

Akut Toksoplazmozlu Fare Modelinde Azitromisin ve *Chlorella vulgaris*'in Tedavi Etkinliğinin, NK Aktivasyonu ve Bazı Sitokin Değerlerinin Araştırılması

Effects of Azithromycin and *Chlorella vulgaris* Treatment on Certain Cytokine Values and NK Cell Activity in an Acute Murine Toxoplasmosis Model

Deniz Gözde ÇELİK PAYÇU¹, Özden BÜYÜKBABA BORAL¹

¹ İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 10.08.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.01.2017

ÖZ

Toksoplazmoz, karmaşık tedavi süreci olan yaygın bir enfeksiyondur. Azitromisin (AZT) yan etkileri az, oküler ve serebral toksoplazmozlu hastalarda etkin olarak kullanılan makrolid grubu bir antibiyotiktir. *Chlorella vulgaris* (CV), besleyici maddeler içeren ve çeşitli biyolojik etkilere sahip tek hücreli yeşil algdır. CV ekstresinin (CVE) çeşitli bakteri ve virusların neden olduğu enfeksiyonlarda özellikle doğal öldürücü (Natural Killer) (NK) hücrelerin sitotoksik aktivitelerini ve IL-12 ve IFN- γ düzeylerini artırarak immün sistemin aktivasyonuna katkıda bulunup enfeksiyonlara karşı koruyucu etki oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada; akut toksoplazmozlu farelerde, azitromisin ve CVE'nin tek tek ve birlikte kullanıldığında tedaviye, IL-2, IL-12, IFN- γ sitokin seviyeleri ile NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Her biri sekiz fareden (Balb/c) oluşan beş deney grubu oluşturulmuş ve bir gruba (sağlıklı kontrol-SK) hiçbir işlem yapılmamıştır. Diğer gruplara 11×10^4 trofozoit/ml olacak şekilde 1 ml *Toxoplasma gondii* RH suşu trofozoiti intraperitoneal yolla verilmiştir. Enfekte Kontrol (EK) grubuna başka bir işlem yapılmamıştır. Diğer gruplara ise trofozoit verildikten 24 saat sonra oral gavaj ile CV grubuna CVE, AZT grubuna azitromisin, CV + AZT grubuna CVE ve azitromisin birlikte 6 gün boyunca verilmiştir. EK, CV, AZT, CV + AZT grubuna ait tüm fareler 8. günde ketamin ile anestezi uygulanarak, periton sıvıları, kalp kanı ve dalakları alınmıştır. Bu grupların periton sıvılarında trofozoit sayıları belirlenmiş, tedavi gruplarının ortalama trofozoit sayılarıyla büyüme inhibisyon aktiviteyi hesaplanmıştır. SK dahil tüm grupların serum örneklerinde IL-2, IL-12, IFN- γ düzeyleri ELISA, dalak NK hücrelerinin sitotoksik aktiviteleri "Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay" ile saptanmıştır. CV, AZT ve CV + AZT gruplarında trofozoit sayıları EK grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p < 0.001$). AZT tedavi grubu %98,46; CV grubu

