

Encephalitozoon intestinalis'in Dört Farklı Hücre Hattında Üreme Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Evaluation of the Reproductive Potential of *Encephalitozoon intestinalis* in Four Different Cell Line

Ülfet ÇETİNKAYA¹, Arzu CHARYYEVA^{2,3}, Esra GÜRBÜZ³

¹ Erciyes Üniversitesi Halil Bayraktar Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Kayseri.

¹ Erciyes University Halil Bayraktar Vocational School of Health Services, Kayseri, Turkey.

² Ostrava Üniversitesi Bilim Fakültesi, Yaşam Bilimleri Araştırma Merkezi, Ostrava.

² Ostrava University Faculty of Science, Life Science Research Center, Ostrava, Czech Republic.

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

³ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Kayseri, Turkey.

* Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından (Proje no: TCD-2016-7042) desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 12.06.2018 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.09.2018

ÖZ

Microsporidia, omurgalı ve omurgasız birçok canlıda enfeksiyon oluşturan, küçük ve dış ortam koşullarına dirençli sporlara sahip parazitlerdir. Zorunlu hücre içi parazitleri oldukları için aksenik kültürleri yapılamamaktadır. Bu çalışmada, insan kolon epidermal adenokarsinoma hücresi (Caco-2), insan monositik hücreleri (U937), Afrika yeşil maymunu böbrek epitel hücre hattı (VERO) ve insan böbrek epitel hücreleri (HEK-293) olmak üzere parazitin yerleştiği doku ve organlara ait hücre hatlarında parazit kültürünün yapılması ve altı hafta boyunca spor miktarı takip edilerek bu hücre hatlarında parazitin üreme potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. U937 hücrelerinin üretilmesi için RPMI-1640 besiyeri, diğer hücre hatları içinse DMEM kullanılmıştır. U937 hücreleri, Phorbol-12-Myristate-13-Asetate ile stimülasyon sağlandıktan sonra enfekte edilmiştir. Parazit invazyonunun gerçekleşebilmesi için 37°C'de %5 CO₂'li ortamda bir gece inkübe edildikten sonra besiyeri içerisindeki serbest halde bulunan sporlar uzaklaştırılmıştır. Altı hafta boyunca tüm kültürler takip edilerek sporların konak hücrelerinden ilk çıkış süresi, enfeksiyon sonrası konak hücrelerinin durumu gözlenmiştir. Enfekte hücrelerden açığa çıkan spor yoğunluğu; kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile parazit yükü hesaplanarak ve Thoma lamı ile sayılarak farklı hücrelerde parazitin üreme potansiyelleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda dört hücre hattının da enfekte edilebildiği ve en az altı hafta boyunca enfeksiyonun devam ettiği gözlenmiştir. Enfeksiyon sonrası birkaç günlük süreçte yüzeye tutunmuş haldeki makrofaj ve Caco-2 hücrelerinin yüzeyden ayrılmaya başladığı ve böylece hücre sayısının da azaldığı gözlenmiştir. Daha sonraki günlerde HEK-293 hücrelerinin de yüzeyden ayrılarak kirli besiyerinin oluşmasına ve dolayısıyla da saf spor elde edilmesinin olumsuz yönde etkilenmesine sebep olduğu saptanmıştır. VERO hücrelerinde ikinci haftanın sonunda sporların çıkmaya başladığı görülmüş olup, diğer hücrelerde spor çıkmaya başlaması daha uzun sürmüştür. Altı hafta boyunca VERO hücrelerinde parazitin üreme potan-

siyelinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmada insan orijinli üç hücre hattı ile maymun orijinli VERO hücre hattında *E.intestinalis* üreme potansiyeli karşılaştırılmıştır. Bu çalışma, yaygın enfeksiyonlara sebep olan *E.intestinalis*'in yerleştiği doku ve organlara ait hücreleri enfekte edebildiğini ve enfeksiyonun altı hafta boyunca devam ettiğini göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların; parazit ile ilişkili genetik, farmakolojik, biyokimyasal, immünolojik alanda yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: *Microsporidia*; *Encephalitozoon intestinalis*; hücre kültürü.

