


Koyun Orijinli Polimorf Nükleer Lökositlerde *Toxoplasma gondii*'ye Karşı Şekillenen Hücre Dışı Tuzağın Kantitatif Analizinde Picogreen ve Sytox Orange Boyalarının Karşılaştırılması

Comparison of Picogreen and Sytox Orange Stains in Quantitative Analysis of Extracellular Trap Formed against *Toxoplasma gondii* in Polymorphonuclear Leukocytes from Sheep

Perçem Atan¹, Kader Yıldız² 

¹Sinop İl Sağlık Müdürlüğü Erfelek İlçe Devlet Hastanesi, Sinop, Türkiye

²Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

Cite this article as: Atan P, Yıldız K. Comparison of Picogreen and Sytox Orange stains in quantitative analysis of extracellular trap formed against *Toxoplasma gondii* in polymorphonuclear leukocytes from sheep. *Türkiye Parazit Derg* 2018; 42(4): 240-4.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada *in vitro* şekillenen hücre dışı tuzak yapılarının omurgasını oluşturan DNA'nın kantitatif ölçümünde iki ekstrasellüler DNA boyasının (Sytox orange ve Picogreen) etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla koyun polimorf nükleer lökosit (PMN)-*Toxoplasma gondii* takizoit kültürü model olarak alınmıştır.

Yöntemler: Çalışma kapsamında koyunlardan izole edilen PMN ve *T. gondii* takizoitleri farklı sürelerde (30, 60, 90 ve 120 dakika) inkübe edilmiş ve reaksiyon sonucunda açığa çıkan ekstrasellüler DNA iki farklı boyaya ile boyanarak ölçülmüştür.

Bulgular: Çalışma sonucunda 30 dakikalık inkubasyon dışındaki ($p=0,014$) inkubasyon sürelerinde açığa çıkan DNA'nın ölçümü bakımından iki boya arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Sonuç: İki boya arasında 30. dakikadaki boyanma farklılığı önemli bulunmuştur. Bu durumun sebebinin kullanılan boyaya ait boyama özelliği ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. *In vitro* netosis çalışan araştırmacıların kısa süreli inkubasyon sonucunda şekillenen ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizinde iki farklı boya kullanmaları önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hücre dışı tuzak oluşumu, nötrofil lökosit, Picogreen, Sytox Orange

Geliş Tarihi: 20.03.2018

Kabul Tarihi: 17.05.2018

ABSTRACT

Objective: The present study aimed to compare the effectiveness of two extracellular DNA dyes (Sytox Orange and PicoGreen) in quantitative measurement of the DNA that forms the backbone of the extracellular trap structures *in vitro*. Toward this aim, the co-culture of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and *Toxoplasma gondii* tachyzoites isolated from sheep was selected as model.

Methods: *T. gondii* tachyzoites and PMNs isolated from the sheep were incubated for varied durations (30, 60, 90 and 120 min); the extracellular DNA released following this incubation was stained using two different dyes.

Results: In the present study, no statistical significant difference was observed between the two extracellular DNA dyes with regard to the measurement of extracellular DNA released for all the incubation durations ($p>0.05$), except for the 30-min incubation ($p=0.014$).

Conclusion: There was a statistically significant difference at 30 min incubation time. This difference may be attributed to the staining properties of the dye. Researchers studying *in vitro* netosis are recommended to use two different extracellular DNA dyes for the quantitative analysis of extracellular DNA formed during short-term incubation.

Keywords: Extracellular traps formation, neutrophil leucocytes, PicoGreen, Sytox Orange

Received: 20.03.2018

Accepted: 17.05.2018

GİRİŞ

Zorunlu hücre içi yaşayan parazitik protozoon olan *Toxoplasma gondii*; takizoit, bradizoit (doku kisti içinde) ve sporozoit

(ookist içinde) olmak üzere üç farklı enfektif yaşam formuna sahiptir (1). Heteroksen gelişme gösteren *T. gondii*'nin yaşam çemberinde Felidae ailesi son konak, son konağı da kapsayan pek çok omurgalı canlı arakonaktır (1, 2).

