

Doi: 10.4274/npa.y6302

Deneyisel Kronik Toksoplazmoz Fare Modeli: Beyin Lezyonlarının Davranış Değişiklikleri ile İlişkilendirilmesi

Experimental Chronic Toxoplasmosis Model in Mice: Brain Lesions and Related Behavioral Changes

Orhan Murat KOÇAK¹, Hasan Tarık ATMACA², Osman Safa TERZİ², Seyhan BÜYÜKKAYAER², Hatice ÖZDEMİR¹, Tuba UZUNLIOĞLU², Güngör CAĞDAŞ DİNÇEL², Erhan BAL², Oğuz KUL²

¹Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Psikiyatri Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

²Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Bölümü, Kırıkkale, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; kist oluşturan *T. gondii* ME 49 suşu ile enfekte farelerde oluşan anksiyete ile ilişkili davranış değişiklikleri ve beyin lezyonlarıyla ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Uygulama öncesi serumlarında anti-*T. gondii* antikorlarının olmadığı gösterilen 2 aylık 21 adet erkek Swiss albino fareden deney grubundaki 14'üne; intraperitoneal (IP) (n=8) ve oral (n=6) yollarla 2x10² *Toxoplasma gondii* ME49 oocisti verildikten 4 hafta sonra, anksiyete veya korku ile ilişkili davranışları *T. gondii* ile enfekte fareler ile kontrol grubu sağlıklı farelerde karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Deney bitiminde (inokulasyon sonrası 45'inci gün) farelere ötenazi yapılarak, beyinleri histopatolojik olarak ve *T. gondii* doku kisti antijeni yönünden immunoperoksidaz test ile incelendi.

Bulgular: *T. gondii* ile enfekte farelerin daha düşük düzeyde anksiyeteye sahip olduklarını, enfekte olmayan kontrol grubundaki farelere göre daha yüksek oran ve süreyle açık kolu tercih ettiklerini ortaya koydu. Patolojik olarak; enfekte grupta özellikle parietal ve temporal loblar, kornu ammonis, amigdala, talamus ve çevresinde, beyin diğer bölümlerine oranla daha yüksek derecede gliosis, perivasküler hücre infiltrasyonu, menenjit ve nöron nekrozları gözlemlendi. Beyinde *T. gondii* doku kisti yerleşimi de anılan lezyon şiddeti ile doğru orantılı olarak diğer alanlara oranla daha yüksek sayıdaydı.

Sonuç: Kronik toksoplazmozlu farelerin beyinlerinde şekillenen *T. gondii* doku kistleri ve nöropatolojik değişikliklerin doğrudan anksiyetenin azaltılmasına yönelik davranış manipülasyonu ile ilişkili olduğu öne sürülebilir. (*Nöropsikiyatri Arşivi* 2012; 49: 139-144)

Anahtar kelimeler: *Toxoplasma gondii*, fare, doku kisti, davranış

Çıkar çatışması:

Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

ABSTRACT

Objective: In this study, it is aimed to constitute a chronic toxoplasmosis model using *toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ME49 strain that is supposed to produce tissue cysts, to compare healthy and infected mice in terms of behavioral changes. In addition, the relationship between behavioral changes and brain lesions was questioned.

Method: Before experimental application, out of a total of twenty-one 2-month-old Swiss albino mice, *T. gondii* antibody-free, 14 were infected by intraperitoneal (IP) (n=8) or oral (n=6) inoculation of 2x10² *Toxoplasma gondii* ME49 oocysts. Four months later, fear- and anxiety-related behavioral changes in infected and healthy control groups were comparatively evaluated with plus-maze test. At the end of the experiment (45 day after inoculation), euthanasia was carried out on all mice and their brains were examined histopathologically and immunohistochemically for the presence of *T.gondii* tissue cysts.

Results: Infected mice had low levels of anxiety, they have entered the open arms more frequently and have spent more time in the open arms of the maze compared to controls. Pathologically, in the infected group, high rates of gliosis, perivascular cell infiltration, meningitis, and neuron necrosis were observed especially in the parietal and temporal lobes, cornu ammonis, amygdala, and thalamus compared to the other parts of the brain. A higher number of tissue cyst formations were positively correlated with the lesion severity in these parts of the brain.

Conclusion: It can be suggested that, tissue cysts and neuropathological changes in chronically infected mice brains have direct concern with behavioral manipulation which results from low anxiety levels. (*Archives of Neuropsychiatry* 2012; 49: 139-144)

Key words: *Toxoplasma gondii*, mice, tissue cyst, behavior

Conflict of interest:

The authors reported no conflict of interest related to this article.

