T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı

TOXOPLASMA GONDII İLE ENFEKTE İNSAN TROPHOBLASTİK HÜCRELERİNİN (BEWO) TOLL-LIKE RESEPTÖR YOLAĞINA NİTROFURANTOİNİN ETKİSİ

Hazırlayan
Eda SİVCAN

Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Doktora Tezi

Aralık 2019
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

TOXOPLASMA GONDII İLE ENFEKTE İNSAN TROPHOBLASTİK HÜCRELERİNİN (BEWO) TOLL-LIKE RESEPTÖR YOLAĞINA NİTROFURANTOİNİN ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Hazırlayan
Eda SİVCAN

Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Aralık 2019
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Eda SİVCAN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"*Toxoplasma gondii* İle Enfekte İnsan Trophoblastik Hücrelerinin (BeWo) Toll-Like Reseptör Yolağına Nitrofurantoinin Etkisi" adlı **Doktora Tezi,** Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Eda SİVCAN

Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Muammer Hakan POYRAZOĞLU

Prof. Dr. Abdullah İNCİ danışmanlığında **Eda SİVCAN** tarafından hazırlanan **"*Toxoplasma gondii* İle Enfekte İnsan Trophoblastik Hücrelerinin (BeWo) Toll-Like Reseptör Yolağına Nitrofurantoinin Etkisi"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında **doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

... /.../2019

JÜRİ: **İmza**

Danışman : Prof. Dr. Abdullah İNCİ
(ERÜ Vet. Fak. Parazitoloji, Kayseri)

Üye : Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM
(ERÜ Vet. Fak. Parazitoloji Kayseri)

Üye : Doç. Dr. C. Soner BÖLÜKBAŞ
(OMÜ Vet. Fak. Parazitoloji, Samsun)

Üye : Doç. Dr. G. Zafer PEKMEZCİ
(OMÜ Vet. Fak. Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Samsun)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ
(ERÜ Vet. Fak. Viroloji, Kayseri)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımda bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdullah İNCİ'ye, katkılarıyla bana yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM, Doç. Dr. Önder DÜZLÜ, Dr. Öğr. Üyesi Zuhal ÖNDER, Dr. Öğr. Üyesi Arif ÇİLOĞLU'na ve ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ederim. Diğer yandan çalışmalarımızın her aşamasında desteklerini esirgemeyen ERÜ Tıp Fakültesi Dekanı ve Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜRÜK, Arş. Gör. Emrah ERDOĞAN ve ERÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı personeline, ayrıca İnönü Üni. Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Tülay AKSOY'a teşekkür ederim.

Son olarak akademik çalışmalarım süresince sevgi ve fedakârlıklarıyla sürekli yanımda olan aileme teşekkür sunarım.

Eda SİVCAN

Kayseri, Aralık 2019

TOXOPLASMA GONDII İLE ENFEKTE İNSAN TROPHOBLASTİK HÜCRELERİNİN (BEWO) TOLL-LIKE RESEPTÖR YOLAĞINA NİTROFURANTOİNİN ETKİSİ

Eda SİVCAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi,
Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

ÖZET

Toksoplasmosis, zorunlu hücre içi protozoon parazit *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu yaygın bir paraziter hastalıktır. Hastalık fetustan erişkinliğe kadar süregelen ciddi kliniklere neden olmaktadır. Bu çalışmada, *T. gondii* ile enfekte insan trofoblastik koriokarsinom hücresi olan BeWo hücre hattında, TLR (Toll-Like Reseptör) ait sinyal yolağına, nitrofurantoinin (NF) etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. BeWo hücreleri takizoitler ile 1:1 oranında enfekte edilmiştir. Kullanılacak konsantrasyonu belirlenmek üzere NF, deney gruplarını oluşturan hücrelere eklenmiştir. Giemsa boyama yöntemi, tripan blue boyama yöntemi ve MTS (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) testi uygulanmıştır. MTS ölçüm sonrasında GraphPad Prism 8.0 istatistik programı kullanılarak IC_{50} (maksimum inhibisyon konsantrasyonu) ve EC_{50} (maksimum cevabın yarısını vermek için gerekli ilaç konsantrasyonu) değerleri hesaplanmıştır. Uygun ilaç konsantrasyonunun 1,25 µM (mikromolar) olduğu bulunmuştur. NF'nin TLR yolağına etkisini tespit için 24. saatte, 48. saatte ve 72. saatte olmak üzere üç ayrı zamanda örnekler toplanmıştır. Deney sonrası deney gruplarından 24, 48 ve 72. saatlerde alınan örneklerin RNA izolasyonu yapılarak cDNA (complementer DNA)'ları sentezlenmiş ve Real-Time PCR (RT-qPCR) analizleri yapılmıştır. GAPD (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ve B2M (Beta-2-microglobulin) referans genleri kullanılarak gen ekspresyonlarındaki orantısal değişim hesaplanmıştır. Buna göre; MAPK1 (Mitogen-activated protein kinase 1), SPP1 (Secreted phosphoprotein 1), TLR6 (Toll-like receptor 6) ve TLR8 (Toll-like receptor 8) genlerinde görülen ekspresyon seviyesindeki azalmaya bağlı olarak ilacın en etkili saat diliminin 48. saat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, üç deney grubundaki

parazit yükünün 24 saat sonraki değişim düzeylerinde anlamlı farklılık görülmezken (p=0.086), 48 (p=0.015) ve 72 (p=0.049) saat sonra parazit yükündeki değişim düzeylerinde anlamlı farklılık olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, NF'nin *T. gondii* enfeksiyonunu, TLR yolağındaki hangi genler üzerinden inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, NF'nin toksoplamozisle mücadelede kullanılan etkin dozajının uyardığı bu moleküllerin bilinmesi, hastalığın tedavisinde alternatif bir yöntem olarak bu moleküller üzerinden etki eden daha az yan etkili geniş kullanım alanlı yeni preparatların geliştirilebileceğini de göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: BeWo hücre hattı, Nitrofurantoin, Toll-like reseptör, *Toxoplasma gondii***.**

INFLUENCE OF NITROFURANTOIN ON TOLL-LIKE RECEPTOR PATHWAY OF HUMAN TROPHOBLASTIC CELLS (BEWO) INFECTED WITH *TOXOPLASMA GONDII*

Eda SİVCAN
Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Medical Parasitology
Doctorate Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a common parasitic disease caused by the obligatory intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. The disease causes serious clinics from fetus to adulthood. The aim of this study was to investigate the effect of nitrofurantoin (NF) on the signaling pathway of TLR (Toll-Like Receptor) in the BeWo cell line, a human trophoblastic choriocarcinoma cell infected with *T. gondii*. BeWo cells were infected with tachyzoites in a 1: 1 ratio. NF was added to the cells forming the experimental groups to determine the concentration to be used. Giemsa staining method, trypan blue staining method and MTS (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) test were applied. After MTS measurement, IC50 (maximal inhibitory concentration) and EC50 (Half maximal effective concentration refers to the concentration of a drug) values were calculated using GraphPad Prism 8.0 statistical program. The appropriate drug concentration was found to be 1.25 µM (micromolar). To determine the effect of NF on the TLR pathway, samples were collected at three different times; 24 h, 48 h and 72 h. After the experiment, cDNAs were synthesized using RNA isolated from the samples taken at 24, 48 and 72 hours and Real-Time PCR (RT-qPCR) analyses were performed. Proportional change in gene expression was calculated using GAPD (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and B2M (Beta-2-microglobulin) reference genes. According to this; due to the decrease in expression level in MAPK1 (Mitogen-activated protein kinase 1), SPP1 (Secreted phosphoprotein 1), TLR6 (Toll-like receptor 6) and TLR8 (Toll-like receptor 8) genes, the most effective time zone of the drug was found to be 48th hour. In addition, no significant difference was observed in the change levels of the parasitic load in the three experimental groups after 24 hours ($p = 0.086$), but after 48 ($p = 0.015$) and 72 ($p =$

0.049) hours, there was a significant difference in the parasitic load changes in the three experimental groups. As a result, it was shown that NF inhibited *T. gondii* infection by which genes in the TLR pathway. Furthermore, the knowledge of these molecules, which are stimulated by the effective dosage of NF used in the fight against toxoplasmosis, have shown that new preparations with fewer side effects and a wide range can be developed as an alternative method of treatment of the disease.

Keywords: BeWo cell line, Nitrofurantoin, Toll-like receptor, *Toxoplasma gondii*.

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ii

ONAY : iii

TEŞEKKÜR iv

ÖZET v

ABSTRACT vii

İÇİNDEKİLER ix

KISALTMALAR ve SİMGELER xiii

TABLOLAR LİSTESİ xvii

ŞEKİLLER LİSTESİ xviii

1.GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1.Tarihçe 3

2.2. Sistematik 5

2.3. MORFOLOJİ 5

2.3.1. Takizoitler (Trofozoitler) 6

2.3.2. Bradizoit (Kistler) 7

2.3.3. Ookistler 8

2.4. Hayat Döngüsü 9

2.5. Epidemiyoloji 11

2.6. Klinik 12

2.6.1. Konjenital Toksoplasmosis 12

2.6.2. İmmün Sistemi Baskılanmamış ve Baskılanmış Kişilerde Toksoplasmosis 13

2.6.3. HIV ile Enfekte Hastalarda Toksoplasmosis 13

2.6.4. Transplantasyon Hastalarında Toksoplasmosis 14

2.7. Patogenez ve İmmünite 14

2.8. Toll-Like Reseptörler 15

2.8.1. Toll-like Reseptör Yolağı 16

2.8.2. MyD88-Bağımlı Yolak 17

2.8.3. TRIF-Bağımlı Yolak 17

2.9. İmmun Yanıtta Toll-Like Reseptörlerin Yeri 18

2.10. Parazit Enfeksiyonlarına Karşı Toll-Like Reseptörlerin İmmünitedeki Yeri 19

2.11. Tanı 21

2.12. Tedavi 21

2.12.1. İmmun Sistemi Normal Kişilerde Toksoplasmosisin Tedavisi 22

2.12.2. İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda Toksoplasmosis Tedavisi 22

2.12.3. Hamilelikte ve Çocukluk Döneminde Toksoplasmosis Tedavisi 22

2.12.4. Oküler Toksoplasmosis Tedavisi 23

2.13. Nitrofurantoin 23

2.14. Korunma 24

3. GEREÇ VE YÖNTEM 26

3.1. MATERYAL 26

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Sarf Malzemeleri, Solüsyon ve Besiyerleri, Canlı Materyaller 26

3.1.1.1. Cihazlar 26

3.1.1.2. Sarf Malzemeleri 27

3.1.1.3. Solüsyon ve Besiyerleri 27

3.1.1.4. Canlı Materyaller 28

3.2.METOD 28
3.2.1.Hücre Kültürü 28
3.2.1.1. DMEM HAM's / F-12 Besiyerinin Hazırlanması 28
3.2.1.2. Hücrelerin Çözdürülmesi ve BeWo Hücre Kültürü Hazırlanması 28
3.2.1.3. Subkültür ve BeWo Hücrelerini Pasajlama Prosedürü ... 29
3.2.1.4. Hücreleri Dondurma İşlemi 30
3.2.1.5. Takizoitlerin Hücre Kültüründe Üretilmesi 30
3.2.1.6. İlaç Solüsyonlarının Hazırlanması 31
3.3. Giemsa Boyama İle Morfoloji Deneyi 31
3.4. MTS ile Hücre Canlılık Testi 32
3.5. Trypan Blue Boyama ile Hücre Canlılık Testi 33
3.4. NF Deneyi 34
3.4.1. Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu 35
3.4.2. cDNA Sentezi 35
3.2.4.3.Toll-Like Reseptör Paneli 36
3.2.4.4. RT-qPCR Analizi 38
3.2.3. İstatistiksel Analiz 38
4. BULGULAR 40
4.1. BeWo Hücre Kültürünün Değerlendirilmesi 40
4.2. BeWo Hücrelerinin Enfeksiyonu İçin Belirlenen *T. gondii* Takizoit Sayısı 41
4.3. Giemsa Boyama Yöntemi 43
4.3.1 Morfoloji Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi 43
4.4. Hücre Canlılık Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi 47
4.4.1. Trypan Blue Testi 47
4.5. MTS Testi 51

4.6. NF Konsantrasyonunun 24. Saatteki Değerlendirilmesi..... 52

4.7. NF Konsantrasyonunun 48. Saatteki Değerlendirilmesi..... 54

4.8. NF Konsantrasyonunun 72. Saatteki Değerlendirilmesi..... 56

4.9. RT-qPCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi 58

4.9.1. Genlerin Ekspresyon Seviyesinde ve Eksprese Edilen RNA Miktarlarında 24.,48. ve 72. Saatte Meydan Gelen Değişiklikler 59

5. TARTIŞMA..... 114

6. KAYNAKLAR..... 122

EKLER

ÖZGEÇMİŞ..... 132

KISALTMALAR ve SİMGELER

µl : Mikrolitre

µM : Mikromolar

AIDS : Acquired Immune Deficiency Sendrom

AP-1 : Activator protein 1

APC : Antigen-presenting cell

CCR5 : C-C kemokin reseptörü tip 5

CCL2 : Chemokine(C-C motif) ligand 2

CD14 : Cluster of differentiation 14

cDNA : Komplementer (Complementer) DNA

cm^2 : Santimetre kare

CO_2 : Karbondioksit

Cq : Quantification threshold

CT : Bilgisayarlı tomografi

CHUK : Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase

DAMP : Damage Associated Moleculer Patterns

dk : Dakika

DMSO : Dimetilsülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

dNTP : Deoksinükleotid trifosfat

DTT : Dithiothreitol

DPBS : Dubelco's Fosfat Buffer Saline

EC_{50} : Maksimum cevabın yarısını vermek için gerekli ilaç konsantrasyonu

EGF : Epidermal growth factor

ER : Endoplazmik Retikulum

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2

FADD : Fas (TNFRSF6)- asociated via death domain

FBS : Fetal bovine serum

GM CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HIV : Human Immunodeficiency virus

IC_{50} : Maksimum inhibisyon konsantrasyonu

IFAT : Indırect flouresan antibody assay

IFN-γ : Interferon gamma

IgM : Immunoglobulın M

IHA : Indırect hemaglitunation assay

IKBKB : Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta

IL : Interlökin

IKK : IκB kinase

IKKβ : Nuclear factor kappa-B kinase

IRAK : Interleukin-1 receptor-associated kinase

IRF : Interferon regulatory factor

İYE : İdrar yolu enfeksiyonu

JNK : c-Jun N-terminal kinase

LAP : Lenfadenopati

LPS : Lipopolisakkarit

LRR : Leucine rich repeat

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

ml : Mililitre

mRNA : Mesenger RNA

MYD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88

MALP-2 : Macrophage-activating lipopeptide-2

MD-2 : Myeloid differentiation 2

MTS : 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum / Hücre canlılık testi

NEMO : Nuclear factor-kappa B Essential Modulator

NF : Nitrufurantoin

NF- κβ : Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells

NK : Nötral killer

NO : Nitrik oksit

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PAS : Periyodik asit shift

RIP1 : Receptor-interacting protein 1

PRR : Pattern Recognition Reseptors

RAC1 : RAS- related C3 botilinum substrate 1

RT-qPCR : Kantitatif Real-Time Ploimeraz Chain Reaction

RNA : Ribonükleik asit

sa : Saat

SMZ : Sülfametaksazol

SPP1 : Secreted phosphoprotein 1

STAg : *Toksoplazma* lizat antijeni

STAT1 : Signal transducer and activator of transcription 1

TAB1 : TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1

TAK1 : Transforming growth factor beta-activated kinase 1

TH1 : T helper 1

TH2 : T helper 2

TIR : Toll/interleukin-1 receptor

TRAF : TNF receptor-associated factor 6

TRIF : TIR domain-containing adaptor inducing interferon-β

TLR : Toll like resptör

TMP : Trimetapirim

TNF-α : Tumor necrosis factor α

UBC 13 : Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Dondurma besiyerinin hazırlanışı. 30

Tablo 2. Toll-Like reseptör panelindeki genler. 36

Tablo 3. Kontrol Grupları ve Deney Gruplarındaki Hücrelerin Canlılık Yüzdeleri 47

Tablo 4. BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu ve takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubuna göre deney grubundaki genlere ait ekspresyon seviyesindeki değişiklikler 59

Tablo 5. BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu ve takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubuna göre deney grubundaki genlerin eksprese edilen RNA miktarlarındaki değişiklikler. 62

Tablo 6. B1 geni seri dilüsyon verileri. 111

Tablo 7. Parazitlerin 24 Saat Sonraki Değişimine Göre Kruskal Wallis H- Testi Sonucu 113

Tablo 8. Parazitlerin 48 Saat Sonraki Değişimine Göre Kruskal Wallis H- Testi Sonucu 113

Tablo 9. Parazitlerin 72 Saat Sonraki Değişimine Göre Kruskal Wallis H- Testi Sonucu 113

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. *Toxoplasma gondii* trofozoiti 7

Şekil 2. Fare beyninde bulunan doku kisti içindeki bradizoitler. 8

Şekil 3. a: Sporlanmış *T. gondii* ookisti, **b:** Sporlanmamış *T. gondii* ookisti (https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplamosis/index.html). 9

Şekil 4. *Toxoplasma gondii*'nin hayat döngüsü 11

Şekil 5. Toll-like reseptör yolağı 18

Şekil 6. TLR'in *Toxoplasma gondii*'yi tanıma modeli: Doğal immun hücreler ve özellikle dentritik hücreler, profilin ve glikozilfosfotadillinositol gibi *T. gondii* ile ilgili patojen molekülleri tanıyan TLR11 ve TLR2'yi salgılarlar. 20

Şekil 7. NF'nin açık formülü 24

Şekil 8. BeWo hücrelerinin invert mikroskopta görünüşü (20X). 41

Şekil 9. Takizoitlerin invert mikroskopta görünüşü (40X). 42

Şekil 10. BeWo hücrelerinin takizoitlerle enfeksiyonu (40X). 42

Şekil 11. a) Giemsa boyama sırasında örneklerin görüntüsü. 43

Şekil 12. Farklı NF konsantrasyonlarında Giemsa boyamalı enfekte BeWo hücrelerinin morfoloji deney görüntüleri (40X) **a)** BeWo Kontrol **b)** Parazit Kontrol **c)** 320 µM NF **d)** 160 µM NF **e)** 80 µM NF **f)** 40 µM NF 45

Şekil 12. Farklı NF konsantrasyonlarında Giemsa boyamalı enfekte BeWo hücrelerinin morfoloji deney görüntüleri (40X) **g)** 20 µM NF **h)** 10 µM NF **ı)** 5 µM NF **i)** 2,5 µM NF **j)** 1,25 µM NF 46

Şekil 13. Tripan Blue boyama öncesinde örneklerin görüntüsü. 47

Şekil 14. Farklı NF konsantrasyonlarında enfekte BeWo hücrelerinin Tripan Blue boyama yöntemi ile canlılık deneyi görüntüleri (40X) **a)** BeWo Kontrol **b)** Parazit Kontrol **c)** 320 µM NF **d)** 160 µM NF **e)** 80 µM NF **f)** 40 µM NF 49

Şekil 14. Farklı NF konsantrasyonlarında enfekte BeWo hücrelerinin Tripan Blue boyama yöntemi ile canlılık deneyi görüntüleri (40X) **g)** 20 µM NF **h)** 10 µM NF **ı)** 5 µM NF **i)** 2,5 µM NF **j)** 1,25 µM NF 50

Şekil 15. MTS testi yapılmak üzere 96'lık kültür pleytine ekimi yapılan kontrol ve deney gruplarına ait hücre kültürü görüntüsü. 51

Şekil 16. a) Sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna göre IC_{50} ve EC_{50} değerleri **b)** takizoitlerle enfekte BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna göre IC_{50} ve EC_{50} değerleri. 51

Şekil 17. 24.saatte sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)..... 53

Şekil 18. 24.saatte BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)..... 53

Şekil 19. 24.saatte 1,25 µM NF Deney grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X). 54

Şekil 20. 48.saatte sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)..... 55

Şekil 21. 48.saatte BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)..... 55

Şekil 22. 48.saatte 1,25 µM NF Deney grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X) 56

Şekil 23. 72.saatte sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)..... 57

Şekil 24. 72.saatte BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)..... 57

Şeki 25. 72.saatte 1,25 µM NF Deney grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X) 58

Şekil 26. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80. 64

Şekil 27. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80. 65

Şekil 28. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80. 65

Şekil 29. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5. 66

Şekil 30. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5. 66

Şekil 31. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5. 67

Şekil 32. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1. 67

Şekil 33. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1..... 68

Şekil 34. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1. 68

Şekil 35. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3. 69

Şekil 36. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3. 69

Şekil 37. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3. 70

Şekil 38. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14. 70

Şekil 39. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4,

MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14. 71

Şekil 40. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14. 71

Şekil 41. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1. 72

Şekil 42. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1. 72

Şekil 43. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1. 73

Şekil 44. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2. 73

Şekil 45. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2. 74

Şekil 46. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2. 74

Şekil 47. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5. 75

Şekil 48. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5..... 75

Şekil 49. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5. 76

Şekil 50. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M. 76

Şekil 51. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M. 77

Şekil 52. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M. 77

Şekil 53. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GAPD, GUSB, HPRT1, PPIA, RPL13A. 78

Şekil 54. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A. 78

Şekil 55. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A. 79

Şekil 56. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80. 80

Şekil 57. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80. 80

Şekil 58. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80. 81

Şekil 59. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5. 81

Şekil 60. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5. 82

Şekil 61. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5. 82

Şekil 62. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1. 83

Şekil 63. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1..... 83

Şekil 64. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1. 84

Şekil 65. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3. 84

Şekil 66. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3. 85

Şekil 67. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3. 85

Şekil 68. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14. 86

Şekil 69. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14. 86

Şekil 70. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14. 87

Şekil 71. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1. 87

Şekil 72. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1. 88

Şekil 73. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1. 88

Şekil 74. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2. 89

Şekil 75. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2. 89

Şekil 76. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2. 90

Şekil 77. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5. 90

Şekil 78. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5..... 91

Şekil 79. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5. 91

Şekil 80. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M. 92

Şekil 81. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M. 92

Şekil 82. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M. 93

Şekil 83. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A. 93

Şekil 84. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A. 94

Şekil 85. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A. 94

Şekil 86. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80. 95

Şekil 87. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80. 96

Şekil 88. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80. 96

Şekil 89. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5. 97

Şekil 90. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5. 97

Şekil 91. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5. 98

Şekil 92. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1. 98

Şekil 93. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1..... 99

Şekil 94. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1..... 99

Şekil 95. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3. 100

Şekil 96. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3. 100

Şekil 97. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3. 101

Şekil 98. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14. 101

Şekil 99. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14. 102

Şekil 100. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14. 102

Şekil 101. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1. 103

Şekil 102. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1. 103

Şekil 103. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1. 104

Şekil 104. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2. 104

Şekil 105. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2. 105

Şekil 106. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2. 105

Şekil 107. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5. 106

Şekil 108. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5..... 106

Şekil 109. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5. 107

Şekil 110. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, GAPD. 107

Şekil 111. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M. 108

Şekil 112. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M. 108

Şekil 113. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A. 109

Şekil 114. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A..... 109

Şekil 115. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A. 110

Şekil 116. ▲,1:1oranında dilüsyon,●, 1:10 oranında dilüsyon, *,1:100 oranında dilüsyon, ■,1:1000 oranında dilüsyon, ♦,1:10000 oranında dilüsyon, ⁂, 1:100000 oranında dilüsyon, □, 1:1000000..... 112

Şekil 117. Dilüsyonu yapılan örneklerin B1 primerine göre standart eğrisi..... 112

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Toksoplasmosis, zorunlu hücre içi protozoan parazit olan *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu yaygın bir hastalıktır. Apicomplexa infraphylumunda yer alan *T. gondii*, sıcakkanlı tüm omurgalıları enfekte edebilen parazittir (Blume ve Seeber, 2018; Montazeri ve ark., 2018). Dünyadaki insanların yaklaşık üçte birinin kronik olarak *T. gondii* ile enfekte olduğu bildirilmiştir (Kato, 2018). Toksoplasmosis seroprevalansı, Uzak Doğu'daki bazı ülkelerde en düşük % 1, Avrupa ve Güney Amerika ülkelerinin bazı bölgelerinde en yüksek % 90 seviyesine kadar farklılık göstermektedir (Fallahi ve ark., 2018). İnsanlarda toksoplasmosis temel olarak; çiğ veya az pişmiş etlerdeki doku kistlerinin alınması ve/veya ookistlerle kontamine olmuş yiyecek, su, sebze, meyve vb. tüketimi ile bulaşır (Montazeri ve ark., 2018). Aynı zamanda, hamilelik sırasındaki anneden fetüse konjenital geçiş, organ nakli, kan transfüzyonu ve sporlanmış ookistli tozun yutulmasıyla enfeksiyona sebep olmaktadır (Blume ve Seeber, 2018; Montazeri ve ark., 2018).

İnsan sağlığı için büyük bir problem olan konjenital toksoplasmozis, fetustan erişkinliğe kadar süregelen ciddi kliniklere neden olmaktadır (Carlier ve ark., 2012; Robert-Gangneux ve Darde, 2012; Su ve ark., 2012; Diakoua ve ark., 2013; Halonen ve ark., 2013; Pittman ve ark., 2014; Wujcicka ve ark., 2014; Lau ve ark., 2016). Doğum sonrası süreçte *T. gondii* enfeksiyonu, körlüğe, korioretinite, zeka geriliğine, kalp ve beyin bozukluklarına, kalıcı nörolojik hasara ve ölüme neden olacak kadar ciddi neonatal malformasyonlar gibi çok çeşitli klinik belirtilerle ortaya çıkabilmektedir (Chaudhry ve ark., 2014). Enfeksiyonun kronik ve akut döneminde makrofajlar, dentritik hücreler ve nötrofiller gibi bağışıklık sistemi hücrelerinden sitokinler ve kemokinler salınmaktadır. Bu sitokin ve kemokinlerin salınımı Toll-like reseptörler (TLR) bağımlı sinyal mekanizması ile gerçekleşmektedir. TLR, doğal immun sistemin patojenler ile ilk

karşılaşma aşamasında kilit rol oynayan protein yapılardır. Bu reseptörler sayesinde doğal immun sistem patojenlerin yapısını tanır ve inflamatuar yanıtı başlatır. Bu reseptörler aynı zamanda doğal immun sistem ile edinilmiş immun sistem arasında da köprü görevi görmektedirler (Gazzinelli ve ark., 1993; Kundakcı ve Pirat, 2012).

Günümüzde kongenital bulaşmada bu adaptör moleküller ve onların izledikleri yolaklar hakkında pek fazla bilgi bulunmamakla birlikte, özellikle toksoplasmozis tedavisinde kullanılacak ilaçların yüksek etkinlikli ve düşük toksititeye sahip olmaları istenmektedir. Bu nedenle kullanılacak ilaçların toksitelerinin belirlenmesi ve immun cevabın oluşması sırasında meydana gelen reaksiyon yolaklarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Nitrofurantoin'in toksoplasmosisle mücadelede kullanılan etkin dozajının uyardığı TLR yolağındaki moleküllerin bilinmesi, hastalığın tedavisinde alternatif bir yöntem olarak bu moleküller üzerinden etki eden, daha az yan etkili ve geniş kullanım alanlı yeni preparatların geliştirilebileceği hipotezini doğurmuştur. Bu hipotez kapsamında, *T. gondii* ile enfekte insan trofoblastik koriokarsinom hücresi olan BeWo hücre hattında, doğal bağışıklık ile kazanılmış bağışıklık sistemleri arasında önemli rol oynayan TLR ait sinyal yolağına gebelerde kullanılabilen nitrofurantoinin (NF) etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Toxoplasma gondii, ilk kez 1900 yılında Java serçesinin hemotopoetik sisteminde görülmüştür ve *Haemamoeba danilewskyi*'nin çoğalan formu olduğu belirtilmiştir (Özcel, 2007).

Toxoplasma gondii'de geçen toxon kelimesinin Yunanca yay anlamına gelmesi ve parazitin görünümünün yaya benzemesi özellikle parazitin isimlendirilmesinde etkili olmuştur (Nicolle ve Manceaux, 2009). 1908 yılında, Charles Nicolle ve L. Manceaux isimli araştırmacılar, *Ctenodactylus gondii* isimli kemiricinin karaciğer, dalak ve kemik iliğinde *T. gondii*'yi saptamışlardır. 1908 yılında Splendore tarafından tavşanda ve 1910 yılında Mello tarafından evcil bir köpekte *T. gondii* tespit edilmiştir. İlk insan olgusu ise 1923'de Prag'da bir bebeğin gözünden alınan örnekte tespit edilmiştir. 1928 yılında, Levadity, Schsen ve Sanches isimli araştırmacılar bradizoit doku kistini tanımlamışlardır. Hastalık, ilk kez 1939 yılında ABD'de Wolf, Cowen ve Paige tarafından bir bebekte tespit edilmiştir (Nicolle ve Manceaux, 2009).

1942 yılında Sabin; hidrosefali, mikrosefali, korioretinid ve intraserebral kalsifikasyon olmak üzere toksoplasmozisin dört klinik belirtisini gözlemlemiştir. 1945'de ise Kean ve Grocott tarafından ilk defa asemptomatik kişilerdeki *T. gondii*'ye ait doku kistleri tespit edilmiştir (Nicolle ve Manceaux, 2009). Kronik enfeksiyonlardaki asemptomatik kistler ise Plaut tarafından 1946 yılında otopsi sonucunda tespit edilmiştir. 1948 yılında hastalığın tanısında; Sabin ve Feldman tarafından serumda anti-toksoplazma antikorlarını belirleme prensibine dayanan Dye testinin ve yine Frenkel tarafından ise alerjik reaksiyonlara neden olan alerjenlerin belirlenmesi esasına dayanan deri testinin kullanılabileceği ortaya konulmuştur. Dye testi 1949'da kullanılmaya başlanmıştır. 1951 yılında *Toksoplazma*'nın hidrosefaliye sebep olduğunu Frenkel ve Friatlander

ortaya koymuşlardır. 1953 yılında Eyles ve Coleman sülfanamidlerin primetaminlerle sinerjik etki göstererek takizoitlerin bölünmesine karşı etkili olduklarını tespit etmişlerdir (Nicolle ve Manceaux 2009).

Türkiye'de ise *T. gondii*'ye ait ilk insan olgusu Unat ve arkadaşları tarafından 1953'de bildirilmiştir (Dubey, 2008). 1956 yılında Siim ve Beverley tarafından ve 1958 yılında Beatie tarafından yapılan çalışmalarda lenfadenopatinin toksoplamoziste en sık karşılaşılan belirti olduğu bildirilmiştir. 1957 yılında ise Hardley ve Marshall, koyunlarda toksoplamozisi teşhis etmişlerdir. 1958 yılında *T. gondii*'nin hücre içerisinde endodiyogoni ile çoğalması Goldman tarafından tanımlanmıştır. 1960 yılında Remington Jacobs ve Melton tarafından toksoplasmozisin hayvan etinden insana bulaşabileceği belirtilmiştir. 1968'de Remington tarafından kandaki IgM antikorlarının tespitini kolaylaştırmak amacıyla testler geliştirilmiştir. 1970 yılında ise Dubey *T. gondii* ookistlerinin morfolojisini tanımlamıştır (Dubey, 2008). 1972 yılında, insanların ookistlerle teması sonucu bulaşan toksoplasmozise karşı alınması gereken önlemler Frenkel ve Dubey tarafından belirtilmiştir (Dubey, 2008).

1973 yılında Frenkel tarafından *T. gondii*'nin hayat döngüsünde yer alan takizoit ve bradizoit formları tanımlanmıştır. 1973-1978 yıllarında Thalhammer tarafından Avusturya ve Fransa'daki gebe kadınlarda yapılan taramalarda konjenital toksoplasmozisi azaltmak için proflaktik tedavi uygulanmıştır. 1976 yılında Dubey ve Frenkel tarafından, doku kistleri ve bradizoitlerin gelişimi, yapısı ve morfolojisi ile ilgili detaylı çalışmalar ilk defa yapılmıştır. AIDS'li hastaların toksoplasmozise karşı duyarlılığı ilk kez 1983 yılında Luft tarafından araştırılmıştır (Nicolle ve Manceaux, 2009). Wilkins ve O'Connell 1983 yılında koyunlardaki *T. gondii* kaynaklı fetal kayıpları azaltmak için ticari bir aşı geliştiririrken, Waldeland ve Frenkel tarafından ise ara konaklar için Ts-4 aşısı geliştirilmiştir. 1986 yılında yaptığı araştırmalarla Dubey, enfekte etlerdeki *T. gondii*'yi yok etmek için uygulanan pişirme ve dondurma işlemlerindeki sıcaklık eğrilerini belirlemiş ve 72^0C'nin öldürme derecesi olduğunu saptamıştır. 1988 yılında Dubey ve Beattie tarafından koyunlardaki ve tarım ürünlerindeki olumsuz etkinin nedeninin *T. gondii* kaynaklı olduğu belirtilmiştir. *T. gondii* DNA'sını tespit edebilmek amacıyla 1989 yılında Burk tarafından B1 geni kullanılarak PCR testi geliştirilmiştir (Nicolle ve Manceaux, 2009).

1991 yıllında Frenkel, kedilerin dışkılarıyla atılan ookistlerin etkisini azaltabilmek amacıyla T-263 aşısını geliştirmiştir. 1995'de Dubey tarafından serolojik testlerle parazite ait ilk doğrulama gerçekleştirilmiştir. 2000 yılında Cole tarafından yapılan araştırmalar sonucunda, *T. gondii*'ye bir deniz memelisi olan su samurunda rastlanmıştır (Nicolle ve Manceaux, 2009).

2.2. Sistematik

Toxoplasma gondii'nin taksonomik sınıflandırması aşağıdaki gibidir (Meissner ve ark., 2002).

Bölüm	**:**	Eukaryota
Alem	**:**	Protozoa
Şube	**:**	Myzozoa
Alt Şube	**:**	Apicomplexa
Sınıf	**:**	Conaidasida
Alt Sınıf	**:**	Coccidiasina
Takım	**:**	Eucoccidiasina
Alt Takım	**:**	Eimeriorina
Aile	**:**	Sarcocytidae
Alt Aile	**:**	Toxoplasmatinae
Tür	**:**	***Toxoplasma gondii***

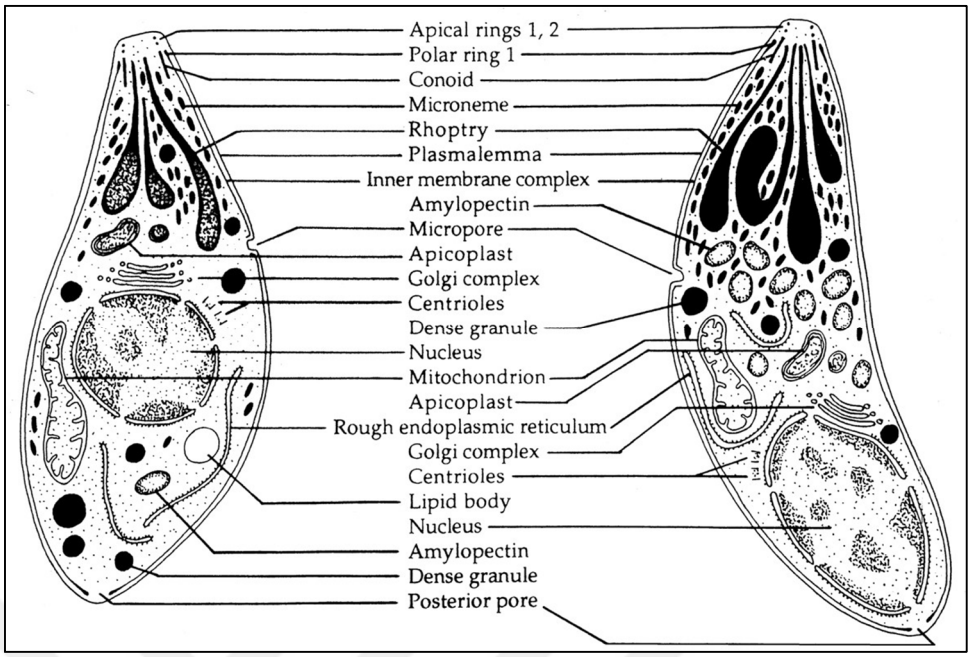
2.3. MORFOLOJİ

Toxoplasma gondii, zorunlu hücre içi apikoplasta sahip bir apicomplexan protozoon parazitdir. Parazitin, hızlı bölünen invaziv takizoit, yavaş bölünen ve doku kistinde yaşayan bradizoit ve serbest tabiattaki ookist formu vardır. Takizoit, bradizoit ve sporlanmış ookistler (2 adet sporokist ve her bir sporokist içerisinde de 4'er adet sporozoit olmak üzere, sporlanmış bir ookistte toplam 8 adet sporozoit bulunmaktadır)

enfektedirler. Özetle *T. gondii*'nin 3 enfektif gelişme dönemi bulunmaktadır (Roos ve ark., 1999).

2.3.1. Takizoitler (Trofozoitler)

Takizoitler, 4-8 µm uzunluğunda, 2-4 µm eninde olup hilal veya muz şeklindedir. Parazitin bir ucu sivri diğer ucu küttür ve çekirdek bu uca daha yakındır (Unat ve ark., 1995: 601-620). Trofozoit olarak da isimlendirilmekte olup aseksüel dönemde görülmektedirler. Yaşamak ve çoğalmak için hücre içinde yerleşimi tercih ederler. Konak içinde endodyogeni ile ikiye bölünerek çoğalırlar (Frenkel, 1988). Takizoiti dışardan çevreleyen hücre zarı üç katlı membrandan oluşur. Dışta bulunan membran daimi yapıya sahip olup hücrenin hareketiyle değişiklik göstermemektedir. Fakat içteki iki katlı yapı değişerek parazitin kutup halkası adı verilen oluşumlarını meydana getirir. Hücre zarının altında 22 adet mikrotübül bulunur. Bu mikrotübüller plazma membranı boyunca uzanır ve hücrenin hareketiyle ilgili oldukları bülinmektedir (Kuman ve Altıntaş, 1996). Takizoitlerin ön veya sivri ucunda, kesik koni biçiminde, parzitin beslenmesinde konak hücresine girişinde sekresyonların salgılanmasında görev aldığı düşünülen yapıya konoid denilmektedir. Konoidin arkasında rhoptri adı verilen ince uzun kesecikler halindeki yapılar bulunmaktadır. Takizoit sitoplazması içinde ER, golgi aygıtı, mitekodriler ve küçük vesikül yapıda mikronemler bulunmaktadır. Bu mikronemler parazitin konak hücresi içerisine giriş esnasında sekresyon ve ekskresyon görevini üstlendikleri ve içeriklerini vakuole boşalttıkları düşünülmektedir (Pfefferkorn, 1996).

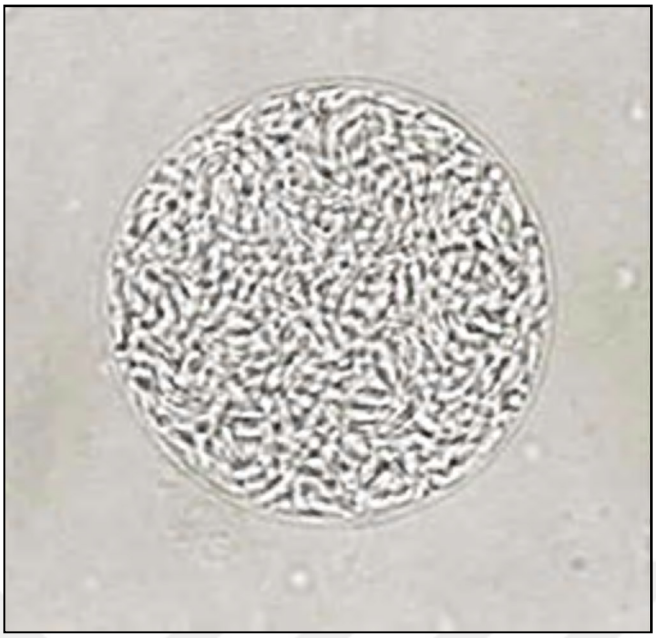


Şekil 1. *Toxoplasma gondii* trofozoiti (Dubey ve ark., 1998).

2.3.2. Bradizoit (Kistler)

10-120 µm büyüklüğündeki bradizoitler, parazitin hücre içine girdikten sonraki dönemde, hücresel immun cevabın meydana gelmesinin ardından oluşan ve doku kistlerinin içinde yavaş çoğalan formudur. Takizoitlere benzerlik gösterseler de çekirdeklerin arkada olması, birçok glikojen vakuolü içermeleri ve PAS boyası ile kuvvetli boyanmaları ile birbirlerinden ayrılırlar (Kara, 1997).

Bradizoitler her çeşit dokuda oluşabilmektedirler. Fakat daha çok sinir sisteminde, gözün retina katmanında ve kaslarda görülürken, bazen bu yapılar içerisinde yıllarca latent halde kalabilirler. Özellikle immun sistemi baskılayıcı ilaç tedavisi gören kişilerde, organ nakli yapılan kişilerde, kişinin direncinin kırıldığı dönemlerde, kanserli hastalarda ve AIDS'lilerde çeşitli sebeplerden dolayı yeniden aktive olabilmektedirler (Montoya ve ark., 2000).

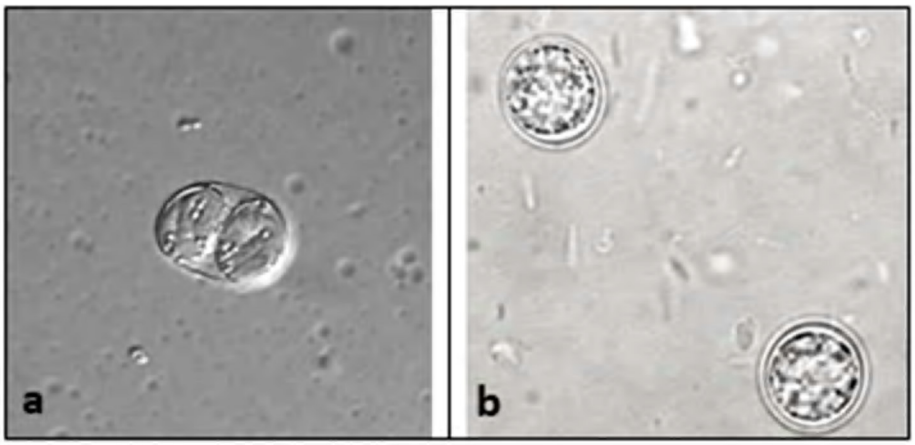


Şekil 2. Fare beyninde bulunan doku kisti içindeki bradizoitler (Meissner ve ark., 2002)

2.3.3. Ookistler

Ookistler 11-14 µm x 9-11 µm boyutlarındadır. Kedi ve kedigillerin bağırsaklarında gerçekleşen eşeyli üreme sonucunda meydana gelir ve dışkıyla dışarı atılır. Her bir ookist içerisinde 2 sporokist bulunur. Her bir sporokist ise 4 sporozoit içermektedir. Ookist duvarı çok katlı tabakalardan oluşmaktadır ve bu yapı çevresel faktörlerden korunmasına katkı sağlamaktadır. Ookistler kedi dışkısı ile dışarı atıldıktan sonra uygun hava ve nem koşullarında enfektif hale gelmektedir. Dış ortama atılan ookistin sporlanmasıyla meydana gelen bu sürece 'sporulasyon' adı verilmektedir (Ho-Yen DO, 1992).

Sporlanmayan ookistler ise enfektif değildir. Kediler son konak (ana konak), diğer tüm sıcakkanlı hayvanlar ise ara konaktır. Ookistler, kedi dışında hiçbir hayvanda oluşmamaktadır (Özcan, 1998).



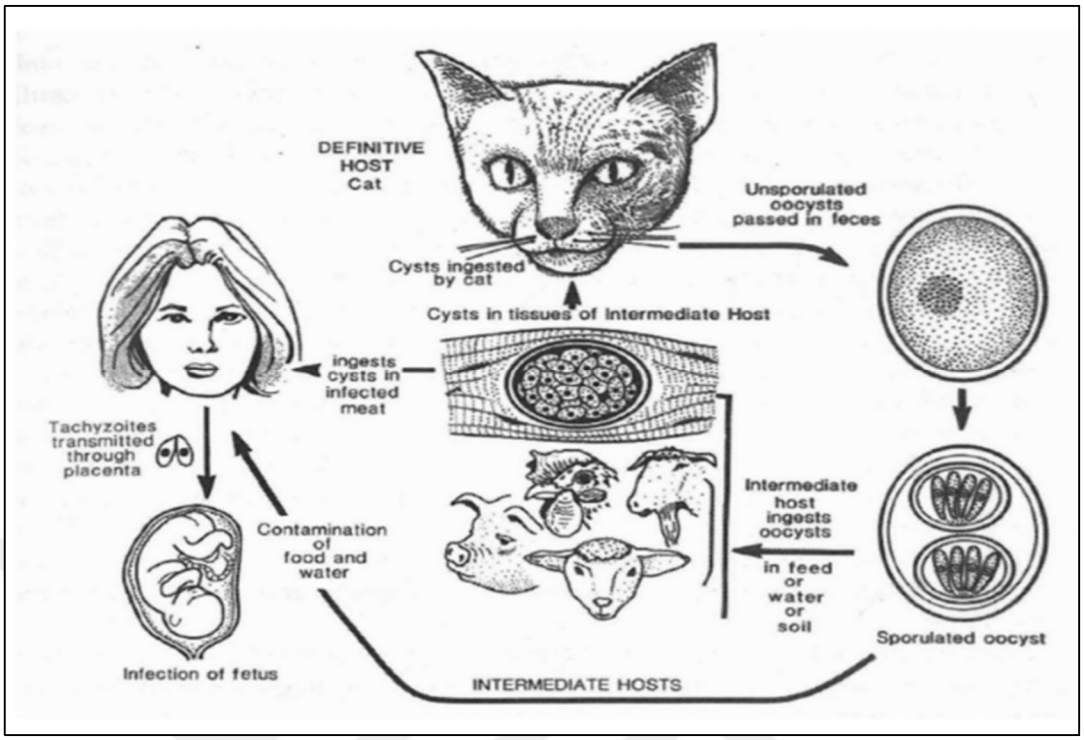
Şekil 3. a: Sporlanmış *T. gondii* ookisti, **b:** Sporlanmamış *T. gondii* ookisti (https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplamosis/index.html).

2.4. Hayat Döngüsü

Toxoplasma gondii'nin hayat döngüsünde, ara konak vücudunda doku kistleri yer alır. Kistler içindeki takizoitler kronik enfeksiyon sonucunda bradizoitlere dönüşürler. Son konak olan kedi ve kedigillerdeki hayat döngüsünde, aseksüel ve seksüel olmak üzere 2 dönem görülebilmektedir. Parazitin sporogoni gelişme dönemi ise serbest tabiatta geçer. Aseksüel dönemde merogoni ile merozoitler; seksüel dönemde gametogoni ile gametler; ookist ve ookistlerin içinde sporogoni ile de sporozoitler oluşur. Seksüel dönem sadece son konak olan kedi ve kedigillerde oluşmaktadır (Afonso ve ark., 2006, Saygı ve Miman, 2018). Parazitin, kedinin incebağırsak epitel hücrelerine girmesi ile enterik faz gerçekleşir. Bu fazda sporozoitlerin trofozoite dönüşümü parazitoforik vakuolde gerçekleşir. Parazitik vakuol içerisindeki trofozoitler, endodiyogoni ile bölünerek çoğalmaya başlar. Bir trofozoitten yaklaşık olarak 2-40 merozoit oluşur. Enfeksiyonda 3-15 gün sonra merozoitlerin bazıları yeni hücreleri invaze eder. Sayıları giderek artan merozoitler hücreyi parçalayarak yeni hücreleri enfekte etmeye başlar (Dubey, 1998). Hücre içerisine giren merozoitlerden, mikrogametosit ve makrogametosit oluşur. Oluşan her bir mikrogametositten 12 mikrogamet meydana gelir. Hücre içindeki mikrogametin, makrogameti döllemesi sonucu zigot meydana gelir. Oluşan zigottan şekillenen ookistler kedigillerin bağırsak lümenine atılırlar. Dışkı ile dış ortama atılan ookistler 2-5 gün içinde, uygun ısı, nem ve oksijen varlığında sporlanırlar. Bu dönemde her bir ookistin içinde 2 sporokist, her bir sporokistin içinde de 4 sporozoit meydana

gelmesiyle ookistler enfektif hale gelir (Ferguson, 2002). Uygun ısı ve oksijen varlığında sporulasyon 1-21 gün sürmektedir. Bu sürenin +24 ^{0}C'de 3 gün, + 15 ^{0}C'de 5-8 gün, +11 ^{0}C'de 14-21 gün olduğu bildirilmiştir. +4 ^{0}C'nin altında, +37 ^{0}C'nin üstünde sporulasyonun durduğu ve ookistin nemli toprakra 18 aya kadar canlı olduğu gözlemlenmiştir (Remington ve ark,. 1992).

İnsan ve diğer ara konaklar, sporlanmış ookistlerin alınmasıyla olabildiği gibi doku kisti içeren etlerin iyi pişmeden veya çiğ olarak tüketilmesiyle, akut dönemde vücut sıvılarıyla veya ookistlerle enfekte olabilmektedirler. Ağızdan alınan sporlanmış ookistlerin ince bağırsakta açılmasıyla içerisindeki sporozoitler serbest kalır. Her bir sporozoit intestinal epitel hücreler içine girerek çoğalmaya başlar. Epitel hücreyi aşan parazit, makrofajlar tarafından fagosite edildiğinde immun sistemden korunup vücudun her yerinde enfeksiyon oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Duncanson ve ark., 2001; Saygı ve Miman, 2018). Eğer konak mekanızması tarafından yok edilmezlerse sporozoitlerin her biri intestinal epitel hücrelerine girer ve orada endodiyogeni ile çağalırlar. Konak hücreleri içinde çoğalan takizoitler immun sistem baskısıyla bradizoitlere dönüşerek doku kistlerini oluşturmaktadır. Doku kistleri konak vücudunda daha çok kronikleşince kalp, beyin, iskelet ve kalp kaslarında oval veya yuvarlak şekilde görülmektedir. Doku kistlerinin içerisinde yer alan bradizoitler, insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonun latent veya kronik hale geçmesinde ve enfeksiyonun uzun yıllar devam etmesinde rol oynamaktadırlar. Doku kistlerini içeren sıcak kanlı hayvan ve kuşların etlerini çiğ olarak tüketen insanların veya hayvanların ince bağırsaklarında serbest kalan parazitler bağırsak epitel hücrelerinin içerisine girerek çoğalırlar (Linday ve ark, 1991).



Şekil 4. *Toxoplasma gondii*'nin hayat döngüsü (Dubey, 1998).

2.5. Epidemiyoloji

Dünyanın farklı bölgelerinden *T. gondii* seroprevalansı bildirilmiştir. Dünya nüfusunun yaklaşık olarak % 30'unun parazit ile enfekte olduğu düşünülmektedir (Leport ve Remington, 1992; Jones ve Dubey, 2010). Toksoplamosis prevalansı, her bölgede ve bölgelere ait yemek yeme alışkanlıklarına bağlı olarak erişkin birey popülasyonunda % 10 - 90 arasında değişiklik göstermektedir (Tenter ve ark., 2000; Meireles ve ark., 2015). Çocuklar, coğrafik ve çevresel koşullara bağlı olarak değişen hijyenite nedeniyle daha fazla etkilenmektedir (Stagno ve ark., 1980; Meireles ve ark., 2015).

Dünyada 438 toksoplamosis salgını bildirilmiştir (Meireles ve ark., 2015). Bunların içinden bildirilen 38 salgının; 8'inin (% 21) su kaynaklı, 10'unun (% 26,3) toprakla temas kaynaklı, 2'sinin (% 5,3) kontamine sebze tüketimi kaynaklı, 17'sinin (% 44,7) çiğ veya az pişmiş et tüketimi kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Kist ile kontamine çiğ veya az pişmiş et tüketimine bağlı salgınlar Avusturalya, Brezilya, Kanada, Kore ve Amerika'dan; ookistle kontamine su kaynaklı salgınlar Kanada'da ve Brezilya'dan; çiğ

keçi sütü tüketimine bağlı salgınlar Brezilya, Amerika ve Birleşik Krallık'tan bildirilmiştir (Meireles ve ark., 2015).

Aynı zamanda hastalık oranları Doğu Avrupa'da % 87, Afrika'da % 71, Kuzey Amerika'da % 33, Karayipler'de % 26, İsveç ve İskoçya'da % 12 olarak tespit edilmiştir (Altıntaş, 1997; Robert-Gangneux ve Darde, 2012).

Türkiye'deki insan nüfusunun üçte biri seropozitiftir. Fakat konjenital toksoplasmosis oranı hakkında ve 12 yaş ve altındaki çocuklarla ilgili pek bilgi bulunmamaktadır. 14-18 yaşındaki okul çocuklarında ise büyük bir akut toksoplasmosis salgını bildirilmiştir (Koloren ve Dubey, 2019). Diğer yandan toksoplasmosisin prevalansı, yatan hastalarda, et endüstrisinde veya hayvanlarla temas halindeki çalışanlarda, asemptomatik hastalarda, homoseksüellerde ve hemodiyaliz hastalarında sırasıyla % 13,9-% 85,3; % 20,7-% 57,6; % 23,0-% 43,7 ve % 16,3-% 76,6 oranlarındadır (Saygı ve Miman, 2018).

Türkiye'de hayvanlardaki toksoplasmosisin prevalansı, evcil kedilerde % 43 (İnci ve ark., 1996); köpeklerde % 68,57 (İnci ve ark., 1996); atlarda % 1,9 (İnci ve ark., 1996); sığırlarda % 66 (İnci ve ark., 1999); koyunlarda % 33,76; keçilerde % 63,2 (Babur ve ark., 1997); kümes hayvanlarında % 1,66 (İnci, 1998) ve av kuşlarında % 9,09 (İnci ve ark., 2002) olduğu tespit edilmiştir. Bu oran hayvanlardaki toksoplasmosisin genel prevalansının % 39,5 ile % 78 arasında değişmekte olduğunu göstermektedir (İnci ve ark., 2018).

2.6. Klinik

Toksoplamosis sağlıklı bireylerde çoğunlukla asemptomatiktir ve ciddi klinik sorunlara neden olmaz. Fakat dokulara yerleşen parazit kist formunda dormant halde kalıp, immunsupresyonla yeniden aktifleşebilmektedir. Immunsuprese hastalarda, organ yetmezlikleri, ensefalit, koriyoretinit ve sonunda ölümle sonuçlanabilen ciddi tablolar gelişebilir (Zamboni ve Lima-Junior, 2015).

2.6.1. Konjenital Toksoplasmozis

1953 yılında Feldman yaptığı bir çalışmada; 103 olgudan % 99'unda göz bulgusu, % 63'ünde kranial kalsifikasyon, % 56'sında psikomotor gelişme geriliğini bildirmiştir. Böylece maternal toksoplasmosisin, konjenital toksoplasmosise neden olabileceğini

göstermiştir (Kim ve Weiss, 2004). Hamilelik sırasında geçirilen enfeksiyon fetusa transplasental yolla bulaşarak ağır santral sinir sistemi hasarına, düşük ve ölü doğum gibi komplikasyonlara neden olabilmektedir. Ancak hamilelik sonrası sağlıklı doğan bebeklerde yaşamın ileri yıllarında ciddi görme sorunlarına neden olabilir. Gebeliğin ilk trimesterinde geçirilen enfeksiyonlarda fatal enfeksiyon riski % 10-25, ikinci trimesterinde % 30-50, üçüncü trimesterinde ise % 60-70 arasındadır. Maternal enfeksiyonlardaki fetal hasarın, hamileliğin 26. haftasından önce geçirilen enfeksiyonlarda daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Gürüz, 2007; Saygı ve Miman, 2018).

2.6.2. İmmün Sistemi Baskılanmamış ve Baskılanmış Kişilerde Toksoplasmosis

Akut toksoplasmosisin immun sistemi sağlam kişilerde en yaygın klinik belirtileri lenfadenopati (LAP) ve halsizlik (% 65) olarak bilinmektedir ve lenfadenopati en sık boyun bölgesinde görülmektedir. Toksoplasmosis klinik bulgu veren lenfadenopatilerin %5'inden sorumlu tutulmaktadır. Hastalık, ateş, halsizlik, gece terlemeleri, kas ve boğaz ağrısı, hepatosplenomegali, dolaşımda atipik lenfositle birlikte görülebilmektedir. İmmün sistemi sağlam erişkinlere benzer şekilde hamilelerde akut toksoplasmosisin asemptomatik seyrettiği ve nadiren LAP geliştiği belirtilmektedir. Bu sebeple sessiz seyreden enfeksiyon konjenital toksoplasmosis riskini ortaya koymaktadır (Gürüz ve Delibaş, 2007).

*Toxoplasma gondii'*nin doku kistleri konağın yaşamı boyunca ve özellikle immun sistemin zayıfladığı durumlarda ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Hodgkin lenfoma gibi hematolojik kanserlilerde ve immun sistemi zayıf kimselerde reaktivasyonun önlenmesi oldukça zordur. Bu nedenle hastalarda görülen ateş, halsizlik, hemiparezi, kranial sinir felçleri, epileptik konvülzyonlar, serebellar bulgular, konfüziyon ve koma vs. bulgular bazen maligniteyle ilişkilendirilmekte ve gerçek teşhis konulamamaktadır (Gürüz ve Delibaş, 2007).

2.6.3. HIV ile Enfekte Hastalarda Toksoplasmosis

AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) hastalarının en önemli ölüm sebepleri arasında toksoplazmik ensefalit yer almaktadır. AIDS hastalarında görülen fokal beyin lezyonlarının en yaygın sebebi olarak toksoplamozis kabul edilmekte ve aynı zamanda

ensefalit ve pnömoni gibi ölümcül hastalıklara ve korioretinite neden olduğu bildirilmektedir. Hastalık kendisini, AIDS hastalarında görülen latent enfeksiyonun reaktivasyonuna bağlı olarak hemiparezi (% 39-52), mental durum değişimi (% 30-42), konvülzyon (% 15-29), kranial sinir hasarı (% 7-28), konuşma bozukluğu (% 6-26), serebellar bulgular (% 9-30), meningismus (% 10-16), psikoz, anksiete, demans şeklinde psikomotor bozukluklar (% 30-42) gibi subakut fokal yetmezliklerle göstermektedir (Gürüz ve Delibaş, 2007).

2.6.4. Transplantasyon Hastalarında Toksoplasmosis

Transplantasyon sonrası meydana gelen toksoplasmosis, organ rejeksiyonunu engellemek için yapılan immunosüpresif tedavinin seropozitif alıcıda reaktivasyonu tetiklemesi veya seronegatif alıcıya takılan seropozitif organın serokonversiyona yol açması ile oluşmaktadır. Hastalarda beyin, kalp ve akciğer tutulumu görülmektedir. Organ nakli sonrası görülen ilk bulgu yüksek ateştir. Aynı zamanda toksoplasmosisli hastalarda kemik iliği transplantasyonu sonrasında da en sık görülen bulgu yüksek ateştir. Çoğu hastalarda birden fazla bulgu geliştiği gözlemlenmekte ve bu sebeple ölüm riskinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Gürüz ve Delibaş, 2007).

2.7. Patogenez ve İmmünite

Takizoitler konağa girdiği bölgedeki hücrelerde, doku kistinin ağız yoluyla alımından sonra serbestleşen bradizoitler ve sporozoitler intestinal epitel hücrelerinde çoğalırlar. Konağın toksoplasmosisi kontrol altına alması parazitin hücre içinde yaşayarak humoral immun yanıttan kaçabilmesi nedeniyle zordur (Gürüz ve Delibaş, 2007).

*Toxoplasma gondii'*ye karşı bağışıklık yanıtı enfeksiyon etkeniyle ilk kez karşılaşılan akut dönem, ikincisi ise çeşitli dokulara yerleşmiş olan kistlerdeki etkenin tekrar aktive olmasıyla oluşan dönem olmak üzere iki dönemde ortaya çıkmaktadır. Her iki dönemde de konak bağışıklığında görev alan hücreler makrofajlar, dendritik hücreler ve nötrofillerdir. Bu hücreler *T. gondii* ile karşılaşınca T hücrelerinden ve NK hücrelerinden IFN-γ sentezlenmesine ve salınmasına yol açan yol açan IL-12 sentezi yapmaktadır. Bu sitokinin salgılanması, makrofajlar ve dentritik hücreler dahil olmak üzere pek çok hücre tipi tarafından eksprese edilen kemokin reseptörü olan CCR5 ve

patojen bağlantılı moleküler kalıpları (PAMP) tanıyan en az 13 proteinden oluşan TLR bağımlı sinyal mekanizması ile meydana gelmektedir (Gazzinelli ve ark., 1993).

