

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CACO-2 EPİTEL HÜCRESİ VE THP-1 MAKROFAJ
HÜCRELERİNİN *STREPTOCOCCUS PYOGENES* VE
ESCHERICHIA COLI'YE KARŞI BAKTERİSİDAL ETKİ,
NİTRİK OKSİT VE SİTOKİN YANITLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Derya BİRİKEN SALIN

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Sulhiye YILDIZ**

2007 – ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CACO-2 EPİTEL HÜCRESİ VE THP-1 MAKROFAJ
HÜCRELERİNİN *STREPTOCOCCUS PYOGENES* VE
ESCHERICHIA COLI YE KARŞI BAKTERİSİDAL ETKİ,
NİTRİK OKSİT VE SİTOKİN YANITLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Derya BİRİKEN SALIN

**FARMASÖTİK MİROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Sulhiye YILDIZ**

Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2005.0809225 proje numarası ile desteklenmiştir

2007 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Mikrobiyoloji Doktora **Programı**

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.12.2007

Prof. Dr. Ahmet AKIN
Ankara Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ufuk ABBASOĞLU
Gazi Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi

Prof. Dr. Murat ÖZSAN
Ankara Üniversitesi Tıp
Fakültesi

Prof. Dr. Sulhiye YILDIZ
Ankara Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi

Prof. Dr. Nurten ALTANLAR
Ankara Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Epitel Hücresi	4
1.1.1. Epitelyal Bariyer	4
1.1.2. Epitelyal Sinyal Yolları	5
1.1.3. Mukus (Musin) Üretimi	5
1.1.4. Antimikrobiyal Peptit ve Proteinler	6
1.1.5. Mikroorganizmayı Tanıma.....	8
1.1.6. Fagositoz	9
1.1.7. Major Doku Uygunluk Molekülü (MHC) Ekspresyonu ve Profesyonel Olmayan Antijen Sunumu	10
1.1.8. Sitokin ve Kemokin Salınımı	11
1.1.9. Diğer Medyatörlerin Salınımı	13
1.1.10. Antikor Oluşumu.....	14
1.1.11. Epitel Hücresinin Diğer İmmun Hücreler ile Etkileşimi.....	15
1.1.12. T ve B Hücre Uyarımı	16
1.1.13. Doğal ve Kazanılmış İmmun Yanıtın Uyarılması.....	17
1.2. Makrofajlar	17
1.2.1. Yerleşik ve Gezici Makrofajlar	18
1.2.2. Makrofaj Reseptörleri	21
1.2.3. Makrofaj Fenotipini Yönlendiren Sitokinler.....	24
1.2.4. Makrofaj Yanıtları.....	25
1.3. <i>Streptococcus pyogenes</i> (Grup A Streptokoklar)	28
1.3.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	28

1.3.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikler	29
1.3.3. Antijenik Yapı ve Patojenite	29
1.3.4. Yaptığı Hastalıklar	31
1.3.5. <i>Streptococcus pyogenes</i> Konak Hücre Etkileşimi.....	31
1.4. <i>Escherichia coli</i>	33
1.4.1. Morfolojisi ve Boyanma Özellikleri	33
1.4.2. Kültür Özellikleri	33
1.4.3. Antijenik Yapı	34
1.4.4. Virulans ve Patojenite Özellikleri	34
1.4.5. Plazmidleri	36
1.4.6. Bakteriyosinleri	36
1.4.7. Yaptığı Hastalıklar	36
2. GEREÇ VE YÖNTEM	39
2.1. Gereç	39
2.1.1. Sarf Malzemeler	39
2.1.2. Kimyasal malzemeler	39
2.1.3. Araçlar	40
2.1.4. Kullanılan Solüsyonların hazırlanması	41
2.2. Yöntem	42
2.2.1. Mikroorganizmaların Hazırlanması	42
2.2.2. Caco-2 Epitel Hücre Kültürünün Hazırlanması	42
2.2.3. THP-1 Makrofaj Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	43
2.2.3.1. THP-1 Monosit Hücre Kültürü	43
2.2.3.2. Hücresel Diferensiyasyon (Farklılaşma).....	43
2.2.3.3. THP-1 Makrofaj Hücre Kültürü.....	44
2.2.4. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Tek Başına Mikroorganizma ile Uyarılması ve Bakterisidal Etkisinin Araştırılması.....	44
2.2.5. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Birlikte Mikroorganizma ile Uyarılması ve Bakterisidal Etkisinin Araştırılması.....	45
2.2.6. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Temasının	

