



Toxoplasma gondii Takizoit ve Doku Kistlerinin Kriyoprezervasyonu

Cryopreservation of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Tissue Cysts

Mert Döşkaya¹, Ayşe Caner¹, Hüseyin Can², Sultan Gülce İz³, Aysu Değirmenci¹, A. Yüksel Gürüz¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye

ÖZET

Toxoplasma gondii takizoit ve doku kistleri çalışmaları aşı, tanı testleri ve ilaç araştırmaları, biyokimyasal ve moleküler yapı çalışmaları gibi birçok bilimsel çalışmada kullanılmaktadır. Doku kisti ve takizoitlerin sürekli *in vivo* pasajlanması zahmetli bir işlem olduğu kadar diğer yandan sürekli hayvan kullanılmasından kaynaklanan yüksek maliyetli ve etik sorunlar çıkaran bir işlemdir. Takizoitlerin ve doku kistlerinin kriyoprezervasyonunun gerektiğinde *in vivo* canlandırılması ekonomik kayıpları, iş gücü ve hayvan etik sorunlarını azaltılabilecektir. Bu makalede takizoit ve doku kistlerinin farelerde, intraperitoneal üretimi, kriyoprezervasyon için hazırlanması ve kriyolanmış örneklerin çözülürülerek farelere tekrar uygulanması detaylı olarak tarif edilmiştir. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 44-6)

Anahtar Sözcükler: Kriyoprezervasyon, doku kisti, takizoit

Geliş Tarihi: 16.11.2012 **Kabul Tarihi:** 03.12.2012

ABSTRACT

Toxoplasma gondii tachyzoites and tissue cysts are largely used for developing diagnostic assays, vaccines and in drug research as well as biochemical and molecular structure studies. Continuous passaging of tachyzoites or tissue cysts in animal models encounter ethical and economical problems and it is a time consuming procedure. Cryopreservation of tachyzoites and tissue cysts and revitalization of cryopreserved samples whenever needed, can decrease the economical loss, ethical problems and labour. In the present article, production of tachyzoites and tissue cysts in mice, preparation of samples for cryopreservation, cryopreservation of tachyzoites and tissue cysts, defrosting of cryopreserved samples and reinoculation to mice have been described in detail. (*Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 44-6)

Key Words: Cryopreservation, tissue cyst, tachyzoite

Received: 16.11.2012

Accepted: 03.12.2012

GİRİŞ

Toxoplasma gondii, bir protozoon parazit olup, kuşlar dahil tüm memelileri enfekte edebilmektedir. Tıbbi önemi yüksek olan parazitin dünyadaki insanların yaklaşık üçte birini enfekte ettiği tahmin edilmektedir (1-3). İnsanlarda genelde asemptomatik seyretmekle beraber, düşük, ölü doğum, konjenital toxoplasmosis, görme bozuklukları, ensefalit, organ reddi ve hatta ölüme dahi yol açabilen klinik tablolar yaratabilmektedir (4-8). Bu parazitin morfolojik özelliklerinin

ve evriminin en ince detaylarının açıklığa kavuşması toxoplasmosis tanısı, tedavisi ve aşı çalışmaları açısından büyük önem taşımaktadır.

T. gondii'nin kompleks hayat döngüsün de üç form; takizoitler, bradizoitler (doku kisti içinde) ve sporozoitler (ookist içinde) tanımlanmıştır. *T. gondii*'nin evriminde takizoitler hızlı bölünen form olup tüm insan hücrelerini işgal edebilmektedir ve akut enfeksiyondan sorumludurlar (8, 9). Ortalama 14 gün içinde, işgal ettikleri hücrede bölünme hızları yavaşlaya-

