

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİBİYOTİK G 418'İN
TOXOPLASMA GONDII ÜZERİNE ETKİSİNİN
İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**HAZIRLAYAN
Vet. Hek.
Damla OKATAN**

**VETERİNER FAKÜLTESİ
KLİNİK ÖNCESİ BİLİMLER BÖLÜMÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Oğuz KUL**

2017 – KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

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

Tez Savunma Tarihi: 20 / 04 /2017

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

Prof. Dr.
Meral AYDENİZÖZ
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Üye

Yrd. Doç. Dr
Hüseyin CİHAN
Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
ÖNSÖZ.....	1
SİMGELER VE KISALTMALAR	2
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ.....	4
1.1. Takizoitler.....	5
1.2. Bradizoit ve Doku Kistleri	7
1.3. Oosistler	8
1.4. Yaşam Çemberi	8
1.5. Epidemiyoloji.....	9
1.6. Bulaşma ve Yayılım.....	12
1.7. Toksoplazmoz Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler	13
1.7.1. Sulfadiazine	13
1.7.2. Primethamine	14
1.7.3. G-418.....	16
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	19
2.1. Hücre Kültürü ve <i>T.gondi</i> RH suşuna bakılması.....	19
2.1.1. Materyal temini ve kullanımı:	19
2.1.2. Besiyeri Hazırlama - Vero-6 Hücre Serisinin Pasajlanması	19
2.1.3. Hücrelerin Kaldırılması	20
2.1.4. MTT için Hücre Hattının Hazırlanması;	21
2.1.5. Uygulanışı.....	22
2.2.2. Primethamine	24
2.2.3. G-418.....	24
2.3. RH Suşunun Vero-6 Hücrelerine Ekilmesi Ve Parazit Aktivasyonunun Antibiyotikle Etkileşimi Ardından Görüntülenmesi	25
3. BULGULAR.....	28

3.1. Elisa Reader’da okunan verilere göre oluşturulmuş tabloların grafiklerle ifade edilmesi	28
3.2. Proliferasyon İndeksinin Belirlenmesi.....	32
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	34
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	57



ÖNSÖZ

28 yıl boyunca maddi ve manevi her türlü desteği ile arkamda duran, eğitim öğrenimimde sonsuz emeğini esirgemeyen annem, babam ve canım kardeşime, Engin bilgilerini benimle paylaşıp yetişmemde emeği geçen Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Danışmanım; Prof. Dr. Oğuz KUL ve ikinci ailem olarak gördüğüm çok değerli eşi Doç. Dr. Bengi Çınar KUL'a,

Her türlü destek ve katkılarından dolayı, tecrübeleri ile bana ışık olan Patoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Araştırma Görevlisi arkadaşım Sn; Tuğçe SÜMER'e,

Her daim yanımda olan ve manevi desteği ile her zaman desteğini hissettiren ev arkadaşım Şeyda TÜRKER'e,

Yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve doktora öğrencilerine teşekkürlerimi borç bilirim.

Veteriner Hekim

Damla OKATAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma ve Simge : Açıklama

' : Dakika

" : Saniye

μm : Mikrometre

B : Blastocidin S-HCL

BÇ (BP) : Baz Çifti

CO₂ : Karbondioksit

DMEM : Modifiye Eagle Medium (EMEM'e Dulbecco modifikasyonu)

DMSO : Dimetilsülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

Dulbecco's PBS : Dulbecco's Balanced Salt Solution

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

FBS : Fetal bovine serum

FCS : Fetal calf serum

FITC : Fluorescein isothiocyanate

G : G418

G 418 : Geneticin

Gtt : Gutta (damla)

Mid50 : %50'sini enfekte etmek için gerekli doz

ml : Mililitre

mm	: Milimetre
MTT	: 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue
nm	: Nanometre
PABA	: Para Amino Benzoik Asit
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pri	: Primethamine
PV	: Parazitofor Vakuol
RNA	: Reoksiribonükleikasit
S	: Sülfadiazine
TR	: Texas Red
<i>T. gondii</i>	: Toxoplasma gondii
XTT	: 2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sülfophenyl]-2H-tetrazolium -5- carboxanilide iner salt
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

ÖZET

Toksoplazmoz insanların da arasında bulunduğu tüm memeli hayvanlar ve kanatlılarda enfeksiyon oluşturabilen protozoan bir parazittir. Toksoplazmozisin yaygınlığı, konak immunitesi ile karşılıklı kurduğu ılımlı bir enfeksiyon dengesi nedeniyle tahmin edilenin üzerinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle ölümcül toksoplazmoz olgularının çoğunda virüent *T.gondii* suşları rol alırken, daha düşük virulense sahip suşlarla konağın hayatı boyunca devam eden subklinik formda seyrederek. Primatlar, koyun ve keçilerde *T.gondii* plasental bariyeri geçerek abort ve yenidoğan enfeksiyonuna yol açabilmektedir. Sığırlarda toksoplazmozise karşı tür düzeyinde direnç olduğu bildirilmiştir. Günümüzde toksoplazmozun standart tedavisinde kullanılan antibiyotikler; primethamine- sülfadiazine kombinasyonu, spiramisin ve klindamisinidir. Alternatif tedavide ise primethamine ile yeni makrolidlerin kombinasyonu veya trimethoprime sulfametoksazol kullanılmaktadır. Son yıllarda, üzerinde çalışmaların yoğunlaştığı yeni makrolid grubu antibiyotiklerin doku kistlerine de etki edebileceği üzerinde durulmaktadır. Gebelik döneminde, toksoplazmozis tanısı alan bireylerde izlenecek tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır ve hem yavru hem de anne için güvenilir ve en az yan etkiye sahip ilaçla tedavi seçenekleri aranmasına halen devam edilmektedir. İnsanlarda en yaygın kullanılan antibiyotik tedavisi sulfonamid ve trimetoprim kombinasyonudur, ancak uzun süreli kullanımında yavruda folat eksikliğine yolaçmaktadır. Özellikle erişkin göz toksoplazmozunda olduğu kadar konjenital olarak enfekte yeni doğanlar ve

çocukların tedavileri için de daha az toksik ve daha etkili yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada; *T.gondii* tedavisi için, kullanımda olan sülfadiazine ve trimetoprime ile yeni bir makrolid antibiyotik olan G418 karşılaştırılarak daha az toksik ve daha etkili alternatif tedavi ajanı bulunması amaçlanmıştır. Bu çalışmada; öncelikle Vero-6 hücre kültürü hattında, konak hücreye zarar vermeyecek her bir antibiyotik dozu sitotoksosite testi (MTT) ile belirlenmiştir. Sonrasında ise *T. gondii*'nin RH suşu ile enfekte edilen hücre kültürüne uygulanarak ilaç etkinliğinin ortaya konulması amacıyla parazit proliferasyon indeksi, invazyon derecesi ve parazit sayısı; May Grunwald giemsa ve immunositolojik olarak anti-*T.gondii* antikorları ile işaretlendikten sonra floresan mikroskopta görüntülendi. Sülfadiazine, Trimetoprim ile G418 etken maddelerinin in-vitro *T. gondii* üzerine etkisinin hangi düzeyde olduğu ve tedavi amacı ile güvenle kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldığında; G418'in, *T.gondii* RH suşu takizoitlerine karşı daha etkili ve hücre üzerinde daha az toksik olabileceği gösterildi. MTT sonuçlarına göre verileri ile, yapılacak yeni çalışmalarda kullanılabilme olanağını düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler:

T.gondii, RH, Hücre Kültürü, antibiyotik, in-vitro

SUMMARY

Toxoplasmosis is a protozoan parasite that can infect all mammals and poultry, including humans. The prevalence of toxoplasmosis is above predicted due to a moderate level of infection balance established by host immunity.

For this reason, virulent *T. gondii* strains play a role in the majority of deadly toxoplasmosis cases, while they live in a subclinical form that continues throughout life with strains with lower virulence. In primates, sheep and goats, the *T. gondii* placental barrier can lead to abortion and newborn infections. It has been reported that there is resistance at the species level against toxoplasmosis in cattle. Antibiotics currently used in the standard treatment of toxoplasmosis; Primethamine-sulfadiazine combination, spiramycin and clindamycin. In the alternative treatment, a combination of primethamine and new macrolides or trimethoprim sulfamethoxazole is used. In recent years, it has been emphasized that the new macrolide group of intensive work on antibiotics can also affect tissue cysts. In pregnancy, the treatment options to be followed in toddlers who are diagnosed with toxoplasmosis are very limited, and the options for medication with reliable and least side effects for both the offspring and the mother are still being sought. The most commonly used antibiotic treatment in humans is the combination of sulfonamide and trimethoprim, but it causes the folate deficiency to grow slowly over a long period of time. Especially in adult eye toxoplasmosis, congenital infected newborns and less toxic and more effective new medicines are needed for the treatment of children.

In this study; For the treatment of *T. gondii*, it was aimed to find a less toxic and more effective alternative treatment agent by comparing G418, a new macrolide antibiotic, with sulfadiazine and trimethoprim in use. In this study; First, each antibiotic that will not harm the host cell in the Vero-6 cell culture line was determined by the desensitization cytotoxicity test (MTT). Subsequently, the *T. gondii* was administered to RH cultured strain of cultured cell line to determine drug activity, the number of parasite proliferation index, the level of invasion and the

number of parasites; May Grunwald was exposed and immunocytochemically labeled with anti-*T. gondii* antibodies, then visualized on a fluorescence microscope. When the effects of sulfadiazine, trimethoprim and G418 agents on in vitro *T. gondii* are investigated to determine the level of effectiveness and whether they can be used safely with the intended purpose; G418 has been shown to be more effective against *T. gondii* RH strain tachyzoites and less toxic on the cell. Based on data from MTT results, it is possible to use it in new studies to be done.

1. GİRİŞ

Toksoplazmozis; *Apicomplexa* filumunda yer alan ve hücre içi zorunlu protozoan bir parazit olan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)'nin oluşturduğu, tüm dünyada memeli ve kanatlıları etkileyen zoonoz bir hastalıktır (Remington ve ark, 2001). *T. gondii*'nin ara konağı olan canlılarda enfektif 3 formu bulunmaktadır. Bunlar; takizoit, bradizoit ve doku kistleridir.

***Toxoplasma gondii* 'nin taksonomisi**

Kökaltı: Apicomplexa

Sınıf: Sporozoasida

Takım: Eucoccidiorida

Suborder: Eimeriorina

Aile: Eimeriidae

Cins: *Toxoplasma*

Tür: *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii'nin ara konak olan insanlarda enfektif 3 formu bulunmaktadır. Bunlar; takizoit, bradizoit ve doku kistleridir. Aynı zamanda konak dışında dirençli oosist evresi de mevcuttur (Dubey, Lindsay ve ark, 1998).

Eşeysiz çoğalan bireylerde veya gruplarda takizoitler, doku kistleri içerisinde bradizoitler ve oosistler içerisinde sporozoitler bulunur (Dubey ve ark, 1998).

1.1.Takizoitler

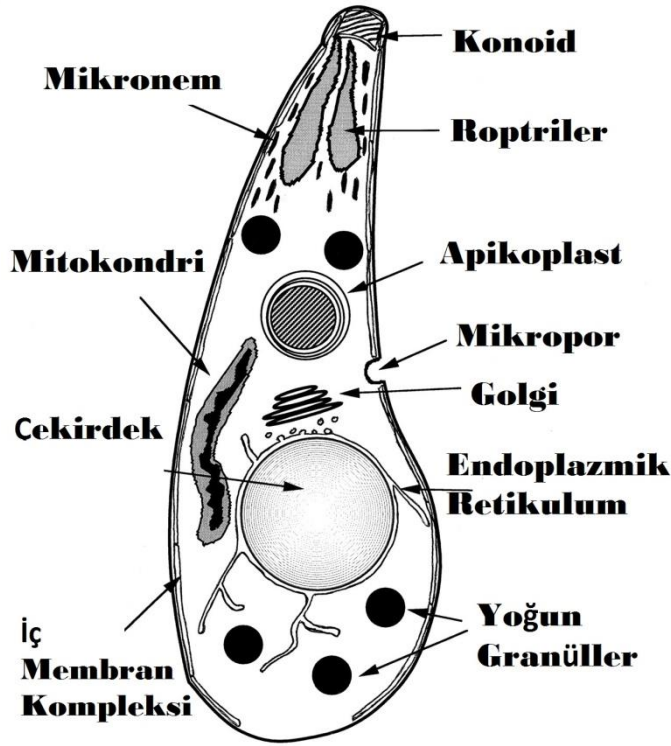
Çok hızlı büyüme özelliğine sahip olduklarından, yunanca hızlı anlamına gelen ‘‘tachos’’ tan ismini almışlardır (Frenkel, 1973). Öncesinde de beslenme anlamına gelen ‘‘trophicos’’ trafozoid terimi kullanılmıştır.