2.8. Toll-Like Reseptörler

TLR, doğal immun sistemin patojenler ile ilk karşılaşmasında kilit rol oynayan protein yapılardır. TLR'ler sayesinde doğal immun sistem patojenlerin yapısını tanıyarak inflamatuar yanıtı başlatır. Aynı zamanda bu reseptörler doğal immun sistem ile edinilmiş immun sistem arasında köprü görevi görür (Kundakcı ve Pirat, 2012). Bugüne kadar TLR ailesinden 13 üye belirlenmiştir. TLR10, TLR12, TLR13'ün ligandları henüz bilinmemektedir (İnci ve Bişkin, 2007).

TLR ailesinin ilk üyesi TLR 1'dir. TLR 1, dalak ve periferal kan hücrelerinden yüksek düzeyde eksprese edilmiştir. TLR 1'in, TLR 2 ile beraber triaçil lipopeptitlere karşı oluşan yanıtta rol oynadığı tespit edilmiştir. TLR 2; hem gram negatif, hem de gram pozitif bakteriler üzerinde bulunan lipoproteinler TLR 2 tarafından tanınmaktadır. Bunun sonucunda hücrelerin aktive etmesinden dolayı TLR'nin lipoproteinleri tanıyan reseptör olduğu kabul edilmiştir (Janeway ve Medzhitov, 2002). Mikoplazma lipoproteinlerinin tanınmasında TLR 6 ile birlikte iş birliği içindedir. TLR 3'ten yoksun farelerde yapılan deneylerde viral RNA kopyasına karşı oluşan cevapların azalması, TLR 3'ün dsRNA'nın tanınmasında rol oynadığını göstermiştir. İnsanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan TLR 4 reseptörleridir. Bu reseptörün lipopolisakkarit reseptörü olduğu ortaya çıkarılmıştır. TLR 4, hücre yüzeyinde CD14, MD-2 ve LPS bağlayıcı protein içeren molekül kompleksini bulundurmaktadır. TLR 5; bakteriyel flagellanın temel yapısal bileşeni olan bakteriyel flagellini tanıyıp bağlanması sonucu TNF-α gibi sinyal oluşturur. TLR 2, TLR 4 ve TLR 6 birçok farklı mikrobiyal ajana cevap veren reseptörler iken, TLR 5 ve TLR 9 tek bir yapıyı tanıyabilen reseptörlerdir. TLR 6, TLR 2 ile heterodimerdir. MALP-2' yi tanımada beraber rol oynarken; aynı zamanda TLR 6, MALP-2 ve BLP arasındaki küçük yapısal farklılıkların tanınmasında da önemli rol oynamaktadır. TLR 7; imiquimod ve R-848 gibi kuvvetli antiviral ve antitümör özelliklerine sahip olan imidazoquinol ailesinin birkaç tipini tanımaktadırlar. TLR 8; endozomal kompartmanda tek zincirli RNA'yı tanıyarak sitokin salınımında rol almaktadır. TLR 9; bakteriyel ve viral, metillenmemiş sitozin fosfat guanozin (CpG) dinükleotitlerini içeren, B hücre proliferasyonunu stimüle

eden ve makrofaj ile dentritik hücreleri aktive ettiği belirlenen sentetik oligodNTP'lerin tanınmasında önemli yer almaktadır. Akciğerlerden ve B lenfositlerden eksprese edilen TLR 10'un fonksiyonu ve ligandı hakkında halen bilgi bulunmamaktadır. TLR 11 (profilin), idrar kesesi epitel hücrelerinden eksprese edilir ve üropatojenik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda yanıtın oluşturulmasında görev alır (Janeway ve Medzhitov, 2002). TLR 11, insanlarda fonksiyonel değildir fakat farelerde karakterizedir. TLR 12, yüksek oranda karaciğer, mesane ve böbrekten eksprese edilir ve TLR 11'e benzer şekilde, üropatojenik bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonlara karşı yanıt vermede görevlidir. TLR 3 ile yakın ilişkili olduğu tespit edilen TLR 13, faredeki TIR (Toll/IL-1 reseptörü) domaine homolog olarak tanımlanmıştır (Janeway ve Medzhitov, 2002).

2.8.1. Toll-like Reseptör Yolağı

Doğal immun sistemde, enfeksiyonun tanımlanmasında PRR'ler (Pattern recognition receptors) kullanılır. PAMP'lar (recognize pathogen-associated molecular patterns) olarak bilinen, mikroorganizmalara özgü moleküler imzaları ve zarar gören molekül kalıpları olarak adlandırılan DAMP'lar (Damage-associated molecular patterns) hasarlı hücrelerden türetilen molekülleri tanırlar. PRR'ler; enflamatuar sitokinler, Tip 1 interferon (IFN) ve diğer molekülleri üreterek doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin indüklenmesini sağlayan 'down flow' sinyal yolaklarını aktive ederler (Turul, 2004).

TLR'ler, hücre yüzeyine, ER, endozom, lizozom veya endolizozom gibi hücre içi organellere lokalize olarak lipit, protein, lipoprotein, ve nükleik asit gibi PAMP'ları tanırlar. TLR'lerin her biri, PAMP'ların tanınmasına aracılık eden bir ektodomain olan lösin açısından zengin tekrarlar (LRR'ler) ve 'down flow' sinyal yolaklarını aktive eden bir endodomain olan sitoplazmik TIR alanından oluşurlar. TLR'ler, PAMP ve DAMP'ların tanınması üzerine, sitokinlerin, kemokinlerin ekspresyonunu düzenlemek için NF-κβ, IRF'lerin veya MAP kinazların aktivasyonu sonucunda sinyal iletim yolaklarını başlatmada görev alan MyD88 ve TRIF gibi TIR alanını içeren adaptör proteinlerini yönlendirilmesini sağlar. Böylece Tip 1 IFN'ler enfeksiyona karşı koruma gerçekleştirirler. TLR sinyal yolağı büyük oranda MyD88'e bağlı ve TRIF'ye bağlı iki yolağa ayrılmaktadır (Botos ve ark., 2011).

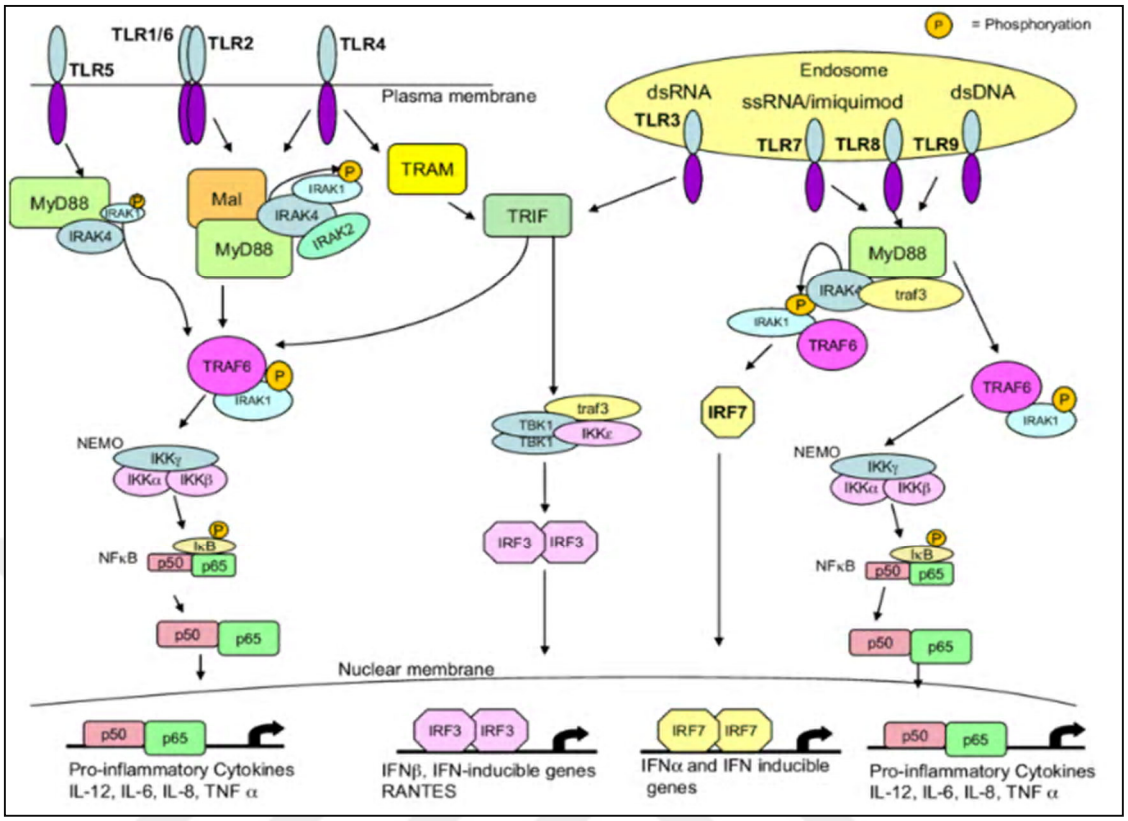
2.8.2. MyD88-Bağımlı Yolak

MyD88, myddsome olarak adlandırılan, IRAK kinaz ailesinin üyeleri ile birlikte bir kompleks oluşturmaktadır. Myddosome oluşumu sırasında, IRAK4, IRAK1'i aktive ederek birkaç bölgede otofosforile edilir ve MyD88'den salınır. IRAK1, RING etki alanı olan E3 ubikitin ligaz TRAF6 ile ilişkilidir. TRAF6, UBC13 ve UEV1A ubikitin konjuge enzimi ile beraber hem TRAF6'nın hem de TAK1 protein kinaz kompleksinin K63 ile bağlantılı poliubitlenmesini sağlar. MAPKKK ailesinin bir üyesi olan TAK1, TAB1, TAB2 ve TAB3 düzenleyici alt birimleriyle birlikte TRAF6 tarafından oluşturulan poliubikuitin zincirleri ile birlikte etkileşen bir kompleks oluşturarak TAK1 aktivasyonunu gerçekleşmesini sağlar. Daha sonra TAK1, IKK kompleksinin, NF-κβ yolağının ve MAPK yolağının aktivasyonu gerçekleştirecek iki farklı yolu aktivasyonunda rol alır (Kawai ve Akira, 2010).

IKK kompleksi, IKKα ve IKKβ katalitik altbirimleri ve düzenleyici alt birim olan NEMO'dan oluşur. Ubikitin zincirleri vasıtasıyla IKK kompleksine bağlanan TAK1, IKKβ'yı fosforile ettirerek etkinleştirir. IKK kompleksi, NF-κβ inhibitör proteini IκBα'yı fosforile ettirir ve NF-κβ'nin proinflamatuar gen ekspresyonunun başlatması için çekirdeğe doğru hareket etmesine yol açar. Ayrıca TAK1 aktivasyonu, AP-1 ailesinde transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna aracılık eden veya inflamatuar yanıtları düzenlemek için mRNA'nın stabilizasyonunda görev alan ve MAPK ailesi üyelerinden olan ERK1/2, p38 ve JNK gibi moleküllerin aktive olmasını da sağlar (Kawai ve Akira, 2010).

2.8.3. TRIF-Bağımlı Yolak

TRIF aktivasyonu, TRAF6 ve TRAF3'ün etkileşmesiyle gerçekleşmektedir. TRAF6, TAK1 kompleksiyle etkileşen ve aktive eden ve NF-κβ ve MAPK'lerin aktivasyonuna ve inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonunu sağlayan kinaz RIP-1'i aktive eder. Aksine TRAF3 ise, IRF3 fosforilasyonunun gerçekleşmesi için IKK ile alakalı kinazlar olan TBK1 ve IKKi'yi NEMO ile birlikte yönlendirir ve sonrasında IRF3 dimer oluşturarak Tip 1 IFN genlerinin ekspresyonunu indüklediği sitoplazmadan çekirdeğe translokasyon yapar (Jiang ve Chen, 2011).



Şekil 5. Toll-like reseptör yolağı (O'Neill ve ark., 2009).

2.9. İmmun Yanıtta Toll-Like Reseptörlerin Yeri

TLR'ler, T ve B lenfositlerden oluşan edinsel immun yanıtı başlatmak için çeşitli mekanizmaları devreye sokarak, mikrobiyal ürünleri tanıyan sensörler gibi görev alırlar. Aktif hale gelen TLR'ler ve bunların intraselüler kısmı aracılığıyla, MAPK ailelerini uyararak NF-κβ; TNF-a, IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünlerin genlerini aktive eder. PRR'ler ile PAMP'ın tanınmasıyla dendritik hücreler olgunlaşır. Periferden lenf nodlarına taşınıp, T hücrelere antijen sunarak, T ve B hücrelerin aktivasyon sürecinde rol alırlar (İnci ve Bişkin, 2007). TLR ile uyarılan dendritik hücreler, T hücrelerini daha etkin bir şekilde uyarılmasını sağlayan ko-stimulan moleküllerin seviyelerini artırır. TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 üretimini ve salınmasını düzenler. IL-12 ile IL-18 sitokinlerini salgılayan dentritik hücreler TH1 hücrelerinin de gelişmesini sağlarlar. TH2 immun yanıtının gelişmesiyle IL-4 ve IL-10'un fazla salınması sonucu B hücreleri uyarılır. Böylece antikor sentezi başlamış olur. Patojenin yok edilmesinde rol oynayan inflamatuar olaylar, TLR ilişkili NF-κβ'nin

aktivasyonu ile salınan enzimler, sitokinler ve çeşitli mediyatörler, konağın antimikrobiyal savunması uyarır. TLR, patojenlerin fagosite edilmesini uyarıp, fagozom içeriğine karşı gelişen inflamatuvar yanıtı güçlendirirerek fagozomun olgunlaşmasına yardımcı olur. Böylece fagosite edilen patojenin yok edilmesi kolaylaşır. Bu nedenle TLR aktivasyonu, patojenlerin konak hücrelerinin fagositozu için önemlidir (İnci ve Bişkin, 2007).

2.10. Parazit Enfeksiyonlarına Karşı Toll-Like Reseptörlerin İmmünitedeki Yeri

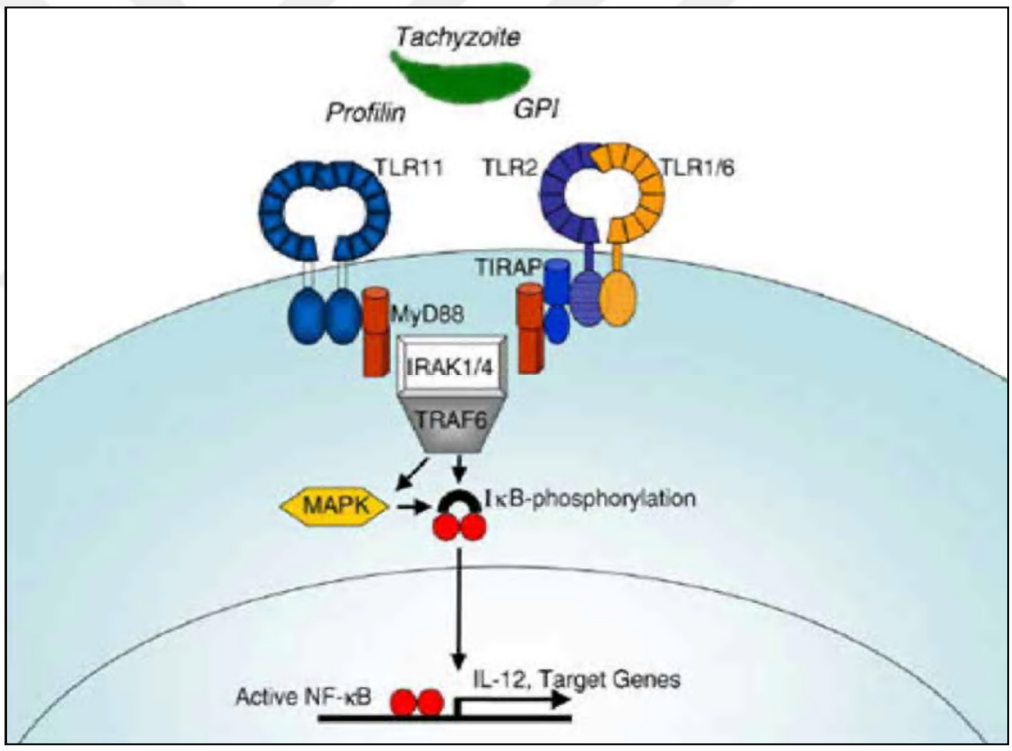
Parazitler, konaklarının metabolik ürünlerini kendi lehine kullanmaktadırlar. Dolayısıyla paraziter enfeksiyonlar gizli seyretmekte ve uzun sürmektedir. Kendi gelişmelerini sürdürebilmek amacıyla *Trypanasoma brucei'*nin EGF ve IFN-γ ve *Leishmania amazonensis'*in IL-2 ve GM-CSF gibi konaklarının büyüme faktörlerini kullandıkları bilinmektedir (Kundakcı ve Pirat, 2012).

Memelilerde saptanmış olan TLR gibi bazı doğal savunma mekanizmaları, mukozal yüzeylerden vücuda giren protozoonlara engel olmaktadır. TLR'ler; patojenlerin fiziksel bariyerlerini geçip hücresel immun yanıtı aktive etmektedirler. PAMP olarak adlandırılan korunmuş moleküler motifleri tanıması sonucu TLR'in bunlara bağlanması, patojene karşı doğal immun sistemin uyarılmasıyla kazanılmış immun cevabın başlaması için gerekli sitokin ve ko-stimulatör moleküllerin üretmesini sağlar. TLR'ler çeşitli protozoon türlerinde saptanmıştır. TLR 2 ve TLR 11; *T. gondii*, TLR 2 ve TLR 9; *Trypanasoma cruzi*, TLR 2 ve TLR 4; *Cryptosporidium parvum*, TLR 9 ve TLR 11; *Babesia bovis* protozoon parazitlere karşı oluşan immun yanıtta görev almaktadır (Özcan, 1998).

Apicomplexa şubesindeki yer alan protozoonlarda, genelde TH1 yanıtına bağlı koruyucu bir immunite gerçekleşir. Fakat parazitler enfekte edecekleri konak hücre membranında meydana getirdikleri ‘moving junction’ sayesinde penetre olurlarken uygun fagozom oluşumunu ve fagozitozun olgunlaşmasını engellemiş olurlar. Bu durumda *Toxoplasma* takizoitlerinin parçalanmasının da önüne geçilmiş olur (İnci ve Bişkin, 2007).

TLR'nin uyarımıyla meydana gelen doğal immun yanıt, kazanılmış immun yanıtın başlatılması için gerekli olan antijen sunan hücrelerin (APC) sitokin ve ko-stimulatör

molekülleri üretmesiyle sonuçlanır. Örneğin, sığır babesiosis'inde yaş direnci olan danalarda, IL-12 ve IL-18 veya *B. bovis* tarafından stimüle olmuş ve IL-12 içeren makrofajları ihtiva eden süpernatantlar ile splenik NK hücreleri uyarılmaktadır. Uyarım sonucunda üretilen IFN-γ ile makrofajların aktivasyonu başlamaktadır. Makrofaj aktivasyonunu kapsayan TH1 hücresel yanıtı birçok protozoer hastalıkta oldukça önemlidir. Aktive edilmiş hücrelerdeki en önemli yıkımlayıcı yollardan birisi nitrik oksit (NO) salınımıdır. NO üretimi sonucunda, NO'nun paraziti öldürmesine bağlı olarak enfeksiyon engellenir ve kazanılmış immunite meydana gelir. Bu veriler, enfeksiyonun kontrolünde kritik öneme sahip olan IL-12 ve IFN-γ aracılığı ile makrofaj aktivasyonunun, kazanılmış bağışıklığın gelişiminin, NO üretiminin doğal immuniteyle olan bağını göstermektedir (İnci ve Bişkin, 2007).



Şekil 6. TLR'in *Toxoplasma gondii*'yi tanıma modeli: Doğal immun hücreler ve özellikle dentritik hücreler, profilin ve glikozilfosfotadillinositol gibi *T. gondii* ile ilgili patojen molekülleri tanıyan TLR11 ve TLR2'yi salgılarlar. TLR2'nin aktive olabilmesi için TLR1 ve TLR6 gerekli iken, NF-κβ'nın aktivasyonu için ise TLR11'in homodimer formasyonu yeterli olmaktadır. Genellikle, TLR aktivasyonu, MyD88 yoluyla IL-12, IL-6 veya tümor nekroz faktör gibi proinfalammatör sitokinlerin üretimine kılavuzluk eder. NF- κβ ve MAP kinaz'ın aktivasyonu sonucu ise IRAK-1, IRAK-4 ve TRAF- salınımı gerçekleşir. TLR11 aktivasyonu *T. gondi*'ye karşı oluşan yanıtta IL-12 üretimini kontrol ederken, TLR2 aktivasyonu bunu yapamamaktadır (Yarovinsky ve Sher, 2006).

2.11. Tanı

Toxoplasma gondii'nin tespiti mikroskobik incelemeye dayanır. Toksoplasmosis tanısında kullanılan ve serolojik yöntemler olarak da bilinen indirekt tanı yöntemleri arasında serumda anti-toksoplazma antikorlarını belirleme esasına dayanan Sabin-Feldman Dye testi, partikül halindeki antijenlerin özgül antikorlarla birleşmesi ve çapraz bağlar oluşturarak kümeleşmesi esasına dayanan modifiye aglütinasyon testi, antikor ilişkisini antikorlara bağlanmış bir enzimin aktivitesini izlemekle araştırma temeline dayanan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ve enfeksiyonun ilk haftasında hızlıca yükselen IgM antikorlarının araştırılmasına dayanan immunosorbent aglütinasyon deneyi (ISAGA), IgG antikorlarını saptamaya dayanan indirek floresan antikor testi (IFAT), *T.gondii*'nin eriyebilen antijenlerini kullanarak tannik asitle duyarlaştırılmış koyun ya da hindi eritrositlerinin antikor varlığında aglütine olması esasına dayanan indirek hemaglütinasyon testi (IHA) gibi çeşitli farklı antijen ve antikor sınıflarını tespit etmek için geliştirilmiştir. *Toxoplasma* tanısında serolojik testlere ek olarak moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerin gelişmesi ile toksoplamozis tanısında PCR tabanlı teknikler uygulanmıştır. Daha hassas ve spesifik sonuçlar veren bu teknikle genellikle çok kopya sayısına sahip genler olan B1 geni, ITS1 ve 18S rDNA bölgelerine ait diziler kullanılmaktadır. Kantitatif real time PCR (RT-qPCR) ile insan kanı, serebrospinal sıvı, aköz hümor, amniyotik sıvı ve diğer örneklerden elde edilen RNA veya DNA tespit edilerek toksoplasmosisin tanısında başarıyla kullanılmaktadır (Erdoğan ve ark., 2019). Ayrıca tanıda çeşitli görüntüleme teknikleri de kullanılmaktadır. Bunlar, konjenital toksoplasmosisin prenatal teşhisi için ultrasonografi (USG), serebral toksoplasmosis teşhisi için bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi tekniklerdir (Liu ve ark., 2015; Saygı ve Miman, 2018).

2.12. Tedavi

Genellikle enfeksiyon asemptomatik bir seyir göstermekte olup, bu nedenle hastalarda çoğu zaman tedaviye gereksinim duyulmamaktadır. Toksoplasmosis'in tedavisi ve

hastalığın takibi, immun sistemi normal ve baskılanmış kişilerde değişiklik göstermektedir (Grossman ve Remington, 1979; Saygı ve Miman, 2018).

2.12.1. İmmun Sistemi Normal Kişilerde Toksoplasmosisin Tedavisi

İmmun sistemi normal olan kişilerde beyin, kalp, akciğer ve karaciğer gibi hayati organlar etkilenmediği sürece tedavi önerilmemektedir. Akiz toksoplasmosis ensefaliti gelişen immun sistemi normal kişilerin tedavisinde, 25 mg/gün pirimetamin ve 6-8 mg/gün sülfadiazin kombinasyonunun 2-4 hafta veya daha uzun süreyle kullanılır (Georgiev, 1994; Özcel, 2007: 141-184). Toksoplasmik hepatit tedavisinde ise ilk 10 gün 2 g/gün spiramisin ve 4 g/gün sülfadiazin, ikinci 10 günde ise 2 g/gün spiramisin ve 50 g/gün pirimetamin tedavisinin başarılı olduğu belirtilmiştir. Deri toksoplasmosisinde klasik tedaviden sonra 2-3 g/gün spiramisin veya 2 g/gün klindamisin veya 2x960 mg/gün kotrimaksazol kullanımının önerildiği belirtilmiştir (Özcel, 2007).

2.12.2. İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda Toksoplasmozis Tedavisi

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda oluşan akut toksoplasmosisin tedavisi, en az 4 hafta süreyle, şiddetli seyreden olgularda ise 6 hafta veya daha uzun süreyle 25-100 mg/gün pyrimetamin, 1-1,5 mg x 4/gün sülfadiazin, 10-20 mg/gün folinik asit kombinasyonu şeklinde verilmektedir. Bu tedavinin bitiminden sonra yüksek oranlarda relapsların geliştiğinin görülmesi üzerine idame tedavisinin uygulanması gerektiği belirtilmiştir. Kistlerin ortadan kaldırılmasında etkili bir ilaç olmadığından dolayı tek bir tedavi protokolü yoktur. Bu nedenle çeşitli ilaç kombinasyonları denenmektedir. Haftada ardışık olarak 3 gün 3 kez 150 mg/m^2 TMP ve 750 mg/m^2/2 dozda SMZ veya günlük 2 kez 50 mg dapson tedavi protokolünün atakları engellediği belirtilmiştir. AIDS gibi immun sistemin baskılandığı durumlarda özgün tedaviye immunoterapi eklenmesi düşünülerek IFN-γ üzerinde durulmuştur (Özcel, 2007).

İmmün sistemi normal kişiler ve immun sistemi baskılanmış kişilerin tedavilerinin yanı sıra, hamilelik-çocukluk döneminde ve oküler toksoplasmosis tedavileri de farklı tiplerde incelenebilir (Özcel, 2007).

2.12.3. Hamilelikte ve Çocukluk Döneminde Toksoplamosis Tedavisi

Hamilelik esnasında, erken dönemde başlanan spiramisin tedavisi (3 g/gün) ile fetal geçiş riskinin % 60 kadar azalmakta olduğu belirtilmiştir. İkinci trimesterde enfekte

olan hamilelerin bebeklerinin ciddi hasar riski altında olması, fetal hastalığın kesinleştiği ve gebelik süresinin 24 haftayı geçtiği olgularda, 3 hafta pirimetamin-sülfonamid, 3 hafta spiramisin dönüşümlü olarak kullanıldığı tedavi protokolü önerilmektedir (Özcel, 2007). Konjenital toksoplasmosisli çocuklarda ise en az 1 yıl süre ile pirimetamin-sülfadiazin-folinik asit kombinasyonu kullanılması gerektiği bildirilmektedir. Eğer aktif korioretinit bulgusu var ise 1 mg/kg/gün/2 doz prednizolon verilmesi önerilmektedir (Özcel, 2007).

2.12.4. Oküler Toksoplasmosis Tedavisi

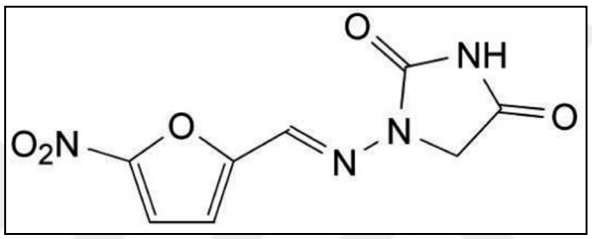
Oküler toksoplasmosis tedavisine başlamak için merkezi görme bozukluğunun saptanması en önemli etkendir. Uygulanan standart tedavi kombinasyonunun yanı sıra alternatif olarak 300 mg, 6 saatte bir 3 hafta boyunca klindamisin kullanımı önerilmektedir (Georgiev, 1994; Özcel, 2007).

2.13. Nitrofurantoin

Antibakteriyel özelliğe sahip olan nitrofurantoin (NF), özellikle idrar tedavisinde kullanılan etkili bir ilaç olup piyasaya ilk defa "Furadantin" ismiyle 1953 yılında sunulmuştur. Kimyasal yapısı 1-(5-nitrofurfuriliden amino)-hidantoin'dir. Molekül ağırlığı 238.2 gr olup, kapalı formülü $C_8H_6N_4O_5$'tir. NF, kokusuz, kristal veya ince toz halinde bulunan acı bir lezzete sahip maddedir. Suda çözünürlüğü sınırlı olan ilaç idrarda ve alkali çözeltilerde çözünmektedir. NF, ağzı sıkıca kapatılmış, ışık geçirmeyen kaplarda ve özellikle 25° C'yi geçmeyecek sıcaklıklarda saklanmalıdır. İlacın biyolojik yarı ömrü 20 dk ile 1 saat arasında değişiklik göstermektedir (Eldem ve Hıncal, 1987). 1953 yılında popüler olan ilaç gram-negatif mikroorganizmalarda antibiyotiklere direncin ortaya çıkmasıyla yeniden gündeme gelmiştir. Yaygın olarak kullanılan NF'ye karşı direnç hala düşüktür ve geniş spekturuma sahiptir. Komplike olmayan İYE (idrar yolu enfeksiyonu olan)'ler için % 90'a kadar pozitif klinik sonuçlar rapor edilmiştir ve dünyadaki birçok ülkede ilk ilaç tedavi seçeneği olarak bildirilmiştir (Wijma ve ark., 2019).

NF'nin kimyasal yapısı, dört karbon atomu ve bir nitro grubuna doğrudan bağlı bir oksijen içeren tipik beş üyeli furan halkasından oluşur (Şekil: 2.7). Asidik koşullar altında ilacın çözünürlüğü, gastrointestinal sistemde iyi bir emilim sağlayacak şekilde

geliştirilmiştir. Sentetik bir ürün olan NF, sarı kristal toz görünümünde olup mikro ve makro kristaller içeren yapıya sahiptir. Aynı zamanda sudaki çözünürlüğü düşük olan ilaç, dimetilformamid (DMF) veya dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözünmektedir. Yıllardan beri kullanılmasına rağmen, farmakokinetik ve farmakodinamik (PK / PD) veriler azdır (Wijma ve ark., 2019). Yapılan bir çalışmada NF, *in vitro* ve *in vivo* olarak anti-*T. gondii* etkileri incelenmiş, *T. gondii* ile enfekte HeLa hücrelerinde NF ve primetaminin anti-toksoplamosis etkilerine bakılmıştır. *T. gondii* tedavisinde karaciğer üzerine yan etkisi daha az, etkin bir tedavi seçeneği olarak NF gösterilmiştir (Yeo ve ark., 2016).



Şekil 7. NF'nin açık formülü
http://tr.fengchengroup.org/pharmaceutical-api/antibiotics/china-nitrofurantoin-suppliers-china.html

2.14. Korunma

Hastalıktan korunmada kişinin yeme alışkanlıkları önemli yer tutar. Tüketilen etin iyi pişirilmiş olması, et kesilen bıçakların yıkanması, sebze meyvelere bulaştırılmaması ve sebze meyvelerin iyice yıkanması önerilmektedir (Saygı ve Miman, 2018). Kedi dışkısı ile çevreye atılan ookistler yaklaşık olarak 2-3 gün sonra enfektif hale gelmektedirler. Kedilerin hayatı boyunca yanlızca bir kere gerçekleşen ookist atılımı yaklaşık olarak 2 hafta boyunca devam etmektedir. Ookistler 55° C ısıtıldığında yaklaşık 1-2 dk içinde ölmekte iken sodyum hipokloride, dondurulmaya, klorlanmaya, ozon uygulanmasına karşı direnç göstermektedirler. Ookistler, sıcaklığın -10° C olduğu durumlarda 106 gün, 4° C olduğu durumlarda yaklaşık olarak 1 yıl, 35° C olduğu durumlarda 32 gün, 40° C olduğunda ise 9 gün canlı kalabilirler. Bu şekilde enfektivitesini koruyan ookistler aynı zamanda uzun süre suda canlılığını kaybetmeden yaşayabilmektedirler. Bu nedenle kedilerle temas sonrasında ellerin yıkanması, kedilerin dışkı kaplarının değiştirilmesinde dikkatli olunması ve gerekirse dışkı kaplarının kaynatılması ve

kedilere ticari yiyeceklerin yedirilmesi önerilmektedir. Kaynağı bilinmeyen suların içilmemesi, toprak, su ve sebzelerle temas sonrası ellerin iyice yıkanması çok önemlidir. Özellikle hamilelerin ve anne adaylarının bunlara çok dikkat etmesi gerekmektedir. Alınacak önlemler arasında etlerin iyi pişirilmesi, az pişmiş etlerin tüketilmemesi, etlerin -20°C'de buzdolabında en az 15 gün bekletilmesi gerekmektedir. Enfekte hayvanların etlerindeki doku kistleri 67° C'de ısıda ölürken, -12° C'de ise en az 3 gün bekletilmelidir. Doku kistleri buzdolabında 3 hafta, 60° C'de 10 dk, 50° C'de 10 dk, 6-7° C'de 11 gün canlılığını korumaktadırlar. Ancak bu durum enfekte etin kalınlığına bağlıdır (Baril ve ark., 1999; Cook ve ark., 2000)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Sarf Malzemeleri, Solüsyon ve Besiyerleri, Canlı Materyaller

3.1.1.1. Cihazlar

- Class II Biyogüvenlik kabini (ESCO, Türkiye)
- CO_2'li Etüv (Panasonic, Japan)
- İnvert mikroskop (Leica, Callifornia, USA)
- Santrifüj (Sigma 1-14K, USA)
- LightCycler 480II (Roche, Mannheim, Germany)
- Sıcak su banyosu (MedLine, Korea)
- Otomatik pipetler (Gilson, PIPETMAN Classic®,UK)
- PCR cihazı (Sensoqest, Almanya)
- Vorteks Bencmixer (Bencmark, ABD)
- - 80 Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)
- Kuru Isı Bloğu, Digital heat blog (Bencmark, ABD)
- + 4 buzdolabı (Uğur, Türkiye)
- ELISA cihazı ve okuma cihazı (Tecan, Güney Kore)

3.1.1.2. Sarf Malzemeleri

- 25 cm^2 filtre kapaklı flask (CellStar Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany)
- 6 kuyucuklu hücre kültür plate (CellStar Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany)
- 96 kuyucuklu hücre kültür plate (CellStar Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany)
- Steril pastör pipetler
- 15 ml'lik steril falcon tüp (CellStar Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany)
- 50 ml'lik steril falcon tüp (CellStar GreinerBio-one, Frickenhausen, Germany)
- 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpü (CellStar GreinerBio-one, Frickenhausen, Germany)
- Kriyotüpler (CellStar Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany)
- 0.22 µm por çaplı şırınga filtre (Millipor, Maryland, USA)
- 200 µl PCR tüpü (CellStar Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany)

3.1.1.3. Solüsyon ve Besiyerleri

- L-glutamine (Biochrom, Berlin, Germany)
- FBS (Capricorn Sciencetific, South America)
- DMEM HAM's -F12 (Biochrom, Berlin, Germany)
- Penisilin/Streptomisin (Capricorn Sciencetific, South America)
- Tripsin-EDTA % 0.25 (Sigma, USA)
- Trypan Blue (MULTICELL, Rhode Island, UK)
- Giemsa (MERCK Millipor, Germany)
- Etanol (MERCK Millipor, Germany)
- DMSO (BioShop, Burlington, USA)

- DPBS (Gibco LifeTechnologies, USA)
- TRI Reagent (Sigma Aldrich, USA)
- Roche-Transcriptor High Fidelity cDNA Syntesis Kit (Roche, Indianapolis, USA)
- Syber green (Roche, Indianapolis, USA)
- İsopropil alkol (MERK Millipor, Germany)
- MTS (Promega, USA)
- Nitrofurantoin (Sigma Aldrich, USA)

3.1.1.4. Canlı Materyaller

- *Toxoplasma gondii* Takizoitleri (Ankara Halk Sağlığı Laboratuvarı, Türkiye)
- BeWo Hücre Hattı (ATTC, USA)

3.2.METOT

3.2.1.Hücre Kültürü

3.2.1.1. DMEM HAM's / F-12 Besiyerinin Hazırlanması

Besiyerinin hazırlanması için (100 ml için);

1. 56º C' lik su banyosunda 30 dk inaktive edilen FBS'den 10 ml (% 10), 88 ml DMEM HAM's / F12 besiyerine eklendi.
2. Penicilin-Streptomisin solüsyonundan 1 ml (% 1) eklendi.
3. L-glutamine solüsyonundan 1 ml (% 1) eklenerek 100 ml'lik besiyeri hazırlandı.
4. Hazırlanan besiyeri 22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi.
5. Besiyeri çalışmaya kadar + 4º C' de bekletildi.

3.2.1.2. Hücrelerin Çözdürülmesi ve BeWo Hücre Kültürü Hazırlanması

- 80'de donmuş halde bulunan BeWo hücre hattı 37^0C'lik su banyosunda 4-5 dk bekletilip çözdürüldükten sonra çalışmanın yapılacağı laminar flow kabine alındı.

Hazırlanan besiyerinden 8 ml 15'lik falkonlara dağıtılıp üzerlerine pipet yardımıyla hücreler eklenip 1200x rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernanat atılıp 2 ml taze besiyeri eklendi ve pastör pipeti ile hücreler homojen hale getirildi.

1. Hücreler, 4 ml besiyeri bulunan 25 cm^2 flask içine aktarıldı ve 37^0C'lik % 5 CO_2 içeren etüve yerleştirildi.
2. İnvert mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyini kaplama seviyeleri her gün düzenli aralıklarla kontrol edildi ve DPBS ile yıkandı.

3.2.1.3. Subkültür ve BeWo Hücrelerini Pasajlama Prosedürü

1. Hücrelerin flask yüzeyinin % 80-100'ünü kaplamasıyla birlikte, pasajlama işleminin yapılması için flaskların dış yüzeyi etil alkol ile temizlenerek kabin içerisine alındı.
2. Flaskın içerisindeki besiyeri tamamen boşaltıldı ve hücreler 2 ml 1x DPBS ile 2 kez yıkandı.
3. Flask içerisindeki DPBS tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 37^0 C'de çözdürülen Tripsin-EDTA solüsyonundan 3 ml flaska eklendi.
4. Flasklar 37º C'lik % 5 CO_2 içeren etüve kaldırıldı ve Tripsin-EDTA ile 5 dk inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası hücrelerin tamamı flask yüzeyinden ayrıldı ve tripsinizasyonu sonlandırmak amacıyla hücre içeriği 6 ml besiyeri bulunan 15 ml falcon tüpüne aktarıldı.
6. 1200x rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet halindeki hücreler üzerine 2 ml besiyeri eklenerek homojen hale getirildi.
7. 2 ml'lik karışım iki yeni 25 cm^2 flask içine eklenerek, 37º C'de % 5 CO_2'li etüve kaldırıldı.
8. Deney aşamasına kadar yıkama ve pasaj işlemleri devam ettirildi.

3.2.1.4. Hücreleri Dondurma İşlemi

1. Deney aşamasının bitiminde artan, yeterli yoğunlukta ve sayıda olan hücrelere dondurma işlemi yapıldı.
2. Dondurma işlemi öncesinde dondurma besiyeri hazırlandı ve filtrasyon işlemi gerçekleştirildi (Tablo 3.1).
3. Hücreler yukarıda 3.2.1.3'de anlatıldığı gibi yıkanarak tripsinizasyon işlemi yapıldı.
4. Yıkanan ve tripsinize edilen hücreler daha sonra santrifüj edilerek çöktürüldü ve 1 ml dondurma besiyeri içerisinde homojen bir karışım olacak şekilde nazikçe çözdürüldü.
5. Homojenat yaklaşık olarak 1 milyon hücre/kriyotüp olacak şekilde dağıtıldı.
6. İçerisinde 1 ml BeWo-medium karışımı bulunan kriyotüpler, bir süre - 20^0 C'de dondurulmaya bırakılıp daha sonra - 80^0C'ye saklamak amacıyla kaldırıldı.

Tablo 1. Dondurma besiyerinin hazırlanışı.

Karışım içeriği	Kullanılan miktar (ml)	Son yoğunluk (%)
RPMI-1640	7 ml	% 70
FBS	2	% 20
Penisilin-Streptomisin	0,1	% 1
% 99.7 DMSO	1	% 10
Toplam Miktar	10 ml	

3.2.1.5. Takizoitlerin Hücre Kültüründe Üretilmesi

1. Takizoitler, 1200x rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernanant, içinde 8 ml besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı.
2. Falkon tüpüne aktarılan karışım 1200x rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantın orta kısmında bulunan takizoitler, steril pastör pipeti ile toplanarak BeWo hücrelerinin bulunduğu 25 cm^2'lik flaska eklendi.

3. Flasklar 37° C'de % 5'lik CO_2'li etüve kaldırıldı ve 4-5 gün inkübe edilerek takizoitlerin sayısının artması sağlandı.
4. BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin de içinde bulunduğu besiyeri, hücre kazıyıcı ile kazınarak 5 µm por gözenekli şırınga filtreden süzüldü ve 1200x rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası oluşan süpernanat taze besiyeri içine alınarak yeniden santrifüj edildi.
6. Yıkama işlemi sonrası elde edilen takizoitler Thoma lamında sayıldı ve deneyin enfeksiyon basamağı için hazır hale getirildi.

3.2.1.6. İlaç Solüsyonlarının Hazırlanması

1. Çalışmada ticari olarak elde edilen toz halindeki saf Nitrofurantoin bileşiği kullanıldı.
2. Nitrofurantoinden 1 M stok solüsyon hazırlandı ve çalışma esnasında belirlenen aralıklarda (320 µM, 160 µM, 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM ve 1,25 µM olacak şekilde) konsantrasyonlar oluşturulup besiyerlerine eklendi.
3. NF, 1 ml DMSO içerisinde çözdürüldü.
4. Deney esnasında belirlenen aralıklardaki ilaç konsantrasyonları besiyerine kontrol grupları hariç eklendi.

3.3. Giemsa Boyama İle Morfoloji Deneyi

1. 25 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan BeWo hücreleri ilk önce DPBS ile iki kez yıkandı.
2. Hücreler yukarıda 3.2.1.3'te anlatıldığı gibi tripsinize edilerek 1200x rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine besiyeri ekilerek hücreler süspanse edildi.
4. Süspansiyon halindeki hücreler 6 kuyucuklu kültür playtinin her kuyusuna ekildi ve 37° C'de % 5 CO_2'li etüvde, playt yüzeyini kaplayana (yaklaşık 24-48 saat) kadar inkübe edildi.

5. İnkübasyon sonrası 6 kuyucuklu playtin hepsinde % 80-100 doluluk oranı sağlandı.
6. Belirlenen konsatrasyonlardaki nitrofurantoin ve takizoitler (1: 1= takizoit: hücre oranında) kuyucuklara eklenerek 24 saat 37° C'de % 5 CO_2'li etüvde inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrasında giemsa boyama için hücreler DPBS ile yıkandı.
8. Yıkanan hücrelerin plate kapakları açılarak steril kabin içinde kuruması sağlandı.
9. Kuruma işlemi sonrasında fiksasyon işlemi için her bir kuyunun üzerine % 100'lük metanol (2 ml) eklenerek tespit edildi.
10. 2-3 dk sonra metanolün fazlası pastör pipeti ile çekildi ve pleyt steril kabinde kurumaya bırakıldı.
11. Boyama işlemi için, ticari olarak elde edilen ve stok halinde bulunan giemsa boyası 1damla/1 ml dH_2O olacak şekilde seyreltildi.
12. Kurutma işlemi sonrasında her bir kuyucuğa 2 ml hazırlanan giemsa boyasından eklendi.
13. Playt içindeki hücrelerin oda ısısındaki steril kabin içinde 45 dk boyunca boyanması sağlandı.
14. Boyama sonrasında kuyucuklardaki giemsa boyası pastör pipeti ile çekildi.
15. Boyanın fazlasının akması için hücreler DPBS ile iki kez yıkandı ve kurumaya bırakıldı.
16. Tamamen kuruduktan sonra hücreleri görüntülenmek için invert mikroskopta inceleme yapıldı.

3.4. MTS ile Hücre Canlılık Testi

25 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan BeWo hücreleri ilk önce DPBS ile iki kez yıkandı.

1. Hücreler yukarıda 3.2.1.3'te anlatıldığı gibi tripsinize edilerek 1200x rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
2. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine besiyeri ekilerek hücreler süspanse edildi.
3. Süspansiyon halindeki hücreler 96 kuyucuklu kültür playtinin her kuyusuna ekildi ve 37° C'de % 5 CO_2'li etüvde, playt yüzeyini kaplayana (yaklaşık 24-48 saat) kadar inkübe edildi.

4. Hücreler playt yüzeyini tamamen kapladıktan sonra sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna ait kuyucuklar hariç, tüm kuyulara 1:1 (takizoit/hücre) oranında *T. gondii* takizoiti verilerek enfeksiyon yapıldı.
5. Aynı zamanda sadece BeWo hücrelerinden ve sadece takizoitlerle enfekte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol gruplarının bulunduğu kuyucuklar hariç, ilaç konsantrasyonları besiyerine eklendi ve toplam hacim 100 µl olacak şekilde bütün örnekler duplikasyonlu olarak çalışıldı.
6. MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] testinin yapım aşamasına kadar pleyt, 37° C'de % 5 CO_2'li etüvde 24 saat inkübe edildi.
7. Bu çalışmada yeni bir tetrazolium bileşiği olan tek solüsyonlu MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent'ın (MTS reagenti)) kullanıldı.
8. - 20° C'de saklanan MTS, 37° C'de su banyosunda 10 dk inkübe edilerek çözdürüldü
9. Totalde 100 µl hacime sahip olan, ilaç konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bulunduğu 96 kuyucuklu kültür pleytinin her bir kuyusuna 20 µl MTS reageni eklendi.
10. Pleyt, 37° C'de % 5 CO_2'li nemlendirilmiş ortamı bulunan etüvde 1-4 saat inkübe edildi.
11. İnkübasyon sonrası pleytteki örneklerin absorbansı ELISA okuyucuda 490 nm'de ölçüldü.
12. Ölçüm sonrasında GraphPad Prism 8.0 istatistik programı kullanılarak normalize edilmiş absorbanslar ile IC_{50} (maksimum inhibisyon konsantrasyonu), EC_{50} (maksimum cevabın yarısını vermek için gerekli ilaç konsantrasyonu), R_2 değerleri belirlendi.

3.5. Trypan Blue Boyama ile Hücre Canlılık Testi

1. 25 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan BeWo hücreleri ilk önce DPBS ile iki kez yıkandı.
2. Hücreler yukarıda 3.2.1.3'te anlatıldığı gibi tripsinize edilerek 1200x rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

3. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine besiyeri ekilerek hücreler süspanse edildi.
4. Süspansiyon halindeki hücreler 6 kuyucuklu kültür pleytinin her kuyusuna ekildi.
5. 37° C'de % 5 CO_2'li etüvde, pleyt yüzeyini kaplayana (yaklaşık 24-48 saat) kadar bekletildi.
6. İnkübasyon sonrası 6 kuyucuklu playtin hepsinde % 80-100 doluluk oranı sağlandı.
7. Belirlenen konsatrasyonlardaki nitrofurantoin ve takizoitler (1: 1= takizoit: hücre oranında) kuyucuklara eklenerek 24 saat 37° C'de % 5 CO_2'li etüvde inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrasında BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin sayısını belirlemek için trypan blue ile boyama yöntemi uygulandı.
9. Her kuyucukta bulunan BeWo hücre- takizoit süspansiyonundan 500 µl alınarak 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.
10. Üzerine 500 µl % 0,4'lük trypan blue solüsyonu eklendi ve karışım 5 dk oda ısısında bekletildi.
11. BeWo hücre- takizoit karışımı Thoma lamında sayıldı.
12. Canlı BeWo hücreleri (boya almayan) tüm hücrelere bölünüp yüzdesi alınarak canlılık oranı belirlendi.
13. Canlı takizoitler (boya almayan) tüm takizoitlere bölünüp yüzdesi alınarak canlılık oranı belirlendi.

$$\text{Canlılık} = \frac{canlı\ hücreler}{tüm\ hücreler}\ x\ 100$$

3.4. NF Deneyi

1. Morfoloji ve hücre canlılık testlerinden sonra elde edilen veriler doğrultusunda en uygun doz belirlendi.
2. 25 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan BeWo hücreleri ilk önce DPBS ile iki kez yıkandı.
3. Hücreler yukarıda 3.2.1.3'te anlatıldığı gibi tripsinize edilerek 1200x rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
4. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine besiyeri ekilerek hücreler süspanse edildi.

5. Süspansiyon halindeki hücreler 6 kuyucuklu kültür pleytinin her kuyusuna ekildi.
6. Belirlenen ilaç konsantrasyonunun etkinliğinin belirlenmesi için 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç günlük deney grubu oluşturuldu.
7. Hücreler, 37° C'de % 5 CO_2'li etüvde pleytin yüzeyini kaplayana (yaklaşık 24-48 saat) kadar bekletildi.
8. İnkübasyon sonrası 6 kuyucuklu pleytin hepsinde % 80-100 doluluk oranı sağlandı.
9. Belirlenen dozdaki nitrofurantoin ve takizoitler (1:1= takizoit: hücre oranında) kuyucuklara eklenerek 37° C'de % 5 CO_2'li etüvde 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besiyeri atıldı ve kültürden 24, 48 ve 72. saatlerde toplanan örneklere 500 µl TRI reagent eklenerek hücre kazıyıcı ile kazındıktan sonra oluşan karışım RNA izolasyonu yapılmak üzere steril tüplere aktarıldı.

3.4.1. Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

Deney sonrası elde edilen örneklerin RNA izolasyonu, Chomczynski'nin (2005) geliştirdiği TRI reagent protokolüne göre gerçekleştirildi.

1. Örneklerde faz ayrımı gerçekleştikten sonra total RNA'nın bulunduğu saydam faz alınarak saflaştırıldı.

2. En son basamakta elde edilen RNA pelleti RNase DNase free su ile çözdürüldü.

3. Örneklerin RNA miktarı ölçüldü ve cDNA (komplementer DNA) sentezi yapılana kadar – 80 ^{0} C'de saklandı.

3.4.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Roche-Transcriptor High Fidelity cDNA Syntesis Kit (Roche, Indianapolis, USA) kullanıldı. Final konsantrasyonda 1 pg-1 µg miktarında total RNA olacak şekilde, RNase DNase free su, son hacimde 60 µM olacak şekilde Random Hexamer ve OligodT primerleri, 1x buffer, RNase inhibitörü, dNTP miks (0,1 nmol), DTT ve revers transkriptaz (1 U/µl) enzimi bulunan PCR karışımı hazırlandı. 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 2 µl enzim eklendi ve karışımın total hacimi 20 µl'ye tamamlandı. Karışım, 42 ^{0}C'de 15 dk, 85^0 C'de 5 dk ve 65^0 C'de 15 dk

olacak şekilde PCR cihazında inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar kullanılıncaya kadar – 20 ^{0}C'de saklandı.

3.2.4.3.Toll-Like Reseptör Paneli

cDNA elde edildikten sonra PCR Array analizi yapılmak için ticari olarak elde edilen Toll-Like reseptör paneli hazırlandı. Toll-Like reseptör yolakları ve gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. Toll-like reseptör paneli (Roche, USA) her kuyudaki primer konsantrasyonu 1000 pmol /µl olacak şekilde ana stok halinde sulandırıldı.
2. 96'lık plate de her bir kuyu için ana stoktan 10 µl alınıp 90 µl dH_2O eklendi. Son konsantrasyon 1000 pmol /µl olacak şekilde ikinci kez sulandırılarak ara stok hazırlandı.
3. Ara stoktaki her kuyudan 1 µl alındı ve son konsantrasyon 10 pmol/µl olacak şekilde RT- qPCR deneyi için hazırlandı.
4. Toll-like reseptör paneli kapsamında ekspresyon seviyesinde değişimi tespit edilecek olan genler Tablo 3.2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. Toll-Like reseptör panelindeki genler.

Genler	**Genlerin Açık Adları**
AKT3	V-akt murine thymona viral oncogene homolog3
CXCL12	Chemokine(C-X-Cmotif)ligand12
PIK3CB	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate3-kinase, cataytic subunit beta
PIK3CD	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate3-kinase, cataytic subunit delta
PIK3R5	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subnit 5
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene e0nhancer in B-cells, kinase epsilon
IL1β	Interleukin 1, beta
MAPK2	Mitogen-avtivated protein kinase kinase 2
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3
NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells2(p49/p100)
TLR1	Toll-like receptor 1
TLR7	Toll-like receptor 7
AKT1	V-akt murine thymona viral oncogene homolog1
AKT2	V-akt murine thymona viral oncogene homolog2
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
CCL3	Chemokine(C-C motif) ligand 3
CCL5	Chemokine(C-C motif) ligand 5
CCL4	Chemokine(C-C motif) ligand 4
CD14	CD14 molecule

CD80	CD 80 molecule
CD86	CD86 molecule
CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CXCL10	Chemokine(C-X-Cmotif)ligand10
CXCL11	Chemokine(C-X-Cmotif)ligand11
FADD	Fas (TNFRSF6)- asociated via death domain
FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
IFNA7	Interferon, alpha7
IFNaR5	IFNAR 1 Interferon (alpha, beta and omega) receptor 5
IFNAR5	Interrferon (alpha, beta, and omega) receptor5
IFNB1	I Interferon, beta1, fibroblast
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
IKBKG	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
IL12A	Interleukin 12A
IL12B	Interleukin 12B
IL6	Interleukin 6(ınterferon, beta2)
IL8	Interleukin 8
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase4
IRF3	Interferon regulatory factor 3
IRF5	Interferon regulatory factor 5
IRF7	Interferon regulatory factor 7
JUN	Jun oncogene
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LY96	Lymphocyte antigen 96
MAP2K1	Mitogen-avtivated protein kinase kinase 1
MAPK3	Mitogen-avtivated protein kinase kinase 3
MAP2K4	Mitogen-avtivated protein kinase kinase 4
MAP2K5	Mitogen-avtivated protein kinase kinase 5
MAP2K7	Mitogen-avtivated protein kinase kinase 7
MAP3K7	Mitogen-avtivated protein kinase kinase kinase 7
MAP3K8	Mitogen-avtivated protein kinase kinase kinase 8
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
MAPK10	Mitogen-activated protein kinase 10
MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9
MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 13
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKBIB	NFKBIA Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitör, beta
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate3-kinase, cataytic subunit alpha
PIK3CG	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate3-kinase, cataytic subunit gamma
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subnit 1(alpha)
PIK3R2	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subnit 2(beta)
PIK3R3	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subnit 3(gamma)
RAC1	RAS- related C3 botilinum substrate 1
RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A(avain)
RIPK1	Receptör- interacting serine- threonine kinase1
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
TAB1	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1
TAB2 protein2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2
TBK1	TANK-binding kinase 1
TICAM1	Toll-like receptor adaptör molecule 1

TICAM2	Toll-like receptor adaptör molecule 2
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor(TIR) domain containing adaptör protein
TLR10	Toll-like receptor 10
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR3	Toll-like receptor 3
TLR4	Toll-like receptor 4
TLR5	Toll-like receptor 5
TLR6	Toll-like receptor 6
TLR8	Toll-like receptor 8
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF	Tumor necrosis factor(TNF superfamıly, member 2)
TOLLIP	Toll interacting protein
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4
TRAF1	TRAF6 TNF receptor- associatedfactor 1
ACTB	Actin, beta
B2M	Beta-2-microglobulin
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GUSB	Glucuronidase, beta
PGK	Phosphoglycerate kinase 1
PPIA	Peptidylproly isomerase A
RPL13A	Ribosomal protein L 13a

3.2.4.4. RT-qPCR Analizi

1. 550 µl Syber Green, 440 µl dH_2O ve 20 µl cDNA ile 1100 µl'lik karışım hazırlanıldı.
2. Elde edilen karışım her kuyuda 9'ar µl olacak şekilde 96'lık pleyte dağıtıldı.
3. Hazırlanan ara stok halindeki Toll-Like Reseptör panelinin her kuyucuğundan 1 µl primer alınarak sırasıyla kuyucuklara eklendi ve total olarak 10 µl'lik reaksiyon hazırlandı.
4. RT- qPCR programı, Roche Light Cycler 480 II cihazı ile uygulandı. Daha sonra, genlerle ilgili Cq değerleri hesaplandı ve rölatif kantifikasyon yapıldı.

3.2.3. İstatistiksel Analiz

Deney triplike edilerek toplanan örnekler PCR array analizi yapılmak üzere RT-qPCR ile değerlendirilmiştir. PCR array panelinde bulunan house keeping genler deney içi kontrol gruplarını oluşturmuştur. Buna göre rölatif kantifikasyon efficiency değeri 2 alınarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak ekspresyon seviyelerindeki değişim orantısal olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, plazmid DNA standartları kullanılarak 24'üncü, 48'inci ve 72'inci saatlerde toplanan örneklerin hesaplanan parazit yüklerinin arasındaki değişimin anlamlılıkları Kruskal Wallis H- testi ile Mann Whitney U- testi kullanılarak

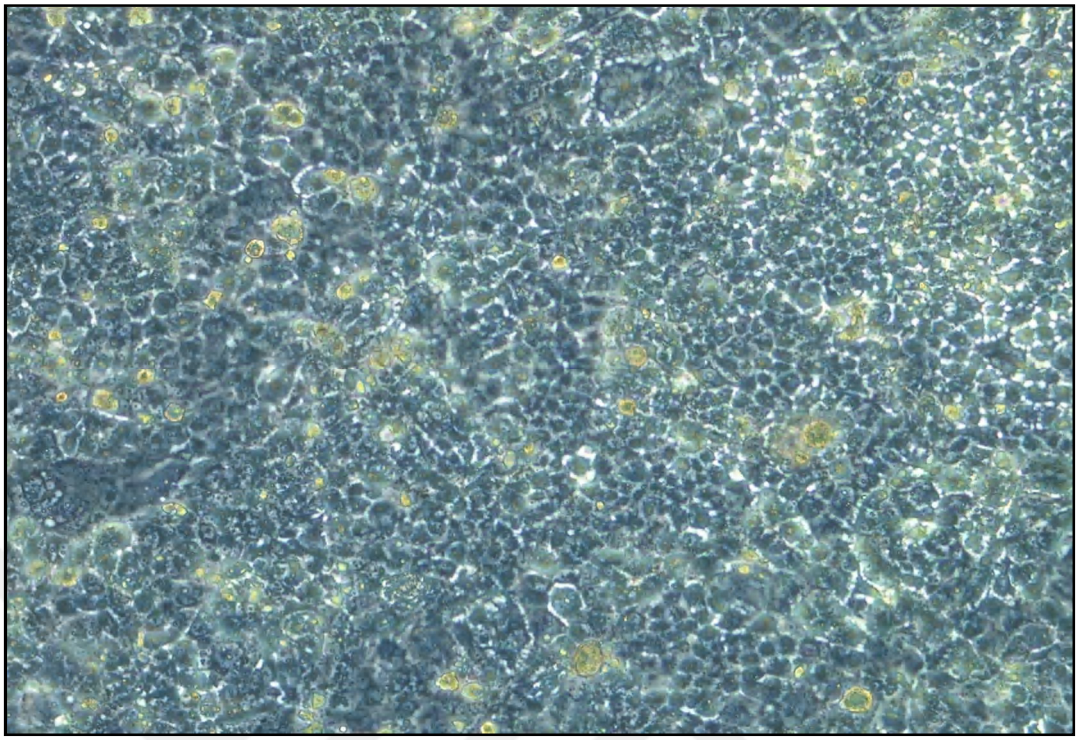
IBM SPSS Versiyon 16.0 istatistiksel paket programı ile belirlenmiştir. $p<0,05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada ilk olarak DMEM HAM's/F-12 besiyerinde, 25 cm^2'lik flasklarda BeWo hücrelerinin çoğaltma işlemi yapılmıştır. Takizoitlerin, enfeksiyon öncesi çoğalma işlemini gerçekleştirmek üzere BeWo hücre kültürü kullanılmıştır. Takizoitlerin üretimi sağlandıktan sonra BeWo hücreleri, 1:1 (hücre: takizoit) oranında takizoitler ile enfekte edilmiştir. Enfeksiyondan hemen önce DMSO içinde ısı verilerek çözdürülen NF konsantrasyonları (320 µM, 160 µM, 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM ve 1,25 µM) oluşturulmuştur. Kontrol grupları ve deney gruplarını oluşturan hücrelere eklenmiştir. Giemsa boyama yöntemi ve tripan blue boyama yöntemleri ile birlikte MTS testi uygulanarak hücre morfolojisi ve canlılık deneyleri yapılmıştır. NF'nin TLR yolağına etkisini tespit için 24. saatte, 48. saatte ve 72. saatte olmak üzere üç ayrı zamanda örnekler toplanmıştır. Deney sonrası deney gruplarından 24, 48 ve 72. saatlerde alınan örneklerin RNA izolasyonu yapılarak cDNA'ları sentezlenmiş ve Real-Time (RT- qPCR) analizleri yapılmıştır.