Engellenmesi Durumunda Mikroorganizma ile Uyarılması ve Bakterisidal Etkisinin Araştırılması.....	46
2.2.7. NO Miktarının Ölçülmesi.....	46
2.2.8. Sitokin Yanıtının Saptanması.....	47
2.2.9. İstatiksel Değerlendirme	47
3. BULGULAR	48
3.1. THP-1 Monosit Hücre Kültürü	48
3.2. Hücresel Diferensiyasyon	48
3.3. Caco-2 Epitel Hücresi ve THP-1 Makrofaj Hücre Kültürleri Tek Başına, Birlikte ve Temasın Engellenmesi Durumunda Mikroorganizmalara Karşı Göstermiş Olduğu Bakterisidal Etkisi.....	50
3.3.1. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Tek Başına Mikroorganizmalara Karşı Göstermiş Olduğu Bakterisidal Etkisi	50
3.3.2. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Birlikte Mikroorganizmalara Karşı Göstermiş Olduğu Bakterisidal Etkisi	51
3.3.3. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Temasının Engellenmesi Durumunda Göstermiş Olduğu Bakterisidal Etkisi.....	51
3.4. NO Yanıtı	54
3.5. Sitokin Yanıtı	55
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
ÖZET	80
SUMMARY	82
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	96

ÖNSÖZ

Konağa mikroorganizma girişinin en sık ve önemli yolu mukozal alanlardır, patojen konağa girdiğinde epitel hücre fiziksel bariyeri, doğal savunma mekanizmaları ve kazanılmış immun yanıt ile karşılaşmaktadır. Doğal immun sistemin en önemli hücreleri epitel hücresi ve makrofajlardır. Çok sayıdaki fonksiyonel rolleri göz önünde tutulursa makrofajlar ve epitel hücreleri inflamatuvar sürecin başlangıcında ve devamında önemli bir rol oynamaktadırlar.

Doğal immunitenin temel mekanizmasını oluşturan gözcü ya da nöbetçi hücreler olduğu bilinen epitel hücresi ve makrofajın etkileşimi dışında diğer immun hücrelerin ve diğer çözünür faktörlerin de zaman ve doza bağlı değişen proinflamatuvar ve antiinflamatuvar yanıtının daha iyi anlaşılması, mukozal aşı çalışmalarına ve hastalıkların patogenezinin araştırılmasına büyük katkılarda bulunacaktır.

Doktora eğitimim boyunca ve tez konumun yürütülmesinde beni destekleyen ve gerekli olanakları sağlayan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hatice Özenci'ye, tez çalışmamı önerileri ile destekleyen ve yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Sulhiye Yıldız'a, tez çalışmam sırasında her türlü desteğini gördüğüm Uzm. Bio. Şükran Yılmaz'a, çalışmamın istatistiksel değerlendirmesini yapan Tolga Kaskatı ve Derya Öztuna'ya, destek ve yardımları için Uzm. Dr. Nurhan Albayrak'a, ilgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Uzm. Dr. Gülay Aral Akarsu'ya, varlığı ile bana güç veren biricik kızım Nehir'e ve manevi desteklerini her zaman gördüğüm sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımızı maddi destekleri ile gerçekleştirmemizi sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü yetkililerine de teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A549	İnsan akciğer adenokarsinoma hücre dizisi
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
BPI	Bakterisidal permeabilite arttırıcı protein
Caco-2	İnsan kolon epidermal adenokarsinoma hücre dizisi
cfu	Koloni oluşturan birim
CR	Kompleman reseptörleri
EAgEC	Enteroagregatif <i>E. coli</i>
E/H	Efektör hücre/hedef hücre
EHEC	Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
EMB	Eozin metilen blue agar
EPEC	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
FcR	Fc reseptör
FCS	Fetal calf serum
G-CSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör
HBD	İnsan beta defensin
HBEC	İnsan bronşial epitel hücreleri
HeLa	İnsan serviks karsinom hücreleri
Hep-2	İnsan nazofaringeal karsinom hücreleri
HIV	Human immunodeficiency virus
H2O2	Hidrojen peroksit
ICAM-1	İntersellüler adezyon molekülü-1
IFN-γ	İnterferon gama
Ig A	İmmünglobulin A
IL	İnterlökin
IMVIC	İndol, Metil kırmızısı, Voges-Proskauer, Sitrat