ABSTRACT

Microsporidia are parasites that can cause infections in many vertebrate and invertebrate organisms and produce small spores resistant to environmental conditions. As they are obligate intracellular parasites, axenic cultures cannot be performed. The aim of this study was to investigate the reproductive potential of the parasite in human colon epidermal adenocarcinoma (Caco-2), human monocytic (U937), African green monkey renal epithelial (VERO) and human kidney epithelial (HEK-293) cell lines of tissue and organs where the parasite is located by following the culture of the parasites and the amount of spores for six weeks. RPMI-1640 medium was used for the cultivation of U937 cells, while DMEM was used for other cell lines and the immature U937 cells were stimulated with Phorbol-12-Myristate-13-Acetate before infection. All of the host cell groups were infected with freshly collected *Encephalitozoon intestinalis* spores in ratio 1:30 and free spores in the culture media were removed after overnight incubation at 37°C under 5% CO₂ condition for parasite invasion. The first release of the spores from the infected cells was observed and recorded by following for six weeks. Furthermore, the spore density released from each cell groups was evaluated by measuring the parasite load by Thoma cell counting chamber and quantified by real-time PCR. As a result of the study, it was observed that four cell lines could be infected by *E.intestinalis* and the spore production can be maintained for six weeks. It was observed that the monolayer macrophages and CaCo-2 cells, started to be detached from the culture flasks in few days following the parasite invasion, thus decreasing the number of host cells. After 1-2 weeks, HEK-293 cells were also detached from the surface, thus negatively affected the pure spore production by contaminating the media with dead host cell suspension. Spores started to appear in VERO cell media at the end of the second week after initial infection, while it took longer time for other cells to start releasing spores. Over the course of six weeks, the VERO cell line had the highest spore-producing potential among the other cell lines. In conclusion, this study compared the potential for reproduction of *E.intestinalis* in three human cell lines and monkey originated VERO cell line. This study demonstrated that cells derived from the tissues or organs where *Microsporidia* species causes disseminated infections could be infected by the parasitic spores in vitro. Additionally, the parasite can survive and propagate longer than six weeks. The authors believe that the results of this study will contribute to the further studies related to the parasite in the area of genetics, pharmacology, biochemistry, immunology and eradication studies.

Keywords: *Microsporidia*; *Encephalitozoon intestinalis*; cell culture.

GİRİŞ

Microsporidia omurgalı ve omurgasız birçok canlıda enfeksiyon oluşturan, küçük ve dış ortam koşullarına dirençli sporlara sahip parazitlerdir. Bugüne kadar tanımlanmış 144 cinsi ve bu cinslere bağlı 1200'den fazla türü bulunmaktadır. Yedi cinse bağlı 14 *Microsporidia* türü ise insanlarda patojen olarak tanımlanmıştır. Bu türler içerisinde *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon intestinalis* en sık görülen türler olup gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına yol açmaktadırlar¹⁻³. Ülkemizde *Microsporidia* ile ilgili birçok epidemiyolojik çalışma yapılmış ve bu parazitin oldukça yaygın olduğu bildirilmiştir⁴⁻⁷. Zorunlu hücre içi parazitleri oldukları için aksenik kültürleri yapılamamaktadır¹⁻³.

İn vitro kültür sistemleri, farmakoloji, biyokimya, immünoloji ve genetik gibi birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun dışında, parazit-konak ilişkisinin anlaşılması, antimikrobiyal ilaçların etkilerinin değerlendirilmesi, gen susturma ve gen tedavisi çalışmaları, parazitlerle ilişkili serolojik testlerin geliştirilmesi gibi birçok çalışmada da önemli bir temel oluşturmaktadır. Bu nedenle, yapılacak çalışmanın amacına yönelik olarak, yeterli miktarda saf spor elde etmek amacıyla parazitin kültürünü yapmak ve belirli bir süre kültürü devam ettirebilmek oldukça önemlidir.

E.intestinalis'in hücre kültürü; dışkı, idrar, bronkoalveoler lavaj (BAL), balgam, burun mukozası, duodenal aspirat ve biyopsi örnekleri gibi farklı biyolojik örneklerde yapılabilir. *E.intestinalis* in vitro hücre kültürü için tavşan böbrek (RK13), köpek böbrek (MDCK), maymun böbrek (VERO), insan fetal akciğer fibroblastları (MRC-5) gibi farklı hücre hatları kullanılmış ve bu güne kadar yapılan birçok çalışmada VERO hücre hattı parazitin üretilmesi için en uygun hücre hatlarından biri olarak bildirilmiştir⁸.

E.intestinalis, öncelikle ince bağırsak enterositlerini enfekte etmekte ve kişinin immün sisteminin paraziti yok etmek için yetersiz kaldığı durumlarda lamina propria makrofajları, fibroblastlar ve endotelial hücrelere yerleşerek yaygın enfeksiyonlara sebep olmaktadır^{1,9,10}. Bu çalışmada, parazitin yerleştiği doku ve organlara ait hücre hatlarında parazit kültürünün gerçekleştirilmesi ve altı hafta boyunca spor miktarı takip edilerek bu hücre hatlarında parazitin üreme potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Konak Hücre Hatlarının Hazırlanması

Bu çalışmada, insan kolon epidermal adenokarsinoma hücresi (Caco-2), insan monositik hücreleri (U937) ve insan böbrek epitel hücreleri (HEK-293) olmak üzere parazitin yerleştiği doku ve organlara ait olan insan orijinli üç hücre hattı ile birlikte VERO hücre hattında parazit kültüre edilmeye çalışıldı ve altı hafta boyunca spor miktarı takip edildi. Çalışmada, Caco-2 ATCC® HTB-37™, HEK-293 ATCC® CRL-1573™, VERO ATCC® CCL-81™ ve U937 ATCC® CRL1593™ hücre hatları kullanıldı.