Ara konaklarda nonintestinal epitelyal hücrelerde endodiyogeni ile çoğalırlar ve endozoit olarak da adlandırılırlar (Frenkel,1973).

Takizoitler, 2-6 mikrometre (μm) büyüklüğünde, bir ucu sivri, diğer ucu yuvarlak, genellikle hilal şeklinde bazen oval olabilen yapılardır. İç yapılarında; pellikül, apikal halka, kutup halkası, konoid, roptri, mikronem, mikropor, mitokondri, subpeliküler mikrotüpler, granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum, golgi aygıtı, ribozom, çekirdek, yoğun granüller, amilopektin granülleri, çekirdekçik gibi çeşitli organel ve iç detaya sahiptirler (de Souza ve ark, 1978-1997;Köhler ve ark, 1968; Shelfield ve ark, 1968;Vivier ve ark, 1972;Iwasaki ve ark, 2004).

Kayma, dönme, bükülme, dalgalanma hareketi yapabilmelerine rağmen takizoitlerin, pseudopod, flagella, silyum gibi aktif hareket organları bulunmamaktadır. Konoid,

roptirler, mikronem ve mikroporları sayesinde konak hücre yüzeyine penetrasyonlarını sağlarlar. İhtiva ettikleri proteolitik enzimler ile hücre duvarını eriterek aktif hareket yaparak hücre içerisine yerleşirler. Sitozom benzeri yapı gösteren mikroporları sayesinde pellicülün dış membranına çıkıntı yaparlar. Konak hücreye aktif penetrasyon veya fagositoz ile girerler ve parazitofor vakuol (PV) oluştururlar (Chiappino ve ark, 1984;Bonhomme ve ark, 1992;Dubremetz ve ark, 1993;Joiner ve ark 1993;Marisaki ve ark, 1995;Nichols ve ark, 1981-1983;Sibley, 1995;Speer ve ark, 1997;Werk, 1985;Dubey ve ark, 1998).



Şekil 1: *Toxoplasma gondii* 'ye ait hüresel organeller gösterilmektedir (Erişim: <http://etallcorp.xpg.uol.com.br/toxoplas.htm>).

Hücre içerisinde endodiyojeni ile aseksüel olarak çoğalıp, yaklaşık 4-6 saatlik bölünme periyoduyla birlikte, herbir bölünme sonrasında mevcut sayılarının iki katına (2^n) ulaşırlar. Bir hücre içerisindeki sayıları 16 ve üzerine çıktığında apikal

kompleks nükleusa dönük olacak şekilde rozet şeklinde dizilirler. Takizoit ile dolan sitoplazma büyür ve 32-64 takizoit içerdiğinde hücre rupture olur (Shelfield, 1970).

Konak hücreye giriş yapan takizoitler, lag periyodu geçirirler. Bu ölü periyodun süresini parazitin suşu belirler. Örneğin; farelerin virulent suşu hücre kültüründe avirulent suşundan çok daha hızlı gelişim göstermektedir (Appelford ve ark, 1997).

T. gondii; genomik açıdan Tip I, Tip II, Tip III olarak klasifiye edilmesine rağmen (Howe ve ark, 1995),(Johnson, 1994),(Sibley ve ark, 1992); sezilebilir bir yapı farklılığı izole edilememiştir (Dubey ve ark, 1998).

1.2. Bradizoit ve Doku Kistleri

Yavaş gelişim gösterdikleri için yunanca yavaş anlamına gelen “brady” den isimlerini almışlardır. Sistozoit olarak da bilinirler(Frenkel, 1973).

Bradizoitlerin endodiyojeni ile bölünmesiyle büyüyen doku kistleri, intrasellüler olarak gelişim gösterirler. Genç doku kisteri 2 bradizoit içerir ve 5µm çapında iken; olgun olanlar yüzlerce organizmaya sahiptir ve çapları 70-100 mikrometre arasında değişir (Ferguson ve ark,1987), (Dubey ve ark, 1977-1993).

Doku kistleri akciğer, karaciğer, böbrek gibi viseral organlarda yerleşim gösterebilirlerse de en çok affiniteyi beyin, göz, iskelet ve kalp kasına duyarlar

(Dubey, 1988).Yıkımlanmamış doku kistleri; konakta hasara sebep olmaz, persiste olarak canlılıklarını sürdürür ve immun yanıtı uyarılmazlar (Dubey ve ark, 1998).

Bradizoitler takizoitlerden daha ince olmalarına rağmen, proteolitik enzimlerin yıkımına daha dayanıklıdırlar (Jacobs ve ark, 1960).

1.3.Oosistler

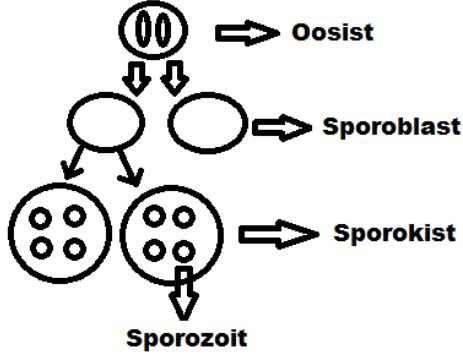
T.gondii son konak (kedi ve kedigillerin) bağırsak epitelinde 5 aseksüel şizogoni aşaması geçirdikten sonra (Shelfield, 1970); merozoide dönüşür, sonrasında da sporulasyon geçirerek oosist olarak dışkı ile atılır(Dubey ve ark, 1996-1976-1989),(Ferguson, 1974).

Doku kistlerinin alimenter yolla alınmasından sonraki prepatent süre 3-10 gündür. Oosistler için bu 18, takizoitler için 13 gün sürer (Dubey ve ark, 1998).

Kedilerin; %30'undan daha azı takizoit veya oosisti aldıktan sonra oosisti saçmalarına rağmen, hemen hepsi doku kistini aldıktan sonra saçım yapar(Dubey, 1976-1996).

1.4.Yaşam Çemberi

Oosistlerin enfektif hale gelebilmeleri için sporulasyon geçirerek olgunlaşmaları gereklidir. Seksüel sporogoni adı verilen bu aşama 4-38 °C’de, 2-21 gün arasında değişmektedir (Omura ve ark, 2004;Trierney ve ark, 2001).



Şekil 2: Oosistlerin gelişimi ile sporoblast, sporokist, sporozoit oluşumunun şematik gösterilmesi.

Öncesinde gametogenesis ile makrogamet-mikrogamet oluşumu, bunların döllenmesi ile de zigot oluşumu görülür. Zigot; olgunlaşmamış oosistir ve sporulasyon geçirerek olgun oosistleri oluşturur (Ferguson ve ark, 1974).

1.5.Epidemiyoloji

Türkiye’de ilk toksoplazmozis raporu 1950’de Akçay ve ark. tarafınan bir köpekte, 1953’te de Unat ve ark. tarafından bir insanda bildirilmiştir (Yaşarol, 1983).

Avrupa’da hastalık açısından önemli bir kaynak olan kedilerde yapılan seroprevalans hesaplamalarında %10-80 arasında pozitiflik saptanmış ve bu kedilerin %0,1-6’sının oosist saçtığı bildirilmiştir(Tenter ve ark, 2000;Kraus ve ark, 2004).

Ülkemizdeki kedilerde ise %37,5-55,5 seropozitiflik rapor edilirken (İnci ve ark, 1996), (Babür ve ark, 1998), (Eren ve ark, 1998); oosist atımı ile ilgili bir bilgilendirme yapılmamıştır.

Can ve arkadaşları (2014); İzmir bölgesindeki veteriner kliniklerinden topladığı 1121 kedi serumu ile yapılan seroprevalans değerlendirmesinde; 22 izolasyon arasında %86.3 oranında (19 tane) tip 2, %9 oranında Tip 3 (2 tane), %4.5 oranında da (1 tane) Afrika 1 genotipine rastlamıştır.

Ara konaklarda görülen kist formu gıda kaynakları açısından insan sağlığını tehdit etmektedir. Türkiye’de de seropozitivite oranındaki yükseklik tablo 1’de gösterilmiştir.

ARAKONAK	SEROPOZİTİVİTE	LİTERATÜR BİLGİSİ
KOYUN	%33,2-88,7	Babür ve ark, 1996-1997 Yağcı ve ark., 1997), (Babür ve Karaer, 1997), (İnci ve ark, 1999), (Nalbantoğlu ve ark, 1999), (Aktaş ve ark., 2000), (Aslantaş ve Babür, 2000), (Aktaş ve ark, 2000), (Yıldız ve ark., 2000), (Babür ve ark, 2001), (Karatepe ve ark, 2001)(Tütüncü ve ark, 2001), (Aslan ve Babür, 2002), (Çiçek ve ark, 2004), (Paşa ve ark., 2004), (Karatepe ve ark, 2004), (Sevgili ve ark, 2005), (Öncel ve ark, 2005).
KEÇİ	%41,30-63,15	(Babür ve ark., 1997; Babür ve ark., 1999;

		Nalbantoğlu ve ark., 1999; Karatepe ve ark., 2004),
SIğIR	%27,61-70,49	(Eren ve ark., 1997; İnci ve ark. 1999; Aktaş ve ark., 2000; Aslantaş ve Babür, 2000; Yıldız ve ark., 2000; Karatepe ve ark., 2001; Nalbantoğlu ve ark., 2002; Aslan ve Babür, 2002; Çiçek ve Babür, 2002; Karatepe ve ark., 2003),
TEK TIRNAKLI	% 1,80-42,20	(İnci ve ark., 1996; Babür ve ark., 1997;1998; Aktaş ve ark., 1999; Aslantaş ve ark., 2001; Taylan ve ark., 2002; İnci ve ark., 2002; Akça ve ark., 2004; Sevgili ve ark., 2004)
KANATLI	%0,00-12.00	(Babür ve ark., 1998; İnci ve ark., 1998; Babür ve ark., 1999; İnci ve ark., 2002; Bıyıkoğlu ve ark., 2002; İnci ve ark., 2002; Çiçek ve ark., 2004)
KÖPEK	%46,00-85,51	(Çakmak ve ark., 1996; İnci ve ark., 1996; Babür ve ark., 1997; Eren ve ark., 1998; Aktaş ve ark., 1998; Sevinç ve ark., 2000; Örgev ve ark., 2001; İnci ve ark., 2002; Aslantaş ve ark., 2005),

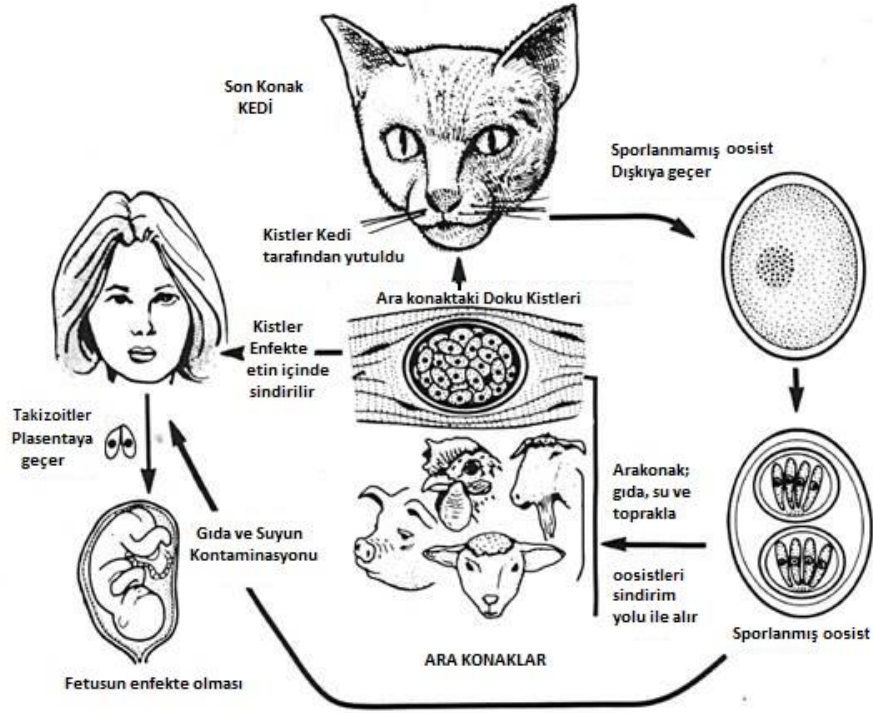
MANDA	%31,13	Çiçek ve ark., 2002
TAVŞAN	%8,00	Babür ve ark., 2000, Nalbantoğlu ve ark, 2010

Tablo 1: Türkiye’de toksoplazmozisin seroprevalansı

1.6.Bulaşma ve Yayılım

1. Oosistlerin alimenter yolla alınması (Fekal-Oral Bulaşma)
2. Doku kistlerinin ve bradizoitlerin bulunduğu ara konakların sindirilmesi
3. Takizoitlerin mide asidine dayanıksız olmalarından dolayı, ancak kontaminasyonu sonucu bulaşma (kan transfüzyonları, çiğ süt tüketimi, konjunktiva ile temas)
4. Transplental bulaşma; enfekte gebelerden konjenital-vertikal yolla fötusa geçtiği bildirilmiştir.