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Kader Yıldız E.mail: kaderyildiz@hotmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5952

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolderg.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolderg.org

Çok hücreli canlılar evrimleri sürecinde, mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonlardan korunmak, vücutlarında çeşitli sebeplere bağlı hasar görmüş ya da nekroze olmuş hücrelerden arınmak için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir (3, 4). Bunlardan birisi ilk koruyucu tepkiyi oluşturan, hızla gelişen ancak patojene özgüllüğü olmayan doğal bağışıklık, diğeri ise olaya daha geç katılan ancak, etken özgüllüğü olan ve etkin savunma sağlayan kazanılmış bağışıklıktır (5).

Vücuda mikroorganizmaların girmesini engelleyen doğal bağışıklık sisteminin fiziksel bariyerleri organizmanın ilk savunma hattını oluşturur (3). Burunda yer alan kıllar, dış ortama açık solunum ve üreme sisteminden salgılanan mukus, dış kulak kanalında üretilen salgı ile epitel hücreler arasında teşkil etmiş sıkı bağlantılar patojenin vücuda girmesini engellemek için fiziksel bir bariyer görevi görür (3, 6). Bu fiziksel bariyerlere ek olarak ter, tükürük ve gözyaşında bulunan enzimler, mide ve vaginadaki asit ortam, sindirim kanalındaki hidrolitik enzimler patojenlerle savaşta ilk savunma hattının kimyasal bileşenlerini oluşturur (6). Patojenler bu ilk savunma hattını atlatmayı başardığında devreye giren ikinci savunma hattı olan hücreli savunma, fagositoz ve antimikrobiyal proteinlerinin aktivitesiyle patojenle mücadele eder (6).

Granülositler olarak da adlandırılan ve parçalı çekirdeğe sahip olan polimorf nükleer lökositler (PMN) üç farklı hücre grubunu barındırır; nötrofil, eozinofil ve bazofil. İnsan ve diğer memelilerin kan dolaşımında en fazla oranda bulunan nötrofiller (%60-70) yangı bölgesine ilk ulaşan hücrelerdir. Bu hücreler akut enfeksiyon esnasında patojene karşı konakta şekillenen ilk yanıtta önemli rol oynar (7-9). Nötrofillerde patojene karşı üç farklı yanıt şekillenir; fagositoz, degranülasyon ve hücre dışı tuzak gelişimi (10, 11).

Hücre dışı tuzak oluşumu, organizmaya giren patojenlere karşı ve otoyangısal durumlarda gelişmekte ve hücreye ait DNA, histonlar, granüler proteazlar, diğer sitoplazmik ve nükleer proteinleri katıldığı doğal bağışıklık mekanizmasıdır (10, 12). Nötrofiller dolaşımında en bol bulunan lökositler olduğundan bu aktivite daha çok nötrofillerle özleştirilmiş olsa da, mast hücreleri, eozinofil ve makrofaj gibi bağışıklık sistemi hücrelerinde de hücre dışı tuzak oluşumu gözlenmiştir (13-15). Hücre dışı tuzak gelişimi yönünde aktive olan nötrofillerde çekirdek, granüler içerik ve sitoplazma birbirleriyle karışır (10). Daha sonra hücre membranı parçalanarak bulutumsu bir görünüme sahip hücre dışı tuzak yapıları şekillenir (12, 16, 17). Granüler içerikler taşıyan hücre dışı tuzak yapıları, enfeksiyon bölgesindeki patojenlerin vücutta yayılmasını engellemekte ve antimikrobiyal etki göstermektedir (12, 15).

DeneySEL olarak *in vitro* ortamda şekillenen hücre dışı tuzaklar taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve floresans mikroskobu ile görülebilmektedir (10, 18). Ancak hücre dışı tuzakların elektron mikroskobu ile incelenmesinde bunların fibrin iplikçiklerinden ayırt edilmesi oldukça güçtür. Bunun yanı sıra histonlar, myeloperoksidaz ve kromatin iplikçikleri gibi hücre dışı tuzak yapılarına özgü unsurları bu mikroskopla ayırt etmek de mümkün olmamaktadır. Floresans mikroskop hücre dışı tuzakların kantitatif analizinde başarıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan floresans boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatinini dolayısıyla çekirdeğini görünür hale getirirler (3). Aynı zamanda histonlar, MPO ve elastaz gibi unsurlar ilgili floresans işaretli antikolar ile boyanarak tespit edilebilir. *In vitro* ortamda şekillenen hücre dışı

tuzakların kantitatif analizinde ise florometre ve flow sitometre kullanılabilir. Bu cihazlar özel floresans boya ile boyanmış protein, RNA ve DNA konsantrasyonundaki floresans ışımaya ölçer.