Caco-2, HEK-293 ve VERO hücre hattının devamlılığı için aşağıda belirtildiği şekilde aynı besiyeri kullanıldı ve benzer şartlar sağlandı. Hücrelerin çözdürülmesi ve sonraki işlemler için "Dulbecco's modified eagle medium" (DMEM)- FG 0445 (Biochrom, Almanya) kullanıldı. Bu besiyeri ayrıca 2 mM L-Glutamin- 59202 (Sigma, Almanya), %10 inaktive edilmiş fetal bovine serum (FBS,10270-106) (Thermo-Fisher Scientific, ABD), 100 IU/ml penisilin + 100 µg/ml streptomisin-15140122 (Thermo-Fisher Scientific, ABD) ilave edilerek zenginleştirildi. Sıvı azotta muhafaza edilen hücreler 37°C'de sıcak su banyosunda çözdürüldü ve 9 ml besiyeri içerisinde 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine taze besiyeri ilave edilip Thoma lamında hücreler sayıldı. Hücreler süspansiyon haline getirilerek 6 kuyucuklu mikropiplara 2 ml besiyeri içerisinde 5×10^6 hücre olacak şekilde dağıtıldı ve 37°C'de %5 CO₂'li ortamda bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tutunmayan hücreler ortamdan besiyeri ile birlikte uzaklaştırıldı¹¹⁻¹³.

Promonositik insan miyeloid lösemi U937 hücre hattının kültürü 2 mM L-glutamin, %10 inaktive edilmiş FBS, 100 IU/ml penisilin + 100 µg/ml streptomisin ve 10 mM HEPES-H0887 (Sigma, Almanya) içerecek şekilde zenginleştirilmiş, RPMI-1640 R8758 (Sigma, Almanya) besiyeri kullanıldı¹⁴. Üretilen bu öncül monositik hücrelerin stimülasyonu için 10 ng/ml konsantrasyonda Phorbol-12-Myristate-13-Asetate (PMA) P8139 (Sigma, Almanya) içeren zenginleştirilmiş RPMI-1640 besiyeri kullanılmış olup, hücrelerin olgunlaşması için 72 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li ve nemli ortamda inkübasyon sağlandı^{9,10}.

***E.intestinalis* Sporlarının Hazırlanması**

Çalışmada ATCC 50506 *E.intestinalis* suşu kullanıldı. Çalışmada kullanılmak üzere yeterli sayıda sporun elde edilmesi için parazitin kültürü VERO hücre hatlarında DMEM FG 0445 (Biochrom, Almanya) besiyeri kullanılarak gerçekleştirildi (Resim 1).

Bu besiyeri, ayrıca 2 mM L-glutamin, %2 inaktive edilmiş FBS, 100 IU/ml penisilin + 100 µg/ml streptomisin ilave edilerek zenginleştirildi. Haftada iki kez besiyeri içerisindeki sporlar besiyeri ile birlikte toplandı¹¹⁻¹³. Besiyeri içerisindeki ölmüş hücreler 5 µm porluk filtreden geçirilip 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek sporlar toplandı.

