

Türkiye’de İzole Edilen İki Farklı *Toxoplasma gondii* Suşundan Üretilen Adjuvanlı Takizoit Eriyik Protein Aşılarının Uyardığı İmmün Yanıtların Karşılaştırılması

Comparison of Immune Responses Elicited by Adjuvanted Tachyzoite Lysate Vaccines Developed from Two Different *Toxoplasma gondii* Strains Isolated in Turkey

Ceylan POLAT¹, Sultan GÜLÇE İZ², Mert DÖŞKAYA³, Hüseyin CAN⁴, Ayşe CANER³, Aysu DEĞİRMENÇİ³, Erdal BALCAN⁵, Yüksel GÜRÜZ³

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

² Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir.

² Ege University Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, İzmir, Turkey.

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

³ Ege University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, İzmir, Turkey.

⁴ Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁴ Ege University Faculty of Science, Department of Molecular Biology, İzmir, Turkey.

⁵ Celal Bayar Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Manisa.

⁵ Celal Bayar University Faculty of Science, Department of Biology, Manisa, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 09.08.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 20.10.2012

ÖZET

Toxoplasma gondii, çok geniş konak aralığında, sıcak kanlı hayvanlarda ve kuşlarda enfeksiyon oluşturabilen zorunlu hücre içi bir parazittir. İnsanlarda *T.gondii* enfeksiyonu, yeni doğanlarda fetal anomali-lere yol açan konjenital toksoplazmoz, körlüğe sebep olan retinokoroidit, immün sistem yetmezliği olan kişilerde fatal seyreden toksoplazmik ensefalit ve organ nakli yapılanlarda organ reddi ve ölüme sebep olmaktadır. Farklı *T.gondii* suşlarının hayvan modellerinde uyardıkları immün yanıtı bağli olarak, oluşturdukları patogeneze de değişiklik göstermektedir. Toksoplazmoza karşı korunmada hücreyel immün yanıtın daha önemli olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada, ülkemizde izole edilen *T.gondii* Ankara ve Ege suşlarından üretilen adjuvanlı takizoit protein aşılarının hayvan modellerinde uyardığı humoral ve hücreyel immün yanıt tiplerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 6-8 haftalık dişi BALB/c fareler kullanılmış ve aşılama için her biri üç adet fare içeren altı grup oluşturulmuştur. Birinci ve ikinci grup *T.gondii* Anka-

İletişim (Correspondence): Dr. Sultan Gülçe İz, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 35100 Bornova, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 388 4955, **E-posta (E-mail):** sultangulce@gmail.com

ra ve Ege (TAnkPE; TEgePE) takizoit eriyiği ile, üçüncü ve dördüncü grup Freund adjuvanı ile birleştirilmiş TAnkPE (TAnkPE-Freund) ve TEgePE (TEgePE-Freund) takizoit eriyiği ile, kontrol grupları olan beşinci ve altıncı gruplar ise PBS ve Freund adjuvanı ile aşılanmıştır. Hayvanların immünizasyonu üç hafta aralıklarla iki kez yapılmıştır. Aşılama öncesi ve her aşılama sonrası alınan serum örneklerinde Western blot yöntemiyle IgG yanıtı, ELISA testi ile IgG1 ve IgG2a yanıtları araştırılmıştır. Hücrel immün yanıtları belirlemek için, hücre kültürü ortamında uyarılan dalak hücrelerinin CD8/CD4 oranı, hücre içi IFN- γ ve IL-4 sitokinleri akış sitometrisi ile ölçülmüştür. Çalışmamızda, *Toxoplasma* IgG antikorları sadece TAnkPE-Freund aşısı uygulanan grupta saptanmış; IgG1 ve IgG2a antikor yanıtlarının hiçbir aşılama grubunda artmadığı tespit edilmiş, IgG1 veya IgG2a yönünde belirgin bir polarizasyon olmadığı belirlenmiştir. Aşılanan grupların hiçbirisinde uyarılmış dalak hücrelerinde CD8/CD4 oranında değişiklik saptanmamıştır. IFN- γ üretimi sadece TAnkPE-Freund ile aşılanan grupta artarken; IL-4 üretimi TAnkPE-Freund, TEgePE-Freund ve TEgePE ile aşılanan gruplarda artmıştır. Çalışmamızın verileri, TAnkPE-Freund aşısının BALB/c farelerinde IgG ve IFN- γ yanıtlarını artırdığını göstermiş, ancak toksoplazmoza karşı geliştirdiğimiz bu eriyik protein aşısının koruyucu immün yanıtı yeterince uyarmadıkları saptanmıştır. Bu nedenle ileride yapılacak olan aşı çalışmalarında daha özgül proteinlerin kullanılması yönünde kanaat oluşmuştur.

Anahtar sözcükler: *Toxoplasma gondii*; takizoit proteini; aşı; adjuvan; immün yanıt.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii the causative agent of toxoplasmosis is an obligate intracellular parasite with a wide host range including all warm-blooded animals and birds. *T.gondii* infection causes congenital toxoplasmosis in newborns and this may lead to fetal anomalies, retinochoroiditis leading to blindness, lethal toxoplasmic encephalitis in immune compromised patients, and organ failure in transplantation patients. The pathogenesis of toxoplasmosis change due to differences in the specific immune response elicited by diverse *T.gondii* strains. The protective immunity against toxoplasmosis is conferred by cellular immune responses. In the present study, two different strains isolated from Turkey named *T.gondii* Ankara and Ege were used to evaluate the types of humoral and cellular immune responses elicited by adjuvanted tachyzoite protein vaccines in an animal model. In the study, 6-8 weeks old female BALB/c mice were used and six study groups (each contains three mice) were composed for vaccination. The first and second groups were vaccinated with *T.gondii* Ankara and Ege (TAnkPE and TEgePE, respectively) tachyzoite lysates, the third and fourth groups were vaccinated by tachyzoite lysates adjuvanted with Freund's adjuvant (TAnkPE-Freund; TEgePE-Freund, respectively). The fifth and sixth groups were vaccinated with PBS and Freund's adjuvant as controls. Immunization of the animals was performed two times at three weeks intervals. The serum samples were collected before vaccination and after each vaccination to determine the IgG response by Western blotting, and IgG1 and IgG2a responses by ELISA. To determine the cellular immune response, CD8/CD4 cell ratio, intracellular IFN- γ and IL-4 levels were determined in stimulated spleen cells grown in cell culture systems by flow cytometry. Toxoplasma IgG antibodies were only detected in TAnkPE-Freund group. IgG1 and IgG2a responses did not increase in any vaccination groups and there was not any polarization towards IgG1 or IgG2a. There was no significant increase in CD8/CD4 ratio of stimulated spleen cells. IFN- γ level was increased in only TAnkPE-Freund vaccination group, however IL-4 levels were increased in TAnkPE-Freund, TEgePE-Freund and TEgePE groups. Our data showed that TAnkPE-Freund vaccine led to increase in IgG and IFN- γ responses in BALB/c mice, however, tachyzoite lysate vaccines developed in this study did not induce sufficient protective immune response against toxoplasmosis. Thus, use of specific immunogenic proteins must be taken into consideration in the future vaccine development studies against toxoplasmosis.