%88.6 ve AZT + CV kombinasyon tedavi grubu %99.4 oranlarında EK grubuna göre *T.gondii*'ye karşı antiprotazoal etki göstermiştir. NK hücre sitotoksiteleri CV, AZT + CV gruplarında, diğer gruplardan anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. IL-12, IFN- γ seviyeleri uyumlu olup EK grubunda en yüksek, AZT + CV grubunda en düşük saptanmış ($p < 0.001$), bu durum enfeksiyonun şiddetinin oldukça düşmüş olması ile ilişkilendirilmiştir. IL-2 düzeyleri CV, CV + AZT gruplarında diğer gruplardan anlamlı oranda yüksek saptanmıştır ($p < 0.001$). Çalışmamızda CV'nin tek başına uygulanması bile enfeksiyonda yüksek oranlarda gerilemeye neden olmuştur. Bu durum NK sitotoksitesi, IL-2, IL-12 ve IFN- γ düzeylerindeki artışla ilişkili olabilir. Azitromisin CV ile birlikte uygulanması *T.gondii* eliminasyonunda yüksek başarı göstermesi, diğer yöntemleri tolere edemeyen ve immün sistemi baskılanmış hastalarda bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Toksoplazmoz; azitromisin; *Chlorella vulgaris*; sinerjizm; tedavi.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a common infection with a complicated treatment process. Azithromycin (AZT) is a macrolide antibiotic that can be effectively used in patients with cerebral and ocular toxoplasmosis and has fewer side effects. *Chlorella vulgaris* (CV), a single-cell green algae that contains nutrients and has various biological effects. CV extract (CVE) has been shown to have protective effects against infections via immune enhancement by increasing the cytotoxicity of NK cells, IL-12 and IFN- γ levels. The aim of this study was to investigate the protective effects of AZT and CV, individually and in combination, against acute toxoplasmosis in mice, and their effects on NK cell cytotoxicity, IL-12, IFN- γ , and IL-2 levels. Six groups of mice (Balb/c) were formed. With the exception of the healthy control (HC) group, all other groups were infected with 1 ml (11×10^4 trophozoite/ml) *Toxoplasma gondii* RH strain trophozoites. No further action was performed for infected control (IC) group. After 24 hours from trophozoite infection, CVE was given to CV group, AZT to azithromycin group and CVE + AZT combination to CV + AZT group by oral gavage for 6 days. All of the mice from IC, CV, AZT and CV + AZT groups were sacrificed on the 8th day of the infection and serum, peritoneal fluid and spleen samples were collected. Trophozoite count of the groups were determined in all groups except HC group and the average growth inhibition activity was calculated by using the growth inhibition formula. In all groups IL-12, IFN- γ , IL-2 levels were measured with ELISA method and cytotoxicity of the NK cells were measured using Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. The number of trophozoites were significantly lower in the CV group than the IC group ($p < 0.001$), and also significantly lower in CV + AZT combination group than the AZT group. According to the growth inhibition calculations CV treatment showed 88.6%, AZT treatment 98.46%, AZT + CV combination treatment 99.4% antiprotazoal activity against *T.gondii* compared with the IC group. NK cell cytotoxicity in the CV and the combination group were significantly higher than all the other groups ($p < 0.001$). IL-12 and IFN- γ levels were highest in IC group and the lowest in AZT + CV group. This situation has been linked to the fact that the severity of the infection has fallen considerably. IL-2 levels were significantly higher in CV, CV + AZT groups than in the other groups ($p < 0.001$). In our study, even CV administration alone caused a significant decline in infection. This may be related to the increased NK cytotoxicity, IL-2, IL-12 and IFN- γ levels. CV + AZT combination seems to be an effective treatment option than AZT alone, particularly in patients who are difficult to treat with common methods or in patients with immunosuppression.

Keywords: Toxoplasmosis; azithromycin; *Chlorella vulgaris*; synergism; treatment.

GİRİŞ

Toksoplazmoz, dünyada yaygın olarak görülen *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu bir enfeksiyondur. İnsanlara hamilelik sırasında bulaşarak yenidoğanda ve immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi klinik tablolara neden olmaktadır. Toksoplazmoza karşı

konakta hücrel ve humoral bağışık yanıt rol oynamaktadır. Laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalarda interferon-gama (IFN- γ) ve interlökin IL-12 düzeyinin savunmada önemli olduğu gösterilmiştir.^{1,2} Ayrıca yapılan çalışmalarda toksoplazmoza karşı, IFN- γ 'nin en etkili sitokin olduğu ve IFN- γ salgılanmasına bağlı olarak, IL-12, IL-2, IL-7 gibi sitokinlerin de dolaylı olarak salgılandığı ve toksoplazmoza karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir.³ Doğal öldürücü (NK) hücrelerden salınan IFN- γ 'nin makrofaj aktivasyonunu sağladığı, IL-12'nin ise deneysel olarak *T.gondii* enfeksiyonu oluşturulan T hücreli farelerde NK hücrelerinden IFN- γ salınımını arttırarak toksoplazmik ensefalit gelişimini engellediği gösterilmiştir.^{4,5} Tedavide primetamin, sulfadiyazin, trimetoprim sülfametoksazolün yanı sıra klindamisin, spiramisin, atovakuon, azitromisin, roksitromisin gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Azitromisin yan etkilerinin az olması nedeni ile özellikle oküler ve serebral toksoplazmozlu hastalarda etkin olarak kullanılan makrolid grubu bir antibiyotiktir.⁶ *Chlorella vulgaris* (CV), besleyici maddeler içeren ve çeşitli biyolojik etkilere sahip tek hücreli yeşil bir algdır. Yapılan çalışmalarda *Chlorella vulgaris* ekstresinin (CVE) enfeksiyonlarda özellikle doğal öldürücü (NK) hücrelerin sitotoksik aktivitelerini ve IL-1 β , IL-12 ve IFN- γ düzeylerini arttırarak immün sistemin aktivasyonuna katkıda bulunduğu, bu yolla enfeksiyonlara karşı koruyucu etki oluşturduğu belirlenmiştir^{7,8}.

