

# Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica ve Toxoplasma gondii Parazitlerinin J774, Vero ve HeLa Hücre Hatlarında Ex Vivo Kültivasyon Potansiyellerinin Değerlendirilmesi

## Evaluation of Ex Vivo Cultivation Potentials of Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica ve Toxoplasma gondii Parasites in J774, Vero and HeLa Cell Lines

Ahmet YILDIRIM (ID), Ahmet ÖZBİLGİN (ID), Kor YERELİ (ID)

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Türkiye.

\*Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje no: 2019-082) tarafından desteklenmiştir.

**Makale Atfı:** Yıldırım A, Özbilgin A, Yereli K. Trypanosoma cruzi, Leishmania tropica ve Toxoplasma gondii parazitlerinin J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında ex vivo kültür potansiyellerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2023;57(1):71-82.

### ÖZ

Önemli morbidite ve mortaliteden sorumlu olan ve makrofaj hücreleri içerisinde yerleşim gösteren layşmanyazis etkeni *Leishmania tropica*, toksoplazmozis etkeni *Toxoplasma gondii* ve Chagas hastalığı etkeni *Trypanosoma cruzi* olmak üzere üç zorunlu hücre içi protozoon parazit türü dünya nüfusunun yarısından fazlasını etkilemekte, sosyo-ekonomik ve coğrafi faktörlerle bağlantılı olarak da önemi giderek artan, ihmal edilen parazitler hastalıklarına neden olmaktadır. Bu çalışmada, *T.cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitlerinin J774, Vero ve HeLa hücrelerinde ex vivo kültürlerinin değerlendirilmesi ve virülans özelliklerini kaybetmeden kısa sürede ve fazla miktarda çoğaltılması amaçlanmıştır. Hücre kültür flasklarında konflüent olarak üretilen J774, Vero ve HeLa hücre hatlarının *T.cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitleriyle enfekte edilmesi ile ex vivo deney modelleri oluşturulmuştur. Ex vivo kültür yapılmasında bir pasaj yedi gün süresince ve ardışık üçer kez olacak şekilde uygulanmıştır. Her pasaj sonrasında yüzeyden kaldırılan hücreler sekiz odacıklı lamalara ekilmiştir. Giemsa boyalı preparatlar hazırlanarak enfeksiyon oranları ışık mikroskopisinde incelenerek değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda üç hücre hattının da *T.cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitleri ile enfekte edilebildiği ve ardışık pasajlar sonrasında tüm hücre hatlarında enfeksiyon oranlarının arttığı görülmüştür. Ex vivo kültür yapılması sonucunda *T.cruzi* ve *L.tropica* suşlarının ürettiği en iyi hücre hatlarının sırasıyla J774, Vero ve HeLa, *T.gondii* suşunun ise sırasıyla HeLa, J774 ve Vero hücre hatları olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). *Trypanosoma cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitleri J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında ex vivo kültür yöntemiyle virülans özelliklerini kaybetmeden kısa sürede ve fazla miktarda olmak üzere başarılı bir şekilde üretilmiştir. *Trypanosoma cruzi* ve *L.tropica* parazitleri için ex vivo kültür yapılması potansiyeli en iyi olan hücre hatlarının sırasıyla J774, Vero ve HeLa iken, *T.gondii* için sırasıyla HeLa, J774 ve Vero olduğu görülmüştür. Elde edilen verilerin aşı, ilaç ve yeni tanı kitleri geliştirilmesi konularında yapılacak birçok çalışmaya katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania tropica*, *Toxoplasma gondii*, ex vivo kültür.

**İletişim (Correspondence):** Dr. Ahmet Yıldırım, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye. Tel (Phone): +90 507 881 8920, E-posta (E-mail): ahmet.yildirim@cbu.edu.tr

## ABSTRACT

Three obligate intracellular protozoan parasite species, namely *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania tropica* and *Toxoplasma gondii*, causative agents of Chagas disease, Leishmaniasis and toxoplasmosis, respectively, which are responsible for significant morbidity and mortality and reside in macrophage cells, affect more than half of the world's population in connection with socio-economic and geographical factors and also causes neglected parasitic diseases of increasing importance. This study aimed to evaluate the ex vivo cultivation potential of *T.cruzi*, *L.tropica* and *T.gondii* parasites in J774, Vero and HeLa cells and to reproduce in a short time and in large amounts without losing their virulence properties. Ex vivo experimental models were created by infecting J774, Vero and HeLa cell lines confluent produced in cell culture flasks with *T.cruzi*, *L.tropica* and *T.gondii* parasites. In ex vivo cultivation, one passage was applied for seven days and three times in a row. Cells removed from the surface after each passage were plated on eight-well chamber slides. Giemsa stained slides were prepared and infection rates were evaluated by light microscopic examination. At the end of the study, it was observed that all three cell lines could be infected with *T.cruzi*, *L.tropica* and *T.gondii* parasites, and infection rates increased in all cell lines after consecutive passages. As a result of ex vivo cultivation, the best cell lines from which *T.cruzi* and *L.tropica* strains grew, were J774, Vero and HeLa, and HeLa, J774 and Vero cell lines for *T.gondii* strain, respectively ( $p < 0.05$ ). *Trypanosoma cruzi*, *L.tropica* and *T.gondii* parasites were successfully grown in J774, Vero and HeLa cell lines by ex vivo culture method in a short time and in large amounts without losing their virulence properties. Cell lines with the best ex vivo cultivation potential for *T.cruzi* and *L.tropica* parasites were J774, Vero and HeLa, respectively, while HeLa, J774 and Vero for *T.gondii*. It is thought that the data obtained in this regard will contribute to many studies on the development of vaccines, drugs and new diagnostic kits.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania tropica*, *Toxoplasma gondii*, ex vivo cultivation.