4.1. BeWo Hücre Kültürünün Değerlendirilmesi

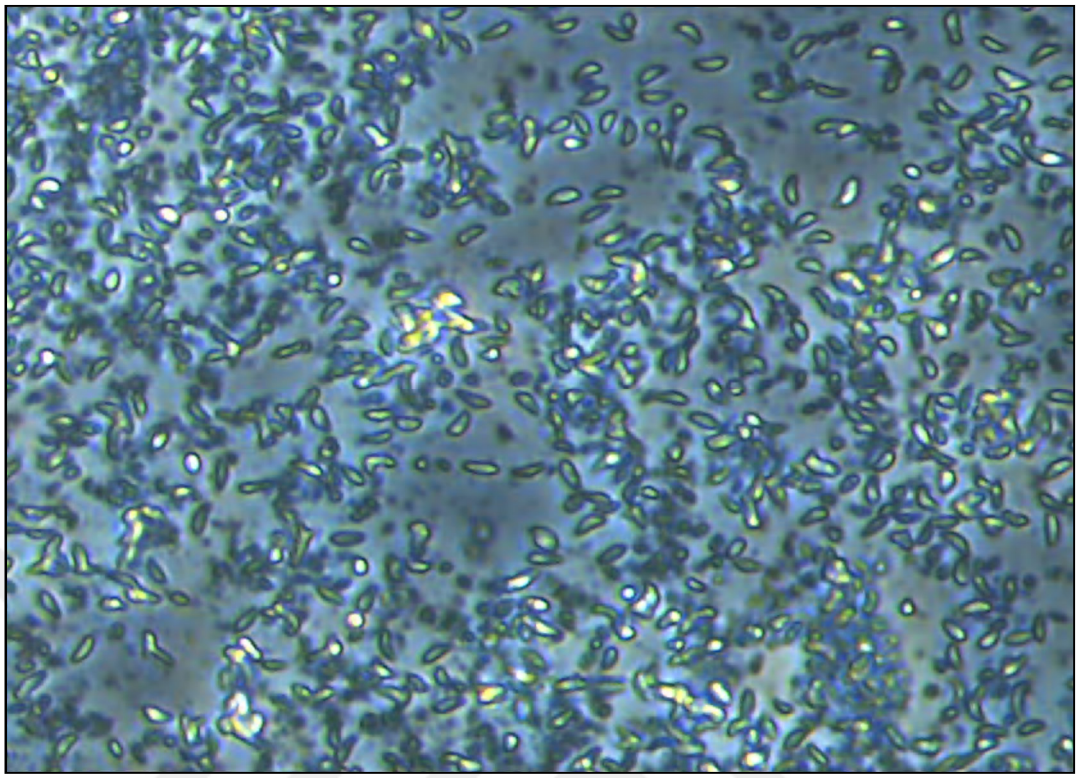
BeWo hücreleri çözdürülüp flaska ekiminden sonraki ilk günde istenilen seviyede doluluğa ulaşmamıştır. Deney koşullarında istenilen sayıda hücre sayısına ulaşılabilmesi için yıkama ve pasaj prosedürü 4 hafta boyunca devam ettirilmiştir. Üst üste birikerek çoğalan BeWo hücreleri 3-4 günde bir pasajlanmış ve hızlı kontaminasyon nedeniyle her gün DPBS ile yıkanmıştır. 4. haftanın sonunda, 25 cm^2'lik flasklarda yaklaşık % 80-100 doluluk görüldüğünde ortalama $1x10^6$ BeWo hücresi olduğu belirlenmiştir (Şekil 8).



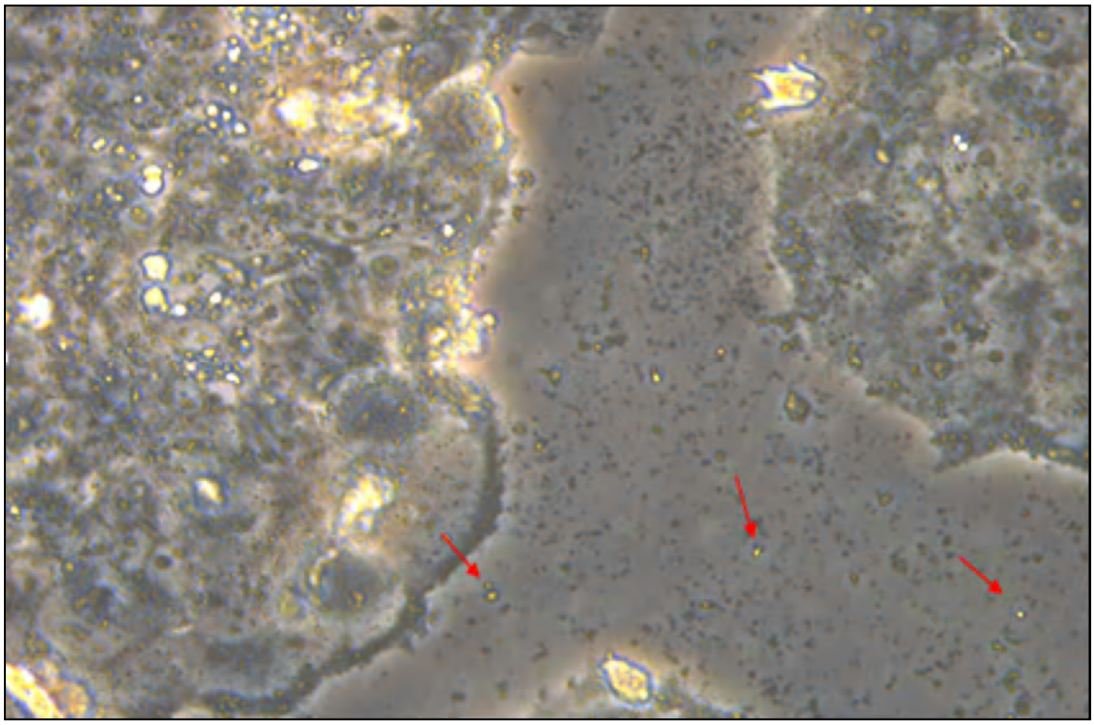
Şekil 8. BeWo hücrelerinin invert mikroskopta görünüşü (20X).

4.2. BeWo Hücrelerinin Enfeksiyonu İçin Belirlenen *T. gondii* Takizoit Sayısı

25 cm^2 flasktaki BeWo hücrelerinin yoğunluğu $1x10^6$ (% 80-100) iken parazit ekimi yapılmış ve takizoitler hızlıca çoğaltılmıştır (Şekil 9). Optimal takizoit sayısı ve canlı hücre sayısını belirlemek için parazit yoğunluğu her gün invert mikroskopla gözlemlenmiş ve sayılmıştır. Enfeksiyonun en iyi gerçekleştiği BeWo hücrelerinin yoğunlukları 25 cm^2 flasklarda $1x10^6$ (% 80-100) hücre sayısı olarak belirlenip en uygun takizoit-hücre oranının ise 1:1 olduğu bulunmuştur (Şekil 10).



Şekil 9. Takizoitlerin invert mikroskopta görünüşü (40X).

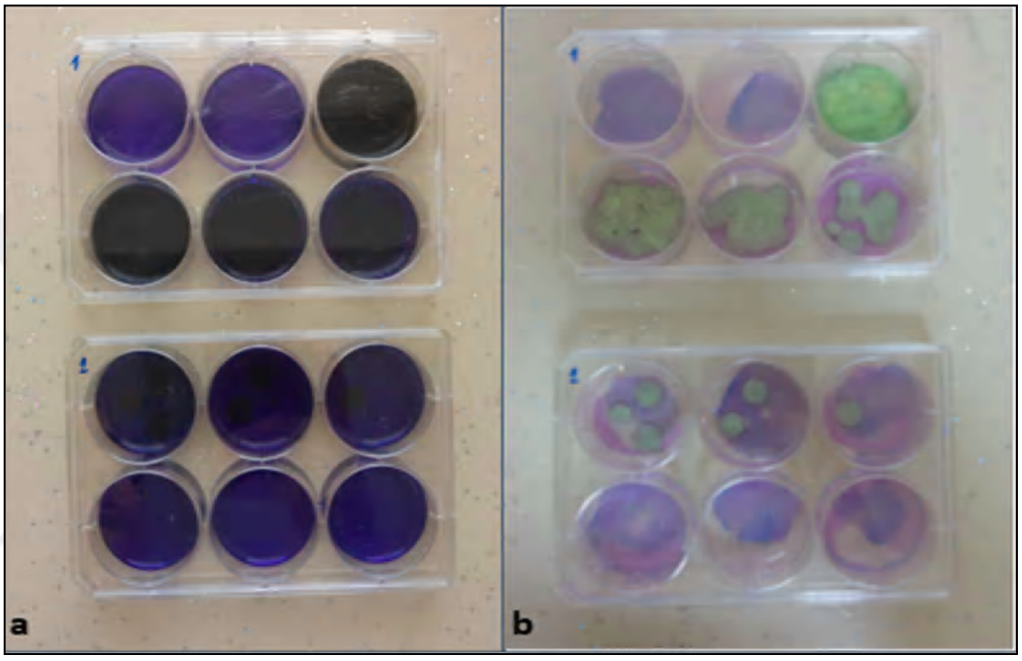


Şekil 10. BeWo hücrelerinin takizoitlerle enfeksiyonu (40X).

4.3. Giemsa Boyama Yöntemi

4.3.1 Morfoloji Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Giemsa boyama yöntemi, 3.3.1'de anlatıldığı gibi kontrol grupları ve deney gruplarına uygulanmıştır. Boyama sonrasında invert mikroskop ile görüntülenen hücreler morfolojik açıdan değerlendirilmiştir (Şekil 11a ve 11b).

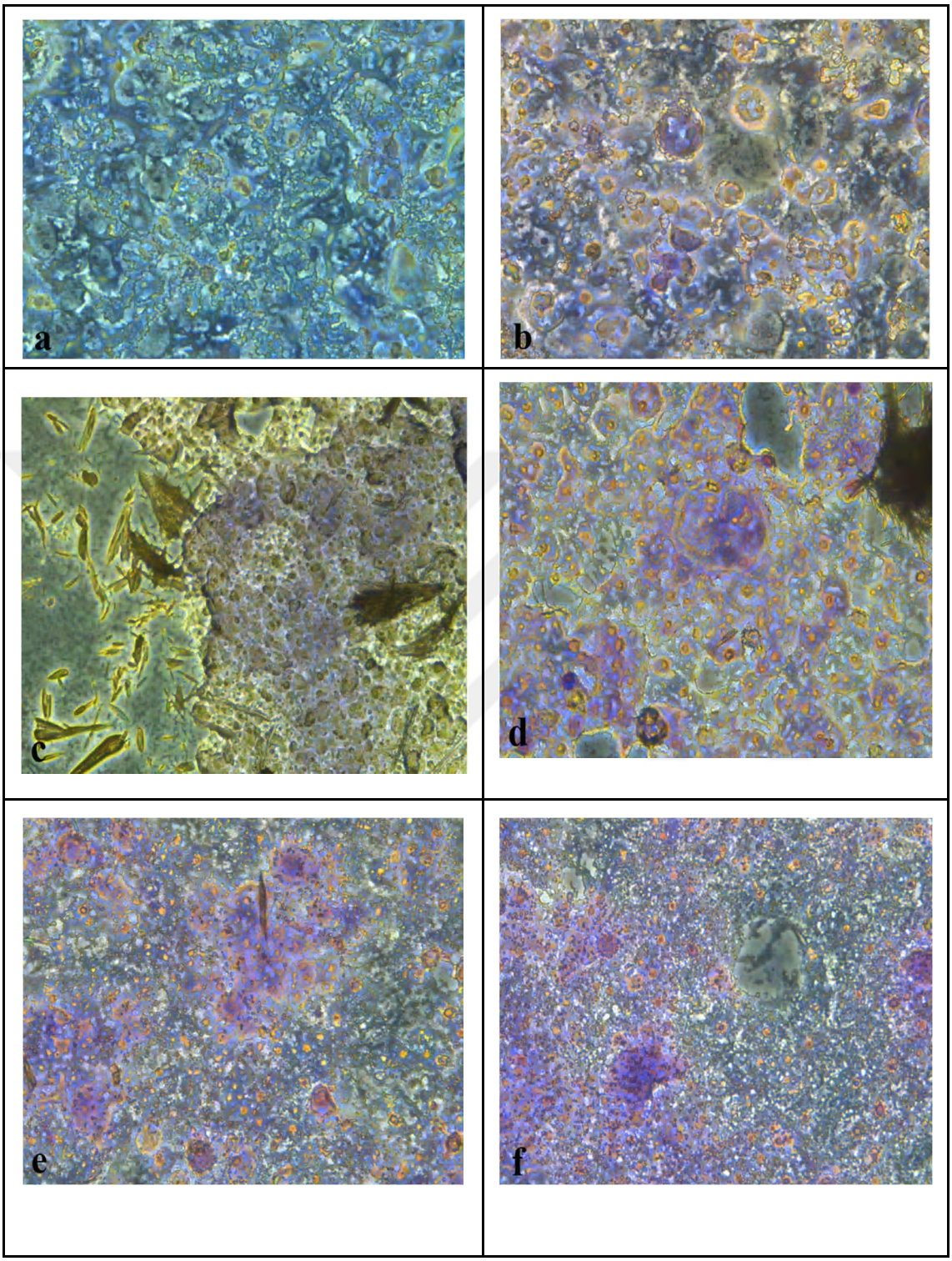


Şekil 11. a) Giemsa boyama sırasında örneklerin görüntüsü
b) Giemsa boyama sonrası örneklerin görüntüsü

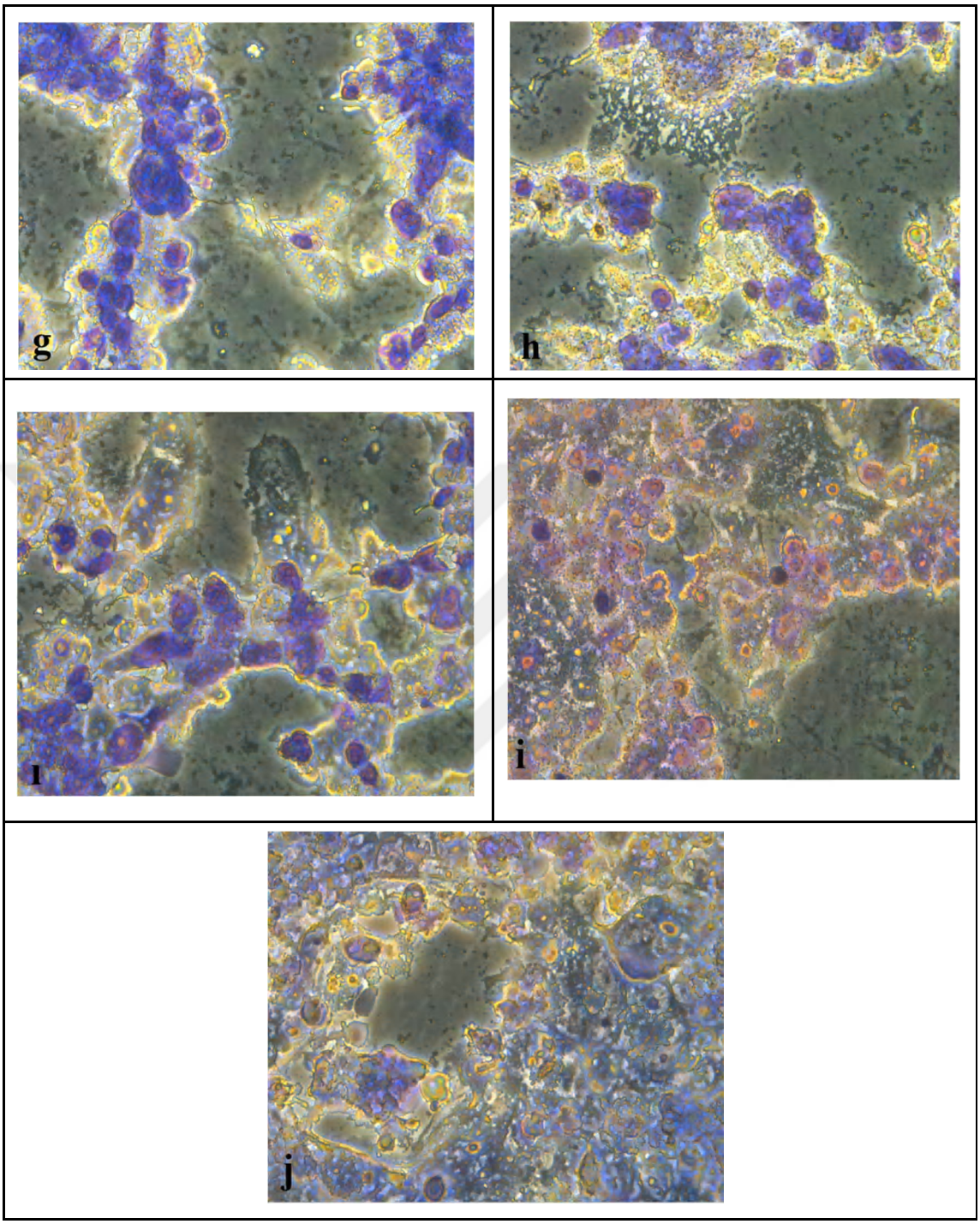
Boyama sonrasında; sadece BeWo hücrelerinin olduğu kontrol grubunda, hücrelerin normal morfolojik yapıya sahip olduğu ve yüzeye tamamen tutunduğu görülmüştür (Şekil 12.a). BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubunda ise parazitler hem hücre yüzeyinde hem de boşluklu alanda görülmekle birlikte normal morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 12.b).

Hazırlanan 320 µM (Şekil 12.c) ve 160 µM'lık (Şekil 12.d) NF konsantrasyonlarının yoğun olması ve hücre yüzeyinde tabaka oluşturması nedeniyle BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin varlığı gözlemlenememiştir. 80 µM (Şekil 12.e) ve 40 µM'lık (Şekil 12.f) NF konsantrasyonlarında, hücre ve takizoitler gözlemlenebilmiştir. BeWo hücrelerinin morfolojik olarak yapısının bozulduğu, hücrelerin dehidrate olduğu görülmüştür.

Takizoitlerin sayının ise parazit kontrole göre arttığı gözlemlenmiştir. 20 µM'lık NF konsantrasyonunda, az sayıda olmakla birlikte, normal morfolojili BeWo hücreleri görülürken, aynı zamanda normal morfolojili takizoitlerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 12.g). 10 µM'lık konsantrasyonda normal morfolojili BeWo hücreleri ve takizoitlerin olduğu görülürken takizoit sayısının 20 µM'lık konsantrasyona göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 12.h). 5 µM'lık konsantrasyonun yaklaşık olarak 10 µM'lık konsantrasyona morfolojik olarak benzediği gözlemlenmiştir (Şekil 12.ı). 2,5 µM'lık konsantrasyondaki BeWo hücrelerinin morfolojik yapısı, BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin bulunduğu kontrol grubu ile benzer özellikte olup normal morfolojiye sahipken, az sayıdaki takizoitlerin yapılarının morfolojik olarak daha büyük yapıda olduğu görülmüştür. Aynı zamanda az sayıda yüzeye tutunamayan hücreler mevcuttur (Şekil 12.i). 1,25 µM'lık son konsantrasyonda ise yüzeye tutunan daha fazla normal morfolojili BeWo hücresi ve ebat olarak daha büyük normal morfolojili takizoit olduğu görülmüştür (Şekil 12.j). Giemsa boyama yöntemi ile yapılan morfoloji deneyinde, sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubu ve BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin birlikte yer aldığı kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılması sonucunda 1,25 µM'lık konsantrasyonun en iyi dozaj olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 12. Farklı NF konsantrasyonlarında Giemsa boyamalı enfekte BeWo hücrelerinin morfoloji deney görüntüleri (40X) **a)** BeWo Kontrol **b)** Parazit Kontrol **c)** 320 µM NF **d)** 160 µM NF **e)** 80 µM NF **f)** 40 µM NF

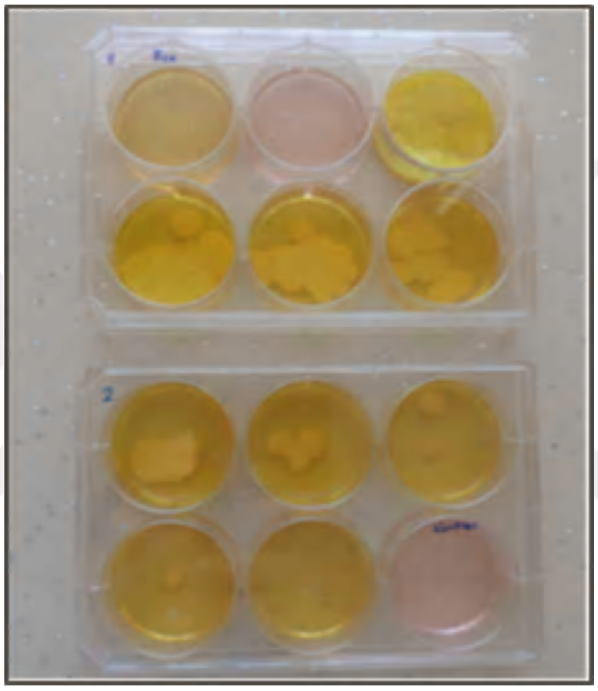


Şekil 12. Farklı NF konsantrasyonlarında Giemsa boyamalı enfekte BeWo hücrelerinin morfoloji deney görüntüleri (40X) **g)** 20 µM NF **h)** 10 µM NF **ı)** 5 µM NF **i)** 2,5 µM NF **j)** 1,25 µM NF

4.4. Hücre Canlılık Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.4.1. Trypan Blue Testi

Tripan blue boyama yöntemi, 3.3.2'de anlatıldığı gibi kontrol grupları ve deney gruplarına uygulanmıştır (Şekil 13). Boyama sonrasında invert mikroskop ile görüntüleme yapılmış ve hücreler canlılıkları açısından değerlendirilmiştir (Tablo 3).



Şekil 13. Tripan Blue boyama öncesinde örneklerin görüntüsü.

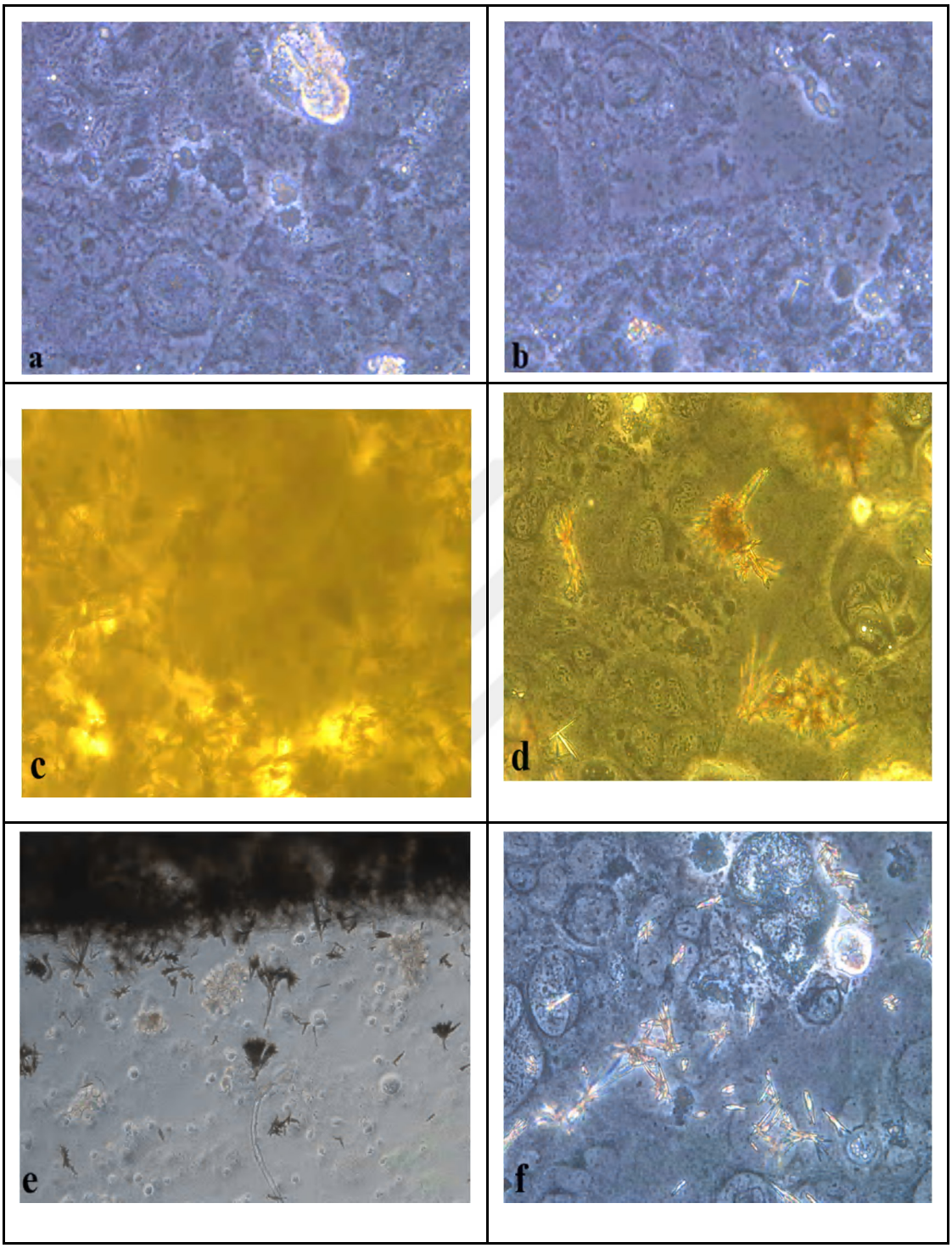
Tablo 3. Kontrol Grupları ve Deney Gruplarındaki Hücrelerin Canlılık Yüzdeleri

Gruplar	**BeWo Hücreleri (%)**	**Takizoitler (%)**
BeWo Kontrol Grubu	100	-
Parazit Kontrol grubu	84	96
320 µM	100	72
160 µM	60	76
80 µM	71	80
40 µM	100	70
20 µM	81	50
10 µM	70	15
5 µM	83	35
2,5 µM	50	14
1,25 µM	80	40

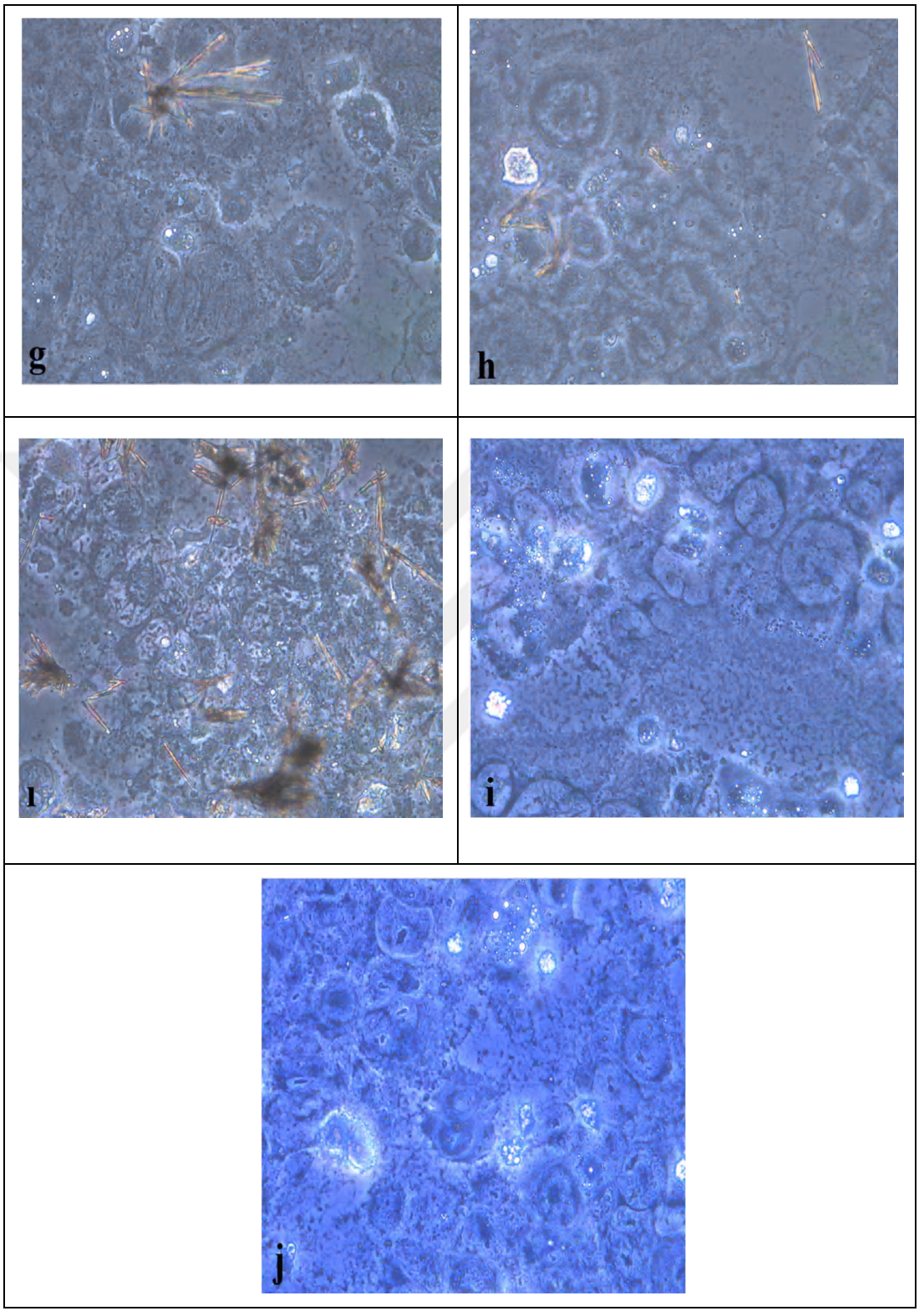
Tripan blue boyama sonrasında; sadece BeWo hücrelerinin olduğu kontrol grubunda, hücrelerin canlı ve normal morfolojik görünüme sahip olduğu görülmüştür (Şekil 14.a). BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubunda ise BeWo hücrelerinin canlı ve normal morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Takizoitlerin çoğalmış olduğu gözlemlenirken, sadece BeWo hücresinin olduğu kontrol grubuna göre BeWo hücre sayısında azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 14.b).

Hazırlanan 320 µM NF konsantrasyonunun yoğun olması ve hücre yüzeyinde tabaka oluşturması nedeniyle BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin varlığı gözlemlenememiştir (Şekil 14.c). 160 µM'lık NF konsantrasyonunun yoğun olması nedeniyle alanın büyük bir kısmı ilaç kristalleriyle kaplanmıştır. Ancak geri kalan görünen kısımda normal morfolojili BeWo hücrelerinin ve çok az sayıda takizoitlerin varlığı gözlemlenmiştir. Takizoitler ebat olarak büyüktür (Şekil 14.d). 80 µM'lık NF konsantrasyonunda, hücrelerin morfolojisi değişmiş ve çok sayıda yüzeyden ayrılan ölü hücrelerin olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda az miktarda takizoitin olduğu görülmüştür (Şekil 14.e). 40 µM'lık NF konsantrasyonunda, BeWo hücrelerinin morfolojik olarak yapısının bozulduğu gözlemlenmiş ve sayı olarak az fakat ebat olarak büyük olan takizoitlerin hareketlerinin azaldığı görülmüştür (Şekil 14.f). 20 µM'lık NF konsantrasyonunda, az sayıda olan canlı hücrelerin morfolojileri bozulmuş olduğu görülürken takizoitlerin miktarının artmış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 14.g). 10 µM'lık (Şekil 14.h) ve 5 µM'lık (Şekil 14.ı) konsantrasyonlarda, konsantrasyon azaldıkça BeWo hücrelerindeki morfolojik yapının düzeldiği görülürken, takizoitlerin ebat olarak büyüdüğü ve sayısının arttığı gözlemlenmiştir. 2,5 µM'lık konsantrasyonda BeWo hücrelerinin morfolojik yapısı normal ve yüzeyden kalkan hücreler olmamakla birlikte, az sayıda takizoitlerin olduğu görülmüştür (Şekil 14.i). 1,25 µM'lık son konsantrasyonda ise tüm yüzeyi kaplayan daha fazla normal morfolojili canlı BeWo hücresi olduğu görülmüştür. BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubuna göre takizoit sayısının az, fakat yüksek konsantrasyonlara oranla daha fazla takizoit olduğu görülmüştür (Şekil 14.j).

Tripan blue boyama yöntemi ile yapılan hücre canlılık deneyinde, sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubu ve BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılması sonucunda 1,25 µM'lık konsantrasyonun en iyi dozaj olduğu gözlemlenmiştir.



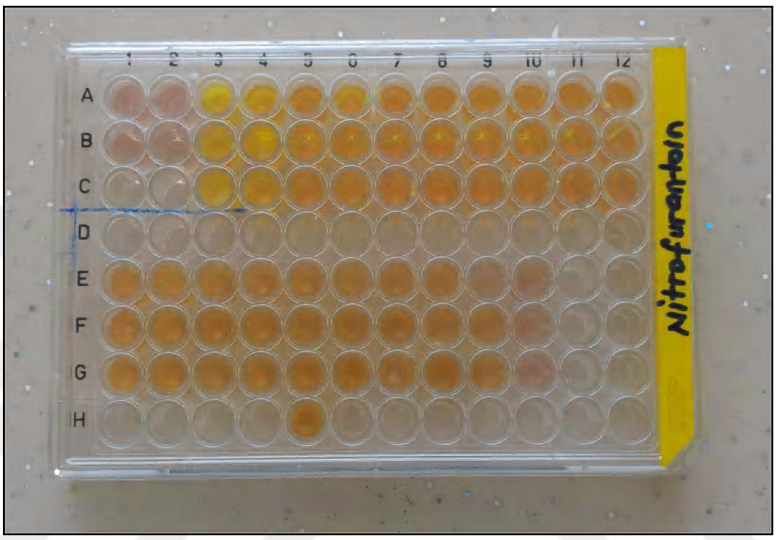
Şekil 14. Farklı NF konsantrasyonlarında enfekte BeWo hücrelerinin Tripan Blue boyama yöntemi ile canlılık deneyi görüntüleri (40X) **a)** BeWo Kontrol **b)** Parazit Kontrol **c)** 320 µM NF **d)** 160 µM NF **e)** 80 µM NF **f)** 40 µM NF



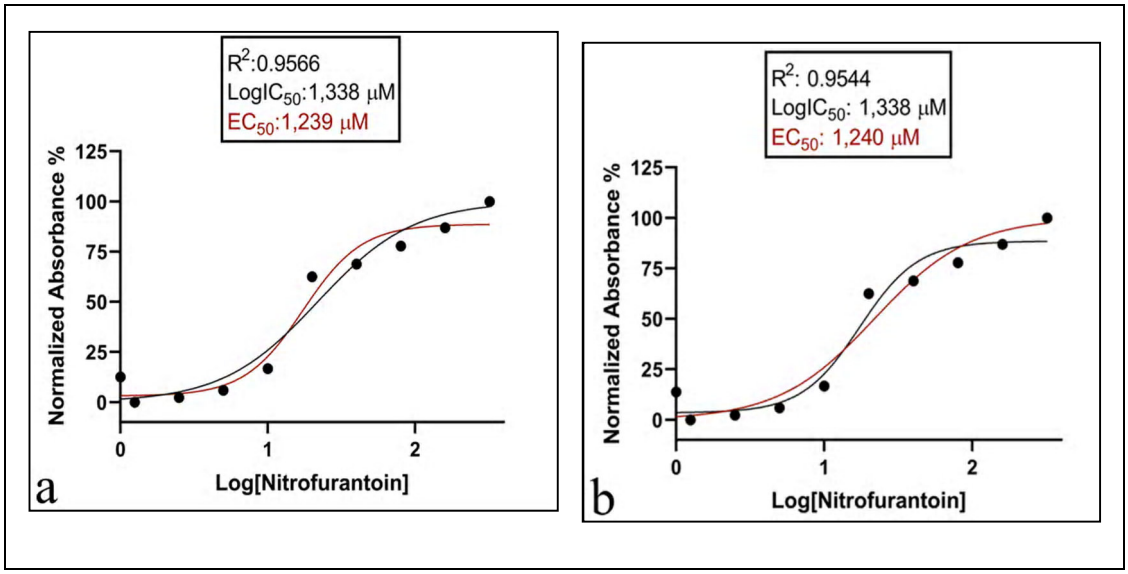
Şekil 14. Farklı NF konsantrasyonlarında enfekte BeWo hücrelerinin Tripan Blue boyama yöntemi ile canlılık deneyi görüntüleri (40X) **g)** 20 µM NF **h)** 10 µM NF **ı)** 5 µM NF **i)** 2,5 µM NF **j)** 1,25 µM NF

4.5. MTS Testi

MTS testi, 3.3.2'de anlatıldığı gibi kontrol grupları ve deney gruplarına uygulanmıştır (Şekil 15). ELISA reader cihazında yapılan ölçüm sonrasında GraphPad Prism 8.0 istatistik programı kullanılarak, normalize edilmiş absorbanslar ile IC_{50} (maksimum inhibisyon konsantrasyonu), EC_{50} (maksimum cevabın yarısını vermek için gerekli ilaç konsantrasyonu), R_2 değerleri belirlenmiştir (Şekil 16.a ve 16.b).



Şekil 15. MTS testi yapılmak üzere 96'lık kültür pleytine ekimi yapılan kontrol ve deney gruplarına ait hücre kültürü görüntüsü.



Şekil 16. a) Sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna göre IC_{50} ve EC_{50} değerleri **b)** takizoitlerle enfekte BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna göre IC_{50} ve EC_{50} değerleri.

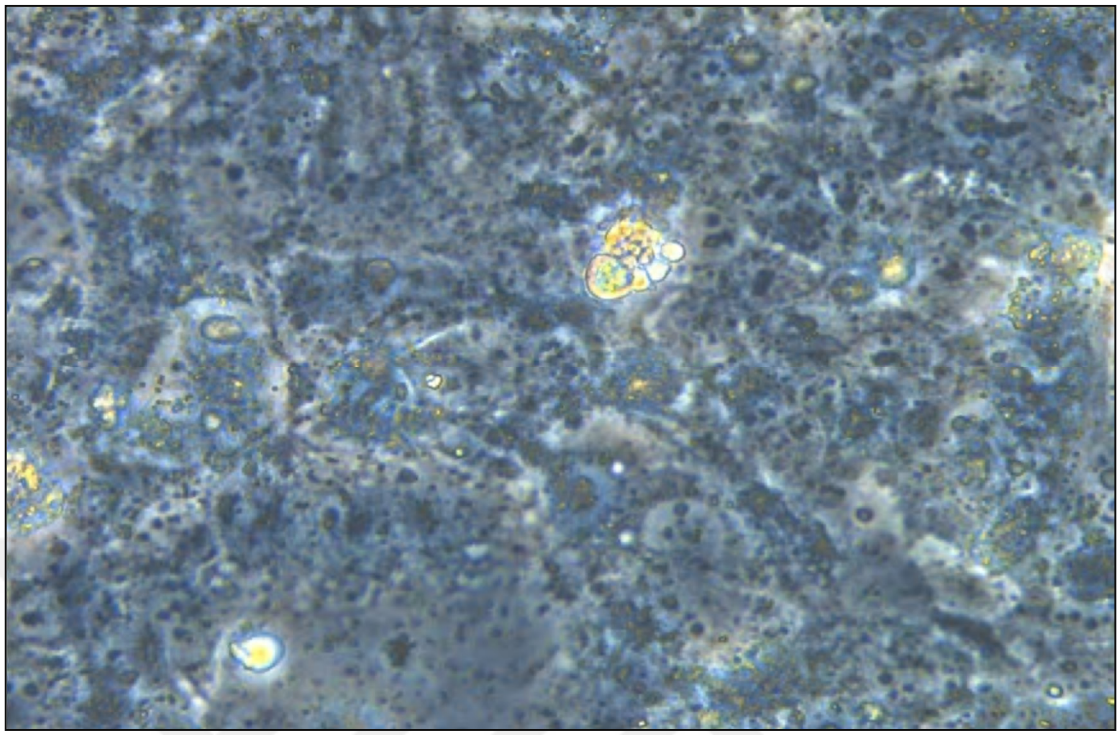
MTS sonucunda elde edilen verilere göre; 1,240 µM'a en yakın olan ve hem giemsa hem de tripan blue boyama deneyleri ile benzerlik gösteren 1,25 µM'lık NF konsantrasyonu en uygun dozaj olarak belirlenmiştir.

Uygun ilaç konsantrasyonunun TLR yolağına etkinliğinin belirlenmesi için 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç ayrı deney grubu oluşturulmuştur.

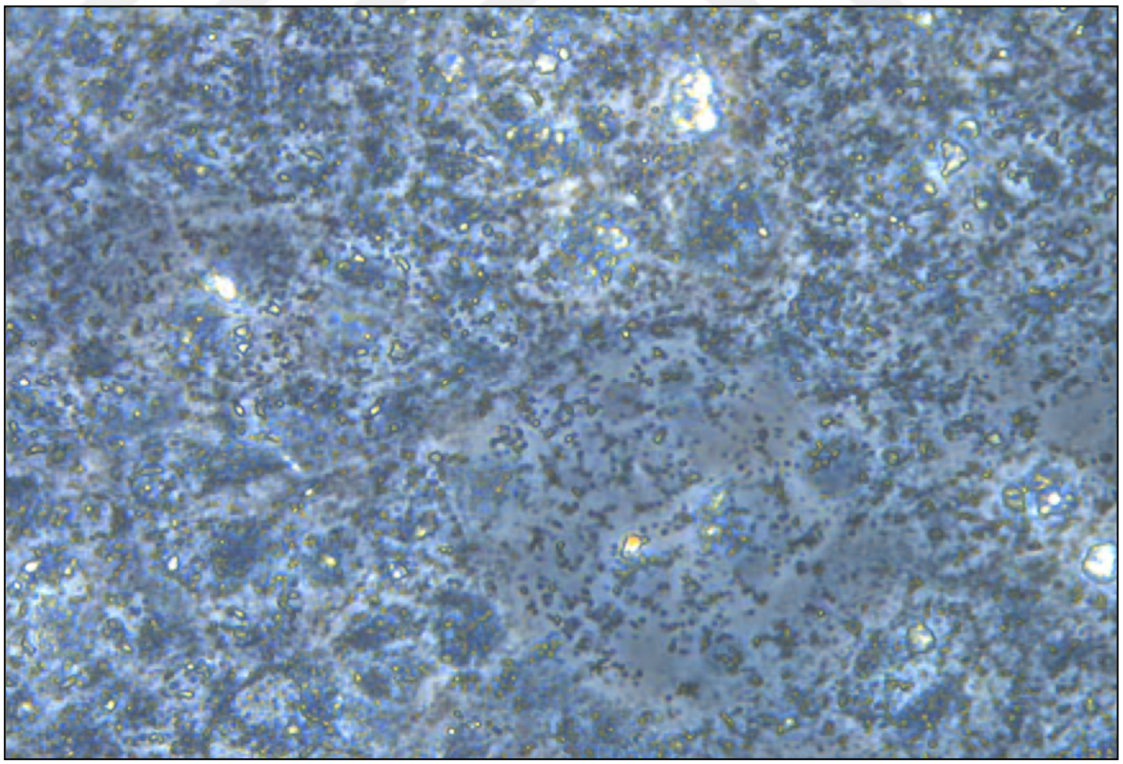
4.6. NF Konsantrasyonunun 24. Saatteki Değerlendirilmesi

24 saat için; 6'lı pleytlerde, sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubu, BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubu ve 1,25 µM'lık NF konsantrasyonun bulunduğu deney grubu oluşturulmuştur. 24 saat sonrasında her kuyucuktaki hücre ve parazitler invert mikroskopta incelenmiştir.

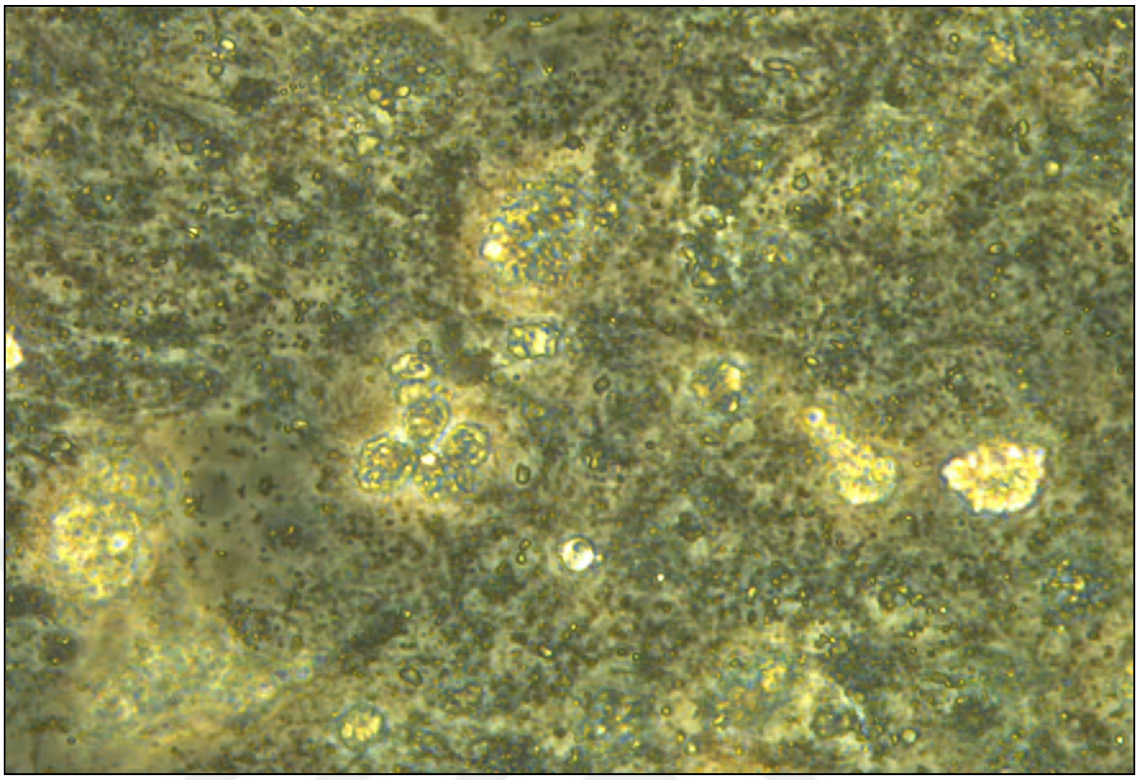
İnceleme sonrasında, sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubundaki hücrelerin normal morfojik yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 17). BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubunda da takizotlerin normal morfolojik yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 18). NF deney grubunda ise BeWo hücrelerinin normal morfolojide olduğu ve canlı parazitlerin bulunduğu gözlemlenmiştir. BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubuna göre ebat olarak büyük olduğu fakat sayı bakımından kontrol grubuyla aynı sayıda olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 17. 24.saatte sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)



Şekil 18. 24.saatte BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)

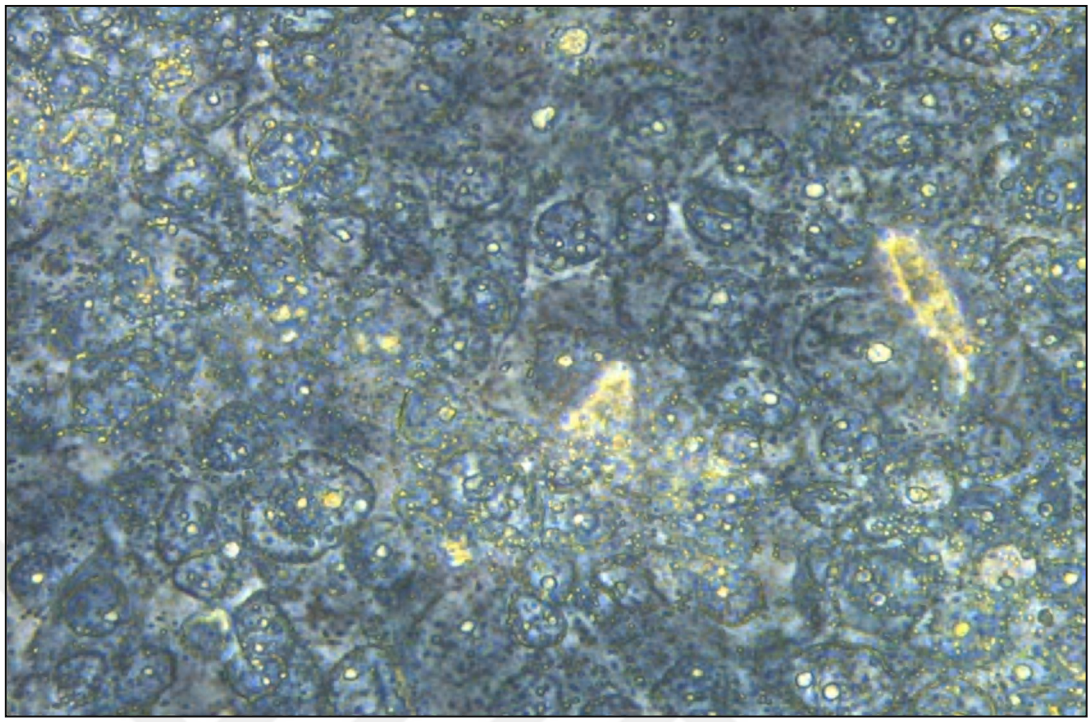


Şekil 19. 24.saatte 1,25 µM NF Deney grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X).

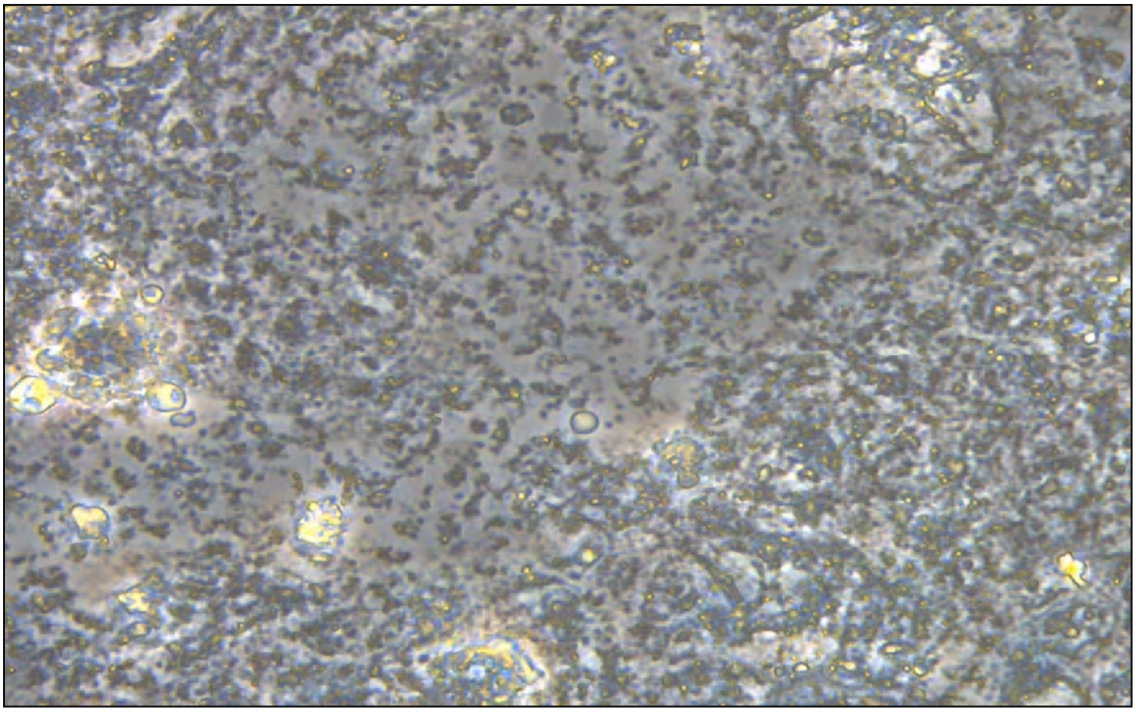
4.7. NF Konsantrasyonunun 48. Saatteki Değerlendirilmesi

48 saat için; 6'lı pleytlerde, sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubu, BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubu ve 1,25 µM'lık NF konsantrasyonun bulunduğu deney grubu oluşturulmuştur. 48 saat sonrasında her kuyucuktaki hücre ve parazitler invert mikroskopta incelenmiştir.

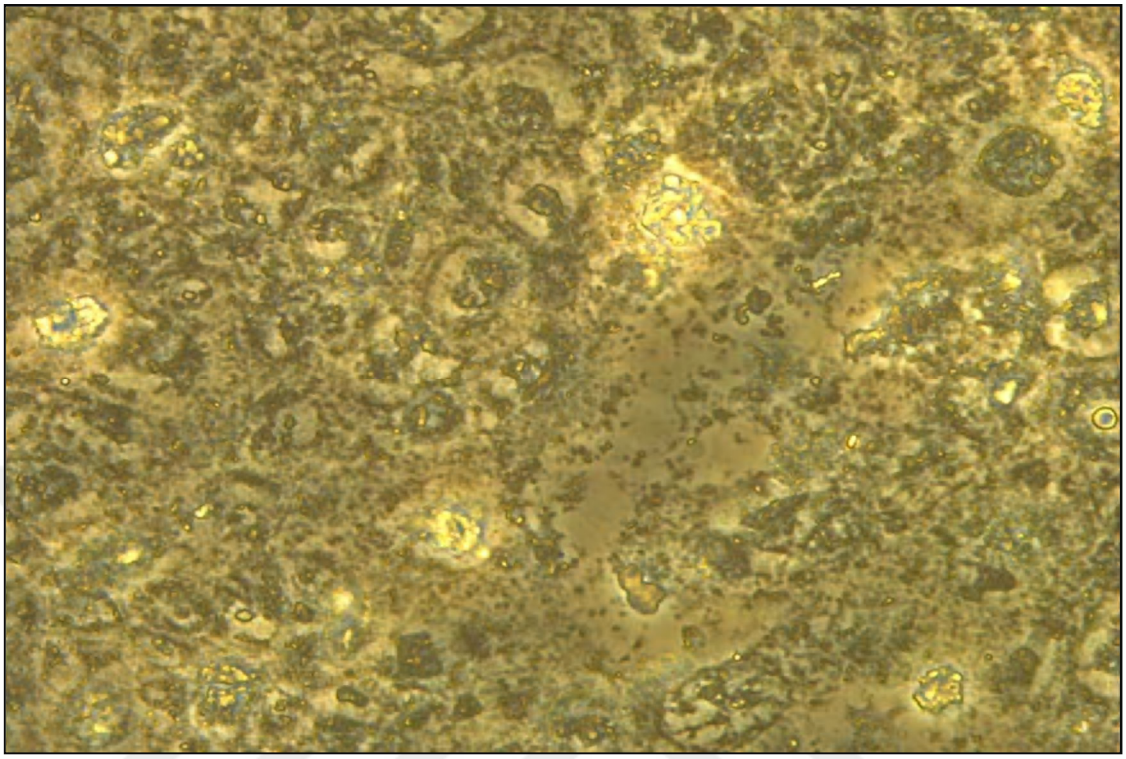
İnceleme sonrasında, sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubundaki hücrelerin normal morfojik yapıya sahip olduğu ve yüzeyi % 100 kaplamış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 20). BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubundaki hücrelerin morfolojik yapılarının bozulduğu ve yüzeyden ayrılan hücrelerin olduğu görülmüştür. Aynı zamanda takizoitlerin çoğaldığı gözlemlenmiştir. (Şekil 21). NF deney grubunda ise BeWo hücrelerinin morfolojilerinin bozulduğu ve yüzeyden ayrılan hücrelerin olduğu gözlemlenirken parazit kontrole göre takizoit sayısının daha az olduğu görülmüştür (Şekil 22).



Şekil 20. 48.saatte sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)



Şekil 21. 48.saatte BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)



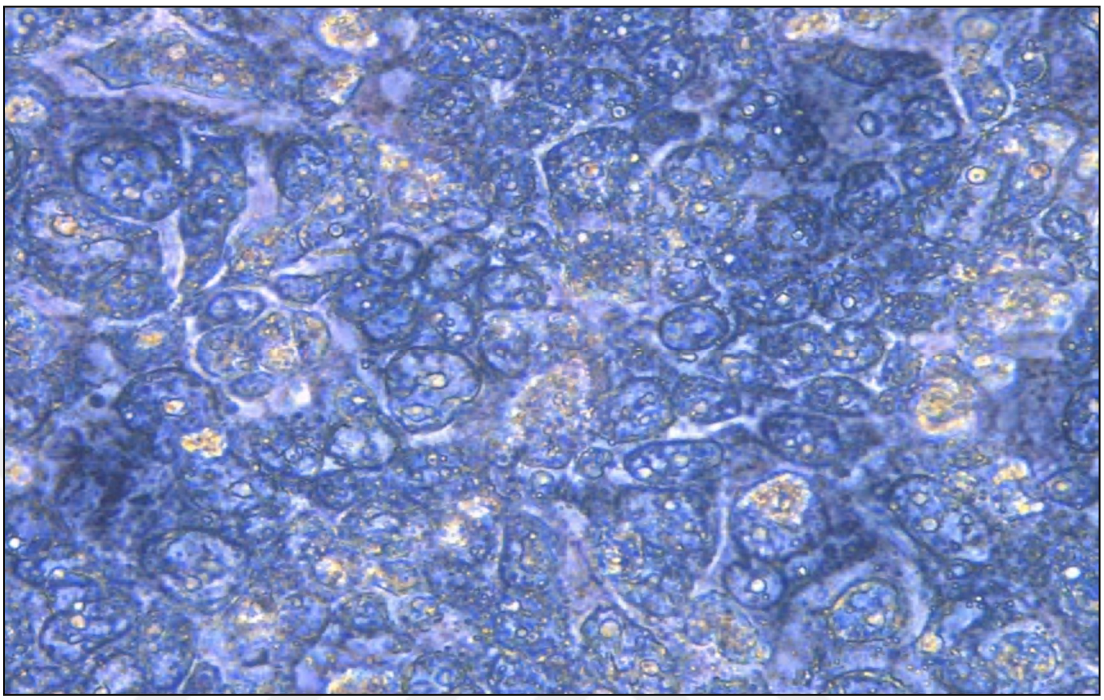
Şekil 22. 48.saatte 1,25 µM NF Deney grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)

4.8. NF Konsantrasyonunun 72. Saatteki Değerlendirilmesi

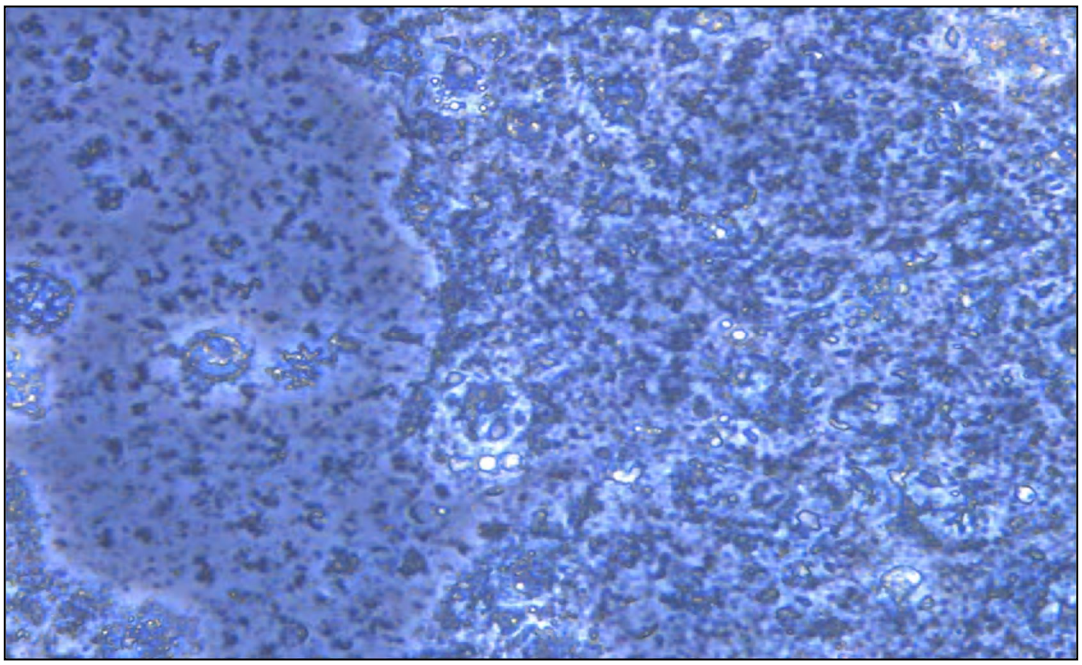
72 saat için; 6'lı pleytlerde, sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubu, takizoitlerle enfekte BeWo hücresinin bulunduğu kontrol grubu ve 1,25 µM'lık NF konsantrasyonun bulunduğu deney grubu oluşturulmuştur. 72 saat sonrasında her kuyucuktaki hücre ve parazitler invert mikroskopta incelenmiştir.

