

Vero Hücre Kültüründe *Toxoplasma gondii* Üretimi

Production of *Toxoplasma gondii* in Vero Cell Culture

Gizem Sivrikaya¹, Emin Ümit Bağrıaçık^{1,2}

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) kültürlerinde konak-parazit dinamiklerinin araştırılması.

Yöntemler: *T. gondii*, takizoitleri Vero-E6 hücre kültürlerinde 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Takizoit ve konak hücreleri ışık mikroskopisi ile karakterize edildi. Parazitin üreme kinetikleri belirlendi.

Bulgular: Takizoit kültürleri ve parazit içermeyen kontrol Vero hücre kültürleri karşılaştırılarak, takizoitlerin çoğalma zamanı ve konak hücrelerin canlılığı saptandı. Kültürlerden toplanan takizoitler daha sonraki araştırmalar için bir seri haline getirildi. Saflaştırılan parazit serisi, bir katalog adı altında, GPK-001 olarak adlandırıldı.

Sonuç: Bu araştırmada, hücre içi bir parazit olan *T. gondii*'nin steril şartlar altında hücre kültürlerinde üretilebileceğini gösterdik. Çalışmamızda oluşturulan parazit hattının diğer pek çok çalışmada yararlı olacağına ve *T. gondii* enfeksiyonlarının biyolojisi ve tedavisi hususunda sorulara cevaplar sağlayacağına inanıyoruz.

(Türkiye Parazitol Derg 2011; 35: 61-4)

Anahtar Sözcükler: *Toxoplasma gondii*, takizoit, Vero E6, hücre kültürü

Geliş Tarihi: 07.01.2011

Kabul Tarihi: 22.03.2011

ABSTRACT

Objective: To investigate parasite-host dynamics in cultures of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*).

Methods: *T. gondii* tachyzoites were incubated in Vero-E6 cell cultures at 37°C, 5% CO₂. Tachyzoites and host cells were characterized by light microscopy. Growth kinetics of the parasite were determined.

Results: Doubling time of tachyzoites and viability of host cells were determined by comparing tachyzoite cultures and control Vero cell cultures that were free of parasites. Tachyzoites harvested from cell cultures were established as a line for future studies. Purified tachyzoite line was named as GPK-001, a catalog name for the line.

Conclusion: In this study, we showed that an intracellular parasite, *T. gondii* can be produced in cell cultures under sterile conditions. We believe that the tachyzoite line established in this study would be useful in many other studies and provide answers to questions regarding biology and treatment of *T. gondii* infections.

(Türkiye Parazitol Derg 2011; 35: 61-4)

Key Words: *Toxoplasma gondii*, tachyzoite, Vero E6, cell culture

Received: 07.01.2011

Accepted: 22.03.2011

GİRİŞ

T. gondii, çeşitli memeli ve kuş türlerini enfekte eden hücre içi parazitik bir protozondur (1, 2). Günümüzde insan nüfusunun yaklaşık %25'i *T. gondii* ile enfekte olmuş durumdadır (3). Parazit ileri evrelerde insanda ölümle sonuçlanabilen, hamile kadınlarda düşüğe yol açan Toxoplazmosis enfeksiyonunun etkenidir (4). İnsan yaşamına verdiği zararlardan dolayı parazit ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. *T. gondii* araştırmalarında çoğunlukla kullanılan *in vivo* yöntemler kadar *in vitro* çalışmalar da önem kazanmaya başlamıştır. *In vitro* kültür sistemleri *T. gondii* ile yapılan genetik çalışmalarda, ilaç çalışmaları ve serolojik testlerin geliştirilmesinde önemli bir temel oluşturmaktadır (5).

Toxoplasma enfeksiyonunun başlamasında, doku kisti bulduran et ürünlerini çiğ halde tüketmek, ookist bulduran toprak ve suları kullanmak başlıca sebepler olmakla birlikte (6), kan transfüzyonu, organ transplantasyonu ve transplental yolla enfeksiyona maruz kalmak da sık sık karşılaşılmaktadır (7). Transplantasyon sonrası hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, özellikle kalp transplantlarında toxoplazmosis'e sıklıkla rastlanmaktadır (8).