Hücre dışı tuzak gelişimi üzerine çalışan araştırmacıların *in vitro* deneylerde şekillenen netosis esnasında gelişen tuzakların kantitatif analizinde farklı DNA boyaları kullandıkları görülmektedir (19-32). Konuyla ilişkin literatürde hücre dışı tuzakların kantitatif analizinde kullanılan bu boyaların etkinliğinin karşılaştırıldığı yayına rastlanmamıştır. Bu çalışmada model olarak *in vitro* ortamda *T. gondii* takizoitleri ile inkube edilen koyun PMN'inde gelişen hücre dışı tuzak yapıları seçilmiştir. Bu modelde ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizi için kullanılan iki farklı floresans boyanın (Sytox Orange ve Picogreen) boyama etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Polimorf nükleer lökositlerin izolasyonu

Çalışma esnasında koyunlara yapılan uygulamalar için Kırıkale Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır (02.02.2016 tarih ve 16/07 sayı). PMN'in izolasyonu amacıyla klinik olarak sağlıklı görünen 1 yaş üzeri koyunların (n=5) *Vena jugularis*'inden usülüne uygun şekilde EDTA'lı kan tüplerine kan örnekleri alınmış, % 0,2'lik PBS-EDTA solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra Biocoll solüsyonu kullanılarak tabakalandırılmıştır. 22 °C'de 800×g hızda 35 dk süreyle santrifüj sonrası elde edilen PMN arasındaki eritrositler hemolize edilmiş, ozmotik dengeyi düzenleyebilmek için 3 mL HBSS (10x) ilave edilerek santrifüj edilmiştir (4 °C, 400×g, 10 dk). Neubauer hücre sayım kamarası ile elde edilen hücreler sayılmış ve RPMI-1640 kullanılarak 1 ml'lik hacimde 10⁶ PMN olacak şekilde sulandırmıştır. Elde edilen PMN'in canlılığı trypan blue solüsyonu ile izole edilen PMN içinde nötrofil oranı ise Diff Quick boya solüsyonu ile tespit edilmiştir.

Toxoplasma gondii takizoitleri

T. gondii Rh suşuna ait takizoitler Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan elde edilmiştir. Solüsyonundaki takizoit sayısını belirlemek için Neubauer sayım kamarası kullanılmış ve mL'de 10⁶ takizoit olacak şekilde RPMI-1640 kullanılarak sulandırmıştır.

PMN ve takizoitlerin *in vitro* kültürünün yapılması

PMN ile takizoit süspansiyonu 1:1 oranında steril reaksiyon tüpü içinde alınmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak Zymosan ile aktive edilen PMN, negatif kontrol olarak da herhangi bir kimyasalla karşılaşmamış PMN kullanılmıştır. Çalışmada deney grupları reaksiyon tüpleri ile negatif ve pozitif kontrol örnekleri 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren steril inkübatore alınmış ve 30, 60, 90 ve 120 dk süreyle inkube edilmiştir.

Ekstrasellüler DNA'nın boyanması ve kantitatif ölçümü

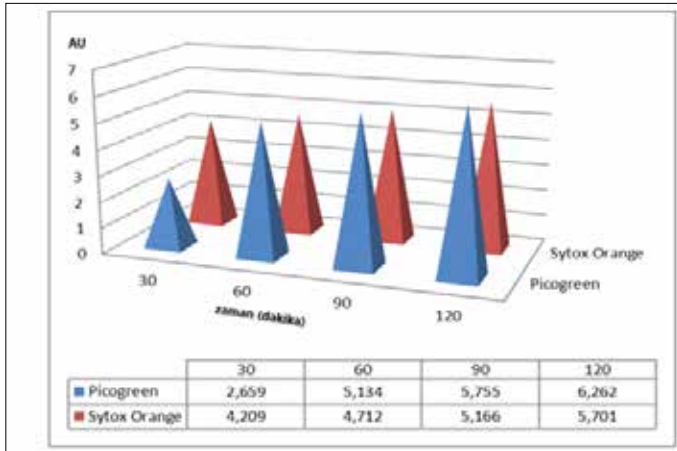
Koyun PMN'i ve takizoit kültürlerinin (1:1 oranda) her bir inkübasyon süresinin bitiminde reaksiyon tüplerine MNase (5 U) eklenmiş ve 15 dk süreyle aynı koşullarda inkübatörde tutulmuştur. Bu süre sonunda reaksiyon tüpleri santrifüj edilmiştir (4 °C, 300×g, 7 dk). Santrifüj sonrasında her bir reaksiyon tüpündeki süpernatant 96'lık immunpleyitin kuyucuklarına aktarılmıştır. Her bir reaksiyon tüpünden çift kuyucuk çalışılmıştır