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Aysu Değirmenci, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye Tel: +90 232 390 47 34 E-posta: aysu.degirmenci@ege.edu.tr

doi:10.5152/tpd.2013.11

rak bradizoitlere dönüştür ve kronik enfeksiyondan sorumlu doku kistlerini oluştururlar. Parazitin bu aseksüel döngüsü dışında, sadece kesin konak olan kedide gerçekleşen bir de seksüel döngüsü vardır. Bu döngüde kediler *T. gondii*'yi ookist veya doku kisti olarak alırlar. Kedinin bağırsak epitel hücrelerinde farklılaşarak oluşan mikrogametosit ve makrogametositler, gametogoni ile mikrogamet ve makrogametlere dönüşmektedir. İki uzun flagellalı mikrogametlerin, makrogametleri dölemesi ile oluşan zigotun etrafında duvar oluşur ve bu forma ookist denir. Enfekte epitel hücrelerini patlatarak çıkan ookistler bağırsak yolu ile dış ortama atılmaktadırlar (5, 6, 8, 9). Dış ortama atılan ookist içinde, çevre ısısı ve oksijen miktarına bağlı olarak 1-21 gün içinde sporogoni ile öncelikle iki adet sporokist, her sporokistin içinde ise dönder adet sporozoit gelişir. Ookistlerin nemli toprakta ortalama 18 ay boyunca canlılığını koruyabildiği gösterilmiştir (5, 6).

T. gondii tanı testlerinde, etkene karşı geliştirilen aşı, ilaç çalışmaları yanında biyokimyasal ve moleküler yapı araştırmalarında, parazitin hayat döngüsünde yer alan takizoit ve bradizoit formları sıklıkla kullanılmaktadır. Bu formların istenildiğinde el altında bulunabilmesi için araştırma merkezlerinde sürekli *in vivo* sağlama yerine kriyoprezervasyona başvurulmaktadır (2-10). Bu makalede *T. gondii* RH Ankara suşu takizoitleri ve PRU suşu doku kistleri ile farelerde gerçekleştirilen pasajlama tekniği anlatılacak ve sonrasında elde edilen formların kriyoprezervasyon işlemleri detaylı olarak anlatılacaktır.

YÖNTEMLER

1. Kullanılan Hayvanlar

T. gondii takizoit ve doku kisti üretiminde 4-6 haftalık BALB/c veya Swiss outbred fareler kullanılmaktadır.

2. *T. gondii* RH Ankara Suşu Takizoitlerinin Farelerde Pasajlanması

Daha önceden *T. gondii* takizoitleri ile enfekte edilmiş farelere CO₂ ile ötenazi sonrası servikal dislokasyon uygulanır. Daha sonra farenin batin bölgesi %70 etanol ile spreylenecek, periton zarına kadar olan deri kısmı açılır ve iki yana diseksiyon yapılır. Periton alt-orta hattan açılarak intraperitoneal alan periton duvarına doğru pastör pipeti ile yaklaşık 10 mL steril %0.9 NaCl püskürtülerek yıkanır ve periton çalkantı suyu steril olarak 15 mL tüpe aktarılır (Resim 1A, B). Elde edilen eksudadaki takizoit miktarı, ışık mikroskopunda 40x objektifte hemositometre ile sayıldıktan sonra 1x10⁶/mL takizoit içerecek şekilde sulandırılır. Bu örnekten alınan 100 µL (yaklaşık olarak 1x10⁵ takizoit içerir) 4-6 haftalık farelere intraperitoneal olarak uygulanır. İlk günü takip eden 3. veya 4. günde pasaj tekrarlanır (10-12).

2.1. Takizoitlerin Kriyoprezervasyon için Hazırlığı

Bölüm 1.1.'de anlatıldığı gibi enfekte farelere ortalama 4. günde CO₂ ile ötenazi sonrası servikal dislokasyon uygulanır. Sonra batin bölgesi %70 etanol ile spreylenecek ve periton zarına kadar deri kısmına diseksiyon uygulanır, periton açılmaz. Steril 5 mL enjektöre 2 mL %0.9 NaCl çekilir. Periton steril penset ile kaldırılır ve 2 mL %0.9 NaCl periton içine verilip, periton penset ile hafifçe çalkalanır. Enjektör iğnesi çıkarılır ve plastik kısmı ile verilen 2 mL %0.9 NaCl geri çekilir (Resim 1C). Eksuda içinde bulunan takizoit miktarı, ışık mikroskopta 40x objektifte hemositometre ile sayıldıktan sonra zaman geçirmeden kriyoprezervasyon işlemine geçilir.