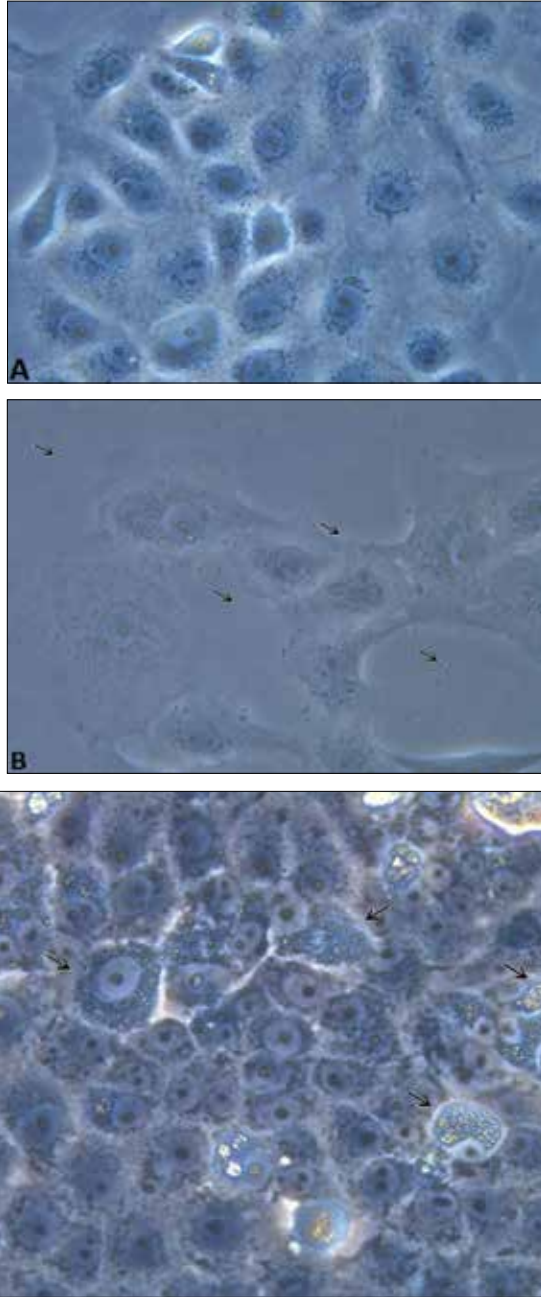
Konak Hücrelerinin *E.intestinalis* ile Enfeksiyonu

Çalışmanın bu aşamasında VERO hücre hattında kültürü devam ettirilen ve hiç dondurulmamış olan sporlar ile konak hücreleri enfekte edildi. Enfeksiyon sırasında ve enfeksiyon sonrasında kullanılan besiyerlerinde konak hücrelerinin çoğaltılmasında kullanılan farklı olarak %2 inaktive edilmiş FBS konuldu. Bir gün önceden flakslarda üretilmiş konak hücrelerinin bulunduğu besiyeri uzaklaştırılarak üzerlerine spor içeren 500 µl besiyeri eklendi. Spor miktarları Thoma lamı ile sayıldı ve hücre/spor oranı 1:30 olacak şekilde hesaplanarak, parazitin konak hücre invazyonunun gerçekleşmesi için, 37°C'de %5 CO₂'li ortamda bir gece inkübe edildi. Sonrasında besiyeri içerisinde tutunmayan sporlar uzaklaştırılarak kültüre %2 FBS içeren besiyerinden 2 ml eklendi ve haftada iki kez besiyeri yenilendi. Altı hafta boyunca devam ettirilen kültürde haftalık olarak sporlar toplandı. Kültürlerdeki spor yoğunluğu qRt-PCR ve Thoma lamı ile hesaplandı.

Enfeksiyonun Değerlendirilmesi

Konak hücrelerinden toplanan besiyeri ortamı haftalarına göre ayrıldı ve toplanan besiyerinden homojen halde bir miktar alınarak Thoma lamında spor sayımı gerçekleştirildi. Sayım sonunda 100 µl içerisindeki spor miktarı hesaplandı.

Konak hücrelerinden toplanan besiyeri ortamı haftalarına göre ayrıldı ve toplanan besiyerinden 100 µl alınarak DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu, GeneAll Exgene Cell SV Mini Kit (GeneAll, Kore) ile doku prosedürü kullanılarak üretici firma önerisine göre yapıldı. *E.intestinalis*'in 16S rRNA gen bölgesini hedef alan *E.intestinalis* F (5'-CCT GAC TGG ACG GAC AGA AG-3') ve *E.intestinalis* R (5'-TTC GTC CTT CAT CGT CAC AT-3') primerleri kullanılarak benzer prosedürle PCR işlemi gerçekleştirildi¹⁵. qRt-PCR ile spor