## GİRİŞ

Chagas hastalığı (CH, Amerika trypanosomiasisi), protozoon parazit olan *Trypanosoma cruzi*'nin neden olduğu potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Dünya genelinde özellikle enfekte kişilerin iş gücünün dışında kalmasına ve yılda 10 000'den fazla ölüme neden olan CH'nin en önemli halk sağlığı sorunlarından biri olduğu bilinen Latin Amerika'da yaklaşık olarak sekiz milyon insan *T.cruzi* ile enfektidir ve 25 milyon insan hastalığa yakalanma riski altındadır. Hastalığın endemik olduğu Orta ve Güney Amerika'dan yılda yaklaşık olarak 300 000 turist alan ülkemiz için de önem arz etmektedir<sup>1-3</sup>.

Layşmanyazis, Antarktika dışındaki tüm kıtalarda yayılım gösteren ve dişi kum sineği (*Phlebotomus* spp.) vektörü aracılığıyla memeli konaklara bulaşan zoonotik/antroponotik karakterli bir paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2018 yılı verilerine göre; kutanöz layşmanyazis (KL)'in 92 ülke veya bölgede, visseral layşmanyazis (VL)'in ise 83 ülke veya bölgede endemik olarak görüldüğü bildirilmiştir. Layşmanyazis için endemik bölgelerde, bir milyardan fazla insan enfeksiyon riski altında yaşamaktadır. Her yıl tahmini olarak 30 000 yeni VL ve bir milyondan fazla yeni KL olgusu bildirilmektedir. Layşmanyazis önemli bir halk sağlığı sorunu olmasına karşın günümüzde bile hastalığın kontrol altına alınması için sarf edilen çabalar yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda komşu ülkelerde patlak veren siyasi karışıklıklar ve savaş sonucunda ülkemizde yapılan yoğun göç hareketi dolayısıyla olgu sayıları ve odaklarda önemli artışlar görülmektedir. Ayrıca, yurt dışından dirençli suşların ülkemize girişinde artış görülmektedir. Bu durum, ilerideki yıllarda bu sağlık sorunda artış yaşanabileceğini göstermektedir<sup>4-6</sup>.

Toksoplazmozis, zorunlu hücre içi apikompleksan protozoon türü olan *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır. Dünya genelinde en yaygın olarak görülen parazitlerden biri olan ve birçok sıcakkanlı hayvan türünde (30'dan fazla kuş türü ve 300 memeli türü) enfeksiyona neden olabilen *T.gondii*, dünya nüfusunun tahmini olarak %30-50'sini kapsayan prevalansa sahip olmasından dolayı insanlarda yaygın olarak görülen bir enfeksiyon hastalığıdır. Ülkemizde *T.gondii* seropozitifliğinin araştırıldığı çok sayıda araştırma yapılmıştır. Son yıllardaki veriler göz önüne alındığında anti-*T.gondii* IgG pozitifliği %17.5-69.5 arasında, anti-*T.gondii* IgM pozitifliği ise %0-5.4 arasında bildirilmiştir<sup>7-9</sup>.

Chagas hastalığının etkeni olan *T.cruzi*, layşmanyazis etkeni olan *Leishmania* spp. ve toksoplazmozis etkeni olan *T.gondii* parazitlerinin üretilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. *Trypanosoma cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitlerinin ex vivo olarak üretilmesi, in vivo modellere kıyasla çok sayıda avantajlara sahiptir. Bu avantajlar arasında etik değer, düşük maliyet ve kolay uygulanabilirlik yer almaktadır. Çeşitli hücre hatlarının kullanıldığı ex vivo kültür yöntemi ile *T.cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitlerinin çoğaltılması, tanı testleri ve yeni tanı kitleri geliştirilmesi, tanıda kullanılan yöntemlerin etkinliğinin değerlendirilmesi, yeni geliştirilen ilaç moleküllerinin taranması ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi, doğal kaynaklardan ve bitkilerden elde edilen ilaç adayı moleküllerin etkinliğinin araştırılması, farklı kullanım alanlarındaki onaylı ilaçların antiparaziter etkinliğinin değerlendirilmesi, hastalıkların patogenezinin aydınlatılması, konak-parazit ilişkisinin aydınlatılması ve profilaktik ilaçların geliştirilmesi konularında yapılacak birçok çalışmaya olanak sağlaması bakımından oldukça büyük önem taşımaktadır<sup>10-15</sup>.

Bu çalışmada, *T.cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitlerinin J774, Vero ve HeLa hücrelerinde ex vivo kültürlerinin değerlendirilmesi ve virülans özelliklerini kaybetmeden kısa sürede ve fazla miktarda çoğaltılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 21/05/2019 ve Karar No: E.42581).