Giriş

Toxoplasma gondii, kedilerin son konak, tüm sıcakkanlı hayvanların ara konak olduğu koksidian bir parazittir (1). Dünya nüfusunun neredeyse üçte birlik bölümünün "*Toxoplasma gondii*" ile enfekte olduğu bilinmektedir (2). Etkenin kompleks yaşam döngüsünde yer alan eşeyli üreme yalnızca kedigillerin

ince bağırsağında oluşurken, eşeysiz üreme fazı insan, kedi ve kanatlıların dahil olduğu tüm sıcak kanlı hayvanlarda meydana gelir (3). İmmün yetmezliği olmayan canlılarda hastalık subklinik formda seyreder ve beyin, kalp, iskelet kaslarında akut enfeksiyonu takiben doku kisti formları gelişir (4). Parazit son konağa başlıca karnivorizm yoluyla bulaşır ve toksoplazmozlu ara konak konumundaki fare, sıçan gibi canlılarda son

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Orhan Murat Koçak, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Psikiyatri Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

E-posta: orhanmuratkocak@gmail.com **Geliş tarihi/Received:** 28.08.2011 **Kabul tarihi/Accepted:** 12.03.2012

© Nöropsikiyatri Arşivi Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır. / © Archives of Neuropsychiatry, published by Galenos Publishing.

zamanlarda ortaya konulan davranış değişikliklerinin son konak olan kediler tarafından daha kolay avlanmasına yol açtığı düşünülmektedir (5). Parazitizmin en önemli koşullarından birisi, parazitin yerleştiği konağını beslenme, transport, sığınma ve çoğalma gibi konularda kullanabilme yeteneğine sahip olmasıdır (6). Bu noktadan hareketle, davranış manipülasyonu hipotezine göre, parazitlerin konaklarında davranış değişikliklerine yol açarak, bulaşma oranlarını artırmak eğiliminde oldukları öne sürülmektedir (6). *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunda yaşam döngüsünün tamamlanmasında ara konak canlılardan doku kistlerinin yenilerek kediye geçmesi büyük önem taşır (7). Avcıdan kaçma davranışı etkenin yayılmasında en açık engeli teşkil eder ve manipülasyon için birincil hedef konumundadır. Normal koşullarda, parazitin ara konağı olan fare ve sıçanların, kedi idrarı ve kokusundan korkarak o bölgelerden uzak durmaları beklenir. Beyinlerinde parazitin doku kistini taşıyan kronik toksoplazmozlu kemiricilerin, kedilerden korkmaması yönünde bir davranış değişikliği, bu hayvanların kediler tarafından daha kolay avlanmalarını sağlamaktadır (7,8). Kedi idrarına karşı oluşan doğal ve öğrenilmiş korkuya bağlı tepkilerin enfekte kemiricilerde azalmakla kalmadığı, hatta bu hayvanların kokuyu feromon olarak algıladıkları ve seksüel olarak ilgilerinin arttığı ortaya konmuştur (7,8,9,10).

1990'lı yıllarda yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar, latent toksoplazmozun yalnızca kemirgen değil insanlarda da davranışı etkilediğini ortaya koymaktadır (11). İnsanlarda oluşan hastalık tablosunun psikiyatrik hastalıklar ile ilişkili olabileceği hipotezi her geçen gün güçlenmektedir (12). *Toxoplasma gondii* seropozitivitesi gösteren insanlarda, şizofreni görülme sıklığının daha fazla olduğu yapılan seroprevalans çalışmalarıyla ortaya konmuştur (13). Kronik toksoplazmozlu bireylerde davranış bozukluğu (11), psikomotor performansta düşüş (14), trafik kazalarına karışma oranlarında (15,16) ve intihar eğiliminde (17) artış ise diğer eşlik eden davranış değişikliği örnekleridir. Bununla birlikte, insanlarda toksoplazmoz ve psikiyatrik hastalıklar arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar anti-toxoplasma antikollarının varlığına dayandırılmakta ve beyinde doku kisti bulunup bulunmadığı hakkında yeterli bilgi veremediğinden sınırlı düzeyde bağlantı oluşturmaktadır (12). Beyinde parazitin oluşturduğu nöro-immunomodülasyon değişimleri, sinirsel geçiş yolları ve gen ekspresyonları deneysel modellerde çalışılmış fakat etkenin konakta davranış üzerine gösterdiği etkinin patofizyolojik mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (12). Toksoplazmozlu bireylerde, parazit tarafından doğrudan salınan DOPA öncülü tirozin hidroksilaz enzimi ve/veya konak nörotransmitter sekresyonundaki değişiklikler ile davranış değişiklikleri oluşabileceği gibi, yalnızca fiziksel olarak beyinde doku kistlerinin ve yangısal reaksiyonların varlığı, davranışlarda böylesine kompleks ve spesifik değişikliklere yol açabilmek için yeterli olabilmektedir (18,19).

Bu çalışmada; deneysel olarak beyinde *T. gondii* doku kistleri oluşturularak, toksoplazmozlu bireylerde anksiyete ve korku ilişkili davranış değişikliklerinin beyin lezyonları, doku kisti sayısı ve lokalizasyonu ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler

Deney Hayvanları ve Deney Düzeni

Çalışmada, uygulama öncesi kan serumlarında anti-*T. gondii* antikollarının olmadığı gösterilen 21 adet 2 aylık Swiss albino fare kullanıldı. Fareler Tip II long, polikarbon kafesler (Allentown Inc, USA) içerisinde ve her bir kafeste en fazla 5'er fare bulunacak şekilde bakıldı. Bu kafeslerin yerleştirildiği deney hayvanı ünitesi ise 3m³/dk ventilasyon gücüne sahip, 0,1 µm por genişlikli HEPA filtre ile havalandırıldı ve çevre güvenliği sağlandı. Deney süresince farelere ticari kemirgen yemi (Kalecik Yem, Kırıkkale) ad libitum olarak verildi ve şehir şebeke suyu kullanıldı. Tüm hayvan deneyleri Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu kurallarına uyularak yapıldı ve aynı kurulum 17.06.2009 tarih ve 09/34 sayılı izni ile gerçekleştirildi.