Bu çalışmada; deneysel olarak *T.gondii* ile enfekte edilen farelerde, azitromisin ve CVE'nin tek tek ve birlikte kullanıldığında tedaviye katkısının ve IL-2, IL-12, IFN- γ sitokin seviyeleri ile NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerine etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmanın yapılması için gerekli etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2015/41 sayı ve karar numarası ile alınmıştır. Deneyler süresince hayvan haklarının korunmasına özen gösterilmiştir.

Her biri sekiz Balb/c fareden oluşan beş deney grubu oluşturulmuş ve bir gruba (Sağlıklı Kontrol-SK) hiçbir işlem yapılmamıştır. Diğer gruplara ise 1 ml *T.gondii* RH suşu trofozoiti (11×10^4 trofozoit/ml) intraperitoneal yolla verilmiştir. Enfekte Kontrol (EK) grubuna başka bir işlem yapılmamıştır. Diğer gruplara ise trofozoit verildikten 24 saat sonra oral gavaj ile CV grubuna CVE, AZT grubuna azitromisin, CV + AZT grubuna CVE ve azitromisin birlikte verilmiştir. EK, CV, AZT, CV + AZT grubuna ait tüm fareler 8. günde ketamin ile anestezi uygulanarak, periton sıvıları, kalp kanı ve dalakları alınmıştır^{9,10} (Tablo I).

SK hariç grupların periton sıvılarında trofozoit sayıları belirlenmiş, tedavi gruplarının ortalama trofozoit sayılarıyla büyüme inhibisyon aktiviteleri Muelas-Serrana'nın¹¹ önerdiği aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\%GI \text{ (Büyüme İnhibisyon Yüzdesi)} = \left(1 - \frac{\text{Tedavi Grubu Trofozoit Sayısı}}{\text{Kontrol Grubu Trofozoit Sayısı}} \right) \times 100$$

Tüm grupların serum örneklerinde IL-2, IL-12, IFN- γ düzeyleri ELISA yöntemi (e-Bioscience, Avusturya) ile saptanmıştır. Standart dilüsyonların absorpsiyon değerleri ile

Tablo 1. Çalışma Grupları ve Tedavi Rejimleri

Çalışma grubu	Özellikler ve tedavi rejimleri
1. Sağlıklı Kontrol (SK)	Sağlıklı/dalak ve kalp kanı alındı.
2. Enfekte Kontrol (EK)	1. gün: Trofozoit 8. gün: Periton sıvısı, dalak ve kalp kanı alındı.
3. <i>Chlorella vulgaris</i> (CV):	1. gün: Trofozoit 2-7.günler: 500 mg/kg/gün, 0.2 ml CVE ⁸ 8. gün: Periton sıvısı, dalak ve kalp kanı alındı.
4. Azitromisin (AZT):	1. gün: Trofozoit 2-7. günler: 200 mg/kg/gün, 0.2 ml AZT ⁹ 8. gün: Periton sıvısı, dalak ve kalp kanı alındı.
5. Kombinasyon (CV + AZT):	1. gün: Trofozoit 2-7. günler: 500 mg/kg/gün, 0.1 ml CVE + 200 mg/kg/gün, 0.1 ml AZT 8. gün: Periton sıvısı, dalak ve kalp kanı alındı.

uygulama grubu örneklerinin absorbands değerleri kit içeriğinde belirtildiği şekilde orantılanarak, pg/ml cinsinden sonuçlar elde edilmiştir. Tüm deney grubu farelerinin dalaklarından (Stemcell NK Cell isolation kit, Stemcell, Catalog #19855) izolasyon kiti ile elde edilen NK hücrelerinin sitotoksik aktiviteleri ise Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, ABD) kullanılarak saptanmıştır. Bu deneyde hedef hücre olarak YAC-1 (ATCC TIB-160) kullanılmıştır. Deneylerde hedef hücre oranları 50 µl besiyerine 10.000 hücre/kuyucuk ve efektör hücre oranları 50 µl besiyerine 10/1'den 0.02/1 (efektör hücre: hedef hücre) olacak şekilde uygulanmıştır.