### Hücre Hatları

Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasında sıvı azotta saklanan J774A.1 [TIB-67, (ATCC, ABD)], Vero [Vero/An10-African green monkey kidney/maymun, (HÜKÜK, TR)] ve HeLa [HeLa/An1-Cervix epithelloid carcinom/insan, (HÜKÜK, TR)] hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları sıvı azottan çıkarıldı, sıcaklığı 37°C'ye ayarlanan su banyosunda hızlıca çözdürüldü, 1500 rpm'de beş dakika santrifüj edildi ve hücre canlılığı tripan mavisi ile ışık mikroskopunda (x 400) kontrol edildi. Santrifüj sonrasında hücre çökeltisinden ekim yapılan kültür flakları %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı, düzenli olarak invert mikroskopta hücrelerin morfolojisi ve sayısı yönünden incelendi, hücrelerin durumuna göre güneşirisi besiyeri değiştirildi ve haftada bir kültür pasajı yapıldı.

## Parazit İzolatları

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasında sıvı azot tankında saklanan *T.cruzi* (Corpus Christi) epimastigotları, *L.tropica* (MHOM/SU/58/strain-OD) promastigotları ve *T.gondii* (RH) takizoitlerini içeren parazit izolatları sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda hızlıca çözdürüldü. Parazitlerin canlılığı tripan mavisi ile ışık mikroskopunda (x 400) kontrol edildi. Çözdürülen her bir parazit izolatından 1 ml alınarak, 9 ml taze RPMI-1640 besiyeri içerisine eklenip pastör pipeti yardımıyla karışması sağlandı. Homojenizasyonu sağlanan parazit izolatları 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak elde edilen çökeltinin, *T.cruzi* epimastigotları ve *L.tropica* promastigotlarının ex vivo kültür öncesinde logaritmik faza girebilmeleri için besiyerine ekimi yapıldı. Ancak, sıvı azottan çıkarılarak çözdürülen *T.gondii* takizoitleri direkt olarak ex vivo kültür çalışmalarında kullanıldı.

Parazit yoğunluğunun artırılması amacıyla çözdürülen *L.tropica* promastigotları NNN besiyerine ve *T.cruzi* epimastigotları LIT besiyerine ekildi. İlk üreme gerçekleşikten sonra fazla miktarda üretmek amacıyla RPMI-1640 besiyerinde kültüre alındı. Ekim yapılan flasklar 26°C'lik etüvde inkübe edildi. Parazitlerin çoğalması takip edilerek 2-3 günde bir besiyerinin eklenmesiyle bol miktarda *L.tropica* promastigot ve *T.cruzi* epimastigot süspansiyonları elde edildi. Elde edilen parazit süspansiyonları ex vivo kültür yapılması için araştırmada kullanıldı.

## Ex vivo Deney Modeli

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasında, 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü flaskları içine eklenen 9 ml taze RPMI-1640 besiyerine J774, Vero ve HeLa hücre serilerinden 1 ml ekim yapıldı ve %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde bekletildi. Hücrelerin konflüent olarak tüm flask yüzeyini kaplaması ile birlikte 1 x 10<sup>6</sup> parazit/mL (*T.cruzi* epimastigotları veya *L.tropica* promastigotları veya *T.gondii* takizoitleri) yoğunluğunda parazit ekimi yapıldı, yedi gün süresince inkübasyona bırakıldı ve her gün hücre kültürlerindeki besiyeri taze RPMI-1640 besiyeri ile değiştirildi. Yedi günlük inkübasyon (birinci pasaj) sonrasında enfekte hücrelerin flask tabanından hücre kazıyıcı ile kazınması ve santrifüjlenmesi ile elde edilen enfekte hücre çökeltilerinden *T.cruzi* epimastigotlarının üretilmesi için LIT besiyerine ve *L.tropica* promastigotlarının üretilmesi için NNN besiyerine ekimi yapıldı ve üreme görülen besiyerlerinden de taze RPMI-1640 sıvı besiyerine ekim yapılarak 26°C'lik etüvde *T.cruzi* epimastigotları ve *L.tropica* promastigotlarının logaritmik fazda üremeleri sağlandı. *Toxoplasma gondii* için ise hücre çökeltisinden hazırlanan hücre süspansiyonu içerisindeki takizoitlerin elde edilmesi için 5 mikromolar (µM) por çaplı steril filtreden geçirildi ve 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve dipte kalan takizoitler taze RPMI-1640 besiyeri içerisinde süspansiyon edildi. Böylece *T.cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitlerinin her birinin dört hücre hattındaki birinci pasajları tamamlandı ve RPMI-1640 sıvı besiyerindeki *T.cruzi* epimastigotlarının, *L.tropica* promastigotlarının ve *T.gondii* takizoitlerinin konflüent haldeki yeni J774, Vero ve HeLa hücre serilerine ekimi gerçekleştirilerek ikinci pasaj aşamasına geçildi. Aynı işlemler sırasıyla ikinci ve üçüncü pasajlarda da uygulandı.