3. *T. gondii* PRU Suşu Doku Kistlerinin Pasajlanması ve Kriyoprezervasyon için Hazırlığı

Daha önce *T. gondii* doku kistleri ile enfekte edilmiş 4-6 haftalık BALB/c veya Swiss outbred farelere ötenazi uygulanır. Fare tüplerinin ortama uçmaması için %70 etanol ile spreylenecek. Steril penset ve makas ile kafa kaide kemikleri açılır, çıkarılan beyin dokusu, 1 mL %0.9 NaCl içeren 50 mL'lik tüpe aktarılır (Resim 1D, E). Beyin dokusu 20 G 1" enjektör iğnesi bulunan 5 mL enjektör ile 50 mL tüp içinde homojenize edilir ve üzerine 3-4 damla Penisilin (10.000 U/mL)/Streptomisin solüsyonu (10.000 µg/mL) (Biochrom) eklenir (Resim 1F). Homojenattan alınan 4 adet 20 µL örnek lam lamel arasında ışık mikroskopta 20x büyütmede incelenir ve kist miktarı sayılır. Elde edilen homojenat, kriyoprezervasyon ve pasajlama için kullanılabilir.

Örnek gece boyunca +4°C'de saklandıktan sonra sağlam farelere intraperitoneal olarak ortalama 10-15 doku kisti olacak şekilde pasajlanır. Yaklaşık 40 günde enfekte farelerde oluşan doku kistleri ile tekrar pasaj yapılabilir. Pasaj aralığı 6 ayı geçmemelidir (10-12).

4. Kriyoprezervasyon

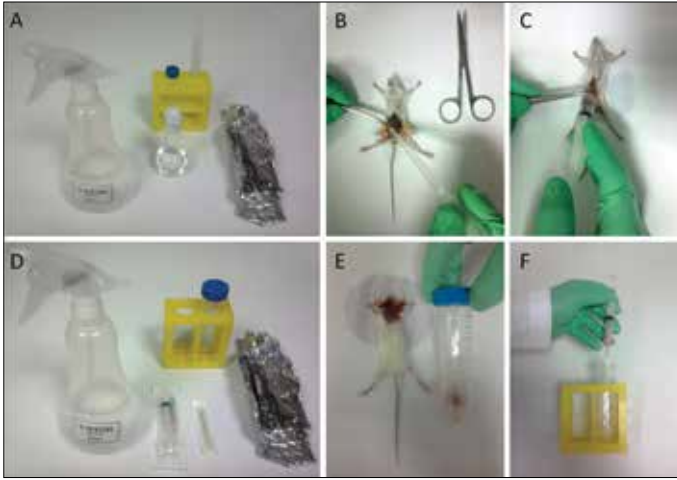
Bölüm 2.1. ve 3.'te anlatıldığı gibi elde edilen 0.5 mL takizoit içeren eksuda veya doku kisti içeren homojenat, önceden hazırlanmış 2 mL kriyo tüpü içindeki 1 mL kriyoprezervasyon solüsyonuna (150 µL Dimethyl Sulfoxide (Dimetilsülfoksit; DMSO), 150 µL FBS (Fetal Bovine Serum) içeren 700 µL RPMI 1640 besiyeri) eklenir. Daha sonra doku kisti içeren kriyo tüplerinin 15-45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmesi gerekmektedir. Kriyoprezervasyon tüplerinin üzerine suşun adı, tüp içinde ne kadar takizoit veya doku kisti bulunduğu ve tarih yazılması önemlidir. Takizoit içeren kriyo tüpü hemen, doku kisti içeren tüp ise inkübasyon sonrası, -80°C derin dondurucuda bulunan strafor kutu içine konulur. Ortalama 4 saat sonra kriyo tüp -80°C derin dondurucuda bulunan kriyo kutusuna aktarılır (12).