Key words: *Toxoplasma gondii*; tachyzoite protein; vaccine; adjuvant; immune response.

GİRİŞ

Dünya popülasyonunun yaklaşık üçte birini enfekte ettiği tahmin edilen *Toxoplasma gondii*, tıbbi önemi yüksek bir protozoondur. Bu parazit, geniş konak spektrumu nedeniyle insanların yanı sıra sıcakkanlı hayvanların da birçoğunu enfekte etmektedir. Enfeksiyonun bulaşı, kontamine su ve besinler ya da çiğ/az pişmiş etlerin tüketimi, kan nakli, organ nakli ve transplasental geçiş gibi çok farklı yollarla olabilmektedir¹.

T.gondii enfeksiyonlarının patogeneğinde, parazit suşunun virülansı, parazitin konağa giriş miktarı, konağın cinsiyeti, genetik yapısı ve immünolojik durumu gibi birçok faktör etkilidir. *T.gondii* suşları arasında virülans farklılıkları olduğu bilinmektedir. Bu farklılıklar nedeniyle bazı suşlar yavaş çoğalırken, bazıları daha hızlı çoğalmakta, hatta konağın ölümüne yol açmaktadır. *T.gondii*’nin oluşturduğu patogene ve enfeksiyona karşı oluşan korunmada bu farklılıkların etkili olduğu bildirilmiş; aynı zamanda bu farklılıkların parazitin konak hücrede oluşturduğu immün yanıtta da rol oynadığı ileri sürülmüştür²⁻⁴. Enfeksiyon sırasında *T.gondii*’ye karşı hücresel ve humoral immünite oluşmakla birlikte, hücre veya kist içindeki parazitlerin kaldığı görülmüştür. Kuvvetli ve etkili bir immün yanıt, *T.gondii*’nin periferik kandan tamamıyla ortadan kalkmasına ve tüm dokulardaki takizoit miktarının önemli ölçüde azalmasına yol açmaktadır. İmmün sistemi sağlam kişilerde kazanılan immünitenin ömür boyu sürdüğü saptanmıştır. Toksoplazmoza karşı gelişen hücresel immünitenin, Th1 ve özellikle CD8⁺ T hücreler tarafından oluşturulduğu ve bu yanıtta IL-12’nin anahtar rolü oynadığı görülmüştür^{2,3,5,6}. Bununla birlikte, virülan *T.gondii* suşlarına karşı korunmanın daha da geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Türkiye’de günümüze kadar RH Ankara ve Ege suşları olmak üzere sadece iki suş izole edilmiştir. Bu çalışmada virülansları farklı olan bu iki suşun oluşturduğu hücresel ve humoral immünite farklılıklarına bağlı olarak immünopatogeneindeki yolların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Hayvanları

Çalışmada, toksoplazmoza karşı aşı çalışmalarında kullanılan 6-8 haftalık dişi BALB/c fareler kullanıldı ve hayvanlar Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Bornova Veteriner Araştırma Merkezinden temin edildi. Çalışmasının deneysel planı, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı.

T.gondii Eriyik Protein Hazırlanması

T.gondii RH Ankara ve Ege suşu takizoitleri, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalından temin edildi. BALB/c fareler için enfektif dozdaki (1×10^6 /ml’lik stoktan 100 µl veya 1×10^5 takizoit) *T.gondii* RH Ankara veya Ege suşu takizoitleri, 6-8 haftalık BALB/c farelerin peritoneal boşluğuna inoküle edildi. Farelerin intraperitoneal alanında 3-4 günde çoğalan *T.gondii* takizoitleri steril şartlarda serum fizyolojik irrigasyonu sonrası alındı ve takizoitlerin canlılığı ve sayısı %0.4 tripan mavisi ile hemositometre kullanılarak belirlendi.

Intraperitoneal alandan elde edilen *T.gondii* takizoitleri 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi; üst sıvı atıldıktan sonra çökelti 10 ml tuzlu fosfat tampon (PBS; pH: 7.4) eklenerek 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Bu işlem iki kez daha uygulandı. Üçüncü yıkama sonrası üst sıvı, tüpün dibinde 1 ml PBS (pH: 7.4) bırakılacak şekilde atıldı ve tekrar sulandırıldı. *T.gondii* RH Ankara ve Ege takizoitlerini içeren süspansiyonlardaki takizoit sayısı hemositometre kullanılarak hesaplandı. Bu aşamada takizoit süspansiyonları 13.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi; üst sıvı atıldı ve çökeltilerin üzerine ortalama 500 µl distile su eklendi. Daha sonra takizoit süspansiyonları sonikatörde hazırlandı; elde edilen hücre eriyikleri, 13.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst sıvılar, por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçirildi. *T.gondii* RH Ankara takizoitlerine ait protein eriyiği (TAnkPE) ve *T.gondii* Ege takizoitlerine ait protein eriyiği (TEgePE) içerisindeki protein miktarı, "Commasie Plus Protein Assay Reagent" (Pierce) ve spektrofotometre ile (NanoDrop) üretici firmanın protokolü kullanılarak Bradford testi ile saptandı. Standart eğrinin belirlenmesi için seri sulandırılmış BSA (Pierce) kullanıldı.