İnkübasyon esnasında açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın kantitatif ölçümü için kuyucuklardan birine Sytox orange boya solü-

yonu, diğer kuyucuğa ise Picogreen boya solüsyonu eklenmiştir. Pleyt 10 dk süreyle ışık görmeyecek ortamda inkübe edildikten sonra florometreye yerleştirilmiş ve 355/460-485/538 excitation/emmission aralığında okutulmuştur. Bu çalışma farklı zamanda beş kez tekrarlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen veriler tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) ile değerlendirilmiştir. Hesaplamalar için The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows, version 21 (IBM Corp.; Armonk, NY, ABD) istatistik paket programı ve NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U test, üç ve üzeri grup karşılaştırmalarında ise Kruskal Wallis test kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin takiplerinin incelenmesinde de Friedman test ve ikili karşılaştırmalarında Wilcoxon Signed Ranks test kullanılmıştır. P değerinin <0,05 olduğu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 1. Koyun PMN'i-*T. gondii* takizoit kültürünün çeşitli sürelerde inkubasyonu esnasında açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın Picogreen ve Sytox Orange boya solüsyonu ile boyanması takininde florometre ile kantitatif ölçümü (AU: Arbitrary Unit).

Tablo 1. Deney gruplarında Picogreen ve Sytox Orange boya solüsyonu ile boyanan ekstrasellüler DNA miktarının florometre ölçümlerinden elde edilen sonuçlar

İnkubasyon süresi		Picogreen	Sytox Orange	çp
30.dk	Min-Mak (Medyan)	1,509-3,942 (2,592)	4,036-4,512 (4,251)	0,014
	Ort±Ss	2,659±1,032	4,290±0,193	
60.dk	Min-Mak (Medyan)	3,969-6,363 (5,101)	4,140-6,586 (4,340)	0,624
	Ort±Ss	5,134±1,332	4,712±1,052	
90.dk	Min-Mak (Medyan)	4,868-6,338(5,908)	4,215-6,379 (4,817)	0,327
	Ort±Ss	5,755±0,702	5,166±1,030	
120.dk	Min-Mak (Medyan)	4,534-7,706 (6,403)	4,555-6,873 (5,455)	0,624
	Ort±Ss	6,262±1,566	5,701±0,962	

çMann Whitney U Test

BULGULAR

Koyunlara ait kan örneklerinden izole edilen PMN'in %95 oranında canlı olduğu ışık mikroskopik muayene ile tespit edilmiştir. Koyu mavi renkte boyanmış parçalı çekirdeğe sahip nötrofillerin izole edilen PMN stoğunda yoğun olduğu (%97) belirlenmiştir.

İki farklı ekstrasellüler DNA boyasının etkinliğini belirlemek amacıyla model olarak seçilen koyun PMN'i ile *T. gondii* takizoit kültüründe farklı inkubasyon sürelerinde (30, 60, 90 ve 120 dk) şekillenen ekstrasellüler DNA miktarı Şekil 1'de görülmektedir. Çalışma sonucunda inkubasyon süresine bağlı (30. dk periyot hariç) açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın kantitatif ölçümünde iki boyanın etkinliği bakımından istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 1). Deneyde PMN: takizoit kültürünün 30. dakikasında açığa çıkan DNA miktarının Sytox orange boya solüsyonu kullanılarak ölçüldüğünde aynı deney sonuçlarının Picogreen boya solüsyonu ile ölçümüne göre daha yüksek veriler elde edilmiş, sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p=0,014$).

TARTIŞMA

Floresans mikroskopi *in vitro* gelişen hücre dışı tuzakların izlenmesinde başarı ile kullanılmasına rağmen bu tuzak yapılarının kantitatif analizinin de yapılması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan florometrik analiz *in vitro* hazırlanan enfeksiyöz etken: PMN kültürlerinin inkubasyonunda şekillenen netosis reaksiyonu esnasında hücre dışı alana çıkan DNA'nın kantitatif ölçülmesine dayanır. Bu reaksiyonda Picogreen, Sytox orange ve Sytox green gibi çeşitli ekstrasellüler DNA boyaları kullanılmaktadır (21, 26, 30). Bunlar hücre dışı alana çıkmış DNA'ya yüksek affiniteyle bağlanabilen, buna karşılık bütünlüğü bozulmamış hücrede yer alan DNA'ya bağlanamayan nitelikteki boyalardır (33).