(Levine, 1985),(Dubey ve Beattie, 1988),(Schwartzman, 2001),(Tenker ve ark, 2000),(Kraus ve ark, 2004).



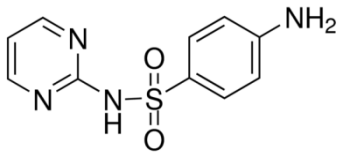
Şekil 3: *T. gondii*'nin yaşam döngüsü ve bulaşma yolları

1.7. Toksoplazmoz Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler

1.7.1. Sulfadiazine

Kimyasal formülü;

4-Amino-N-(2-pyrimidinyl)benzenesulfonamide, N1-(Pyrimidin-2-yl) sulfanilamide



Biyokimyasal yapısı ve fizyolojik etkisi;

Sulfadiazine; dihydropteroate synthase enzimini inhibe eden dihydrofolic acid in sentezini bloke eden sulfonamide grubunda yer alan bir antibiotiktir ve folik asit sentezini sağlamak için gereken bakteriyel inhibitör, para-aminobenzoic acid (PABA) ile kompetetiv olarak çalışır.

Gram pozitif, gram negatif bakterilere ve *Chlamydia* enfeksiyonlarına karşı etkilidir; direnç modu folik asit sentezi için, dihidropteroat sentazın veya alternatif yolun değiştirilmesi yoluyla. Parazitin kendi folik asit sentezini oluşturmasını engelleyerek, nükleik asit oluşumuna engel olmaktadır.

Primethamine ile birlikte kullanıldığında ortaya çıkacak sinerjik etkiden dolayı 10 kat daha etkili olduğu görülmüştür. Bu sebeple kombine kullanılması önerilmektedir.

(erişim;

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s8626?lang=en®ion=TR>)

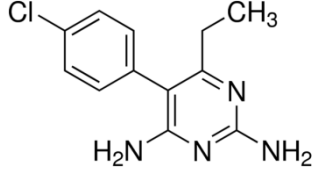
1.7.2. Primethamine

Pyrimethamine (ticari adı; Daraprim) protozoon enfeksiyonlarına karşı kullanılan bir antibiyotiktir. Genellikle sıtma (*Malaria* enfeksiyonları) ya karşı koruma ve tedavi amacı ile kullanılmaktadır.

Edinilmiş bağışıklık sistemi çöküşü sendromlarında destekleyici olarak kullanılmasının yanında, *Toksoplazma gondii* enfeksiyonlarına karşı sülfonamid grubundan sülfadiazine ile birlikte kullanıldığı bilinmektedir.

Kimyasal formülü;

5-(4-Chlorophenyl)-6-ethyl-2,4-pyrimidinediamine



Dihidrofolat redüktaz ile folik asit metabolizmasını inhibe ederek çalışır.

Tetrahidrofolata protozoa dahil bir çok türün, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezi için gereklidir. Ayrıca, amiyotrofik lateral skleroz yer alan bir anahtar proteinin (SOD1), ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir.

Pyrimethamine genellikle sulfonamide ve folinic acid ile birlikte kullanılmaktadır.

Sulfonamide; para aminobenzoik asitten salınan dihydropteroate synthetase enziminin aktivitesini inhibe eder. Bu yüzden; sulfonamidler folik asit sentezi için gerekli olan farklı bir enzimi bloke ederek primetamin ile sinerjik çalışır.

Folinik asit (lökovorin); dihidrofolat redüktaz dayanmadan in vivo olarak, folik asidin birincil aktif formunu tetrahidrofolata dönüştürülen folik asit türevidir. Folinik asit hastada folat eksikliğine bağlı yan etkileri azaltır.

Primetamine karşı direnç yaygındır. Dihidrofolat redüktaz için malarial genindeki mutasyonlar etkinliğini azaltabilir. Bu mutasyonlar hidrojen bağları ve sterik etkileşimler kaybı ile primetamin ve dihidrofolat redüktaz arasındaki kör bağlanma afinitesine azaltır.

Toxoplasma gondii gibi etkenlere karşı uygulanan doz aşımalarında; isiliğin yanı sıra, bulantı, kusma, karın krampları, ağız kuruluğu, kilo kaybı ve ishal gibi gastrointestinal semptomların görülmesine sebep olur.

Ayrıca baş ağrısı, ataksi gibi bulgularla merkezi sinir sisteminin etkilendiği, lökopeni ve anemi gibi semptomlarla da hemorojik yan etkileri olduğu bildirilmiştir.

Folat eksikliği anemisi, epilepsi hastalarında ve gebeliğin birinci trimesterinde olanlarda organogenezisin etkilemesinden dolayı kullanılması uygun değildir.

(erişim: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pyrimethamine>)

1.7.3. G-418

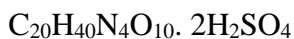
G418 (Geneticin) gentamisin B1 yapısına benzeyen *Micromonospora rhodorangea* tarafından üretilmiş, aminoglikozid yapıda bir antibiyotiktir.

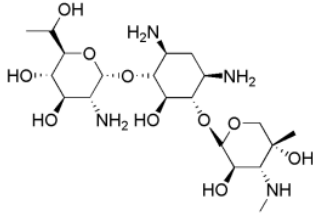
Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda polipeptid sentezinin bloklanmasında uzama adımının inhibasyonundan sorumludur.

G418 direnci, aminoglycoside 3'-phosphotransferase, APH 3' II ile kodlanan Tn5den elde edilen Neomycin resistance gen (neo) ile sağlanır.

Memeli hücrelerinde seçimi, genellikle 400-1000 ug /ml arasında değişen konsantrasyonlarda 3-7 gün içinde elde edilmektedir.

Kimyasal formülü;





1.8.MTT analizi (Hücre sitotoksite Analizi);

MTT ile antibiyotiklerin Vero-6 hücrelerine olan zararının saptanması:

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) yöntemi ile bir hücre grubunda viyabiliteye sahip olan hücreler, kolorimetrik yöntemle analiz edilebilmektedir. Bu metot; sağlam mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır (McGahon AJ. ve ark, 1995).

MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen besiyeri veya tuz solüsyonları ile hazırlandığında sarımsı bir sıvı oluşturur. Tetrazolium halkasının süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanması sonucu MTT mor renkli çözilemeyen formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri ile mümkündür. Oluşan bu formazan izopropil alkol veya başka bir çözücü yardımı ile çözülebilir hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Mosman T,1983).

Sonuç olarak yaşamsal fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renk almakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler renk almamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla aktivasyon ve gelişimi, çökelmiş reaksiyon ürününün çözünebilir hale getirilmesi, reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (Yaka E. ve ark, 2006).

Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel değişken canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleridir. Genellikle; hücre proliferasyonu ve sitotoksitesinin kantitatif olarak saptamada kullanılır. Tetrazolium tuzunun sadece yaşamsal belirti gösteren hücreler tarafından renkli formazanlara redüksiyonu sebebi ile bu yöntem sadece canlı hücrelerin sayılması esasına dayalıdır.

Örneğin MTT içerisinde canlı hücreler renkli, suda çözünmez, formazan tuzu tarafından redüklenir. Formazan kristalleri çözündükten sonra, kısa sürede, pratik bir şekilde klasik mikropate okuyucusunda (maximum absorbans) 570 nanometre(nm) dalga boyunda niceliği belirlenebilir (Doyle A, 1998, Oktar N, 2009).

Çoğalan hücreler, miktarca yoğunluk ve artış göstermeyen hücrelerden metabolik olarak daha çok aktiflik gösterdiği için, bu metotla sadece hücre viyabilitesi ve hücreye toksik etkisi değil, hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir. MTT kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin nicel analizini sağladığından en sık kullanım alanları; sitokinlerin, growth faktörlerinin, medyum bileşenlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinlik düzeyinin analiz edilmesidir (Mosman T,1983).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Hücre Kültürü ve *T.gondi* RH suşuna bakılması

2.1.1. Materyal temini ve kullanımı:

“*Toxoplasma gondii*” RH suşu Refik Saydam Hıfzısıhha Halk Sağlığı Merkezi/Ankara’dan alınan, takizoit ihtiva eden farelerden elde edilmiş olup besi yeri ve Vero-6 içeren flasklara ekimleri yapılmış, pasajları takip edilmiştir.

Farelerden *T.gondii* takizoitlerinin elde edilmesi: Swiss albino cinsi laboratuvar fareleri $2.5-5 \times 10^5$ olacak şekilde hazırlanıp *T. gondii* takizoitleri ile intraperitoneal olarak enfekte edilmiştir. Bu farelerden 48 saat sonunda periton sıvısı ile birlikte beraber tekrar çekilmiştir. Falkona alınan sıvı, 2500 rpm/dk'da 5 dakika santirfüj edilip ve süpernatant atılmış, kalan pelet kullanıma hazır besiyeri ile sulandırılıp takizoitler, thoma lamına aktarılıp, kapatıldıktan sonra, viabilite ve motilite yönünden değerlendirilmiş, ‘Vero-6’ bulunduran 25 ve 75cm³ flasklara ekimleri yapılmış, 3 gün aralıklarla besiyeri değişimleri ve pasajlanması yapılmıştır. Vero-6 hücre serisi, monolayer hücreleri 1:2, hücre:parazit oranıyla enfekte edilmiştir.

2.1.2. Besiyeri Hazırlama - Vero-6 Hücre Serisinin Pasajlanması

Sıvı azot (nitrojen) tankında dondurulmuş olarak 2 mililitre (ml) viyaller içinde muhafaza edilen Vero-6 hücreleri, falkona alınarak hazır besiyeri eklenip santirfüj edildi.

Supernatant atılarak kalan pelet, %89 Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), %10 Fötal buzağı serumu (FCS), %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin), %0,04 Plasmocin (*Mycoplasma* treatment and elimination reagent, invivogen) ile hazırlanan besiyeri ile sulandırılıp 25 ve 75cm³ flasklara ekilerek 37⁰C'de karbondioksitli (CO₂'li) etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Üretilen Vero-6 hücrelerinin bir kısmı kullanılacak olan antibiyotiklerin sitotoksitesinin test edilmesinde kullanılmış, bir kısmı pasaja bırakılarak *Toxoplasma gondii* RH suşu'nun tutunarak üretilmesinde kullanılmıştır.

2.1.3. Hücrelerin Kaldırılması

25 cm³'lük flaskta bulunan Vero-6 hücre hattı, steril phosphate buffer saline (PBS) ile yıkanarak besiyerinde bulunan fötal serumun tripsin ile etkileşime girmesi engellendi.

Flask üzerine 3ml Tripsin-Etilendaimintetraasetikasit (Tripsin-EDTA) eklenerek hücrelerin flasktan kaldırılması sağlandı, 4 dakika CO₂'li etüvde tutulduktan sonra falkona alınıp üzerine tekrar 6ml hazırlanılan besiyeri eklendi.

2500 G devirde 3 dakika santirfüj edildikten sonra supernatant atıldı, tekrar 1 ml besiyeri eklenip, dipte kalan pelet sulandırıldı.

Elde edilen besiyerli hücre karışımından 10 µL alınıp 100 µl Tripan blue 90µl steril PBS ile karıştırılıp (1:20) hücrelerin boyanması sağlandı, thoma lamına konularak sayımı, canlılık oranları hesaplaması yapıldı.

Besiyerli hücre karışımı, 25cm³ lük her bir flaska 10⁵ hücre/ ml gelecek şekilde eşit olarak pay edildi ve 37⁰C'de CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.1.4. MTT için Hücre Hattının Hazırlanması;

XTT ajanının uygulanmasından 1 gün önce 96'lık plak içerisinde her bir kuyucuğa 8.000 Vero-6 hücre hatları gelecek şekilde 100 µl besiyeri ile hücrelerin ekimi yapılarak kuyucuklu pleyt 24 saat 37°C ve %5 CO₂'li etüvde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. Bu yolla tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zararlar ortadan kaldırılmış oldu. Bu protein ve faktörlerin yeniden sentezlenebilmesi için 24 saatlik bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır.

