd. ed. John Wiley & Sons, Inc, USA, p:75.

FEREIG RM, MAHMOUD B HYAH, MOHAMED SGA, ABOULAILAC MR, ABDEL-WAHABD A, OSMANE SA, ZIDANF SA, EL-KHODARYG SA (2016) Seroprevalence and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in farm animals in different regions of Egypt. *Vet Parasitol*, 4,1-6.

FERGUSON DJP (2004) Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol*, 34, 347-360.

FERGUSON DJP, DUBREMETZ JF (2014) The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. In: The Model Apicomplexan Perspectives and Methods. Ed. LM WEISS ve K KIM, 2nd, Academic Press is an Imprint of Elsevier, USA, Chapter:2.

FERGUSON DJP, BIRCH-ANDERSEN A, SIIM JC, HUTCHISON WM (1979) An ultrastructural study on the excystation of the sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 87, 277-283.

FOLDS DJ (2008) Overview of Immunity. In: Handbook of Human Immunology, Ed. O'GORMAN MRG, DONNENBERG AD. 2nd. Ed. CRC Press, Pennsylvania. Chapter:1.

FRENKEL JK, DUBEY JP (1972) Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J Infect Dis*, 126, 664-673.

FRENKEL JK, DUBEY JP, MILLER NL (1969) *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. *Science*, 164, 432-433.

FUCHS T, A ABED U, GOOSMANN C, HURWITZ R, SCHULZE I, WAHN V, WEINRAUCH Y, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176, 231-241.

GABRIEL C, MCMASTER WR, GIRARD D, DESCOTEAUX A (2010) *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *Journal Immunol*, 185, 4319-4327.

GANGNEUX FL, DARDE ML (2012) Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*, 25, 264-96.

GOLD DA, KAPLAN AD, LIS A, BETT GCL, ROSOWSKI EE, CIRELLI KM, BOUGDOUR A, SIDIK SM, BECK JR, LOURIDO S, EGEA PF, BRADLEY PJ, HAKIMI MA, RASMUSSEN RL, SAEQJ

- JPJ (2015) The *Toxoplasma dense* granule proteins gra17 and gra23 mediate the movement of small molecules between the host and the parasitophorous vacuole. *Cell Host Microbe*, 17, 642-52.
- GOLDMANN O, MEDINA E (2012) The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol*, 3, 420-430.
- GUIMARAES-COSTA AB, NASCIMENTOMTC, FROMENT GS (2009) *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *PNAS*, 106, 6748-6753.
- GUO M, DUBEY JP, HILL D, BUCHANAN RL, GAMBLE HR, JONES JL, PRADHAN AK (2015) Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption. *J Food Prot*, 78, 457-76.
- HAKANSSON S, CHARRON AJ, SIBLEY LD (2001) *Toxoplasma* evacuols: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The Embo Journal*, 20, 3132-3140.
- HAKKIM A, FURNROHR BG, AMANN K, LAUBE B, ABED UA, BRINKMANN V (2010) Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci*, 107, 9813-9818.
- HENRY CM, HOLLVILLE E, MARTIN SJ (2013) Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Elsevier Inc*, 61, 90-97.
- HERMOSILLA C, MUNOZ CARO T, SILVA TMR, RUIZ A, TAUBERT A (2014) The intriguing host innate immune response: Novel anti-parasitic defence by neutrophil extracellular traps. *Parasitol*, doi: 10.1017/s0031182014000316.
- HICKMAN CP, ROBERTS LS, KEEN SL, EISENHOUR DJ, LARSON A, I'ANSON H (2014) Integrated Principles of Zoology. *Zooloji Entegre Prensipler*. 16th ed. Çeviren: GÜNDÜZ E, Palme Yayıncılık, Ankara (2016) Chapter:3.
- HILL DE, DUBEY JP (2013) *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *Int J Parasitol*, 43, 107-113.
- HOWE DK, SIBLEY LD (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infec Dis*, 172, 1561-1566.
- HUTCHISON WM (1965) Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206, 961-962.