Ana konağı kedigiller olan parazitin, ara konakları ise kedigiller dahil bütün memeliler ve kuşlardır (9). Parazitin enfeksiyon sırasında geçirdiği 3 formu vardır. Bunlar Takizoit (gruplar halinde veya tek tek buldukları evre), bradyzoit (doku kistlerinde bulunduğu evre) ve sporozoit (ookistlerde, konak dışında) olarak adlandırılır (10). Parazitin kendine ait çeşitli yaşamsal yapıları bulunmasına rağmen takizoit formu hayatta kalabilmek ve çoğalabilmek için konağı ihtiyacı duymaktadır. Bu gelişme döneminde parazit "endodyogeni" yoluyla ikiye bölünerek hızla çoğalır (11). Parazit hücrelerde de takizoit formunda gözlenmektedir.

Toxoplasma araştırmalarında ve klinik testlerde fare ya da sıçan gibi deney hayvanları sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak günümüzde geliştirilmekte olan modern test sistemleri *Toxoplasma*'nın *in vitro* olarak çoğaltılmasındaki zaruriyeti de ortaya koymaktadır. Özellikle, diğer mikroorganizmalardan arındırılmış, saf, kalıcı ve süregen bir parazit kaynağının kullanılması, *T. gondii* çalışmalarından elde edilen sonuçlara, güveni artırıcı önemli bir etkidir. Ayrıca hücre kültürü ile yıllarca yeterli sayıda takizoid elde etmek mümkündür (12).

Çalışmalarımızda hücre kültürü yöntemi kullanılarak yeterli sayıda, saf ve kalıcı bir *toxoplasma* kaynağı elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla parazitin üretimi için hücre kültür sistemi kurularak, parazit serileri (hatları) elde edildi, parazitin konak hücreye etkisi, morfolojik özellikleri ve üreme potansiyelleri araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Vero-E6 hücre kültürleri

Vero-E6 hücrelerini (ATCC, CRL-1586) üretmek için kültür besiyeri olarak %10 fetal sıgır serumu, 200 unit/ml penisilin, 200 µg/ml streptomisin, 0.02mM/ml L-glutamin, 0.01 mM/ml sodyum piruvat, 50µM/ml B-merkaptoetanol ile zenginleştirilmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hepsi Gibco®, CA, USA) kullanıldı. Vero-E6 hücreleri besi yeri içeren kültür flasklarına yerleştirildikten sonra kültür flaskının tabanını kaplayana kadar 37°C ve %5 CO₂'li etüvde, haftada 2-3 defa besiyeri değiştirilerek üretilirdi. Flaskın tabanını tamamen kaplayan hücreler, tripsin-EDTA

solusyonu (Gibco®, CA, USA) ile kaldırıldı ve taze besi yeri içeren yeni flasklara aktarıldı. Bu şekilde yapılan seri pasajlamalar ile Vero-E6 hücrelerinin devamlı kültürleri gerçekleştirildi.

Parazit üretimi

Farede *in vivo* koşullarda üretilmiş olan *T. gondii*, Vero-E6 hücreleri konak olarak kullanılarak, seri aktarım yoluyla üretilirdi. Başlangıçta çeşitli bakteri ve mantarlar ile kontamine halde mevcut olan *Toxoplasma gondii*, iki kat daha fazla Penisilin-Streptomisin dozu kullanılarak 20 seri aktarım sonucu, diğer komponent ve bakterilerden temizlenmiş hale getirildi.

Fare peritoneal sıvısından alınan parazitler DMEM besi yerinde Vero kültürlerine aktarıldı. Saflaştırma işlemi tamalandıktan sonra iki grup oluşturuldu. Bir grup Vero hücresi, pozitif kontrol olarak kullanıldı ve parazit eklemesi yapılmadan düzenli aktarımlarla üretilirdi. Bu üretim için hücreler kültür flaskının tabanını tamamen kaplayınca %0.25 tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak tripsinize edildi. Toplanan hücreler yeni besiyeri ile her flaskta 10⁵ hücre/ml hücre olacak şekilde yeni flasklara aktarıldı.