## Enfeksiyon Oranlarının Değerlendirilmesi

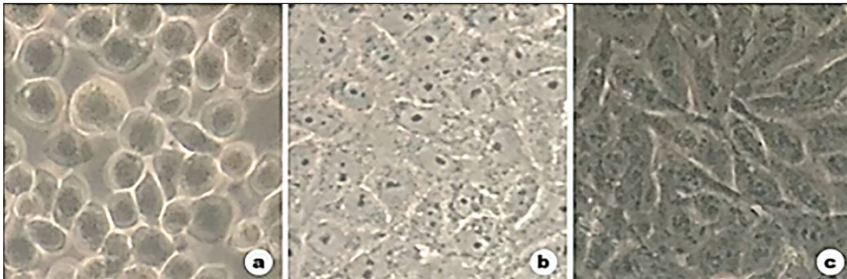
*Trypanosoma cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitlerinin ex vivo kültüründe her pasaj (yedi gün inkübasyon) sonrasında oluşan hücre içi *T.cruzi* amastigotları, *L.tropica* amastigotları ve *T.gondii* takizoitlerinin sayılarak enfeksiyon oranlarının belirlenmesi için enfekte J774, Vero ve HeLa hücre serileri hücre kazıyıcı ile kazındı. Santrifüj yapılarak elde edilen ve thoma lamında sayılarak yoğunluğu her bir odacık için  $1 \times 10^4$  olarak ayarlanan hücre çökeltisinden 100 µl alınarak sekiz odacıklı lamlara (Ibidi®, Almanya) ekim yapıldı, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde altı saat inkübe edildi ve metanol ile tespit edilip Giemsa ile boyanarak ışık mikroskopunda x 1000 büyütmede incelenerek enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki *T.cruzi* amastigotları, *L.tropica* amastigotları ve *T.gondii* takizoitlerinin sayılması ile enfeksiyon oranları değerlendirildi. Bu işlem her bir parazit izolatu ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatları için üçer pasaj sonrasında uygulandı.

### İstatistiksel Analiz

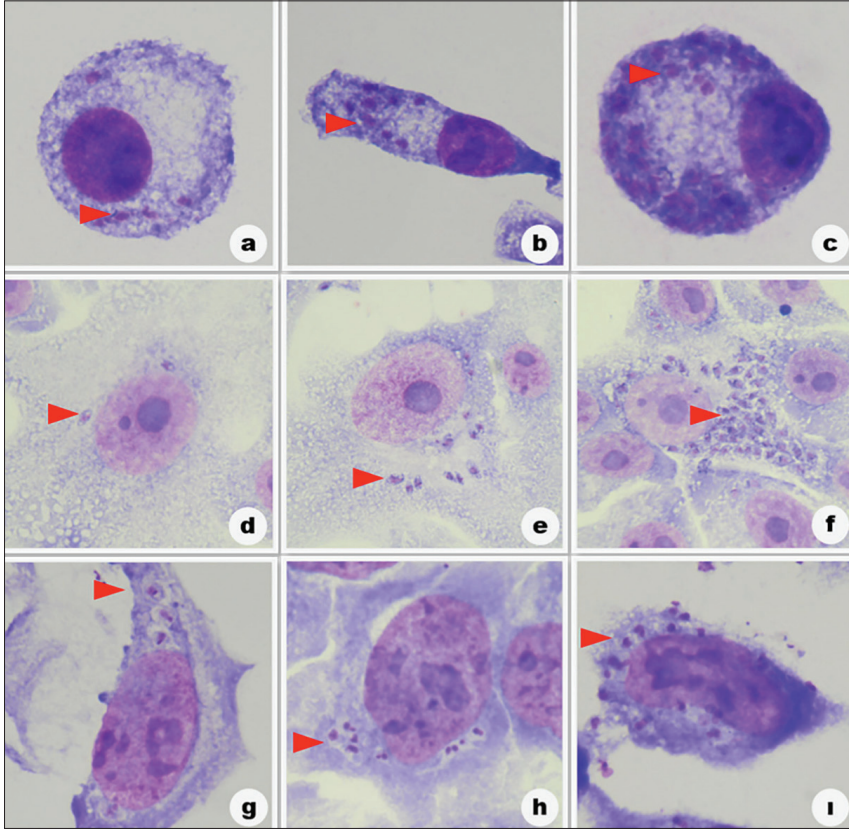
*Trypanosoma cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitlerinin ex vivo kültür yapılması Tukey's multiple comparisons testi uygulanarak ve elde edilen verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 8 yazılımı (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

### BULGULAR

Hücre kültürü flasklarına ekimi yapılan J774, Vero ve HeLa hücre hatlarının %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde flask yüzeyini kaplayarak (konflüent) başarılı bir şekilde üremeleri sağlanmıştır (Resim 1). *Trypanosoma cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* suşları; J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında ex vivo kültür yöntemi ile başarılı bir şekilde üretilmiştir (Resim 2-4). Ex vivo kültür sonucunda her pasaj sonrasında hazırlanan Giemsa boyalı preparatların ışık mikroskopunda incelenmesi ile belirlenen enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde *T.cruzi* ve *L.tropica* suşlarının ürettiği en iyi hücre hatlarının sırasıyla J774, Vero ve HeLa; *T.gondii* suşunun ürettiği en iyi hücre hatlarının sırasıyla HeLa, J774 ve Vero olduğu görülmüştür (Tablo I) (Şekil 1-3).



**Resim 1.** Hücre kültürü flasklarında konflüent olarak üreyen J774, Vero ve HeLa hücre hatlarının invert mikroskopundaki görünümü (x 400) (a. J774 hücre hattı, b. Vero hücre hattı, c. HeLa hücre hattı).