- INNES EA, BARTLEY PM, BUXTON D, KATZER F (2009) Ovine toxoplasmosis. *Parasitol*, 136, 1887-1894.
- JACOBS L, REMINGTON JS, MELTON ML (1960a) A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J Parasitol*, 46, 23-28.
- JACOBS L, REMINGTON JS, MELTON ML (1960b) The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*, 46, 11-21.
- JE S, QUAN H, YOON Y, NA Y, KIM BJ (2016) *Mycobacterium massiliense* Induces Macrophage Extracellular Traps with Facilitating Bacterial Growth. *PLoS One*, 11(5): e0155685.
- JONES TC, HIRSCH JG (1972) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med*, 136, 1173-1194.
- KADOWAKI N, ANTONENKO S, YIU-NAM LAU J, LIU YJ (2000) Natural interferon α/β -producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med*, 192, 219-225.
- KAPLAN MJ, RADIC M (2012) Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*, 189, 2689-2695.
- KARAGENÇ Tİ, ERTABAKLAR H, ULUTAŞ B, AYPAK S, ERTUĞ S (2005) Aydın yöresindeki sığırlarda *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı. *YYÜ Vet Fak Derg*, 16, 67-70.
- KASYANENKO N, BAKULEV V, PEREVYAZKO I, NEKRASOVA T, NAZAROVA O, SLITA A, ZOLOTOVA Y, PANARIN E (2016) Model system for multifunctional delivery nanoplatforms based on DNA-Polymer complexes containing silver nanoparticles and fluorescent dye. *J Biotechnol*, 236, 78-87.
- KESSENBROCK K, KRUMBHOLZ M, SCHÖNERMARCK U, BACK W, GROSS WL, WERB Z, GRÖNE HJ, BRINKMANN V, JENNE DE (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*, 15, 623-5.
- KHAN A, DUBEY JP, SU C, AJIOKA JW, ROSENTHAL BM, SIBLEY LD (2011) Genetic analyses of a typical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol*, 41, 645-655.

- KHAN IA, MATSUURA T, KASPER LH (1996) Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol*, 8, 887-96.
- KHAN IA, THOMAS SY, MORETTO MM, LEE FS, ISLAM SA, COMBE C, SCHWARTZMAN JD, LUSTER AD (2006) CCR5 Is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *Plos Pathog*, 2, 484-490.
- KLINGER CM, NISBET RE, OUOLOGUEM DT, ROOS DS, DACKS JB (2013) Cryptic organelle homology in apicomplexan parasites: insights from evolutionary cell biology. *Curr Opin Microbiol*, 16, 424-431.
- KLUG WS, CUMMINGS MR, SPENCER CA (2011) Concepts of Genetics. Genetik Kavramlar. 8th. Ed. ÖNER C. Palme Yayıncılık Ankara s:263.
- 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*, 24, 119-130.
- KOLACZKOWSKA E, KUBES P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- KUK S, ÖZDEN M (2007) Hastanemizde dört yıllık *Toxoplasma gondii* seropozitifliğinin araştırılması. *Turkiye Parazit Derg*, 31, 1-3.
- LAMB TJ (2012) Apicomplexa: *Toxoplasma gondii*. In: Immunity to parasitic infections. Ed. TJ LAMB, JohnWiley & Sons, USA p:107-120.
- LANIER LL, PHILLIPS JH (1992) Natural killer cells. *Curr Opin Immunol*, 4,38-42.
- LAURIDO S, ZHANG C, LOPEZ MS, TANG K, BARKS J, WANG Q, WILDMAN SA, SHOKAT KM, SIBLEY D (2013) Optimizing small molecule inhibitors of calcium-dependent protein kinase 1 to prevent infection by *Toxoplasma gondii*. *J Med Chem*, 56, 3068-3077.
- LEBLEBİCİER A, YILDIZ K (2014) Silopi’de koyunlarda *Toxoplasma gondii*’nin yaygınlığının indirekt floresans antikor testi (IFAT) ile serolojik olarak belirlenmesi. *Turkiye Parazit Derg*, 38, 1-4.
- MANDA A, PRUCHNIAK MP, ARAZNA M, DEMKOWUA (2014) Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. *Cent E J immunol*, 39, 116–121.