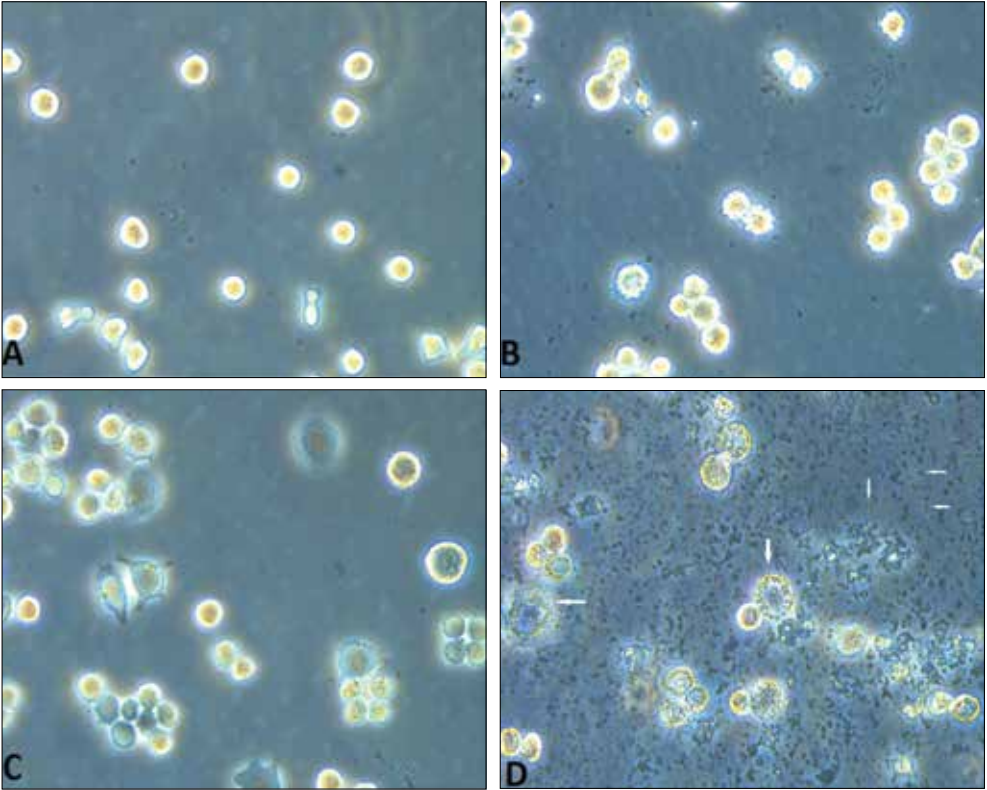
Resim 1. *Encephalitozoon intestinalis* hücre kültürü. A: Enfekte edilmemiş VERO hücreleri, B: Besiyeri içerisindeki serbest sporlar (sporlardan bazıları siyah ok ile gösterilmiştir), C: Hücre içerisinde çoğalan parazitler (Enfekte VERO hücrelerinin bazıları siyah ok ile gösterilmiştir) (invert mikroskop, x400).

yoğunluğunun hesaplanması için; *E.intestinalis* 16S SSU rRNA gen bölgesini içeren plazmid DNA'sından hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardaki seri dilüsyonlar kullanıldı. Seri dilüsyonlarda, ana sulandırımın kopya sayısı 2.8×10^9 olarak hesaplandı. Daha sonra ana stoktan onar kat sulandırım yapılarak dokuz farklı dilüsyon hazırlandı.

qRt-PCR analizi sonunda örneklerdeki parazit yükü standart eğriye göre hesaplandı ve değerlendirildi. Deneyler üç kez tekrarlandı ve verilerin ortalamaları alındı.

BULGULAR

Öncül monosit hücreleri PMA ile stimüle edildiklerinde makrofaj hücrelerine farklılaştıkları ve mikroskopik olarak incelendiğinde önemli farklılıkların olduğu görülmüştür. Süspanse halde üreyen bu hücreler uyarıldıktan sonra tek tabakalı hücrelere dönüşmüş, boyutları büyümüş ve fagositik hücre özelliği kazandıklarından dolayı yalancı ayaklar çıkartarak yıldızimsı görünüme sahip oldukları görülmüştür (Resim 2).



Resim 2. U937 hücreleri. A: Uyarılmamış immatür hücreler, B: Uyarıldıktan 24 saat sonra, C: Uyarıldıktan 72 saat sonra olgun hücreler, D: *Encephalitozoon intestinalis* ile enfekte olmuş hücreler. Ortamda serbest sporlar ve hücre içinde çoğalan parazitler beyaz ok ile gösterilmiştir (invert mikroskop, x400).

E.intestinalis sporları ile enfekte edilmiş tüm hücre gruplarının her 2-3 günde besiyeri ortamı değiştirilerek invert mikroskopunda incelenmiştir. Mikroskopik incelemede ikinci haftanın sonunda tutunmuş halde olan Caco-2 ve U937 hücrelerinin yüzeyden kopmaları nedeniyle besiyeri ortamının oldukça hızlı kirlendiği görülmüştür.