İnceleme sonrasında, sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubundaki hücrelerin normal morfojik yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 23). BeWo hücresi ile parazitin bulunduğu kontrol grubunda hücrelerin morfolojik yapılarının bozulduğu görülmüştür. Takizoitlerin miktarlarının yoğun olmasıyla birlikte morfolojilerinin normal yapıda ve hareketlerinin hızlı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 24). NF deney grubunda ise sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna göre yüzeyden ayrılan hücre sayısı fazla olmakla birlikte hücre morfolojisinin bozulduğu

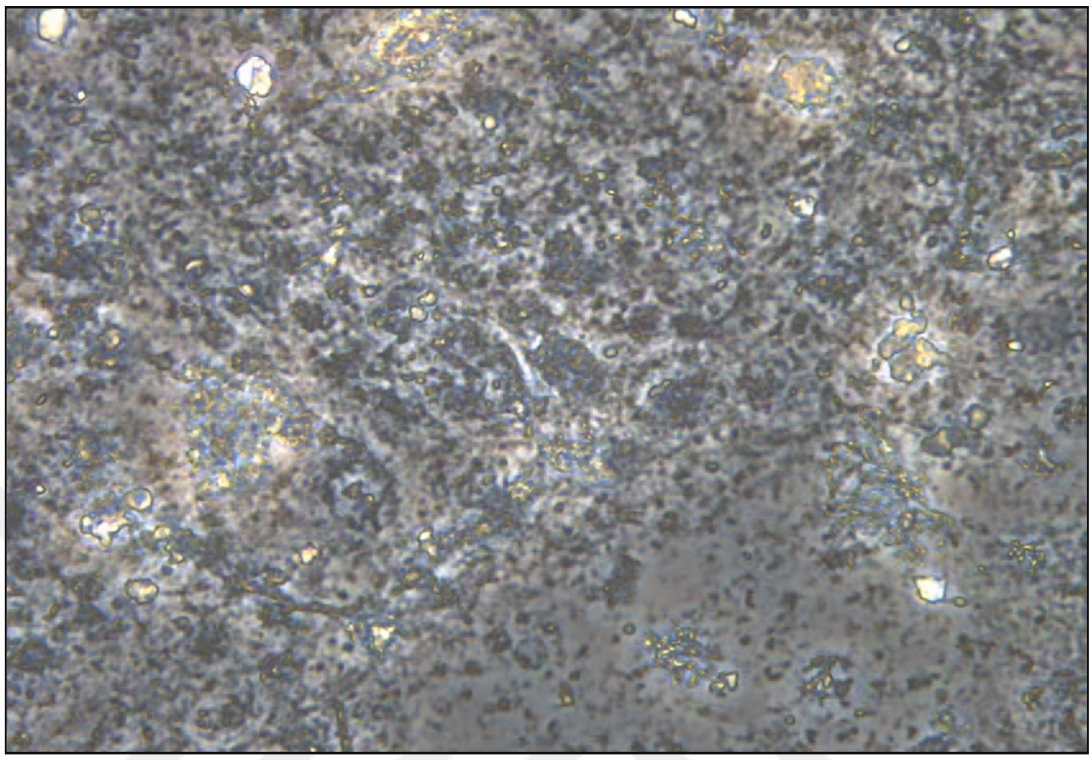
görülmüştür. Canlı hücre sayısı ise azdır. Takizoitlerin sayı olarak parazit kontrole daha az fakat ebat olarak daha büyük olduğu görülmüştür (Şekil 25).



Şekil 23. 72.saatte sadece BeWo hücrelerinin bulunduğu kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X).



Şekil 24. 72.saatte BeWo hücrelerinin ve takizoitlerin yer aldığı kontrol grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)



Şeki 25. 72.saatte 1,25 µM NF deney grubuna ait hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüsü (40X)

İnvert mikroskoptaki görüntülemenin ardından, 24., 48. ve 72. saatlerdeki deney sonrasında 3.4.1 ve 3.4.2'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen her bir cDNA'ya TLR paneli uygulanmıştır.

4.9. RT-qPCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Gen ekspresyon seviyelerini belirlemek için kullanılan RNA örneklerinin nanodrop ölçümleri yapılmıştır. Enfekte hücrelerde ortalama 0,3 µg/µl kaliteli RNA olduğu tespit edilmiştir. Bu RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezlenmiş ve RT-qPCR analizleri yapılmıştır. RT-qPCR sonucunda; 72.saat kontrol grubunda B2M referans geni kullanılırken, diğer kontrol ve deney grupları için GAPD referans geni kullanılarak gen ekspresyonlarındaki orantısal değişim hesaplanmıştır. TLR paneli ile 84 adet gen incelenmiş olup, bunlardan ACTB, B2M, GAPD, PGK, GUSB, PPIA, RPL13A olmak üzere yedisi 'house keeping' genlerden oluşmaktadır. Bu genlerden bazıları immun

modülatör genler iken bazıları immun modülasyona bağlı aktive olan kanser genlerinden oluşmaktadır.

4.9.1. Genlerin Ekspresyon Seviyesinde ve Eksprese Edilen RNA Miktarlarında 24., 48. ve 72. Saatte Meydan Gelen Değişiklikler

24.saat BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubunda B2M geni 72.saat BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubunda B2M geni, diğer saatlere ait, BeWo kontrol, parazit kontrol ve NF deney grubunda GAPD geninin ekspresyon seviyesi temel alınmıştır. Program aracılığıyla hesaplanan, enfeksiyona ve NF ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak, BeWo kontrol grubuna ve parazit kontrol grubuna göre gen ekspresyon seviyesinde değişiklik olan genler ve bu genlere ait Cq değerleri (Tablo 4) ile eksprese edilen RNA miktarları aşağıda belirtilmiştir (Tablo 5).

Tablo 4. BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu ve takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubuna göre deney grubundaki genlere ait ekspresyon seviyesindeki değişiklikler

Gen Ekspresyon Seviyesi (Cq)									
Genler	24 saat			48 saat			72 saat		
	Hücre Kontrol	Parazit Kontrol	NF Deney	Hücre Kontrol	Parazit Kontrol	NF Deney	Hücre Kontrol	Parazit Kontrol	NF Deney
AKT2	21.44	23.10	22.12	21.05	23.47	22.83	22.60	22.82	22.51
AKT3	31.99	34.34	35.75	35.19	36.23	32.69	32.50	32.97	32.20
Casp8	27.85	29.89	28.99	30.64	31.05	30.26	29.33	28.89	29.76
CCL3	35.01	35.32	35.83	37.65	0	35.73	37.09	36.11	36.67
CCL5	24.69	26.51	28.23	27.02	29.11	30.15	26.86	28.24	32.58
CCL4	28.03	28.92	28.73	29.23	30.76	28.04	28.63	28.15	29.78
CD14	32.07	32.26	31.68	30.21	35.07	34.67	31.71	32.73	33.77
CD40	25.93	28.05	29.69	28.54	29.87	30.70	32.68	27.81	30.52
CD80	29.67	30.94	30.06	29.55	31.79	32.28	30.20	30.91	31.73
CD86	33.16	32.57	33.16	32.12	35.94	33.25	33.91	34.47	36.46
CHUK	30.77	31.74	29.50	30.69	31.69	31.80	31.21	30.10	33.47
CXCL10	28.72	29.27	28.71	28.28	29.08	30.16	29.43	28.81	30.44
CXCL11	30.06	32.60	30.68	29.87	32.25	33.76	32.31	30.97	32.72
CXCL12	29.91	30.71	29.93	29.67	30.48	32.71	31.20	31.09	32.83
FADD	25.85	26.66	29.60	31.76	28.80	31.21	33.84	31.55	36.24
FOS	22.85	24.82	25.05	26.18	27.11	25.83	26.46	23.67	25.80
IFNa7	32.23	32.31	34.16	33.34	36.73	36.56	34.90	36.24	34.65
IFNaR5	29.58	30.26	29.67	28.94	36.73	31.42	30.22	29.21	31.66

IFNAR5	32.95	33.72	34.42	35.83	30.69	33.97	35.69	34.19	35.13
IFNB1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IKBKB	28.04	29.42	30.90	29.94	32.25	34.09	31.27	31.12	35.02
IKBKE	28.70	30.44	31.09	30.62	32.63	32.71	32.00	30.95	32.27
IKBKG	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL12a	32.81	34.55	33.84	32.11	34.90	34.69	33.44	33.17	34.48
IL12b	28.86	30.59	30.28	30.13	32.47	33.89	31.24	30.57	34.70
IL1b	25.08	26.73	26.50	26.00	27.24	27.81	27.69	27.14	27.51
IL6	33.54	35.52	35.04	31.29	34.13	34.22	36.65	34.69	40.00
IL8	40.00	37.23	40.00	40.00	0	40.00	38.26	38.72	0
IRAK1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRAK4	31.95	32.13	33.23	31.26	32.90	33.24	32.45	32.24	33.50
IRF3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRF5	22.59	24.01	24.54	24.15	24.73	24.21	25.10	24.18	25.09
IRF7	21.27	22.03	21.23	20.90	22.89	22.81	21.98	22.01	22.00
JUN	25.56	30.61	28.17	28.14	30.64	30.64	31.30	26.15	31.69
LBP	30.25	32.84	31.34	30.49	33.42	32.44	32.74	31.51	32.97
LY96	31.53	33.31	34.00	33.74	34.29	34.16	34.64	34.64	33.77
MAP2K1	26.70	27.54	28.13	29.15	28.82	30.61	32.58	26.97	32.55
MAP2K2	22.85	25.67	27.52	27.76	28.60	29.29	29.34	27.07	31.88
MAP2K3	24.54	27.63	29.77	29.55	30.99	31.18	32.61	30.46	31.87
MAP2K4	25.21	26.48	26.56	28.58	28.79	27.88	28.60	27.73	26.97
MAP2K5	26.99	28.91	28.60	27.82	29.99	30.97	29.70	28.43	31.79
MAP2K7	24.54	26.33	26.56	25.74	28.12	28.67	26.84	26.93	28.05
MAP3K7	22.86	23.85	23.31	22.90	24.57	24.50	23.85	24.03	24.65
MAP3K8	27.70	28.71	28.76	29.58	29.62	30.48	30.65	29.56	28.80
MAPK1	33.49	34.52	32.72	33.94	35.99	36.85	34.23	32.26	34.34
MAPK10	29.50	30.81	29.49	29.55	31.71	31.75	30.93	30.31	30.90
MAPK9	28.55	29.14	28.64	31.46	31.69	31.17	33.54	28.22	35.71
MAPK13	28.93	30.93	31.17	30.93	33.19	34.56	32.08	31.59	34.20
MAPK14	31.87	31.30	32.45	31.78	32.53	35.30	33.61	30.26	35.62
MAPK3	23.08	26.53	29.24	28.08	29.17	31.64	33.32	26.67	33.92
MYD88	28.70	29.45	31.47	32.26	33.87	32.84	35.23	33.34	35.64
NFKb1	30.45	30.66	30.81	32.33	33.35	33.69	35.19	30.92	34.51
NFKb2	23.89	25.11	24.74	23.96	24.98	26.03	25.53	26.23	25.24
NFKBIB	26.47	28.76	29.25	29.60	30.80	31.74	31.91	30.06	32.05
PIK3CA	29.00	30.00	30.63	29.48	31.01	30.83	29.26	29.71	31.04
PIK3CB	34.64	34.83	35.37	30.48	35.28	37.64	34.94	34.21	37.15
PIK3CD	22.68	23.54	23.77	22.56	23.88	24.07	23.57	23.89	24.21
PIK3CG	21.16	21.75	21.55	21.63	22.49	21.86	22.56	22.12	22.29

PIK3R1	34.25	36.48	36.07	35.74	40.00	36.42	37.29	36.77	36.83
PIK3R2	20.61	21.92	20.03	19.61	22.18	22.42	21.07	20.82	22.44
PIK3R3	28.48	30.02	29.51	29.11	29.95	30.85	30.76	29.47	30.86
PIK3R5	28.17	29.56	30.13	29.90	31.76	32.01	32.51	30.87	32.17
RAC1	24.75	25.78	26.04	26.76	29.06	28.66	27.90	24.77	30.52
RELA	25.67	27.76	28.43	25.07	28.14	29.65	29.29	27.79	29.82
RIPK1	30.79	30.87	30.72	31.00	32.55	31.97	31.43	31.68	32.57
SPP1	33.03	33.54	31.47	29.99	32.13	35.86	30.75	30.87	33.95
STAT1	28.62	30.04	28.89	29.99	29.62	30.74	29.55	27.55	33.91
TAB1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TAB2protein2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBK1	33.88	36.08	34.67	35.62	40.00	35.13	35.73	38.01	35.28
TICAM1	27.27	29.21	29.49	28.13	30.45	29.92	29.94	29.44	30.29
TICAM2	40.00	0	0	40.00	0	0	0	0	0
TIRAP	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TLR1	29.64	30.32	28.72	27.52	30.71	31.02	29.22	28.14	31.73
TLR10	24.78	26.75	26.59	25.86	27.02	27.89	27.25	27.58	27.57
TLR2	28.56	29.78	28.54	27.88	30.26	31.48	28.93	29.01	31.23
TLR3	37.45	36.54	37.58	38.00	39.25	40.00	38.47	40.00	40.00
TLR4	29.80	31.19	30.92	28.59	31.25	33.42	29.50	32.51	31.61
TLR5	27.89	31.01	28.44	29.44	31.71	32.43	29.59	30.43	32.80
TLR6	31.07	32.35	32.27	30.71	31.51	36.71	31.04	32.66	33.48
TLR7	18.55	19.22	19.59	19.16	19.93	20.36	19.85	19.85	20.49
TLR8	31.77	32.90	31.57	30.06	33.19	35.77	31.97	31.64	34.71
TLR9	27.93	29.92	29.33	28.25	29.90	30.78	29.89	29.29	30.62
TNF	28.04	29.32	28.32	28.19	30.00	30.30	29.22	27.92	29.69
TOLLIP	0	28.09	27.53	27.68	28.64	29.72	28.71	28.36	28.98
TIRAF4	25.96	27.60	29.43	30.16	30.34	31.84	33.65	29.87	31.17
TIRAF1	26.51	28.70	26.97	26.77	29.01	30.64	28.09	27.45	30.68
ACTB	17.53	20.48	22.19	22.89	25.57	25.20	27.86	21.96	27.72
B2M	23.72	23.17	22.66	22.50	23.45	25.35	●	21.58	27.69
GAPD	17.63	■	■	■	■	■	27.50	■	■
GUSB	24.85	26.76	28.97	27.90	29.30	32.16	31.16	26.70	35.25
HPRT1	40.00	40.00	40.00	0	40.00	0	0	40.00	0
PGK	▲	24.75	26.95	27.04	26.21	29.46	30.81	25.23	32.17
PPIA	21.91	24.58	24.72	24.84	25.59	27.46	29.70	23.88	29.87
RPL13A	17.60	19.61	20.53	19.70	20.62	22.84	24.01	0	0

● **;** Sadece 72.saat BeWo hücre kontrolü için referans alınan gen.
■ **;** 24,48 ve 72. Saat için referans alınan gen (72.saat BeWo hücre kontrolü için referans alınan gen hariç).
▲ **;** Sadece 24.saat BeWo hücre kontrolü için referans alınan gen.

Tablo 5. BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu ve takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubuna göre deney grubundaki genlerin eksprese edilen RNA miktarlarındaki değişiklikler.

Ekspresе Edilen RNA Miktarlarındaki Değişiklikler									
Genler	**24 saat**			**48 saat**			**72 saat**		
	Hücre Kontrol	**Parazit Kontrol**	**NF Deney**	**Hücre Kontrol**	**Parazit Kontrol**	**NF Deney**	**Hücre Kontrol**	**Parazit Kontrol**	**NF Deney**
AKT2	3.492	0.1129	0.8104	0.8053	0.3221	3.070	3.794	0.1172	21.92
AKT3	$2.34x10^3$	$4.67 x10^5$	$6.39 x10^5$	$4.49 x10^3$	$4.63 x10^5$	$3.30 x10^3$	$3.99 x10^3$	$1.04 x10^4$	$2.65 x10^2$
Casp8	$4.12 x10^2$	$1.02 x10^3$	$6.94 x10^3$	$1.05 x10^3$	$1.68 x10^3$	$1.78 x10^2$	$3.59 x10^2$	$1.74 x10^3$	0.1443
CCL3	$2.87 x10^4$	$2.35 x10^5$	$6.03 x10^5$	$8.13 x10^6$	0	$3.99 x10^4$	$1.66 x10^4$	$1.17 x10^5$	$1.20 x10^3$
CCL5	0.3669	$1.06 x10^2$	$1.17 x10^2$	$1.29 x10^3$	$6.47 x10^3$	$1.92 x10^2$	0.1992	$2.75 x10^3$	$2.04 x10^2$
CCL4	$3.65 x10^2$	$1.99 x10^3$	$8.28 x10^3$	$2.79 x10^3$	$2.05 x10^3$	$8.30 x10^2$	$5.84 x10^2$	$2.91 x10^3$	0.1422
CD14	$2.20 x10^3$	$1.96 x10^4$	$1.07 x10^3$	$1.41 x10^3$	$1.04 x10^4$	$8.36 x10^4$	$6.91 x10^3$	$1.22 x10^4$	$8.91 x10^3$
CD40	0.1559	$3.64 x10^3$	$4.26 x10^3$	$4.49 x10^3$	$3.82 x10^3$	$1.31 x10^2$	$3.52 x10^3$	$3.70 x10^3$	$8.50 x10^2$
CD80	$1.17 x10^2$	$4.93 x10^4$	$3.30 x10^3$	$2.22 x10^3$	$1.01 x10^3$	$4.39 x10^3$	$1.96 x10^2$	$4.32 x10^4$	$3.68 x10^2$
CD86	$1.04 x10^3$	$1.59 x10^4$	$3.83 x10^4$	$3.75 x10^4$	$5.68 x10^5$	$2.23 x10^3$	$1.50 x10^3$	$3.64 x10^3$	$1.39 x10^3$
CHUK	$5.43 x10^3$	$2.83 x10^4$	$4.87 x10^3$	$1.01 x10^3$	$1.08 x10^3$	$6.10 x10^3$	$9.76 x10^3$	$7.55 x10^4$	$1.10 x10^2$
CXCL10	$2.25 x10^2$	$1.57 x10^3$	$8.38 x10^3$	$5.38 x10^3$	$6.61 x10^3$	$1.90 x10^2$	$3.35 x10^2$	$1.85 x10^3$	$8.98 x10^2$
CXCL11	$8.89 x10^3$	$1.55 x10^4$	$2.14 x10^3$	$1.79 x10^3$	$7.31 x10^4$	$1.57 x10^3$	$4.55 x10^3$	$4.13 x10^4$	$1.85 x10^2$
CXCL12	$9.90 x10^3$	$5.7 x10^4$	$3.61 x10^3$	$2.05 x10^3$	$2.49 x10^3$	$3.26 x10^3$	$9.77 x10^3$	$3.81 x10^4$	$1.71 x10^2$
FADD	0.1648	$9.52 x10^3$	$4.53 x10^3$	$4.83 x10^4$	$8.02 x10^3$	$9.20 x10^3$	$1.57 x10^3$	$2.77 x10^4$	$1.61 x10^3$
FOS	1.318	$3.43 x10^2$	0.1059	$2.30 x10^2$	$2.58 x10^2$	0.3823	0.2614	$6.52 x10^2$	2.234
IFNa7	$1.97 x10^3$	$1.90 x10^4$	$1.92 x10^4$	$1.61 x10^4$	$3.2 x10^5$	$2.25 x10^4$	$7.56 x10^4$	$1.07x10^3$	$4.86 x10^3$
IFNaR5	$1.24 x10^2$	$7.89 x10^4$	$4.32 x10^3$	$3.40 x10^3$	$2.17 x10^3$	$7.93 x10^3$	$1.93 x10^2$	$1.40 x10^3$	$3. x10^2$
IFNAR5	$1.20 x10^3$	$7.15 x10^5$	$1.61 x10^4$	$2.87 x10^5$	$2.19 x10^5$	$1.36 x10^3$	$4.37 x10^4$	$4.42 x10^5$	$3.48 x10^3$
IFNB1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IKBKB	$3.61 x10^2$	$1.41 x10^3$	$1.84 x10^3$	$1.70 x10^3$	$7.31 x10^4$	$1.25 x10^3$	$9.31 x10^3$	$3.74 x10^4$	$3.75 x10^3$
IKBKE	$2.29 x10^2$	$6.93 x10^4$	$1.61 x10^3$	$1.06 x10^3$	$5.62 x10^4$	$3.26 x10^3$	$5.63 x10^3$	$4.18 x10^4$	$2.52 x10^2$
IKBKG	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL12a	$1.32 x10^3$	$4.03 x10^5$	$2.4x x10^4$	$3.79 x10^4$	$1.17 x10^4$	$8.22 x10^4$	$2.08 x10^3$	$9.00 x10^5$	$5.47 x10^3$
IL12b	$2.05 x10^2$	$6.28 x10^4$	$2.83 x10^3$	$1.49 x10^3$	$6.28 x10^4$	$1.43 x10^3$	$9.53 x10^3$	$5.47 x10^4$	$4.70 x10^3$
IL1b	0.2812	$9.07 x10^3$	$3.90 x10^2$	$2.60 x10^2$	$2.37 x10^2$	$9.68 x10^2$	0.1115	$5.86 x10^3$	0.6861
IL6	$7.98 x10^4$	$2.05 x10^5$	$1.05 x10^4$	$6.69 x10^4$	$1.99 x10^4$	$1.14 x10^3$	$2.24 x10^4$	$3.13 x10^5$	$1.19 x10^4$
IL8	$9.06 x10^6$	$6.26 x10^6$	$3.35 x10^6$	$1.59 x10^6$	0	$2.08 x10^5$	$7.33 x10^5$	$1.92 x10^6$	0
IRAK1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRAK4	$2.41 x10^3$	$2.16 x10^4$	$3.67 x10^4$	$6.83 x10^4$	$4.67 x10^4$	$2.26 x10^3$	$4.13 x10^3$	$1.72 x10^4$	$1.08 x10^2$
IRF3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRF5	1.581	$5.99 x10^2$	0.1508	$9.43 x10^2$	0.1346	1.177	0.6745	$4.58 x10^2$	3.664
IRF7	3.930	0.2369	1.498	0.8968	0.4819	3.097	5.842	0.2060	31.17
JUN	0.2014	$6.16 x10^4$	$1.22 x10^2$	$5.94 x10^3$	$2.23 x10^3$	$1.37 x10^2$	$9.16 x10^3$	$1.17 x10^2$	$3.77 x10^2$
LBP	$7.82 x10^3$	$1.31 x10^4$	$1.36 x10^3$	$1.17 x10^3$	$3.26 x10^4$	$3.92 x10^3$	$3.37 x10^3$	$2.85 x10^4$	$1.56 x10^2$
LY96	$3.21 x10^3$	$9.54 x10^5$	$2.15 x10^4$	$1.23 x10^4$	$1.78 x10^4$	$1.19 x10^3$	$9.01 x10^4$	$3.24 x10^5$	$8.94 x10^3$
MAP2K1	$9.16 x10^2$	$5.17 x10^3$	$1.26 x10^2$	$2.95 x10^3$	$7.91 x10^3$	$1.39 x10^2$	$3.76 x10^3$	$6.62 x10^3$	$2.0 x10^2$
MAP2K2	1.319	$1.90 x10^2$	$1.91 x10^2$	$7.71 x10^3$	$9.22 x10^3$	$3.49 x10^2$	$3.55 x10^2$	$6.19 x10^3$	$3.30 x10^2$
MAP2K3	0.4096	$4.88 x10^3$	$4.02 x10^3$	$2.24 x10^3$	$1.75 x10^3$	$9.37 x10^3$	$3.70 x10^3$	$5.89 x10^4$	$3.34 x10^2$

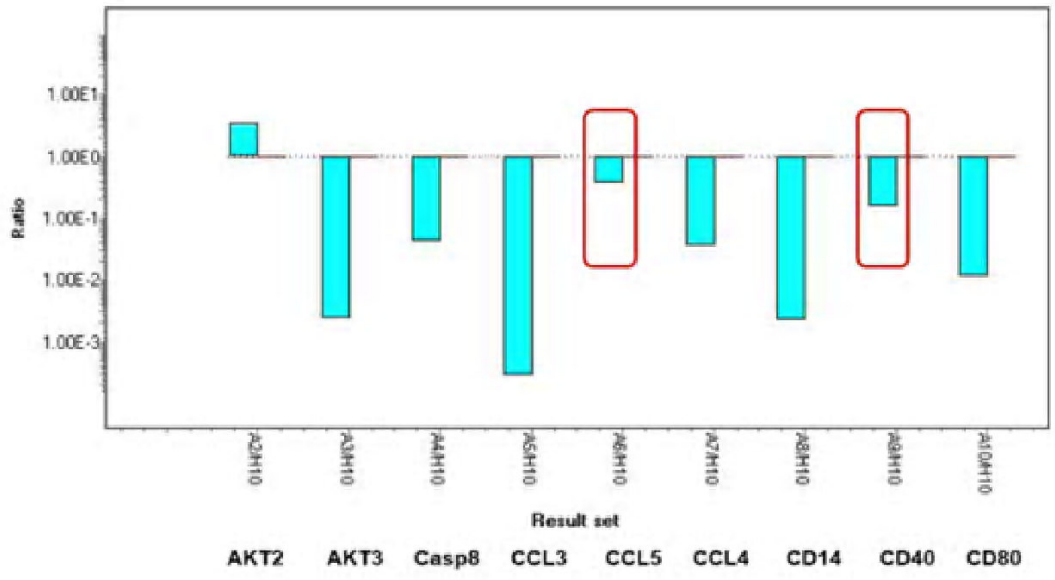
MAP2K4	0.2560	1.08×10^{2}	3.73×10^{2}	4.36×10^{3}	8.07×10^{3}	9.28×10^{2}	5.94×10^{2}	3.91×10^{3}	0.9961
MAP2K5	7.45×10^{2}	2.01×10^{3}	9.09×10^{3}	7.39×10^{3}	3.51×10^{3}	1.09×10^{2}	2.78×10^{2}	2.41×10^{3}	3.52×10^{2}
MAP2K7	0.4080	1.20×10^{2}	3.73×10^{2}	3.13×10^{2}	1.28×10^{2}	5.35×10^{2}	0.2014	6.81×10^{3}	0.4717
MAP3K7	1.307	6.71×10^{2}	0.3545	0.2244	0.1498	0.9623	1.603	5.06×10^{2}	4.968
MAP3K8	4.57×10^{2}	2.30×10^{3}	8.09×10^{3}	2.19×10^{3}	4.53×10^{3}	1.52×10^{2}	1.43×10^{2}	1.10×10^{3}	0.2795
MAPK1	8.25×10^{4}	4.12×10^{5}	5.21×10^{4}	1.07×10^{4}	5.47×10^{5}	1.84×10^{4}	1.20×10^{3}	1.69×10^{4}	6.04×10^{3}
MAPK10	1.31×10^{2}	5.37×10^{4}	4.89×10^{3}	2.23×10^{3}	1.07×10^{3}	6.33×10^{3}	1.19×10^{2}	6.51×10^{4}	6.53×10^{2}
MAPK9	2.53×10^{2}	1.71×10^{3}	8.83×10^{3}	5.95×10^{4}	1.08×10^{3}	9.45×10^{3}	1.94×10^{3}	2.77×10^{3}	2.32×10^{3}
MAPK13	1.95×10^{2}	4.96×10^{4}	1.53×10^{3}	8.56×10^{4}	3.83×10^{4}	9.01×10^{4}	5.34×10^{3}	2.69×10^{4}	6.63×10^{3}
MAPK14	2.54×10^{3}	3.84×10^{4}	6.29×10^{4}	4.75×10^{4}	6.03×10^{4}	5.38×10^{4}	1.84×10^{3}	6.78×10^{4}	2.47×10^{3}
MAPK3	1.125	1.04×10^{2}	5.81×10^{3}	6.20×10^{3}	6.21×10^{3}	6.85×10^{3}	2.26×10^{3}	8.13×10^{3}	8.05×10^{3}
MYD88	2.29×10^{2}	1.38×10^{3}	1.24×10^{3}	3.42×10^{4}	2.38×10^{4}	2.96×10^{3}	6.00×10^{4}	8.03×10^{5}	2.45×10^{3}
NFKb1	6.78×10^{3}	5.9×10^{4}	1.96×10^{3}	3.24×10^{4}	3.43×10^{4}	1.65×10^{3}	6.15×10^{4}	4.28×10^{4}	5.36×10^{3}
NFKb2	0.6422	2.80×10^{2}	0.1312	0.1074	0.1130	0.3335	0.4996	1.10×10^{2}	3.296
NFKBIB	0.1075	2.23×10^{3}	5.76×10^{3}	2.15×10^{3}	2.00×10^{3}	6.38×10^{3}	6.01×10^{3}	7.77×10^{4}	2.94×10^{2}
PIK3CA	1.85×10^{2}	9.43×10^{4}	2.22×10^{3}	2.34×10^{3}	1.73×10^{3}	1.20×10^{2}	3.77×10^{2}	9.90×10^{4}	5.92×10^{2}
PIK3CB	3.71×10^{4}	3.31×10^{5}	8.31×10^{5}	1.17×10^{3}	8.97×10^{5}	1.06×10^{4}	7.33×10^{4}	4.38×10^{5}	8.60×10^{4}
PIK3CD	3.71×10^{4}	8.33×10^{2}	0.2579	0.2838	0.2431	1.295	1.947	5.58×10^{2}	6.728
PIK3CG	4.252	0.2867	1.202	0.5389	0.6368	5.993	3.907	0.1914	25.59
PIK3R1	4.86×10^{4}	1.06×10^{5}	5.11×10^{5}	3.06×10^{5}	3.40×10^{6}	2.49×10^{4}	1.44×10^{4}	7.41×10^{6}	1.07×10^{3}
PIK3R2	6.206	0.2555	3.436	2.185	0.7854	4.057	11.02	0.4703	22.93
PIK3R3	2.67×10^{2}	9.33×10^{4}	4.83×10^{3}	3.03×10^{3}	3.62×10^{3}	1.18×10^{2}	1.33×10^{2}	1.17×10^{3}	6.73×10^{2}
PIK3R5	3.29×10^{2}	1.28×10^{3}	3.14×10^{3}	1.75×10^{3}	1.03×10^{3}	5.29×10^{3}	3.94×10^{3}	4.43×10^{4}	2.70×10^{2}
RAC1	0.3530	1.75×10^{2}	5.34×10^{2}	1.54×10^{2}	6.71×10^{3}	5.39×10^{2}	9.63×10^{2}	3.05×10^{2}	8.50×10^{2}
RELA	0.1869	4.46×10^{3}	1.02×10^{2}	4.97×10^{2}	1.26×10^{2}	2.72×10^{2}	3.69×10^{2}	3.74×10^{3}	0.1386
RIPK1	5.37×10^{3}	5.18×10^{4}	2.08×10^{3}	8.15×10^{4}	5.95×10^{4}	5.43×10^{3}	8.34×10^{3}	2.52×10^{4}	2.05×10^{2}
SPP1	1.14×10^{3}	8.12×10^{5}	1.24×10^{3}	1.64×10^{3}	7.94×10^{4}	3.65×10^{4}	1.34×10^{2}	4.43×10^{4}	7.88×10^{3}
STAT1	2.42×10^{2}	9.17×10^{4}	7.43×10^{3}	1.65×10^{3}	4.53×10^{3}	1.28×10^{2}	3.09×10^{2}	4.43×10^{3}	8.09×10^{3}
TAB1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TAB2protein2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBK1	6.30×10^{4}	1.40×10^{5}	1.35×10^{4}	3.31×10^{5}	3.40×10^{6}	6.08×10^{4}	4.26×10^{4}	3.15×10^{6}	3.15×10^{3}
TICAM1	6.14×10^{2}	1.63×10^{3}	4.91×10^{3}	5.97×10^{3}	2.55×10^{3}	2.24×10^{2}	2.35×10^{2}	1.19×10^{3}	9.97×10^{2}
TICAM2	9.06×10^{6}	0	0	1.59×10^{6}	0	0	0	0	0
TIRAP	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TLR1	1.19×10^{2}	7.56×10^{4}	8.32×10^{3}	9.11×10^{3}	2.13×10^{3}	1.05×10^{2}	3.86×10^{2}	2.94×10^{3}	3.67×10^{2}
TLR10	0.3450	8.97×10^{3}	3.65×10^{2}	2.87×10^{2}	2.74×10^{2}	9.19×10^{2}	0.1519	4.35×10^{3}	0.6592
TLR2	2.52×10^{2}	1.10×10^{3}	9.0×10^{3}	7.09×10^{3}	2.92×10^{3}	7.62×10^{3}	4.72×10^{2}	1.61×10^{3}	5.20×10^{2}
TLR3	5.32×10^{5}	1.02×10^{5}	1.79×10^{5}	6.37×10^{6}	5.71×10^{6}	2.08×10^{5}	6.37×10^{5}	7.91×10^{7}	1.19×10^{4}
TLR4	1.07×10^{2}	4.15×10^{4}	1.82×10^{3}	4.34×10^{3}	1.47×10^{3}	1.98×10^{3}	3.19×10^{2}	1.42×10^{4}	3.98×10^{2}
TLR5	4.01×10^{2}	4.67×10^{4}	1.01×10^{2}	2.41×10^{3}	1.07×10^{3}	3.95×10^{3}	3.00×10^{2}	6.00×10^{4}	1.75×10^{2}
TLR6	4.43×10^{3}	1.85×10^{4}	7.11×10^{4}	9.97×10^{4}	1.23×10^{3}	2.03×10^{4}	1.09×10^{2}	1.28×10^{4}	1.10×10^{2}
TLR7	25.96	1.664	4.676	2.996	3.739	16.96	25.59	0.9188	89.09
TLR8	2.71×10^{3}	1.26×10^{4}	1.16×10^{3}	1.57×10^{3}	3.82×10^{4}	3.90×10^{4}	5.75×10^{3}	2.60×10^{4}	4.65×10^{3}
TLR9	3.89×10^{2}	9.94×10^{4}	5.48×10^{3}	5.50×10^{3}	3.73×10^{3}	1.24×10^{2}	2.43×10^{2}	1.32×10^{3}	7.95×10^{2}
TNF	3.61×10^{2}	1.51×10^{3}	1.10×10^{2}	5.73×10^{3}	3.49×10^{3}	1.73×10^{2}	3.88×10^{2}	3.43×10^{3}	0.1511

TOLLIP	0	3.56×10^3	1.91×10^2	8.17×10^3	8.95×10^3	2.58×10^2	5.51×10^2	2.52×10^3	0.2466
TIRAF4	0.1524	4.97×10^3	5.11×10^3	1.46×10^3	2.76×10^3	5.93×10^3	1.80×10^3	8.88×10^4	5.42×10^2
TIRAF1	0.1039	2.32×10^3	2.80×10^2	1.53×10^2	6.91×10^3	1.37×10^2	8.45×10^2	4.75×10^3	7.60×10^2
ACTB	52.69	0.6910	0.7706	0.2262	7.49×10^2	0.5914	9.94×10^2	0.2126	0.5934
B2M	0.7198	0.1072	0.5564	0.2951	0.3263	0.5351	●	0.2785	0.6062
GAPD	49.01	■	■	■	■	■	0.1273	■	■
GUSB	0.3292	8.90×10^3	7.02×10^3	7.02×10^3	5.67×10^3	4.75×10^3	1.01×10^2	7.97×10^3	3.20×10^3
HPRT1	9.06×10^6	9.21×10^7	3.35×10^6	0	3.40×10^6	0	0	7.91×10^7	0
PGK	▲	3.60×10^2	2.85×10^2	1.27×10^2	4.83×10^2	3.10×10^2	1.29×10^2	2.21×10^2	2.70×10^2
PPIA	2.530	4.04×10^2	0.1337	5.82×10^2	7.40×10^2	0.1237	2.78×10^2	5.64×10^2	0.1337
RPL13A	50.13	1.267	2.440	2.061	2.327	3.036	1.432	0	0

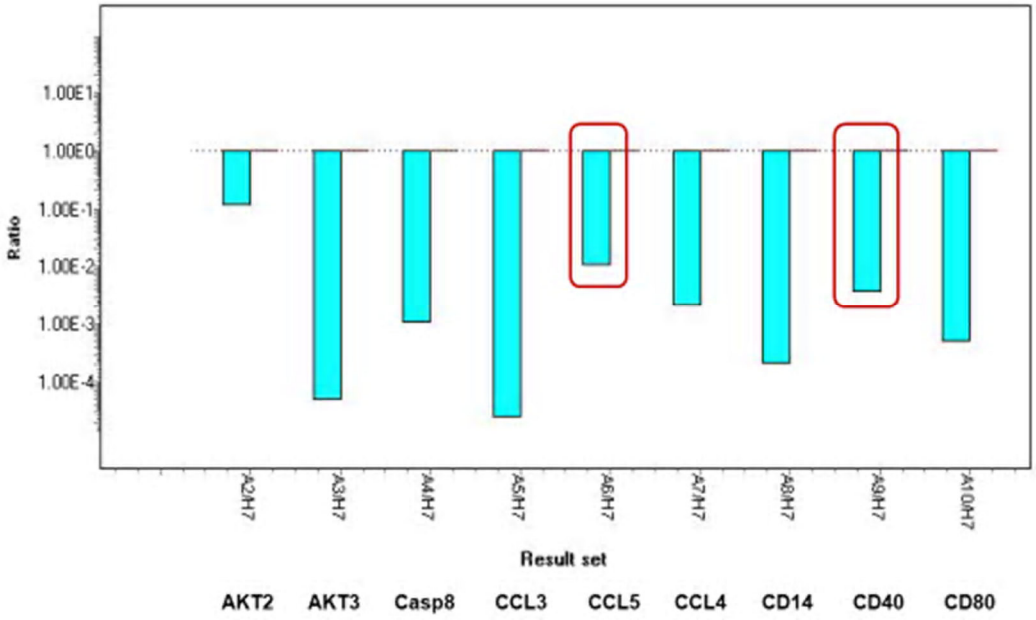
● **;** Sadece 72.saat BeWo hücre kontrolü için referans alınan gen.
■ **;** 24,48 ve 72. Saat için referans alınan gen (72.saat BeWo hücre kontrolü için referans alınan gen hariç).
▲ **;** Sadece 24.saat BeWo hücre kontrolü için referans alınan gen.

BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu, takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu ve NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerine ait relatif kantifikasyon analizi Roche Light Cycler 480 II cihazı ile yapılmıştır.

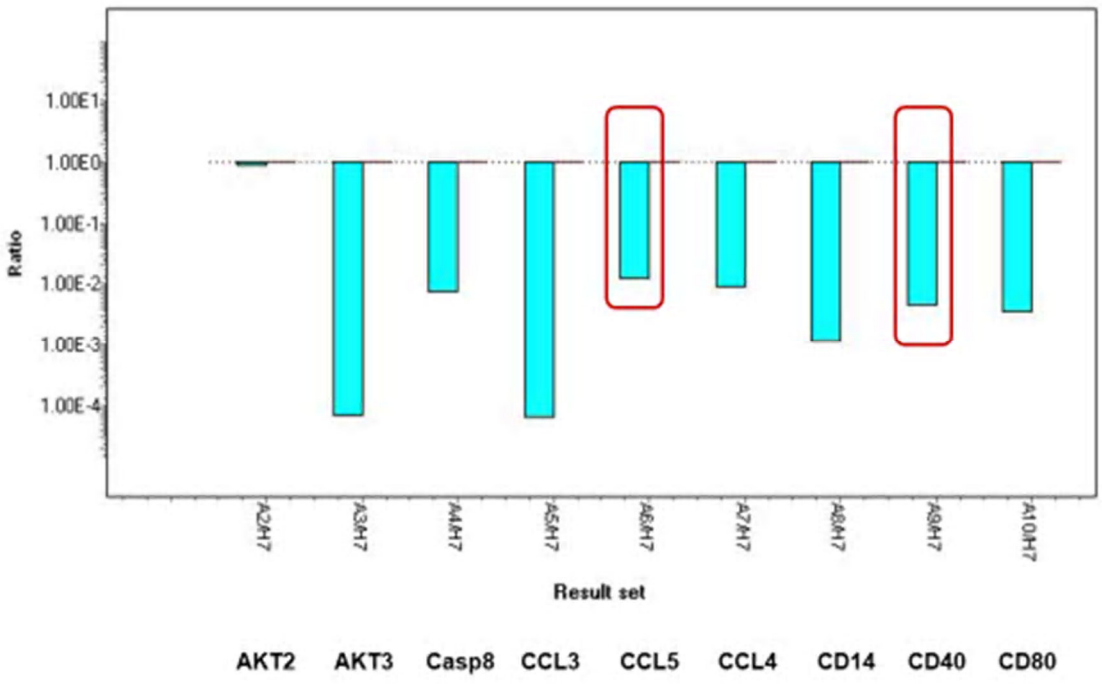
Elde edilen verilere göre 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu ve takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubuna göre deney grubundaki CCL5, CD40, FADD, MAP2K2, MAP2K3, MAPK3, TLR1 ve TOLLIP genlerinde değişiklik gözlemlenmiştir (Şekil 26-55).



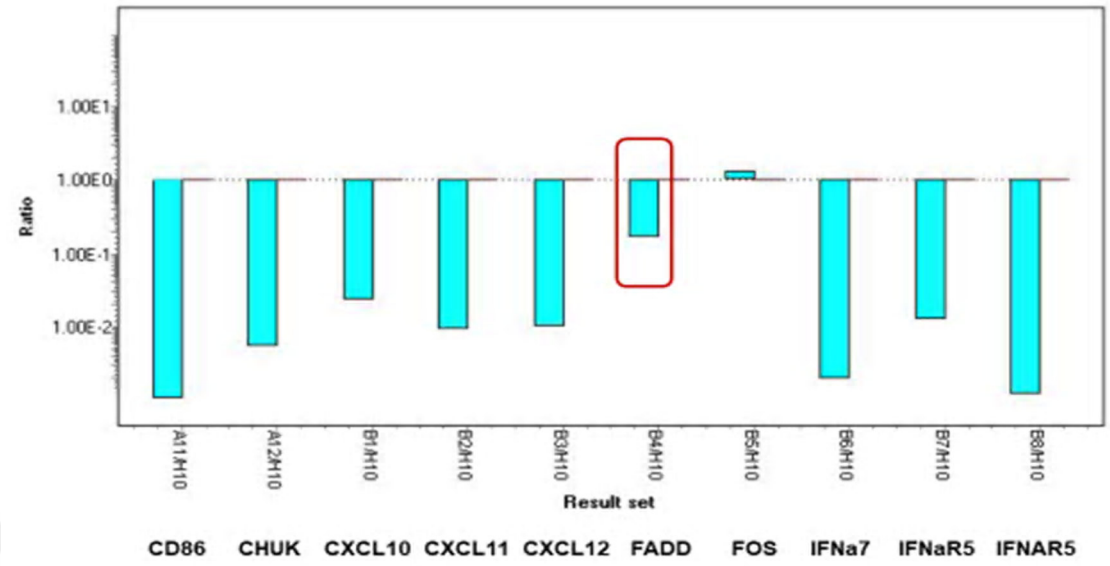
Şekil 26. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80.



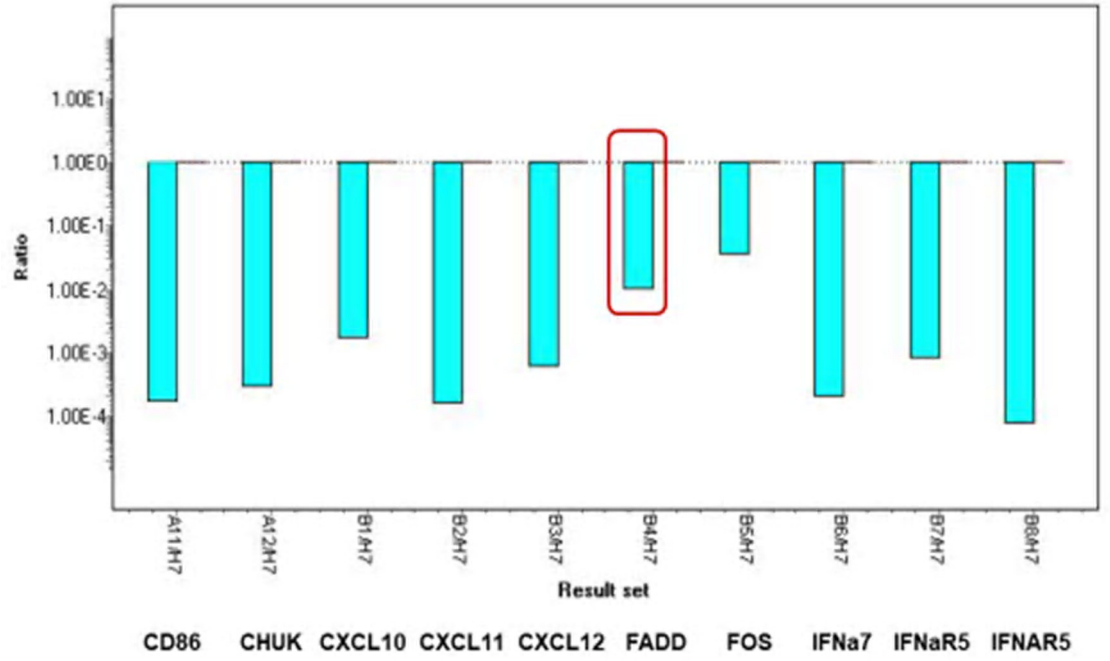
Şekil 27. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80.



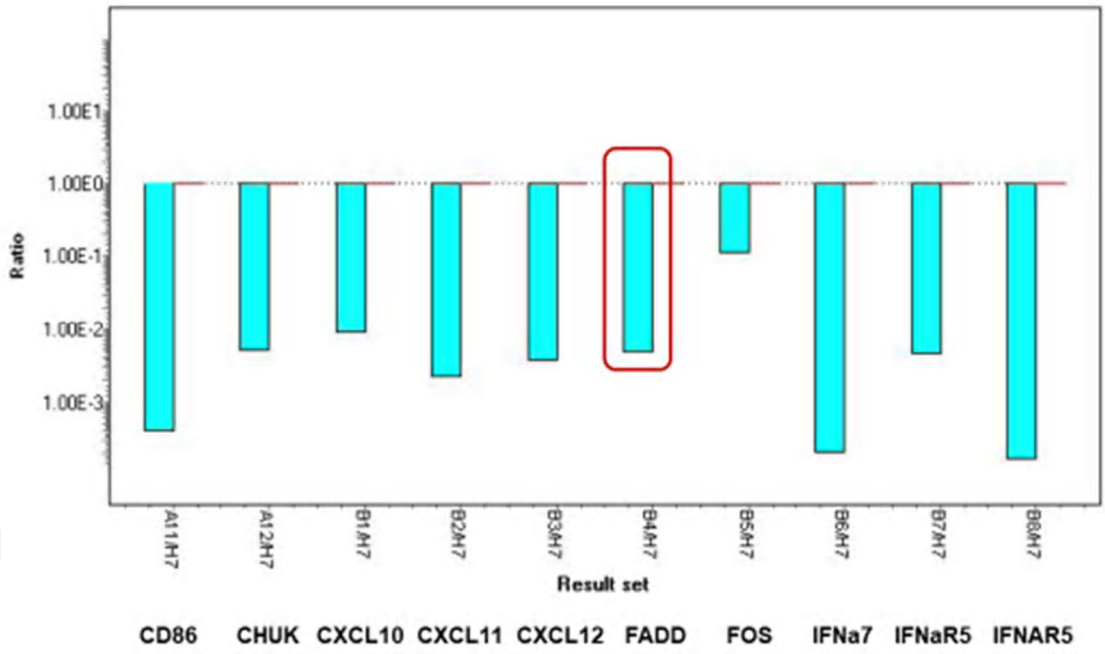
Şekil 28. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80.



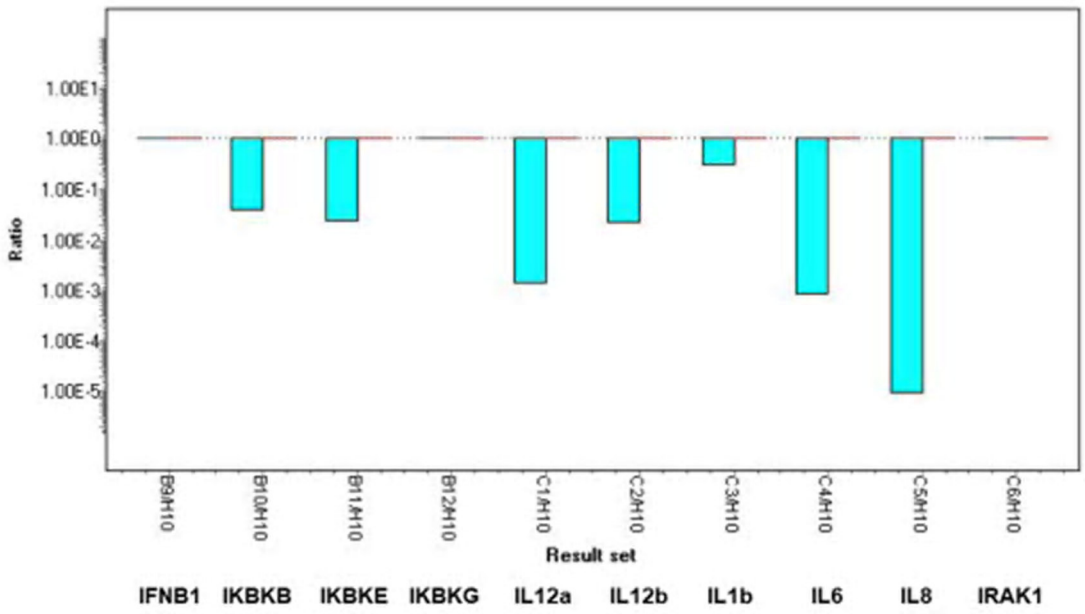
Şekil 29. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5.



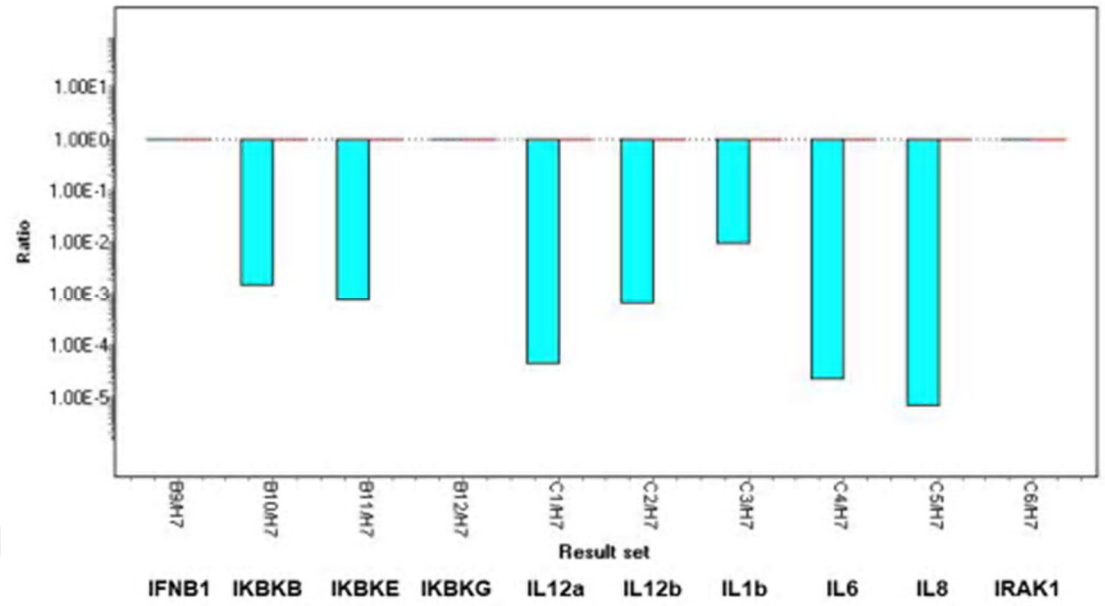
Şekil 30. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5.



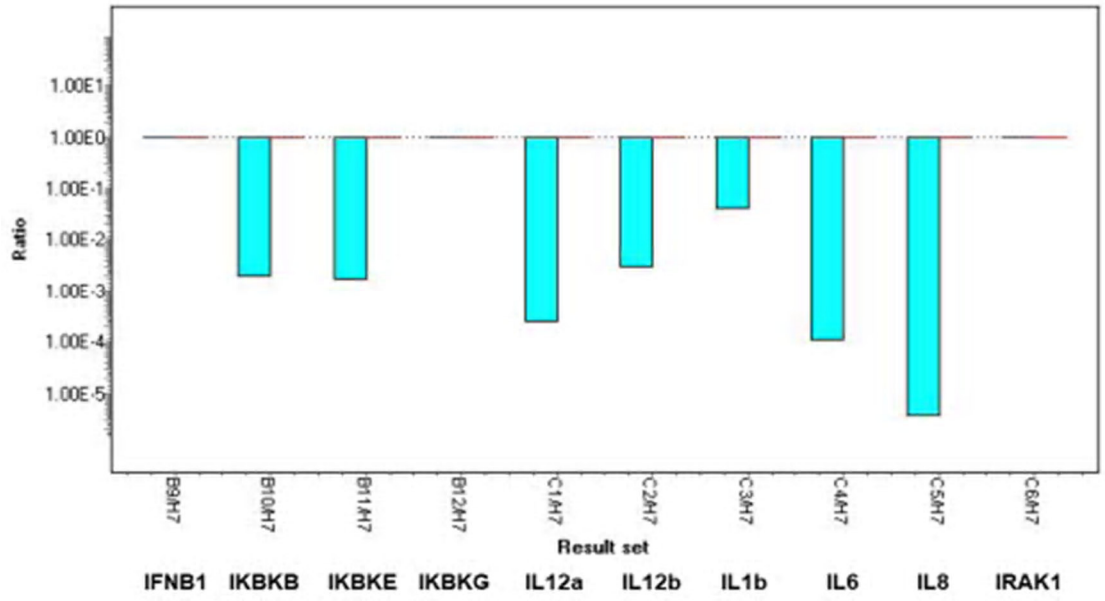
Şekil 31. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5.



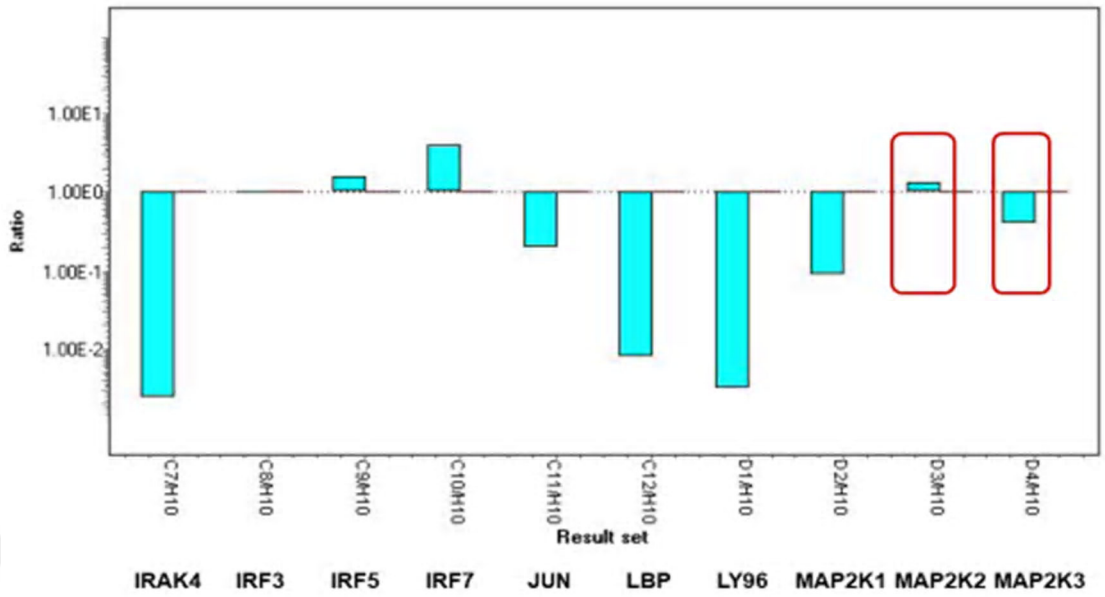
Şekil 32. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1.



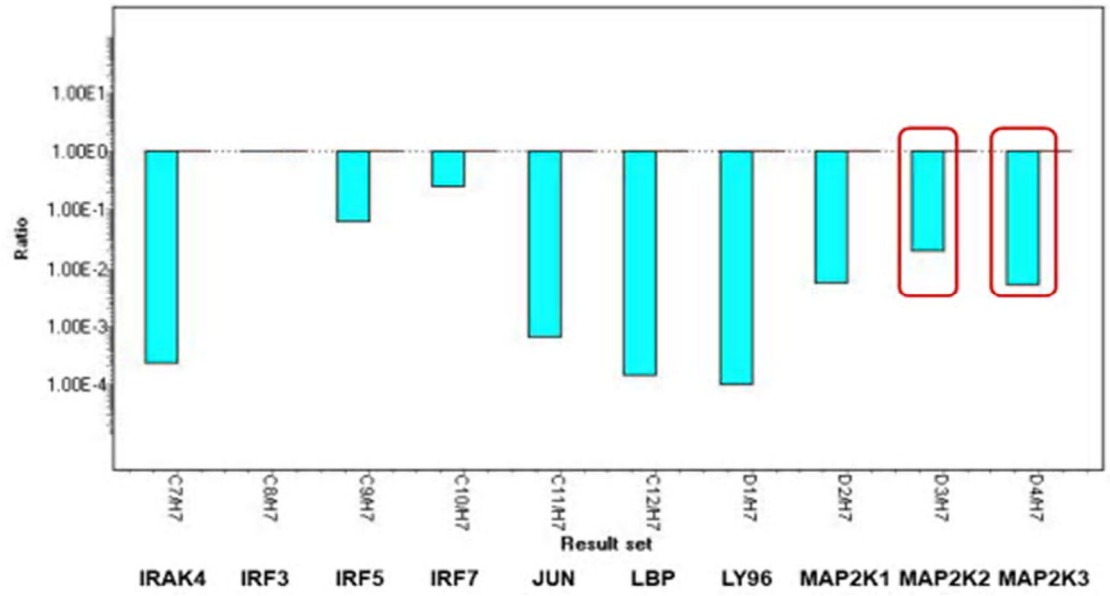
Şekil 33. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1.



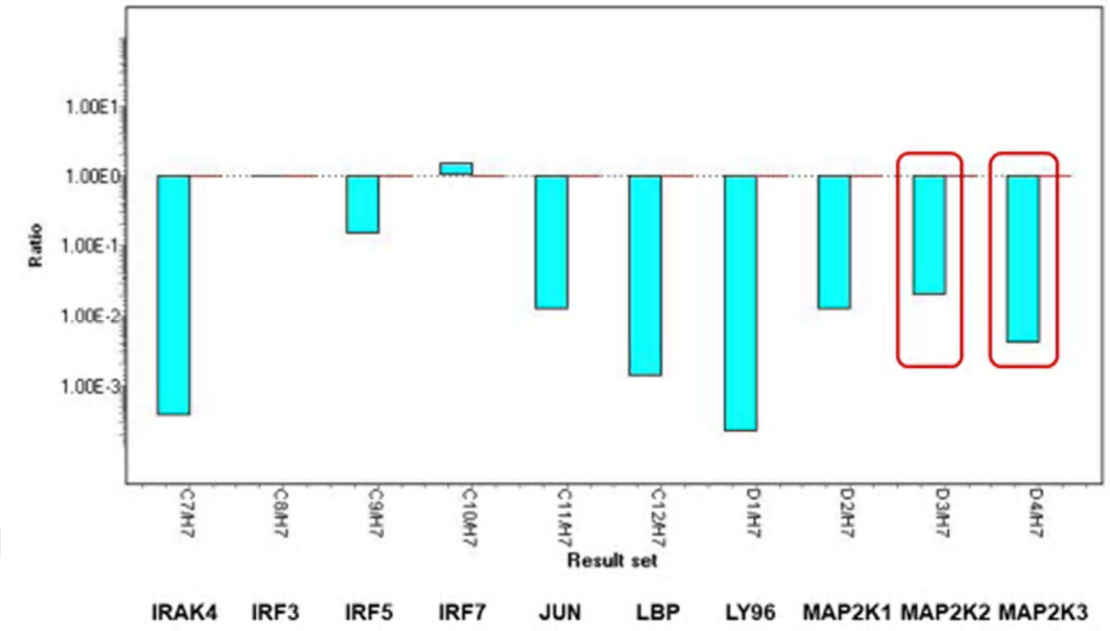
Şekil 34. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1.