- MASIELLO I, BIGGIOGERA M (2017) Osmium ammine for staining DNA in electron microscopy. *Method Mol Biol*, 1560, 261-267.
- MC COLGAN C, BUXTON D, BLEWETT DA (1988) Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. *Vet Rec*, 123, 467-470.
- METZLER KD (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*, 117, 953-959.
- MILLER CM, BOULTER NR, IKIN RJ, SMITH NC (2008) The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 39, 23-39.
- MILLER SA, HARLEY JP (2016) Zoology. Zooloji. 9th ed. Çeviren: Aktümsek A, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul.
- MIRANDA K, PACE DA, CINTRON R, RODRIGUES JC, FANG J, SMITH A, ROHLOFF P, COELHO E, DE HAAS F, DE SOUZA W, COPPENS I, SIBLEY LD, MORENO SN (2010) Characterization of a novel organelle in *Toxoplasma gondii* with similar composition and function to the plant vacuole. *Mol Microbiol*, 76, 1358-1375.
- MORDUE DG, HUNTER CA (2014) The Innate Immunity to *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan Perspectives and Methods. Ed. LM WEISS ve K KIM, 2nd, Academic Press is an Imprint of Elsevier, USA, p:797-812.
- MORDUE DG, SIBLEY LD (2003) A novel population of Gr-1 β -activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J Leukoc Biol*, 74, 1015-1025.
- MORGADO FN, NASCIMENTO MTC, SARAIVA EM (2015) Are neutrophil extracellular traps playing a role in the parasite control in active American tegumentary leishmaniasis lesions. *PLoS One*, 10 (7): e0133063.
- MUNOZ CARO T, HERMOSILLA C, SILVA LMR, CORTESH, TAUBERT A (2014a) Neutrophil extracellular traps as innate immune reaction against the emerging apicomplexan parasite *Besnoitia besnoiti*. *PloS One*, 9 (3): e91415
- MUNOZ CARO T, SILVA LM, RITTER C, TAUBERT A, HERMOSILLA C (2014b) *Besnoitia besnoiti* tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation. *Parasitol Res*, 113, 4189-4197.

- MUNOZ CARO T, LENDNER M, DAUGSCHIES A, HERMOSILLA C, TAUBERT A (2015a) NADPH oxidase, MPO, NE, ERK1/2, p38 MAPK and Ca²⁺ influx are essential for *Cryptosporidium parvum* induced NET formation. *Dev Comp Immunol*, 52, 245-254.
- MUNOZ CARO T, RUBIO MC, SILVA ML, MAGDOWSKI, GARTNER U, MCNEILLY TN, TAUBERT A, HERMOSILLA C (2015b) Leucocyte-derived extracellular trap formation significantly contributes to *Haemonchus contortus* larval entrapment. *Parasites & Vectors*, 8, 607-618.
- NATHAN C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6,173–182.
- NAUSEEF WM (2014) Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol*, 16, 1146-1155.
- NEELI I, DWIVEDI N, KHAN S, RADIC M (2009) Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun*, 1, 194-201.
- NEELI I, KHAN SN, ANDRADIC M (2008) Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol*, 180, 1895-1902.
- NEELI I, RADIC M (2013) Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front Immunol*, 4,1-9.
- NISHINAKA Y, ARAI T, ADACHI S, TAKAORI-KONDO A, YAMASHITA K (2011) Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 413, 75-79.
- OFEK I, GOLDHAR J, KEISARI Y, SHARON N (1995) Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol*, 49, 239-276.
- ÖZDEMİR R, ER H, BARAN N, VURAL A, KURULTAY N (2008) *Toxoplasma gondii* IgG-IgM antikorları pozitif gebelerde IgG avidite sonuçlarının değerlendirilmesi. *İnfek Derg*, 22, 219-222.
- PALMERL J, COOPER PR, LING MR, WRIGHT HJ, HUISSOON A, CHAPPLE ILC (2012) Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol*, 167, 261-8.
- PAPAYANNOPOULOS V, STAAB D, ZYCHLINSKY A (2011) Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PloS One*, 6: e28526