İstatistiksel değerlendirmeler; sürekli değişkenler olan trofozoit sayıları, IL-2, IL-12 ve IFN-γ ve NK sitotoksitesi değerlerinin normal dağılımına Shapiro-Wilk testiyle bakılmış, değişkenlerin normal dağıldığı görülmüştür ($p < 0.05$). One Way (Tek Yönlü) ANOVA testiyle parametrik olarak değerlendirilen gruplardan en az biri diğerlerinden farklı çıkmıştır ($p < 0.05$). Gruplar arasında fark olduğunu belirlemek amacıyla Post Hoc ikili karşılaştırma testleri uygulanmıştır. Tek yönlü ANOVA testlerinde yapılan homojenite incelemesinde varyansları homojen çıkmayan ($p < 0.05$) parametreler trofozoit sayısı ve IL-2 grupları için Post Hoc testlerinden Tamhane's T2, varyansları homojen çıkan ($p > 0.05$) parametreler IL-12 ve IFN-γ grupları için Post Hoc testlerinden Tukey HSD kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

AZT, CV ve AZT + CV gruplarındaki ortalama trofozoit sayılarının her biri SK grubu trofozoit sayılarına göre anlamlı derecede düşük olarak saptanmıştır ($p < 0.001$). AZT grubu trofozoit sayısı CV grubu trofozoit sayısına göre anlamlı derecede düşük, AZT + CV grubuna göre ise anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0.001$). Tedavi grup-

larının ortalama trofozoit sayılarıyla büyüme inhibisyon aktiviteleri hesaplanmıştır. Büyüme inhibisyon aktivite formülü kullanılarak yapılan hesaplamalarda AZT tedavi grubu %98.46; CVE grubu %88.6 ve AZT + CVE kombinasyon tedavi grubu %99.4 oranlarında EK grubuna göre *T.gondii*'ye karşı antiprotozoal etki göstermiştir (Tablo II).

NK hücrelerinin sitotoksik aktiviteleri EK grubunda SK grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0.001$). CV grubu değerleri SK, EK ve AZT grubuna göre oldukça yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0.001$). CV grubu değerleri CV + AZT grubundan da anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p = 0.011$). Yine CV + AZT grubu değerleri ise SK, EK ve AZT grubuna oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$).

IL-12 miktarları EK ve CV gruplarında SK, AZT ve AZT + CV gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p < 0.001$), CV ve EK grupları arasında ise anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p = 0.106$). AZT grubu değerleri ise AZT + CV grubuna göre anlamlı oranda yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0.001$). IFN- γ değerleri EK grubunda tüm diğer gruplara oranla anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0.001$). CV grubu değerleri ise SK, AZT ve AZT + CV gruplarına oranla yüksek olarak bulunmuştur ($p < 0.001$). AZT grubu AZT + CV ve SK, AZT + CV grubunda ise SK gruba oranla IFN- γ seviyeleri yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). IL-2 değerleri CV grubunda tüm gruplara oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Değerler CV + AZT grubunda ise SK, EK ve AZT gruplarına oranla ve EK grubunda ise AZT ve SK grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo III).

TARTIŞMA

T.gondii tüm dünyada yaygın, hamilelere bulaşmasıyla yenidoğanlarda, immün sistemi baskılanmış (İSB) hastalarda oluşturduğu ölümcül tablolar ve uzun tedavi süreleri gerektiren oküler toksoplazmoz gibi klinik tablolarla önemli bir protozoondur. Standart tedavisinde kullanılan yüksek toksik ajanların (primetamin-sulfonamid), toksisitesi düşük antiparaziter ilaçlar bulunması gerekliliğini doğurmuştur. Primetamin kemik iliğini baskılayabilmekte bu nedenle, İSB kişiler ve hamilelerde kullanımı önerilmemektedir. Azitromisin toksisitesi düşük bir ajandır. Özellikle İSB hastalarda, hamilelik döneminde de kullanılabileceği bildirilmektedir^{12,13}. Ayrıca TE'nin primer ve sekonder profilaksisinde kullanılabileceği bildirilmiştir¹⁴. HIV'li hastalarda oküler toksoplazmoz tedavisi, yan etkilerine rağmen, nüks olasılığı nedeniyle hayat boyu devam edebilmektedir. Azitromisinin oküler toksoplazmoz olgularında özellikle diğer tedavi seçeneklerinin uygulanmadığı hastalarda başka antiparaziter ilaçlarla birlikte kullanılabileceği belirtilmiştir¹⁵. Çalışmamızda bu bilgileri destekler nitelikte; AZT grubu periton sıvılarındaki trofozoit sayıları EK grubuna oranla anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p < 0.001$). Yine büyüme inhibisyon aktivite formülü kullanılarak yapılan hesaplamalarda AZT grubu %98.46 oranında EK grubuna göre *T.gondii*'ye karşı antiprotozoal etki göstermiştir.