KB	İnsan ağız epitel hücre dizisi
LPS	Lipopolisakkarid
LT	Isıya duyarlı eksotoksin
LTB	Lökotrien
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MCP-1	Monosit kemotaktik protein 1
MHC	Major doku uygunluk molekülü
MIP	Makrofaj inflamatuvar proteini
MR	Mannoz reseptörleri
NED	N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorit
NF-κB	Nükleer faktör-kappaB
NK	Doğal öldürücü hücre
NO	Nitrik oksit
O₂	Süperoksit anyonları
PAMP	Patojen ile ilişkili moleküler yapılar
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PG	Prostaglandin
pIgR	Polimerik Ig reseptörü
PMNL	Polimorfonükleer lökositler
RANTES	CCL-5 kemokin ligandı
RES	Retikülo endoteliyal sistem
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute'ün 1640 kodlu hücre kültürü vasatı
TII	Alveolar epitel tip II hücreler
THP-1	İnsan leukemia monosit hücre dizisi
TLR	Toll-like reseptör
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa
VCAM-1	Vasküler adezyon molekülü-1
Vero	Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. PMA ile uyarılmamış THP-1 hücreleri.....	48
Şekil 3.2a. THP-1 hücrelerinin 20 ng/ml PMA konsantrasyonda 48 saat inkübasyonu	49
Şekil 3.2b. 48. saat kontrol hücreleri.....	49
Şekil 3.3. Farklı inkübasyon periyodlarının ve PMA konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkileri.....	49
Şekil 3.4. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında <i>S. pyogenes</i> ve <i>E. coli</i> 'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki ortalamaları.....	53
Şekil 3.5. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında <i>S. pyogenes</i> ve <i>E. coli</i> 'e karşı 5. ve 24. saatte göstermiş olduğu NO yanıtları	55
Şekil 3.6. Hücrelerin IL-6 yanıtları ve kontrol.....	57
Şekil 3.7. Hücrelerin IL-8 yanıtları ve kontrol.....	59
Şekil 3.8. Hücrelerin TNF- α yanıtları ve kontrol	61

Şekil 3.9. Hücrelerin mikroorganizmalara karşı 5. ve 24. saatte oluşturdukları NO ve sitokin seviyeleri ortalamaları 62

ÇİZELGELER

Çizelge 1.2.1. Doku makrofajları.....	19
Çizelge 1.2.2. Makrofajlara etkili medyatörler.....	20
Çizelge 1.2.3. T _{H1} ve T _{H2} sitokinlerin etkisi ile gelişen makrofaj fenotipleri	25
Çizelge 1.2.4. Makrofajlardan salınan ürünler, grupları ve örnekler.....	27
Çizelge 3.1. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında <i>S. pyogenes</i> ve <i>E. coli</i> 'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etkinin dağılımı.....	53
Çizelge 3.2. Hücrelerin 1/1 E/H oranlarında <i>S. pyogenes</i> ve <i>E. coli</i> 'e karşı 5. ve 24. saatte oluşturdukları NO ve sitokin seviyeleri ortalamaları	56

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar insan ve hayvanlarda vücuda değişik yollardan girerek, çeşitli mekanizmalarla hastalık oluştururlar (Janeway ve ark., 2001). Patojenin enfeksiyon oluşturması için ilk adım epitel yüzeyine tutunmadır. Patojen epitele tutunabilmek için, özgül olmayan yüzey savunma bariyerlerinden kaçabilmelidir. Enfeksiyon ajanına karşı konak savunması; giren ajanın patojenite gücü ile, mukozalara giriş yerinde konağın mikroorganizmayı temizleme yeteneği arasındaki dengeye bağlıdır (Welsh ve Mason, 2001).

Patojen ile epitel hücresi arasında moleküler ilişkinin kurulması ile etkileşim meydana gelir ve bunun sonucunda immun yanıt oluşur (Huttner ve Bevins,1999). Vücudumuz bulunduğu çevrede mikroorganizmalara sürekli maruz kalmaktadır ve mikroorganizmalar ile temas dış veya iç epitelyal yüzeyler yoluyla meydana gelmektedir. Mikroorganizma vücuda girdiğinde, enfeksiyondan önce var olan ve enfeksiyonun ilk dakikaları içinde etkinleşen doğal savunma mekanizmaları ile karşılaşılır. Doğal konak savunması aşılar, geçilir veya doğal savunmadan mikroorganizma kaçabilirse kazanılmış immun yanıtı ihtiyaç duyulur (Janeway ve ark., 2001).