Parazit ilavesi yapılan Vero kültürlerinde, Vero hücrelerinin oranı her flaskta 10⁵ hücre/ml hücre olacak şekilde sabit tutuldu. Her flaskta 2000 takizoit/ml parazit olacak şekilde seri aktarımlar yapıldı. Parazitlerin üreme oranları düzenli olarak takip edildi. Parazit ve konak Vero hücreleri, 12 megapiksel gücünde kamerasa sahip Leica DM 4000B model (Leica, Germany) mikroskop altında görüntüledi. Elde edilen görüntüler Leica Application Suite olarak adlandırılan görüntüleme programı kullanılarak analiz edildi.

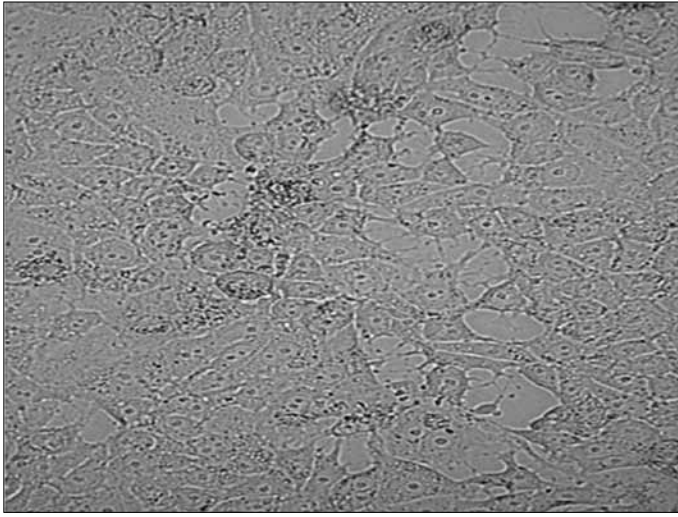
Parazit canlılığı tayin yöntemi

Kültür ortamında üretilen takizoitlerin canlılığı tripan mavis ile boyama yapılarak saptandı. Tripan mavis ile boyanan takizoitler, hemositometre ile sayılarak canlılıkları hesaplandı.

BULGULAR

Fareye inoküle edilmiş olan *T. gondii* fareden elde edilerek *in vitro* kültür ortamında çoğaltıldı. Paraziti çoğaltmak için Vero-E6 hücre serisi (ATCC, CRL-1586) olarak adlandırılan Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri kullanıldı (Resim 1). Elde edilen primer parazit kültürü inverted mikroskopide incelendiğinde ortamda yoğun miktarda partikül tespit edildi. Primer parazit kültürlerinin ilerleyen inkübasyon aşamalarında mantar ve bakteri ile kontamine olduğu saptandı (Bulgularda gösterilmiyor).

Primer kültürlerdeki kontaminasyonun giderilmesi ve önlenmesi için, başlangıç olarak, yüksek penisilin-streptomisin oranı bulunan besiyerleri kullanılarak *T. gondii* 20 jenerasyon boyunca üretilirdi. Her jenerasyonda antibiyotik içeren taze besiyerine aktararak, bakteri ve funguslardan arınmış olan kültürler elde edildi. Her jenerasyon sırasında elde edilen takizoitler yıkanarak 2000 takizoit/ml yoğunlukta prazitin taze besiyerine transferi gerçekleştirildi. Bu işlemden sonra, her jenerasyon sonunda, parazitin bir kısmı krioprezervasyon koşulları altında, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı. 20 jenerasyon sonra yapılan kültürlerden alınan örnekler zenginleştirilmiş agar plaklarına ekilerek bakteri ve mantar üremediği saptandı (Bulgularda gösterilmiyor). Böylece herhangi bir kontaminasyon gözlenmeyen *T. gondii* parazit serisi elde edilmiş oldu. Bu seri GPK-001 olarak adlandırıldı.