- PAPINI RA, BUZZONE G, NARDONI S, ROCCHIGIANI G, MANCIANTI F (2015) Seroprevalence and genotyping of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for human consumption in Italy. *Vet Sci*, 35, 657-661.
- PHILLIPSON M, KUBES P (2011) The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*, 17, 1381-1390.
- PIEPER K, GRIMBACHER B, EIBEL H (2013) B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*, 131, 959-971.
- PILSCZEK FH, SALINA D, POON KKH, FAHEY C, YIPP BG, SIBLEY CD (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 185, 7413-7425.
- PISANU S, CUBEDDU T, PAGNOZZI P, ROCCA S, CACCIOTTO C, ALBERTI A, MAROGNA G (2015) Neutrophil extracellular traps in sheep mastitis. *Vet Res*, 46, 59-61.
- PURAL N (2004) Fonksiyonel hücre görüntüleme teknikleri. *Hacettepe Tıp Der*, 35,107-113.
- RADKE JR, WHITE MW (1998) A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Biochem Parasitol*, 94, 237-247.
- REECE JB, URRY LA, CAIN ML, WASSERMAN SA, MINORSKY PV, JACKSON RB (2013) Campbell Biology. Campbell Biyoloji. 9th ed. Çeviren: GÜNDÜZ E, TÜRKAN İ, Palme Yayıncılık Ankara.
- REICHEL M, MUNOZ CARO T, SANCHEZ CONTRERAS G (2015) Harbour seal (*Phoca vitulina*) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Dev Comp Immunol*, 50, 106-115.
- ROBERTS CW, PRASADY S, KHALIQ F, GAZZINELLI RT, KHAN IA, MCLEOD R (2014) Adaptive Immunity and Genetics of the Host Immune Response. In *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan Perspectives and Methods. Ed. LM WEISS ve K KIM, 2nd, Academic Press is an Imprint of Elsevier, USA, p:821-933.
- SABIN AB, FELDMAN HA (1948) Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-663.

- SALANTA H, HAMBURGERA J, SPIRAA D, DAVID AB, SCHWANC EV (2016) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in poultry kept under different housing conditions in Israel. *Vet Parasitol*, 5, 34-36.
- SEGAL AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, 23, 197-223.
- SIBLEY LD, BOOTHROYD JC (1992) Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, 359, 82-85.
- SIBLEY LD, KHAN A, AJIOKA JW, ROSENTHAL BM (2009) Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Phil Trans R Soc B*, 364, 2749-2761.
- SILVA LMR, MUNOZ CARO T, GERSTBERGER R, VILA-VICOSA MJM, CORTES HCE, HERMOSILLA C, TAUBERT A (2014) The apicomplexan parasite *Eimeria arloingi* induces caprine neutrophil extracellular traps. *Parasitol Res*, 113, 2797-2807.
- SILVA LMR, MUNOZ CARO T, BURGOS RA, HIDALGO MA, TAUBERT A HERMOSILLA C (2016) Far beyond Phagocytosis: Phagocyte-derived extracellular traps act efficiently against protozoan parasites in vitro and in vivo. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1-13.
- SIMON EJ, DICKEY JL, HOGAN KA, REECE JB (2016) Campbell Essential Biology With Physiology. Campbell Temel Biyoloji Fizyoloji İleveli. 5th ed. Çeviren: Gündüz E, Türkan İ, Palme Yayıncılık Ankara.
- SOEHNLEIN O (2009) Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J Mol Med*, 87,1157-1164.
- SORENSEN OE, BORREGAARD N (2016) Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest*, 126, 1612-1620.
- SPEER CA, DUBEY JP (1998). Ultrastructure of early stages of infection in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitol*, 116, 35-42.
- SPEER CA, DUBEY JP (2005) Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol*, 35, 193-206.
- SU C, KHAN A, ZHOUC P, MAJUMDARA D, AJZENBERGD D, DARDED ML, ZHUF XQ, AJIOKA JW, ROSENTHALH BM, DUBEY JP, SIBLEY LD (2012) Globally diverse *Toxoplasma gondii*

isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *PNAS*, 109, 5844-5849.

SUNGMO JE, HAILIAN QUAN, YINA YOON, YIRANG NA, BUM-JOON KIM, SEUNG HYEOK SEOK (2016) *Mycobacterium massiliense* induces macrophage extracellular traps with facilitating bacterial growth. *PLoS One*, 11(5): e0155685.

SZABO EK, FINNEY CAM (2016) *Toxoplasma gondii*: One organism, multiple models. *Trends Parasitol*, 33,113-127.

TAYLOR MA, COOP RL, WALL RL (2007) Veterinary Parasitology. Veteriner Parazitoloji. 3dh. ed. YILDIZ K, Medipress, Malatya s:217.

TENTER AM, HECKEROTH AR, WEISS LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, 30, 1217-1258.

URBAN CF, ERMERT D, SCHMID M, ABU-ABED U, GOOSMANN C, NACKEN W, BRINKMANN V, JUNGBLUT PR, ZYCHLINSKY A (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5, 639-656.

WANG Y, STADLER S, CORRELL S, LI P (2009) Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*, 184, 205-213.

WARTHA F, BEITER K, NORMARK S, HENRIQUES-NORMARK B (2007) Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 10, 52-56.

WEDEMEYER J, TSAI M , GALLI SJ (2000) Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol*, 12, 624-31.

WEI Z, HERMOSILLA C, TAUBERT A, HE X, WANG X, GONG P, LI J, YANG Z, ZHANG X (2016) Canine neutrophil extracellular traps release induced by the apicomplexan parasite *Neospora caninum* in vitro. *Front Immunol*, 7, 436.

WILSON E (2012) Apicomplexa: *Toxoplasma gondii*. In: Immunity to Parasitic Infections. Ed TJ LAMB, 1th. ed. JohnWiley & Sons ltd., USA p:107-120.

WOLF A, COWEN D, PAIGE B (1939) Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verified by transmission to animals. *Science*, 89, 226-227.