Toxoplasma gondii ME49 suşu ookistleri, Dr. Alvaro Freyre McCall, Laboratorio De Toxoplasmosis Departamento De Parasitologia Veterinaria Facultad De Veterinaria Universidad De La Republica Alberto Lasplaces 1550, Montevideo, Uruguay' dan, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün yurtdışından enfektif materyal transferi sertifikası (import licence) ile temin edildi. Ookist süspansiyonu kullanıncaya kadar %2 H₂SO₄ içerisinde + 4 santigrad derecede muhafaza edildi. Deney gruplarına inokülasyon yapılmadan önce fenol red indikatörü içeren %3,3 NaOH ile solusyon sarı ya da renksiz hale gelinceye kadar nötralize edildi. Sonrasında, her ml ookist süspansiyonuna 0,1 mg streptomycin ve 1,000 IU penicillin eklendi. Çalışmada deney grubu olarak kullanılan 14 adet Albino Swiss fare "Farelerde *Toxoplasma gondii* ME49 suşu ile deneysel enfeksiyonda patolojik bulgular, kist lokalizasyonu ve kist büyüklüklerinin incelenmesi" isimli Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans tez çalışmasında oluşturulan deney gruplarının bir bölümünden seçildi (20). Buna göre, sunulan çalışmanın deney grubundaki 14 farenin, 8'ine intraperitoneal (IP) yolla, kalan 6'sına ise oral yolla 2x10² *Toxoplasma gondii* ME49 ookisti verildi. Yedi adet sağlıklı fareye ise oral yolla serum fizyolojik verilerle kontrol grubu olarak kullanıldı. Uygulamadan 4 hafta sonra, yükseltilmiş artı labirente anksiyete ve korku ilişkili davranışları, *T. gondii* enfekte fareler ile kontrol grubu sağlıklı farelerde karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. İnokülasyon sonrası 45'inci gün farelere ötenazi yapılarak, rutin doku takip yöntemleri ile işlenmek üzere beyincik, beyin sapı, orta beyinden geçecek şekilde parasagittal kesitler alındı.

Davranış Deneyleri

Davranış deneyleri için yükseltilmiş artı labirent (YAL) düzeneği kullanıldı (Video 1). YAL; anksiyojenik/anksiyolitik etkiler sonucu oluşan değişimlerin görüntülenmesi ve genel nörobiyolojik araştırmalarda kullanılan bir test düzeneğidir. Kemirgenlerin davranış deneylerinde geniş yer almakla birlikte, farmakolojik ajanların, steroid hormonların anti-anksiyete etkilerini ve anksiyete ilişkili davranışlardan sorumlu beyin alanlarını ve mekanizmalarını tanımlamada yararlanılmaktadır. Yerden 40-70 cm yüksekte bulunan deney düzeneğinde artı şeklinde ikisi açık, ikisi kapalı olmak üzere 4 kol bulunur. Model, terminolojide "tigmotaksi" adı ile anılan, rodentlerin açık kollardan kaçınmaları ve hareketlerini kapalı kollarda sınırlamaları esasına dayalı çalışır (21,22).

Video 1 izle

Her bir fare labirentin orta noktasından kafaları açık kollara bakacak şekilde serbest bırakılarak beş dakika süreyle deneye tabi tutuldu ve deney süresince bir dijital kamera ile kayıt yapıldı. İnokulasyon sonrası dördüncü haftadan itibaren deneyler üçer gün arayla dört kez tekrarlandı. Son olarak, kamera kayıtları değerlendirilerek, açık kolda kalma süresi, açık kola girme sayısı, kapalı kola girme sayısı, herhangi bir koldan diğerine geçiş sayısı parametreleri için veriler kaydedildi.

Histopatolojik İnceleme

Nekropsi sonrası elde edilen beyin dokuları, %10'luk tamponlu formalinde 48-72 saat süreyle tespit edildikten sonra akan çeşme suyu altında 6-8 saat yıkandı. Rutin doku takip işlemlerinde, dereceli alkol (70°, 80°, 90°, 96° ve 99,5°) ve ksilol serilerinde işlem gördükten sonra parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında 3'er adet kesit lamlara alındı. Hematoksiyen ve eozin (HE) ile boyanan kesitler, histopatolojik yönden incelendi ve lezyon şiddetine göre skorlandı. Histopatolojik skorlamada, perivasküler hücre infiltrasyonu; 1-2 sıra +1, 3-5 sıra +2, 5-10 sıra +3, 10 sıra üzeri +4, Gliosis; 3-4 hücre +1, 5-10 hücre +2, 10 hücre üzeri +3, Meningitis; +1 Hafif, +2 Orta, +3 Şiddetli olmak üzere Hermes ve ark. göre yapıldı.