Resim 1. Yeşil Afrika maymunu böbrek hücresi (ATCC, CRL-1586) olan Vero-E6 hücrelerinin hücre kültüründe üremesi sırasındaki morfolojik yapısı

T. gondii üreme kinetiği

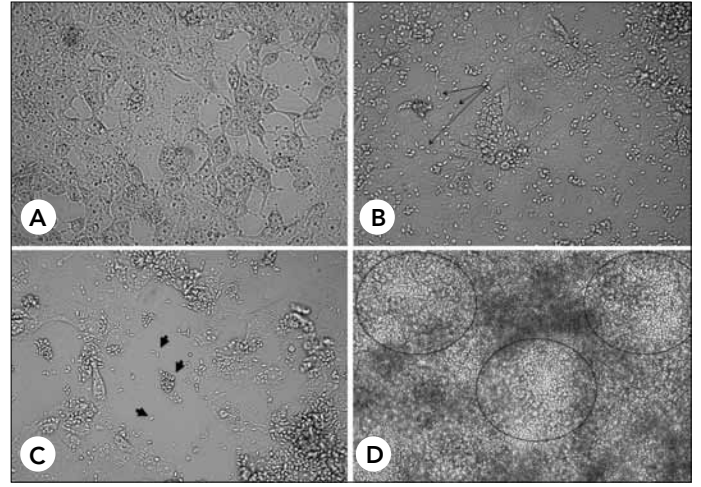
Vero-E6 hücreleri (10^5 hücre/ml) 25cm² hücre kültür flasklarında üretildi. GPK-001 serisi takizoitlerinden 2×10^3 parazit/ml olacak şekilde kültür sistemine ilave edildi. Kültürler günlük olarak takip edildi. Kültür ortamına bırakılan takizoitler birkaç saat içinde kültürdeki Vero-E6 hücreleri enfekte ederek hücre içine yerleşti. Bu aşamada çekilen fotoğraflarda parazit dış ortamda olmadığından dolayı görüntülenemedi (Resim 2A). Daha sonra yapılan takiplerde, ilk dört gün besi ortamında hiç parazite raslanmadı. Beşinci gün yapılan sayımlarda kültür ortamında 1.2×10^6 takizoit/ml parazit tespit edildi (Resim 2B). Daha sonraki günlerde kültür ortamında parazit artışı ve hücreleri patlatarak hücre dışına çıkması devam etti. Parazit sayısı onuncu günde 2.8×10^6 takizoit/ml olarak artış gösterdi (Resim 2C). Kültürlerde parazit sayısının aşırı artmasına karşın konak Vero hücrelerinin ölüm oranlarının da arttığı gözlemlendi (Resim 2D).

Kültür ortamında üretilen parazitlerin canlılık analizleri tripan mavisi boyaması ile yapıldı. Kültür ortamında üreyen parazitlerin canlılığı, ilk 8 gün içinde, 98 ± 2 olarak tespit edildi. Daha sonraki günlerde kültür ortamında artan parazit sayısına, kısıtlı miktarda mevcut olan besin miktarı ve konak hücre sayısına bağlı olarak parazit canlılığında, zaman içinde giderek azalma gözlemlendi (Şekil 1).