Bu işlemler sonucunda elde edilen, *T.gondii*'nin iki farklı suşuna ait eriyik proteinleri (TAnkPE ve TEgePE) hem aşılama denemelerinde hem de hümmoral immünitenin değerlendirildiği ELISA ve "Western blot (WB)" testlerinde kullanıldı.

Aşılama ve Enfekte Etme

Çalışma için, her biri üçer adet fare içeren dört aşı ve iki kontrol grubu oluşturuldu ve hayvanlar TEgePE, TEgePE-Freund, TAnkPE ve TAnkPE-Freund aşıları ile intraperitoneal (İP) olarak üç hafta aralıklarla iki defa aşılandı. TEgePE ve TAnkPE aşıları, 100 µl steril 1_PBS içinde bulunan 33 µg TEgePE ve 33 µg TAnkPE proteinleri olarak üç hafta aralıklarla iki defa uygulandı⁷. TEgePE-Freund ve TAnkPE-Freund aşıları ise, 50 µl steril 1 x PBS içinde bulunan 33 µg TEgePE ve 33 µg TAnkPE proteinlerinin aynı miktar Freund'un tam adjuvanı ile birleştirilmesi ve sonikatörde karıştırılması ile hayvanlara uygulandı. İkinci aşılama adjuvan değiştirildi ve Freund'un yarım adjuvanı ile birleştirilen aynı miktar protein içeren aşılar kullanıldı.

Negatif kontrol fareleri iki gruba ayrılarak ilk gruba İP yoldan 50 µl Freund adjuvanı ile 50 µl steril 1 x PBS karıştırılıp sonike edildikten sonra; ikinci aşılama ise 50 µl Freund'un yarım adjuvanı ile 50 µl steril 1 x PBS karıştırılarak uygulandı. Diğer gruba ise 100 µl steril 1 x PBS uygulandı. Kuyruk kanları her aşılama 3 hafta sonra toplandı.

IgG Yanıtının Değerlendirilmesi

Bu amaçla, sodyum dodesil sülfat (SDS)-poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve WB yöntemleri kullanıldı. Hazırlanan eriyik antijenler TEgePE ve TAnkPE, 2x örnek tamponu ile karıştırıldıktan sonra ısı bloğunda inkübe edildi ve antijenler %12'lik SDS poliakrilamid jelinde ayrıştırıldı. SDS-PAGE sonunda proteinleri ayrıştırılmış antijen örnekleri bulunan %12'lik jeller, polivinilidinden florid (PVDF) transfer membranı ile karşı karşıya getirildi. Proteinler, jelden PVDF transfer membranına doğru transfer tampon (25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 metanol) içerisinde transfer edildi.

Transfer sonrasında PVDF membranı, %6.25 yağsız süt tozu içeren 1 x TBS-T tamponunda (20 mM Tris-Cl pH: 7.8, 0.5 M NaCl, %0.5 Tween) 20-30 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak bloke edildi. Daha sonra boyuna kesilen PVDF membranlar, 1/100 oranında 1 x TBS-T tamponunda sulandırılan, aşılanmış farelerden alınan havuzlanmış serum örnekleri ile 1.5 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi. PVDF transfer membranı 1 x TBS-T tamponu ile 3 kez kısa süreli ve 3 kez de üçer dakika yıkandı ve daha sonra 1 x TBS-T tamponunda 1/2500 oranında sulandırılmış konjugat (alkalen fosfat ile işaretli anti-fare IgG antikor) ile bir saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi. Inkübasyon sonrası membran önce 1 x TBS-T, sonra da 1 x TBS tamponu ile 3’er kez kısa süreli ve 3’er kez de üç dakika olacak şekilde yıkandı. Blotların görüntülenmesi için, PVDF membranı üzerine substrat [250:2:1 oranında karıştırılan dietanolamin tampon (%10 dietanolamin, 0.5 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; pH: 9.8), NBT (nitroblue tetrazolium chloride), BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)] eklendi ve karanlık ortamda 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra distile su ile reaksiyon durduruldu.

IgG Alt Gruplarının Belirlenmesi

Bu amaçla enzim temelli immünolojik yöntem (ELISA) kullanıldı. Hazırlanan eriyik antijenler TEgePE ve TAnkPE, PBS (pH: 7.4) ile son konsantrasyonu 4.75 µg/ml olacak şekilde sulandırıldı ve ELISA mikropiplarının her bir çukuruna 100 µl olacak şekilde eklendi. Antijenle kaplanan plaklar, çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. Farelere ait serum örnekleri sulandırma plağında kazein tampon ile 4:1000 oranında sulandırıldı ve inkübasyon sonunda antijen içeriği boşaltılan plağın her bir çukuruna 100 µl sulandırılmış serum örneği eklendi. Her serum örneği, için çift çukur kullanıldı. Plaklar oda sıcaklığında 30 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edildikten sonra içerikleri boşaltıldı ve otomatik yıkayıcıda 3 kez 200 µl PBS (pH: 7.4) ile yıkandı. Daha sonra her bir çukura 100 µl, 1:2500 oranında kazein tampon ile sulandırılmış konjugat (peroksidaz ile işaretli anti-fare IgG1 ve IgG2a antikorları) eklendi; 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi ve yukarıda anlatıldığı şekilde yıkama tekrarlandı. Bu kez her bir çukura 10:1 oranında karıştırılan TMB tampon (70.4 mM Na_2HPO_4 , 36.4 mM sitrik asit, %7 dimetilasetamid, %0.016 H_2O_2 , distile su) ve TMB stok (0.1 mM 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin, %4 dimetilasetamid; pH: 2) solüsyonundan 100’er µl eklendi. Plak, karanlık ortamda 45 dakika bekletildikten sonra reaksiyon, her çukura 75 µl 2N sülfürik asit eklenerek durduruldu. ELISA plak okuyucusu ile 450 nm dalga boyunda absorban değerleri (AD) ölçüldü. Serum örneklerinden elde edilen AD, negatif kontrollere ait AD (+) 3x standart sapma üzerine çıktığında, örnek pozitif kabul edildi.