Chlorella vulgaris, sıcak su ekstresi (CVE)'nin *Escherichia coli* peritoniti oluşturulan farelerde enfeksiyona karşı koruma sağladığı belirlenmiştir.¹⁶ *Listeria monocytogenes* ile enfekte edilen farelerde iki farklı dozda (50 ve 500 mg/kg/gün) CV verilen farelerde kurtulma

Tablo II. Çalışma Gruplarına Ait Ortalama Trofozoit Sayıları

Çalışma grubu	Periton sıvısında 8. günde saptanan ortalama trofozoit sayısı (trofozoit/ml)	Büyüme inhibisyon yüzdesi (%)
EK	122 x 10 ⁴	-
CV	13.9 x 10 ⁴	88.6
AZT	1.9 x 10 ⁴	98.46
CV + AZT	0.75 x 10 ⁴	99.4

EK: Enfekte kontrol; CV: *Chlorella vulgaris*; AZT: Azitromisin.

Tablo III. Gruplara Ait Ortalama NK Sitotoksitesi, IL-12, IFN-γ ve IL-2 Düzeyleri

Çalışma grupları	NK sitotoksitesi (%)	IL-12 (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
SK	26	14	20.4	10
EK	48	104	376	32
AZT	48.2	81	184	30.5
CV	74.12	96	300	59.2
CV + AZT	70.6	62	92.8	54.4

SK: Sağlıklı kontrol; EK: Enfekte kontrol; AZT: Azitromisin; CV: *Chlorella vulgaris*.

oranlarının arttığı (%20 ile %55, sırasıyla) belirlenmiştir⁸. Diğer bir çalışmada kurşun ile immünsüpresyon sağlanan fareler *L.monocytogenes* ile enfekte edilmiş, CV'nin kurşunun neden olduğu immünsüpresyonun olumsuz etkisini azaltarak farelerin kurtulma oranlarını arttırdığı bildirilmiştir.¹⁷

Söz konusu çalışmalara benzer olarak çalışmamızda; 500 mg/kg/gün 6 gün boyunca CV verilen grupta periton sıvılarındaki trofozoit sayıları EK grubuna oranla anlamlı derecede düşük saptanmıştır. Ayrıca CV grubu %88.6 oranında EK grubuna göre *T.gondii*'ye karşı antiprotozoal etki göstermiştir. CV'in tek başına bile *T.gondii* enfeksiyonunda neden olduğunu gerileme, özellikle enfeksiyon açısından riskli bireylerde profilaktik olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Azitromisinin diğer anti-paraziter ilaçlarla kombinasyon şeklinde kullanılmasının tedavi etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir. Azitromisinin primetamin ile kombinasyonu 42 yetişkin HIV pozitif, TE tanısı alan hasta ile yapılan çalışmada kullanılmış, uygun bir alternatif tedavi seçeneği olduğu, sulfonamid ve klindamisinini tolere edemeyen TE olgularında etkin şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir¹⁴.

Çalışmamızda AZT + CV grubu trofozoit sayıları EK, AZT ve CV gruplarına göre anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur. AZT + CV grubu %99.4 oranında EK grubuna göre *T.gondii*'ye karşı antiprotozoal etki göstermiştir. Çalışmamızın sonuçları, bir antimikrobiyal ajan olmamasına karşın CV'nin AZT ile kombinasyon tedavisinin enfeksiyonun gerilemesine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermiştir.

T.gondii vücuda girdiği zaman doğal ve edinsel bağışıklığa ait pek çok hücrenin dahil olduğu bir yanıt oluşur. Akut toksoplazmozda erken dönemde oluşan doğal bağışık yanıtta dendritik hücreler, nötrofiller ve makrofajlar parazit antijenlerine karşı IL-12, IFN- γ ve TNF- α üreterek direkt olarak yanıt verirler. Eğer parazit temizlenemezse immün süreç özgül bağışık yanıt ile devam eder¹⁸⁻²¹.