Doğal immun sistem patojenlere karşı güçlü bir erken savunma sistemi oluşturmaktadır. Konak hücrede bulunmayan, buna karşın farklı mikroorganizmalar üzerinde ortak olarak bulunan lipopolisakkarit (LPS), peptidoglikan, lipoteikoik asit ve lipopeptidleri içeren çok sayıdaki bakteriyel komponentler doğal immun sistemi uyarmaktadır (Mori ve ark., 2003). Doğal immun cevapda iki önemli hücresel katılımcı, epitel hücreleri ve makrofajlardır (Bodet ve ark., 2005; Farberman ve ark., 2004). Epitel hücreleri patojenlerin en büyük fiziksel bariyeridir ve dokuların bitişiğinde ya da altında bulunan immun hücreler ve bakteriler arasında sinyaller ileterek ve oluşturarak mikrobiyal enfeksiyonlar sırasında algılayıcılar olduğunu bildirmişlerdir (Berin ve ark., 1999; Bodet ve ark., 2005; Kagnoff ve Eckmann,

1997; Schilling ve ark., 2001). Epitel hücreleri pasif bir bariyerden daha ziyade, proinflamatuvar genlerin ekspresyonu, inflamatuvar sitokinlerin salınımı ve patojenik bakterilerin ve onların ürünlerine cevapta inflamatuvar hücrelerin toplanmasını sağlaması yolu ile mukozal immün cevaba aktif olarak katılmaktadır (Melmed ve ark., 2003).

Makrofajlar; genellikle doğal immün/inflamatuvar cevabı başlatan ve istila eden patojenle ilk temasta bulunan hücre olarak kabul edilmektedir (Blau ve ark., 1997; Delves ve ark., 2006; Farberman ve ark., 2005; Janeway ve ark., 1999; Kanzato ve ark., 2001; Smythies ve ark., 2005). Ne var ki epitel hücreleri stratejik olarak hem inhale olmuş patojenlerin hem de hareket eden makrofajların temasta bulunduğu yerdir. İntestinal epitel hücreleri ile immün hücrelerin çözünür faktörler aracılığıyla birbirlerini etkiledikleri yer intestinal epitelyumdur. Epitel hücreleri direkt hücre-hücre teması ile ya da yayılabilen aktivasyon faktörleri veya ko-faktörler salarak makrofajları aktive edebilirler (Farberman ve ark., 2004; Mathew ve ark., 2007; Mori ve ark., 2003; Satsu ve ark., 2006).

Monositler/Makrofajlar ve epitel hücrelerinin çok sayıdaki fonksiyonel rolleri göz önünde tutulursa, olasılıkla inflamatuvar sürecin başlangıcında ve devamında önemli bir rol oynamaktadırlar (Bodet ve ark., 2005). Aktive olmuş makrofajlar nitrik oksit (NO), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve interlökin 6 (IL-6) gibi bakterisidal ve inflamatuvar önleyici faktörler oluştururlar; aktive olmuş makrofajların şekilleri değişir, daha hareketli olurlar ve patojenleri fagosite ederler (Blau ve ark., 1997; Janeway ve ark., 1999; Farberman ve ark., 2005). Epitel hücrelerle temas insan makrofajlarının fenotipinin niteliğini değiştirmektedir. Bakteriyel meydan okuma da onların cevabından etkilenebilen bir olaydır (Bodet ve ark., 2005; Striz ve ark., 2001).

Çalışmamızda insan kolon epidermal adenokarsinoma hücre dizisinin (Caco-2 hücresi) ve insan leukemia monosit hücre dizisinin (THP-1 hücresi) birlikte ve farklı mikroorganizmalarla (*Streptococcus pyogenes* ve *Escherichia coli*) olan ilişkisini ve

immun yanıt üzerindeki etkilerini belirlemek için, in vitro ko-kültürü yapılarak epitel ve makrofajın tek başına, bir arada ve temasın engellendiği durumda mikroorganizmalara verdiği yanıtta değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Epitel hücresi ile makrofajın etkileşiminin bu hücrelerin bakterisidal etkilerine katkısı olup olmadığı daha önceden araştırılmamıştır. Epitel hücresi ve makrofajın tek başına, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda farklı mikroorganizmalara karşı uyarımının bakterisidal etkide, NO oluşumunda, IL-6, IL-8, TNF- α ve interferon gama (IFN- γ) sitokinlerinin üretiminde değişikliğe neden olup olmadığının da araştırılması amaçlanmıştır.