4.1. Kriyoprezervasyonda Bulunan Örneklerin Çözdürülmesi

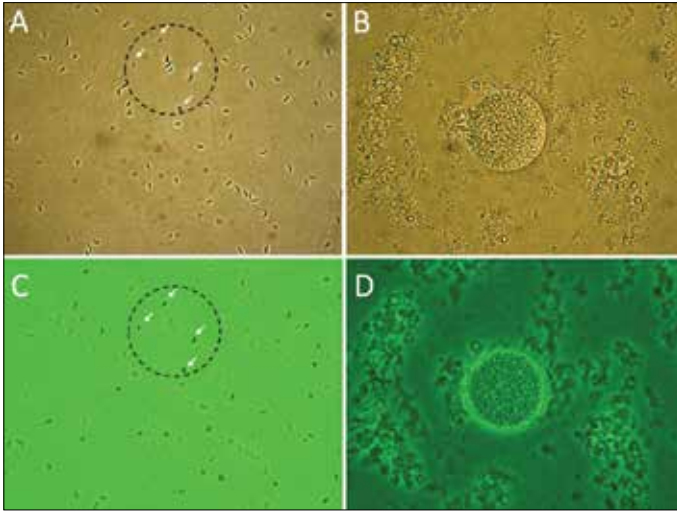
Kriyoprezervasyon solüsyonunda bulunan DMSO takizoit veya doku kistlerine zarar verebileceğinden, çözündürme işlemi hızlı gerçekleştirilmelidir. Bunun için daha önceden hazırlanmış 5 mL RPMI 1640 besiyeri içeren 15 mL tüp ve steril pastör pipeti hazırlanır ve su banyosu 37°C'ye getirilir. Kriyo tüp -80°C derin dondurucudan çıkarıldığı gibi 37°C su banyosuna konulur ve içerik çözüldükten hemen sonra steril pastör pipeti ile 5 mL RPMI 1640 besiyeri içeren 15 mL tüpe eklenir. Daha sonra tüp 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üst sıvı 0.5 mL kalana kadar pastör pipeti ile atılır ve pellet üstüne 2 mL RPMI 1640 eklenerek, pastör pipeti ile yavaşça homojenize edilir.

Homojenattan alınan örnekteki takizoit miktarı, ışık mikroskopta 40x objektifte canlılık açısından faz kontrast mikroskopi ile değerlendirilir (Resim 2A-C). Daha sonra 1x10⁶/mL canlı takizoit içerecek şekilde RPMI 1640 ile süspanse edilir ve en az 3 fareye intraperitoneal yoldan farklı miktarlarda (100-300 µL) uygulanır.

Doku kisti içeren homojenattan alınan 4 adet 20 µL örnek içinde bulunan doku kistlerinin canlılığı lam lamel arasında ışık ve faz kontrast mikroskopunda 20x büyütmede değerlendirilir ve kist miktarı sayılır (Resim 2B-D). Daha sonra sağlam farelere intraperitoneal yoldan 10-15 canlı kist olacak şekilde verilir. Yaklaşık 40 gün sonrasında enfekte farelerin beyininde oluşan doku kistleri ile tekrar pasaj yapılabilir.