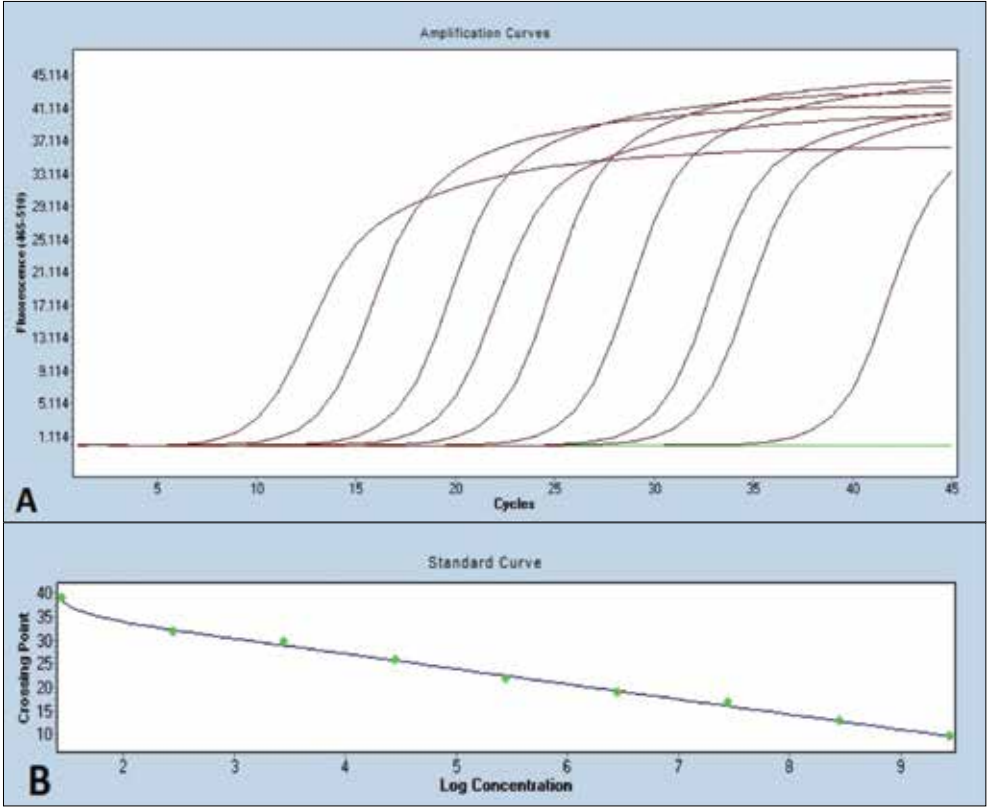
Spor miktarlarının değerlendirilmesinde iki farklı yöntem kullanılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen sonuçların birbirini destekler şekilde olduğu görülmüştür. Kantitatif olarak sonuçları değerlendirebildiğimiz qRt-PCR sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Plazmit DNA'sından hazırlanan seri dilüsyonlardan elde edilen DNA düzeyleri (kopya/ml) standart eğrinin oluşturulmasında kullanılmıştır (Resim 3).

Düzenli olarak takip edilen dört hücre hattı arasında VERO hücrelerinde 10. günde sporların çıkmaya başladığı saptanmış, diğer hücrelerde spor yapısının görülmeye başlamasının daha uzun sürdüğü tespit edilmiştir. Her hafta sonunda hücre gruplarından toplanan besiyerlerinden, serbest haldeki hücreleri uzaklaştırmak için boyutu 5 µm porlu filtrelerden süzölmüş ve parazit yoğunluğu değerlendirilmiştir. Dört hücre hattının da başarılı şekilde enfekte edildiği ve enfeksiyonun en az altı hafta boyunca devam ettirilebildiği görülmüştür.

Altı hafta boyunca VERO hücrelerinde parazitin üreme potansiyelinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Caco-2 ve U937 hücrelerinde ise spor miktarının ilerleyen haftalarda düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Altı hafta boyunca U937 hücrelerinde parazitin üreme

Tablo 1. Haftalara Göre Hücre Hatlarındaki Parazit Yoğunluğu

		Hücre hatları			
		VERO	HEK-293	Caco-2	U937
2. hafta	* Cp değeri	13.48	17.51	19.95	22.74
	** DNA düzeyleri	1.67×10 ⁸	9.39×10 ⁶	1.64×10 ⁶	2.25×10 ⁵
3. hafta	* Cp değeri	14.17	17.54	18.08	23.64
	** DNA düzeyleri	1.02×10 ⁸	9.19×10 ⁶	6.23×10 ⁶	1.18×10 ⁵
4. hafta	* Cp değeri	14.27	17.42	20.55	24.85
	** DNA düzeyleri	9.47×10 ⁷	9.99×10 ⁶	1.07×10 ⁶	4.99×10 ⁴
5. hafta	* Cp değeri	13.18	17.50	22.88	25.78
	** DNA düzeyleri	2.06×10 ⁸	9.48×10 ⁶	2.03×10 ⁵	2.56×10 ⁴
6. hafta	* Cp değeri	12.24	14.64	23.03	26.52
	** DNA düzeyleri	4.05×10 ⁸	7.25×10 ⁷	1.83×10 ⁵	1.51×10 ⁴
* Cp: Crossing point.					
** DNA Düzeyleri: Kopya/ml.					



Resim 3. *Encephalitozoon intestinalis* 16S SSu rRNA gen bölgesinden hazırlanan plazmit DNA'sından hazırlanmış seri dilüsyonların prob temelli qRt-PCR analiz sonuçları. A: Amplifikasyon eğrileri, B: Standart eğri.

potansiyelinin en düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu altı hafta süre boyunca enfeksiyonun devam ettiği görülmüştür.