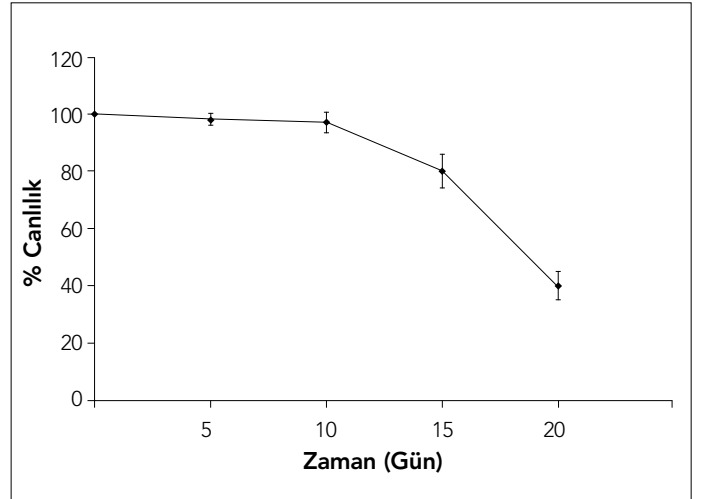
Ortalama 10-15 gün içerisinde konak Vero-E6 hücreleri canlılıklarını tamamen kaybetti. Buna bağlı olarak parazitlerde de morfolojik değişiklikler gözlenmeye başlandı. Örneğin, takizoit formundaki yay şekilleri yavaş yavaş kayboldu, bunun yerini daha hareketsiz ve yuvarlak bir morfolojik yapı aldı. Bu aşamadan sonra, tripan blue ile yapılan parazit sayımlarında, boyanın parazitlerin içine nüfuz etmeye başladığı gözlemlendi.

TARTIŞMA

T. gondii teşhis ve tedavisinde çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerin uygulanmasında, yapılan kültür çalışmalarının önemli yeri bulunmaktadır. Özellikle teşhis amaçlı kullanılan Sabin-Feldman boya testi, parazitin tespitinde altın standart yön-



Resim 2. Kültür ortamında üretilen *T. gondii* takizoitleri ve konak Vero hücrelerinin üreme kinetiği ve morfolojik özellikleri. A) Takizoitler konak Vero hücrelerini enfekte ederek bir kaç saat içinde hücre içine yerleşir ve görünmez hale gelir, B) yaklaşık 4 gün sonunda hücre içinde çoğalan takizoitler konak hücreleri patlatarak dışarı çıkmaya başlar, C) Takizoitler sayıca artmaya buna karşın konak hücreler yaşamlarını yitirerek sayıca azalmaya devam eder, D) Kültür ortamında üremiş olan milyonlarca takizoit yavaş yavaş yaşamlarını yitirmeye başlar



Şekil 1. Kültür ortamında üreyen takizoit canlılık kinetiği

temdir. Bunun dışında ELISA da geçerliliğini korumaktadır (13). Ancak bu testlerin uygulanmasında kısıtlamalar mevcuttur. Zira bu testlerin uygulanabilmesi için düzenli olarak *T. gondii* antijeni sağlanması gerekmektedir. Pek çok çalışmada parazit, özellikle rat ve fare gibi hayvanlardan çalışma sırasında elde edilmektedir. Hastane ortamında rahatça kullanılabilen bu testler, hayvanların hastaneye sokulamaması ve hastane ortamında barındırılmaması gibi dezavantajlar sebebiyle yapılamamaktadır. Bakteri veya mantar kontaminasyonu içermeyen *T. gondii* kültürleri *in vitro* ortamda, parazit hücre serileri olarak kolayca üretilir. Bu çalışmada elde edilen GPK-001 parazit serisi *in vitro Toxoplasma* çalışmaları için önemli bir kazanımdır.

GPK-001 parazit serisinin hücre kültürlerindeki üretimi sırasında, Vero kültürlerinin parazitlerle enfeksiyonunu takiben ilk dört günlük

süre içerisinde kültür ortamında hiçbir takizoit formu gözlenmemiştir. Bunun sebebi şöyle açıklanabilir: *T. gondii* hücre içi zorunlu bir protozoandır. Vero-E6 hücre kültürüne parazit ilavesini takiben bir kaç saat içinde takizoidler hücre içine girerek çoğalma evresine geçer. Takizoidlerin Vero hücreleri içindeki çoğalma evreleri, araştırmamızda yapılan kültürlerde yaklaşık 3-4 gün olarak belirlendi. Dolayısı ile takizoitler ilk 4 gün konak hücre içerisinde kaldığı için kültür ortamında tespit edilemedi. Bu süre sonunda hücreleri patlatarak sayıları yaklaşık bir kaç bin kat artmış bir şekilde kültür ortamına çıktılar. Kültür ortamına çıkmış olan parazitler enfekte olmamış olan Vero hücrelerini enfekte ederek çoğalma döngüsüne devam etti. Ancak ikinci beş günlük sürede, kültür ortamındaki canlı Vero hücre sayısı azaldığı için parazit üremesindeki artış yavaşladı. Toplam 10-15 günlük süre zarfında, konak hücrelerin tamamen ölmesiyle birlikte parazitlerin üreyebileceği bir konak hücre ortamı kalmadığı için takizoitler sporozoit formuna dönüşmeye başladı. Saadatnia ve ark. (14) yaptığı çalışmada benzer konak hücre ve parazit kinetikleri tespit edilmiştir.