- WOLF A, COWEN D, PAIGE B (1940) Toxoplasmic encephalomyelitis IV. experimental transmission of the infection to animals from a human infant. *J Exp Med*, 71, 187-214.
- YAMAN O, ÇETİNKAYA Ü, HAMAMCI B, YAZAR S, ŞAHİN İ (2010) Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalına müracaat edenlerde anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının araştırılması. *J Health Sci*, 19, 119-124.
- YAROVINSKY F (2014) Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol*, 14, 109-121.
- YAROVINSKY F, ZHANG D, ANDERSEN JF, BANNENBERG GL, SERHAN CN, HAYDEN MS, HIENY S, SUTTERWALA FS, FLAVELL RA, GHOSH S, SHER A (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 308, 1626-1629.
- YAZAR S, KUK S, ÇETİNKAYA Ü, KAYA M, ŞAHİN İ (2012) Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına müracaat eden hastalarda anti-*Toxoplasma gondii* Antikorlarının Dağılımı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18,89-92.
- YILDIZ K, PIŞKIN FÇ, UTUK AE, GOKPINAR S (2015) Prevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep meats purchased from retail stores in Central Anatolia, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 39, 328-332.
- YILDIZ K (2016) Netosis: Nötrofilin patojenle savaşta kullandığı alternatif savunma yöntemi. *Turkiye Parazitol Derg*, 2016, 158-62.
- YILDIZ K, GOKPINAR S, GAZYAGICI AN, BABUR C, SURSAL N, AZKUR AK (2017) Role of NETs in the difference in host susceptibility to *Toxoplasma gondii* between sheep and cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 189, 1-10.
- YIPP BG, PETRI B, SALINA D, JENNE CN, SCOTT BNV, ZBYTNUIK LD (2012) Infection induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*, 18, 1386-1393.
- YOUSEFI S, GOLD JA, ANDINA N, LEE JJ, KELLY AM, KOZLOWSKI E (2008) Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*, 14, 949-953.
- YOUSEFI S, MIHALACHE C, KOZLOWSKI E, SCHMID I, SIMON HU (2009) Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*, 16, 1438-1444.
- ZAJAC AM, CONBOY GA (2009) Veterinary Clinic Parasitology, Veteriner Klinik Parazitoloji, 7th. ed. YILDIZ K, Medipress Malatya s:162.

ZAWROTNIAK M, RAPALA-KOZIK M (2013) Neutrophil extracellular traps (NETs)- formation and implications. *Acta Biochim Pol*, 60, 277-284.



KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi:02.02.2016

Toplantı Sayısı:16/01

Karar No:16/ 07

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik 02.02.2016 Salı günü saat 13:00'de Prof.Dr.Siyami KARAHAN'ın başkanlığında toplanarak gündemdeki konuları görüştü.

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof.Dr.Kader YILDIZ tarafından yürütülen 'Hücre Dışı Tuzağın Kantitatif Analizinde Picogreen ve Sytox Orange Boyalarının Karşılaştırılması' isimli projesinin Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu Yönergesinde belirtilmiş olan Etik İlkelerine uygun olduğuna karar verilmiştir.

PROJEDE GÖREVLİ PERSONEL			
Sıra	Proje Görevi	İsim	Kurum
1	Yürütücü	Kader YILDIZ, Prof.Dr.	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
2	Araştırmacı	Perçem ATAN, Biyolog	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Prof.Dr.Siyami KARAHAN

Başkan

Prof.Dr.Umut TEKİN

Üye

Yrd.Doç.Dr.Uğur TİFTİKÇİ

Üye

Yrd.Doç. Dr.Serap YÖRÜBULUT

Üye

Mustafa AKIN

Üye

Prof.Dr.Zuhal AKTUNA

Üye

Yrd.Doç.Dr.Nahit PAMUKOĞLU

Üye

Vet.Hek. Ümit ÖZGÜ

Üye

Vet.Hek.Yaşar ŞAHİN

Üye

ÖZGEÇMİŞ

I. Kişisel Bilgiler

Adı : Perçem
Soyadı : Atan
Doğum yeri ve tarihi : Ankara / 03.03.1986
İletişim Adresi : Ada mah. Okullar cad. 116/14 Sinop
Telefon : 0553 864 3388
E-posta : percemevrimatean@hotmail.com

II. Eğitimi

ÜNİVERSİTE : Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yabancı dil : İngilizce

III. Yayınları

A- Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlar

- ATAN P, YILDIZ K (2015) İxodid kenelerle mücadelede kimyasal akarisitlere alternatif yollar. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 26, 29-35.
- SÜRSAL N, ATAN P, GÖKPINAR S, DURU Ö, ÇAKMAK A, YILDIZ K. (2017). Kırıkkale Yöresinde yetiştirilen taklacı güvercinlerde (*Columbalivia domestica*) *Haemoproteus* spp.'nin yaygınlığı. Türkiye Parazitol Derg, 41, 71-75.