Özgül koruyucu bağışıklık *T.gondii*'nin hücre içi paraziti olması nedeni ile hücre-aracılı bağışık yanıt şeklinde oluşur. T hücreleri tarafından üretilen IFN- γ konak yanıtının önemli bir faktörüdür ve T-lenfosit defektli hayvanlarda avirulan *T.gondii* suşlarının virulan hale geldiği bildirilmiştir^{22,23}.

Makrofajlar ve dendritik hücrelerce üretilen IL-12 enfeksiyonun akut fazında savunmada ana rolü üstlenir. IL-12, NK hücreleri ve T lenfositlerden (CD4, CD8 T hücreleri) IFN- γ salınımını aktive eder. CD4, CD8 T hücreleri konağın *T.gondii* enfeksiyonuna dirençte rol oynar. CD8 hücrelerinin çoğalması ve NK hücrelerinin olgunlaşması ayrıca IFN- γ üretilmesini uyarır. TNF- α ise monosit, makrofaj ve T lenfositlerince üretilir ve makrofaj aktivasyonu ve parazit replikasyonunun durdurulması için gereklidir²⁴.

CV'nin enfeksiyonlarda immün sistemin düzenlenmesine katkıda bulunarak koruyucu etki oluşturduğu belirlenmiştir. CV'nin oral uygulamasının *L.monocytogenes*'in subletal dozları ile enfekte farelerdeki NK hücreleri aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmış, enfeksiyonun tek başına NK hücre aktivitelerinde bir artışa neden olduğu, CV uygulanan enfekte hayvanlarda NK hücre aktivitelerinde ek bir artış gözlemlendiği ve bu artışın enfekte gruplara oranla önemli ölçüde yüksek olduğu vurgulanmıştır¹⁶. Yine *L.monocytogenes* ile enfekte, kurşun ile immün sistemi baskılanan farelerde, CV'nin kandaki kurşun düzeyini azaltarak, ayrıca serum koloni-stimule eden faktör (GM-CSF) seviyelerini artırarak kurşunun neden olduğu mielosüpresyonu önlediği belirtilmiştir. Fakat bu koruyucu etkinin IFN- γ defektli farelerde görülmediği, CV'nin koruyucu etkilerinin IFN- γ ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür¹⁷. *L.monocytogenes* ile enfekte farelerde CV'nin Th1 sitokinlerinin (IFN- γ ve IL-12) üretimini arttırdığı belirtilmiştir. Bir başka çalışmada CV'nin normal ve Muri-ne Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu (MAIDS) olan farelerde *L.monocytogenes* ile enfekte farelerde IFN- γ , IL-2, IL-1 α ve TNF- α düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir²⁵. CV'nin antiviral etkinliği de olduğu, ayrıca CV'nin NK hücrelerinin aktivitelerinde ve IFN- γ üretiminde artışa neden olarak sitomegalovirüs replikasyonunu önlediği gösterilmiştir²⁶.

Çalışmamızda NK hücrelerinin sitotoksik aktiviteleri CV grubunda, SK, EK ve AZT ve CV + AZT grubundan anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Yine CV + AZT grubu ise SK, EK ve AZT grubuna oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar CV'nin NK hücrelerinin sitotoksitelerini arttırdığını göstermektedir. EK grubu NK sitotoksitite değerlerinin hiçbir enfeksiyonun olmadığı SK grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek olması enfeksiyonun NK hücre sitotoksitelerinde bir artışa neden olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar literatürde CV'in *L.monocytogenes* ile enfekte farelerde NK sitotoksitesini arttırdığını öne süren çalışmaya benzerdir¹⁶. CV grubunun CV + AZT grubuna oranla daha yüksek sitotoksik aktivite göstermesi, CV + AZT grubundaki farelerde *T.gondii*'nin neredeyse tamamen elimine olmasından kaynaklandığını düşündürmüştür.