Hücresel İmmün Yanıtın Değerlendirilmesi

Antijene özgül hücresel immün yanıtın değerlendirilmesi amacıyla öncelikle tek hücre süspansiyonları hazırlamak için farelerden steril şartlarda alınan dalaklar, PBS tampona eklendi ve iki buzlu mikroskop lamı arasında homojenize edildi. Dalak hücreleri, 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve hücreler 1 ml kırmızı kan hücre yıkıcı solüsyon (15 mM NH_4Cl , 10 mM $KHCO_3$, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) ile tekrar süspanse edilip, 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 5 ml PBS eklendi, 1500

rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı atılarak hücrelerin üzerine 10 ml üretim besiyeri [1 x RPMI 1640, %10 fetal buzağı serumu, 55 µM 2-merkaptoetanol, 1 mM sodyum piruvat, 0.1 mM MEM esansiyel olmayan aminoasit, 2 mM L-glutamin, penisilin (100 U/ml) ve streptomisin (100 µg/ml)] eklendi. Hücrelerin canlılığı ve miktarı tripan mavisi ve hemositometre ile saptandı. Yuvarlak tabanlı 96 çukurlu plakların her bir çukuruna 5×10^5 canlı hücre ve 100 µl üretim besiyeri eklendi. Dalak hücreleri uyarılmadan önce antijendeki endotoksin miktarının azaltılması amacıyla TEgePE ve TANKPE proteinlerine 50 µg/ml son konsantrasyonda polimiksin B ilave edildikten sonra yarım saat inkübe edildi. Hücreler kinetik incelemelerden sonra 25 µg/ml oranında uyarıldı.

Pozitif kontrol olarak her çeşit aşılardan ve kontrol gruplarından elde edilen hücreler, konkanavalin A (Biochrom) ile son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde inkübe edildi. Negatif kontrol olarak sadece 200 µl üretim besiyeri kullanıldı. Her bir çukurda bulunan hücreler, toplam 200 µl üretim besiyeri içerisinde %5 CO₂ ve 37°C'lik ortamda 96 saat inkübe edildi. Deneyin son 4 saatinde ortalama 10⁶ dalak hücresi içeren her bir çukura 2 µM Monensin (GolgiStop, Becton Dickinson Biosciences, ABD) kimyasalı eklendi.

CD4 ve CD8 yüzey antijenlerinin incelenmesi: Dalak hücrelerindeki CD4 ve CD8 yüzey antijenleri "Cytotfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit" (BD Biosciences, ABD) ile üretici firmanın protokolüne göre boyandı. Inkübasyon sonrasında hücre kültürü plağı 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve ortalama 10⁶ dalak hücresi, aynı anda boyama için 50 µl boyama tamponu içerisinde sırasıyla 1/50 ve 1/20 oranında sulandırılan FITC ile konjuge rat anti-fare CD4 antikoları ve PE ile konjuge edilmiş rat anti-fare CD8a antikoları ile 30 dakika 4°C'de inkübe edildi. Inkübasyon sonrası iki kez 250 µl boyama tamponu ile yıkanan hücreler, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, üst sıvı atıldı, 100 µl fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonunda tekrar süspansiyon edilerek 20 dakika 4°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler iki kez 250 µl Perm/Wash tamponu ile yıkandı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak hücreler 500 µl boyama tamponunda sulandırıldı. Yüzey antijenlerinin akış sitometrisi ile belirlenmesi için, BD FACSAria (BD Biosciences, ABD) cihazından 10⁴ dalak hücresi geçirilerek, CD4 ve CD8 reseptör içeren hücreler belirlendi ve elde edilen veriler BD FACSDiva programı (BD Biosciences, ABD) ile analiz edildi.

Hücre içi sitokinlerin incelenmesi: Dalak hücrelerine ait hücre içi sitokinlerin boyanması için Monensin ile inkübasyon sonrasında hücre kültürü plağı, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı. Daha sonra plağın her bir deliğine 100 µl fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonu eklenerek tekrar sulandırılan hücreler, 20 dakika 4°C'de inkübe edildi. Hücreler bu süre sonunda iki kez 250 µl Perm/Wash tamponu ile yıkandı ve ortalama 10⁶ dalak hücresi, ayrı ayrı 50 µl boyama tamponları içerisinde 1/20 oranında sulandırılan PE ile konjuge edilmiş rat anti-fare IFN-γ ve IL-4 (Becton Dickinson Biosciences, ABD) antikoları ile 30 dakika 4°C'de inkübe edildi. Bu süre sonunda hücreleri iki kez 250 µl boyama tamponu ile yıkandı, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, üst sıvılar atılarak 500 µl boyama tamponunda sulandırıldı. Hücre içi sitokinlerin akış sito-

metrisi ile belirlenmesi için, BD FACSAria cihazından 10^4 dalak hücresi geçirilerek, IFN- γ ve IL-4 salgılayan hücreler belirlendi ve elde edilen veriler BD FACSDiva programı ile analiz edildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler, Microsoft Excel 2000 programı ile işlendi ve istatistiksel analiz Prism 3.03 programı (GraphPad, ABD) ile yapıldı. Aşılama grupları arasındaki farkı değerlendirmek için “Two-tailed unpaired t test” veya %95 güvenlik aralığı bulunan “one-way” varyans analizi kullanıldı. Hümorale ve hücresel immün yanıt sonuçları, aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi; $p \leq 0.05$ değeri anlamlı olarak yorumlandı.

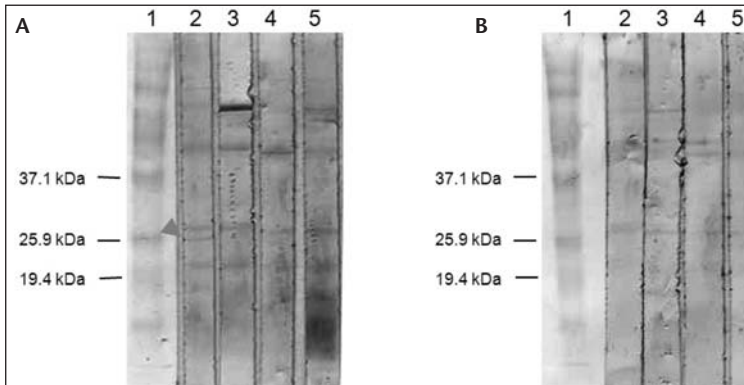
BULGULAR

Aşılama ile Oluşan IgG Yanıtı

TEgePE, TEgePE-Freund, TANKPE ve TANKPE-Freund aşıları uygulanan deney ve kontrol grubu farelere ait serum örnekleri WB yöntemi ile değerlendirildiğinde; elde edilen bant paternlerine göre TEgePE, TEgePE-Freund ve TANKPE aşıları ile kontroller arasında değişiklik saptanmamıştır. TANKPE-Freund aşısında ise diğerlerinden farklı olarak ortalama 25 kDa büyüklüğünde bir bant gözlenmiştir (Şekil 1).