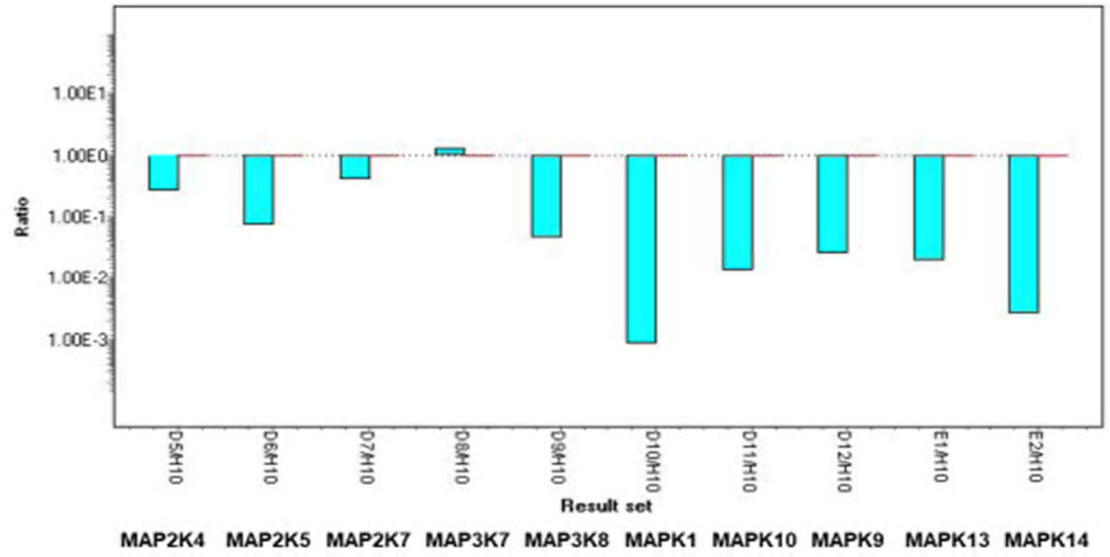
Şekil 35. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3.



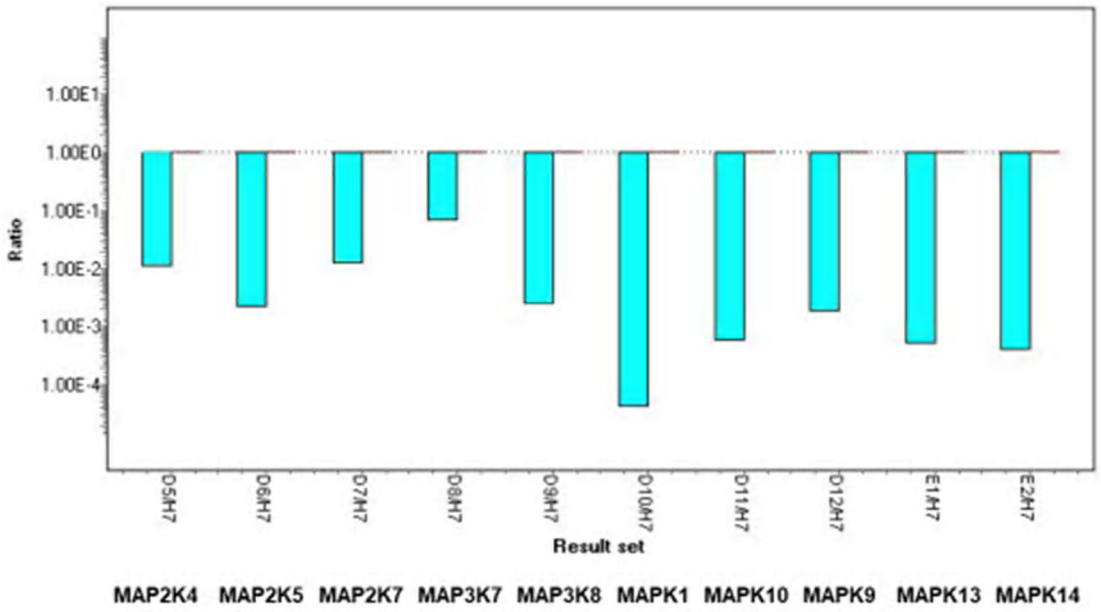
Şekil 36. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3.



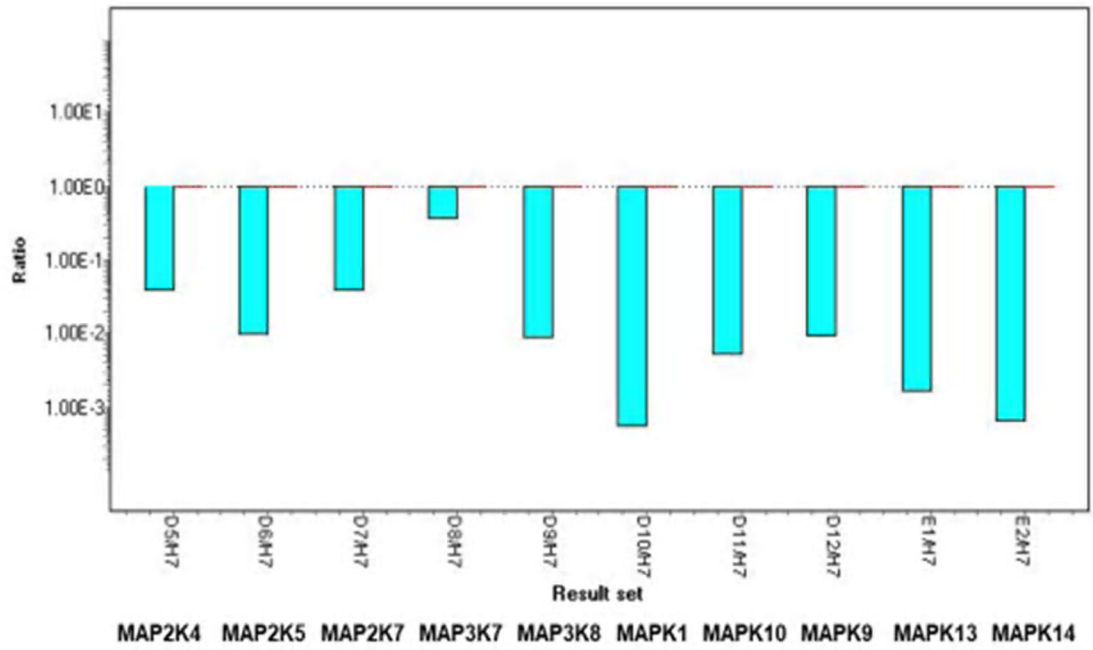
Şekil 37. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3.



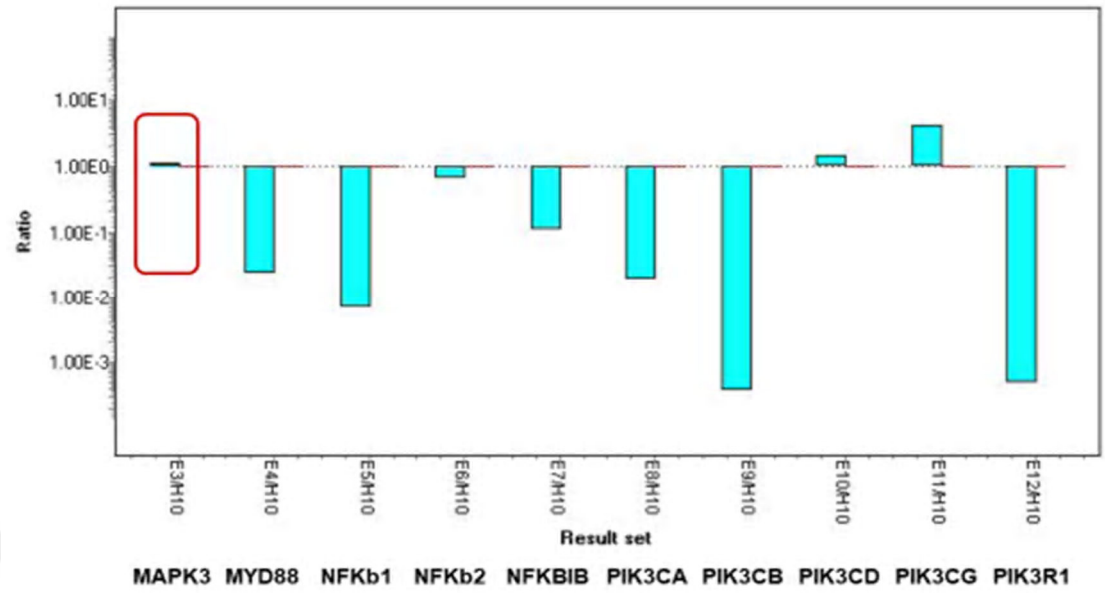
Şekil 38. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14.



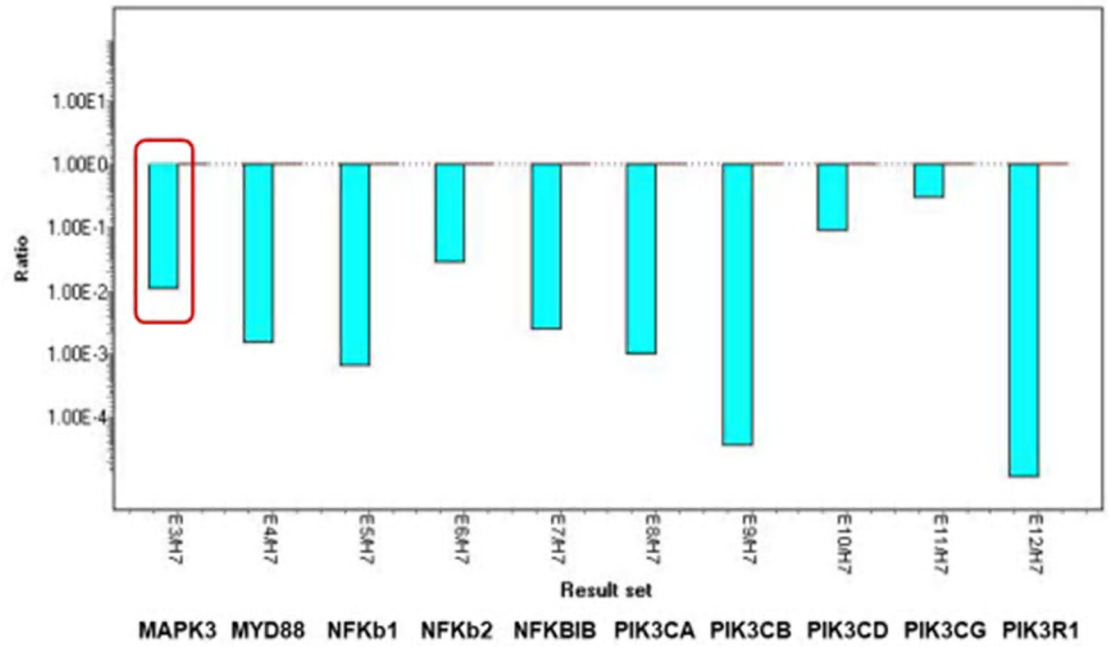
Şekil 39. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14.



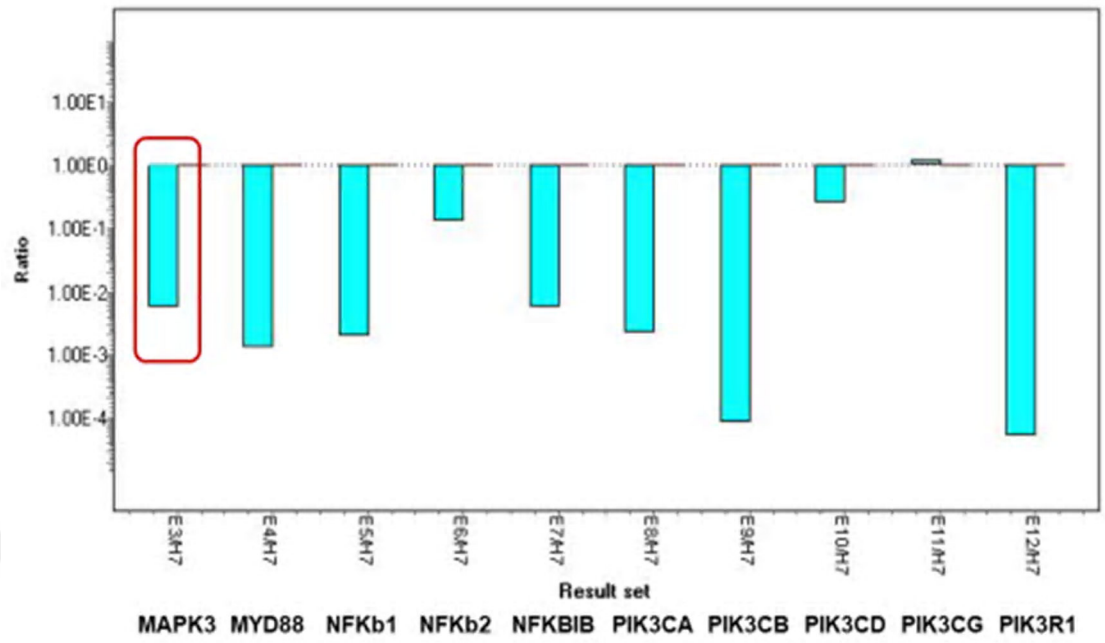
Şekil 40. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14.



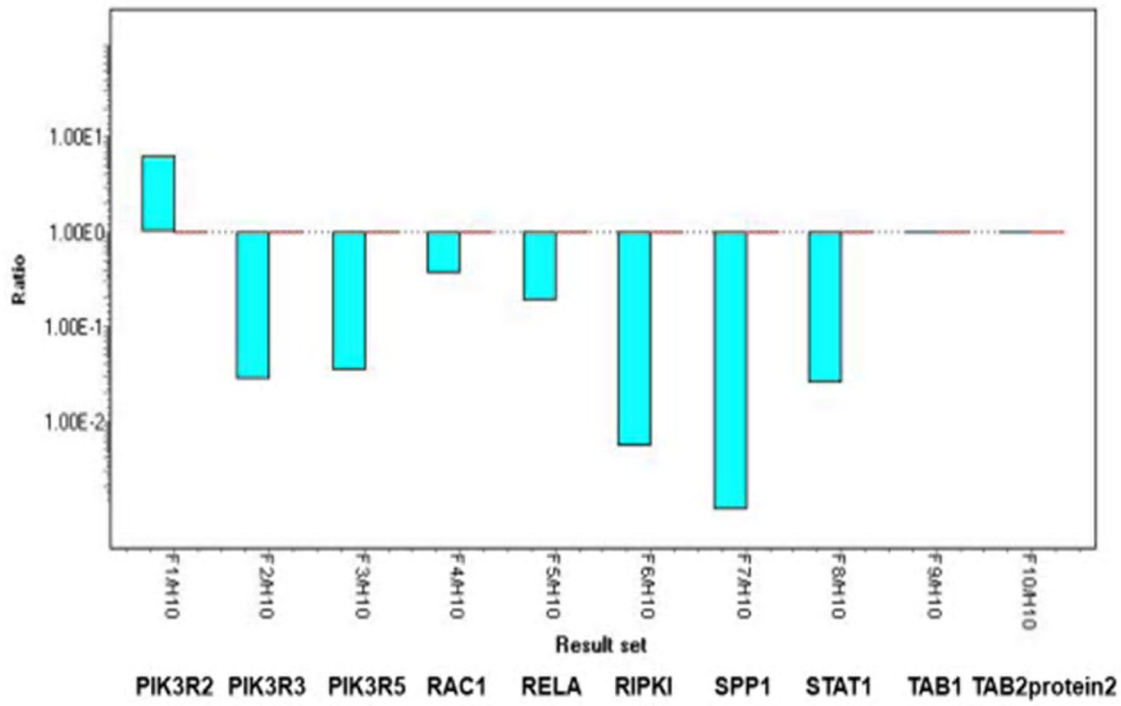
Şekil 41. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1.



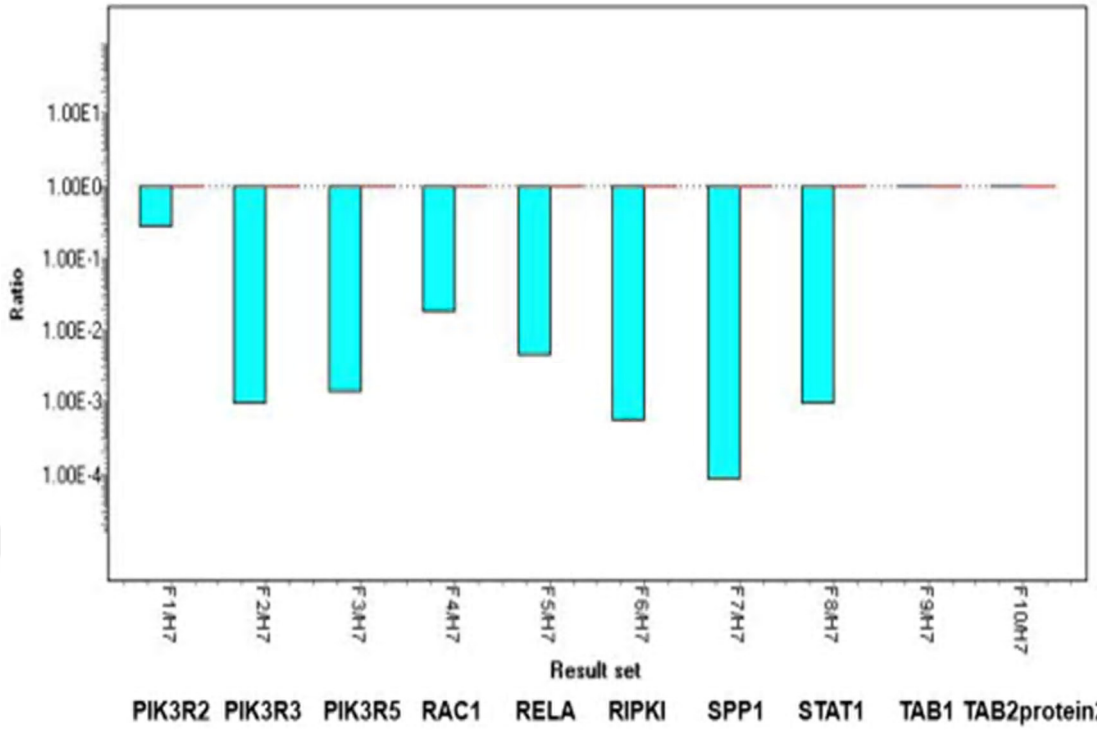
Şekil 42. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1.



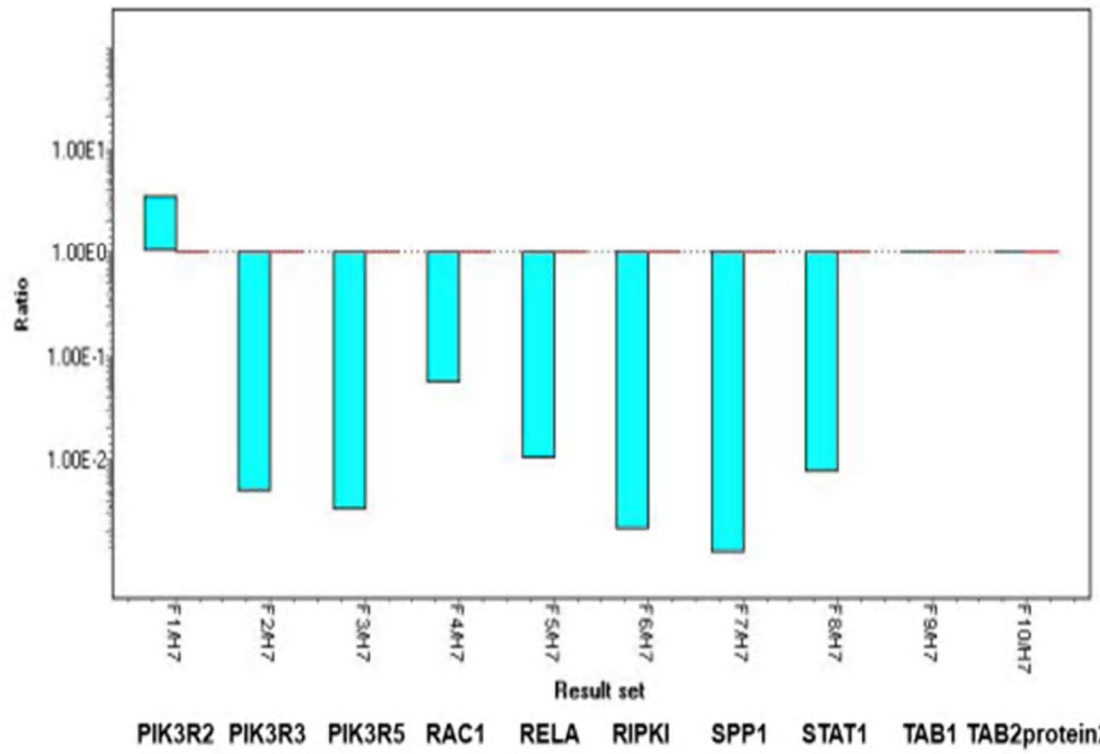
Şekil 43. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1.



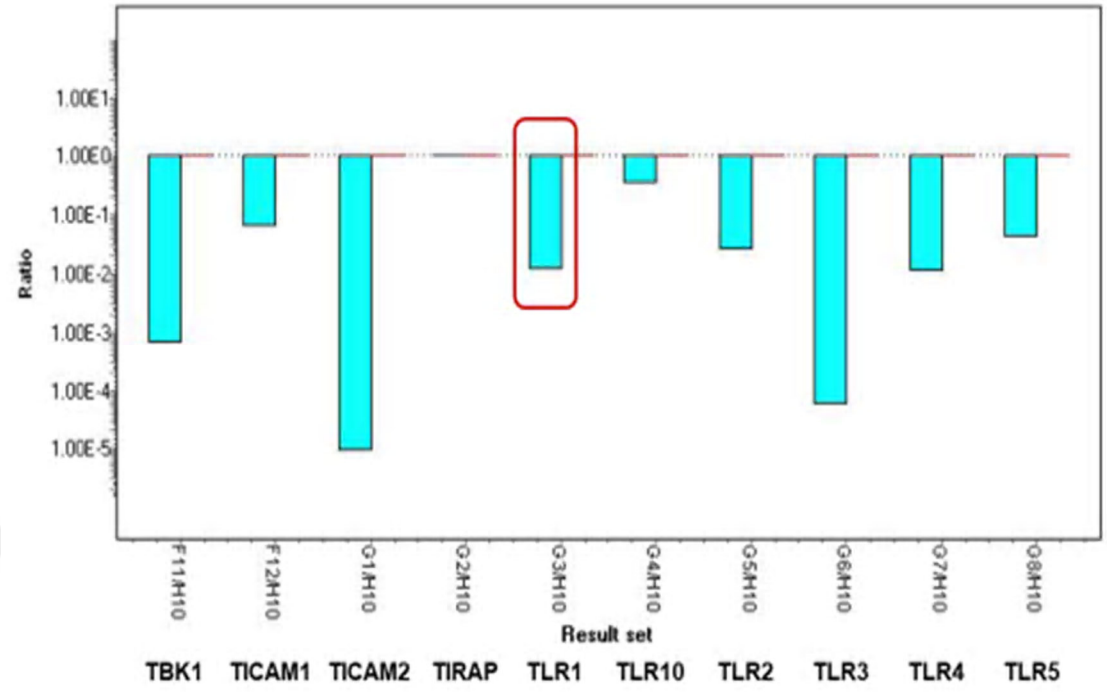
Şekil 44. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2.



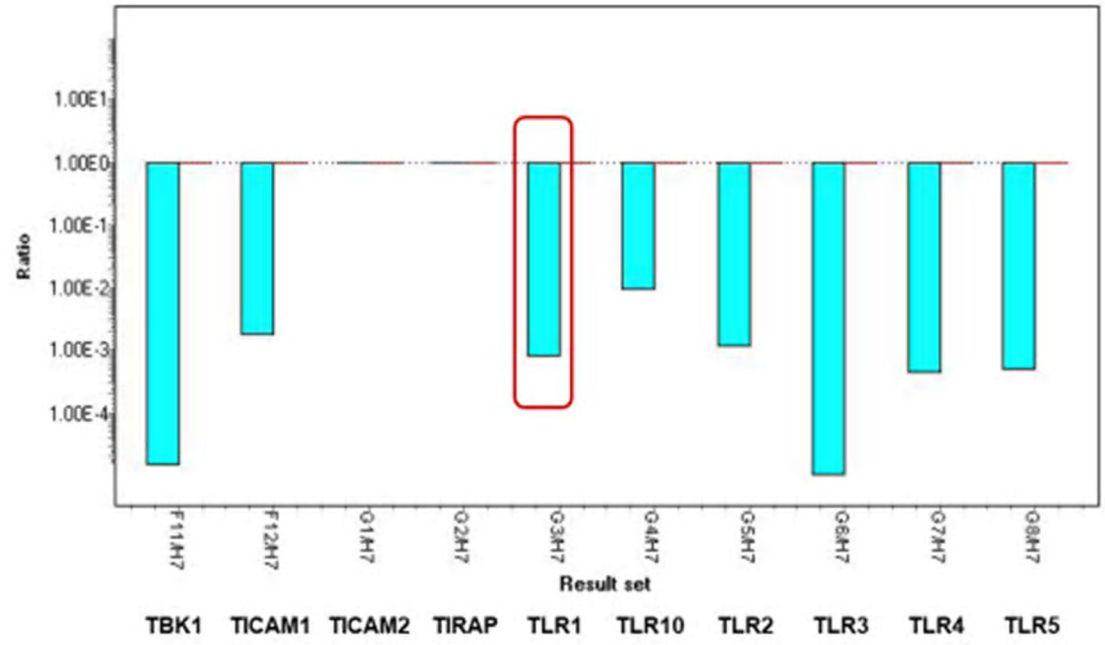
Şekil 45. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2.



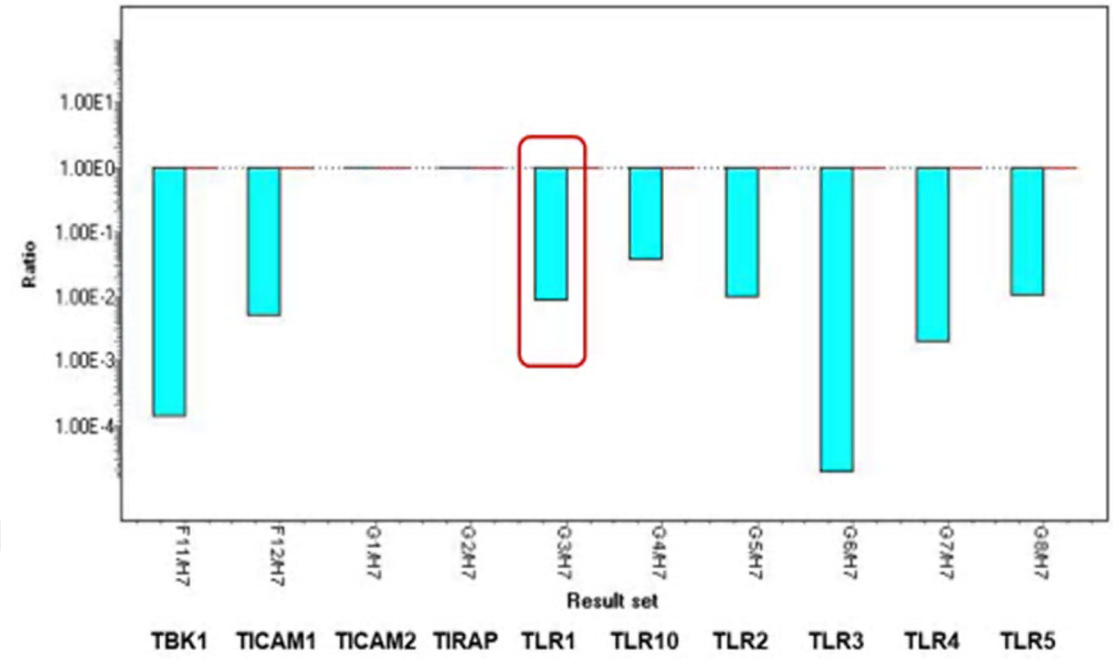
Şekil 46. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2.



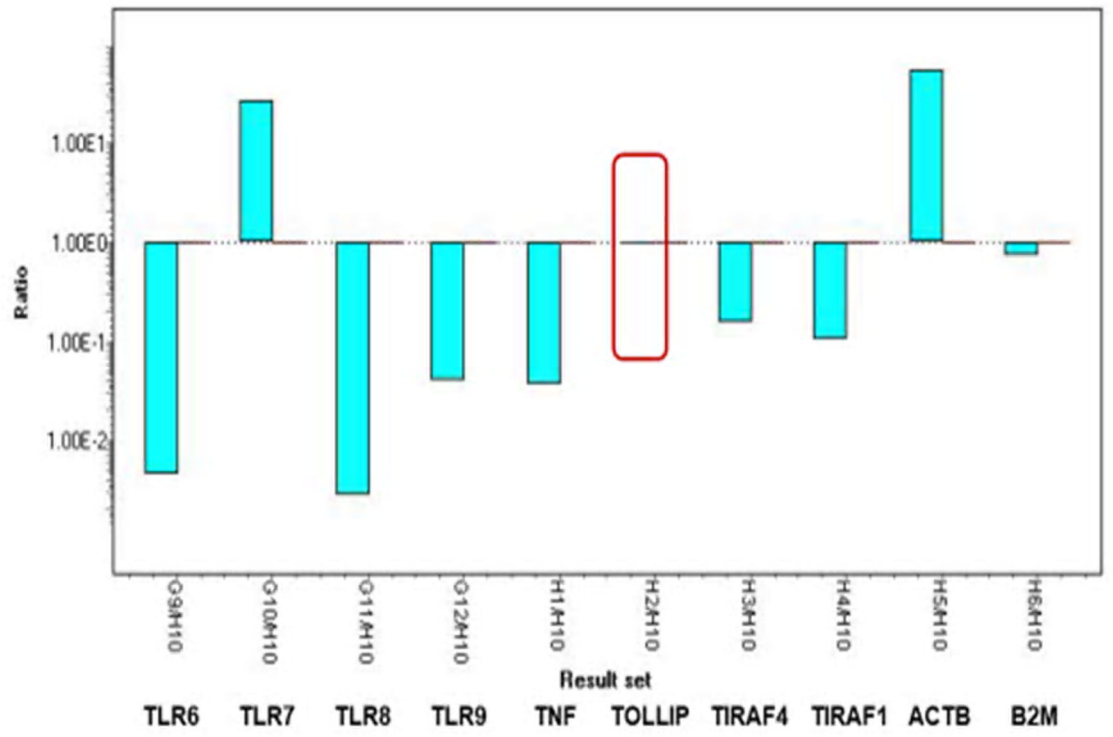
Şekil 47. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5.



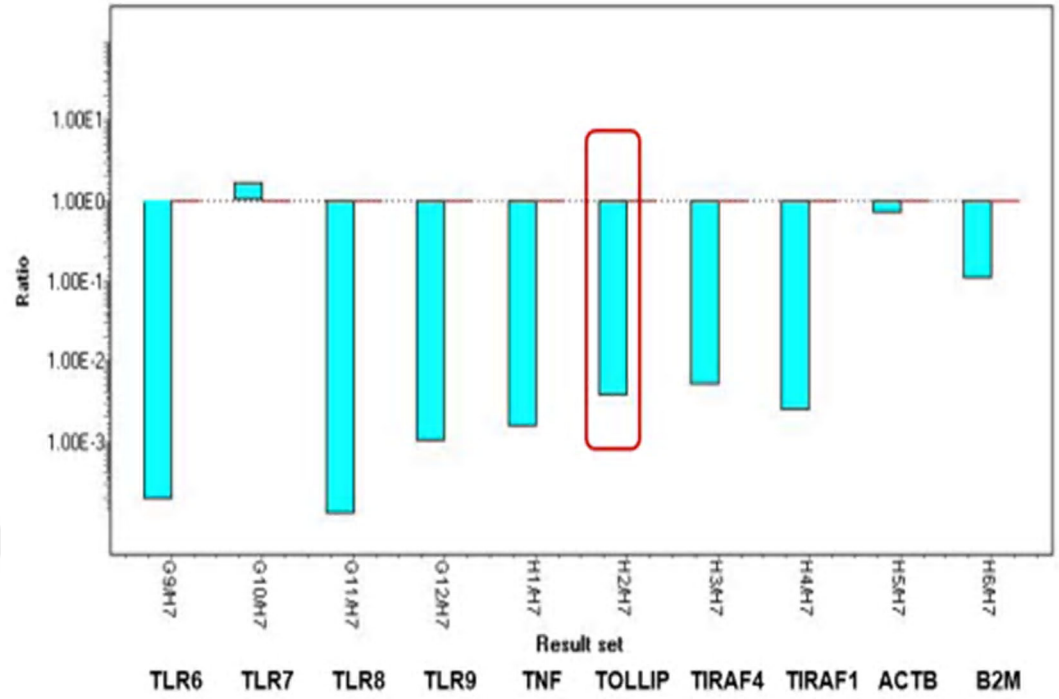
Şekil 48. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5.



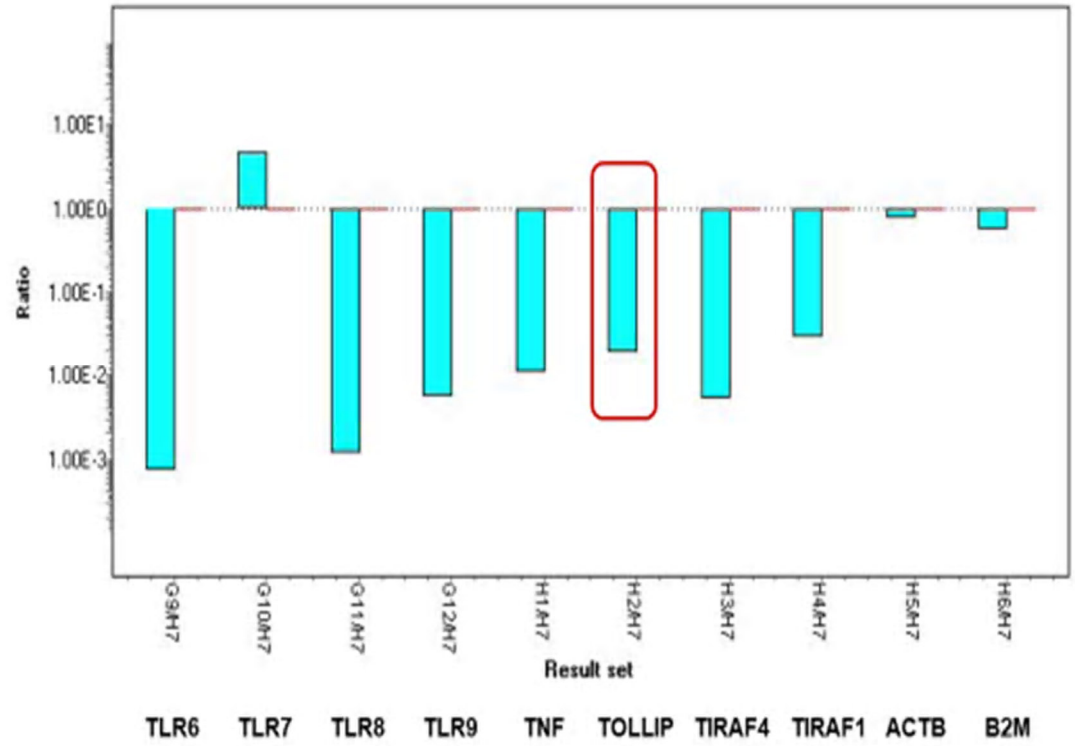
Şekil 49. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5.



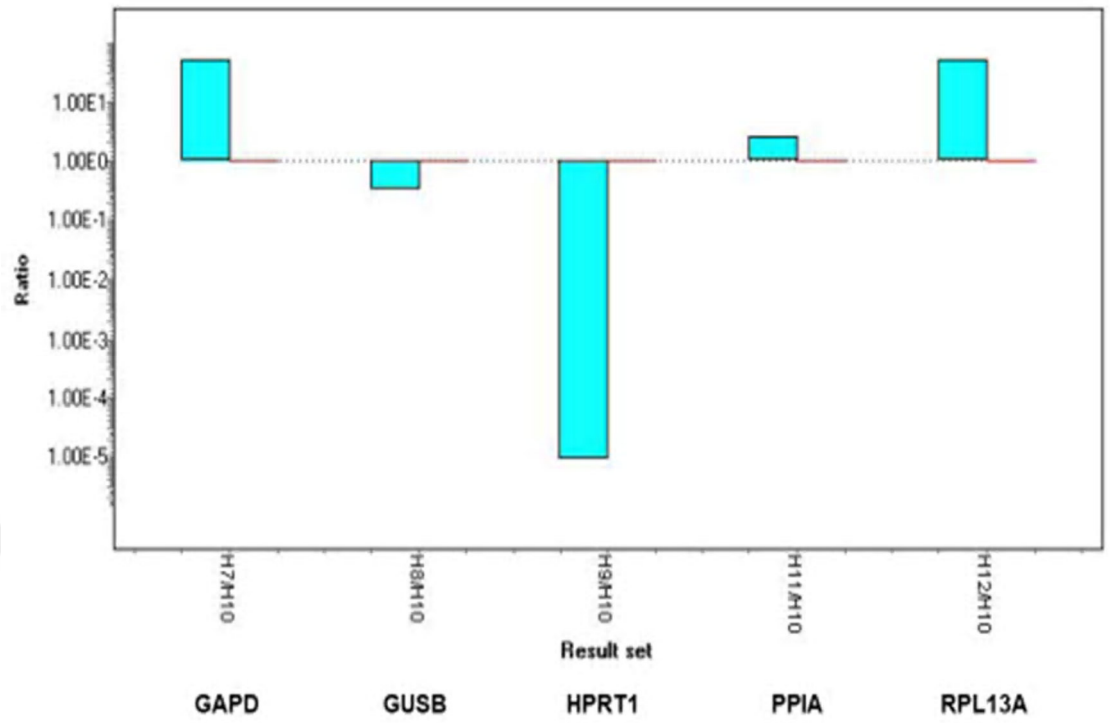
Şekil 50. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M.



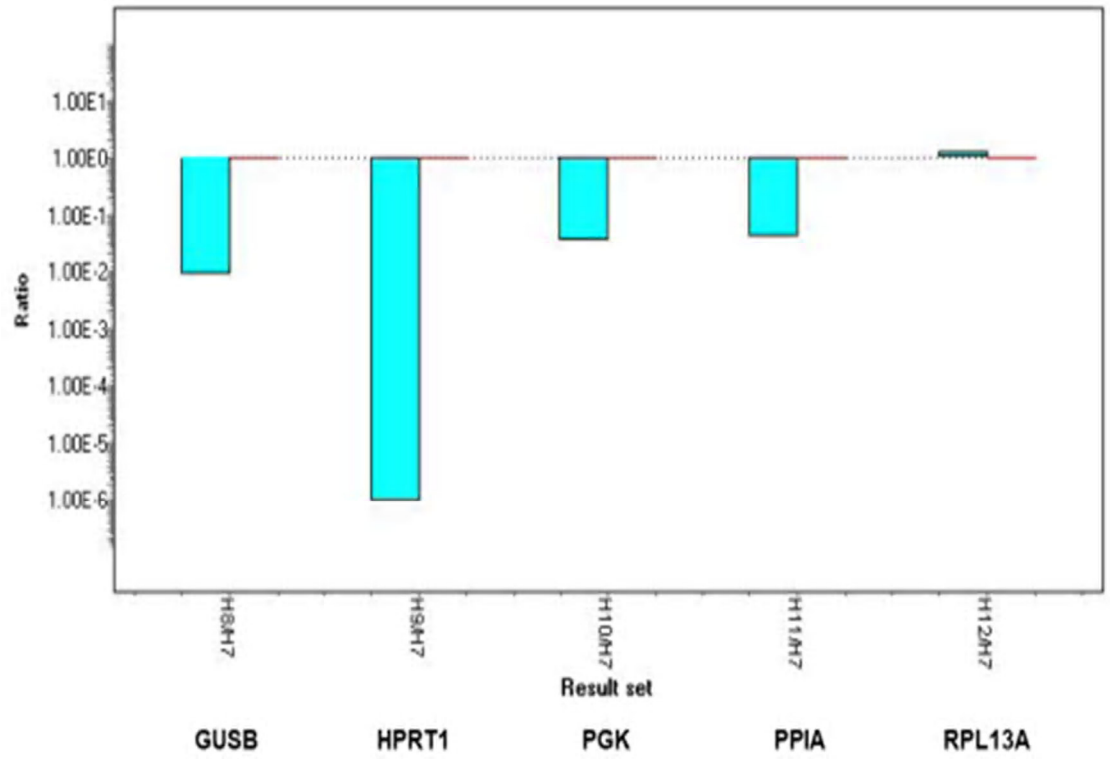
Şekil 51. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M.



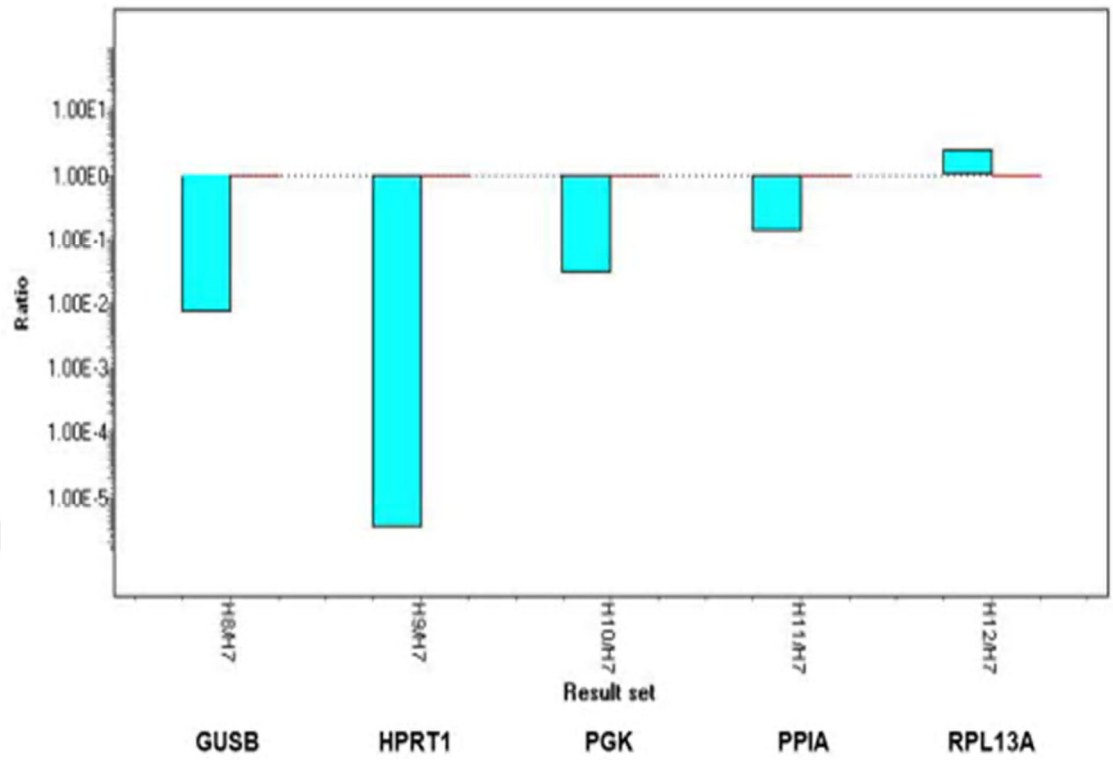
Şekil 52. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M.



Şekil 53. 24.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GAPD, GUSB, HPRT1, PPIA, RPL13A.

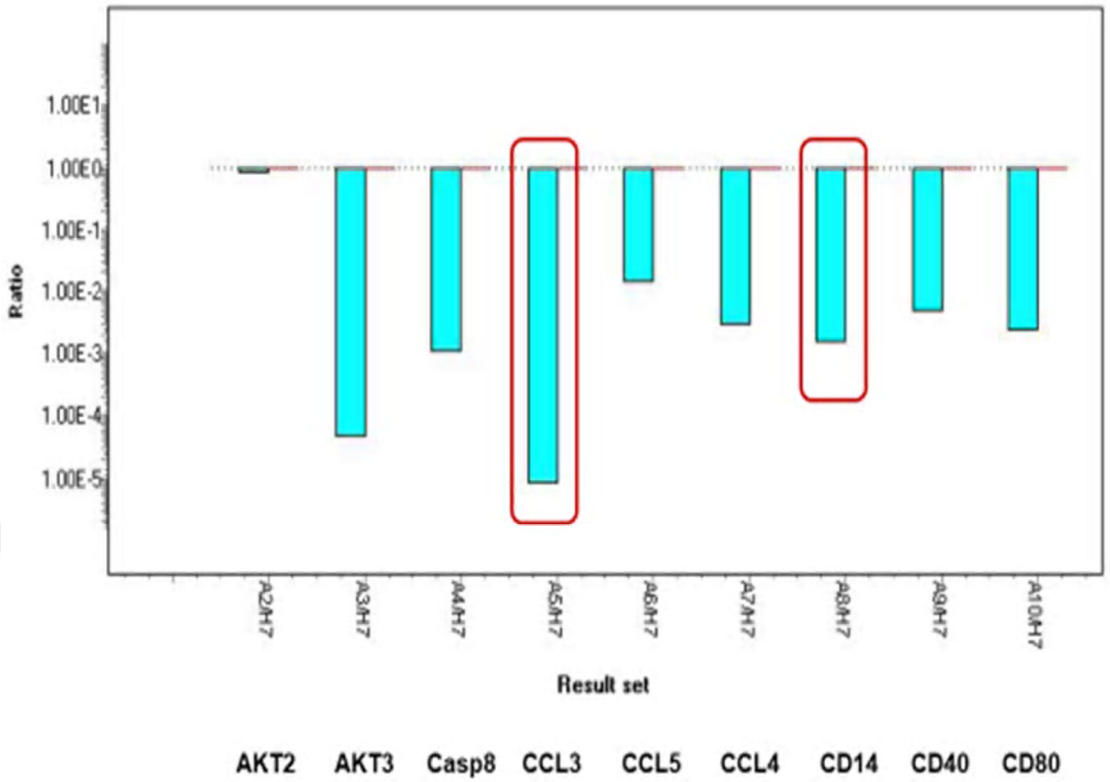


Şekil 54. 24.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A.

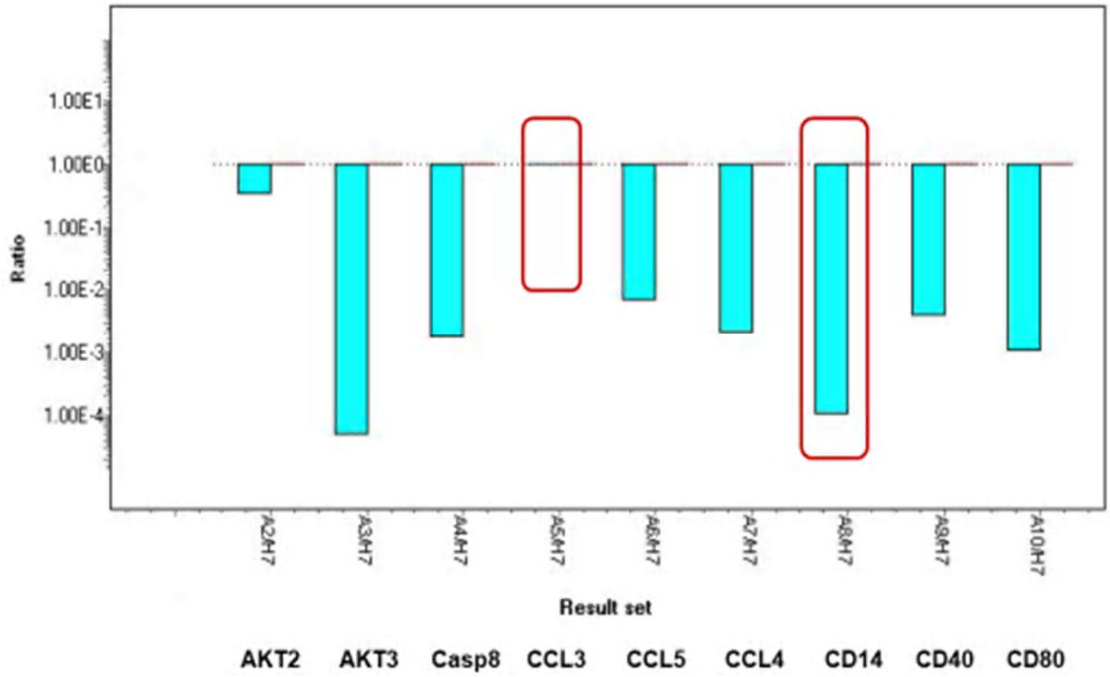


Şekil 55. 24.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A.

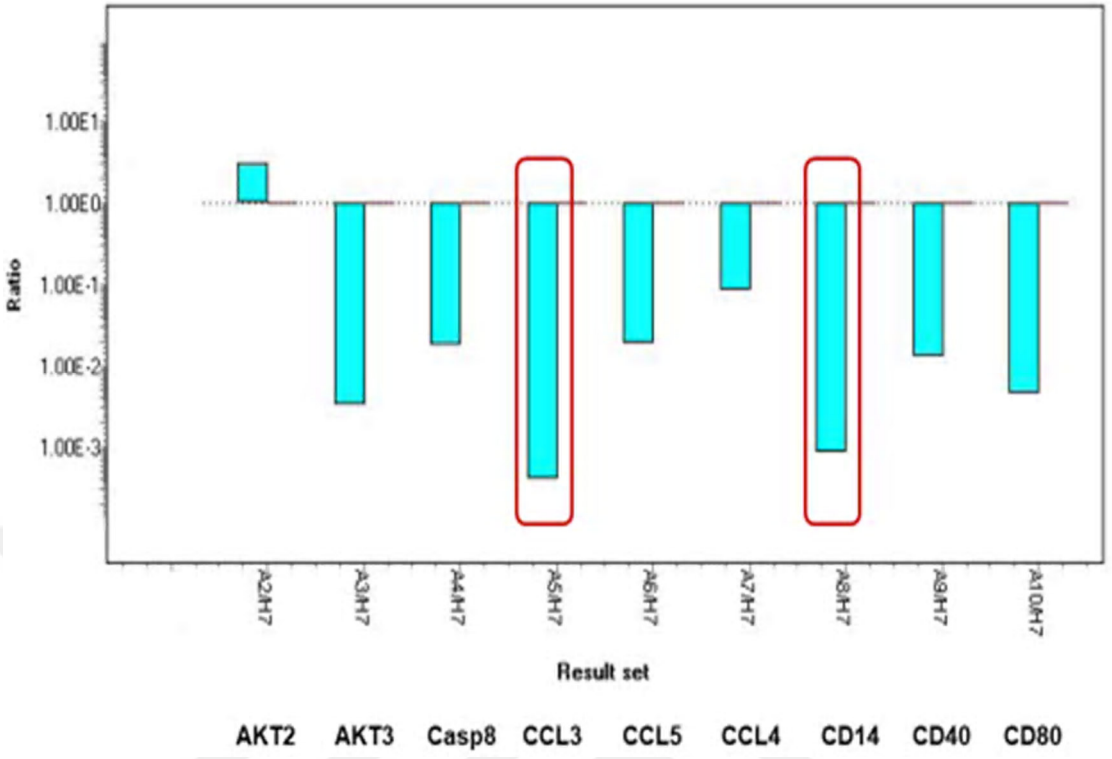
48.saat sonrasında elde edilen verilere sonucunda BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu ve takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubuna göre deney grubundaki CCL3, CD14, CXCL11, FOS, IFNaR5, IKBKB, MAP2K4, MAPK13, MAPK14, PIK3CB, PIK3R1, RELA, SPP1, TBK1, TLR6 ve TLR8 genlerinde değişiklik gözlemlenmiştir. Buna göre ekspresyon seviyesi artan genlerin grafikleri elde edilmiştir (Şekil 56-85).



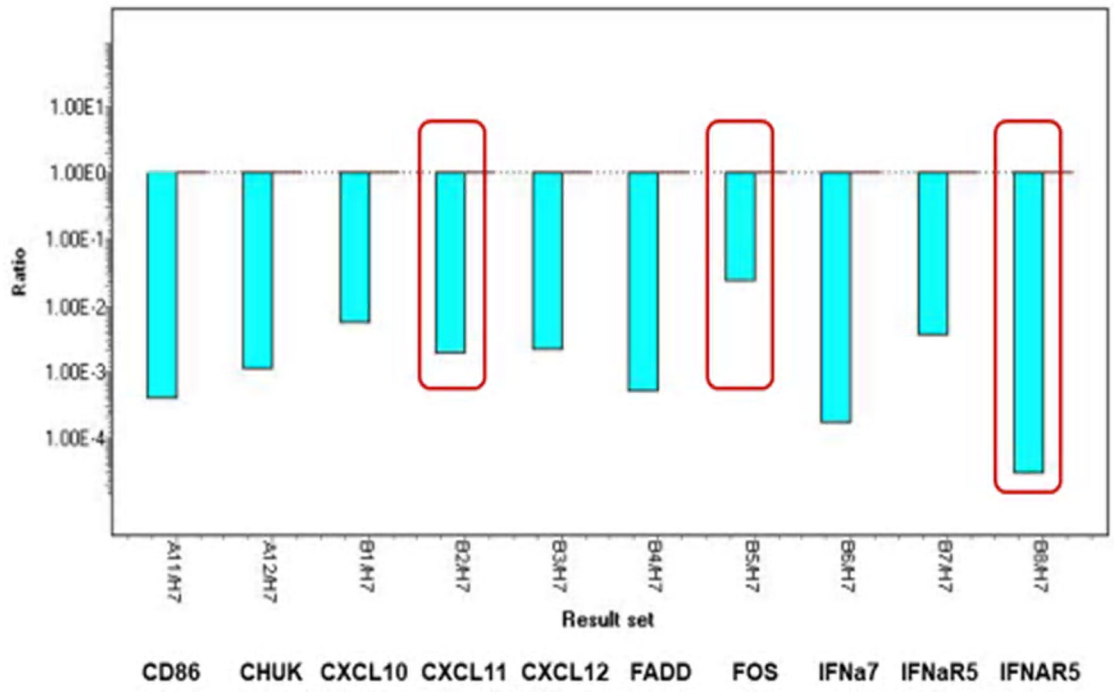
Şekil 56. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80.



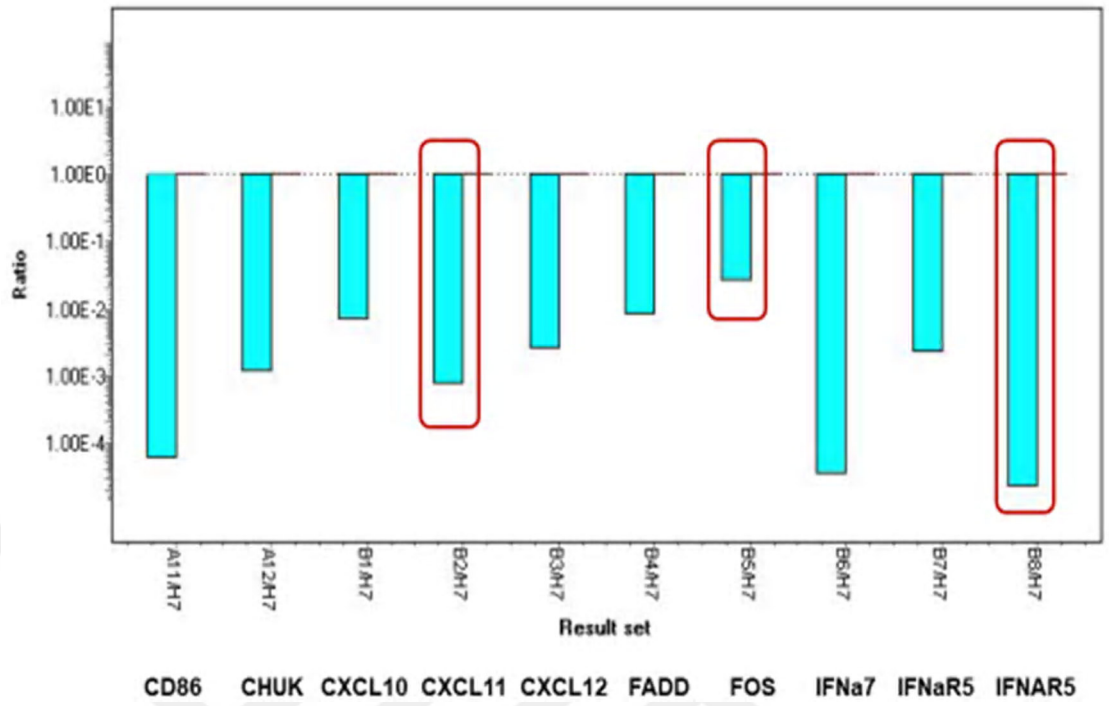
Şekil 57. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80.



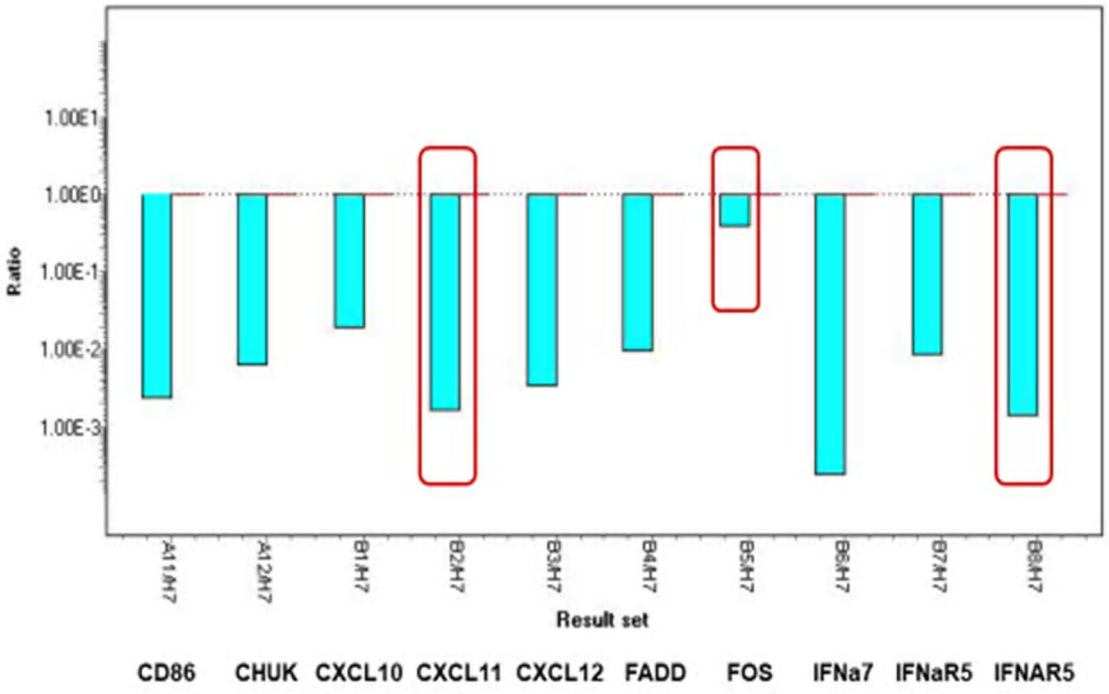
Şekil 58. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80.