24 saatlik inkübasyonlardan sonra kullanılacak ilaçlar derişimlerine göre; 1µM, 10µM, 100µM, 1000µM olacak şekilde 2şer tekrarlı toplam 3 er adet kuyucuklara eklendi. Tüm madde uygulamalarından sonra hücre hatları 24saat süreli inkübasyonda tutuldu, MTT reaktifi (Cayman Chemical MTT Cell Proliferation Assay Kit, no:10009365) eklenerek 4 saat sonunda kullanılan ilacın sitotoksik etkisi XTT yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Hücreler 24, 48, 72. saatlerde aynı büyüklüklerde 3 kuyucuk olacak şekilde 96'lık mikrolatelerde XTT (2,3,-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-kaboksanilit tuzu) solüsyonu kullanılarak spektrofotometrik ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyundaki geçirgenlik değerinde okutularak kantitatif olarak değerlendirildi.

XTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olmakla beraber canlı hücrede mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimi ile reaksiyona girdiğinde parçalanarak,

çözülebilir formazan kristallerine dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu metabolik olarak aktif hücrelerin yani canlı hücre sayısı ile orantılıdır.

Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplandı. Ortaya çıkan veriler grafikleştirilerek MİD50 dozu belirlenmiş oldu.

2.1.5. Uygulanışı:

Solüsyonların hazırlanması:

- 1) Tahlil tampon tableti 100 ml distile suda çözüldü.(oda sıcaklığında 1 yıl saklanabilir)
- 2) MTT reaktifi 5ml tahlil taponu içinde parlak sarı olana kadar titreşimle karıştırılarak çözüldü. Çözünmeyen kısmı santirfuj veya filtreleme ile atıldı. (Tek sefer kullanılmayacaksa, sonra tekrar kullanmak üzere porsiyonlayıp - 20⁰C'de aylarca muhafaza edilebilir.)
- 3) Kullanmadan hemen önce hazırlanan solüsyon; kristal çözücü solüsyon (SDS), Hidroklorid içinde çözülecek. 96 kuyucuklu pleyt için her bir kuyucuğa 100µl gelecek şekilde konuldu.

Prosedür:

- 1) 96 kuyucuklu pleytte her bir kuyucuğa $5 \times 10^2 - 10^5$ hücre gelecek şekilde 100µl DMEM ile birlikte konularak ve 24-48 saat 37⁰C, CO₂li etüvde inkübasyona bırakıldı.

- 2) 10µl MTT reaktifi eklendi.
- 3) Orbital karıştırıcıda karışması sağlandı.
- 4) 3-4 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. 4 saatin sonunda formazan kristalleri pleytin dibinde karanlık olarak gözlemlendi.
- 5) En son hazırlanan 3 numaralı karışım, 100µl olarak her bir kuyucuğa eklendi ve 4-18 saat inkübasyona bırakıldı.
- 6) İnkübasyon sonunda mor renk veren kristaller 570 nm elisa okuyucu ile okutuldu.

2.2. Antibiyotiklerin seçimi ve karşılaştırılması

2.2.1. Sulfadiazine

Temin edilen firma;

Sigma Aldrich

Çözücüsü;

1 Molar sodyum Hidroksit (NaOH) içerisinde 100 mg çözülebilir.

→ Toksoplazmozis üzerine etkisinin araştırılması için stok solüsyonu 2ml NaOH+0,250g sülfadiazine ile hazırlandı ve 8 ml kullanıma hazır besiyeri eklendi. Pozitif kontrol grubu olarak tutuldu.

Uygulanışı;

Sulfadiazine; çoğunlukla toxoplazmosisde immun sistemi baskılanan hastalar için primethamine ile beraber kullanılan kısa etkili bir antibiyotiktir. Aynı zamanda, yenidoğan ve konjenital enfeksiyonların sağaltımında kullanılır. *Toxoplazma gondii* ile tekrar enfekte olan deney hayvanlarında akut toksoplazmosisin kontrolünde kullanılmıştır.

(erişim;

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s8626?lang=en®ion=TR>)

2.2.2. Primethamine

Temin edilen firma;

Sigma Aldrich

Çözücüsü;

→225 mg primethamine 3,632 ml Dimethylsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü, 5,448 ml kullanıma hazır besiyeri eklendi. Araştırmada kullanılacak stok solüsyonu hazırlandı.

(erişim: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pyrimethamine>)

2.2.3. G-418

Temin edilen firma;

InvivoGen

→1/10, 1/100, 1/1000 ml/ml konsantrasyonları kullanıma hazır besiyeri ile hazırlanmıştır.

ADI	FİRMA/ KODU	Test Edilen Konsantrasyonu
• Sulfadiazine	Sigma / S8626	1/10-1/100-1/1000
• Primethamine	Sigma / 248715814011	1/10-1/100-1/1000
• G 418	Invivogen / ant-gn-1	1/10-1/100-1/1000

Tablo 2: Kullanılan antibiyotiklerin temin edildiği firma kodları ve kullanılan dozları gösterilmiştir.

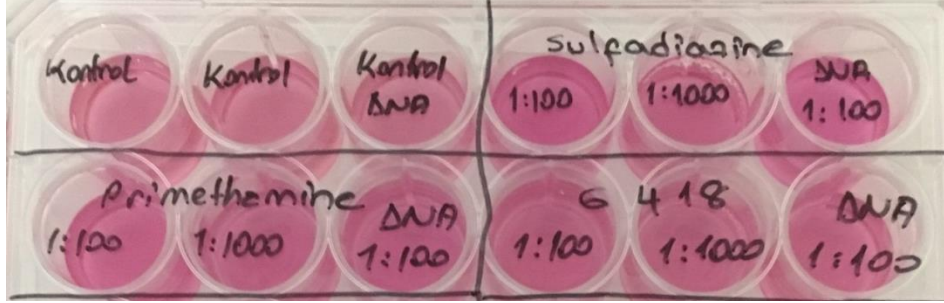
2.3. RH Suşunun Vero-6 Hücrelerine Ekilmesi Ve Parazit Aktivasyonunun Antibiyotikle Etkileşimi Ardından Görüntülenmesi

Vero-6 hücre hattı, 24'lük wellplate'e MTT de belirlenen doz doğrultusunda 100µM ve 1000µM olacak şekilde 2 kuyucuk, ayrıca moleküler incelemelerde kullanılabileceği düşüncesi ile 100 µM lık tek kuyucuk olacak şekilde 3 antibiyotik için toplam 9 kuyucuğa 3 de kontrol tutulacak şekilde ekildi. 24 saat 37⁰C'de CO₂li etüvde inkübasyona bırakıldı.

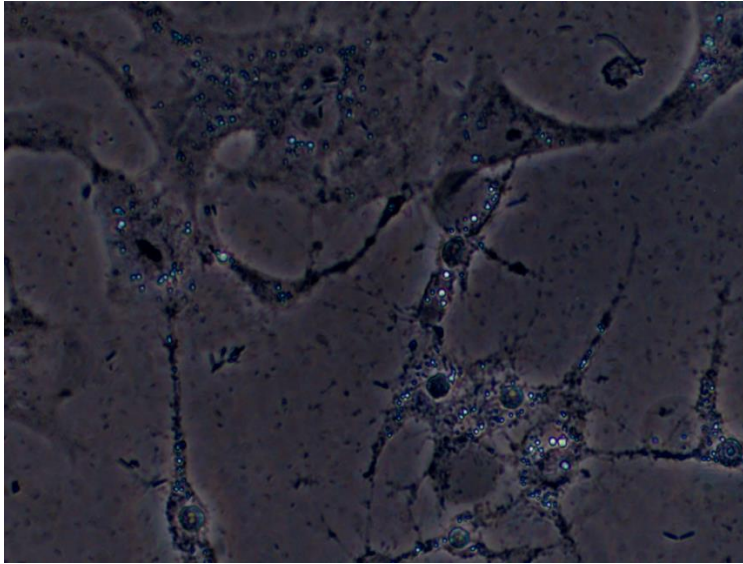
Toxoplasma gondii RH suşu thoma lamında tripan blue ile boyanıp sayılarak; 1:2, hücre:parazit oranında enfekte edilip bir gece inkübasyona bırakılıp, ardından 100µM ve 1000µM olacak şekilde antibiyotikleri eklendi. (fotoğraf 2)

3,5 saatlik inkübasyon periyodu sonucunda moleküler incelemeler için ayrılmış olan 100µM'lık kuyucukta bulunan Vero-6+RH+antibiyotik içeriği kazınarak 2 ml'lik

ependorflara alınmış ilerleyen günlerde DNA izolasyonu yapılması için -20°C 'de muhafaza edilmiştir.



Fotoğraf 2: Vero-6 hücre hattı, 24 kuyucuklu pleyte MTT de belirlenen doz doğrultusunda $100\mu\text{M}$ ve $1000\mu\text{M}$ olacak şekilde 2 kuyucuk, ayrıca moleküler incelemelerde kullanılacak olan $100\mu\text{M}$ lık tek kuyucuk olacak şekilde 3 antibiyotik için toplam 9 kuyucuğa 3 de kontrol tutulacak şekilde ekildi. 24 saatlik inkübasyon periyodunun ardından Vero-6:RH 1:2 olacak şekilde ekimi yapıldı.



Fotoğraf 3: Vero-6 hücresi:RH;1:2 oranında enfekte edildikten sonra invert mikroskop (Olympus Trinoküler CKX41 Inverted Mikroskop) ile görüntülenmesi

2.4.İnvazyon Testi

Red/green (kırmızı/yeşil) invazyon testi uygulanmıştır.

200.000 RH takizoiti/ml, 1ml'lik dozlanmış ilaçla eppendorflar içinde 30 dakika bekletildikten sonra, chamberslide'a 24 saat 37⁰C, CO₂'li etüvde inkübe edilmiş olan 100.000 Vero-6/ml Vero-6 hücresi üzerine monolayer olarak supernatantı atılarak ekildi.

45 dakika sonra platelerdeki medium ve serbest parazitler PBS ile yıkanıp ve immunositokimya prosedürüne göre boyama işlemine geçildi.

Formaldehid ile 5 dakika fikzasyonu sağlandı. 10' PBS ile yıkandı. 10' hidrojen peroksit (in %0,3 metanol) ile muamelesi sağlandı. Tekrar 10' PBS ile yıkanarak protein blocking solüsyonu damlatıldı 10' beklendi.

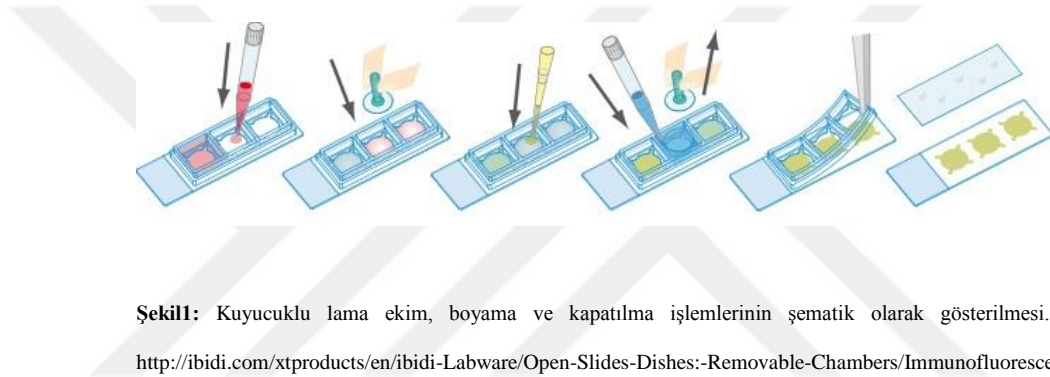
T. gondii için 1/100'lük (Thermo,ab-1) primer antikoru damlatıldı ve +40C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

PBS ile 10' yıkandıktan sonra tekrar protein bloklama solüsyonu damlatıldı 10' bekletildi.

Hücre membranına tutunmuş takizoitler için FITC işaretli anti-toxoplasma gondii (anti rabbit, abcam) antikoru ile işaretlenerek 1 saat oda ısısında karanlıkta muhafaza edildi.

Hücre içine girmiş takizoitler; 5 er dakika metilen ve aseton ile permabilizasyon yapılmış hücrelerde Teksas kırmızısı ile işaretli anti-*Toxoplasma gondii* antikoruna (abcam-TR) ile boyandı. Bir saat karanlıkta inkübe edildikten sonra çekirdek boyası için DAPI kullanılarak kapatıldı.

Görüntüleme floresan mikroskobu altında yapıldı. Boyanma sonunda kırmızı ve yeşil ile floresan ışıltama veren takizoitler enfekte her bir hücre için sayıldı.