Hücre hatları ve kültür metodları kullanılarak üretilen *T. gondii* serilerinden, serolojik testler, genetik çalışmalar ve izolasyon çalışmaları için kolayca antijen elde edilebilir (15). Bu tür *in vitro* çalışmalar *T. gondii* konusunda aydınlatılmamış olan bilgilerin anlaşılması için kullanışlı bir yöntem oluşturabilir.

Sonuç olarak çalışmalarımızda elde edilen GPK-001 *T. gondii* parazit serisi, enfeksiyonun teşhisinin daha az maliyetli hale gelmesini sağlayacak araştırmalarda kullanışlı olabileceği gibi, *Toxoplasma* konusunda diğer bir çok araştırma için de sürekli ve canlı *T. gondii* elde etmeye olanak sağlayacak bir çalışmadır.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın yazımında kullanılan kaynakların düzenlenmesinde emeği geçen Gazi Üniversitesi Immunoloji Anabilim Dalı, Doktora Öğrencisi sayın Emine Yavuz'a teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology. 4th Edition. New York: McGraw Hill Medical Publishing Division, p. 2004; 722-7.
2. Ferreira da Silva Mda F, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*, Mol Biosyst 2008; 4: 824-34. [CrossRef]
3. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64: 607-23. [CrossRef]
4. De Meerschman F, Rettigner C, Focant C, Boreux R, Pinset C, Leclipteux T, et al. Use of a serum-free medium to produce in vitro *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites on Vero cells. Vet Res 2002; 33: 159-68. [CrossRef]
5. Chatterton JMW, Evans R, Ashburn D, Joss AWL, Ho-Yen DO. *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. Journal of Microbiological Methods 2002; 51: 331-5.
6. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2002; 30: 1217-58.
7. Yazar S, Yaman O, Şahin İ. *Toxoplasma gondii* seropozitif gebelerde IgG-avidite sonuçlarının değerlendirilmesi. T Parazitol Derg 2005; 29: 221-3.
8. Barsoum RS. Parasitic infections in transplant recipients, Nature Clinical Practice Nephrology 2006; 2: 490-503. [CrossRef]
9. Haholu A, Yıldırım Ş, Kuru Ö, Ardic N, Baloğlu H. Toksoplazma gondii lenfadenitinin sitolojik tanısı: Olgu sunumu. Türk Patoloji Dergisi 2006; 22: 57-60.
10. Dubey JP, Lindsay DS and Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clinical Microbiology Reviews, apr. p 1998; 267-99.
11. İnci A, İça A, Yıldırım A, Duzlu O. Memelilerin (Yabani) Önemli Paraziter Hastalıkları I: Protozoon Enfeksiyonları. Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg 2008; 5: 51-60.
12. Chatterton JMW, McDonagh S and O Ho-Yen D. *Toxoplasma* tachyzoites from cell culture are more appropriate in some situations. J Clin. Pathol 2010; 63: 438-40. [CrossRef]
13. Aslan G, Altıntaş K. Toksoplazmosis teşhisinde Sabin-Feldman testi ve ELISA IgM antikorlarının karşılaştırılması. Genel Tıp Derg 2000; 10: 161-4.
14. Saadatnia G, Haj Ghani H, Khoo BY, Maimunah A and Rahmah N. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. Tropical Biomedicine 2010; 27: 125-30.
15. Evans R, Chatterton JMW, Ashburn D, Joss AWL, Ho-Yen DO. Cell-Culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 879-84. [CrossRef]