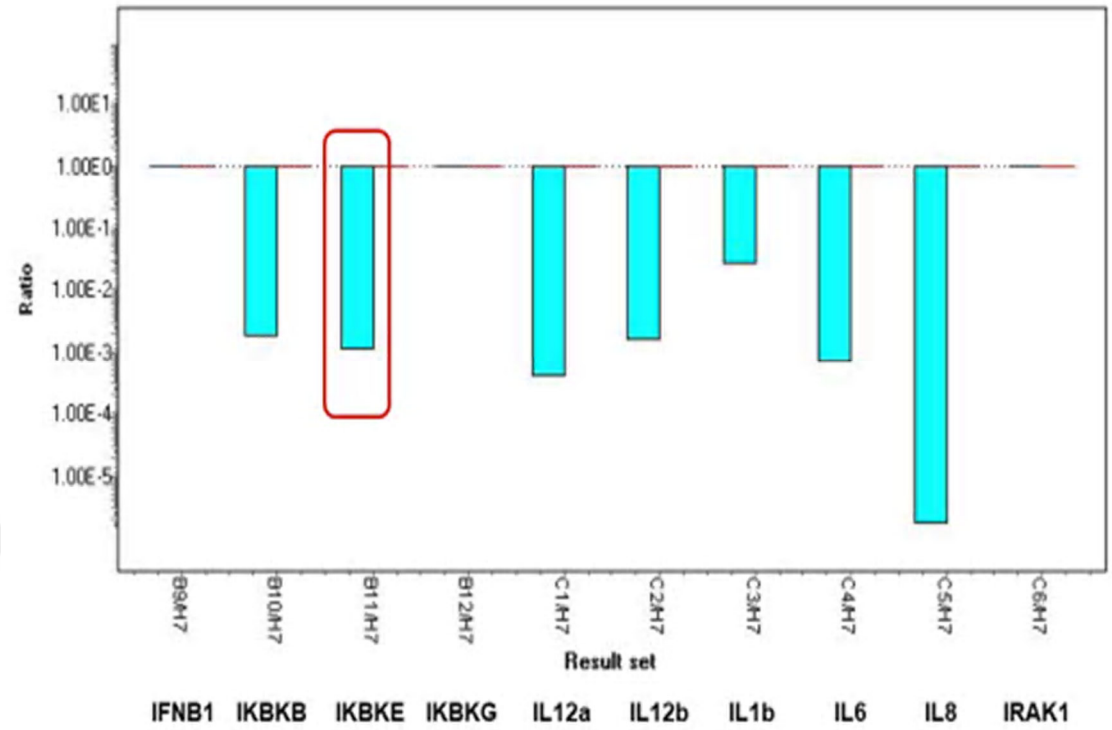
Şekil 59. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5.



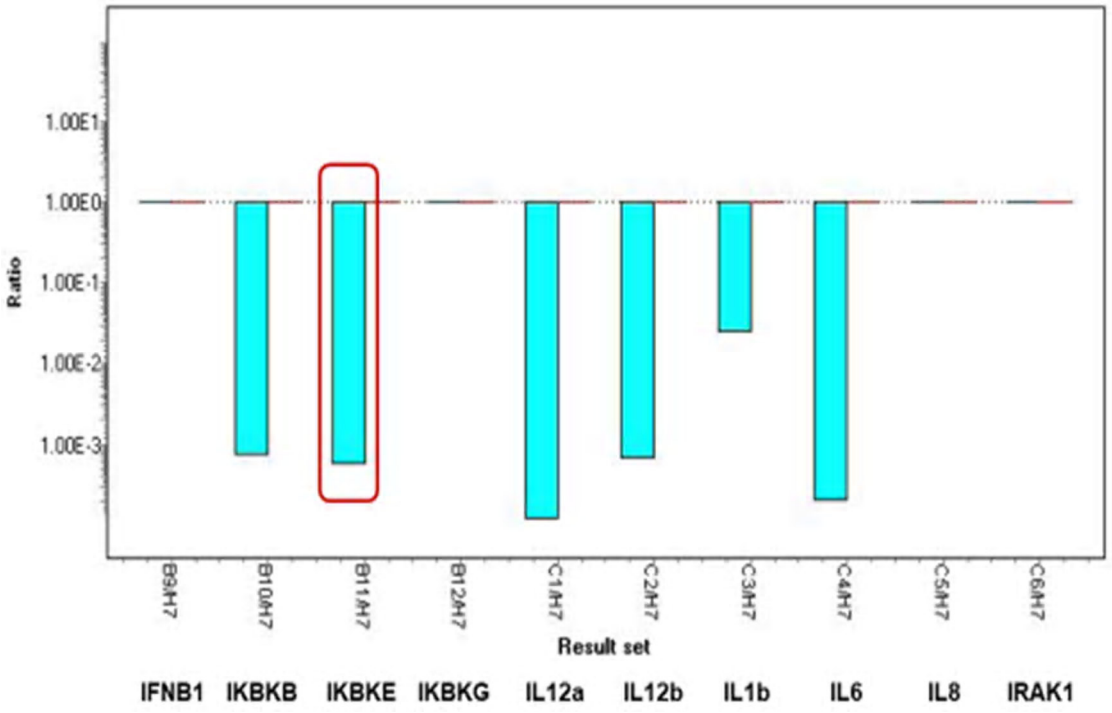
Şekil 60. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5.



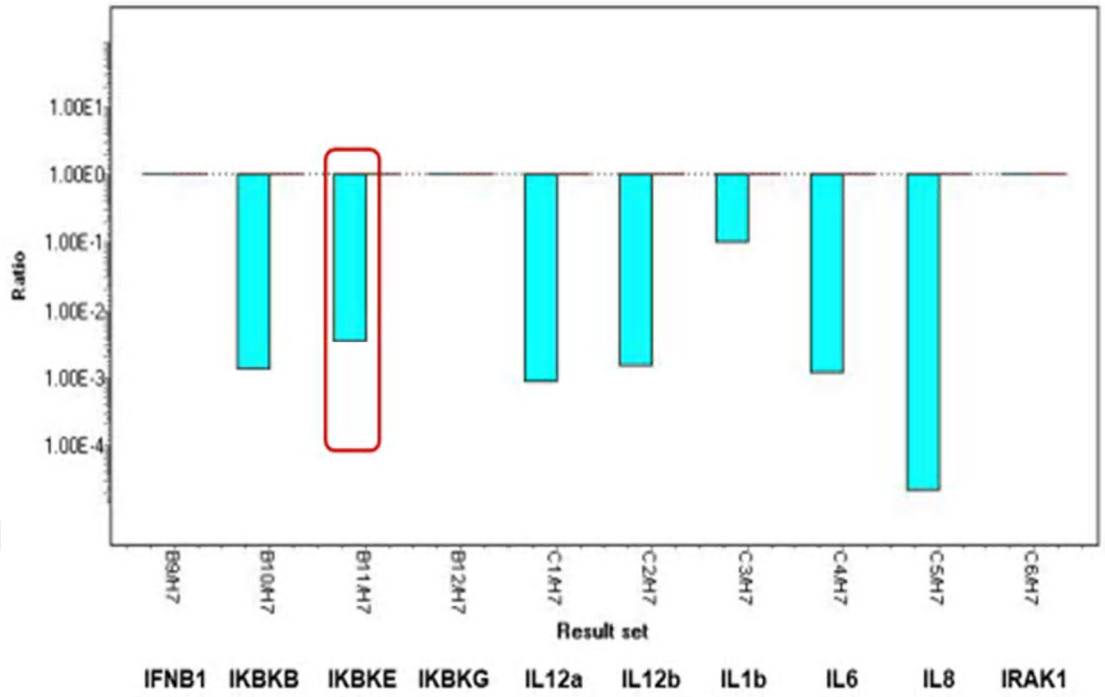
Şekil 61. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5.



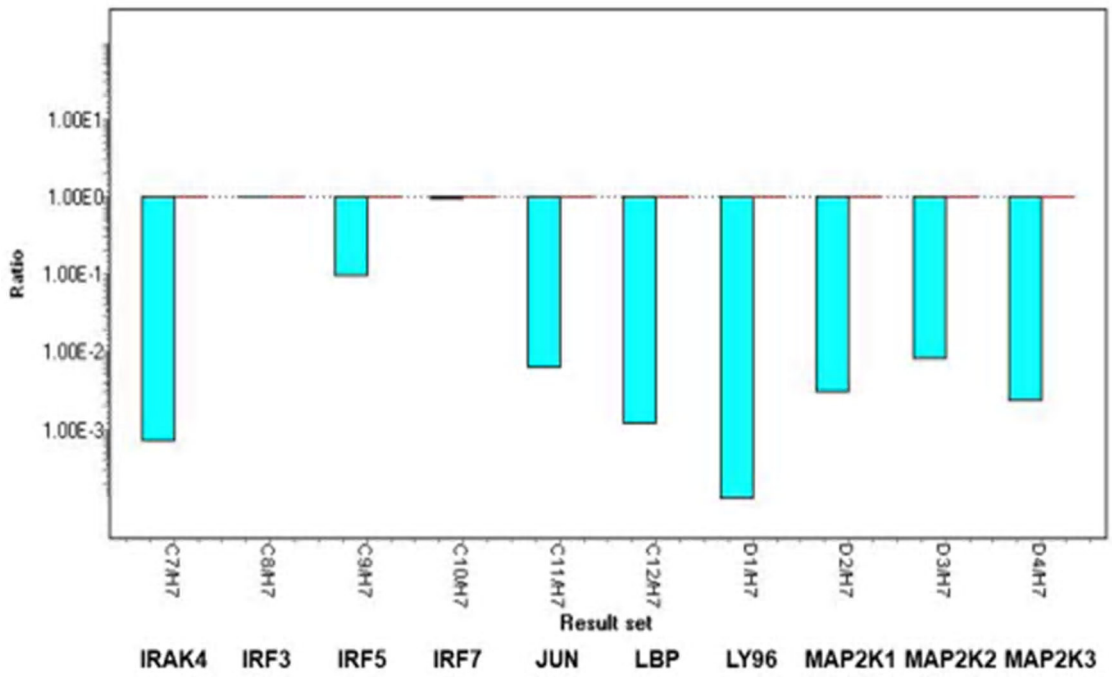
Şekil 62. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1.



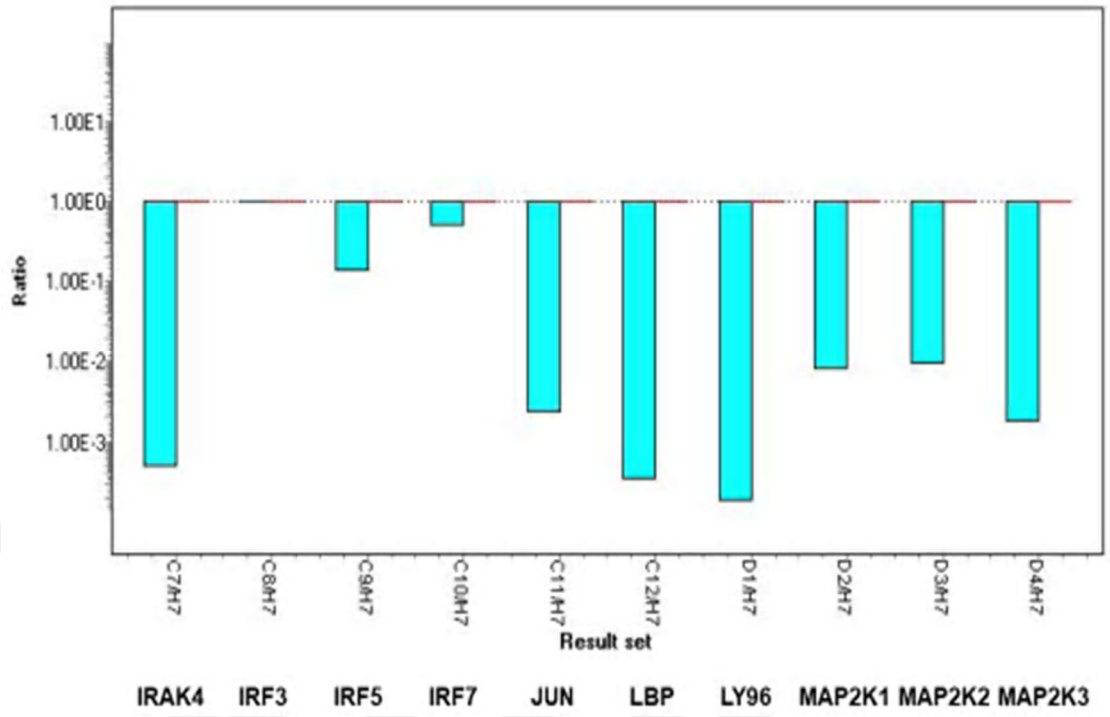
Şekil 63. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1.



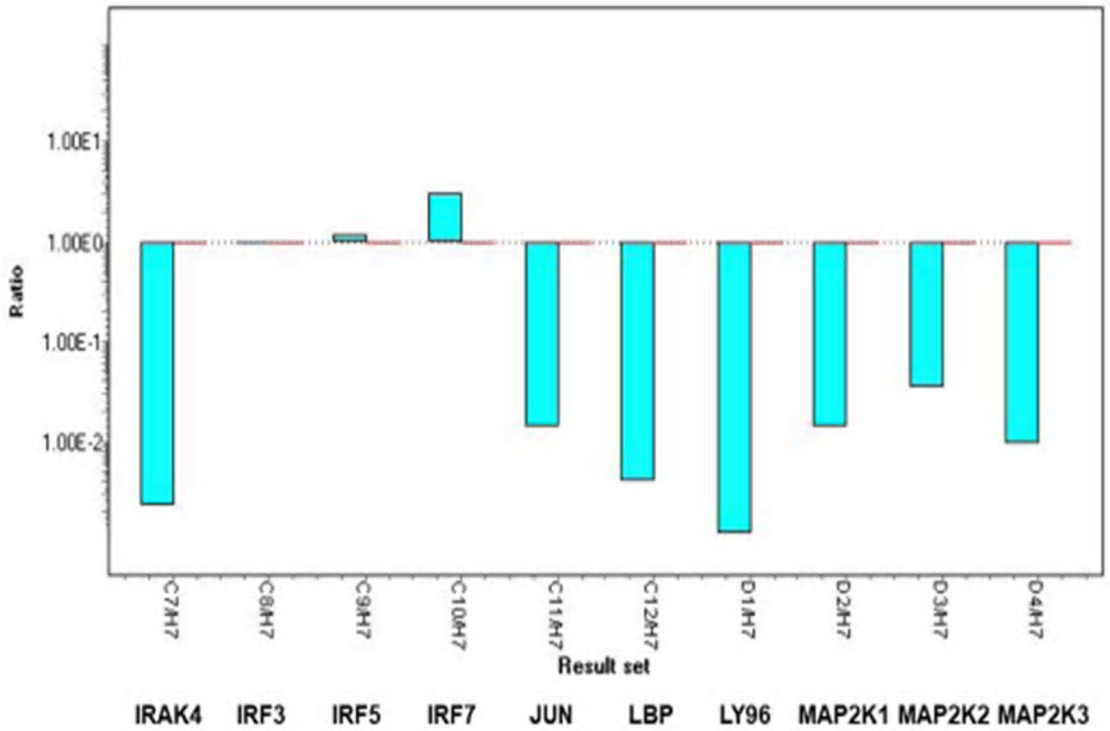
Şekil 64. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1.



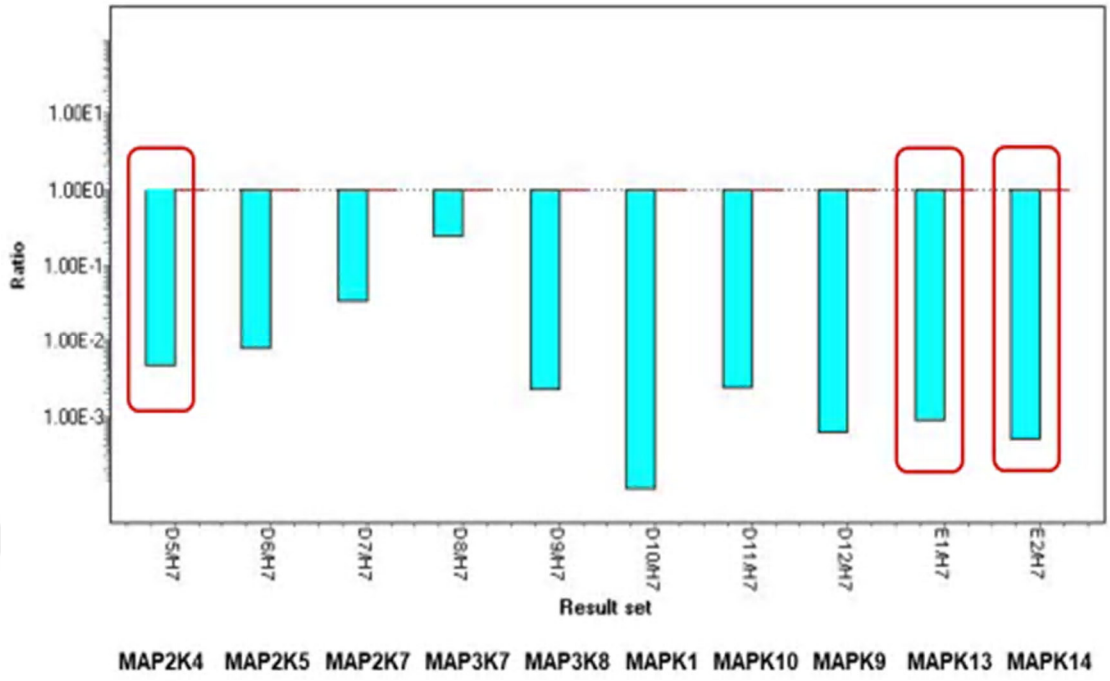
Şekil 65. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3.



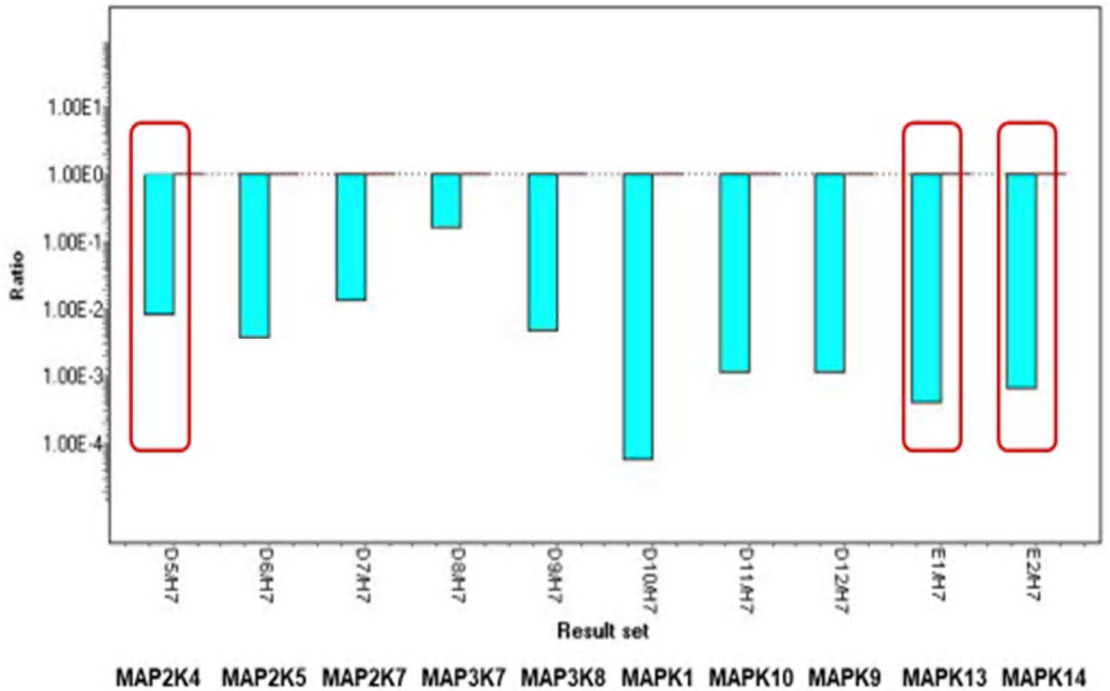
Şekil 66. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3.



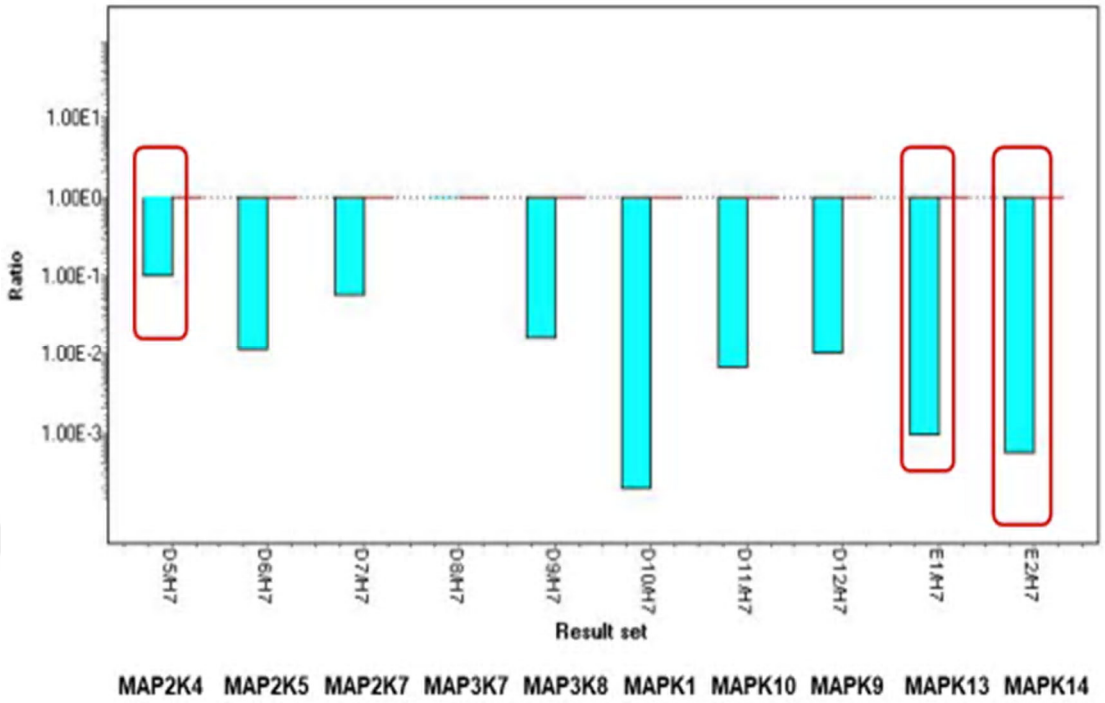
Şekil 67. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3.



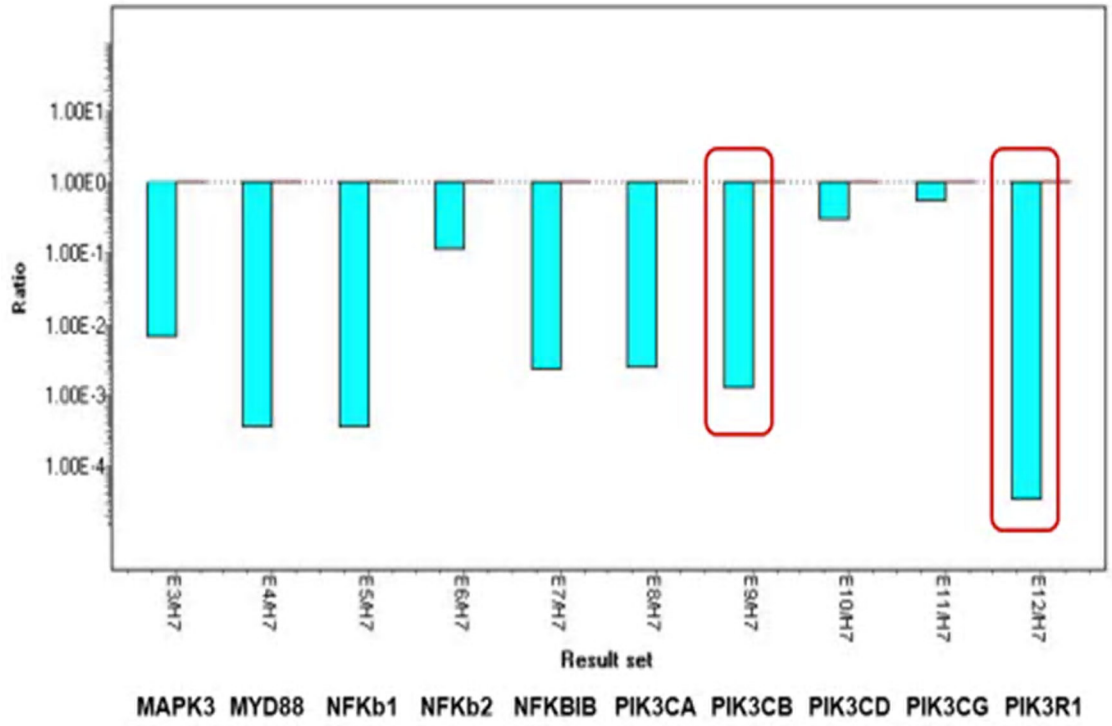
Şekil 68. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14.



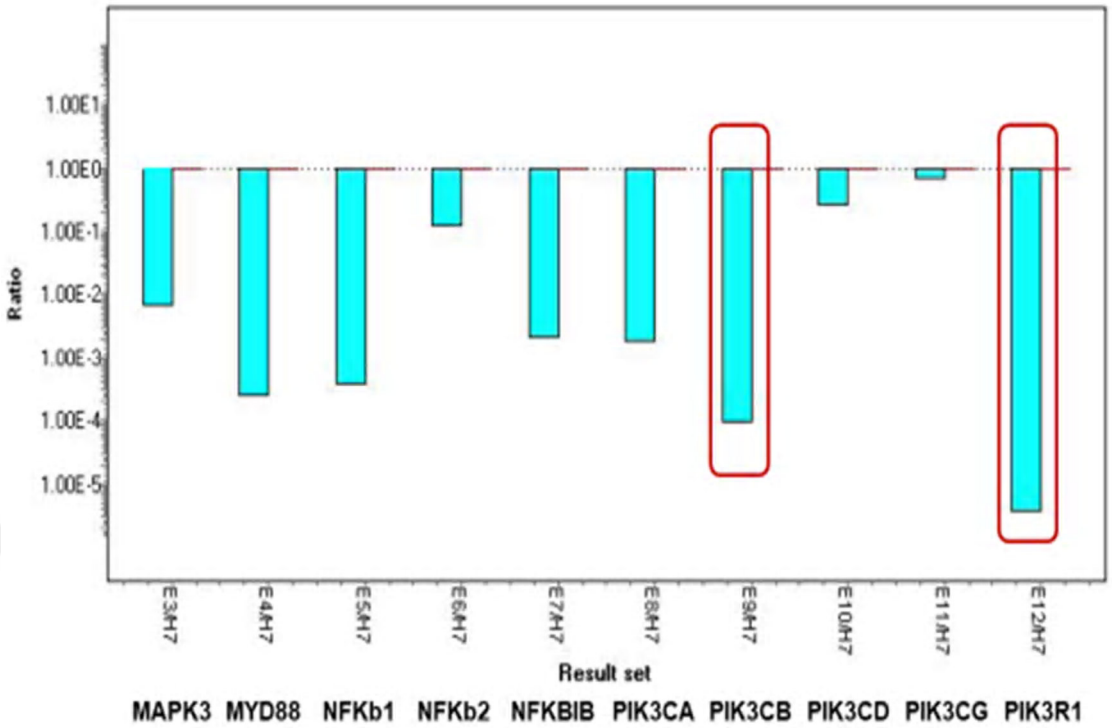
Şekil 69. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14.



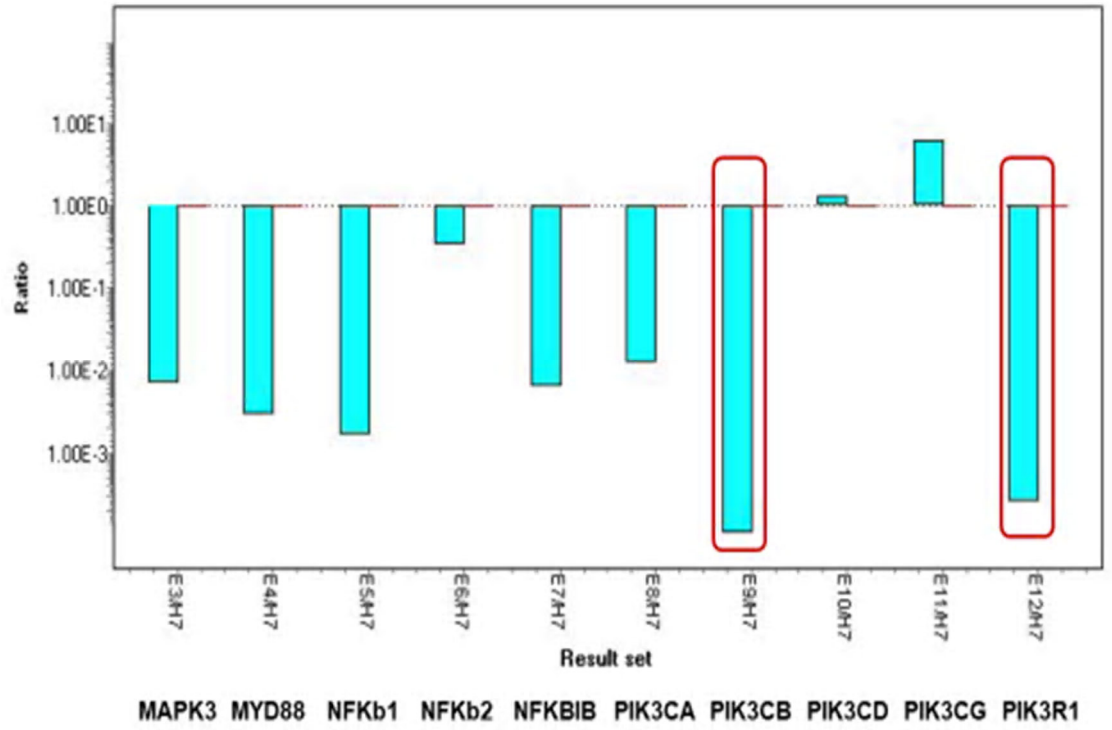
Şekil 70. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14.



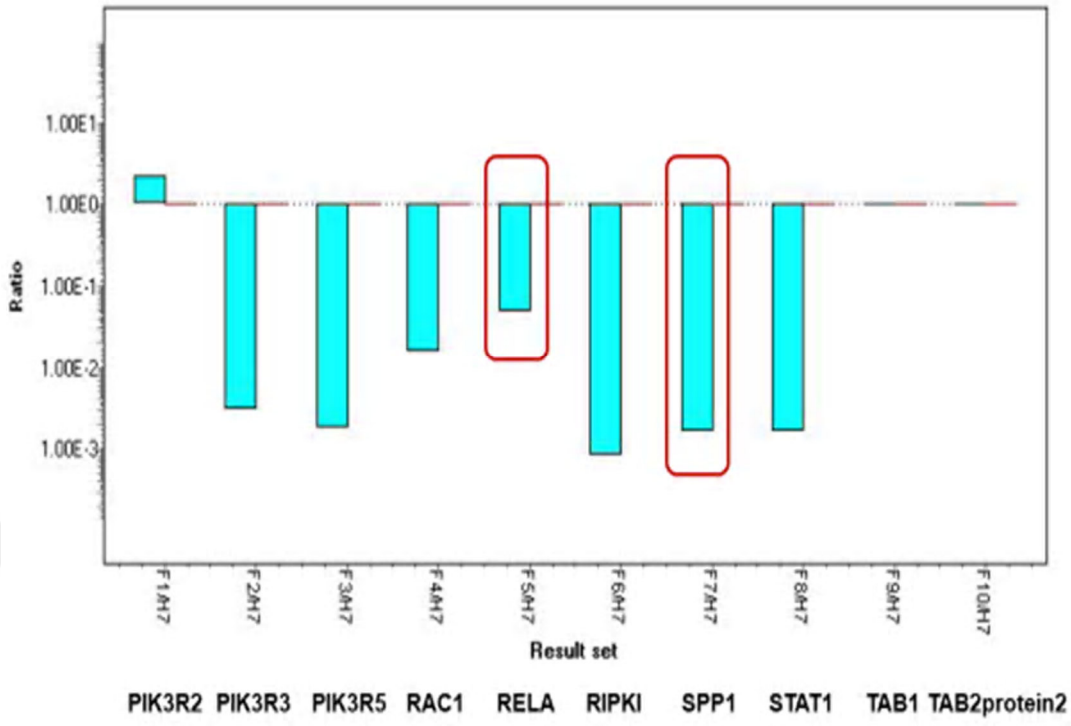
Şekil 71. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1.



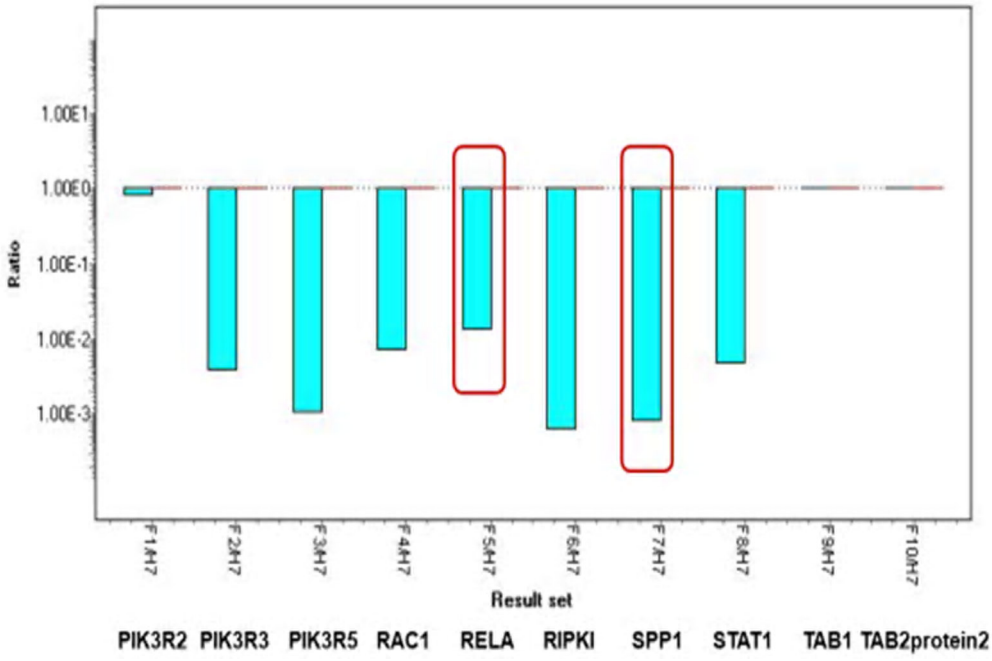
Şekil 72. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1.



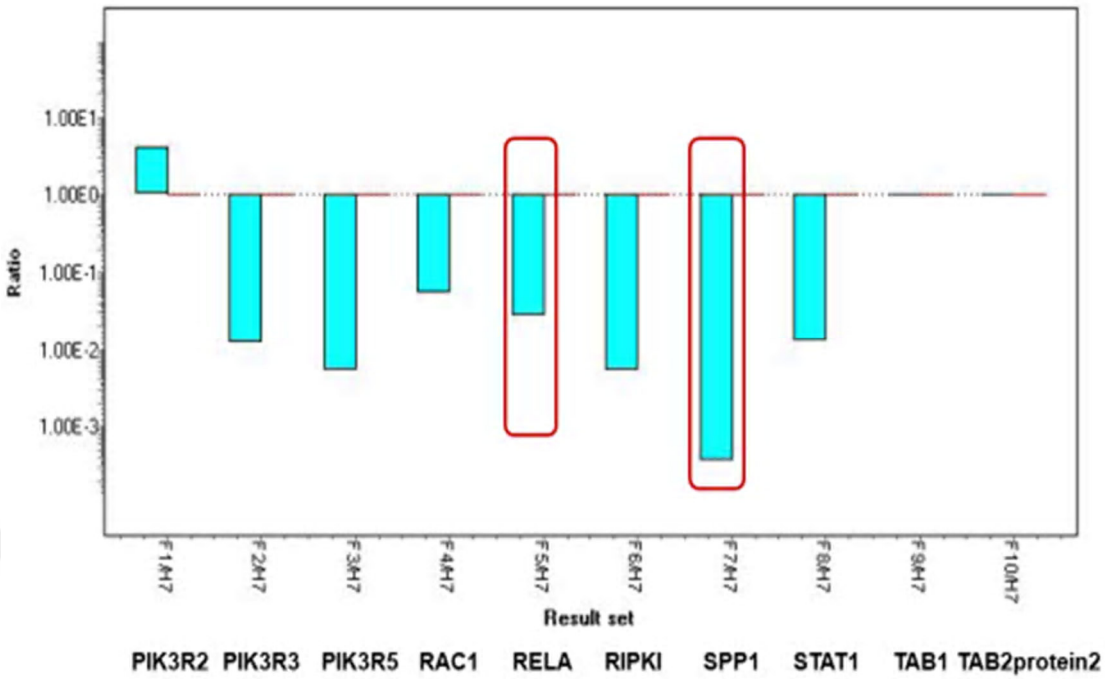
Şekil 73. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1.



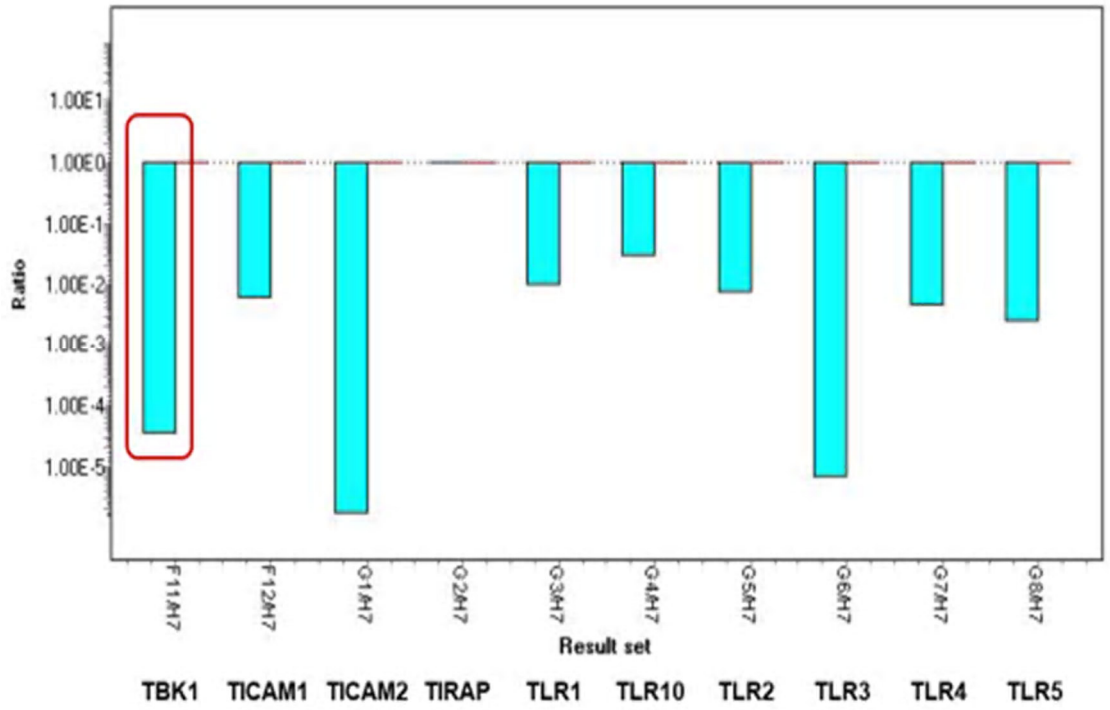
Şekil 74. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2.



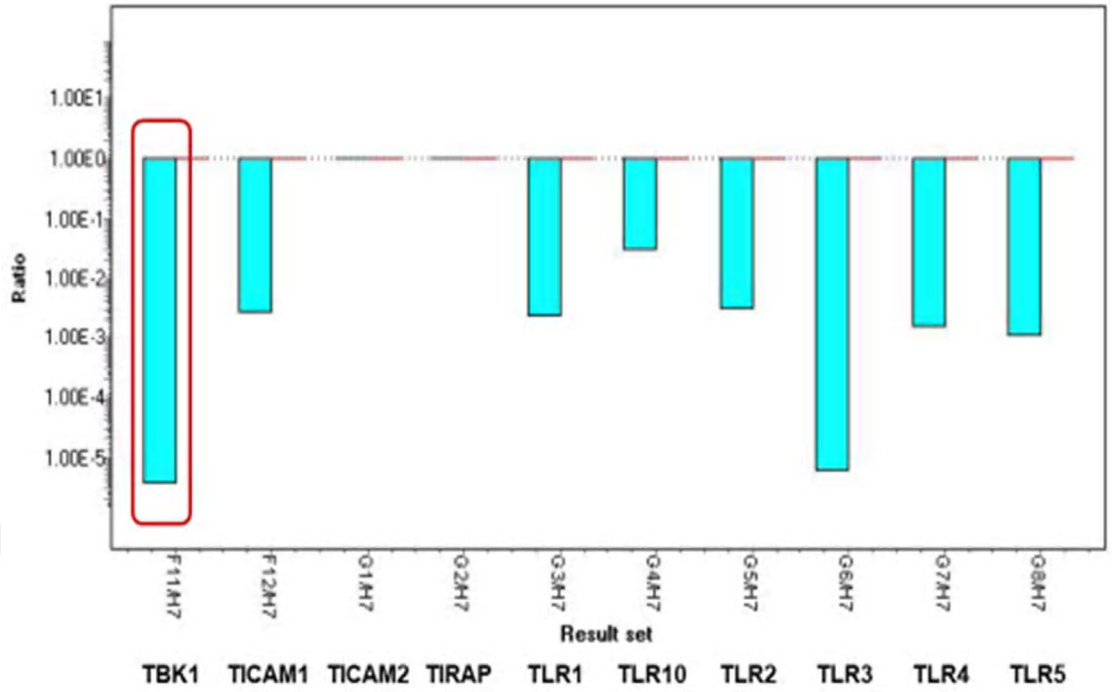
Şekil 75. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2.



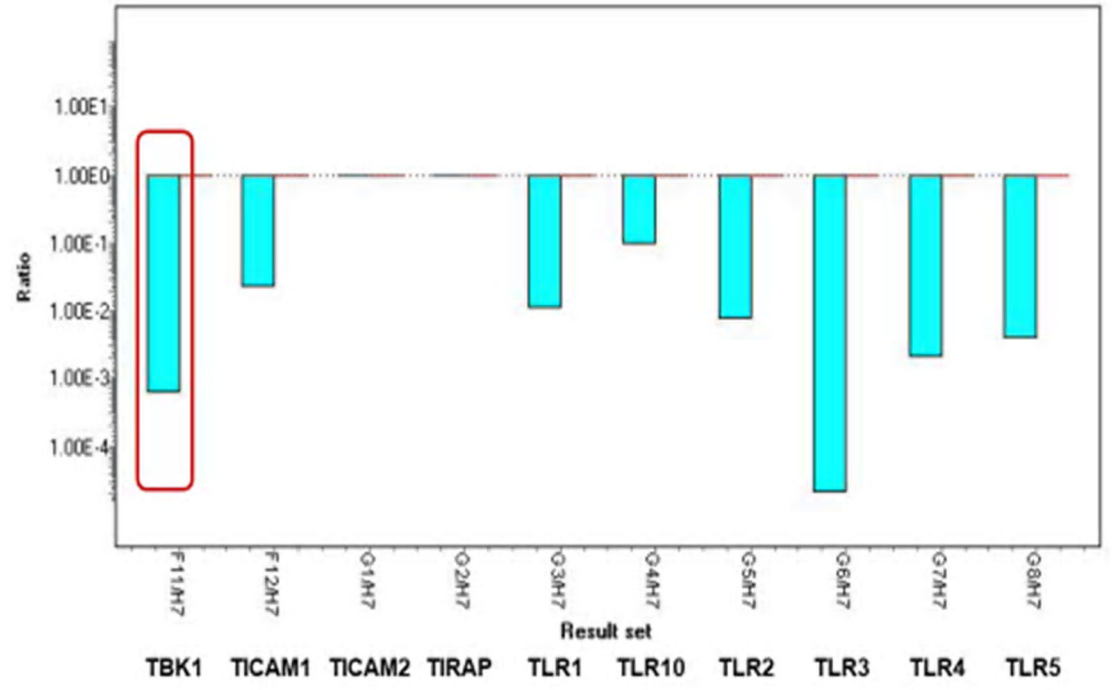
Şekil 76. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2.



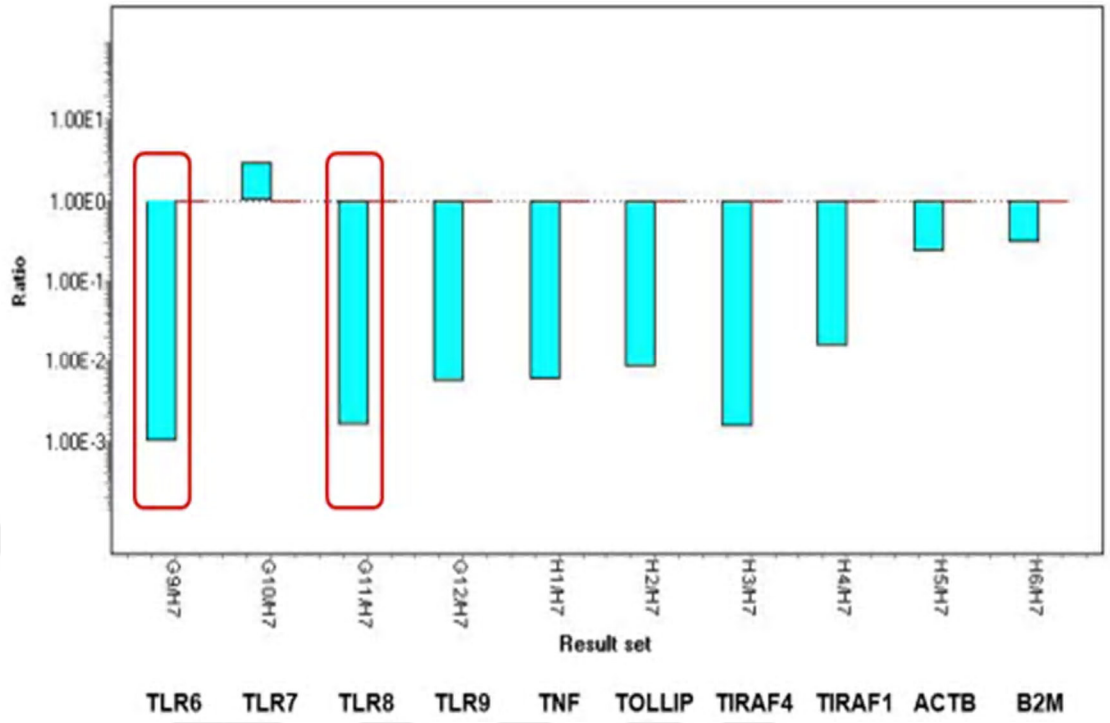
Şekil 77. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5.



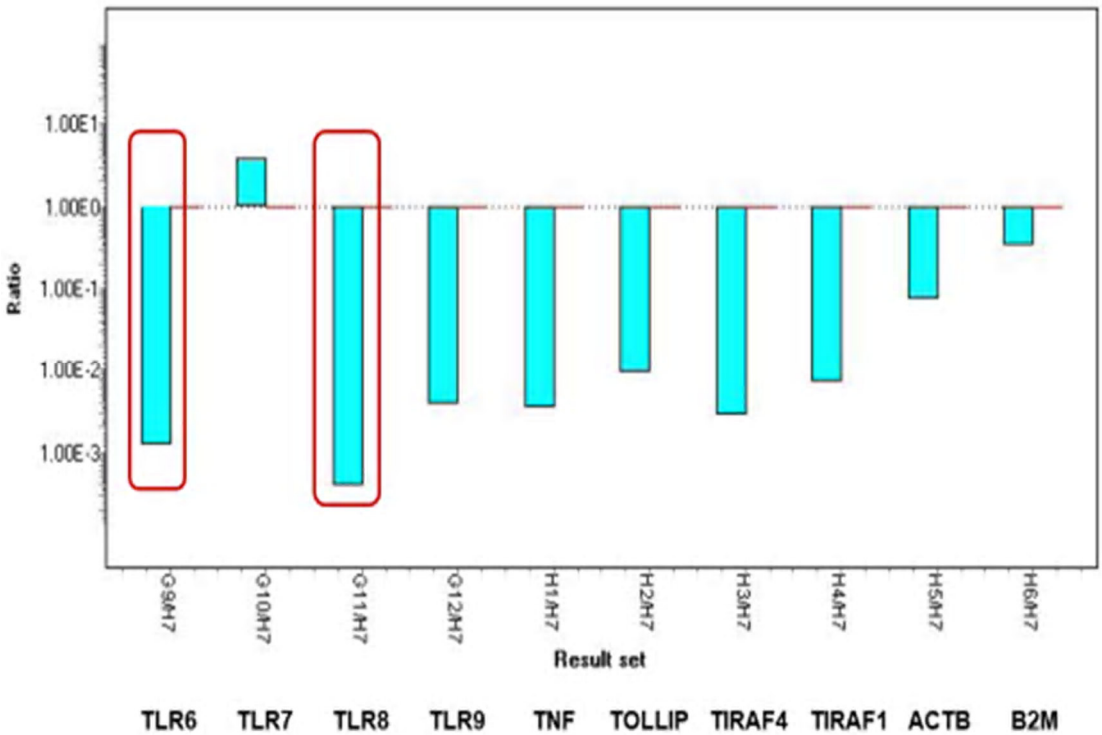
Şekil 78. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5.



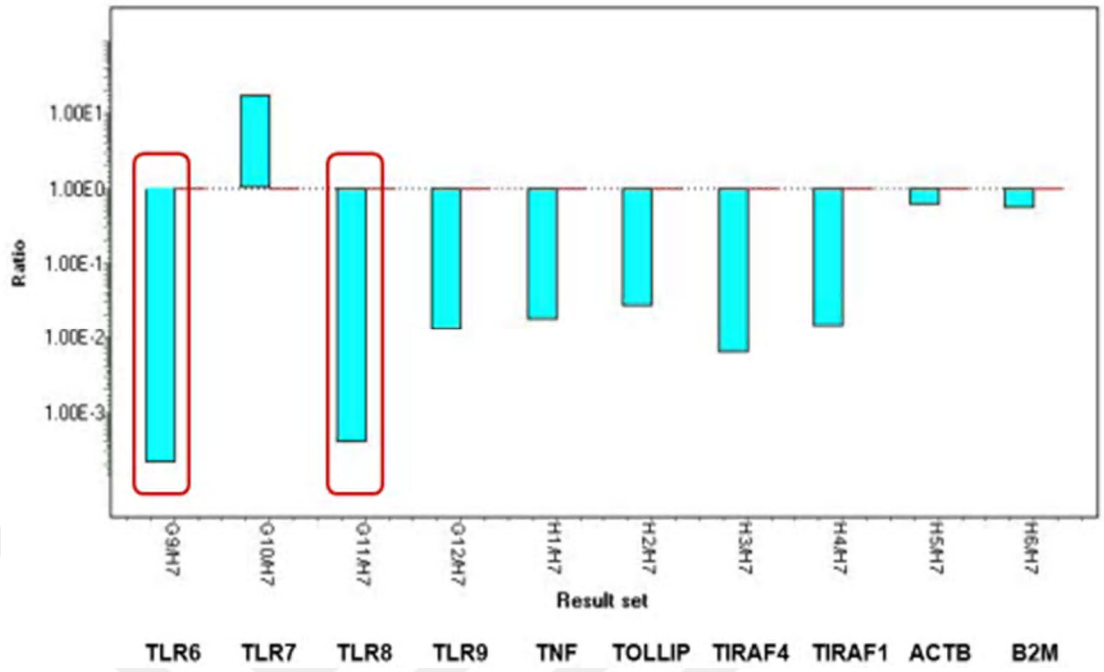
Şekil 79. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5.



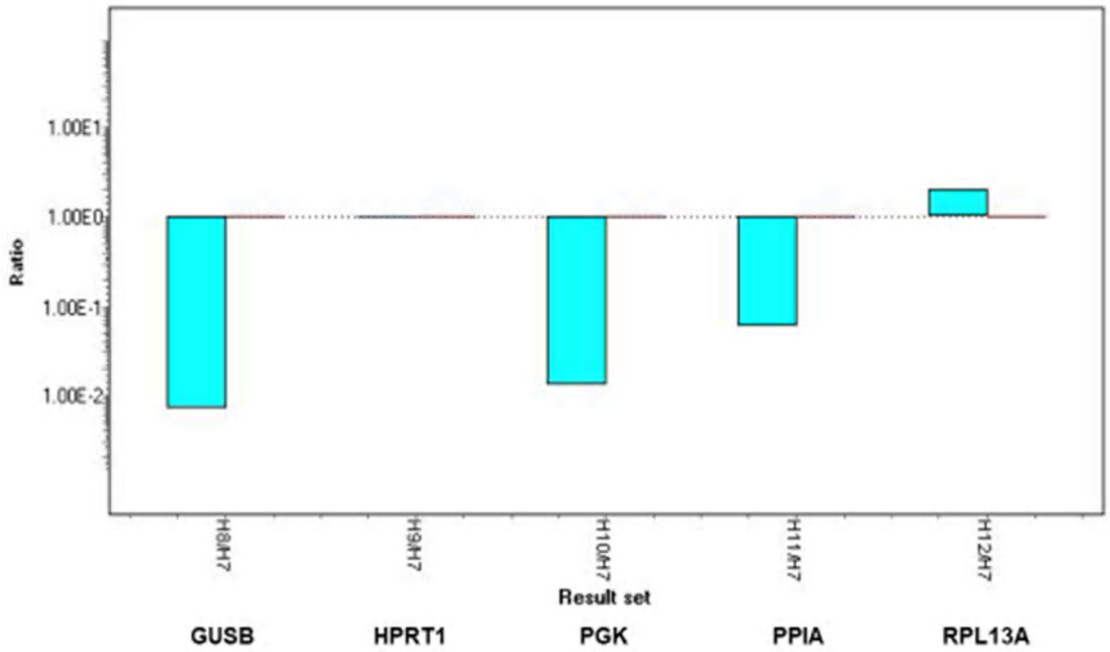
Şekil 80. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M.



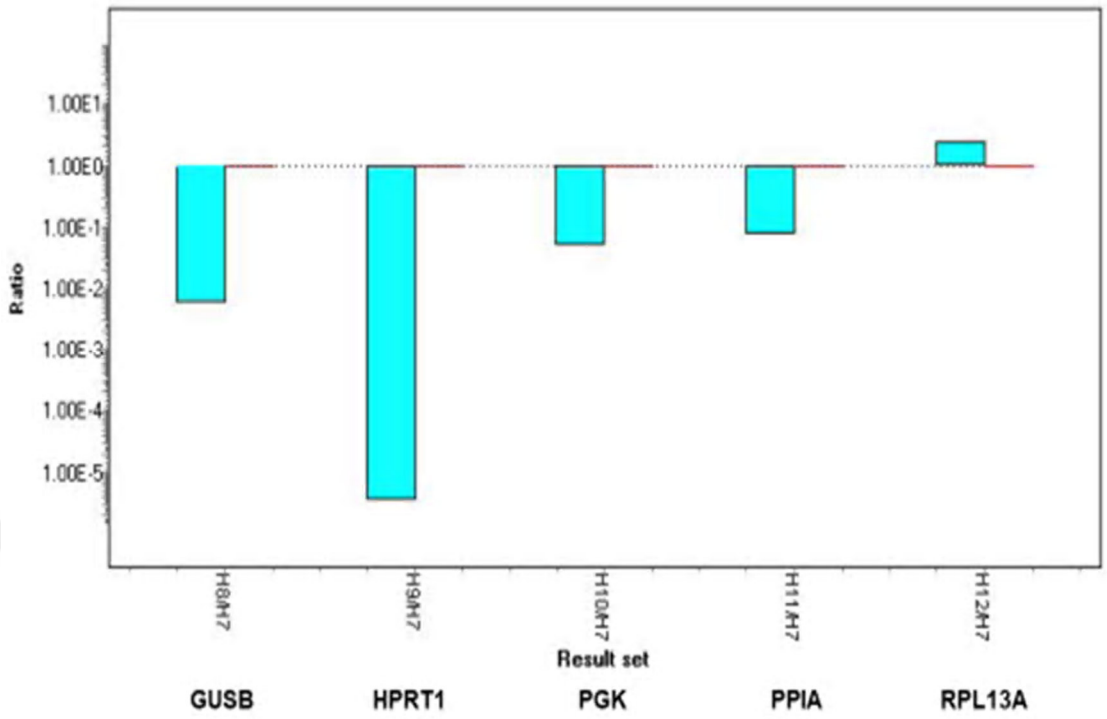
Şekil 81. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M.



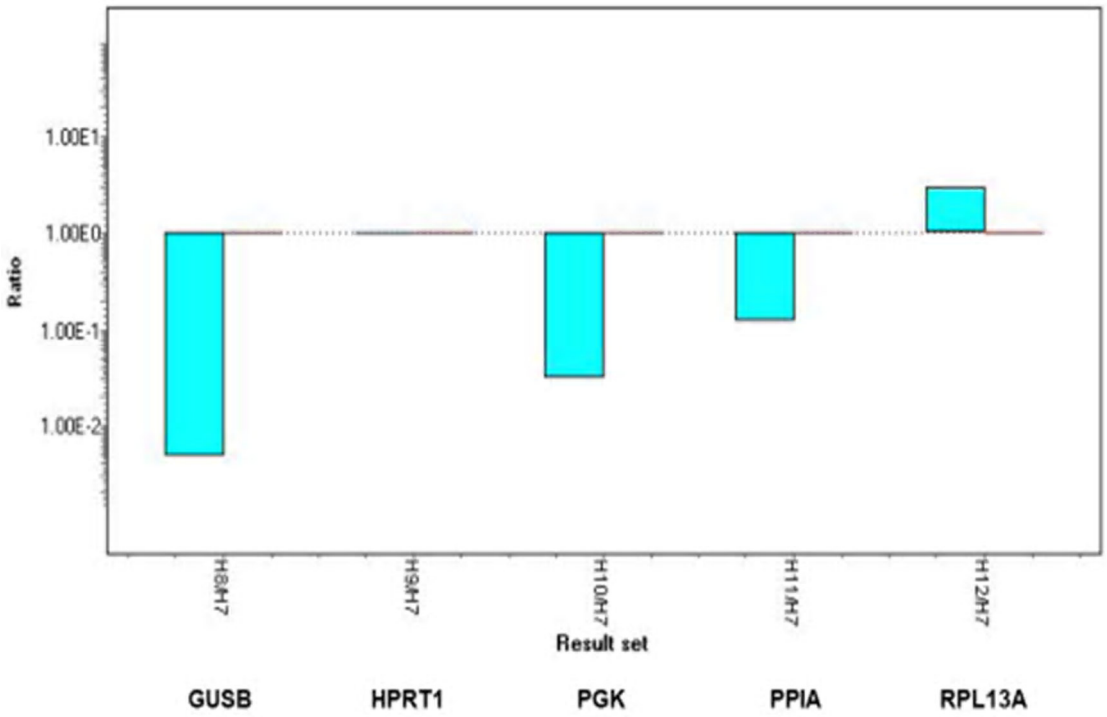
Şekil 82. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M.



Şekil 83. 48.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A.

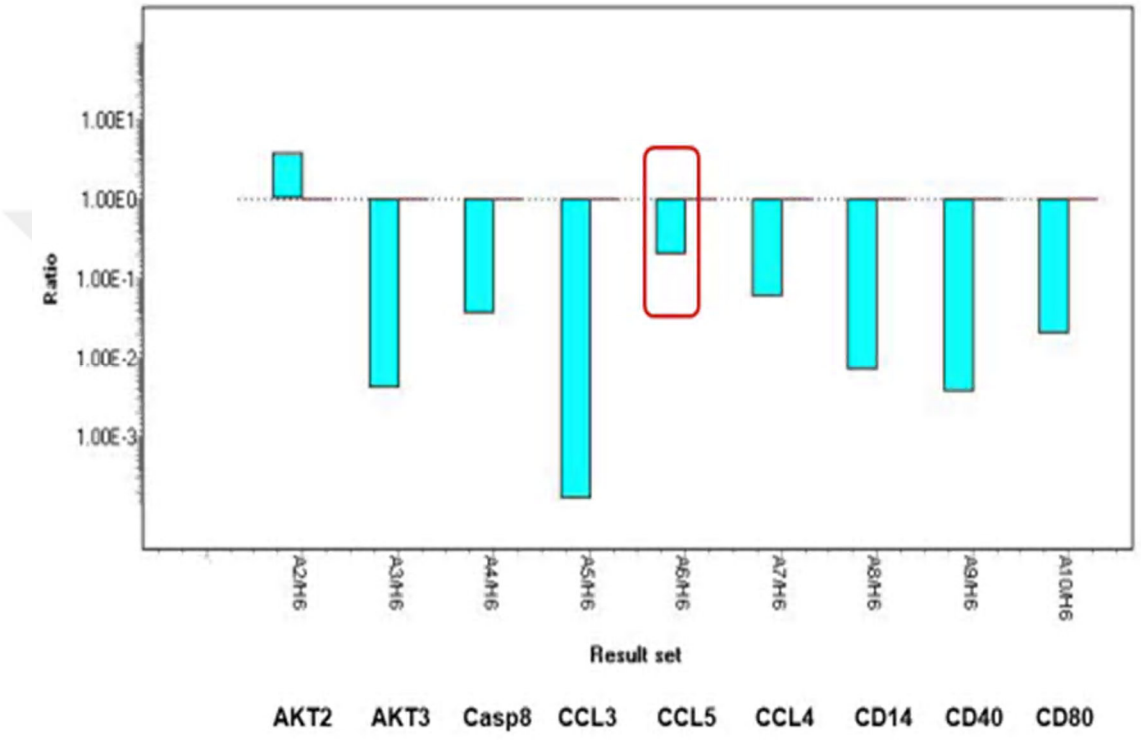


Şekil 84. 48.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A.