Şekil1: Kuyucuklu lama ekim, boyama ve kapatılma işlemlerinin şematik olarak gösterilmesi. (Erişim: <http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-Removable-Chambers/Immunofluorescence-Chambers-Family>)

3. BULGULAR

3.1. Elisa Reader’da okunan verilere göre oluşturulmuş tabloların grafiklerle ifade edilmesi

Vero-6 hücre hattına sitotoksik olup olmadığı yönünden MTT yöntemi ile BiotekPowerWave XS2 Elisa Readerda değerlendirilen G418; rutinde kullanılan makrolid grubu antibiyotiklerden Sulfadiazine ve Trimetoprim ile karşılaştırılmıştır.

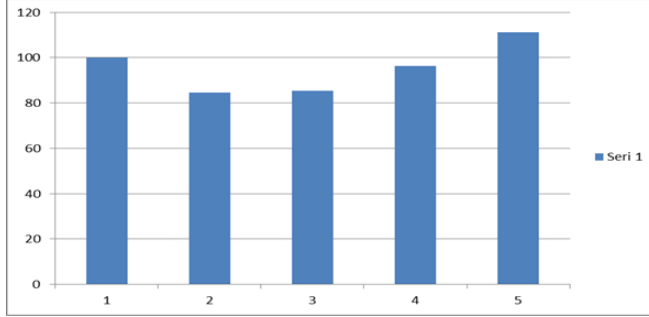
Elisa okuyuda elde edilen veriler doğrultusunda hazırlanan grafikler ile hücreye zarar vermeden, takizoitler üzerinde etkili olan en düşük dozun (MİD50'nin) 100µM olduğuna, bundan sonraki işlemlerde 100µM ve 1000µM'lık dozların kullanılacağına karar verilmiştir.



Fotograf 4: MTT reaktifi eklendikten sonra mor renkli formazan kristalere dönüşümü gözlenmektedir

		SULFADIAZINE KONSANTRASYONLARI			
	KONTROL	s1/1	s1/10	s1/100	s1/1000
I.PLATE	0,99	0,90	0,91	0,94	0,97
2.TEKRAR	0,97	0,96	0,99	0,91	0,96
3.TEKRAR	0,87	0,92	0,90	0,78	0,92
II.PLATE	1	0,90	0,91	0,94	0,98
2.TEKRAR	0,97	0,96	1	0,91	0,96
3.TEKRAR	0,87	0,92	0,91	0,79	0,92
ORT	0,94	0,93	0,93	0,88	0,95
%	100	98,27	99,03	93,14	100,61

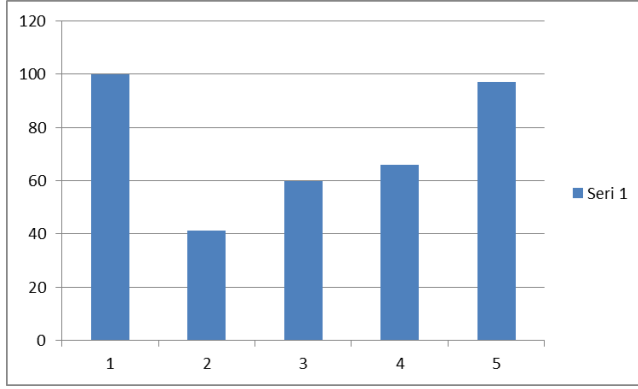
Tablo 2: Sülfadiazine'in hücre toksisitesi üzerindeki etkinliği



Grafik 1: Sülfadiazine'in mid50 dozunun grafik ile gösterilmesi

PRIMETHAMINE KONSANTRASYONLARI					
	KONTROL	PR1/1	PR1/10	PR1/100	PR1/1000
	0,64	0,21	0,33	0,34	0,56
2.TEKRAR	0,57	0,24	0,38	0,35	0,5
3.TEKRAR	0,55	0,28	0,35	0,47	0,66
ORT	0,59	0,24	0,35	0,38	0,57
%	100	41,25	59,81	65,91	97,06

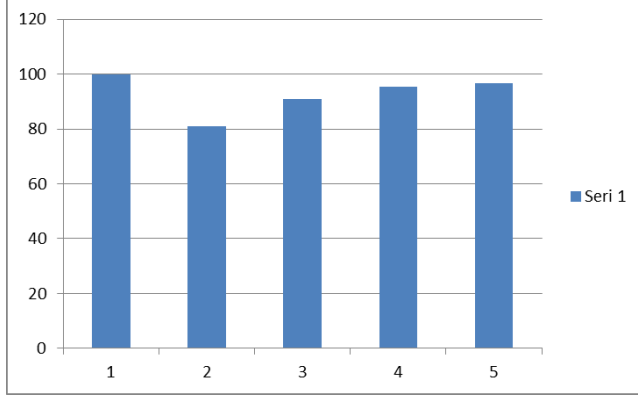
Tablo 3: Primethamine'in hücre toksisitesi üzerindeki etkinliği



Grafik 2: Primethamine'in mid50 dozunun grafik ile gösterilmesi

		G418 KONSANTRASYONLARI			
	KONTROL	G1/1	G1/10	G1/100	G1/1000
I.PLATE	1,08	0,83	0,93	0,97	0,99
2.TEKRAR	1,07	0,88	1	1,07	1,06
3.TEKRAR	1,08	0,90	1,01	1,04	1,06
II.PLATE	1,09	0,84	0,94	0,99	1,01
2.TEKRAR	1,07	0,89	0,99	1,06	1,07
3.TEKRAR	1,08	0,91	1,01	1,04	1,07
ORT.	1,08	0,87	0,98	1,033	1,04
%	100	80,98	90,89	95,33	96,75

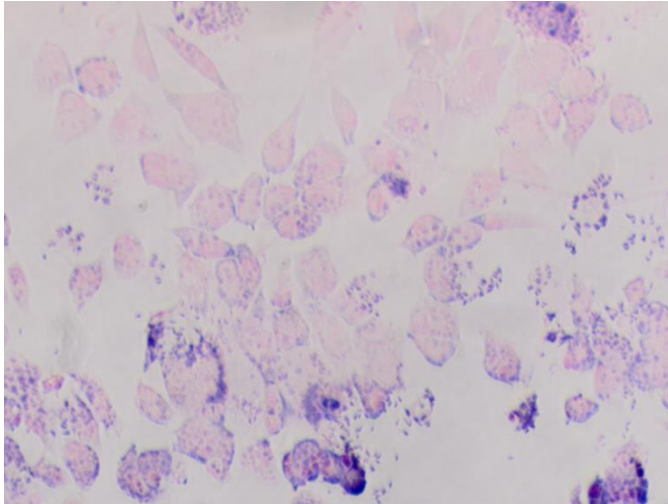
Tablo 4: G418'in hücre toksisitesi üzerindeki etkinliği



Grafik 3: G418'in mid50 dozunun grafik ile gösterilmesi

3.2.Proliferasyon İndeksinin Belirlenmesi

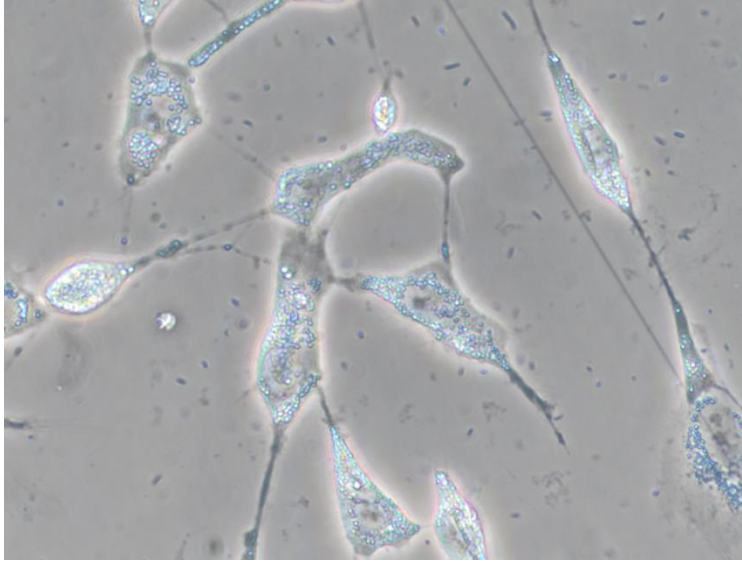
24lü wellplate deki kuyucuklardaki süpernatant çekilerek uzaklaştırılmış. Plate tabanına tutunan antibiyotikli vero-6:RH 1:2 hücreleri metil alkol ile tespit edilmiş, May Grünwald Giemsa (1gtt/1ml, Merck) ile boyanarak gliserin ile, ilaç molaritelerinin, 100 enfekte hücre içerisindeki parazit sayısına olan etkileşimleri ışık mikroskobu altında sayılarak ve kontrol grubu ile karşılaştırılıp fotoğraflanmıştır.



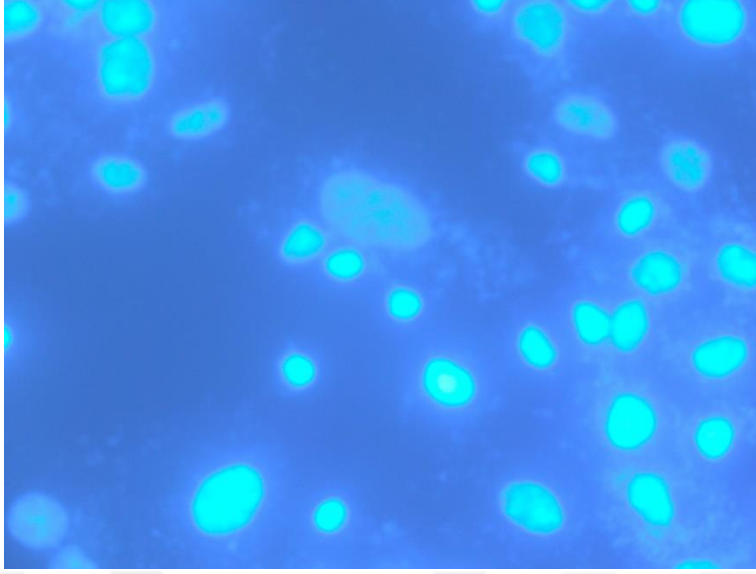
Fotograf 3: G418 grubu ile tedavi edilmiş Vero-6+RH; mor kalıntılar enfeksiyon varlığını, boyanma olmayan alanlar ise G418'in etkinliğini göstermektedir.

Antibiyotik	Enfekte hücre	Toplam hücre	Enfektivite oranı	Antibiyotiğin çalışma %si
Kontrol	145	169	0,85	0,14
Sulfadiazine	216	323	0,66	0,33
G418	126	254	0,49	0,50

Tablo 5: *T. gondii* RH suşu ile enfekte Vero-6 hücrelerine etki eden antibiyotiklerin sayısal olarak gösterilmesi.



Fotograf 4: Immunositokimya öncesi; Invazyon testi için G418 içinde bekletilmiş RH suşunun, Vero-6 hücrelerine aktarılmasından sonra görüntülenmesi.