Immunoperoksidaz Teknik ile Dokularda *Toxoplasma gondii* Doku Kistlerinin İncelenmesi

Toxoplasma gondii doku kisti spesifik antikor

İn vitro percoll gradient yöntem ile izole edilen *T. gondii* doku kistleri, homojenize edildikten sonra Tween 80 ile muamele edildi (23). On iki haftalık 2 adet fareye her seferinde 0,2 ml inokulum sırt bölgesine deri altı yolla, birer hafta arayla 5 kez enjekte edildi. Sonrasında farelere etil eter ile derin inhalasyon anestezisi sağlanarak V. Jugularis'den kanları toplandı ve serumları çikarıldıktan sonra doku kisti spesifik poliklonal *Toxoplasma gondii* antikorlu olarak kullanılmak üzere -20° C'de saklandı.

Immunoperoksidaz Teknik

Dokularda *Toxoplasma gondii* antijeninin saptanması amacıyla ticari indirekt immunoperoksidaz streptavidin/biotin immunoperoksidaz kiti (Novacastra, HRP, Katalog no: RE7 110-K, USA) kullanıldı ve tüm uygulamalar kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Buna göre, kesitler üç ksilol serisinde 5'er dakika deparafinize edildi ve saf alkol, %95 ve %70'lik alkol ve distile suda 5'er dakika tutularak rehidrate edildi. Dokular metanolde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitte 15 dakika tutularak endojenaz peroksidad aktivitesi giderildi. %0,1'lik proteinaz K ile 37 C°'de enzimatik sindirilme uygulandı ve protein bloke edici serumda 7 dakika bekletildi. Sonrasında 1/500 dilüsyonda doku kisti antijeni spesifik poliklonal fare anti-*Toxoplasma gondii* antikorlu ile oda ısısında 50 dk süre ile inkübe edildi. Biotinle işaretli sekonder antiserumla 15 dakika, streptavidin-peroksidad enzimi ile 15 dakika tutulduktan sonra renk reaksiyonu için aminoetil karbazol kromojeni ile 15 dakika, karşıt boyama için de Mayer'in hematoksiyeni ile 1-2 dakika süreyle boyamaları yapıldıktan sonra su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı.

Doku Kisti Analizleri

Çalışmada elde edilen immunohistokimyasal bulgular DP25 kamera ataçmanlı Olympus BX51 mikroskop ile görüntülendi. Çekilen mikrofotografılar kaydedildi. DP2 BSW analiz programı kullanılarak, oluşan doku kistlerinin beyincik, beyin sapı ve orta beyin dikkate alınarak yerleşim yerleri ve sayıları kaydedildi.

İstatistik İncelemeler

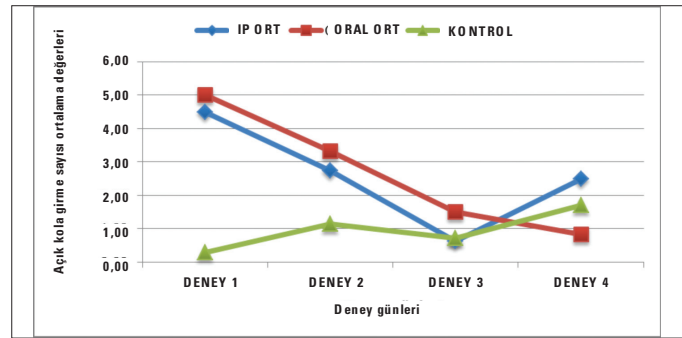
YAL'den elde edilen ölçüm parametreleri (açık kola girme sayısı, kapalı kola girme sayısı, herhangi bir koldan diğerine geçme sayısı ve açık kolda kalma süresi) bağımlı değişken olarak çok değişkenli varyans analizine (MANOVA) ve ayrı ayrı varyans analizine (ANOVA) sokuldu. Gruplar ve deney günleri arasındaki farklar Post-hoc Tukey testi ile yapılan analizlerle ortaya kondu.

Sonuçlar

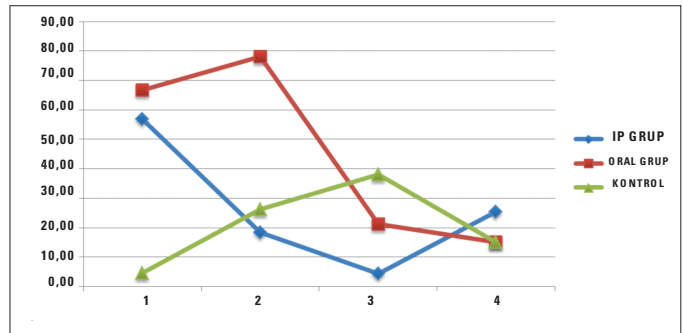
Davranış Deneyleri

Yükseltilmiş artı labirent kullanılarak yapılan davranış deneylerinde, kronik enfekte farelerin kontrol grubuna göre daha düşük oranda anksiyete ve korku belirtileri sergilediği gözlemlendi (Video 2). Grafik 1 ve 2'de deney günlerine göre açık kola girme sayılarına ait ortalama değerler sunulmuştur.