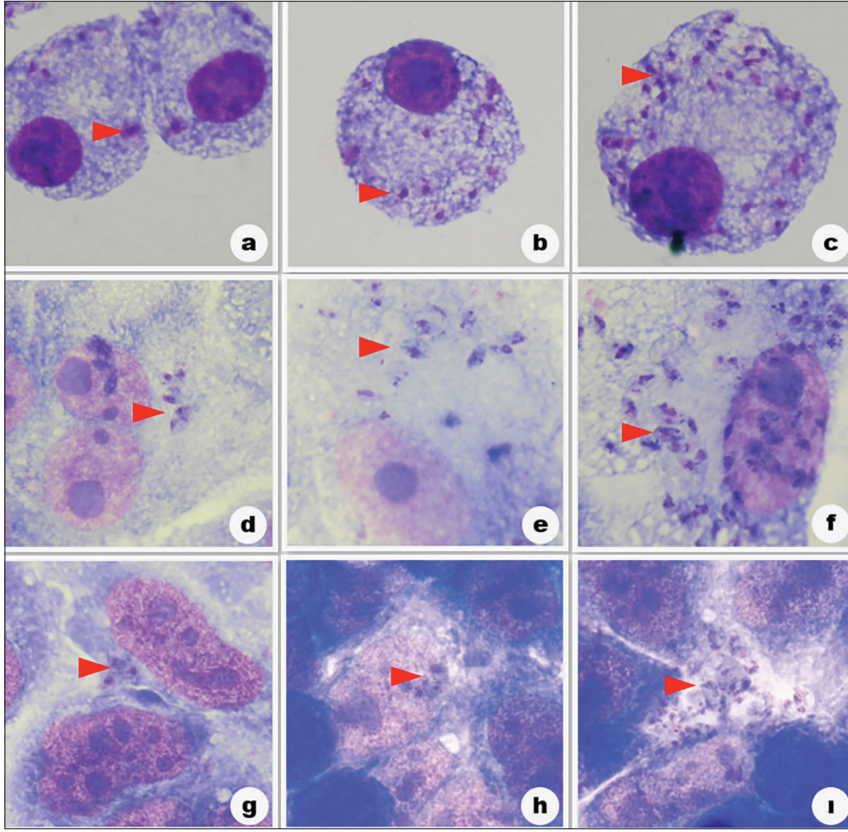


**Resim 2.** Giemsa boyalı preparatta *T.cruzi* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki amastigotların pasajlar sonrasındaki görünümü (a. J774 hücre hattında 1. pasaj, b. J774 hücre hattında 2. pasaj, c. J774 hücre hattında 3. pasaj, d. Vero hücre hattında 1. pasaj, e. Vero hücre hattında 2. pasaj, f. Vero hücre hattında 3. pasaj, g. HeLa hücre hattında 1. pasaj, h. HeLa hücre hattında 2. pasaj, ı. HeLa hücre hattında 3. pasaj).

J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında ex vivo kültürü yapılan *T.cruzi* ve *L.tropica* suşlarının her bir hücre hattındaki enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde J774 ve Vero hücre hatları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş ( $p > 0.05$ , Tukey); ancak J774 ve HeLa hücre hatları arasında ( $p < 0.05$ , Tukey) ve Vero ve HeLa hücre hatları arasında ( $p < 0.05$ , Tukey) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. *Toxoplasma gondii* suşunun her bir hücre hattındaki enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0.05$ , Tukey) (Tablo I).

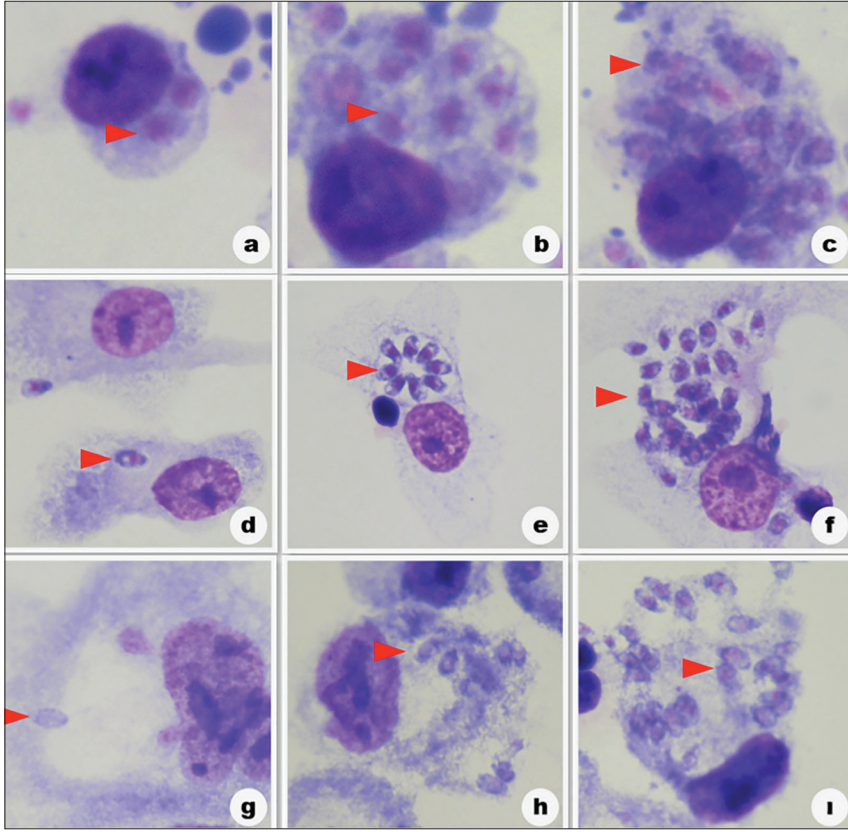
## TARTIŞMA

Chagas hastalığının etkeni olan *T.cruzi*, layşmanyazis etkeni olan *Leishmania* spp. ve toksoplazmozis etkeni olan *T.gondii* parazitlerinin ex vivo olarak üretilmesi, in vivo modellere kıyasla çok sayıda avantajlara sahiptir. Bu avantajlar arasında etik değer, düşük maliyet ve kolay uygulanabilirlik yer almaktadır. Çeşitli hücre hatlarının kullanıldığı ex vivo