Çalışmamızda EK ve CV gruplarının IL-12 değerleri SK, AZT ve AZT + CV gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş, CV ve EK grupları arasında ise anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Sadece *T.gondii* ile enfekte edilen EK grubunda IL-12 değerlerinin hiçbir enfeksiyonun olmadığı SK grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olması enfeksiyonun IL-12 seviyelerinde bir artışa neden olduğunu göstermektedir. CV grubunda EK grubuna göre enfeksiyon anlamlı derecede gerilemiş olmasına rağmen IL-12 değerleri arasında az bir fark olması CV uygulanmasının IL-12'yi arttığını destekler niteliktedir. Yine AZT + CV grubunda AZT grubuna oranla düşük IL-12 düzeylerinin saptanması ise yine AZT + CV grubunda enfeksiyonun anlamlı ölçüde elimine olmasından kaynaklandığını düşündürmüştür.

Çalışmamızda gruplara ait IFN- γ seviyeleri IL-12 düzeylerine benzer bulunmuştur. En yüksek IL-12 düzeylerinin EK grubunda olması, bunu sırasıyla CV, AZT ve AZT + CV, SK gruplarının izlemesi enfeksiyonun şiddetinin azalması ile uyum göstermektedir.

Sitokinlerin uzamış etkileri, yüksek biyolojik potansiyelleri nedeniyle hasara sebep olur²⁷. Sönmez ve arkadaşları²⁸ 2014 yılındaki toksoplazmoz tedavisinde atovakuon ve astragalus kombinasyonunun etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında bu kombinasyonun uygulandığı grupta IL-12 düzeylerinin düşük bulunmasını enfeksiyonun azalması ile ilişkilendirmiş ve bu durumun immün sistemdeki inhibisyon/aktivasyon dengesinin işleyişinin düzgün çalıştığını doğruladığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da enfeksiyon şiddetinin azalması ile IL-12 ve IFN- γ düzeylerinde düşüş meydana gelmiştir.

IL-2, T lenfositlerin proliferasyonu ile doğrudan ilişkili bir sitokindir. Çalışmamızda CV grubunda IL-2 düzeyi en yüksek olup, bunu CV + AZT grubu takip etmiştir. Bu sonuç CV'nin IL-2 düzeylerinde anlamlı bir yükselişe neden olduğunu göstermektedir. CV + AZT grubunda CV'ye oranla anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum yine enfeksiyonun iyileşme oranının daha yüksek olması ile ilişkilendirilebilir. AZT grubunda ise CV grubuna göre anlamlı oranda düşük fakat enfeksiyonun iyileşme oranının daha fazla olduğu göz önüne alınırsa CV'nin IL-2 düzeylerinde oldukça fazla bir artışa neden olduğu göze çarpmaktadır. Bu bulgular deneysel olarak kanser oluşturulan farelerden CV uygulanan grupta kontrol grubuna oranla anlamlı bir artış görüldüğünü belirten çalışma ile benzerdir.²⁹

Sonuç olarak; *T.gondii* günümüzde önemini koruyan bir protozoondur. Çalışmamızda azitromisin bir immünomodülatör olan CV ile birlikte uygulanması *T.gondii* eliminasyonunda yüksek başarı göstermiştir. CV'nin İSB farelerde immün yanıtı düzenleyici etkisinin bildirilmiş olması TE gibi ciddi toksoplazmoz komplikasyonları yönünden risk taşıyan bireylerde CV ile AZT kombinasyon tedavisinin etkin olarak uygulanabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda CV'nin tek başına uygulanması bile enfeksiyonda yüksek oranlarda gerilemeye neden olmuş, bu sonuç toksoplazmoz yönünden risk taşıyan immün sistemi baskılanmış bireylerde profilaksiste kullanılabileceğini akla getirmiştir. Sonuçlarımız CV'nin toksoplazmoz tedavisinde kullanımı ile ilgili daha ileri çalışmalara gerek olduğunu düşündürmüştür.