TARTIŞMA

E.intestinalis konak hücre dışında aktif formu bulunmayan, tek hücreli, spor oluşturan zorunlu hücre içi parazittir. Bu nedenle de aksenik kültürü yapılamamaktadır. Konak hücresi içinde ve konak hücresi tarafından oluşturulan bir parazitoforoz vakuol içerisinde gelişmekte ve çoğalmaktadır. Çevresel şartlara dirençli olan spor, ökaryotik hücreye polar tüpü ile tutunmakta ve enfektif sporoblast polar tüp aracılığıyla konak hücresine enjekte edilmektedir^{16,17}. Parazit, konak hücresine yerleşebilmek için, vakuol membran parçalanana kadar, konakçı hücrenin normal hücre metabolizmasını ve hücresel süreçlerini devre dışı bırakmaktadır¹⁸. Parazitoforoz vakuolün çok sayıda olgun spor ile dolması sonucunda ise enfekte hücre ve vakuol parçalanarak sporlar kültür ortamında serbest kalmaktadır^{11,19}.

İnsanda enfeksiyona sebep olan *Microsporida* türlerinin birçoğunun farklı hücre hatlarında kültürünün yapılabildiği bildirilmektedir¹¹. *E.intestinalis* immün sistemi sağlam kişi-

lerde öncelikle intestinal sisteme yerleşmekte ve ishale sebep olmaktadır. İmmün sistemin baskılanması sonucunda ise makrofajlara yerleşmekte ve makrofajları bir araç gibi kullanarak vücuda dağılmaktadır. Bu çalışmada yaygın enfeksiyonlara sebep olan *E.intestinalis*'in insan orijinli ve parazitin yerleştiği organlara ait olan hücre hatlarında üreme potansiyeli araştırılmıştır.

Joseph ve Sharma⁸ yaptıkları bir çalışmada SIRC (tavşan kornea), VERO ve HeLa hücrelerinde parazitin üreme potansiyelini araştırmışlar ve *E.intestinalis*'in VERO hücre hattında daha yüksek üreme potansiyeline sahip olduğunu bulmuşlardır. Ludovisi ve arkadaşları²⁰ RK13 (tavşan böbrek), MDCK (Kanin böbrek) ve VERO hücre hatları ile yaptıkları çalışmalarında *E.intestinalis*'in VERO hücre hattında daha yüksek üreme potansiyeline sahip olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda karşılaştırılması yapılan dört hücre hattından VERO hücrelerinde parazit üreme potansiyelinin en yüksek olduğu ve altı hafta boyunca yoğun bir şekilde spor üretiminin olduğu görülmüştür (Tablo I).

E.intestinalis öncelikle ince bağırsak enterositlerini enfekte etmektedir. Bu nedenle çalışmamızda CaCo-2 hücreleri seçilmiştir. VERO ve HEK293 hücreleri ile kıyaslandığında parazitin üreme potansiyelinin düşük olduğu ve aynı zamanda enfeksiyon sonrası hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlenmiştir. Altı hafta boyunca enfeksiyon devam ettirilebilmiş olmasına rağmen spor miktarında azalma olduğu görülmüştür.

Biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılan hücre hatlarından biri olan U937 hücreleri 37 yaşındaki bir erkeğin histiyositik lenfoma dokusundan izole edilmiştir. Hücreler gerekli uyaranlarla muamele edildiğinde monositlerin farklılaşması sonucu makrofajlara dönüşebilmektedir. U937 hücreleri miyeloid bağlantılı hücreler olup uyaranlara bağlı olarak çok sayıda sitokin ve kimokin sekresyonu yapabilmektedir²¹. Çalışmamızda PMA ile monositler uyarılmış ve makrofajlara farklılaştığı gözlenmiştir. Diğer hücre hatları ile kıyaslandığında parazitin bu hücreler içerisinde üreme potansiyelinin oldukça düşük olduğu fakat çalışma sonucunda enfekte edilebildiği ve en az altı hafta boyunca enfeksiyonun devam ettiği görülmüştür (Tablo I).

HEK293 hücreleri biyoteknoloji ve hücre biyolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır²². *E.intestinalis*, immün sistemi baskılanmış hastalarda yaygın enfeksiyon oluşturmakta ve bu hastalarda böbrek tutulumu da gözlenmektedir^{23,24}. Bu nedenle bu çalışmada HEK293 hücreleri seçilmiştir. Çalışmamızda parazitin üreme potansiyelinin HEK293 hücrelerinde oldukça yüksek olduğu ve spor sayısının ise altıncı haftada belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür (Tablo I).