**Resim 3.** Giemsa boyalı preparatta *L.tropica* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki amastigotların pasajlar sonrasındaki görünümü (a. J774 hücre hattında birinci pasaj, b. J774 hücre hattında ikinci pasaj, c. J774 hücre hattında üçüncü pasaj, d. Vero hücre hattında birinci pasaj, e. Vero hücre hattında ikinci pasaj, f. Vero hücre hattında üçüncü pasaj, g. HeLa hücre hattında birinci pasaj, h. HeLa hücre hattında ikinci pasaj, i. HeLa hücre hattında üçüncü pasaj).

kültür yöntemi ile *T.cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitlerinin çoğaltılması, tanı testleri ve yeni tanı kitleri geliştirilmesi, tanıda kullanılan yöntemlerin etkinliğinin değerlendirilmesi, yeni geliştirilen ilaç moleküllerinin taranması ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi, doğal kaynaklardan ve bitkilerden elde edilen ilaç adayı moleküllerin etkinliğinin araştırılması, farklı kullanım alanlarındaki onaylı ilaçların antiparaziter etkinliğinin değerlendirilmesi, hastalıkların patogenezinin aydınlatılması, konak-parazit ilişkisinin aydınlatılması ve profilaktik ilaçların geliştirilmesi konularında yapılacak birçok çalışmaya olanak sağlaması bakımından oldukça büyük önem taşımaktadır<sup>10-17</sup>. Yukarıda bahsi geçen bilimsel çalışmalarda kullanım alanı bulan ex vivo deney modelleri başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Ancak, ex vivo deney modellerinin oluşturulması için parazitin virülansını koruyacak şekilde ex vivo olarak üretilmesi gerekmektedir.



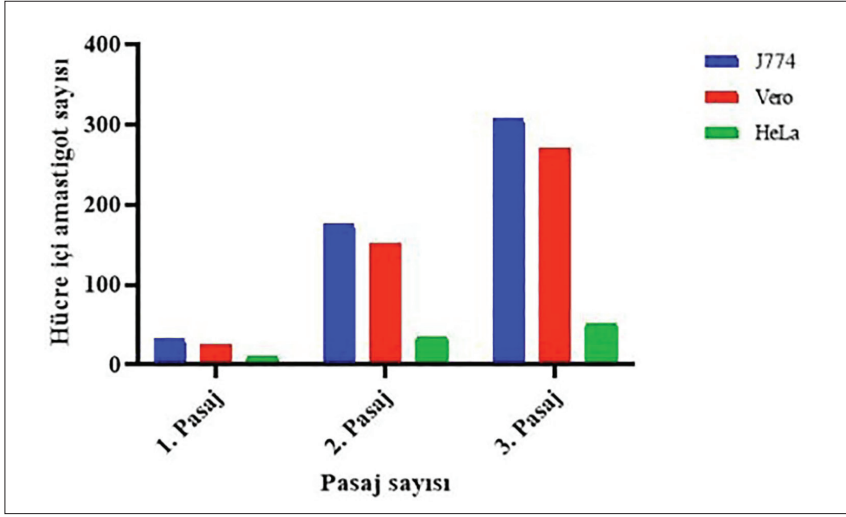
**Resim 4.** Giemsa boyalı preparatta *T.gondii* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücreleri içerisindeki takizoitlerin pasajlar sonrasındaki görünümü (a. J774 hücre hattında 1. pasaj, b. J774 hücre hattında 2. pasaj, c. J774 hücre hattında 3. pasaj, d. Vero hücre hattında 1. pasaj, e. Vero hücre hattında 2. pasaj, f. Vero hücre hattında 3. pasaj, g. HeLa hücre hattında 1. pasaj, h. HeLa hücre hattında 2. pasaj, ı. HeLa hücre hattında 3. pasaj).

**Tablo 1.** Giemsa Boyalı Preparatlarda J774, Vero ve HeLa Hücreleri İçerisindeki *T.cruzi* Amastigot, *L.tropica* Amastigot ve *T.gondii* Takizoit Sayıları

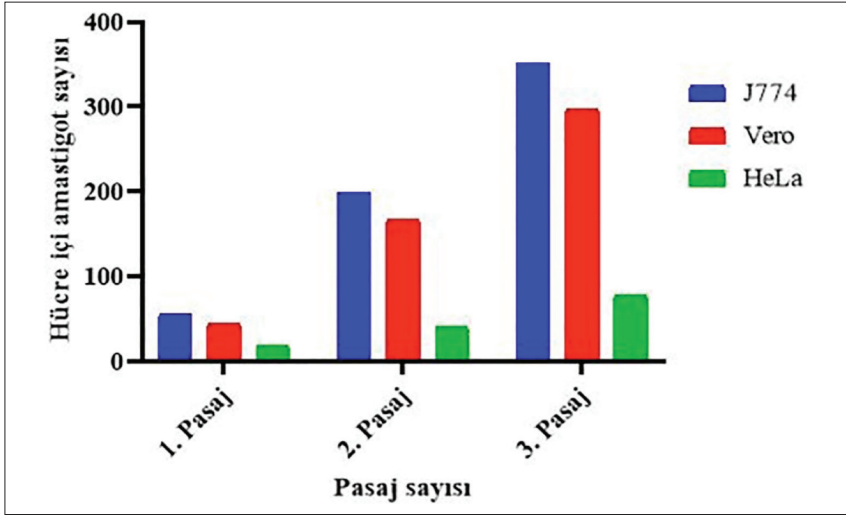
	J774			Vero			HeLa		
	1. Pasaj	2. Pasaj	3. Pasaj	1. Pasaj	2. Pasaj	3. Pasaj	1. Pasaj	2. Pasaj	3. Pasaj
<i>T.cruzi</i> (Amastigot)	32	175	307	25	152	270	11	34	51
<i>L.tropica</i> (Amastigot)	56	198	352	44	167	297	19	41	78
<i>T.gondii</i> (Takizoit)	51	210	298	24	203	270	56	280	320