Aşılama ile Oluşan IgG Alt Grupları

Aşılamaların sonucunda farelerde Th1 veya Th2 yanıtının oluştuğunun işareti olan özgün IgG1 ve IgG2a antikorlarının polarizasyonu araştırılmıştır. *T. gondii*’ye ait iki farklı suşun genotipleri farklı olduğundan TEgePE, TEgePE-Freund, TANKPE ve TANKPE-Freund aşıları uygulanan deney ve kontrol grubu farelerden alınan serum örneklerinde IgG alt grup yanıtı TEgePE ve TANKPE antijenleri kullanılan ayrı ELISA testleri ile değerlendirilmiştir.



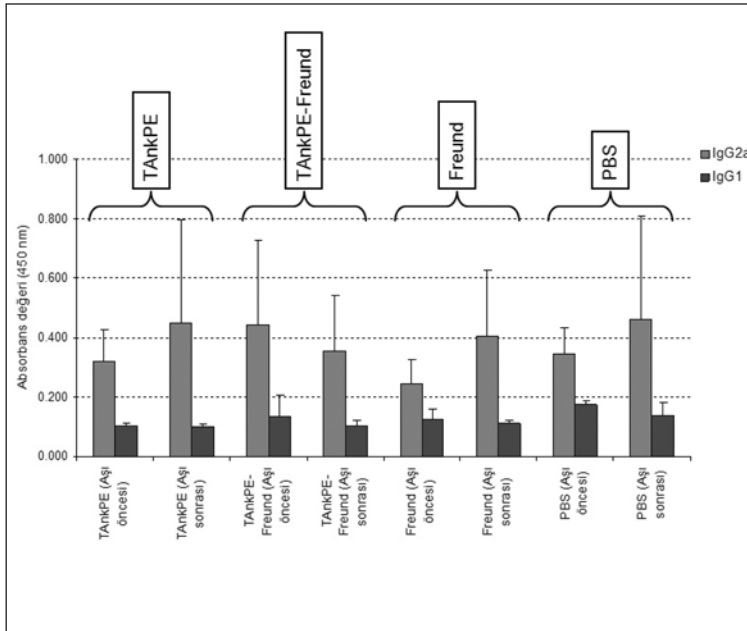
Şekil 1. Aşılanan fare serumlarında IgG antikor yanıtının (A) TANKPE antijeni; (B) TEgePE antijeni içeren WB ile değerlendirilmesi (1. sütun: Protein merdiveni; 2. sütun: TANKPE-Freund/TEgePE-Freund aşısı; 3. sütun: TANKPE/TEgePE aşısı; 4. sütun: Freund kontrol grubu; 5. sütun: PBS kontrol grubu. TANKPE-Freund aşısında ortalama 25 kDa büyüklüğünde bant okbaşı ile gösterilmiştir)

TankPE antijenleri ile yapılan ELISA'ya göre; TankPE, TankPE-Freund aşıları ve kontrollerin oluşturduğu IgG2a veya IgG1 antikor yanıtının herhangi bir yöne polarize olmadığı saptanmış, bunun yanında aşılama öncesi IgG2a veya IgG1 antikorlarının aşılama ile belirgin şekilde artmadığı belirlenmiştir (Şekil 2). TEgePE antijenleri kullanılarak yapılan ELISA'ya göre; TEgePE ve TEgePE-Freund aşıları ve kontrollerin oluşturduğu IgG2a veya IgG1 antikor yanıtının herhangi bir yöne belirgin şekilde polarize olmadığı saptanmıştır. Bunun yanında aşılama öncesi IgG2a veya IgG1 antikorlarının aşılama ile istatistiksel olarak belirgin şekilde arttırılmadığı belirlenmiştir (Şekil 3).

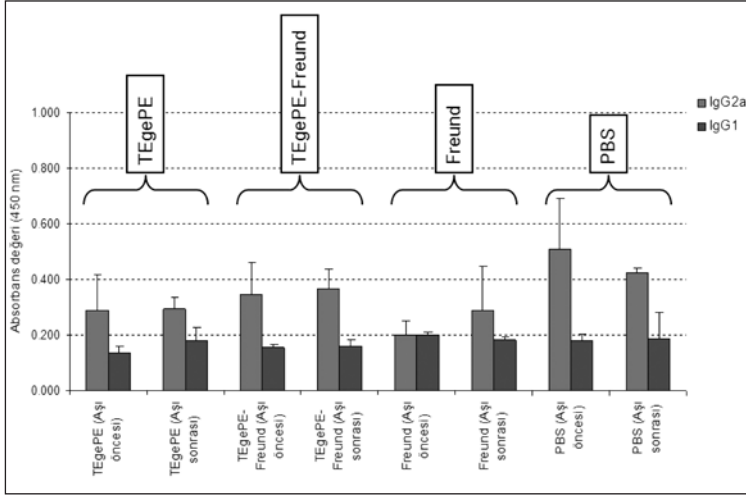
TEgePE ve TankPE karşılaştırıldığında IgG2a yanıtında belirgin bir fark saptanamazken, IgG1 yanıtında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p= 0.03$). TEgePE-Freund ve TankPE-Freund karşılaştırıldığında ise IgG2a yanıtında belirgin bir farklılık olmadığı, IgG1 yanıtında ise belirgin bir fark olduğu gösterilmiştir ($p= 0.056$).