Resim 1. *T. gondii* RH Ankara suşu takizoitleri ve PRU suşu doku kistlerinin kriyoprezervasyonu için hazırlığı. (A-B) Takizoit pasajı için gerekli malzemeler ve pasajlama (C) Takizoit kriyoprezervasyonu için eksuda örneği alımı. (D) Doku kisti pasajı için gerekli malzemeler. (E, F) Doku kisti kriyoprezervasyonu için örnek alımı ve homojenizasyon



Resim 2. *T. gondii* RH Ankara suşu takizoitleri ve PRU suşu doku kistlerinin ışık mikroskop (A, B) ve faz kontrast (C, D) mikroskop görüntüleri (x40 büyütme). (A-C) Yuvarlak içine alınmış bölgedeki oklar canlılığını yitirmiş takizoitleri göstermektedir

SONUÇ

Parazitin değişik evrim formlarını elde etmek için sürekli pasajlarda deney hayvanı veya hücre kültürü kullanımı ekonomik ve etik açıdan, olduğu kadar iş gücü kayıpları açısından da çeşitli sorunları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle kriyoprezervasyonun ihtiyaç duyulduğunda çözdürülerek kullanılması bu sorunların

önüne geçmektedir. Pek çok parazit türleriyle başarılı kriyoprezervasyon çalışmaları yapılabilmektedir (13, 14).

T. gondii, hücre biyolojisi ve moleküler çalışmaları için iyi bir model olması yanında tıbbi ve veterinerlik çalışmalarında sıklıkla kullanılması nedeniyle çok sayıda araştırmada yararlanılmaktadır (2). Laboratuvarında tanı, tedavi, aşı geliştirme ve moleküler özelliklerin araştırılması aşamasında *T. gondii*'nin takizoit ve bradizoit formlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Takizoit ve bradizoit formlarının üretimleri, kriyoprezervasyonu ve kriyo eritme basamaklarını içeren iyi bir standart laboratuvar uygulama protokolü hazırlamak *T. gondii* ile araştırma laboratuvarının olmazsındır.

Teşekkür

T. gondii PRU suşunu sağlayan Fransa Limoges Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji-Mikoloji bölümü öğretim görevlisi Prof. Dr. Marie-Laure Dardé ve diğer çalışanlara teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ajioka JW, Morrisette NS. A century of *Toxoplasma* research. Int J Parasitol 2009; 39: 859-60. [CrossRef]
2. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. J Eukaryot Microbiol 2008; 55: 467-75. [CrossRef]
3. Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. Microbes Infect 2008; 10: 978-84. [CrossRef]
4. Gürüz AY, Özcel MA. Toxoplasmosis. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. M. Ali Özcel (Editör). Meta Basım, Bornova/İzmir, 2007.s.141-89.
5. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004; 363: 1965-76. [CrossRef]
6. Montoya JG, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. Mandell: Principles and Practice of Infectious Diseases 5th Ed. Churchill Livingstone, Inc, 2000.
7. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol 2009; 39: 895-901. [CrossRef]
8. Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma gondii*, The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods, 2007; 1st ed. Elsevier Ltd., Great Britain.
9. Dubey, JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 267-99.
10. Üner A, Değirmenci A. Hayvan İnkübasyonları. Parazitolojide Laboratuvar. Metin Korkmaz, Ülgen Zeki Ok (Editörler). Meta Basım, Bornova/İzmir, 2011.s.429-52.
11. Döşkaya M, Can H. Workshop I: *Toxoplasma gondii* Takizoit ve Doku Kistlerinin Hayvan Modelinde Pasajı. Yüzyıllık Tecrübe; *Toxoplasma gondii* Uluslararası Katılımlı Sempozyum ve Workshop Kitabı İzmir 17-20 Mart 2010; 1-2.
12. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988; 30-6.
13. Özbilgin A, Östan İ, Tabak T, Aşar K. [Cryopreservation of plasmodia with malaria models and establishment of a cryobank]. Türkiye Parazit Derg 2010; 34: 146-51. [CrossRef]
14. Özbilgin A, Östan İ, Kurt Ö. Kriyoprezervasyon. Parazitolojide Laboratuvar. Metin Korkmaz, Ülgen Zeki Ok (Editörler). Meta Basım, Bornova/İzmir, 2011.s.405-8.