Hücre içi parazitler arasında yer alan *T.cruzi*, *L. tropica* ve *T.gondii* parazitleri ile ex vivo deney modeli oluşturulmasında yapılan çalışmalarda farklı hücre hatları kullanılmıştır. Duran-Rehbein ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan bir derlemede<sup>18</sup> çalışmanın



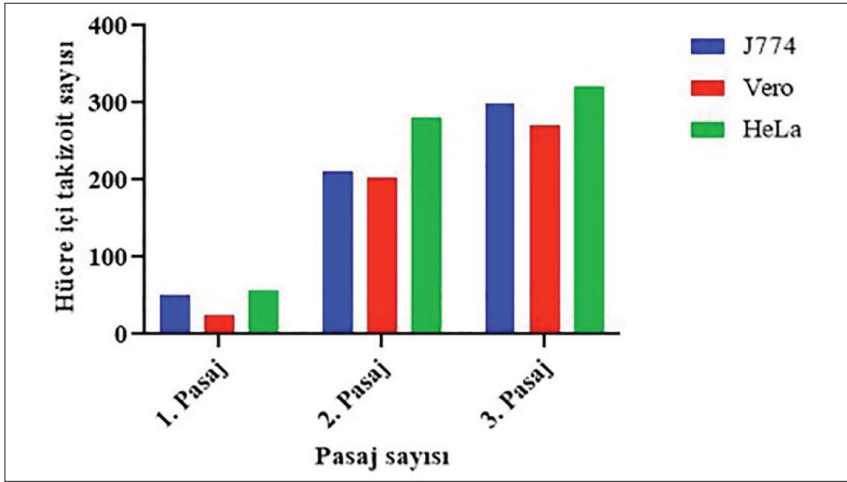


Şekil 1. *Trypanosoma cruzi* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında pasajlar sonrasındaki hücre içi amastigot sayıları.



Şekil 2. *Leishmania tropica* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında pasajlar sonrasındaki hücre içi amastigot sayıları.

amacına bakılmaksızın herhangi bir *T.cruzi* suşu veya izolatu ile enfekte hücre kültürlerinin olduğu makaleler için bilimsel dergi veri tabanları araştırılmıştır. Bu makalelerden hücre tipi, parazit genotipi, kültür koşulları ve enfeksiyon sonuçları ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. PubMed MeSH terms aracılığıyla, *Trypanosoma cruzi* ve *T.cruzi* terimleri ile birlikte aşağıda bahsi geçen hücre tiplerinin her biri ile yapılan bu bağımsız araştırmada elde edilen sonuçlara göre Vero hücreleri 177, HeLa hücreleri 103, PBMC hücreleri 44, LLCMK2 hücreleri 21, HUVEC hücreleri 5 ve HEp-2 hücreleri iki makale içinde kullanılmış-



Şekil 3. *Toxoplasma gondii* ile enfekte J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında pasajlar sonrasındaki hücre içi takizoit sayıları.

tır. Çalışmamızda, *T. cruzi*, *L. tropica* ve *T. gondii* parazitlerinin ex vivo deney modellerinin oluşturulmasında J774, Vero ve HeLa hücre hatları kullanılmıştır.

Jabari ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan ve HeLa, Vero, RBK ve A549 hücre hatlarında *T. gondii* takizoitlerinin kültürünün karşılaştırıldığı bir çalışmada, dört hattının kültürü yapılmış ve sırasıyla 5 000 000 takizoit ile enfekte edilmiştir. Her kültürde takizoitlerin ve canlı konak hücrelerin sayısı ve ortamın pH'ı değerlendirilmiştir. En yüksek takizoit verimi HeLa hücre kültüründe görülmüştür. En düşük canlı konak hücre sayısı ve en düşük pH da HeLa hücre kültüründe görülmüştür. En düşük takizoit verimi, en yüksek canlı hücre ve en yüksek pH, Vero hücre kültüründe gözlenmiştir. Dolayısıyla HeLa ve Vero hücre hatlarının, sırasıyla *T. gondii* takizoitlerinin hem hızlı hem de uzun vadeli üremeleri için uygun olduğu bildirilmiştir<sup>19</sup>.