Aşılama ile Oluşan Hücresel İmmün Yanıt

Aşılamalar ile farelerde oluşturulan hücresel immün yanıtın araştırılması için hücre kültürü ortamında uyarılan dalak hücrelerinin CD8/CD4 oranı yanında IFN- γ ve IL-4 salgılayan hücrelerin oranı belirlenmiştir. *T.gondii*'ye ait iki farklı suşun genotipleri farklı olduğundan TEgePE, TEgePE-Freund, TankPE ve TankPE-Freund aşıları uygulanan deney ve kontrol grubu farelerden alınan dalak hücreleri, TEgePE ve TankPE antijenleri ile ayrı ayrı uyarılmış dalak hücreleri akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Bu işlem sırasında ilk ola-



Şekil 2. TankPE ve TankPE-Freund aşıları uygulanan farelerden ve kontrol gruplarından elde edilen serum örneklerinde IgG alt grup antikor yanıtının TankPE antijeni kullanılan ELISA ile araştırılması.



Şekil 3. TEgePE ve TEgePE-Freund aşıları uygulanan farelerden ve kontrol gruplarından elde edilen serum örneklerinde IgG alt grup antikor yanıtının TEgePE antijeni kullanılan ELISA ile araştırılması

rak dalak hücreleri içerisinde lenfositlerin yoğun olduğu bölge, hücrelerin büyüklük (FSC-A) ve granül içerik (SSC-A) analizi sonucu belirlenmiştir.

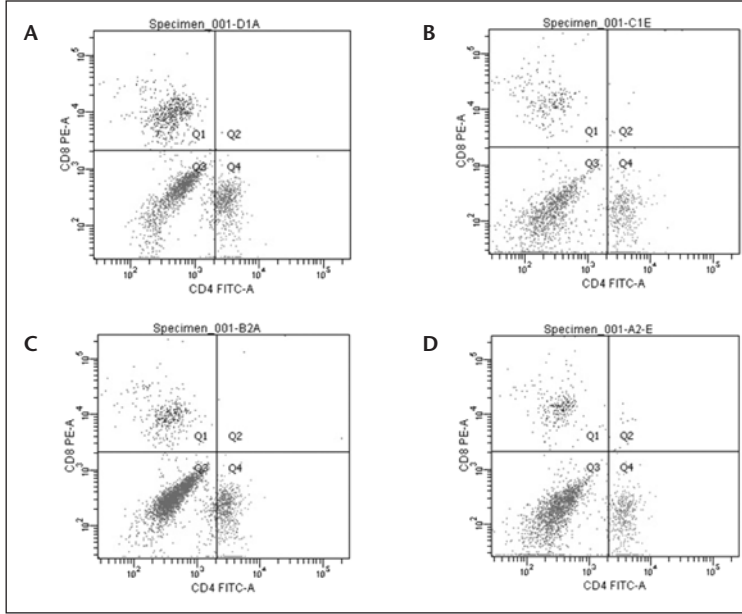
İkinci aşamada, aşılanmış hayvanlara ve kontrollere ait uyarılmış ve uyarılmamış dalak hücreleri, FITC ile konjuge edilmiş anti-fare CD4 ve PE ile konjuge edilmiş anti-fare CD8a antikorları ile aynı anda boyanmıştır (Şekil 4). Elde edilen sonuçlara göre dalak hücrelerinde CD8/CD4 oranı TEgePE, TEgePE-Freund, TankPE ve TankPE-Freund ile aşılanmış hayvanlarda belirgin olarak değişmemiştir (Şekil 5).

Üçüncü aşamada, aşılanmış hayvanlara ve kontrollere ait uyarılmış ve uyarılmamış dalak hücreleri PE ile konjuge edilmiş anti-fare IFN- γ ve anti-fare IL-4 antikorları ile ayrı ayrı boyanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, TankPE-Freund ile aşılanmış hayvanlara ait dalak hücrelerinde IFN- γ oranı uyarılmış dalak hücrelerinde uyarılmamışlara göre bir miktar artmasına rağmen, TEgePE, TEgePE-Freund ve TankPE ile aşılanmış hayvanlarda belirgin bir artış oranı saptanamamıştır (Şekil 6).

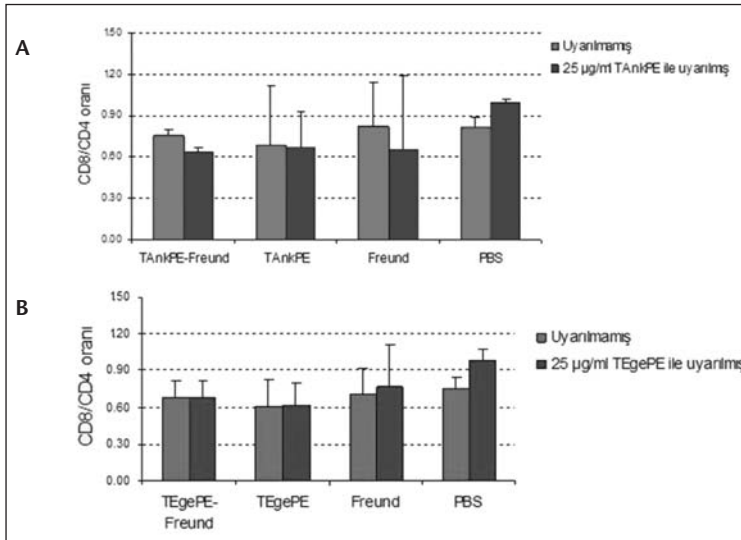
TankPE-Freund, TEgePE-Freund ve TEgePE ile aşılanmış hayvanlara ait dalak hücrelerinde IL-4 oranı uyarılmış dalak hücrelerinde uyarılmamışlara göre bir miktar artmış, TankPE ile aşılanmış hayvanlarda belirgin bir artış izlenmemiştir (Şekil 7).

TARTIŞMA

İnsanlarda *T.gondii* enfeksiyonu, yeni doğanlarda fetal anomalilere yol açan konjenital toksoplazmoz, körlüğe sebep olan retinokoroidit, immün sistem yetmezliği olan kişilerde fatal seyreden toksoplazmik ensefalit yanında, organ nakli yapılanlarda organ reddi ve ölüme sebep olmaktadır⁸. Toksoplazmozun infertilite ile de ilişkili olabileceği düşünülmekte ve son yıllarda şizofreni ve bazı psikiyatrik hastalıklardan sorumlu olabileceği belirtilmektedir^{9,10}.