Açık kola girme sayısı, kapalı kola girme sayısı, herhangi bir koldan diğerine geçme sayısı ve açık kolda kalma süresi bağımlı değişken olarak çok değişkenli varyans analizine (MANOVA) sokuldu. Uygulamanın yapıldığı gün ve grup bağımsız değişkenleri oluşturdu. MANOVA grup (FWilks' Lambda (8,138)= 2,683, p=0,009) ve gün (FWilks' Lambda (12, 182,848)= 1,949, p=0,031) ana etkisini ortaya koydu. Anlamlı grup X gün etkileşimi saptanmadı. Dört bağımlı değişken ayrı ayrı varyans analizine (ANOVA) sokulduğunda kapalı kola girme sayısı dışındaki tüm parametrelerin gruplar arasında farklılık gösterdiği saptandı (açık kola girme sayısı için F(2,72)=5,392, p=0,007; kapalı kola girme sayısı için F(2,72)=1,444, p=0,243; herhangi bir koldan diğerine geçme sayısı için F(2,72)=3,155, p=0,049; açık kolda kalma süresi için F(2,72)=3,793, p=0,027). ANOVA sonuçları, benzer şekilde, kapalı kola girme sayısı dışındaki tüm



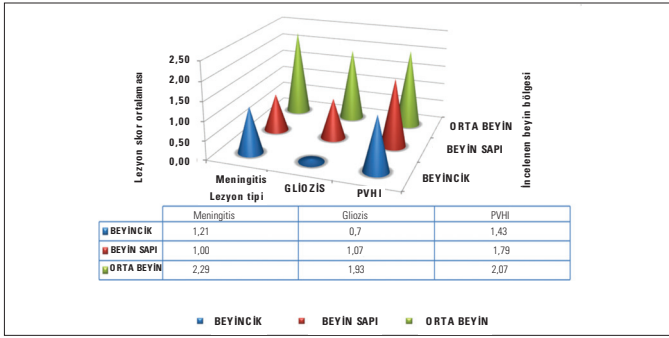
Grafik 1. *Toxoplasma gondii* enfekte (IP ve Oral) ve sağlıklı fare gruplarında açık kola giriş sayıları



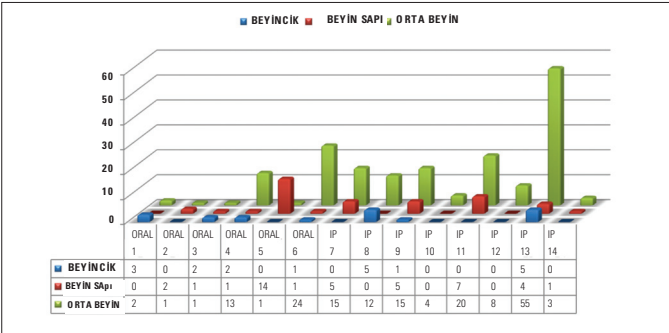
Grafik 2. *Toxoplasma gondii* enfekte (IP ve Oral) ve sağlıklı fare gruplarında açık kolda kalma süreleri

parametrelerde gün bağımsız değişkeni açısından farklılık ortaya koydu (açık kola girme sayısı için $F(3,72)=4.257$, $p=0,008$; kapalı kola girme sayısı için $F(3,72)=2,287$, $p=0,086$; herhangi bir koldan diğerine geçme sayısı için $F(2,72)=2,816$, $p=0,045$; açık kolda kalma süresi için $F(2,72)=3.429$, $p=0,021$).

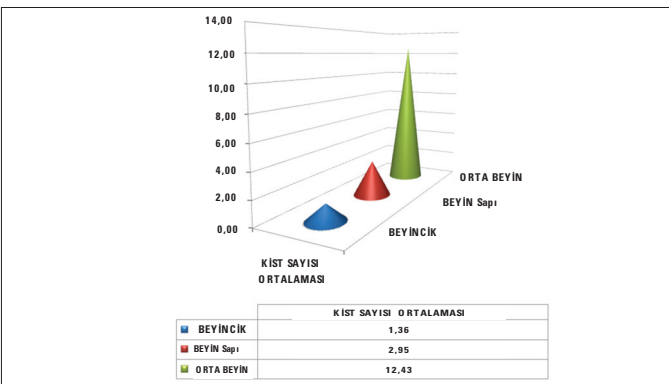
Post-hoc Tukey testi ile yapılan analizlerde grup farkının kontrol grubundan kaynaklandığı gözlemlendi. Bu sonuçlara göre düşük anksiyeteyi yansıtan parametrelerin (açık kola girme sayısı ve açık kolda kalma süresi) enfekte olmayan farelerde (kontrol grubu) daha düşük olduğu saptandı. Yine hareketi yansıtan parametre olan herhangi bir koldan diğerine geçme sayısı da kontrol grubunda daha düşüktü. Tukey testi gün farkının temel olarak birinci gün ile üçüncü gün arasındaki farktan kaynaklandığını gösterdi. İlginç olan, hem açık kola girme sayısı hem de açık kolda kalma süresinin, tüm hayvanlar dikkate alındığında giderek azalıyor olmasıydı. Özellikle enfekte gruplarda, bu parametrelerdeki düşüşten hareketle, uygulamanın



Grafik 3. İncelenen beyin bölgeleri ve oluşan lezyonların skor ortalamaları



Grafik 4. Olgu numaraları (yatay eksen) ve inokulasyon yollarına göre enfekte hayvanlarda üç ayrı beyin bölgesinde oluşan kist sayıları (dikey eksen)