Çeşitli araştırmacılar tarafından *in vitro* dizayn edilen deneysel netosis çalışmalarda şekillenen ekstrasellüler DNA miktarının kantitatif ölçümü amacıyla farklı boyalar kullanılmış ve ekstrasellüler boya tercihi de herhangi bir kriter ya da özellik belirtilmemiştir (19-32). Bu boyalardan birisi Picogreen'dir (20, 22, 24, 26, 29). Guimaraes-Costa ve ark. (20), insandan elde ettikleri PMN'i *Leishmania amazonensis* promastigotları ile *in vitro* kültüre etmeleri sonucunda ortamda açığa çıkan DNA miktarını Picogreen kullanarak tespit etmiştir. Benzer şekilde *Leishmania donovani*

promastigotları ile inkube edilen PMN'de şekillenen netosis reaksiyonunda ekstrasellüler DNA Picogreen ile belirlenmiştir (22). Keçi PMN'i ile inkube edilen *Eimeria arloingi* sporozoitleri ve ookistlerine karşı gelişen hücre dışı tuzak yapıları Picogreen ile boyanarak florometrik olarak ölçülmüştür (26). *Besnoitia besnoiti* takizoitleri ile inkube edilen sığır orijinli PMN'de gelişen tuzak yapılarındaki hücre dışı DNA da Picogreen boya ile analiz edilmiştir (24). Benzer şekilde *Cryptosporidium parvum* ookistleri ve sporozoitleri ile *in vitro* kültüre edilen sığır PMN'inde şekillenen hücre dışı tuzakları oluşturan temel unsur olan DNA, Picogreen boya ile boyanarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir (29).

Diğer ekstrasellüler DNA boyalarından olan Sytox orange ve Sytox green de *in vitro* netosis çalışmalarında hücre dışı tuzakların ana bileşeni olan DNA'nın kantitatif belirlenmesinde kullanılmaktadır (21, 30). Bu iki DNA boyası nükleik asitlere oldukça affinite göstermekte, sadece plazma membranı yırtılmış hücreleri boyamaktadır. *Eimeria bovis*'e ait sporozoitler, sığırdan izole edilen PMN ile *in vitro* ortamda karşılaştırılmış ve şekillenen ekstrasellüler DNA, Sytox orange kullanılarak florometrik olarak ölçülmüştür (21). *In vitro* inkube edilen köpek orijinli PMN'de *Neospora caninum* takizoitlerin tetiklediği hücre dışı tuzak yapılarındaki ekstrasellüler DNA miktarının kantitatif analizi Sytox green ile yapılmıştır (30).

Toxoplasma gondii'nin *in vitro* inkube edilen farklı canlılara ait PMN'lerde hücre dışı tuzak gelişimini tetiklemektedir (23, 28, 32). Fare, insan ve foktan izole edilen PMN'de *T. gondii*'ye karşı şekillenen hücre dışı tuzak yapısının öğelerinden birisi olan ekstrasellüler DNA miktarı Picogreen ile kantitatif ölçülmüştür (23, 28). *T. gondii* ile inkube edilen koyun ve sığır PMN'inde gelişen netosis reaksiyonunda şekillenen hücre dışı tuzak yapılarının omurgasını teşkil eden DNA, Sytox green kullanılarak florometrik olarak analiz edilmiştir (32). Bu çalışmada, Picogreen ve Sytox orange'ın ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizinde etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmış ve model olarak seçilen koyun PMN'in-*T. gondii* takizoitleri kültüründe açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın kantitatif analizine ait florometrik ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde (30 dakikalık inkubasyon süresi haricinde) iki boya arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Çalışmada PMN: takizoit kültürünün 30. dakikasında açığa çıkan DNA miktarının Sytox orange boya solusyonu kullanılarak daha yüksek ölçüldüğü ve bu sonucu istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,5$). Bu durumun sebebinin kullanılan boyaya ait boyama özelliği ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada seçilen her iki boya ölü hücrelerden açığa çıkan DNA'ya affinite gösteren floresans boyalardır. PMN'de hücre dışı tuzaklar patojenle karşılaşmayı takiben yaklaşık 10 dakika içinde şekillenmeye başlamaktadır (15). Bu aşamada patojenle reaksiyona girerek tuzak oluşturmaya başlayan PMN aktive olmaktadır. Çalışmada kullanılan Sytox Orange'ın inkubasyonun başlangıcında patojenle karşılaşmasını takiben hücre dışı tuzak oluşturma yönünde ilerleyen ve böylelikle ölüm sürecine giren hücreleri boyamada Picogreen'den daha etkin olduğu kanaatine varılmıştır.