Evans ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan ve sürekli olarak yeterli miktarda *T. gondii* takizoit üretimini sağlayabilen ve sürdürülebilir bir hücre hattı ve kültür yönteminin belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışmada<sup>20</sup>, HeLa, LLC ve Vero hücre hatları ve konvansiyonel hücre kültür flaskları, membran tabanlı kültür flaskları ve otomatik kültür sistemi olmak üzere üç hücre kültür yöntemi kullanılmıştır. HeLa hücrelerinde takizoit üremesinin, LLC hücrelerinden ( $p < 0.00005$ ) veya Vero hücrelerinden ( $p < 0.05$ ) elde edilenlerden önemli ölçüde daha yüksek verime sahip olduğu bildirilmiştir. HeLa hücrelerinde yapılan sürekli kültür sonucunda *T. gondii* üretiminin, düzenli canlı takizoit kaynağı olabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda J774, Vero ve HeLa hücre hatlarının her birinin *T. cruzi*, *L. tropica* ve *T. gondii* parazitleri ile enfekte edilebildiği ve ardışık pasajlar sonrasında tüm hücre hatlarında enfeksiyon oranlarının arttığı görülmüştür. *Trypanosoma cruzi* ve *L. tropica* parazitleri için ex vivo kültür yapılması potansiyeli en iyi olan hücre hatlarının sırasıyla J774, Vero ve HeLa iken; *T. gondii* için sırasıyla HeLa, J774 ve Vero olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, *Trypanosoma cruzi*, *L.tropica* ve *T.gondii* parazitleri J774, Vero ve HeLa hücre hatlarında ex vivo kültür yöntemiyle virülans özelliklerini kaybetmeden kısa sürede ve fazla miktarda olmak üzere başarılı bir şekilde üretilmiştir. Bu bakımdan elde edilen veriler ışığında ex vivo deney modelleri oluşturulmasının aşı, ilaç ve yeni tanı kitleri geliştirilmesi konularında yapılacak birçok çalışmaya katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasına katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 20.05.2019, Sayı: 85252386-050.04.04-).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

- Guarner J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Semin Diagn Pathol* 2019; 36(3): 164-9. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.008>
- Okuyucu A, Somuncu M. 1990-2015 yılları arasında Türkiye'ye yönelik uluslararası turizm hareketlerindeki değişim. *Türk Coğrafya Derg* 2018; 71: 7-13. <https://doi.org/10.17211/tcd.376358>
- Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* 2018; 391(10115): 82-94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Leishmaniasis fact sheet. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Accessed date: 18 Temmuz 2022).
- Özbel Y, Özensoy Töz S, Leishmaniasis, s: 199-241. Özcel MA , Özbel Y, Ak M (ed), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 22. Meta Basım Bornova, İzmir.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet* 2018; 392(10151): 951-70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Beder D, Esenkaya Taşbent F. Genel özellikleri ve laboratuvar tanısı ile *Toxoplasma gondii* enfeksiyonları. *Türkiye Parazit Derg* 2020; 44(2): 94-101. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6634>
- Paris L. Toxoplasmosis, pp: 803-813. Ryan ET, Hill DR, Solomon T, Aronson NE, Endy TP (ed), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 2020, 10<sup>th</sup> ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00106-X>
- Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis-a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One* 2014; 9(3): e90203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>
- Passero LF, Sacomori JV, Tomokane TY, Corbett CE, da Silveira FT, Laurenti MD. Ex vivo and in vivo biological behavior of *Leishmania* (Viannia) shawi. *Parasitol Res* 2009; 105(6): 1741-7. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1614-7>
- Acosta-Dávila A, Acosta-Espinel A, Hernández-de-Los-Ríos A, Gómez-Marín JE. Human peripheral blood mononuclear cells as an ex vivo model to study the host parasite interaction in *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 2020; 219: 108020. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108020>

12. Oualha R, Barhoumi M, Marzouki S, Harigua-Souiai E, Ben Ahmed M, Guizani I. Infection of human neutrophils with *Leishmania infantum* or *Leishmania major* strains triggers activation and differential cytokines release. *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 9:153. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00153>
13. Gonzalez-Fajardo L, Fernández OL, McMahon-Pratt D, Saravia NG. Ex vivo host and parasite response to antileishmanial drugs and immunomodulators. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9(5): e0003820. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003820>
14. Cobb D, Smeltz RB. Regulation of proinflammatory Th17 responses during *Trypanosoma cruzi* infection by IL-12 family cytokines. *J Immunol* 2012; 188(8): 3766-73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103478>
15. Stempin CC, Garrido VV, Dulgerian LR, Cerbán FM. Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of *Trypanosoma cruzi* in macrophages. *Acta Trop* 2008; 106(2): 119-27. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.02.004>
16. Zorbozan O, Harman M, Evren V, Erdoğan MA, Kılavuz A, Tunalı V, et al. Glia hücrelerinin antimona dirençli *Leishmania tropica* ile enfekte edilmesi: Yeni bir ex-vivo modeli. *Mikrobiyol Bul* 2018; 52(1): 49-55. <https://doi.org/10.5578/mb.66350>
17. Akarsu GA, Salın DB. In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* in various cell cultures. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30(2): 598-602. <https://doi.org/10.5336/medsci.2009-14716>
18. Duran-Rehbein GA, Vargas-Zambrano JC, Cuéllar A, Puerta CJ, Gonzalez JM. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: A review of the published literature. *Parasite* 2014; 21: 38. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014040>
19. Jabari S, Keshavarz H, Salimi M, Morovati H, Mohebbali M, Shojaee S. In vitro culture of *Toxoplasma gondii* in HeLa, Vero, RBK and A549 cell lines. *Infez Med* 2018; 26(2): 145-7.
20. Evans R, Chatterton JM, Ashburn D, Joss AW, Ho-Yen DO. Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18(12): 879-84. <https://doi.org/10.1007/s100960050423>