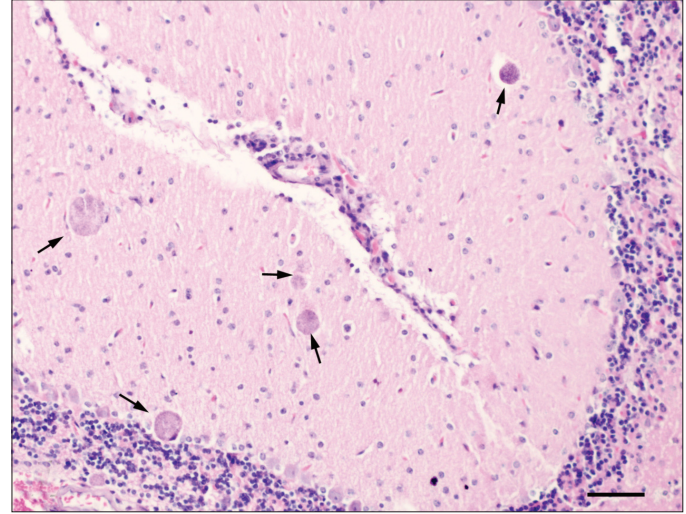


Grafik 5. Enfekte farelerde (n=14) üç ayrı beyin bölgesinde oluşan ortalama *Toxoplasma gondii* doku kisti sayıları

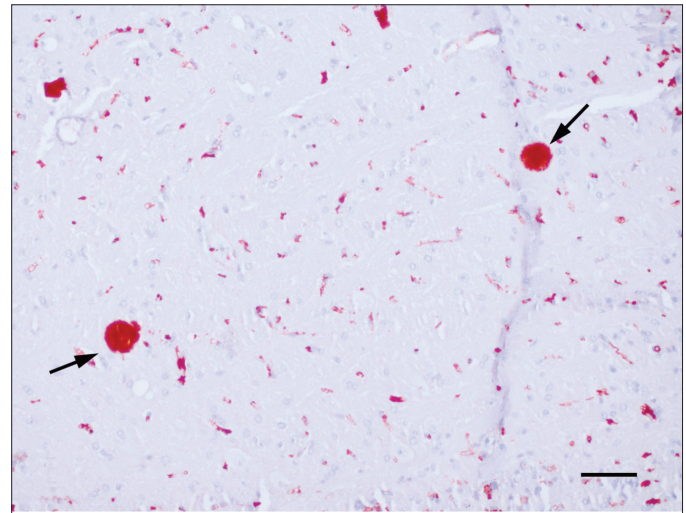
başlangıcına göre sonraki uygulamalarda anksiyetenin arttığı söylenebilir. Bunu destekler nitelikte bir bulgu, yüzde olarak açık kolda kalma sürelerinin bağımlı değişken olarak ANOVA'ya sokulmasıyla elde edilmiştir. ANOVA'ya göre, yüzde olarak açık kolda kalma süreleri açısından, sadece grup X gün etkileşiminin anlamlı olduğu saptanmıştır ($F(6,72)=2,387$, $p=0,037$). Kontrol grubunda bu yüzde uygulamalar ilerledikçe hafifçe artarken, deney grubunda belirgin bir şekilde azalmaktadır (Grafik 2).

Histopatolojik Bulgular

Çalışmada oluşturulan deney grubunda, IP ve oral inokulasyon yapılan fare beyinlerinde birbirine benzer nöropatolojik değişiklikler şekillendi. Başlıca histopatolojik bulgular, perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu, kapillar endotel hipertrofisi, multifokal kanamalar, gliosis, nöron dejenerasyonu ve nekrozu, non-pürülan menenjit ile karakterizydi. Beyinde parietal ve temporal loblar, ammon boynuzu, talamus başta olmak üzere, pons, medulla oblongata, kaudal ve rostral serebral pedünlükte lezyon yerleşimi olduğu gözlemlendi. Beyincik lezyonları daha hafif şiddette olmak üzere



Resim 1. Çok sayıda, etrafında yangısal reaksiyon bulunmayan *Toxoplasma gondii* doku kistleri (oklar). Beyincik, hematoksilin-eozin, bar=50 µm



Resim 2. *Toxoplasma gondii* immunopozitif doku kistleri (oklar). Beyin, fare anti-T.gondii poliklonal antikor, ABC indirekt immunoperoksidaz test, bar=50 µm

yalnızca 8 olguda dikkat çekecek düzeydeydi (Resim 1). Posterior serebral arter etrafında tüm olgularda değişen yoğunlukta mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Bunun yanı sıra, orta beyinde peri ve epitalamik bölgeler, ammon boynuzu ve amigdaloid kompleks bölgelerinde perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları ve gliozisin belirgin derecede daha şiddetli olduğu gözlemlendi. Grafik 3'te beyin değişik bölgelerinde histopatolojik değişikliklerin şiddeti ve yerleşimini yansıtan lezyon skorlaması sunulmuştur. Skorumla sonuçlarında da görülebileceği üzere orta beyin, diğer iki bölgeye göre daha fazla oranda etkilenmiştir.

Immunoperoksidaz incelemelerde; doku kistlerinin incelenen üç beyin bölgesinden orta beyinde, beyin sapı ve beyinciğe göre daha yüksek oranda lokalize olduğu, orta beyindeki kist sayısının daha fazla olduğu görüldü ($p<0,05$) (Resim 2). Kist sayıları ve aritmetik ortalamaları sırasıyla Grafik 4 ve 5'te sunulmuştur.