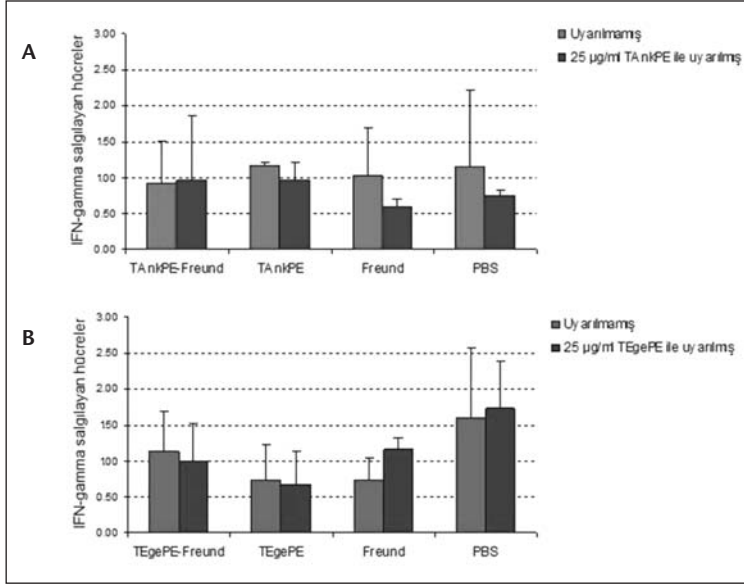


Şekil 4. (A) TAnkPE, (B) TEgePE, (C) TAnkPE-Freund, (D) TEgePE-Freund aşılı fare dalak hücrelerinin uyarılma sonrası CD8 ve CD4 oranının belirlenmesi sırasında elde edilen akış sitometrisi grafikleri.

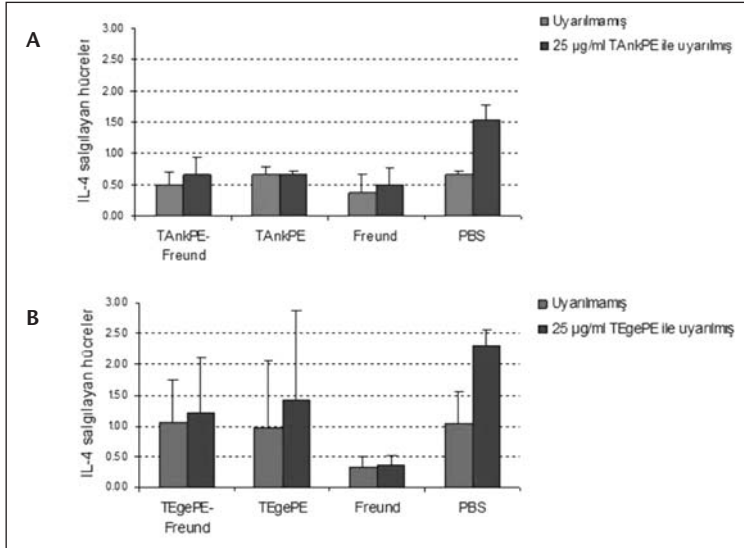


Şekil 5. (A) TAnkPE ve TAnkPE-Freund, (B) TEgePE ve TEgePE-Freund aşılı fareler ve kontrol gruplarının CD8/CD4 oranları (Elde edilen CD8/CD4 oranları üç hayvana ait değerlerin aritmetik ortalama $\pm$ standart sapmasıdır)

Toksoplazmoza bağlı oluşan fetal anomalilerin azaltılması için Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yüz milyonlarca dolar harcanmaktadır¹¹. Bu kadar ciddi klinik tablo ve



Şekil 6. (A) TAnkPE ve TAnkPE-Freund, (B) TEgePE ve TEgePE-Freund aşıları uygulanan fareler ve kontrol gruplarının IFN- γ oranları (Elde edilen IFN- γ oranları üç hayvana ait değerlerin aritmetik ortalama $\pm$ standart sapmasıdır).



Şekil 7. (A) TAnkPE ve TAnkPE-Freund, (B) TEgePE ve TEgePE-Freund aşıları uygulanan fareler ve kontrol gruplarının IL-4 oranları (Elde edilen IL-4 oranları üç hayvana ait değerlerin aritmetik ortalama $\pm$ standart sapmasıdır).

ekonomik kayıplara yol açan toksoplazmoz tedavisinde tam kür sağlayan bir ilaç halen kullanımda olmadığı için, etkene karşı geliştirilmeye çalışılan aşı, korunmada önemli bir yer tutmaktadır. *T.gondii*'ye karşı geliştirilmeye çalışılan koruyucu aşı çalışmaları 1990'lı yıllarda hızlanmıştır. Günümüzde kullanımda olan tek aşı, mutant S48 suşunu içeren canlı aşı olup, koyunlarda kullanılmaktadır^{12,13}. Ancak bu aşı, kısa raf ömrü ve yüksek maliyeti sebebiyle yaygın şekilde kullanıma girememiştir. Ayrıca insanlarda uygulanan canlı aşılar hem patojenik formun reaktivasyonu, hem de beklenmeyen zararlı ters mutasyonlar gözlenebilmektedir¹³⁻¹⁵.