Sonuç olarak; bu çalışmada insan orijinli üç hücre hattı ile maymun orijinli VERO hücre hattında *E.intestinalis* üreme potansiyeli karşılaştırılmıştır. Çalışmada yaygın enfeksiyonlara sebep olan parazitin yerleştiği doku ve organlara ait olan hücrelerin parazit ile enfekte edilebildiği ve enfeksiyonun en az altı hafta boyunca devam ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın, *E.intestinalis* ile ilişkili olarak gerçekleştirilecek farmakoloji, biyokimya, immünoloji ve genetik alanlarında yer alan birçok çalışmaya katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Curry A. Microsporidiosis, pp: 529-55. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD (eds). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections; Parasitology. 10th ed. 2005. ASM Press, Washington, D.C.
2. Franzen C, Müller A. Molecular techniques for detection, species differentiation and analysis of Microsporidia. Clin Microbiol Rev 1999; 12(2): 243-85.
3. Sancak B, Akyön Y. Microsporidia: genel özellikleri, enfeksiyonları ve laboratuvar tanısı. Mikrobiyol Bul 2005; 39(4): 513-22.
4. Hamamcı B, Çetinkaya Ü, Berk V, et al. Prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in cancer patients under chemotherapy. Mikrobiyol Bul 2015; 49(1): 105-13.
5. Türk S, Doğruman Al F, Karaman Ü, et al. İshalli olgularda microsporidia sıklığının farklı boyama yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyol Bul 2012; 46(1): 85-92.
6. Karaman U, Sener S, Calık S, et al. Akut ve kronik ürtikerli hastalarda microsporidia pozitiflik oranı. Mikrobiyol Bul 2011; 45(1): 168-73.
7. Çetinkaya Ü, Hamamcı B, Kaynar L, et al. Kemik iliği transplant hastalarında *Encephalitozoon intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi* varlığının IFA-MAbs yöntemiyle araştırılması. Mikrobiyol Bul 2015; 49(3): 432-8.
8. Joseph J, Sharma S. In vitro culture of various species of microsporidia causing keratitis: evaluation of three immortalized cell lines. Indian J Med Microbiol 2009; 27(1): 35-9.
9. Orenstein JM, Dieterich DT, Kotler DP. Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. AIDS 1992; 6(10): 1143-50.
10. Mertens RB, Didier ES, Fishbein MC, et al. Encephalitozoon cuniculi microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. Mod Pathol 1997; 10(1): 68-77.
11. Visvesvara GS. In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. Clin Microbiol Rev 2002 Jul; 15(3): 401-13.
12. Ghamiloui MM, Valadkhani Z, Rahimi F. A study of microsporidiosis in corneal scrapings of keratitis patients referring to Farabi eye hospital, Tehran, Iran in 2013-14. Curr Med Mycol 2015; 1(3): 39-44.
13. Joveeta J, Vemuganti GK, Sharma S. Microsporidia: emerging ocular pathogen. Indian J Med Microbiol 2006; 23(2): 80-91.
14. Passmore JS, Lukey PT, Ress SR. The human macrophage cell line U937 as an in vitro model for selective evaluation of mycobacterial antigen-specific cytotoxic T-cell function. Immunology 2001; 102(2): 146-56.
15. Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, et al. Leishmania major amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. Infect Immun 2004; 72(5): 2582-9.
16. Çetinkaya Ü, Yazar S, Kuk S, et al. The high prevalence of encephalitozoon intestinalis in patients receiving chemotherapy and children with growth retardation and the validity of real-time PCR in its diagnosis. Turk J Med Sci 2016; 46(4): 1050-8.
17. Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Ann Rev Microbiol 2002; 56: 93-116.
18. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. Curr Opin Infect Dis 2006; 19(5): 485-492.
19. Scanlon M, Shaw AP, Zhou CJ, et al. Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle. J Eukaryot Microbiol 2000; 47(6): 525-31.
20. Ludovisi A, Rossi P, Onori AM, et al. In vitro growth on different cell lines of four microsporidial species infecting humans. Folia Parasitol (Praha) 1998; 45(4): 329-31.
21. Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. J Leukoc Biol 1985; 37(4): 407-22.

22. Fischer J, Suire C, Hale-Donze H. Toll-like receptor 2 recognition of the microsporidia *Encephalitozoon* spp. induces nuclear translocation of NF-kappaB and subsequent inflammatory responses. *Infect Immun* 2008; 76(10): 4737-44.
23. Nagpal A, Pritt BS, Lorenz EC, et al. Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 2013; 15(5): 526-32.
24. Kicia M, Wesolowska M, Kopacz Z, et al. Prevalence and molecular characteristics of urinary and intestinal microsporidia infections in renal transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22(5): 462. e5-9.