Tartışma

Bu çalışmada, kronik toksoplazmozlu farelerin YAL deney düzeneğinde, enfekte olmayanlara göre daha yüksek oranda açık kolları tercih ettiği ortaya konulmuştur. Bu durum, doku kistlerinin orta beyinde, beyin sapı ve beyincik bölgelerine oranla çok sayıda lokalize olmasına ($p<0,05$) ve daha fazla miktarda kist sayısına bağlı olarak, kronik enfekte farelerde anksiyete düzeyinin düşük olduğu yönündeki hipotezimizi destekler niteliktedir. *Toxoplasma gondii* ile enfekte farelerde, motor aktivitenin gözlemine yönelik çeşitli çalışmalar daha önceleri yapılmış, ancak farelerde YAL gibi anksiyete düzeneklerinde davranış değişikliklerinin tespitine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır (24).

Nörohistopatolojik değerlendirmede daha önceden gerçekleştirilen in vivo ve in vitro çalışmalar astrositlerin ve nöronların birlikte etkilendiğini fakat astrositlerin daha yüksek oranda enfekte olduğunu ortaya koymaktadır (25,26). Histopatolojik bulgular ise, astrositlerin beyinde *T. gondii* replikasyonu için predominant konak hücre konumunda olduğunu işaret etmektedir (24). Beyindeki yerleşim alanları göz önünde bulundurulduğunda, doku kistlerinin beyinde geniş yelpazede, değişik alanlarda bulunabildiği görülmektedir (8,24,27). Doku kistlerinin beyindeki spesifik ve seçici lokalizasyonu, davranış manipülasyonuna sebep olabilecek potansiyel mekanizmalar içinde direkt etkiler arasında sayılmaktadır (28). Bulbus olfaktorius, amigdala, nükleus akübens, serebral korteks, beyincik, medulla oblongata, bazal gangliyon, hippokampus çevresi gibi bölgelerin etken tarafından daha sıklıkla tercih edildiği önceki çalışmalarda ortaya konmuştur (8,24,29). Bu çalışmada, doku kistleri ve lezyon şiddeti özellikle ammon boynuzu, perihippokampal bölge ve amigdaloid komplekste daha yüksek oranda gözlenmiştir. Hipotalamus, amigdala, medial frontal korteks gibi limbik alanlarda hasar oluşumunun, YAL' de ve sosyal ilişki testlerinde anksiyete oranını düşürdüğü gösterilmiştir (30,31,32). Amigdaloid kompleksin, korku ve endişe duygularının oluşumu ve dışavurumunda direkt rolü olduğu bilinmektedir (33). Nitekim, kronik enfekte kemirgenlerde kedi feromonlarına karşı mevcut olan doğal korkunun bloke olduğu ve

yerini ilgi duymaya bıraktığı, medial ve bazolateral amigdala bölgelerinde doku kisti yoğunluğunun fazla olduğu gözlenmiştir (8). Hipotalamus, amigdala, medial frontal korteks gibi bölgelerin, korku duygusunun denetiminden sorumlu olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu bölgelerde *T. gondii* doku kisti oluşumu ya da buna bağlı şekillenen hücresel yanıtın fizyolojik görevleri etkileyerek bu çalışmada da ortaya konulan davranış değişikliklerinin geliştiğini savunmaktayız.

Davranış değişikliğine sebep olabilecek birçok potansiyel mekanizma sayılırken, enfeksiyon oluşturulan deney gruplarında hayvanlara verilen etken tipi ve miktarının da etkili olabileceğini düşünmek gerekir. Gonzalez ve ark. (24) sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, takizoit kullanılarak enfeksiyon oluşturulmuş ancak farklı dozlarda, farklı davranış değişikliği oluştuğuna dair bulgular elde etmişlerdir. Yüksek dozlu inokulasyonlar (1500 takizoit) genel motor aktivitede düşüşü indüklemiş ve bunun bir sonucu olarak anksiyolitik etkinin ortaya konulması güçleşmiştir. Diğer taraftan Kannan ve ark. (34), farelerde Prugnau ve ME49 suşlarını karşılaştırmış ve *T. gondii* enfeksiyonlarının davranışa etkisinin suşa bağımlı olduğu sonucuna varmışlardır. Fakat suşlar arası farklılık araştırılması, davranış deneyleriyle sınırlı tutulmuş ve histopatolojik bir muayeneye yer verilmemiştir. Sunulan çalışmada, farklı suşlar ve farklı dozlar denenmemiş olsa da ileri de yapılması planlanan çalışmalarda; hem suş-nörohistopatoloji ilişkisi hem de mediatör düzeyleri ile davranış değişikliklerinin karşılaştırılabilir birer parametre olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Böylelikle beyinlerinde doku kisti barındıran bireylerde şekillenen davranış değişikliklerinin, fonksiyonel nörohistopatoloji ile aydınlatılabilmesi mümkün olabilecektir.