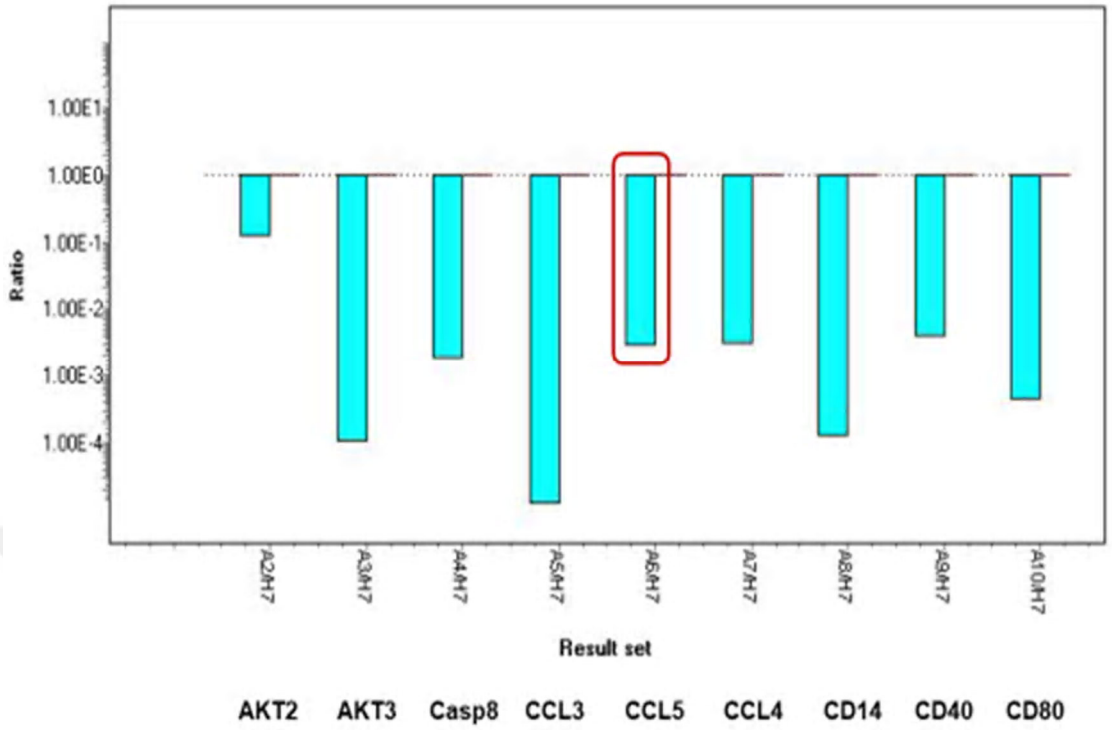


Şekil 85. 48.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A.

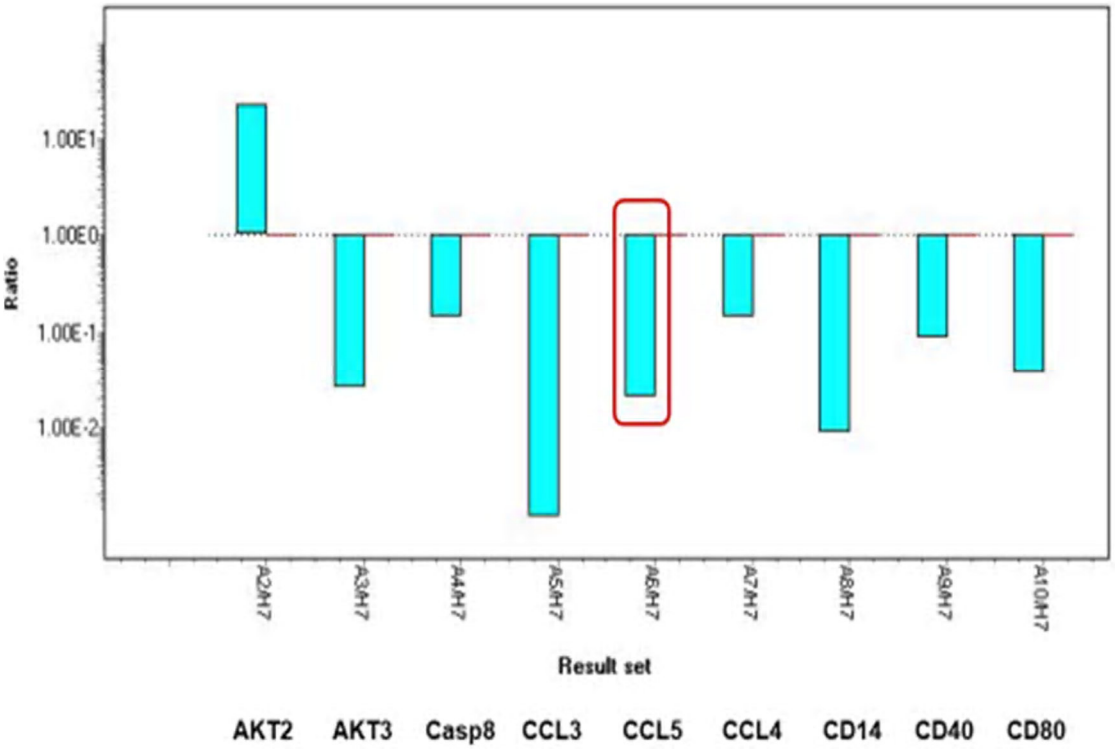
72.saat sonrasında elde edilen verilere sonucunda BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu ve takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubuna göre deney grubundaki CCL5, FOS, IFNa7, IKBKB, IL12b, JUN, MAP2K1, MAPK14, MAPK3, RAC1 ve STAT1 genlerinde değişiklik gözlemlenmiştir Buna göre ekspresyon seviyesi artan genlerin grafikleri elde edilmiştir (Şekil 86-115).



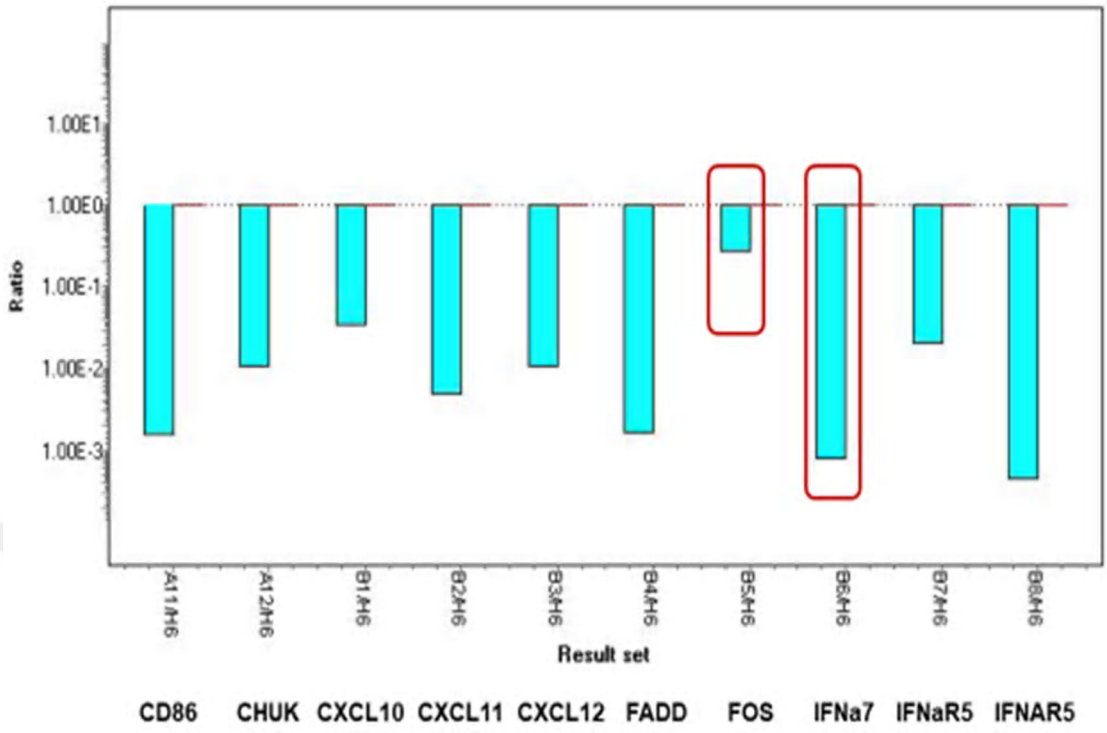
Şekil 86. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80.



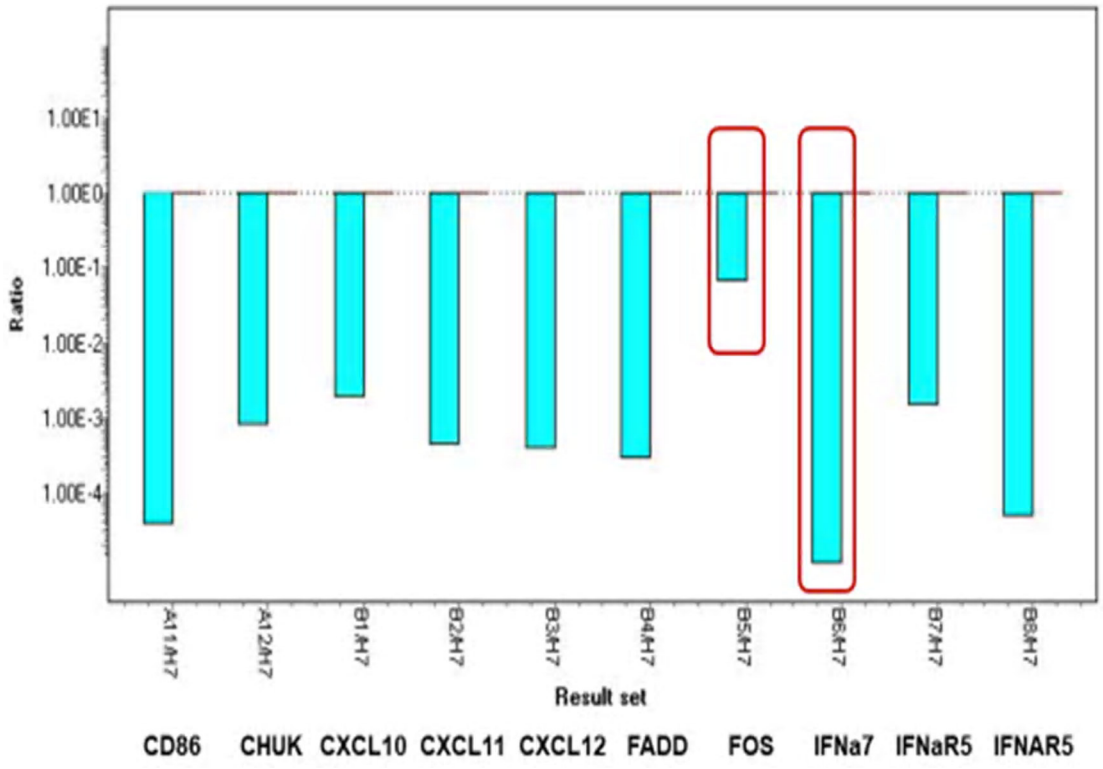
Şekil 87. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80.



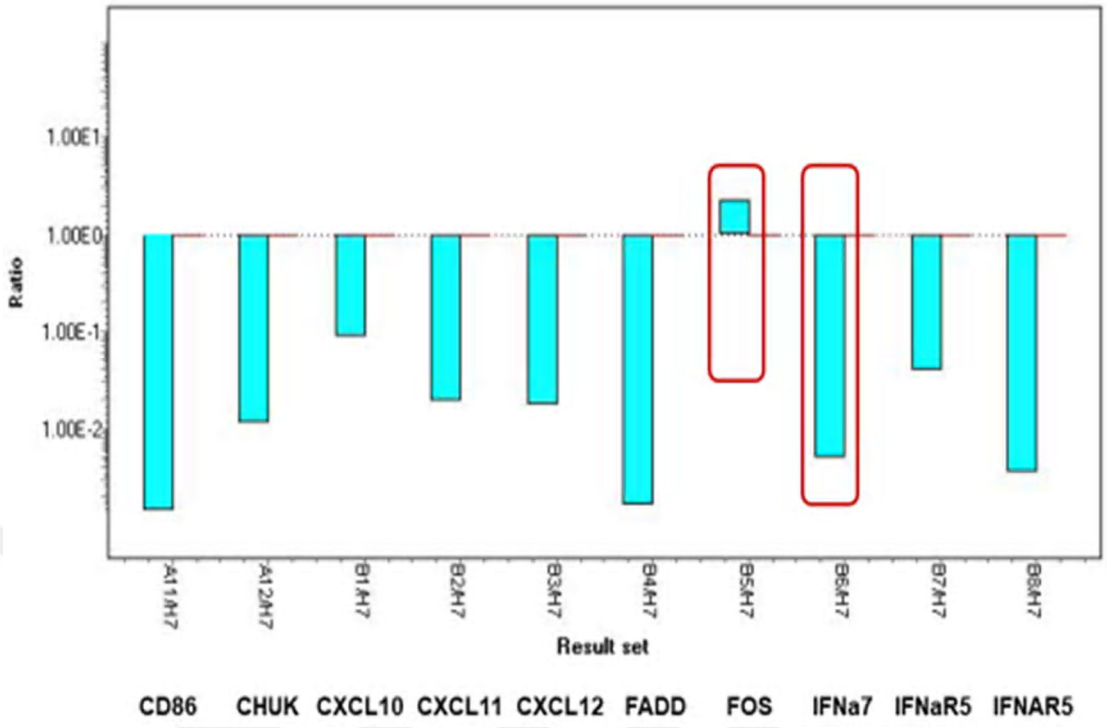
Şekil 88. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; AKT2,AKT3, Casp8, CCL3, CCL5, CCL40, CD14, CD40, CD80.



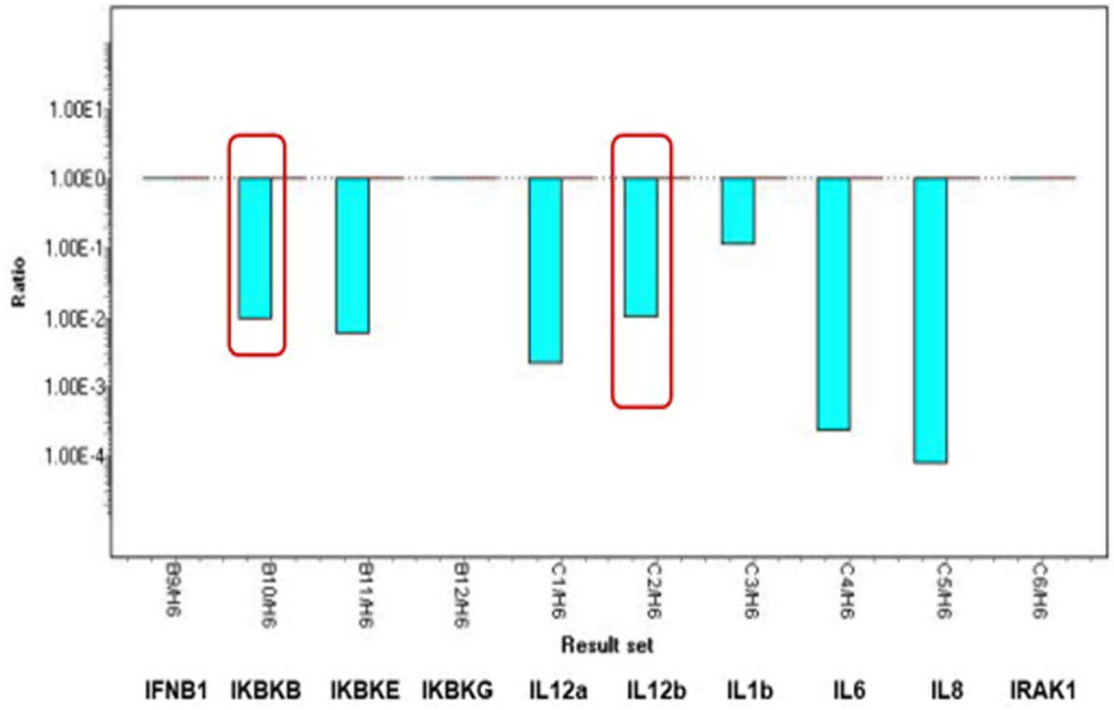
Şekil 89. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5.



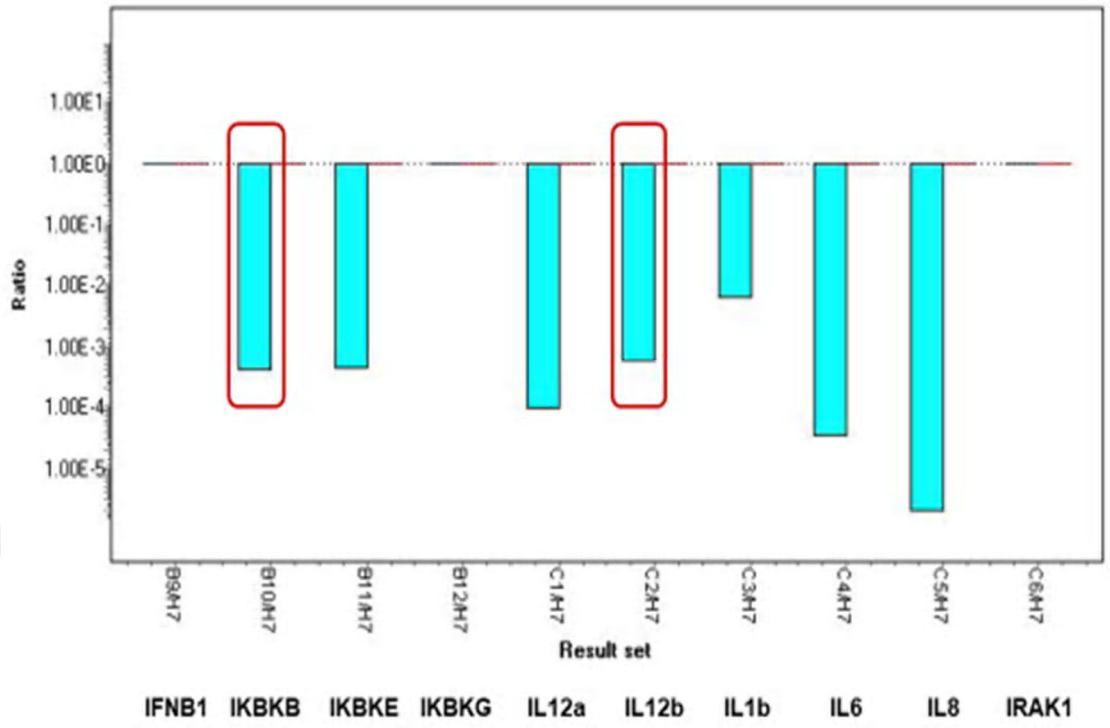
Şekil 90. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5.



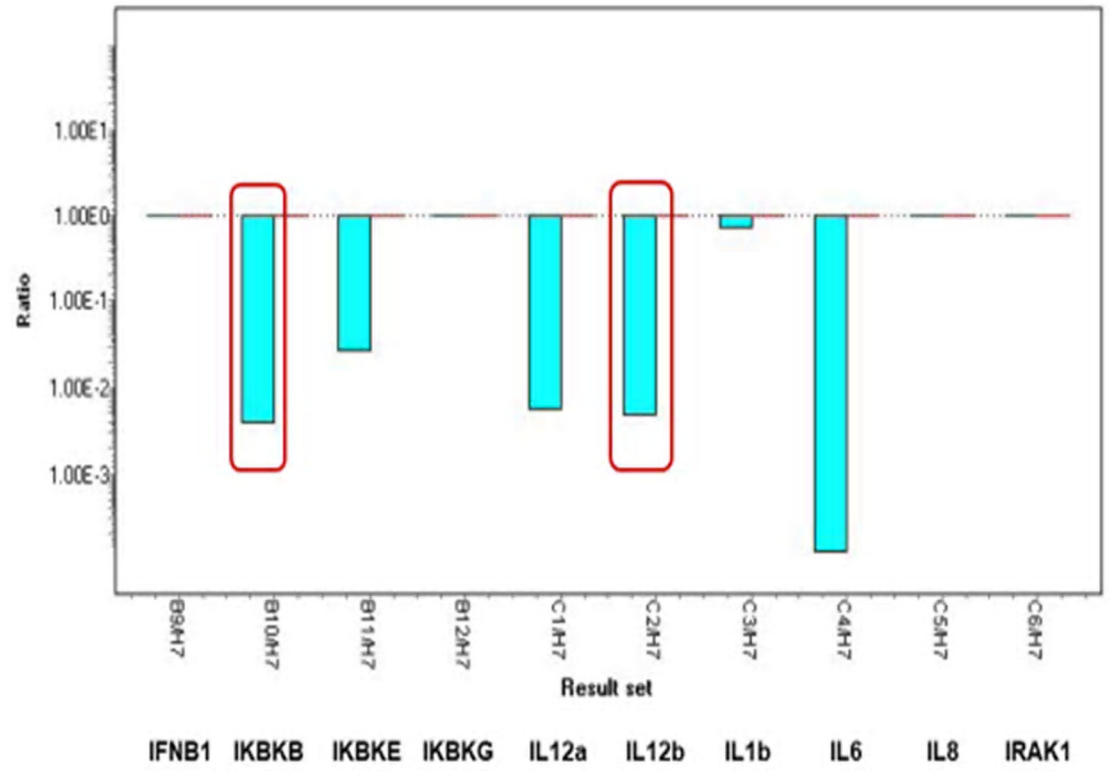
Şekil 91. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; CD86, CHUK, CXCL10, CXCL11, CXCL12, FADD, FOS, IFNa7, IFNaR5, IFNAR5.



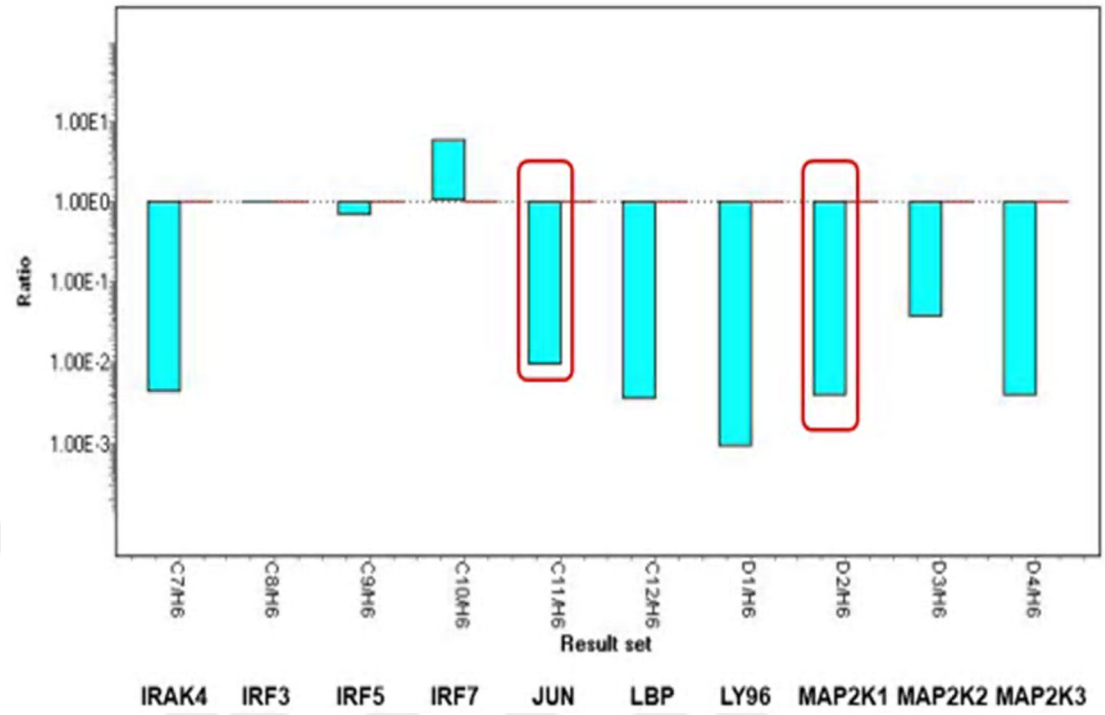
Şekil 92. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1.



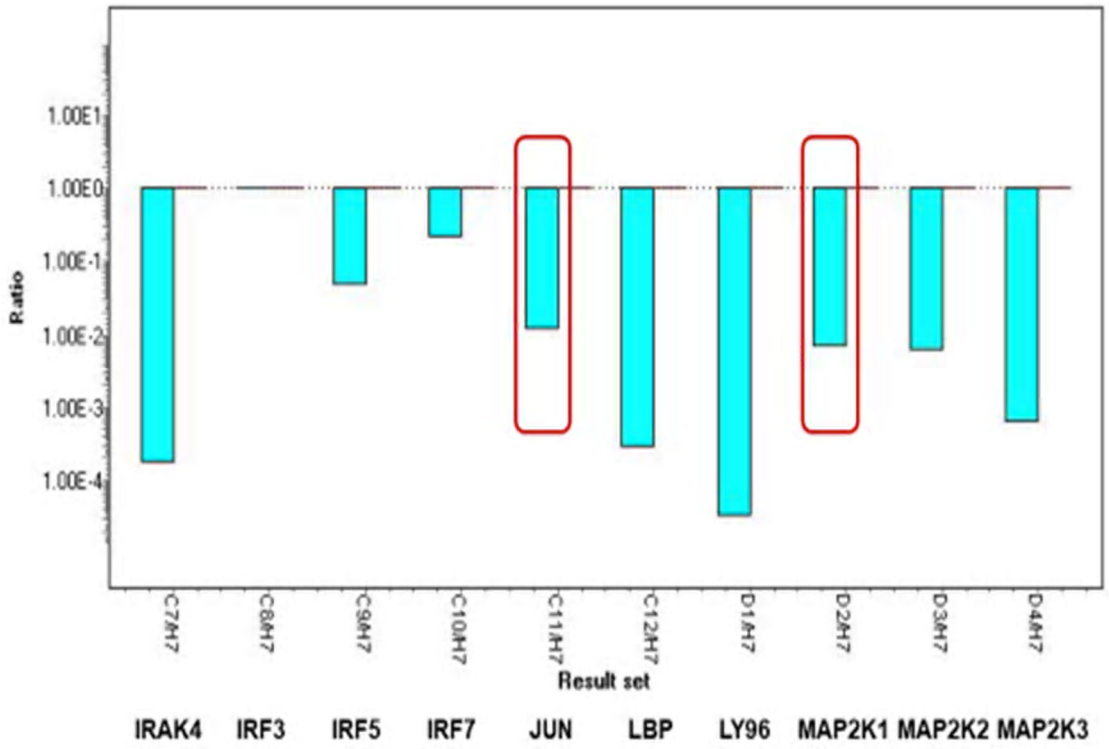
Şekil 93. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1.



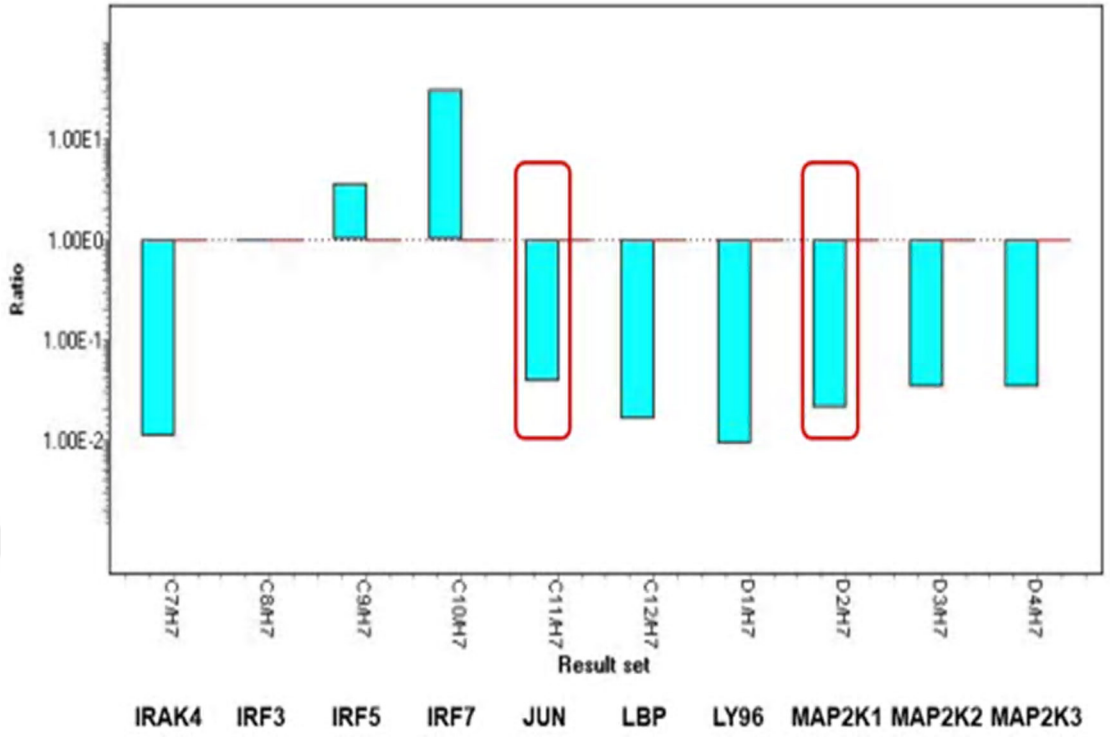
Şekil 94. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IFNB1, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IK12a, IL12b, IL1b, IL6, IL8, IRAK1.



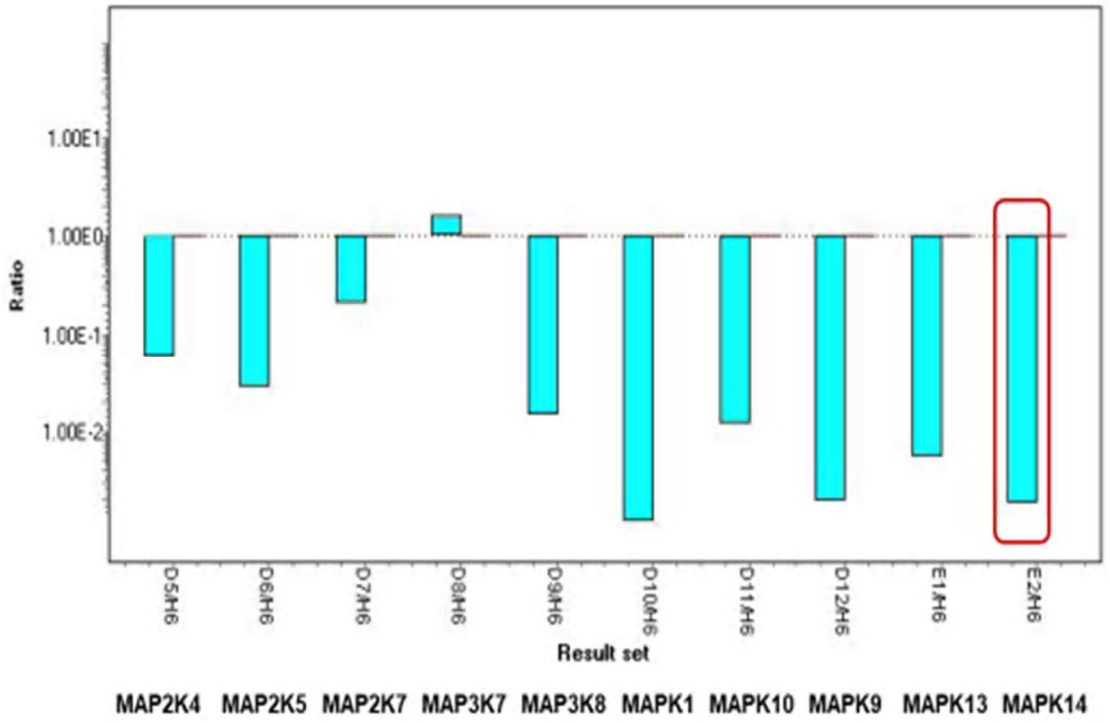
Şekil 95. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3.



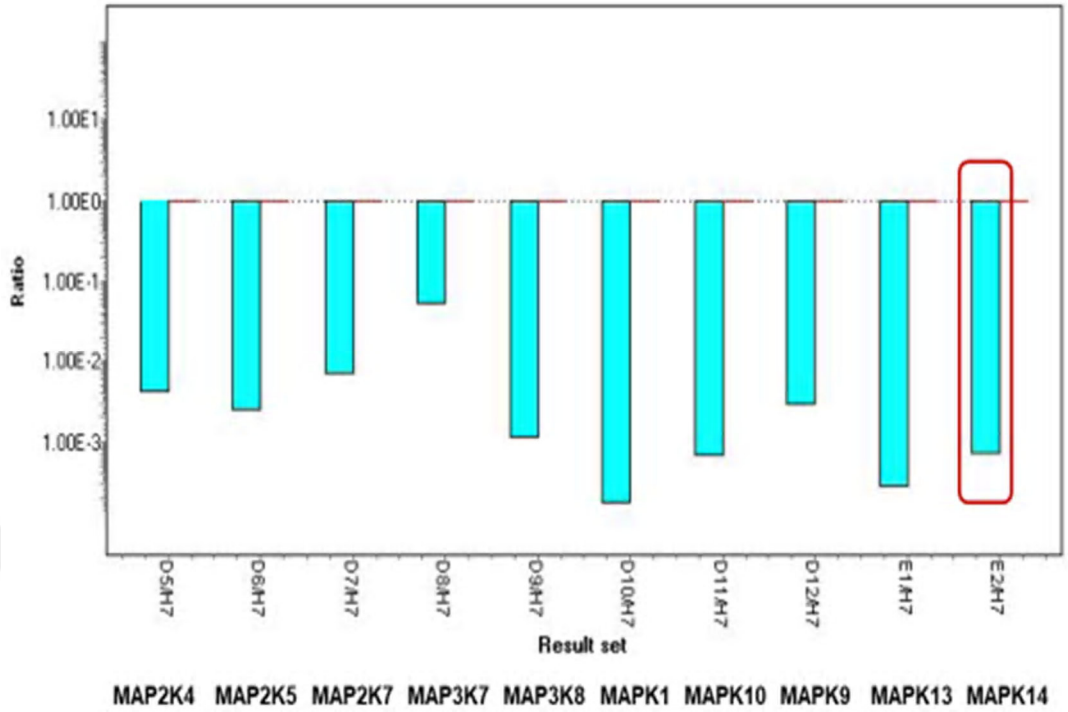
Şekil 96. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3.



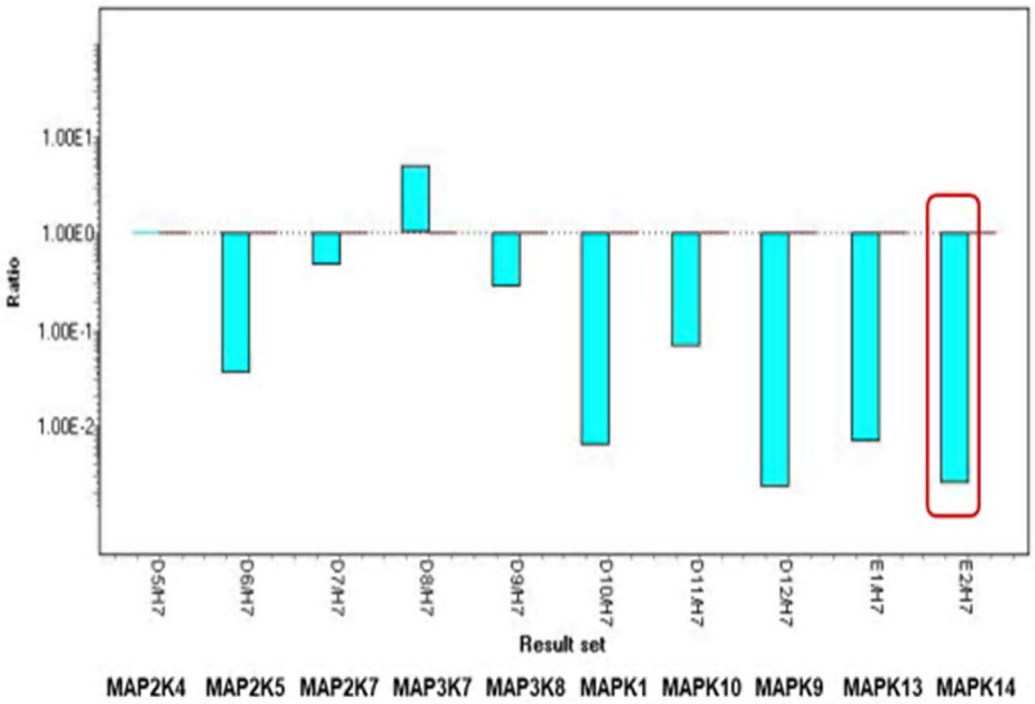
Şekil 97. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; IRAK4, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, LBP, LY96, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3.



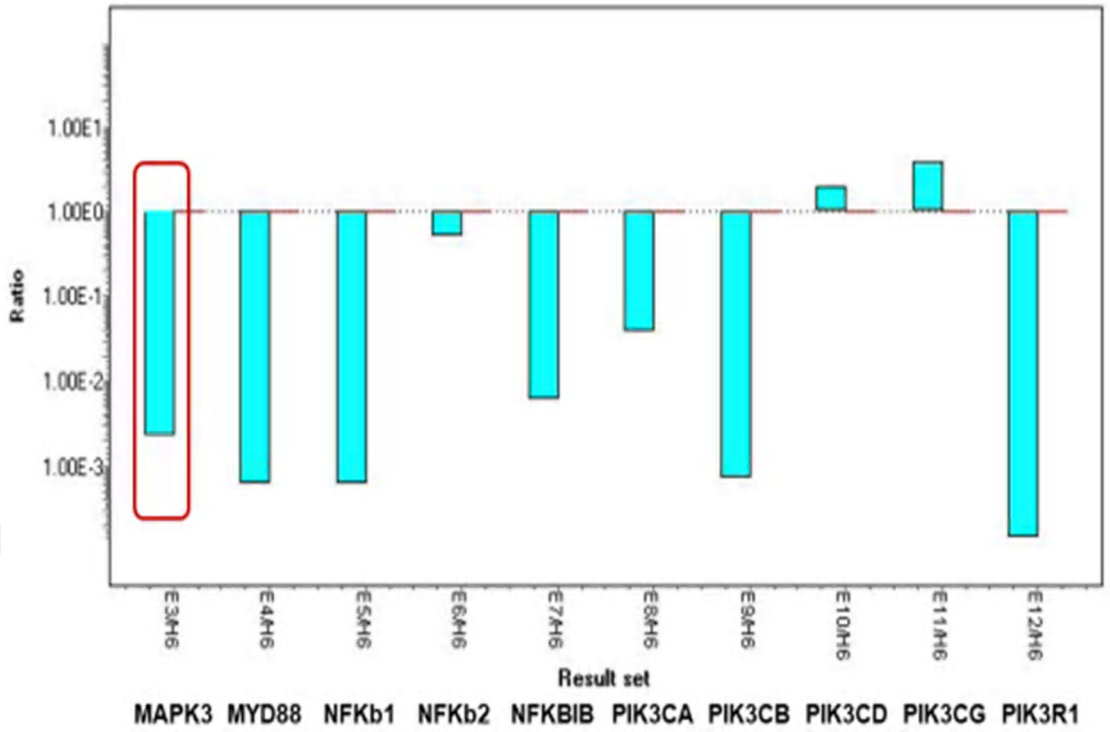
Şekil 98. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14.



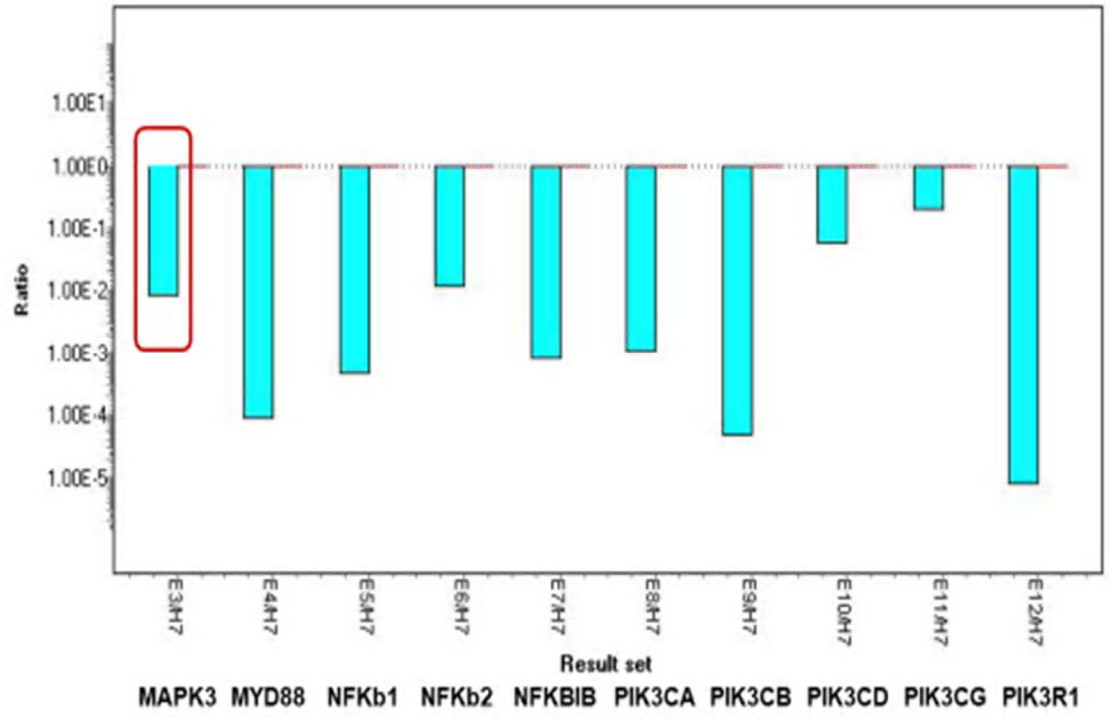
Şekil 99. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14.



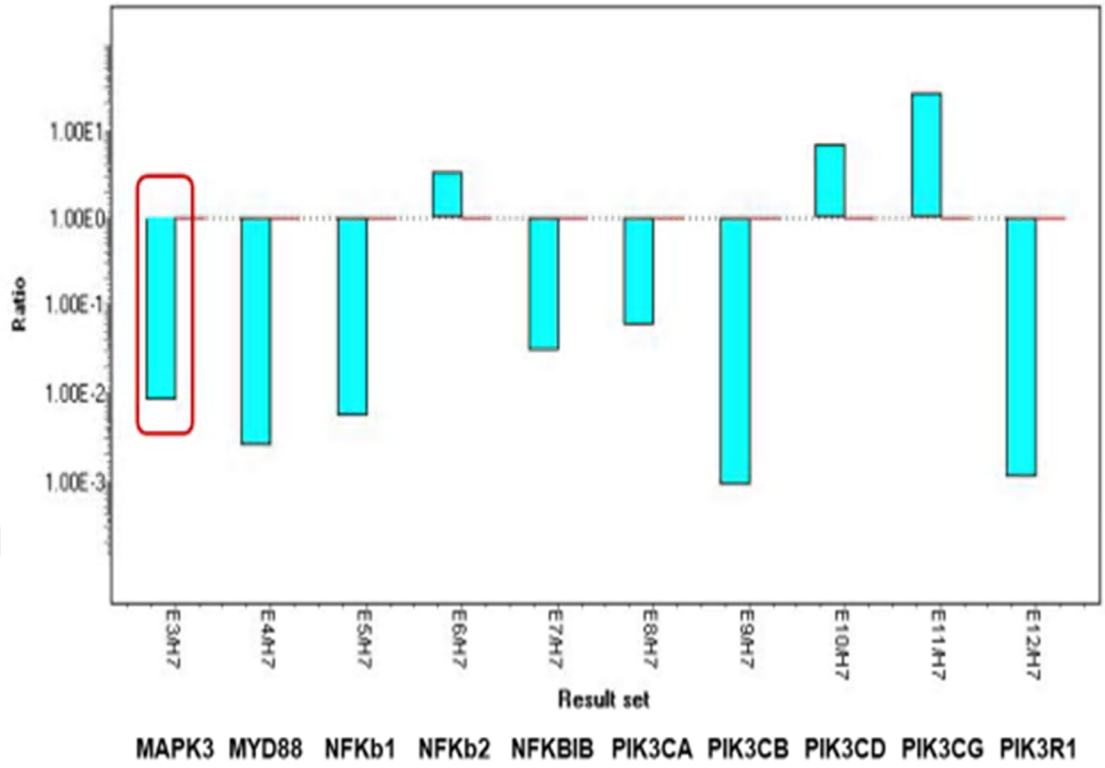
Şekil 100. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAP2K4, MAP2K5, MAP2K7, MAP3K7, MAP3K8, MAPK1, MAPK10, MAPK9, MAPK13, MAPK14.



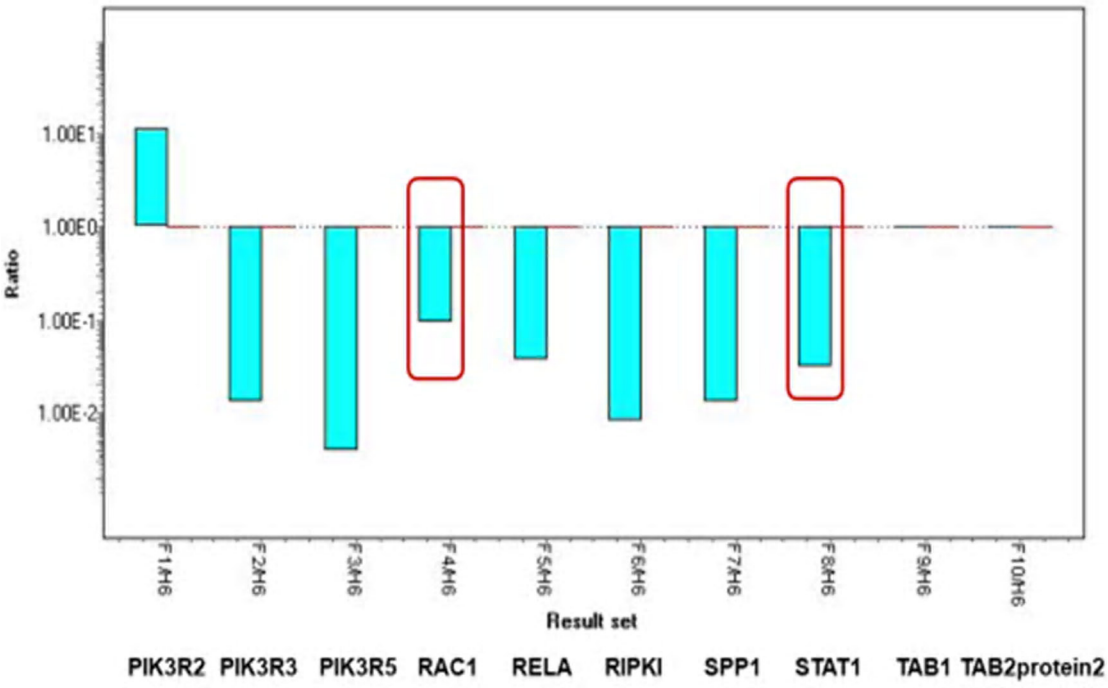
Şekil 101. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1.



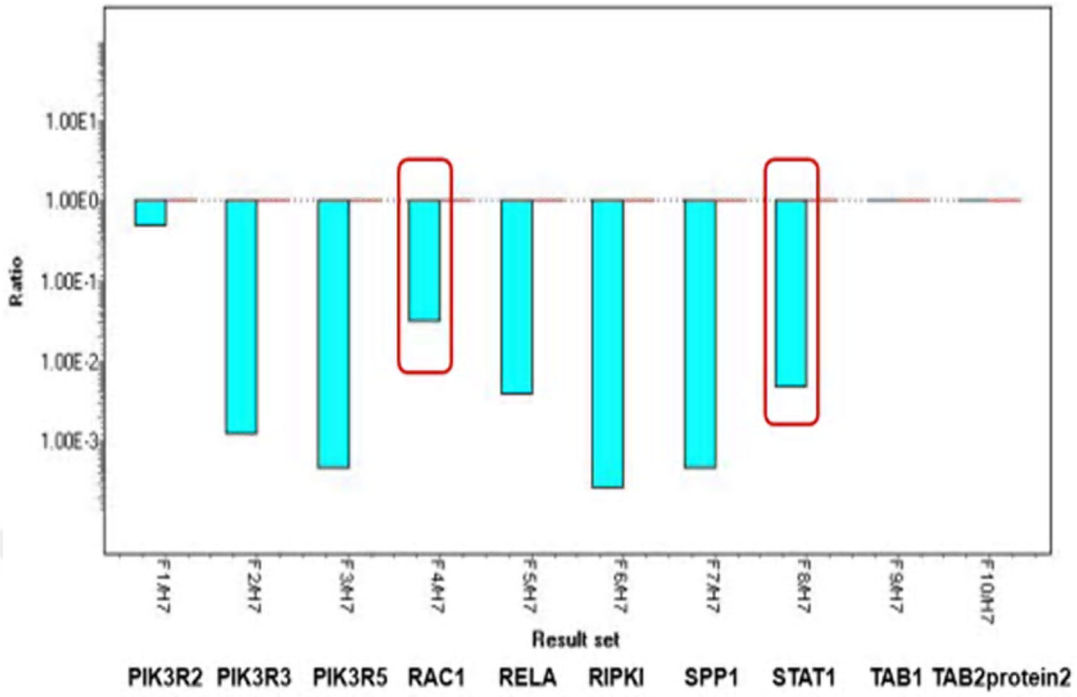
Şekil 102. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1.



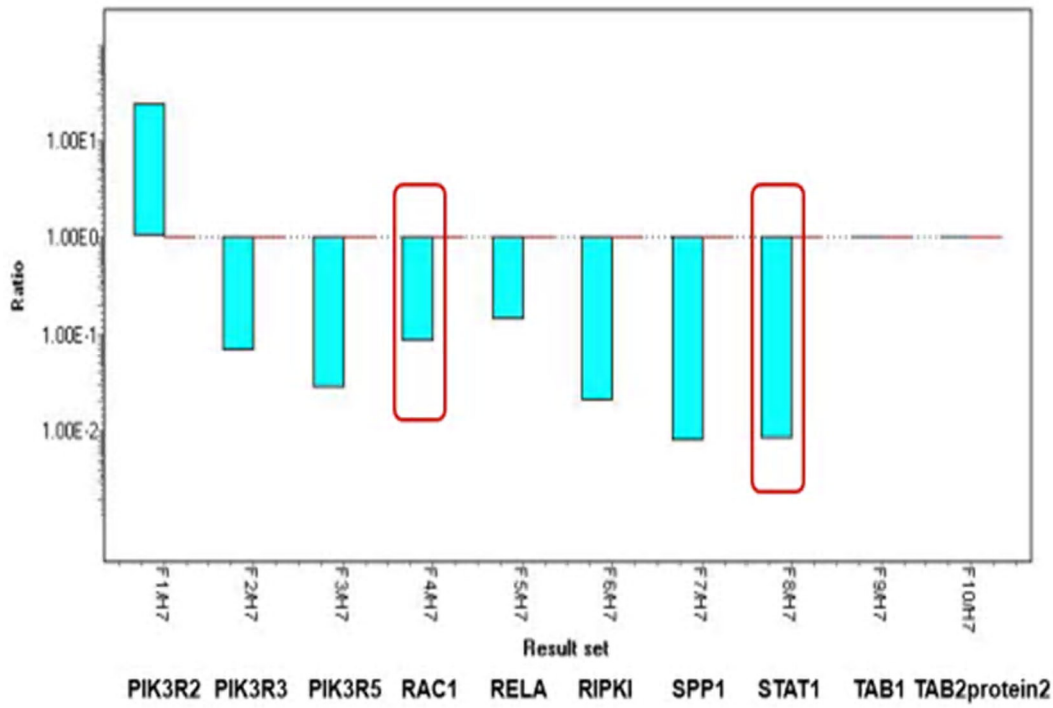
Şekil 103. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; MAPK3, MYD88, NFKb1, NFKb2, NFKBIB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1.



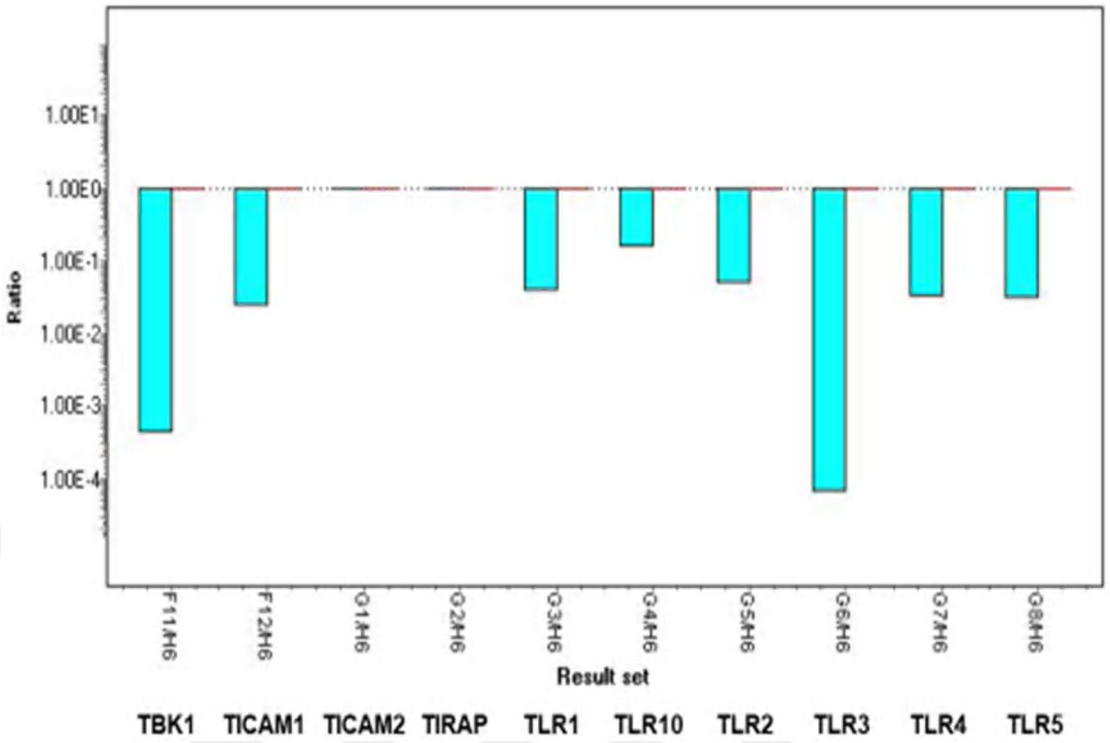
Şekil 104. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2.



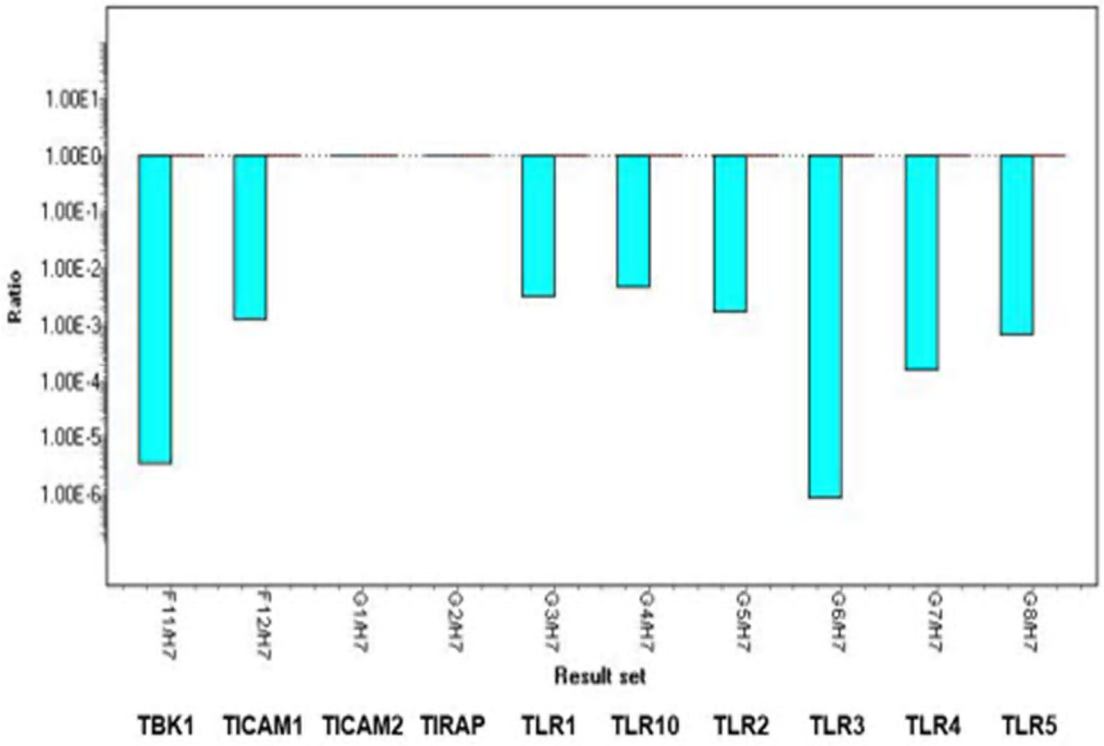
Şekil 105. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2.



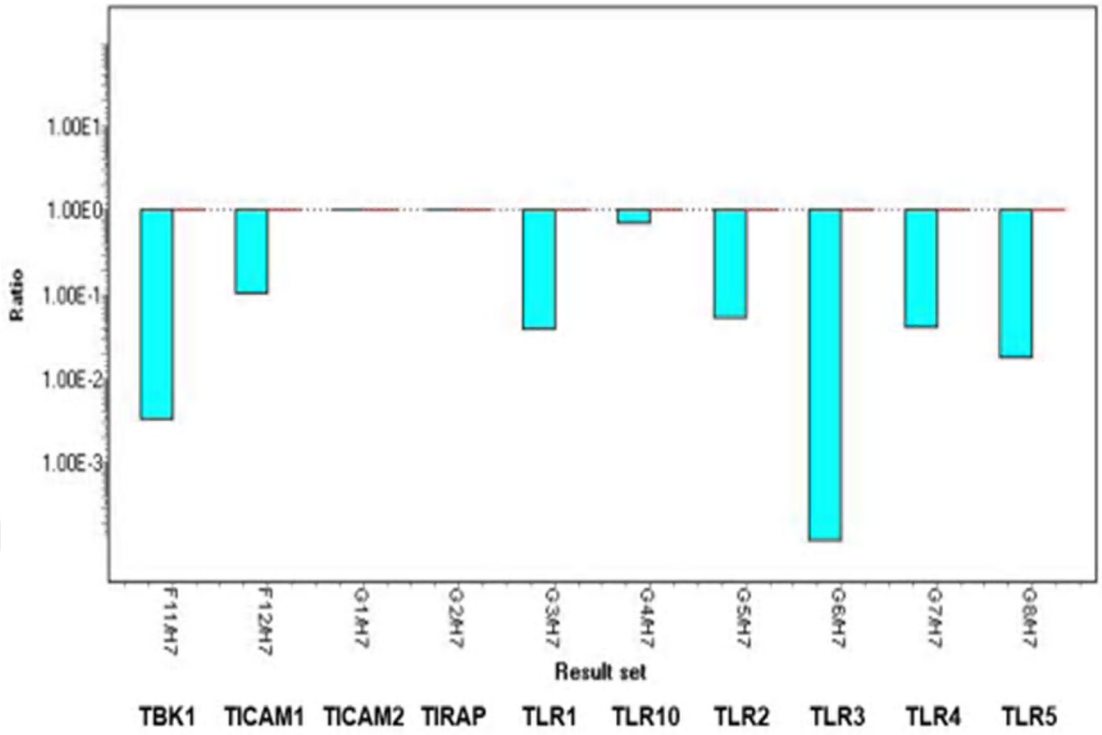
Şekil 106. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, RAC1, RELA, RIPKI, SPP1, STAT1, TAB1, TAB2protein2.