SONUÇ

Canlının vücuduna giren patojen ajanlara mücadele ettiği yollarından birisi olan netosis ve bu esnada şekillenen hücre dışı tuzak yapılarının mekanizmasının anlaşılması güncel ve araştırmacıların üzerinde durduğu önemli giderek artan bir konudur. Farklı pa-

razitlerin çeşitli canlı türlerine ait PMN'de şekillendirdiği hücre dışı tuzaklara ilişkin bazı kantitatif sonuçlar verilmektedir. Çalışmalarda kullanılan ekstrasellüler DNA boyasının sonuçlar üzerine etkisi olup olmadığı hakkında bilgi literatürde mevcut değildir. Parazitlerle ilişkili *in vitro* netosis çalışmalarında yaygın kullanılan floresans özellikte DNA boyalarından ikisinin (Sytox orange ve Picogreen) etkinliğinin araştırıldığı bu çalışma sonucunda deneyin 30 dakikalık inkubasyon periyodu dışındaki sürelerde istatistiksel yönden önemli bir farklılığa rastlanmamıştır.

Etik Komite Onayı: Çalışma esnasında koyunlara yapılan uygulamalar için Kırıkkale Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır (02.02.2016 tarih ve 16/07 sayı).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – K.Y., P.A.; Tasarım – K.Y., P.A.; Denetleme – K.Y.; Kaynaklar – P.A.; Malzemeler – K.Y., P.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi – P.A.; Analiz ve/veya Yorum – P.A., K.Y.; Literatür Taraması – P.A.; Yazıyı Yazan – P.A., K.Y.; Eleştirel İnceleme – K.Y.

Teşekkür: T. gondii takizoitlerinin temininde yardımcı olan Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Parazitoloji Laboratuvarı'ndan Uzman Dr. Cahit Babür'e teşekkür ederiz. Bu çalışma yüksek lisans tez çalışmasından özetlenmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2016-144).

Ethics Committee Approval: All animal handling procedures were approved by the Kırıkkale University Local Ethics Committee for Animal Experiments (02.02.2016, Protocol no: 16/07).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – K.Y., P.A.; Design – K.Y., P.A.; Supervision – K.Y.; Resources – P.A.; Materials – K.Y., P.A.; Data Collection and/or Processing – P.A.; Analysis and/or Interpretation – P.A., K.Y.; Literature Search – P.A.; Writing Manuscript – P.A., K.Y.; Critical Review – K.Y.

Acknowledgement: We would like to thank Dr. Cahit Babür from the Public Health Agency of Turkey Parasitology Laboratory, which helped in the provision of *T. gondii* tachyzoites. This study is summarized from a thesis.

Conflict of Interest: Authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was financially supported by the Scientific Research Committee of Kırıkkale University (Project no: 2016-144).

KAYNAKLAR

1. Dubey JP. Toxoplasmosis in Animals and Humans, 2nd Ed, CRC Press, Boca Raton, FL; 2010. p: 1-313.
2. Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2009; 364: 2749-61. [CrossRef]
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System. Temel İmmünoloji İmmün Sistem İncelemeleri ve Bozuklukları. 4th ed. Çeviren: Camcioğlu Y, Deniz G, Güneş Tıp Kitapevleri Ankara; 2016. s:17-40.
4. Eales JC. Immunology for Life Scientists, 2nd. ed. John Wiley & Sons, Inc, USA; 2005. p:75.
5. Simon EJ, Dickey JL, Hogan KA, Reece JB. Campbell Essential Biology with Physiology. Campbell Temel Biyoloji Fizyoloji İlaveli. 5th ed. Çeviren: Gündüz E, Türkan İ, Palme Yayıncılık Ankara; 2016.

6. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 173-82. [\[CrossRef\]](#)
7. Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol* 2007; 15: 87-92. [\[CrossRef\]](#)
8. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801. [\[CrossRef\]](#)
9. Phillipson M, Kuberski P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 2011; 17: 1381-90. [\[CrossRef\]](#)
10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss D.S, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-35. [\[CrossRef\]](#)
11. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012; 189: 2689-95. [\[CrossRef\]](#)
12. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin. *J Cell Biol* 2012; 198: 773-83. [\[CrossRef\]](#)
13. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol* 2012; 3: 420.
14. Je S, Quan H, Yoon Y, Na Yirang, Kim BJ, Seok SH. Mycobacterium massiliense induces macrophage extracellular traps with facilitating bacterial growth. *PLoS One* 2016; 11: e0155685. [\[CrossRef\]](#)
15. Yıldız K. Netosis: Nötrofilin patojenle savaşta kullandığı alternatif savunma yöntemi. *Türkiye Parazit Derg* 2016; 40: 158-62. [\[CrossRef\]](#)
16. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 577-82. [\[CrossRef\]](#)
17. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231-41. [\[CrossRef\]](#)
18. Puralı N. Fonksiyonel hücre görüntüleme teknikleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 107-13.
19. Baker VS, Imade GE, Molta NB. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age. *Malar J* 2008; 7: 41. [\[CrossRef\]](#)
20. Guimarães-Costa AB1, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Send to Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 6748-53. [\[CrossRef\]](#)
21. Behrendt JH, Ruiz A, Zahner H, Taubert A, Hermosilla C. Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite Eimeria bovis. *Vet Immun Immunopathol* 2010; 133: 1-8. [\[CrossRef\]](#)
22. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 2010; 185: 4319-27. [\[CrossRef\]](#)
23. Abi Abdallah DS, Lin C, Ball CJ, King MR, Duhamel GE, Denkers EY. Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun* 2012; 80: 768-77. [\[CrossRef\]](#)
24. Munoz Caro T, Hermosilla C, Silva LMR, Cortes H, Taubert A. Neutrophil extracellular traps as innate immune reaction against the emerging apicomplexan parasite Besnoitia besnoiti. *PLoS One* 2014; 9: e91415. [\[CrossRef\]](#)
25. Munoz Caro T, Silva LM, Ritter C, Taubert A, Hermosilla C. Besnoitia besnoiti tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation. *Parasitol Res* 2014; 113: 4189-97. [\[CrossRef\]](#)
26. Silva LMR, Munoz Caro T, Gerstberger R, Vila-Vicosa MJM, Cortes HC, Hermosilla C, et al. The apicomplexan parasite Eimeria arloingi induces caprine neutrophil extracellular traps. *Parasitol Res* 2014; 113: 2797-807. [\[CrossRef\]](#)
27. Morgado FN, Nascimento MT, Saraiva EM, de Oliveira-Ribeiro C, Madeira Mde F, da Costa-Santos M, et al. Are neutrophil extracellular traps playing a role in the parasite control in active American tegumentary leishmaniasis lesions. *PLoS One* 2015; 10: e0133063. [\[CrossRef\]](#)
28. Reichel M, Munoz Caro T, Sanchez Contreras G. Harbour seal (Phoca vitulina) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. *Dev Comp Immunol* 2015; 50: 106-15. [\[CrossRef\]](#)
29. Munoz Caro T, Lendner M, Dausgschies A, Hermosilla C, Taubert A. NADPH oxidase, MPO, NE, ERK1/2, p38 MAPK and Ca2+ influx are essential for Cryptosporidium parvum induced NET formation. *Dev Comp Immunol* 2015; 52: 245-54. [\[CrossRef\]](#)
30. Wei Z, Hermosilla C, Taubert A, He X, Wang X, Gong P, et al. Canine neutrophil extracellular traps release induced by the apicomplexan parasite Neospora caninum in vitro. *Front Immunol* 2016; 7: 436. [\[CrossRef\]](#)
31. Avila EE, Salaiza N, Pulido J, Rodriguez MC, Diaz-Godinez C, Lacleite JP et al. Entamoeba histolytica trophozoites and lipopeptidophosphoglycan trigger human neutrophil extracellular traps. *PLoS One* 2016; 11: e0158979. [\[CrossRef\]](#)
32. Yıldız K, Gokpınar S, Gazyağcı AN, Babur C, Sursal N, Azkur AK. Role of NETs in the difference in host susceptibility to Toxoplasma gondii between sheep and cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2017; 189: 1-10. [\[CrossRef\]](#)