Sonuç olarak; *Toxoplasma gondii* ME49 doku kistlerinin orta beyin bölgelerinde selektif olarak yerleşerek, parazitin kendi neslini arttırmak içgüdüğü ile konağın birtakım nörolojik fonksiyonlarını bozduğu ve davranış değişikliklerine sebep olabileceği teorik olarak söylenebilir. Ayrıca deneysel ve kontrollü olarak gerçekleştirilen bu çalışma ile kronik toksoplazmozlu farelerin beyinlerinde şekillenen *T. gondii* doku kistleri ve nöropatolojik değişikliklerin doğrudan anksiyetenin azaltılmasına yönelik davranış manipülasyonu ile ilişkili olduğu görülmektedir.

Kaynaklar

1. Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans. 2th edition. New York: CRC Press; 2010.
2. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004; 363:1965-1976.
3. Miró G, Montoya A, Fisher, Fuentes I. Toxoplasmosis – an update. Ejc 2008; 18:3.
4. Dubey JP. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. Weiss LM., Kim K. editors. *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan. Perspectives and Methods*, Second edition. Great Britain: Academic Press; 2007; s. 1-12.
5. Hrdá S, Votýpka J, Kodým P, Flegr J. Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral changes in mice. J Parasitol 2000; 86:657-663.
6. Thomas F, Adamo S, Moore J. Parasitic manipulation: where are we and where should we go? Behav Processes 2005; 68:185-199.
7. Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. Schizophr Bull 2007; 33:752-756.
8. Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104:6442-6447.

9. Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc Biol Sci* 2000; 267:1591-1594.
10. Lamberton PH, Donnelly CA, Webster JP. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. *Parasitology* 2008; 135:1143-1150.
11. Flegr J. Effects of toxoplasma on human behavior. *Schizophr Bull* 2007; 33:757-760.
12. Fekadu A, Shibre T, Cleare AJ. Toxoplasmosis as a cause for behaviour disorders-overview of evidence and mechanisms. *Folia Parasitol (Praha)* 2010; 57:105-113.
13. Torrey EF, Bartko JJ, Lun ZR, Yolken RH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Bull* 2007; 33:729-736.
14. Havlíček J, Gasová ZG, Smith AP, Zvára K, Flegr J. Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis. *Parasitology* 2001; 122:515-520.
15. Flegr J, Havlíček J, Kodym P, Malý M, Smahel Z. Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: a retrospective case-control study. *BMC Infect Dis* 2002; 2:11.
16. Yereli K, Balçioğlu IC, Özbilgin A. Is *Toxoplasma gondii* a potential risk for traffic accidents in Turkey? *Forensic Sci Int* 2006; 163:34-37.
17. Yagmur F, Yazar S, Temel HO, Cavusoglu M. May *Toxoplasma gondii* increase suicide attempt-preliminary results in Turkish subjects? *Forensic Sci Int* 2010; 199:15-17.
18. Vyas A, Kim SK, Sapolsky RM. The effects of toxoplasma infection on rodent behavior are dependent on dose of the stimulus. *Neuroscience* 2007; 148:342-348.
19. Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr Bull* 2007; 33:745-751.
20. Büyükkayaer S. Farelerde *Toxoplasma gondii* Me49 suşu ile deneysel enfeksiyonda patolojik bulgular, kist lokalizasyonu ve kist büyüklüklerinin incelenmesi. Kırıkkale: Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2010.
21. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14:149-167.
22. Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29:493-498.
23. Omata Y, Kawano T, Ohsawa T, Sugaya S, Satake M, Isamida T, Koyama T, Taka A, Miyazawa K, Takagi M, Saito A, Toyoda Y. Infectivity of feline enteroepithelial stages of *Toxoplasma gondii* isolated by Percoll-density gradient centrifugation. *Vet Parasitol* 1999; 82:211-215.
24. Gonzalez LE, Rojnik B, Urrea F, Urdaneta H, Petrosino P, Colasante C, Pino S, Hernandez L. *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats: A behavioral analysis. *Behav Brain Res* 2007; 177:70-79.
25. Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55:1150-1156.
26. Peterson PK, Gekker G, Hu S, Chao CC. Intracellular survival and multiplication of *Toxoplasma gondii* in astrocytes. *J Infect Dis* 1993; 168:1472-1478.
27. Webster JP, Lamberton PH, Donnelly CA, Torrey EF. Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proc Biol Sci* 2006; 273:1023-1030.
28. Webster JP, McConkey GA. *Toxoplasma gondii*-altered host behaviour: clues as to mechanism of action. *Folia Parasitol (Praha)* 2010; 57:95-104.
29. Di Cristina M, Marocco D, Galizi R, Proietti C, Spaccapelo R, Crisanti A. Temporal and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* differentiation into Bradyzoites and tissue cyst formation in vivo. *Infect Immun* 2008; 76:3491-3501.
30. File SE, Gonzalez LE, Gallant R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology* 1998; 19:397-405.
31. File SE, Gonzalez LE, Gallant R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21:312-320.
32. Rangel A, Gonzalez LE, Villarreal V, Hernandez L. Anxiolysis followed by anxiogenesis relates to coping and corticosterone after medial prefrontal cortical damage in rats. *Brain Res* 2003; 992:96-103.
33. LeDoux J. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 2003; 23:727-738.
34. Kannan G, Moldovan K, Xiao JC, Yolken RH, Jones-Brando L, Pletnikov MV. *Toxoplasma gondii* strain-dependent effects on mouse behaviour. *Folia Parasitol (Praha)* 2010; 57:151-155.



Video 1



Video 2