Fotograf 5: Invazyon testinde immunfloresan boyanma sonucu takizoitlerin hücre içinde yerleşimleri gözlenmiştir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Toksoplazmozis; *Apikompleksa* şubesinde yer alan, koksidiyan, hücre içi zorunlu protozoan olan *T. gondii* tarafından oluşturulan ve dünya çapında etkili zoonoz bir hastalıktır. Türkiye’de toksoplazmozis oldukça yaygın bir epidemiyolojiye sahiptir. Türkiye’de ilk toksoplazmozis raporu 1950’de Akçay ve ark. tarafınan bir köpekte, 1953’te de Unat ve ark. tarafından bir insanda bildirilmiştir (Yaşarol, 1983). Kedilerde ise %37,5-55,5 seropozitiflik rapor edilmiştir (İnci ve ark, 1996), (Babür ve ark, 1998), (Eren ve ark, 1998). Güncel olarak; Can ve arkadaşları (2014); İzmir bölgesindeki veteriner kliniklerinden topladığı 1121 kedi serumu ile yapılan seroprevalans değerlendirmesinde; 22 izolasyon arasında %86.3 oranında (19 tane) tip II, %9 oranında Tip III (2 tane), %4.5 oranında da (1 tane) Afrika I genotipine rastlamışlardır. Ülkemizde kedilerde görülen *T. gondii* serotiplerinin tanımlanması açısından oldukça önemli bulgular içeren bu çalışma sonuçları, özellikle Avrupa

lkelerinde yaygın düşük patojeniteli Tip II sularına paralellik göstermekle birlikte, yüksek patojeniteli Tip I-III suları da içermesi açısından dikkat çekicidir. Yukarıda tanımlanan seroprevalans ve izolasyon bulgularına bakılarak ülkemizde insanlar ve diğer hayvanlardaki yaygınlığın tahmin edilmesi de mümkündür. Toksoplazmozis bula kaynağı insanlar için coğrafı, sosyo-ekonomik ve kültürel özelliklere göre farklılık göstermektedir. Örneğin; ehir hayatı yaşayan ve yüksek gelir seviyesine sahip bireyler için çiğ ve az pimi koyun-keçi eti tüketimi, çiğ sebze ve meyveler önemli olurken, kırsal alanda yaşayan ve düşük gelirli bireyler enfekte kediden saçılan oosistler ve çiğ et tüketimine bağlı alışkanlıklar dolayısıyla enfeksiyona yakalanmaktadırlar. Her ne şekilde olursa olsun, insanlarda subklinik ve belirti göstermeden seyreden toksoplazmoz olgularının erken tanısı ve etkin şekilde tedavisi gereklidir. Ancak, akut seyirli toksoplazmoz haricinde, tedavi için etkin bir ilaç henüz gelitirilememitir. İnsanlarda toksoplazmozdan korunmak için onaylı bir aı uygulaması da henüz yoktur. Bu durum, ülkemizde hamilelik döneminde test edilen hastalıklar arasında yeralan (TORCH testi) *T. gondii* için daha büyük öneme sahiptir ve gebelik dönemi tedavilerinde bebek için en az yan etkiye sahip kemoterapi seçeneklerinin ortaya konulması için yapılan araştırmalar da büyük hızla devam etmektedir. Günümüzde standart tedavide kullanılan antibiyotikler primethamine ile sülfadiazine kombinasyonu, spiramisin ve klindamisindir. Alternatif tedavide ise primethamine ile yeni makrolidlerin kombinasyonu veya trimethoprime sulfametoksazol kullanılmaktadır. Akut toksoplazmoz için etkili olan sulfodiazine/trimetoprim tedavisi bebeklerde folat eksikliğine yol açmakta ve nefrotoksisite gibi yan etkilere sahiptir. Spiramisin ve klindamisin ise yumuşak dokularda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmeleri nedeniyle tercih edilmelerine

rağmen hücre içi düzeyleri yetersiz kalabilmektedir. Gebelik ve yeni doğan döneminde; *T.gondii* yaygın görülen, abortlara ve kalıcı hasara sebebiyet verebilen bir enfeksiyon olduğundan; bu dönemlerde kullanılacak tedavi ajanının RH suşu takizoitlerine karşı daha etkili fakat hücre üzerindeki toksisitesinin en az olması gerekmektedir. Bu çalışmada, hücre kültürü ortamında insanlarda toksoplazmoz tedavisinde kullanılan bazı antibiyotikler ile G 418 kemoterapisinin hücrelere olan sitotoksik etkileri, farklı doz aralıklarında değerlendirilmiş ve klinik uygulanmaları halinde şekillenebilecek yan etkileri modellenmeye çalışılmıştır. Ayrıca; bugüne kadar *T.gondii* tedavisi için denenmemiş G418 molekülünün enfekte hücre serilerinde parazitostatik ve parazitoidal etkileri araştırılmıştır. Bulgular, G418'in tedavi amacıyla klinik kullanılmasının mümkün olabileceğini ve diğer test edilen kemoterapotiklere oranla daha düşük sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Sitotoksite testinde ise; hücreye zarar vermeden *T. gondii* RH suşunun takizoitlerine etki eden antibiyotik dozunun (mid50) 100µM olduğuna karar verilmiştir. Mid50 ile yapılan invazyon testi ve çoğalma indeksinin belirlenmesi işlemlerinde; G418 adlı antibiyotik ihtiva eden gruptaki takizoitlerin, daha önce kullanılan makrolid antibiyotiklerden sulfadiazine oranla daha az yaşama şansı bulunduğu gözlemlenmiştir.

İn-vitro olarak uygulanan ilaçların memeli hücrelerine verdikleri hasarın değerlendirilmesinde sıklıkla MTT ve WST1 testleri kullanılır. Bu testlerde, test edilecek ilaçların farklı molaritelerde hazırlanan derişimleri kültür flaskı tabanına tutunmuş ticari hücre serileri üzerine besiyeri ile birlikte eklenir. Prensip olarak, her iki testte de; eğer ilaç hücre mitokondrisi üzerine toksik etkiye sahipse hücre solunumu baskılanır ve test solusyanları içerisinde yeralan tetrazolium tuzları ile

daha az oranda reaksiyona girer. Mitokondriler çift katmanlı lipoprotein zar yapısı ve yüksek metabolik aktiviteleri nedeniyle hücrede oluşan hasarlarda ilk etkilenen hücre organelidir. Dolayısıyla bu testlerde, ilaçların en az yan etkiye sahip konsantrasyonları belirlenebilir ve daha sonrasında gerçekleştirilecek in-vivo deney hayvanı çalışmaları için referans veri elde edilmiş olur. Bununla birlikte, MTT ve WST1 testlerinde hücre proliferasyon düzeyi gösterilmekle birlikte, ilaçların hücre solunumu ve mtokondriyal hasar haricinde etkileri değerlendirilemez. Kısacası; eklenecek ilacın mikrotübül ve aktin gibi yapısal proteinler ile DNA hasarı üzerine etkileri ancak Western blotlama, qPCR ve proteomics gibi daha gelişmiş teknikler kullanılarak ortaya konulabilir. Bu çalışmada, G418 molekülü memeli Vero hücreleri üzerine düşük sitotoksikite göstermiştir ve bu sonuç ileride gerçekleştirilebilecek in-vivo denemeler ve hatta hayvan ve insanlarda klinik kullanımı için umut vericidir. Ancak, hücresel düzeyde olabilecek muhtemel diğer etkilerinin detaylı olarak araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışmanın bir diğer önemli çıktısı da, G418'in in-vitro olarak *Toxoplasma gondii* takizoitleri üzerine olan çoğalmayı önleyici etkisidir. Deneyler sırasında, vero hücreleri üzerine iki katı oranında eklenecek *T.gondii* RH suşunun çoğalma grafiği incelendiğinde; G 418 100 mikromolar konsantrasyonda parazit çoğalmasını % 50 oranında engellemiş ve süfadiazin uygulanan diğer tedavi grubu ile ilaç uygulanmayan kontrol grubuna oranla daha yüksek etkili olduğu bulunmuştur. Bu değerlendirme, kültür flasklarında tespit edildikten sonra May Grunwald Giemsa ile boyandıktan sonra, takizotlerin 100x mikroskop büyütmesi ile sayılmaları ile elde edilmiştir. Dolayısıyla, Giemsa ile boyanmasına rağmen canlılığını kaybetmiş takizotlerin ortamda bulunması mümkündür ve sonuçları etkileyebileceği göz ardı edilmemelidir. G 418

molekölünün *T. gondii* takizoitleri üzerine etki şekli halen tanımlanmamış olduğundan, MTT gibi mitokondriyal aktivite testleri de bu değerlendirme için yeterli görünmemektedir. Dolayısıyla, ökaryotik canlıların hücre membranı selektif geçirgenliğinin devam ettiği hücreler (canlı hücre) ile, canlılığını yitirmiş hücrelerin ayrımını sağlayan tripan blue ve orange G vital boyalarının kullanılmasının daha uygun olabileceği değerlendirilmiştir. *Toxoplasma gondii*'ye karşı kemoterapötik etkinliğin değerlendirilmesinde kullanılabilir bir diğer yöntem ise; invitro olarak ilaçla muamele edilen ve edilmeyen takizotlerin farelere intraperitoneal yolla verildikten sonra ölüm oranları, peritoneal takizoit sayıları ve organlarda oluşturdukları lezyonların şiddetine göre değerlendirme (in-vivo bioassay) yapılmasıdır. Bu yolla, yukarıda bahsedildiği şekilde ilacın etkisiyle ölen ancak halen kültür ortamında bulunan takizoitlerin değerlendirme dışı bırakılması mümkün olmaktadır.

Antiprotozoer ilaçların etkinlik değerlendirmelerinde, in-vitro proliferasyon deneyleri ilk basamağı oluşturur ve test edilen ilacın ne derecede etkili olduğu yönünde çok değerli bilgiler verir. İkinci aşamada ise uygun enfeksiyon modelleri oluşturularak deney hayvanı çalışmaları gerçekleştirilir. Deney hayvanı akut toksoplazmoz modeli olarak en sık tercih edileni, intraperitoneal yolla Swiss albino ya da C57/BL6 inbreed farelere intraperitoneal yolla 10^5 - 10^6 sayıda takizot verilmesi yoluyla oluşturulan modeldir. Bu çalışmanın başlangıç aşamasında da, anılan model takizoitlerin in-vitro deneyler öncesinde pasajlanması ve üretilmeleri için kullanılmış ve başarıyla oluşturulmuştur. Sunulan çalışma sonuçlarına göre, G418'in ileriki in-vivo fare deneylerinde etkinliğinin test edilmesi ve fareleri ölümcül toksoplazmozdan koruyucu etkinliğinin olup olmadığının anlaşılabilmesi için gerekli görünmektedir.

Diğer taraftan, in-vitro olarak Vero6 yeşil maymun böbrek epitel hücreleri üzerine olan düşük düzeydeki sitotoksik etkisinin, canlı bireyler üzerinde tüm hücre grupları, doku, organ ve sistemler üzerine etkileri de hem klinik-biyokimyasal hem de hücre düzeyinde test edilmiş olacaktır.

Bu bağlamda; G418, *T.gondii* RH suşu takizoitlerine karşı daha etkili ve hücre üzerinde daha az toksik olabileceği verileri ile, yapılacak yeni çalışmalarda kullanılabilme olanağını düşündürmüştür. Ancak sonuçların doğruluğunu gösterebilmek adına moleküler araştırmalara başvurmak gerekmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile G418'in etkinliğini desteklemek mümkündür.

KAYNAKLAR

1. Ajioka JW, Soldati D. *Toxoplasma Moleculer and Cellular Biology*. UK Horizon Bioscience Scientific Press.2007; 3-8.
2. Akca A, Babür C, Arslan M O, Gıcık Y, Kara M, Kılıç S, 2004. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in the province of Kars, Turkey. *Vet Med-Czesh*; 49(1):9-13.
3. Aktaş M, Babür C, Düzgün A, 2000. Malatya yöresinde koyunlarda *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı F Ü Sağlık Bil Derg; 14(1): 65-67.
4. Aktaş M, Babür C, Karaer Z, Dumanlı N, 2000. Elazığ yöresinde sığırlarda Sabin-Feldman (SF) testi ile anti-*Toxoplasma gondii* antikörlerinin belirlenmesi. *Türk J Vet Anim Sci*; 24: 535-538.
5. Aktaş M, Babür C, Karaer Z, Dumanlı N, Köroğlu E, 1998. Elazığ'da sokak köpeklerinde *Toxoplasmosis*in seroprevalansı. *Vet Bil Derg*; 14 (1): 47 - 50.
6. Aktaş M, Babür C, Köroğlu E, Dumanlı N, 1999. Sultansuyu Tarım işletmesi atlarında anti-*Toxoplasma gondii* antikörlerinin Sabin-Feldman boya testi ile belirlenmesi. *F Ü Sağlık Bil Derg*; 13(2): 89-91.
7. Aktaş M, Dumanlı N, Babür C, Karaer Z, Öngör H, 2000. Elazığ yöresinde gebe ve yavru atmış koyunlarda Sabin-Feldman (SF) testi ile *Toxoplasma gondii* yönünden seropozitiflik oranının belirlenmesi. *Türk J Vet Anim Sci*; 24 : 239- 241.
8. Appleford, P. J., and J. E. Smith. 1997. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. *Acta Trop*. 65:97–104.

9. Araujo FG, Khan AA, Remington JS. Rifapentine is active in vitro and in vivo against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40:1335-1337.
10. Aslan G, Babür C 2002. Şanlıurfa'da koyun ve sığırlar ile mezbaha çalışanlarında *Toxoplasma gondii* seroprevalansı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*; 32(1-2): 102-105.
11. Aslantaş Ö, Babür C , Kılıç S, 2001. Kars yöresinde atlarda Bruselloz ve Toksoplazmoz'un seroprevalansı. *Etilik Vet Mikrob Derg*; 12 (1-2):1-7.
12. Aslantaş Ö, Babür C, 2000. Kars Yöresinde sığır ve koyunlarda Bruselloz ve Toksoplazmoz üzerine seroepidemiolojik araştırmalar. *Etilik Vet Mikrob Derg*; 11(1 -2): 47-55.
13. Aslantaş Ö, Özdemir V, Kılıç S, Babür C, 2005. Seropidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Veterinary Parasitology*; 129: 187-191.
14. Atmaca HT¹, Dincel GC, Macun HC, Terzi OS, Uzunalioglu T, Kalender H, Kul O A rare case of feline congenital *Toxoplasma gondii* infection: fatal outcome of systemic toxoplasmosis for the mother and its kitten. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2013 May-Jun;126(5-6):216-9.
15. Babür C, Aktaş M, Dumanlı N, Altaş M G, 1998. Elazığ yöresinde kedilerde Sabin-Feldman boya testi ile anti-*Toxoplasma gondii* antikörlerinin araştırılması. *Vet Bil Derg*; 14 (1):55-58.
16. Babür C, Bıyıkoğlu G, Pişkin FÇ, Erdal N, 1997. İstanbul sokak köpeklerinde Toksoplazmosis'in seroprevalansı, *T Parazitol Derg*; 21 (4): 413-416.