T.gondii ile enfeksiyon sonrası hümmoral ve hüresel immün yanıt oluşmaktadır; ancak korunmada primer olarak Th1 tipi hüresel yanıt ve IFN- γ salgılanmasının etkin olduğu saptanmıştır¹⁶⁻¹⁸. *T.gondii* RH suşu eriyik proteini daha önceden adjuvan eşliğinde aşı denemelerinde kullanılmış ve BALB/c farelerde koruyuculuğu artırdığı belirtilmiştir⁷. Sunulan bu çalışmada, ülkemize ait iki farklı *T.gondii* genotipinden üretilen eriyik proteinlerin, Freund adjuvanı ile birleştirildikten sonra BALB/c farelere uygulanması ile, uyarılan hümmoral ve hüresel immün yanıt tiplerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, Türkiye'de izole edilen *T.gondii* Ankara ve Ege suşu takizoitlerinden sırasıyla TANKPE ve TEgePE eriyik proteinleri üretilmiş, daha sonra her biri üç adet fare içeren dört grup BALB/c fareye TEgePE, TEgePE-Freund, TANKPE ve TANKPE-Freund aşıları uygulanmıştır. Aşılanan ve kontrol grubu farelerden alınan serum örneklerinde öncelikle WB yöntemi ile IgG antikor varlığı araştırılmıştır. WB bant desenlerine göre TEgePE, TEgePE-Freund ve TANKPE aşıları ile aşılanan hayvanlar ile kontroller arasında belirgin bir değişiklik saptanmamış; ancak TANKPE-Freund ile aşılanan hatvanlarda farklı olarak ortalama 25 kDa büyüklüğünde bir bant gözlenmiştir (Şekil 1). Bu sebeple aşılar içinde en etkin IgG antikor yanıtının TANKPE-Freund aşısı ile oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda, aşılama ile farelerde Th1 veya Th2 yanıtının oluştuğunun işareti olan özgün IgG1 ve IgG2a antikorlarının polarizasyonunun belirlenmesi amacıyla ELISA testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre TANKPE, TANKPE-Freund, TEgePE ve TEgePE-Freund aşılarının oluşturduğu IgG2a veya IgG1 antikor yanıtının herhangi bir yöne polarize olmadığı saptanmış; ayrıca aşılama öncesi IgG2a veya IgG1 antikorlarının aşılama ile belirgin şekilde artmadığı da belirlenmiştir (Şekil 1 ve 2). TEgePE ve TANKPE karşılaştırıldığında, IgG2a yanıtında belirgin bir farklılık olmadığı, IgG1 yanıtında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p=0.03$). TEgePE-Freund ve TANKPE-Freund karşılaştırıldığında, IgG2a yanıtında belirgin bir farklılık olmadığı, IgG1 yanıtında ise belirgin bir fark olduğu gösterilmiştir ($p=0.056$). TEgePE-Freund ve TEgePE aşılarının TANKPE-Freund ve TANKPE'ye göre IgG1 yanıtında artış sağlaması, bu aşılarla uyarılan immün yanıtın Th2 yönüne olduğunu düşündürmüştür.

Aşılama ile farelerde oluşturulan hüresel immün yanıtın araştırılması için hücre kültürü ortamında uyarılan dalak hücrelerinin CD8/CD4 oranı ve hücre içi IFN- γ ve IL-4 oranları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre dalak hücrelerinde CD8/CD4 oranı, TEgePE, TEgePE-Freund, TANKPE ve TANKPE-Freund ile aşılanmış hayvanlarda belirgin olarak değişmemiştir (Şekil 3). Hücre için sitokin analizinden elde edilen sonuçlara göre de,

her iki eriyik proteininden oluşturulan aşıların IFN- γ salgısını artırmadığı, sadece TANKPE-Freund aşısının uyarılmış dalak hücrelerinde uyarılmamış hücrelere göre IFN- γ oranını bir miktar artırdığı belirlenmiştir. TANKPE-Freund, TEgePE-Freund ve TEgePE aşılarının ise IL-4 oranını uyarılmış hücrelerde uyarılmamış hücrelere göre daha çok artırması, aşıların immün yanıtı Th2 yönünde uyardığı şeklinde yorumlanmıştır. Daha önceden *T.gondii* RH suşundan elde edilen eriyik antijen aşısının da koruyuculuk sağlamaması bu sonucu desteklemektedir⁷. Sonuç olarak Türkiye’de izole edilen iki farklı *T.gondii* genotipinden üretilen eriyik proteinlerin Freund adjuvanı ile birleştirilmesi sonrası BALB/c farelerde uyardıkları hümmoral ve hücreyel immün yanıtın toksoplazmoza karşı tam koruyucu olmadıkları gösterilmiştir. Bu nedenle gelecekte yapılacak olan aşı çalışmalarında immünojen ve patojen olduğu gösterilmiş, özgün antijenlerin kullanılmasının doğru olabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004; 363(9425): 1965-76.
2. Bhopale GM. Pathogenesis of toxoplasmosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2003; 26(4): 213-22.
3. Hegab SM, Al-Mutawa SA. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. Clin Exp Med 2003; 3(2): 84-105.
4. Dubey JP. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*, pp: 1-17. In: Weiss LM, Kim K (eds), *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan. Perspectives and Methods. 2007, 1st ed. Academic Press, San Diego.
5. Lütjen S, Soltek S, Virna S, Deckert M, Schlüter D. Organ- and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells. Infect Immun 2006; 74(10): 5790-801.
6. Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. Semin Immunopathol 2012; 34(6): 793-813.
7. Fachado A, Rodriguez A, Molina J, et al. Long-term protective immune response elicited by vaccination with an expression genomic library of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun 2003; 71(9): 5407-11.
8. Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. Scand J Infect Dis 2012; 44(11): 805-14.
9. Henriquez SA, Brett R, Alexander J, Pratt J, Roberts CW. Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. Neuroimmunomodulation 2009; 16(2): 122-33.
10. Terpsidis KI, Papazahariadou MG, Taitzoglou IA, Papaioannou NG, Georgiadis MP, Theodoridis IT. *Toxoplasma gondii*: reproductive parameters in experimentally infected male rats. Exp Parasitol 2009; 121(3): 238-41.
11. Jones JL, Kruszon-Moran D, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2000. Emerg Infect Dis 2003; 9(11): 1371-4.
12. Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. Parasitology 1995; 110 (Suppl): S11-6.
13. Hotez PJ, Bethany JM. Parasitic disease vaccines, pp: 1295-300. In: Plotkin SA, Orenstein WA (eds), Vaccines. 2008, 5th ed. Saunders, Elsevier Inc., Pennsylvania.
14. Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Förster-Waldl E, Petersen E. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(2): 252-66.
15. Garcia JL. Vaccination concepts against *Toxoplasma gondii*. Expert Rev Vaccines 2009; 8(2): 215-25
16. Denkers EY. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. Microbes Infect 1999; 1(9): 699-708.
17. Denkers EY. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 39(3): 193-203.
18. Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. Immunol Rev 2011; 240(1): 269-85.