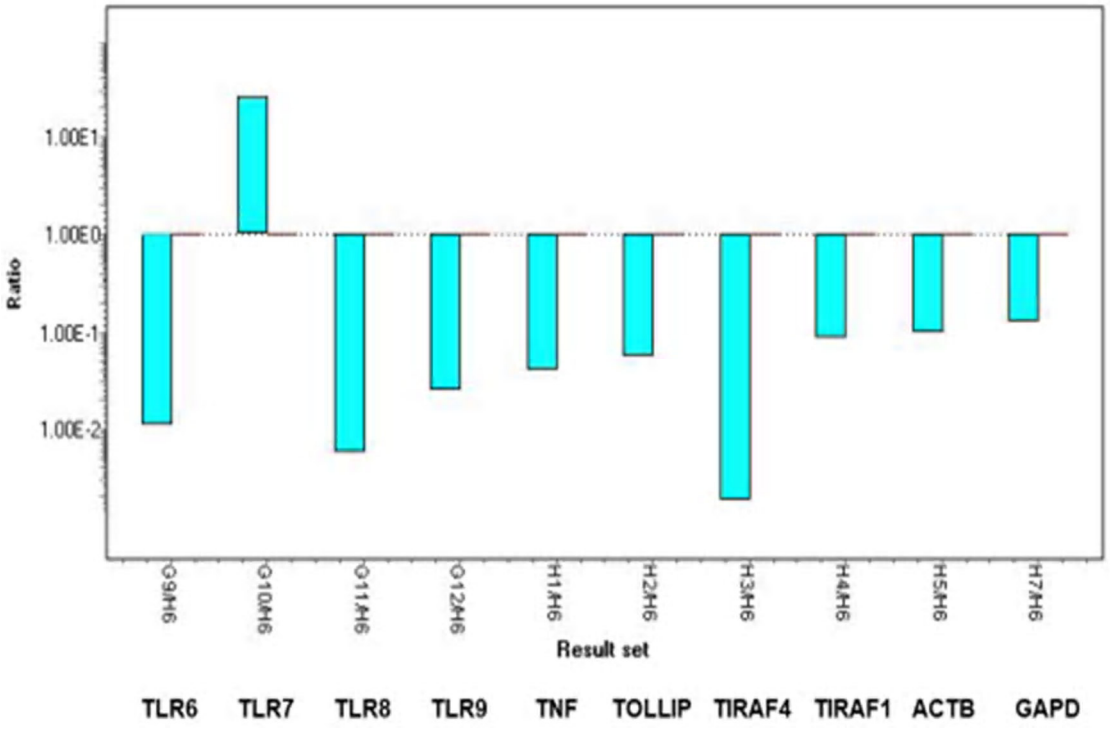
Şekil 107. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5.



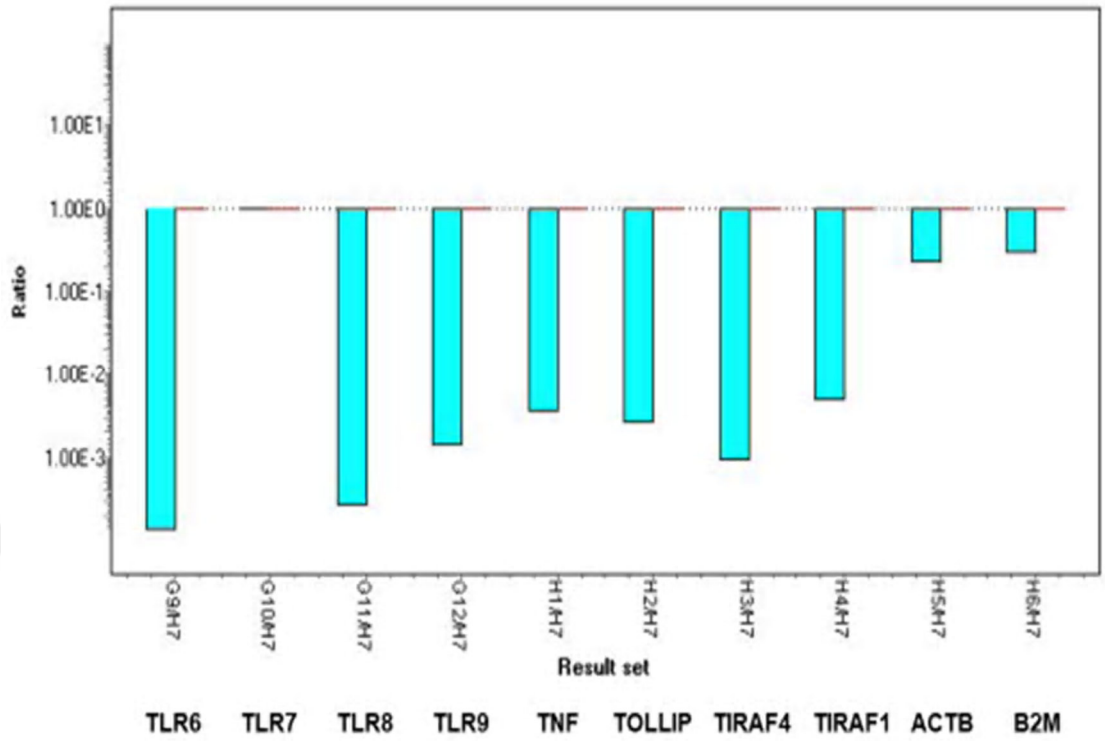
Şekil 108. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5.



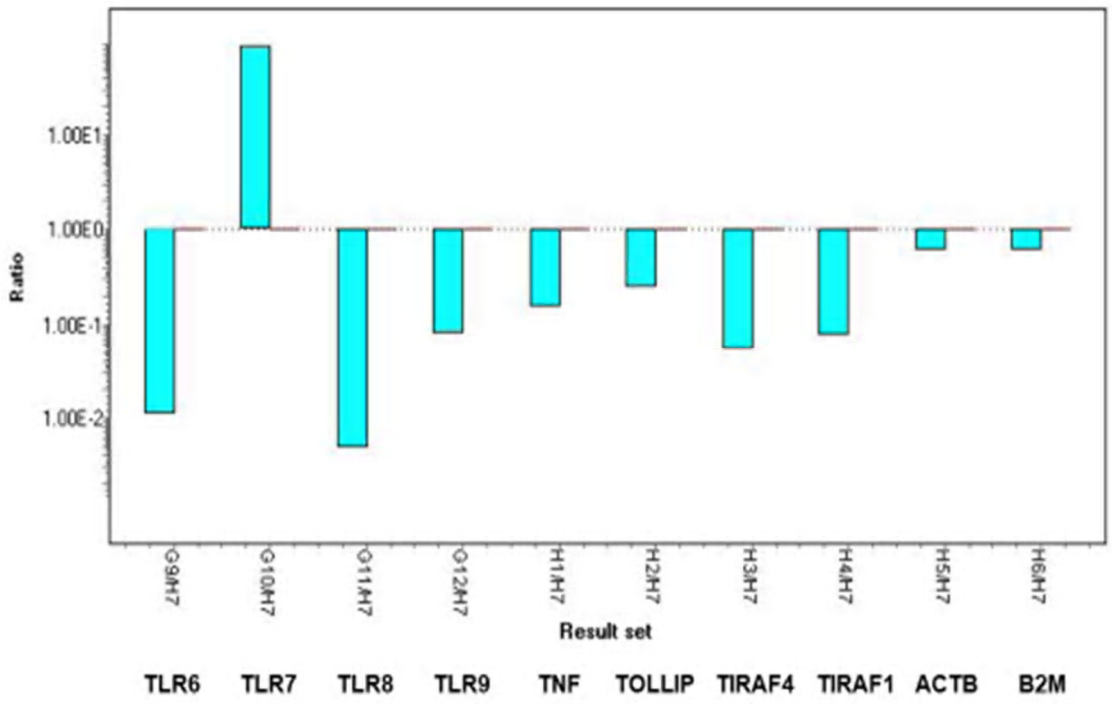
Şekil 109. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TBK1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5.



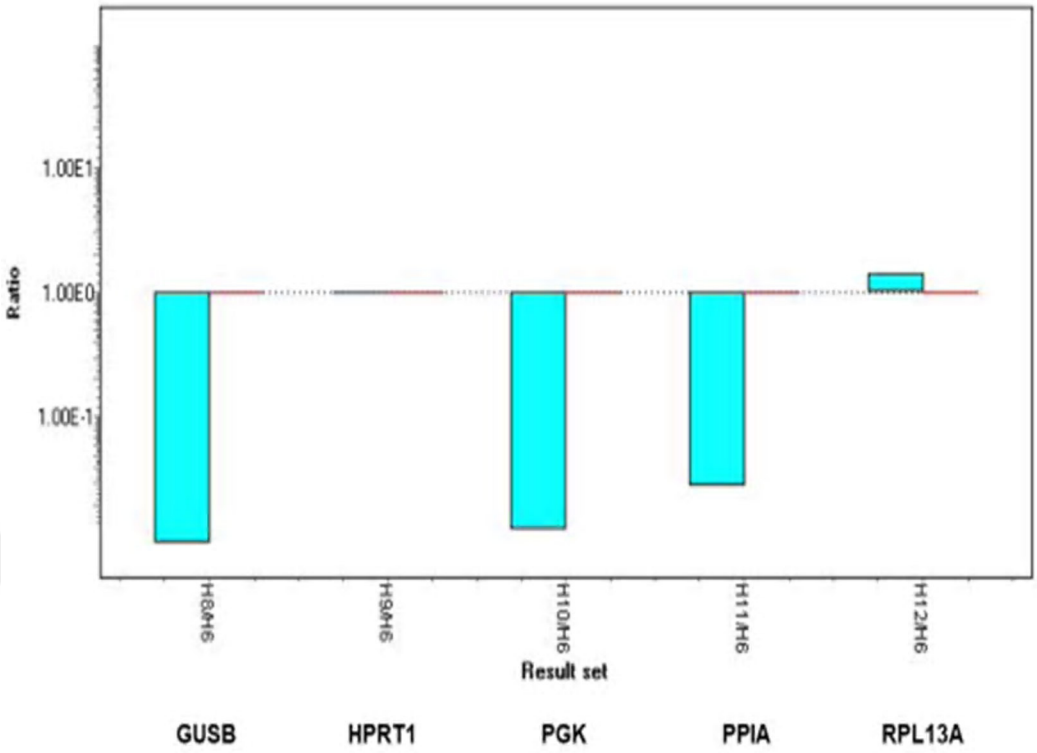
Şekil 110. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, GAPD.



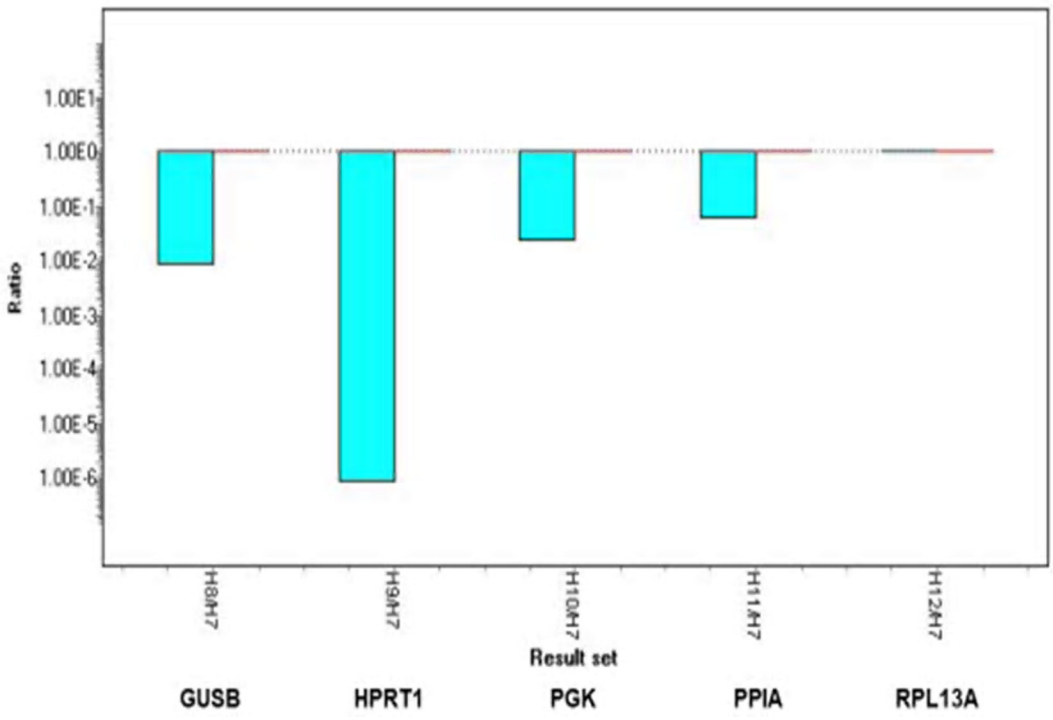
Şekil 111. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M.



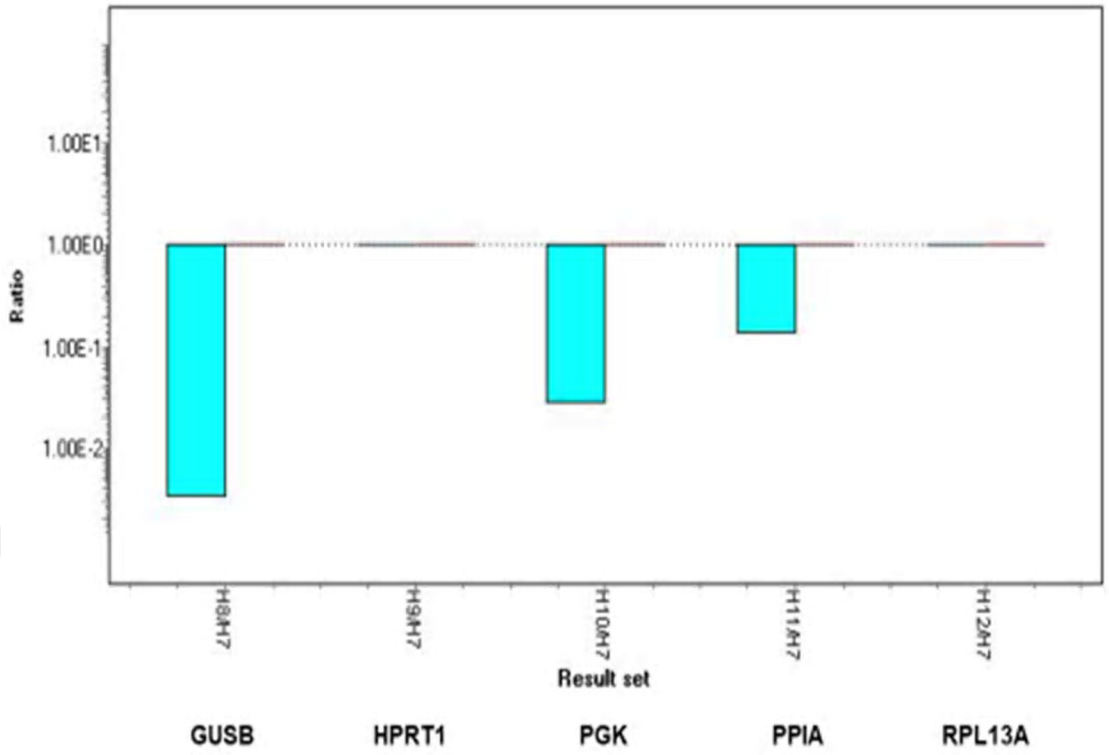
Şekil 112. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TOLLIP, TIRAF4, TIRAF1, ACTB, B2M.



Şekil 113. 72.saatte BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A.



Şekil 114. 72.saatte takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubu hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A.



Şekil 115. 72.saatte NF deney grubunu oluşturan BeWo hücrelerinin relatif kantifikasyon analizi; GUSB, HPRT1, PGK, PPIA, RPL13A.

24, 48 ve 72.saat sonrasında elde edilen veriler sonucunda BeWo hücrelerinden oluşan kontrol grubu ve takizoitler ile enfekte BeWo hücrelerinden oluşan parazit kontrol grubuna göre NF deney grubundaki CHUK, FADD, IKBKB, IL12b, IL6, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK9, MAPK3, MYD88, NFKb1, RAC1, SPP1, STAT1, TLR6 ve TLR8 genlerinde değişiklik gözlemlenmiştir.

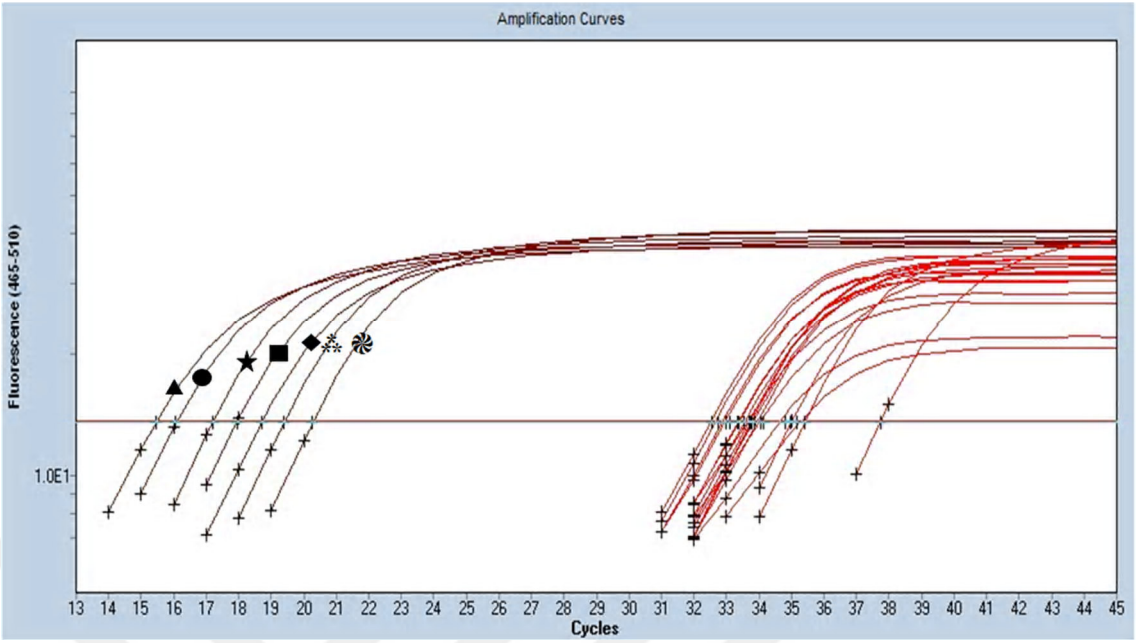
CHUK, FADD, IKBKB, IL12b, IL6, MAP2K1, MAP2K2, MAPK9, MAPK3, MYD88, NFKb1, RAC1 ve STAT1 genlerinin 24.saatten 72.saate kadar kademeli olarak ekspresyon seviyelerinde azalma tespit edilirken MAPK1, SPP1, TLR6 ve TLR8 genlerinde görülen ekspresyon seviyelerindeki azalmaya bağlı olarak ilacın en etkili saat diliminin 48.saat olduğu belirlenmiştir.

Triplike edilen deneyde 24'üncü, 48'inci ve 72'inci saatlerde toplanan örneklerin, klonlanan *T. gondii* B1 geni ile hazırlanan plazmid DNA'sı standart olarak kullanılmış ve parazit yükleri hesaplanmıştır.

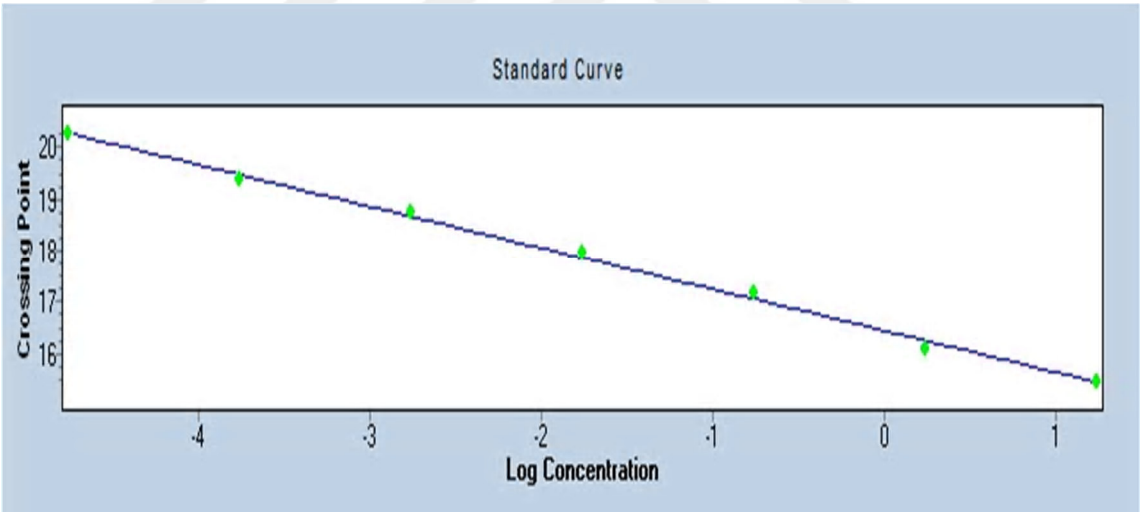
Sulandırılmamış DNA'nın miktarı 0,0175 µg/µl olarak hesaplanmıştır. 10'ar kat sulandırma yapılarak her iki primer için 7 dilüsyon hazırlanmış ve kopya/ml oranları belirlenmiştir (Tablo 6). Seri dilüsyonlardan elde edilen kopya sayılarına göre standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 116 ve Şekil 117). Elde edilen veriler ışığında deney gruplarının pozitiflik oranları belirlenmiştir.

Tablo 6. B1 geni seri dilüsyon verileri.

dilüsyon	B1 primeri	
	Cq değeri	DNA miktarı (µg/µl)
1:1	12.90	$175x10^{-1}$
1:10	13.68	$175x10^{-2}$
1:100	14.85	$175x10^{-3}$
1:1000	15.60	$175x10^{-4}$
1:10000	16.32	$175x10^{-5}$
1:100000	17.19	$175x10^{-6}$
1:1000000	18.09	$175x10^{-7}$



Şekil 116. ▲,1:1oranında dilüsyon,●, 1:10 oranında dilüsyon, *,1:100 oranında dilüsyon, ■,1:1000 oranında dilüsyon, ♦,1:10000 oranında dilüsyon, ⁂, 1:100000 oranında dilüsyon, □, 1:1000000



Şekil 117. Dilüsyonu yapılan örneklerin B1 primerine göre standart eğrisi.

Deney grupları arasındaki parazit yüklerinin değişiminin anlamlılık değerleri Kruskal Wallis H- testi kullanılarak IBM SPSS Versiyon 16.0 istatistiksel paket programı ile belirlenmiştir. Buna göre; üç deney grubundaki parazit yükünün 24 saat sonraki değişim düzeylerinde anlamlı farklılık görülmezken (Tablo 7), 48 ve 72 saat sonra üç deney

grubundaki parazit yükünün değişim düzeylerinde anlamlı farklılık olduğu görülmüştür (Tablo 8 ve Tablo 9).

Tablo 7. Parazitlerin 24 Saat Sonraki Değişimine Göre Kruskal Wallis H- Testi Sonucu

Deney Grupları	n	Sıra Ort	sd	X^2	p	Anlamlı Fark
Parazit kontrol	4	4.75	2	4.902	0.086	3-1,3-2,2-1
NF deneyi	4	5				
Hücre kontrol	4	9.75				

Tablo 8. Parazitlerin 48 Saat Sonraki Değişimine Göre Kruskal Wallis H- Testi Sonucu

Deney Grupları	n	Sıra Ort	sd	X^2	p	Anlamlı Fark
Parazit kontrol	4	7.25	2	8.375	0.015	2-3,2-1,1-3
NF deneyi	4	9.75				
Hücre kontrol	4	2.5				

Tablo 9. Parazitlerin 72 Saat Sonraki Değişimine Göre Kruskal Wallis H- Testi Sonucu

Deney Grupları	n	Sıra Ort	sd	X^2	p	Anlamlı Fark
Parazit kontrol	4	6.75	2	6.038	0.049	2-3,2-1,1-3
NF deneyi	4	9.5				
Hücre kontrol	4	3.25				

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Toksoplasmosis, zorunlu hücre içi protozoon parazit *T. gondii*'nin neden olduğu yaygın bir paraziter hastalıktır. Konjenital toksoplasmosis, fetustan erişkinliğe kadar olan dönemde ciddi sonuçlar doğurmakta olup, insan sağlığı için büyük bir problem teşkil etmektedir. Fetüsün korunmasında plasenta-kan bariyeri önemli bir rol oynamaktadır. Plesanta-kan bariyerinin rolünün anlaşılması özellikle konjenital toksoplasmosisin engellenmesi için önem arz etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, plasenta trofoblastlarının direkt olarak toksoplasmosis patogenezinde rol aldığını göstermektedir (Franco ve ark., 2011). Gebeliğin immunolojisinde, hücre içi parazitlerle enfeksiyonda özellikle trofoblast hücrelerinin görevi, BeWo hücre hatları gibi insan koriokarsinom hücreleri kullanılarak incelenmektedir (Franco ve ark., 2011). BeWo hücreleri, insan koriokarsinomundan türetilmekte ve maternal fetal arayüzde *T. gondii* enfeksiyonunun araştırılması için *in vitro* insan trofoblast modeli olarak kullanılmaktadır. Normal trofoblastlarla ortak morfolojik özelliklere sahip olan bu hücreler, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α ve makrofaj göçü inhibe edici faktör (MIF) sitokinlerinin salgılanmasını da gerçekleştirmektedir (Franco ve ark., 2011). *T. gondii* genotipleri ile enfekte edilen BeWo hücrelerinin azitromisin tedavisine karşı standart tedavide kullanılan antibiyotiklere göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Ribeiro ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada, BeWo hücrelerinin *T. gondii*'ye olan yüksek duyarlılığın, immunomodülasyon mekanizmalarına bağlı olabileceğini bildirilmiştir. Trophoblast hücrelerinin gebelik için elverişli bir plasental mikro ortam oluşturmadaki rolünün, plasental dokularda enfeksiyonu kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (Barbosa ve ark., 2014; Carvalho ve ark., 2010). Dolayısıyla, bu tez çalışmasında da plasental bir mikroortam oluşturulmak amacıyla BeWo hücre hattı kullanılarak *T. gondii* takizoitleri ile enfekte edilmesi gerektiği düşünülmüş ve trofoblast enfeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Enfeksiyonun kronik ve akut döneminde makrofajlar, dentritik hücreler ve nötrofiller gibi bağışıklık sistemi hücrelerinden sitokinler ve kemokinler salınmaktadır. Bu sitokin ve kemokinlerin salınımı TLR bağımlı sinyal mekanizması ile gerçekleşmektedir. Günümüzde kongenital bulaşmada bu adaptör moleküller ve onların izledikleri yolaklar hakkında pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, kullanılacak ilaçların toksitelerinin belirlenmesi ve immun cevabın oluşması sırasında meydana gelen yolaklara ait reaksiyonların araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Doğuştan gelen immun reseptörlerin repertuarı çok geniştir ve TLR'ler bu immun reseptör grubu içerisinde yer almaktadır. Çok sayıdaki farklı tanıma molekülleri olan TLR'ler karbonhidratlar, lipitler, nükleik asitler ve proteinler dahil çeşitli mikrobiyal moleküllerin tespit edilmesinde görev almaktadırlar. TLR'ler adaptif immun yanıtların kontrolüne doğrudan dahil olmalarından dolayı doğal immun sistemin temel elemanları gibidirler (Yarovinsky ve ark., 2006). Fakat ilginç bir şekilde, *T. gondii*, bağışıklık sistemini başarılı bir şekilde atlatmak, manipüle etmek ve konak hücrelerinde enfeksiyon oluşturmak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir (Lima ve Lodoen, 2019). IL-12, *T. gondii* enfeksiyonuna cevap olarak üretilen konak mediatörüdür. Bu sitokin, dendritik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller tarafından sentezlenerek, IFN-γ üretiminde anti-mikrobiyal efektör hücreleri aktive eden çok önemli bir rol oynamaktadır (Yarovinsky, 2008). Hamile ve immun sistemi baskılanmış bireylerde toksoplasmozis tedavisi önemlidir (Montoya ve Liesenfeld, 2004). Spiramisin fetal enfeksiyonu önlemek için hamilelik sırasında enfekte olmuş kadınlarda kullanılmaktadır. Çünkü spiramisin, düşük fetal doku penetrasyonuna rağmen plasental dokularda yüksek konsantrasyonlara kadar ulaşmaktadır (Kaye, 2011). Eğer fetal enfeksiyon doğrulanmışsa, anneye sülfadiazin, pirimetamin ve folik asit kombinasyonu içeren bir tedavi verilmektedir (Montoya ve Remington, 2008). Fakat yaygın olarak kullanılan sülfadiazin ve pyrimetamin toksik etkiye sahiptir ve yan etkilere neden olabilmektedir (Kaye, 2011; Montoya ve Remington, 2008). Toksoplasmosis tedavisi veya profilaksisi için önerilen ilaçlar, nötropeni, lökopeni, ağır trombosit sayısı azalması, trombositopeni ve aşırı duyarlılık reaksiyonları gibi ciddi yan etkilere sebep olmaktadır (Porter ve Sande, 1992; Montazeri ve ark., 2015). Bunun yanı sıra bu ilaçlar agranülositoz, Stevens-Johnson sendromu, toksik epidermal nekroliz ve toksoplasmosisli hastalarda

ölümcül olabilen hepatik nekroza da sebebiyet verebilmektedirler (McLeod ve ark., 2006). Retrospektif bir derlemede, prymetamin, sülfadiazin ve lökovorin ile tedavi edilen hastaların % 62'sinde, % 44 oranında terapötik rejimde değişiklik gerektiren yüksek toksisite ve birçok yan etki görülmüştür (Porter ve Sande, 1992). NF'nin toksoplasmosisle mücadelede kullanılan etkin dozajının uyardığı TLR yolağındaki moleküllerin bilinmesi, hastalığın tedavisinde alternatif bir yöntem olarak bu moleküller üzerinden etki eden, daha az yan etkili ve geniş kullanım alanlı yeni preparatların geliştirilebileceği hipotezini doğurmuştur. Bu nedenle bu çalışmada, *T. gondii* ile enfekte insan trofoblastik koriokarsinom hücresi olan BeWo hücre hattında, doğal bağışıklık ile kazanılmış bağışıklık sistemleri arasında önemli rol oynayan TLR ait sinyal yolağına gebelerde kullanılabilen nitrofurantoinin (NF) etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde yukarıda belirtilen çalışmalar gibi pek çok çalışma mevcuttur. Ancak, BeWo hücreleri ile *in vitro* ortamda gerçekleştirilen ve anti-Toxoplasma etkinliğini TLR yolağındaki hangi genlere etki ederek gösterildiğinin açıklanması bu tez çalışması ile ortaya konmuştur.

Nitrofurantoin düşük polariteli bir bileşik olup sudaki çözünürlüğü düşüktür. Bu nedenle nitrofurantoin dimetilformamid (DMF) veya dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülebilmektedir (Wijma ve ark., 2019). Çalışmamızda da stok solüsyonlarımızın hazırlanmasında ve konsantrasyonlarımızın hazırlanmasında DMSO kullanılmıştır. Bunun yanında kristal yapıda olan ilacın çözünmesini artırmak için ısıdan da yararlanılmıştır. Nitrofurantoin eski bir antibiyotik olarak komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Eski yıllardaki popülaritesi, mikroorganizmalar arasındaki çoklu ilaç direncinin artması sebebiyle yeniden gündeme gelmektedir (Wijma ve ark., 2019). Yaygın olarak kullanılmasına rağmen nitrofurantoinun direnç oranları hala düşüktür. Nitrofurantoin için komplike olmayan İYE'nunda % 90'a kadar pozitif klinik sonuçlar elde edilmiştir (Wijma ve ark., 2019). Aynı zamanda nitrofurantoinun asemptomatik bakteriüride sıklıkla tercih edilen güvenilir bir ilaç olduğu ve gebelikte kullanılabilecek ilaçlar arasında yer aldığı belirtilmektedir. Son zamanlarda ilaç dirençlerinin artmasıyla ortaya çıkan antibakteriyel aktivitesindeki ve toksisitesindeki belirsizliğin çözülmesi gereken problemler olduğu belirtilmektedir (Wijma ve ark., 2019).

İnsan trofoblast hücrelerinde ve üçüncü trimesterden alınan insan villöz eksplantlarında, enrofloksasin ve tolrazurilinin, *T. gondii* enfeksiyonu üzerindeki etkinliğinin araştırılması için yapılan bir çalışmada *in vitro* model olarak insan koriokarsinomu trofoblastik hücreleri (BeWo hücre hattı) kullanılmıştır (da Silva ve ark., 2017). Enrofloksasin ve toltrazuril açısından düşük konsantrasyonlarda hücre ve villöz canlılığını azaltmadığı belirtilmiştir. Her iki ilacın da, tedavi edilmeyen koşullara göre parazitin hücre içi proliferasyonunda azalma meydana getirdiği gösterilmiştir. Fakat ilaçların takizoit yapısına zarar verirken uygun olmayan parazitlerin sayısının ise arttırdığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak bu antibiyotiklerin çeşitli sitokinlerin uyarımını yaparak hücrelerde ve takizoitlerde etki ettiği bildirilmiştir (da Silva ve ark., 2017). Ayrıca *T. gondii* suşlarının ilaca dirençli formlarının oluşması ve insan hastalığına zararlı etkilerinin meydana gelmesi konusunda ileride tedavi başarısızlığına yönelik bir endişeleri ortaya koymaktadır (Porter ve Sande, 1992). Son deneysel çalışmalar toksoplasmozise karşı ilaç direncinin olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, hastalığı kontrol etmede ilaç direnci mekanizmalarını anlamak oldukça önemlidir. Parazite ait hedefleri belirlemede, hangi ilaç veya ilaç kombinasyonlarının birlikte kullanılması gerektiğine olanak sağlar. Bu nedenle *T. gondii*'deki ilaç direnci mekanizmalarının anlaşılması, özellikle konjenital toksoplasmosis ve immun sistemi baskılanmış hastalar arasında hastalığın kontrol altına alınmasında önemli rol oynamaktadır (Montazeri ve ark., 2018). Yapılan bir çalışmada NF'nin, *in vitro* ve *in vivo* olarak anti-*T. gondii* etkileri incelenmiştir. Çalışmada *T.gondii* ile enfekte HeLa hücrelerinde NF ve primetaminin anti-toksoplasmosis etkilerine bakılmıştır. 5, 10, 20 ve 40 μM konsantrasyonları kullanılmıştır. *T. gondii*' ye karşı NF'nin EC_{50} değeri 14,7 μM, HeLa hücreleri için ise 33,1 μM olarak hesaplanmıştır. *T. gondii* ile enfekte olmuş dişi ICR farelerde nitrofurantoin kullanımına bağlı olarak, *T. gondii* enfeksiyonunun indüklediği ve karaciğer hasarının göstergesi olan biyokimyasal-hematolojik parametrelerden serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, çalışmayla NF'nin potansiyel bir anti-Toksoplasmosis preparat olduğu ve klinik olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Yeo ve ark., 2016). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, yukarıdaki çalışma bulgularıyla paralellik göstermiş ve NF'nin anti-Toksoplasmozis preparat olarak kullanılabileceği sonucunu desteklemiştir.

Çalışmamızda ayrıca uygun ilaç konsantrasyonunun TLR yolağına etkinliğinin belirlenmesi için 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç ayrı deney grubu oluşturularak ilaç etkinliğine ait TLR yolak mekanizmasının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. NF'nun besiyeri ortamında yüksek konsantrasyonlar yerine düşük konsatrasyonlarda daha iyi çözündüğü ve takizoitler üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Giemsa boyama yöntemi ile yapılan hücre morfoloji deneyi ve tripan blue boyama yöntemi ile yapılan hücre canlılık deneyleri sonucunda invert mikroskopta yapılan inceleme sonrasında 1,25 µM'lık ilaç konsantrasyonunda, normal morfolojili BeWo hücrelerin tüm yüzeyi kaplamış olduğu, takizoit sayısının parazit kontrole göre daha az olduğu ve ebat olarak büyüyerek morfolojilerinin değiştiği görülmüştür. Canlı hücre ve takizoit sayısı tüm konsantrasyonlar için hesaplanmış ve en iyi hücresel canlılık oranı yine 1,25 µM konsantrasyonda tespit edilmiştir. BeWo hücrelerinin, 24 saat sonra 1,25 µM konsantrasyondaki canlılık oranı % 80, takizoitlerin ise % 40 olarak hesaplanmıştır. MTS testi ile IC_{50}= 1,339 µM, EC_{50}= 1,239 µM değerleri elde edilmiş ve BeWo hücleri için toksik olmayan ilaç konsantrasyonu 1.25 µM olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada (Lee ve ark., 2008) anti-TLR2 ve anti-TLR4 transfekte edilerek immunsupresifleştirilen HEK-293 hücrelerinde *T. gondii* lizatı veya LPS'leri ile uyarımı sonrasında TLR 2 ve TLR 4 ekspresyonları aracılıyla NF-κβ aktivasyonu ile IL-8 üretimi gözlenmiştir. Başka bir deneysel toksoplasmosis modelinde ise, özellikle TLR aracılı *T. gondii*'nin tanınmasının kanıtı olan non-lenfoid IFN-γ kaynağının varlığını ortaya konmuştur (Sturge ve ark., 2013). Aynı zamanda çalışmada Rekombinasyon Aktivatör Gen 2 ve IL-2Rγc genlerindeki eksiklikler nedeniyle lenfoid hücrelerden yoksun olan genetiği değiştirilmiş farelerin protozoon parazite karşı cevap olarak IFN-γ ürettiği belirtilmiştir. Parazit ile enfekte edilmiş TLR11 knockout farelerde nötrofillerin seçici olarak yok edilmesi, IFN- γ eksikliği olan farelerde gözlenen şekilde akut duyarlılığa neden olduğu belirtilmiştir. Bu sebeple, IFN-γ'nın üretiminde, nötrofillerin lenfoidal TLR'den bağımsız olarak patojenlere karşı konağın korunmasında çok önemli olduğu vurgulanmaktadır (Sturge ve ark., 2013). *T. gondii*-profilin benzeri ligand olan TLR11, farelerde tanımlanan bir reseptör olmasına rağmen insanlarda TLR11 geninin fonksiyonel bir görevi yoktur. Salazar Gonzalez ve ark., (2014)'nın yaptıkları bir çalışmada, insan ve fare türleri arasında çoklu dizi hizalama filogenetik analiz programını kullanmışlar ve insan TLR5'in, fare TLR11 ile ilgili olarak TLR gen ailesi

içinde evrimsel olarak birbirine yakın üyeler olduğu belirtmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada insan TLR5 reseptörünün *T. gondii*-profilin benzeri liganda karşı IL-6, IL-8 ve IL-12p70 cevabı da araştırılmıştır. Sonuç olarak, hem insan hücre hattında hem de periferik kan monositlerinde sitokinlerin üretiminin olduğu görülmüştür. Bunun yanında, TLR5 geni üzerindeki R392X mutasyonunu taşıyan periferik kan monositlerinin *T. gondii*-profilini ile stimüle edildikten sonra yanıt olarak sitokinleri üretemediği de gösterilmiştir (Salazar Gonzalez ve ark., 2014). Kim ve ark., (2006) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *T. gondii* ile enfekte edilen fare makrofajlarının, MAPK aktivasyonu gerçekleştirdiği ve IL-12 üretimine neden olduğu fakat hücre sinyal yolaklarının net olarak tanımlanmadığı belirtilmektedir. Bu nedenle, virülansı yüksek RH suşu tip I *T. gondii* takizoitlerinin oluşturduğu enfeksiyona karşı virülansı düşük ME49 suşu tipi II takizoitlerin oluşturduğu enfeksiyon karşılaştırılmış ve immun yanıtta meydan gelen makrofaj sinyal yolakları incelenmiştir (Kim ve ark., 2006). Tip II ile enfekte hücrelerin, tip I ile enfekte hücrelerden 2-3 kat daha fazla sitokin salgılamasına rağmen, her iki suşa ait takizoitlerin p38 MAPK'ya bağlı makrofaj IL-12 salımını indüklemiş olduğu gözlemlenmiştir. Tip I'in neden olduğu IL-12 salgısı, MyD88 bağımsızken, Tip II'in neden olduğu IL-12 üretimi TLR / IL-1R adaptör moleküllerine ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir. MyD88'in, tip I ile uyarılan p38 MAPK aktivasyonu için gerekli olmadığı belirtilirken, tip II ile uyarılan p38 MAPK aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Konak sinyal yollarındaki farklılıkların yüksek ve düşük virülans özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Kim ve ark., 2006). Diğer bir çalışmada da, *T. gondii*'nin fonksiyonel MyD88'e sıkı bir şekilde bağlı olarak nötrofil IL-12 ve kemokin ligand 2 (CCL2; monosit kemoatraktan protein 1) üretimini tetiklediği düşünülmektedir. Ayrıca TLR2'nin CCL2 üretimini tetikleyen bir reseptör olarak tanımlanmakta fakat parazite bağlı IL-12 üretiminin TLR'ye bağımlı olmadığı belirtilmektedir. IL-12 ve CCL2'nin üretiminin ise IFN-γ ile nötrofil aktivasyonundan sonra ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra IFN-γ'nın IL-12 üzerindeki sinerjistik etkisinin CCL2'ye bağlı olmadığı STAT1 sinyal transdüksiyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir (Del Rio ve ark., 2004). Yapılan son çalışmalar, *T. gondii* enfeksiyonuna karşı oluşan immun yanıtta adaptör molekül olan TRAF 6'nın TLR sinyal yolaklarında rol aldığını göstermektedir. Bu yolakta hem NF-κβ hem de mitojenle aktifleştirilen protein kinazın (MAPK) aktivasyonuna katılan serin/treonin kinazlarla birleştiği

belirtilmiştir. *Toksoplasma* lizat antijenine (STAg) cevap olarak IL-12 üretimine katılan hücre içi sinyal yollarını aydınlatmak için, yabani tip ve TRAF6 knockout fareler STAg ile aşılanarak IL-12 (p40) üretimi belirlenmiştir. TRAF6 knockout farelerin, STAg'ye yanıt olarak IL-12 (p40) üretemedikleri ve STAg ile uyarılan TRAF6 knockout makrofajların da IL-12 (p40) üretemedikleri görülmüştür. Böylece IL-12'nin (p40) üretiminin TRAF6 ve p38 MAPK'ya bağlı olduğunu gösterilmiştir (Mason ve ark., 2004).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar kapsamında; (a) apoptatik yolakların tümünde mediatör moleküller olan MYD88 ve FADD moleküllerinin; (b) mitokondrial hasara bağlı apoptozda etkinleşen MAP-kinaz gen ailesi üyeleri olan MAP2K1, MAP2K2, MAPK9, MAPK3 moleküllerinin; (c) inflamasyon sonrası makrofaj uyarımını sağlayarak fagositozu tetikleyen sitokinler olan IL-12b, IL-6 moleküllerinin; (d) özellikle *T. gondii* enfeksiyonu sonrası seviyesi artarak hücrede intrinsik faktörlerin uyarımı ile pro-apoptotik genlerin aktivasyonunu sağlayan STAT1 molekülünün; (e) TNF aracılı hücresel ölümün ara basamaklarında bulunan CHUK, RAC1, IKBKB moleküllerinin gen ekspresyon seviyelerinde NF ile muamele edilen hücrelerde anlamlı oranda değiştiği RT-qPCR sonrası analizlerde tespit edilmiştir. Bu genlerin 24. saatten 72. saate kadar kademeli olarak ekspresyon seviyelerinde azalma tespit edilirken, MAPK1, SPP1, TLR6 ve TLR8 genlerinde görülen ekspresyon seviyesindeki azalmaya bağlı olarak ilacın en etkili saat diliminin 48. saat olduğu görülmüştür. Dolayısıyla *T. gondii* takizoitlerinin enfeksiyon sonrası TLR'lerce hücresel tanınmayla başlattığı apoptotik sürecin NF ile muamele sonrası inhibe edildiği tespit edilmiştir. Böylece NF'nin *T. gondii* ile enfeksiyon sonrası aktive olan TLR yolağına etki ederek enfeksiyonu hangi genler üzerinden inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca Nitrofurantoin'nin hücre kültüründe takizoitler üzerinde 24 saatten sonra anlamlı düzeyde letal etkisi olduğu istatistiksel olarak da gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile;

1) Nitrofurantoin'nin *in vitro* kültür ortamında *T. gondii* ile enfekte BeWo hücreleri ile etkileşimi sonrasında gelişen spesifik immun yanıtta rol alan TLR' ler ve yolakla ilişkili diğer moleküller hakkında özgün veriler elde edilmiştir.

2) Karaciğer üzerine toksik etkisinin az olduğu bilinen Nitrofurantoin'nin toksoplasmosis tedavisinde etkin bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

3) Nitrofurantoin'nin etkin dozajının uyardığı moleküllerin belirlenmiş olması, gelecekte toksoplasmosisin tedavisinde kullanılabilecek daha az yan etkili, geniş kullanım alanlı yeni preparatların geliştirilmesi ile ilgili yapılacak çalışmalara model ve temel oluşturacaktır.

6. KAYNAKLAR

Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E. Transmission of Toxoplasma gondii in an urban population of domestic cats (Felis catus). Int J Parasitol, 2006; 36;(13): 1373-1382.

Altıntaş K. Tıbbi genel parazitoloji ve protozooloji. Nobel tıp kitapevi Ltd.Şti, Ankara, 1997:171-192, 272-4.

Babur C, Yağci S, Sert H, Yaman N, Ates C, Karaer Z. Serodiagnosis of toxoplasmosis in horses at the Serum Production Stud Farm of the Ministry of Health's Refik Saydam Hygiene. Etlik Vet Mikrobiol Derg, 1997;9 1-5.

Barbosa BF, Paulesu L, Ietta F, Bechi N, Romagnoli R, Gomes AO, Favoreto-Junior S, Silva DA, Mineo JR, Mineo TW, Ferro EA. Susceptibility to Toxoplasma gondii proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. Placenta, 2014; 35(3): 152-162.

Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Risk factors for Toxoplasma infection in pregnancy: a case-control study in France. Scand J Infect Dis, 1999; 31(3): 305-309.

Blume M, Seeber F. Metabolic interactions between Toxoplasma gondii and its host. 2018; F1000Res 7.

Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. Structure, 2011; 19(4): 447-459.

Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F. Congenital parasitic infections: a review. Acta Trop, 2012; 121(2): 55-70.

Carvalho JV, Alves CM, Cardoso MR, Mota CM, Barbosa BF, Ferro EA, Silva NM, Mineo TW, Mineo JR, Silva DA. Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to Neospora caninum infection. Int J Parasitol, 2010; 40(14): 1629-1637.

Chaudhry SA, Gad N, Koren G. Toxoplasmosis and pregnancy. Can Fam Physician, 2014; 60(4): 334-336.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. Bmj, 2000; 321(7254): 142-147.

da Silva RJ, Gomes AO, Franco PS, Pereira AS, Milian ICB, Ribeiro M, Fiorenzani P, Dos Santos MC, Mineo JR, da Silva NM, Ferro EAV, de Freitas Barbosa B. Enrofloxacin and Toltrazuril Are Able to Reduce Toxoplasma gondii Growth in Human BeWo Trophoblastic Cells and Villous Explants from Human Third Trimester Pregnancy. Front Cell Infect Microbiol, 2017; 7: 340.

Del Rio L, Butcher BA, Bennouna S, Hieny S, Sher A, Denkers EY. Toxoplasma gondii triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors. J Immunol, 2004; 172(11): 6954-6960.

Diakoua A, Papadopoulos E, Panousis N, Karatzias C, Giadinis N. Toxoplasma gondii and Neospora caninum seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. Vet Parasitol, 2013; 198(3-4): 387-390.

Dubey JP. Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. Int J Parasitol, 1998; 28(7): 1019-1024.

Dubey JP. The history of Toxoplasma gondii--the first 100 years. J Eukaryot Microbiol, 2008; 55(6): 467-475.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clin Microbiol Rev, 1998; 11(2): 267–299.

Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. High levels of congenital transmission of Toxoplasma gondii in a commercial sheep flock. Int J Parasitol, 2001;31(14): 1699-1703.

Eldem T, Hıncal AA. Nıtrofurantoin. FABAD J, Pharm. Sci, 1987; 12: 170-178.

Erdogan E, Yuruk M, Sivcan E, Karaca S, Temel H, Sabanoglu T, Gultekin A, Sahin I. Retrospective evaluation of serologic and molecular test results of toxoplasmosis suspected patients. Mikrobiyol Bul, 2019; 53(1): 96-105.

Fallahi S, Rostami A, Nourollahpour Shiadeh M, Behniafar H, Paktinat S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of Toxoplasma gondii infection. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2018; 47(3): 133-140.

Ferguson DJ. Toxoplasma gondii and sex: essential or optional extra?. Trends Parasitol, 2002; 18(8): 355-359.

Franco PS, Gomes AO, Barbosa BF, Angeloni MB, Silva NM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by Toxoplasma gondii but are able to control infection. Placenta, 2011; 32(11): 838-844.

Frenkel JK. Pathophysiology of toxoplasmosis. Parasitol, 1988; 4: 273- 278.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993; 90(13): 6115-6119.

Georgiev VS. Management of toxoplasmosis. Drugs, 1994; 48(2): 179-188.

Grossman PL, Remington JS. The effect of trimethoprim and sulfamethoxazole on Toxoplasma gondii in vitro and in vivo. Am J Trop Med Hyg, 1979; 28(3): 445-455.

Gürüz AY, Delibaş SB. Tıbbi ve Veteriner İmmünoparazitoloji. İzmir, Meta Basım, 2007; 167-191.

Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. Handb Clin Neurol, 2013; 114: 125-145.

Ho-Yen DO J.A. Human Toxoplasmosis. Oxfort Medical Publishing, 1992.

shttps://www.cdc.gov/dpdx/toksoplasmozis/index.html. Erişim tarihi: 29.10.2019.

http://tr.fengchengroup.org/pharmaceutical-api/antibiotics/china-nitrofurantoin-suppliers-china.html. Erişim tarihi: 29.10.2019.

İnci A, Aydin N, Babür C, Çam Y, Akdoğan C, Kuzan Ş. Kayseri Yöresinde Sığır Ve Koyunlarda Toxoplasmosis Ve Brucellosis Üzerine Seroepidemiyolojik Araştırmalar. Pendik Vet Mikrobiol Derg, 1999; 30(1): 41-46.

İnci A, Babür C, Aydin N, Çam Y. The Investigation on the Seroprevalence of Toxoplasma gondii (Nicolle ve Manceaux, 1908) and Listeria monocytogenes in Equids Around Kayseri. FU Sağ Bil Derg, 2002; 16: 181-185.

İnci A, Babur C, Karaer Z. Detection of anti-Toxoplasma gondii antibodies using Sabin-Feldman dye test in horses in military farm in Gemlik. Turkiye Parazitol Derg, 1996; 20 417-419.

İnci A, Bişkin Z. Toll-like reseptörler ve protozoon enfensiyonlarındaki rolleri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg, 2007; 121-128.

İnci A, Babür C, Dinçer Ş, Erdal N. Türkiye'nin Bazı Illerinde Evcil Kanatlılarda Sabin-Feldman Boya Testi Ile Anti-Toxoplasma Gondii Antikorlarının Saptanması. Turkiye Parasitol Derg, 1998; 22(4): 420-423.

İnci A, Doğanay M, Özdağrendeli A, Düzlü Ö, Yıldırım A. Türkiye'de zoonotik Hastalıklara Genel Bakış: Tek Sağlık Konsepti ve Gelecek Tehditler. Türkiye Parazitol Derg, 2018;42: 39-80.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol, 2002; 20: 197-216.

Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. Nat Rev Immunol, 2011; 12(1): 35-48.

Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. Exp Parasitol, 2010; 124(1): 10-25.

Kara H. Konjenital toksoplazmozun tanısında PCR'ın kullanılması ve IFAT sonuçlarıyla karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1997.

Kato K. How does Toxoplama gondii invade host cells?. J Vet Med Sci, 2018; 80(11): 1702-1706.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol, 2010; 11(5): 373-384.

Kim K, Weiss LM. Toxoplasma gondii: the model apicomplexan. Int J Parasitol, 2004; 34(3): 423-432.

Kim L, Butcher BA, Lee CW, Uematsu S, Akira S, Denkers EY. Toxoplasma gondii genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. J Immunol, 2006; 177(4): 2584-2591.

Koloren Z, Dubey JP. A review of toxoplasmosis in humans and animals in Turkey. Parasitology, 2019; 1-17.

Kuman HA, Altıntaş N. Protozoon Hastalıkları. Ege Üni. Basım. S. 1996; 112-141.

Kundakcı A, Pirat A. Toll Benzeri Reseptörler Toll Benzeri Reseptörler. Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi, 2012; 10: 63-73.

Lau YL, Lee WC, Gudimella R, Zhang G, Ching XT, Razali R, Aziz F, Anwar A, Fong MY. Deciphering the Draft Genome of Toxoplasma gondii RH Strain. PLoS One, 2016; 11(6): e0157901.

Lee EJ, Heo YM, Choi JH, Song HO, Ryu JS, Ahn MH. Suppressed production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated macrophages after treatment with Toxoplasma gondii lysate. Korean J Parasitol, 2008; 46(3): 145-151.

Leport C, Remington JS. Toxoplasmosis in AIDS. Presse Med, 1992; 21(25): 1165-1171.

Lima TS, Lodoen MB. Mechanisms of Human Innate Immune Evasion by Toxoplasma gondii. Front Cell Infect Microbiol, 2019; 9: 103.

Linday DS, Dubey JP, Blagborn NL. Examination of tissue cyst formation by Toxoplasma gondii in cell cultures using bradizoits, tachizoits and sporozoits. J Parasitol, 1991; 77: 126-132.

Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of Toxoplasma gondii. Parasit Vectors, 2015; 8: 292.

Mason NJ, Fiore J, Kobayashi T, Masek KS, Choi Y, Hunter CA. TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin-12 by macrophages in response to Toxoplasma gondii." Infect Immun, 2004; 72(10): 5662-5667.

Meireles LR, Ekman CC, Andrade HF Jr, Luna EJ. Human Toxoplasmosis Outbreaks and the Agent Infecting Form. Findings from a Systematic Review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2015; 57(5): 369-376.

Meissner M, Reiss M, Viebig N, Carruthers VB, Toursel C, Tomavo S, Ajioka JW, Soldati D. A family of transmembrane microneme proteins of Toxoplasma gondii contain EGF-like domains and function as escorters. J Cell Sci, 2002; 115(Pt 3): 563-574.

Montazeri M, Mehrzadi S, Sharif M, Sarvi S, Shahdin S, Daryani A. Activities of anti-Toxoplasma drugs and compounds against tissue cysts in the last three decades (1987 to 2017), a systematic review. Parasitol Res, 2018; 117(10): 3045-3057.

Montazeri M, Mehrzadi S, Sharif M, Sarvi S, Tanzifi A, Aghayan SA, Daryani A. Drug Resistance in Toxoplasma gondii. Front Microbiol, 2018; 9: 2587.

Montoya JG, Remington JS, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Toxoplasma gondii. Principles and practice of Infectious Diseases, 2000; 5th ed.: 2858-2881.

Nicolle C, Manceaux LH. On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. 1908. Int J Parasitol, 2009; 39(8): 863-864.

O'Neill LA, Bryant CE, Doyle SL. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. Pharmacol Rev, 2009; 61(2): 177-197.

Özcan K. Toxoplasma gondii. Tıbbi parazitoloji ders ve laboratuar notları, Adana 1998: 64-73.

Özcel MA. Özcelin Tibbi Parazit hastalıkları. Toxoplasmosis. 2007; 141-184.

Pfefferkorn ER. Cell Biology of Toxoplasma gondii. Modern Parasite Biology. Ed. Wyler, D. Freeman and Co. New York. 1996; 26-50.

Pittman KJ, Aliota MT, Knoll LJ. Dual transcriptional profiling of mice and Toxoplasma gondii during acute and chronic infection. BMC Genomics, 2014; 15: 806.

Ribeiro M, Franco PS, Lopes-Maria JB, Angeloni MB, Barbosa BF, Gomes AO, Castro AS, Silva RJD, Oliveira FC, Milian ICB, Martins-Filho OA, Ietta F, Mineo JR, Ferro EAV. Azithromycin treatment is able to control the infection by two genotypes of Toxoplasma gondii in human trophoblast BeWo cells. Exp Parasitol, 2017; 181: 111-118.

Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev, 2012; 25(2): 264-296.

Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. Curr Opin Microbiol, 1999; 2(4): 426-432.

Salazar Gonzalez RM, Shehata H, O'Connell MJ, Yang Y, Moreno-Fernandez ME, Chougnet CA, Aliberti J. Toxoplasma gondii-derived profilin triggers human toll-like receptor 5-dependent cytokine production. J Innate Immun, 2014; 6(5): 685-694.

Saygı G, Miman Ö. Temel Tıbbi Parazitolojisi. Toxoplasma gondii. İstanbul Tıp Kitabevleri, 2018; 110-118.

Stagno S, Dykes AC, Amos CS, Head RA, Juranek DD, Walls K. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. Pediatrics, 1980; 65(4): 706-712.

Sturge CR, Benson A, Raetz M, Wilhelm CL, Mirpuri J, Vitetta ES, Yarovinsky F. TLR-independent neutrophil-derived IFN-gamma is important for host resistance to intracellular pathogens. Proc Natl Acad Sci USA, 2013; 110(26): 10711-10716.

Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Darde ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. Globally diverse Toxoplasma gondii isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proc Natl Acad Sci USA, 2012; 109(15): 5844-5849.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. Toxoplasma gondii: from animals to humans. Int J Parasitol, 2000; 30(12-13): 1217-1258.

Turul T, Ersoy F. Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: Toll-like reseptörler (TLR). Hacettepe Tıp Dergisi, 2004; 114-118.

Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitoloji. 5. Baskı. 1995; 601-620.

Wijma RA, Fransen F, Muller AE, Mouton JW. Optimizing dosing of nitrofurantoin from a PK/PD point of view: What do we need to know?. Drug Resist Updat, 2019; 43: 1-9.

Wujcicka W, Wilczynski J, Nowakowska D. Do the placental barrier, parasite genotype and Toll-like receptor polymorphisms contribute to the course of primary infection with various Toxoplasma gondii genotypes in pregnant women?. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014; 33(5): 703-709.

Yarovinsky F. Toll-like receptors and their role in host resistance to Toxoplasma gondii. Immunol Lett, 2008;119(1-2): 17-21.

Yarovinsky F, Kanzler H, Hieny S, Coffman RL, Sher A. Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response. Immunity, 2006; 25(4): 655-664.

Yarovinsky F, Sher A. Toll-like receptor recognition of Toxoplasma gondii. Int J Parasitol, 2006; 36(3): 255-259.

Yeo SJ, Jin C, Kim S, Park H. In Vitro and in Vivo Effects of Nitrofurantoin on Experimental Toxoplasmosis. Korean J Parasitol, 2016; 54(2): 155-161.

Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. Immunol Rev, 2015; 265(1): 156-171.

TOXOPLASMA GONDII İLE ENFEKTE İNSAN TROPHOBLASTİK HÜCRELERİNİN (BEWO) TOLL-LIKE RESEPTÖR YOLAĞINA NİTROFURANTOİNİN ETKİSİ

ORIJINALLIK RAPORU

%6	%	%6	%
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	İNCİ, Abdullah and BİŞKİN, Zuhal. "Toll-like reseptörler ve protozoon enfeksiyonlarındaki rolleri", Erciyes Üniversitesi, 2007. Yayın	%2
2	"Cytotoxic T-Cells", Springer Nature, 2014 Yayın	%1
3	Aycan Kundakcı, Arash Pirat. "Toll Benzeri Reseptörler", Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi, 2012 Yayın	<%1
4	Mendes, M.E.. "Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells", Immunobiology, 201103 Yayın	<%1
5	selek, mehmet, tugba atik, bayhan bektore, hakan erdem, orhan baylan, and mustafa ozyurt. "A Case of Pneumonia and Bacteriamia	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER
Adı Soyadı : Eda SİVCAN
Uyruğu : Türkiye (T.C.)
Doğum Tarihi ve Yeri : 09.02.1989 / KAYSERİ
Medeni Durum : Bekar
Tel : 541 837 01 55
E-mail : edasvcn_38@hotmail.com.
Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı 38039 Talas/ KAYSERİ.

Öğrenim durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Tıbbi Parazitoloji AD	Erciyes Üniversitesi	2015
Lisans	Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji	Erciyes Üniversitesi	2011
Lise	75.Yıl Cumhuriyet Lisesi	Kayseri	2006

Bilimsel Kuruluşa Üyelikler:
Türkiye Parazitoloji Derneği
Türkiye Hidatidoloji Derneği
Türkiye Mikrobiyoloji Derneği

YABANCI DİL:
İngilizce