17. Babür C, Çakmak A, Bıyıkoğlu G, Pişkin FÇ, 1998. Ankara Atatürk Orman Çiftliği hayvanat bahçesi vahşi hayvanlarını beslemek için kesilen atlarda anti-Toxoplasma gondii antikorlarının Sabin-Feldman boya testi ile saptanması. T Parazitol Derg; 22 (2): 174-176.
18. Babür C, Esen B, Bıyıkoğlu G, 2001. Yozgat'ta koyunlarda Toxoplasmosis gondii'nin seroprevalansı. Türk J Vet Anim Sci; 25: 283-285.
19. Babür C, Gıcık Y, İnci A, 1998. Ankara' da güvercinlerde Sabin - Feldman boya testi ile anti -Toxoplasma gondii antikorlarının araştırılması. T Parazitol Derg; 22 (3): 308-310.
20. Babür C, İnci A, Karaer Z, 1997. Çankırı yöresinde koyun ve keçilerde Toxoplasma gondii seropozitifliğinin Sabin - Feldman boya testi ile saptanması. T Parazitol Derg; 21 (4): 409-412.
21. Babür C, Karaer Z, 1997. Koyunlarda Toxoplasma gondii'nin seroinsidensi ve izolasyonu üzerine araştırmalar. T Parazitol Derg; 21 (3): 293-299.
22. Babür C, Karaer Z, Çakmak A, Yaralı C, Zeybek H, 1996. Ankara yöresinde Sabin - Feldman (SF), İndirekt Floresan Antikor (İFA), Latex Aglutinasyon (LA) testleri ile koyun toxoplasmosis'inin prevalansı. F Ü Sağlık Bil Derg; 10 (2): 273-277.
23. Babür C, Kılıç S, Taylan Özkan A, Esen B 2002. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığında 1995-2000 yılları arasında çalışılmış Sabin-Feldman dye test sonuçlarının değerlendirilmesi. T Parazitol Derg; 26(2):124 - 128.
24. Babür C, Pişkin F Ç, Bıyıkoğlu G, DüNDAR B, Yaralı C, 1999. Eskişehir Çifteler Harası Ankara Keçilerinde anti-Toxoplasma gondii antikorlarının

- Sabin - Feldman Dye test(SFDT) ile araştırılması. T Parazitol Derg; 23 (1): 72-74.
- 25.** Babür C, Pişkin F Ç, Bıyıkoğlu G, Mutlu Ö F, 1999. İzmir ve Manisa yöresi güvercinlerinde (*Columba sp.*) anti-Toxoplasma gondii antikorlarının Sabin-Feldman boya testi ile araştırılması. T Parazitol Derg; 23 (3): 309-311.
- 26.** Babür C, Sevgili M, Aksın N, Dünder B, Esen B, 2000. Elazığ yöresinde tavşanlarda Sabin-Feldman boya testi ile anti-Toxoplasma gondii antikorlarının araştırılması. T Parazitol Derg; 24(4): 398-400.
- 27.** Babür C, Tanyüksel M, Gün H, Tunaoğlu M, Güvener E 1995. Ankara Et ve Balık Kurumu Mezbaha çalışanlarında Sabin-Feldman Dye Test (SFDT) ve Vitek Immüno Diagnostik Assay System (VIDAS) tekniği ile anti-Toksoplazma antikorlarının araştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg; 52 (2): 87-92.
- 28.** Babür C, Yağcı Ş, Sert H, Yaman N, Ateş C, Karaer Z, 1997. T C Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Serum Üretim Çiftliği atlarında Toxoplasmosis'in serodiagnozu. Etlik Vet Mikrob Derg; 9 (2): 1-5.
- 29.** Bıyıkoğlu G, Kılıç S, Babür C, Ayçiçek H, 2002. Marmara bölgesi damızlık işletmelerinde yetiştirilen tavuklarda Toxoplasma gondii antikorlarının araştırılması. T Parazitol Derg; 26 (4): 355 – 357.
- 30.** Bonhomme, A., L. Pingret, and J. M. Pinon. 1992. Review: Toxoplasma gondii cellular invasion. Parassitologia 54:31–43.

31. Carruthers VB, Hakansson S, Giddings OK, Sibley LD. Toxoplasma gondii uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. Infection and Immunity 2000; 68(7): 4005-4011.
32. Chatterton JMW, Evans R, Ashburn D, Joss AWL, Ho-Jen DO. Toxoplasma gondii in vitro culture for experimentation. Journal of Microbiological Methods 2002; 51: 331-335.
33. Chiappino, M. L., B. A. Nichols, and G. R. O'Connor. 1984. Scanning electron microscopy of Toxoplasma gondii: parasite torsion and host-cell responses during invasion. J. Protozool. 31:288–292.
34. Çakmak A, Karaer Z, Bıyıkoglu G, Babür C, Pişkin F Ç, 1996. Ankara'da sokak köpeklerinde Toxoplazmosisin seroprevalansı. F Ü Sağlık Bil Derg; 10 (2): 279-282.
35. Çiçek H, Babür C, 2002. Afyon yöresinde sığırlarda Toxoplasma gondii' nin Sabin Feldman (SF) Dye testi ile seroprevalansı. Etlik Vet Mikrob Derg; 13(2): 1-3.
36. Çiçek H, Babür C, Karaer Z, 2004. Afyon yöresinde Sabin-Feldman (SF) boya testi ile koyunlarda Toxoplasma gondii seroprevalansı. A Ü Vet Fak Derg; 51: 229-231.
37. Çiçek H, Babür C, Kenar B, 2002. Afyon'da özel bir mezbahada kesilen mandalarda anti – Toxoplasma gondii antikorlarının Sabin-Feldman (SF) Dye testi ile araştırılması. Etlik Vet Mikrob Derg; 13(2): 4-6.
38. Çiçek H, Babür C, Kılıç S, Çakmak A, 2004. Serologic prevalence of Toxoplasma gondii in chickens in Afyon, Turkey. Indian Vet J October; 81: 1091-1092.

39. De Meerchman F, Rettigner C, Focant C, Boreux R, Pinset C, Leclipteux T, Losson B. Use of a serum-free medium to produce in vitro *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites on Vero-6 cells. *Vet. Res.* 2002; 33: 159-168.
40. de Souza, W., and T. Souto-Prado. 1978. Ultrastructural localization of basic proteins on the conoid, rhoptries and micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Z. Parasitenkd.* 56:123–129.
41. de Melo, E. J. T., and W. de Souza. 1997. A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 83:252–256.
42. Denney CF, Eckman L, Reed SL. Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immunity.* 1999; 67: 1547-1552.
43. Derouin F, Chastang C. In vitro effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989; 1753-1759.
44. Doyle A. Griffiths JB. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.* John Wiley & Sons. 1998; 57-64.
45. Dubey JP, Beattie CP, 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man.* CRC Press, Boca Raton, Florida. p.220.
46. Dubey, J. P. 1977. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals*, p. 101–237. In J. P. Kreier (ed.), *Parasitic protozoa*, 3rd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

47. Dubey, J. P. 1988. Long term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am. J. Vet. Res.* 49:910–913.
48. Dubey, J. P. 1993. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals, p.1–158. In J.P. Kreier (ed.), *Parasitic protozoa*, vol. 6. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
49. Dubey, J. P. 1996. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J. Parasitol.* 82:957–960.
50. Dubey, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, in press.
51. Dubey, J. P., and J. K. Frenkel. 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J. Protozool.* 23:537–546.
52. Dubremetz, J. F., and J. D. Swartzman. 1993. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res. Immunol.* 144:31–33.
53. Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P, 2005. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Enke Verlag, Stuttgart. p.575.
54. Eren H, Babür C, Erdal N, Sert H, 1997. Ankara ve Aydın yöresi sığırlarında Sabin -Feldman testi ile *Toxoplasma gondii*'nin prevalansı. *Türk Hij Den Biyol Derg*; 54 (1-2): 31-34.
55. Eren H, Babür C, Özlem M B, Durukan A, Ulutaş B 1998. Aydın ili kedi ve köpeklerinde anti-*Toxoplasma gondii* antikörlerinin Sabin-Feldman boya testi ile araştırılması. *Bornova Vet Kontr ve Araşt Enst Md Derg*; 23 (37): 23 - 28.
56. Erişim: <http://etallcorp.xpg.uol.com.br/toxoplas.htm>

57. Erişim: <http://www.invivogen.com/hygomycin>
58. Erişim: <http://www.invivogen.com/phleomycin>
59. Erişim: <http://www.invivogen.com/zeocin>
60. Erişim:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s8626?lang=en®ion=TR>
61. Erişim: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pyrimethamine>
62. Erişim:
<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/protocols/cloning/transformation-protocol/blasticidin-s-hcl.html#7>
63. Ferguson, D. J. P., and W. M. Hutchison. 1987. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* 73:483–491.
64. Ferguson, D. J. P., and W. M. Hutchison. 1987. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Arch. A* 411:39–43.
65. Ferguson, D. J. P., W. M. Dunachie, J. F. and J. C. Siim. 1974. Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 82:167–181.
66. Freyre, A., J. P. Dubey, D. D. Smith, and J. K. Frenkel. 1989. Oocystinduced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J. Parasitol.* 75:750–755.
67. Guzzo CA, Furtek CI, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, Sciberras DG, Hsieh JY, Lassetter KC. Safety, tolerability, pharmacokinetics of escalating

high doses of ivermectin in healthy adult subjects. The Journal of clinical Pharmacology 2002; 42: 1122-1133

68. Howe, D. K., and L. D. Sibley. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J. Infect. Dis. 172:1561–1566.
69. Hu K, Johnson J, Florens L, Fraunholz M, Suravajjila S, et al. Cytoskeletal components of an invasion machine-The apical complex of *Toxoplasma gondii*. PLOS Pathogens. 2006; 2(2): 121-137.
70. Hüseyin Can, Mert Döşkaya, Daniel Ajzenberg, ve ark. 2014. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates and Toxoplasmosis Seroprevalence in Stray Cats of İzmir, Turkey. Plos one, August 15.
71. İnci A, Aydın N, Babür C, Çam Y, Akdoğan C, Kuzan Ş, 1999. Kayseri yöresinde sığır ve koyunlarda Toksoplazmozis ve Brusellozis üzerine seroepidemiolojik araştırmalar. Pendik Vet Mikrobiyol Derg; 30 (1): 41 - 46.
72. İnci A, Babür C, Aydın N, Çam Y, 2002. Kayseri yöresinde tek tırnaklılarda (at, eşek ve katır) *Toxoplasma gondii* (Nicolle ve Manceaux, 1908) ve *Listeria monocytogenes*'in seroprevalansı üzerine araştırmalar. F Ü Sağlık Bil Derg; 16(2): 181-183.
73. İnci A, Babür C, Çam Y, İça A, 2002. Kayseri yöresi köpeklerde *Toxoplasma gondii* (Nicolle ve Manceaux, 1908) seroprevalansı. T Parazitol Derg; 26(3):221 - 223.

74. İnci A, Babür C, Çam Y, İça A, 2002. Kayseri yöresinde bazı yırtıcı kuşlarda Sabin Feldman boya testi ile *Toxoplasma gondii* (Nicelle ve Manceaux, 1908) seropozitifliğin araştırılması. F Ü Sağlık Bil Derg; 16(2): 177-179.
75. İnci A, Babür C, Dinçer Ş, 1996. Ankara'da kedilerde Sabin-Feldman boya testi ile anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının araştırılması. T Parazitol Derg; 20 (3-4): 407-411.
76. İnci A, Babür C, Dinçer Ş, Erdal N, 1998. Türkiye'nin bazı illerinde evcil kanatlılarda Sabin-Feldman boya testi ile anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının saptanması. T Parazitol Derg; 22 (4): 420-423.
77. İnci A, Babür C, İşcan K M, İça A, 2002. Bildircinlarda (*Coturnix coturnix japonica*) *Toxoplasma gondii* (Nicolle ve Manceaux, 1908) spesifik antikorlarının Sabin-Feldman boya testi ile araştırılması. T Parazitol Derg; 26(1):20 - 22.
78. İnci A, Babür C, Kalınbacak A, 1996. Gemlik Askeri Harası köpeklerinde anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının Sabin - Feldman boya testi ile araştırılması. T Parazitol Derg; 20 (3-4): 413-416.
79. İnci A, Babür C, Karaer Z, 1996. Gemlik Askeri Harası atlarında anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının Sabin- Feldman boya testi ile saptanması. T Parazitol Derg; 20 (3-4): 417-419.
80. Jacobs, L., J. S. Remington, and M. L. Melton. 1960. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 46:11–21.
81. Johnson, A. M. 1997. Speculation on possible life-cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. Parasitol. Today 13:393–397.