Teşekkür

2211-C Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destek nedeniyle TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine ve ayrıca İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 45031)'ne teşekkür ederiz. Ayrıca projenin hücre kültürü aşamasındaki yardımları için İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Seyhun ÇOLAKOĞLU ve Sibel DOĞAN'a, istatistiksel hesaplamalardaki yardımlarından dolayı ise İstanbul Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Halim İŞSEVER'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Walker W, Roberts CW, Ferguson DJ, Jebbari J, Alexander J. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in IL-12 and gamma interferon production. *Infect Immun* 1997; 65(3): 1119-21.
2. Gutierrez Y. Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations. pp: 201-34. Oxford University Press Inc. 2000, 2nd ed. New York.
3. Mehlhom H. Encyclopedic reference of parasitology. Chapter 2519: *Toxoplasma gondii*. 2016; 2766-72.
4. Gürüz AY, Özcel MA. Toxoplasmosis. pp: 141-89. Özcel'in tıbbi parazit hastalıkları. In: M. Ali Özcel (ed). 2007, Meta Basım. Bornova, İzmir.
5. Suzuki Y, Conly PK, Remington JS. Importance endogenous INF-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* 1989; 143(6): 2045-50.
6. Araujo FG, Gupta DR, Remington JS. Azithromycin, a macrolide antibiotic with potent activity against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32(5): 755-7.
7. Kwak JH, Baek SH, Woo Y, et al. Beneficial immunostimulatory effect of short-term *Chlorella* supplementation: enhancement of natural killer cell activity and early inflammatory response (Randomized, doubleblinded, placebo-controlled trial). *Nutr J* 2012; 11: 53.
8. Dantas DCM, Kaneno R, Queiroz MLS. The effects of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*, role of natural killer cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999; 21(3): 609-19.
9. Degerli K, Kilimcioglu AA, Kurt Ö, Tamay AT, Özbilgin A. Efficacy of azithromycin in a murine toxoplasmosis model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from Turkey. *Acta Tropica* 2003; 88(1): 45-50.
10. Büyükbaba Boral O, Sönmez Tamer G, Keçeli Özcan S, Sönmez N, İşsever H, Tekeli F. Investigation of combined effectiveness of spiramycin and beta-glucan in mice models of acute toxoplasmosis and determination of IL-10, IL-12 and TNF- α levels. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(3): 446-55.
11. Muelas-Serrana S, Nagal JJ, Martinez-Diaz RA, Escario JA, Martínez-Fernández AR, Gómez-Barrio A. In vitro Screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis* 2. *J Ethnopharmacol* 2000; 71(1-2): 101-7.
12. Bahat Dinur A, Koren G, Matok I, et al. Fetal safety of macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(7): 3307-11.
13. Beckers CJ, Roos DS, Donald RG, et al. Inhibition of cytoplasmic and organellar protein synthesis in *Toxoplasma gondii* Implications for the target of macrolide antibiotics. *J Clin Invest* 1995(1); 95: 367-76.
14. Jacobson JM, Hafner R, Remington J, et al. Dose-escalation, phase I/II study of azithromycin and pyrimethamine for the treatment of toxoplasmic encephalitis in AIDS. *AIDS* 2001; 15(5):583-9.

15. Rothova A, Bosch-Driessen LEH, Loon NHW, Treffers WF. Azithromycin for ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 1998; 82(11): 1306-8.
16. Tanaka K, Koga T, Konishi F, et al. Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 1986; 53(2): 267-71.
17. Queiroz MLS, Rodrigues APO, Bincoletto C, Figueiredo CAV, Malacrida S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol* 2003; 3(6): 889-900.
18. Fillisetti D, Candolfi E. Immun response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita* 2004; 40(1): 71-80.
19. Scharton-Kersten TM, Wynn TA, Denkers EY, et al. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J Immunol* 1996; 157(9): 4045-54.
20. Johnson LA. Protective role for endogenous tumor necrosis factor in *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 1992; 60(5):1979-83.
21. Denkers EY, Gazinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(4): 569-88.
22. Gazinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin-12 is required for T lymphocyte independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(13): 6115-9.
23. Lindberg RE, Frenkel JK. Toxoplasmosis in nude mice. *J Parasitol* 1977; 63(2): 219-21.
24. Buzoni-Gatel D, Werts C. Trends *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol* 2006; 22(10): 448-52.
25. Hasegawa T, Kimura Y, Hiromatsu K, et al. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. *Immunopharmacology* 1997; 35(3): 273-82.
26. Ibusuki K, Minamishima Y. Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine *Cytomegalovirus* infections. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1990; 9(2): 121-8.
27. Yılmaz Ö, Turgay N. Sitokin ilişkili hücre içi sinyal iletimi ve paraziter enfeksiyonlardaki önemi. *Türk Parazitol Derg* 2009; 33(4): 301-6.
28. Sönmez N, Büyükbaba Boral O, Kaşali K, Tekeli F. Effects of atovaquone and astragalus combination on the treatment and IL-2, IL-12, IFN- γ levels on mouse models of acute toxoplasmosis. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(4): 639-51.
29. Ramos AL, Torello CO, Queiroz ML. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. *Nutr Cancer* 2010; 62(8): 1170-80.