- 82.** Joiner, K. 1993. Cell entry by *Toxoplasma gondii*: all paths do not lead to success. *Res. Immunol.* 144:34–48.
- 83.** Karatepe B, Babür C, Karatepe M, 2001. Amasya yöresi sığırlarında *Toxoplasma gondii*'nin seroprevelansı. *Etlik Vet Mikrob Derg*; 12 (1-2): 8-11.
- 84.** Karatepe B, Babür C, Karatepe M, Çakmak A, Nalbantoğlu S, 2004. Seroprevalance of toxoplasmosis in sheep and goats in the Niğde province of Turkey. *Indian Vet J* September; 81: 974-976.
- 85.** Karatepe B, Babür C, Karatepe M, Çakmak A, Nalbantoğlu S, 2003. Niğde yöresinde sığırlarda *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı. *Etlik Vet Mikrob Derg*; 14(1-2): 18-21.
- 86.** Karatepe M, Babür C, Karatepe B, 2001. Gümüşhacıköy (Amasya) yöresi koyunlarda *Toxoplasma gondii*'nin Sabin-Feldman boya testi ile seroprevelansı. *T Parazitol Derg*; 25(2): 110-112.
- 87.** Kaufmann J, 1996. *Parasitic Infections of Domestic Animals. A Diagnostic Manual.* Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin. p.423.
- 88.** Khan AA, Slifer T, Araujo FG, Remington JS. Quinupristin-Dalfopristin is active against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2043-2045.
- 89.** Köhler, S., C.F. Delwiche, P.W. Denny, L.G. Tilney, P. Webster, R.J.M. Wilson, J. D. Palmer, and D. S. Roos. 1997. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* 275:1485–1489.
- 90.** Krauss H, Weber A, Apple M, Enders B, Graevenitz AV, Isenberg HD, Schiefer HG, Slenczka W, Zahner H, 2004. Zoonosen. *Von Tier zu Mensch*

übertragbare Infektionskrankheiten, 3.volständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Mit 100 Abbildungen und 102 Tabellen, Deutscher Ärzte-Verlag, p.605.

91. Kul O, Atmaca HT, Anteplioglu T, Ocal N, Canpolat S Neospora caninum: the First Demonstration of the Enteroepithelial Stages in the Intestines of a Naturally Infected Dog. J Comp Pathol 2015 Jul;153(1):9-13. doi: 10.1016/j.jcpa.2015.03.005. Epub 2015 May 15.
92. Kul O, Yildiz K, Ocal N, Freyre A, Deniz A, Karahan S, Atmaca HT, Gokpinar S, Dincel GC, Uzunalioglu T, Terzi O In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced Toxoplasma gondii tissue cysts in lambs: a novel strategy for prevention of human exposure to meat-borne toxoplasmosis. Res Vet Sci 2013 Apr;94(2):269-76. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.08.001. Epub 2012 Sep 3.
93. Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Nielsen HE, Peitersen B, Rechnitzer C, et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. Lancet. 1999; 353: 1834-1837.
94. Levine ND, 1985. Veterinary Protozoology. Iowa State University Press, Ames. p.413.
95. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, et al. Green DR: The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. In: Schwartz LM, Osborne BA (eds), Methods in Cell Biology, Cell Death. Academic Press. San Diego, 1995; 46: 150-181.

- 96.** Morisaki, J. H., J. E. Heuser, and L. D. Sibley. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Sci.* 108:2457–2464.
- 97.** Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*, 1983; 65: 55-63.
- 98.** Nalbantoğlu S, Babür C, Çakmak A, Karaer Z, Korudağ E, 1999. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde Sabin - Feldman dye testi ile koyun ve keçilerde *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı. *Türk Hij Den Biyol Derg*; 56 (2): 83-86.
- 99.** Nalbantoğlu S, Vatansever Z, Deniz A, Babür C, Çakmak A, Karaer Z, Korudağ E, 2002. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde Sabin-Feldman (SF) ve indirekt floresan antikor (İFA) testleri ile sığırlarda *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı. *Türk J Vet Anim Sci*; 26: 825-828.
- 100.** Nichols, B. A., and G. R. O'Connor. 1981. Penetration of mouse peritoneal macrophage by the protozoon *Toxoplasma gondii*. *Lab. Invest.* 44:324–335.
- 101.** Nichols, B. A., M. L. Chiappino, and G. R. O'Connor. 1983. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 83:85–98.
- 102.** Oktar N. K562 Hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik ekisinin MTT ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2009; 20-25.
- 103.** Omura S, Crump A. The life and times of ivermectin- a success story. *Perspectives.* 2004; 2: 984-989

- 104.** Öncel T, Vural G, Babür C, Kılıç S, 2005. Detection of Toxoplasmosis gondii seropozitivity in sheep in Yalova by Sabin-Feldman dye test and latex agglutination test. T Parazitoloj Derg; 29(1) : 10-12.
- 105.** Örgen C, Kılıç S, Taylan Özkan A, Babür C, 2001. Sakarya sokak köpeklerinde Toxoplasma gondii'nin Sabin-Feldman boya testi ile seroprevalansı. Pendik Vet Mikrobiyoloji Derg; 32 (1-2): 21 -25.
- 106.** Öztürk C, Babür C, Aslan G 2002. Mersin yöresinde koyunlarda ve mezbaha çalışanlarında Sabin-Feldman boya testi ile anti- Toxoplasma gondii antikorlarının araştırılması. Genel Tıp Derg; 12(1) :21-24.
- 107.** Paşa S, Babür C, Kılıç S, Gazıyağcı S, Bayramlı G, 2004. Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep in Aydın region in Turkey. Indian Vet J April; 81: 376-377.
- 108.** Petersen E. Toxoplasmosis. Seminars in Fetal & Neonatal medicine 2007;12(3): 214-223.
- 109.** Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schnieder T, 2000. Veterinärmedizinische Parasitologie. 5., Vollständig neubearbeitete Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, p.913.
- 110.** Schwartzman JD, 2001. Toxoplasmosis. Gillespie SH, Pearson RD. eds. Principles and Practice of Clinical Parasitology. John Wiley and Sons Ltd, England, p. 113-138.
- 111.** Sevgili M, Babür C, Gökçen A, Nalbantoğlu S, 2004. Seroprevalance of Toxoplasma gondii (Nicolle and Manceaux, 1908) in thoroughbred arabian mares as detected by test in Şanlıurfa. F Ü Sağlık Bil Derg; 18(1): 21-23.

- 112.**Sevgili M, Babür C, Nalbantoğlu S, Karaş G, Vatansever Z, 2005. Determination of seropositivity for *Toxoplasma gondii* in sheep in Şanlıurfa province. *Turk J Vet Anim Sci*; 29 : 107-111.
- 113.**Sevinç F, Dik B, Babür C, Kamburgil K, Uslu U, 2000. Konya sokak köpeklerinde *Toxoplasma gondii*'nin Sabin-Feldman boya testi, İndirekt Floresan Antikor Testi ve Modifiye Aglutinasyon Testi ile seroprevelansı. *T Parazitol Derg*; 24 (1): 61-64.
- 114.**Sheffield, H. G. 1970. Schizogony in *Toxoplasma gondii*. An electron microscopic study. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 37:237–242.
- 115.**Sheffield, H. G., and M. L. Melton. 1968. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 54:209–226
- 116.**Sibley, L. D., and J. C. Boothroyd. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359:82–85.
- 117.**Sibley, L. D. 1995. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol.* 5:129–132.
- 118.**Silva, S. R. L., S. S. Meirelles, and W. de Souza. 1982. Mechanism of entry of *Toxoplasma gondii* into vertebrate cells. *J. Submicrosc. Cytol.* 14:471–482.
- 119.**Speer, C. A., J. P. Dubey, J. A. Blixt, and K. Prokop. 1997. Time lapse video microscopy and ultrastructure of penetrating sporozoites, types 1 and 2 parasitophorous vacuoles, and the transformation of sporozoites to tachyzoites of the VEG strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 83:565– 574.
- 120.**Taylan Özkan A, Babür C, DüNDAR B, Pişkin F Ç, 2002. Güneydoğu Anadolu'nun bazı illerinde atlarda anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının

Sabin-Feldman Dye testi ile araştırılması. Etlik Vet Mikrob Derg; 13(2) :16-18.

121.Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM, 2000. *Toxoplasma gondii*: from animal to humans. Inter J Parasitol 30, 1217-1258.

122.Trierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA. Current Medical diagnosis & treatment, 40 th ed. New York, Lange medical books/ Mc Graw-Hill, 2001; 1444-1447.

123.Turner SA, Maclean JD, Fleckenste L, Greenaway C. Parenteral administration of ivermectin in a patientwith disseminated strongyloidiasis. Am. J. Trop. Hyg. 2005; 73(5): 911-914

124.Türkiye Milli Zoonoz Komitesi Toxoplasma Hastalığı Alt Çalışma Grubu Raporu, 2000.

125.Tütüncü M, Akkan H A, Babür C, Ayaz E, Karaca M, 2001. The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep detected by Sabin Feldman Dye Test in the region of Van, Turkey. YYÜ Vet Fak Derg; 12(1-2): 33 - 35.

126.Vivier, E., and A. Petitprez. 1972. Données ultrastructurales complémentaires, morphologiques et cytochimiques, sur *Toxoplasma gondii*. Protistologica 8:199–221.

127.Werk, R. 1985. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells. Rev. Infect. Dis. 7:449–457.

128.Yağcı Ş, Babür C, Karaer Z, Çakmak A, 1997. Ankara yöresinde keçilerde Toxoplasmosis. Etlik Vet Mikrob Derg; 9 (1): 94 - 98.

129.Yaka E, Eğilmez MY, Keskinöglü P, ve ark. Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında (BOS) biyolojik belirteçler ve BOS' un PC12 hücre hattı

canlılığı üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi, Turkish Journal of Geriatrics 2006; 9 (1): 1-7.

130. Yaşarol Ş, 1983. Toxoplasmosis. Türkiye Parazitolojisi Derneği Yayın No: 3, İzmir, p. 128.

131. Yeo SJ, Jin C, Kim S, Park H. In Vitro and in Vivo Effects of Nitrofurantoin on Experimental Toxoplasmosis. Korean J Parasitol 2016 Apr;54(2):155-61. doi: 10.3347/kjp.2016.54.2.155. Epub 2016 Apr 30.

132. Yıldız K, Babür C, Kılıç S, Aydenizöz M, Dalkılıç İ 2000. Kırıkkale Mezbahası'nda kesilen koyun ve sığırlar ile mezbaha çalışanlarında anti-Toxoplasma gondii antikorlarının araştırılması. T Parazitolojisi Derg; 24(2): 180-185.

133. Yıldız K, Kul O, Babur C, Kilic S, Gazyagci AN, Celebi B, Gurcan IS Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cattle ranches with high abortion rate: special emphasis to serologic co-existence with Toxoplasma gondii, Brucella abortus and Listeria monocytogenes. Vet Parasitol. 2009 Oct 14;164(2-4):306-10. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.06.004. Epub 2009 Jun 11.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Damla Okatan

Doğum Tarihi: 14.05.1989

Mail: damlaokatan@hotmail.com

Telefon: +90 546 438 70 40

Adres: Yenişehir mah. 286. Sok. Zeynep apt. no: 8/5 Yahşihan/Kırıkkale

Damla Okatan 14 Mayıs 1989'da İstanbul'da doğdu. İlkokulu İstanbulda, Ortaokul ve Liseyi Bursa'da okudu. 2007'de Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nde başladığı lisans eğitimini 2014'te tamamladı. Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler, Patoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimine 2014 yılı bahar döneminde başladı. Halen Nehir Su Ürünleri Yem Sanayii Ankara şubesinde Labart Veteriner Teşhis Laboratuvarı'nda veteriner hekim olarak çalışmalarını sürdürmektedir. Eylül 2016'dan beri, Part time olarak Sanofi Aventis İlaç firması tarafından Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim dalında yürütülen Dupilimab çalışmasında Klinik Araştırma Saha Koordinatörü olarak görev almaktadır.