Doğal immunité enfeksiyona karşı ilk konak savunma çizgisidir ve konağın patojen mikroorganizmaya maruz kalmasını izleyen ilk saatler içinde enfeksiyonu sınırlamayı hedefleyen konak savunmasını temsil eder. Doğal immunité mikroorganizmalar için seçicilik göstermeksizin (non-spesifik) ve süreklilik içinde gözetici ve kontrol edici bir görev yapar. Mikroorganizma ile karşılaşmadan önce vardır ve kazanılmış immunitenin gelişiminden önce mikroorganizma ile hızlıca aktive edilir (Kılıçturgay, 2003).

Doğal immun sistemin üyeleri; epitelyal bariyerler, lökositler (nötrofil, makrofaj ve doğal öldürücüler (NK hücreleri), dolaşımdaki efektör proteinler (kompleman kollektin ve pentraksin) ve sitokinlerdir (ör; TNF- α , IL-1, kemokinler, IL-12 ve IFN- γ) (Kılıçturgay, 2003).

1.1. Epitel Hücresi

Epitel; sindirim, solunum, üreme ve idrar yollarının ve çeşitli bezlerin kanallarını ve salgı hücrelerini, epidermis, gözün yüzeyle, follow tüp ve kese yüzeylelerini döşeyen benzer hücrelerin birbiriyle bağlanması ile oluşan dokulardır. Epitelin fonksiyonları; bariyer, sekretuvar ya da absorbtif olarak tanımlanabilir (Ganz, 2002).

1.1.1. Epitelyal Bariyer

Mukozal patojenlere karşı ilk savunma hattı moleküllerin transepitelyal hareketini etkili bir şekilde sınırlayan intersellüler sıkı bağlantılardan (tight junctionlar) oluşan yüksek derecede selektif epitel hücresi tarafından sağlanır. Farklı mukozal alanlarda değişik fizyolojik, histolojik ve immunolojik özelliklere sahip olan epitel hücresi, iç dünya ile patojenlerden oluşan dış dünya arasında fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır (Ganz, 2002; Quayle, 2002).

Epitel hücresi sıkı bağlantıları ile birlikte dış ortama karşı etkin bir engel oluşturmakta (Janeway ve ark., 2001), kontrollü ve seçici geçişe izin vermektedir (Hamzaqı ve Pringavit, 1998). Epitel hücre apikal ve bazal olarak sıkı bağlantıları ile bir araya getirilmiştir ve genellikle büyük makromoleküllere geçirgen değildir. Sıkı bağlantılar di- ve tri-peptidlerin geçişini engeller. Sadece iyonlar geçebilir. Perinatal peryodun yanı sıra inflamasyon olan yerlerde de sıkı bağlantılar, büyük moleküllerin alttaki lamina propria'ya geçişine izin vererek 'tight-sıkı' özelliğini kaybeder (Mayer, 2003).

Yüzeyel epitel hücreesine tutunan mikroorganizmanın epitelle dökülmesi (desquamasyon) sırasında atılması, böylece konaktan uzaklaştırılması etkin bir konak savunmasıdır ve epitelyumun patojen ile invaze edilmesini önlemektedir (Abbas ve Lichtman, 2003).

Açık bir şekilde görülmektedir ki epitel hücresi fiziksel bariyerden çok daha fazlasıdır. Epitel hücresi sınırlar, sinyal iletim mekanizmaları ve mikroorganizmalara karşı etkili bir reaksiyon gösteren efektör moleküller ile dinamik bir konak savunma mekanizması göstermektedir (Ganz, 2002).

1.1.2. Epitelyal Sinyal Yolları

Epitel hücresinin mikroorganizmaya cevapta kullandığı sinyal yolları, proinflatuvar yanıt genlerinin düzenlenmesini sağlayan, hücre çekirdeğinde bulunan nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ile geçici ve hızlı düzenlenen kalsiyumun hücre içi değişimi ile ilişkilidir. Bakteriyel patojenler veya proinflatuvar sitokinlere maruziyet sonucu eksprese olan kemokinler ve diğer uyarılabilir moleküller hücrenin çekirdeğinde mobilize olmuş bir transkripsiyon faktörü olan NF κ B tarafından düzenlenmektedir (Haller ve ark., 2004).

1.1.3. Mukus (Müsin) Üretimi

Epitel bariyerinin yüzeylerini mukus tabakası örter ve temel bileşenini müsin glikoproteinleri oluşturmaktadır. Mukus oluşturan goblet hücreleri devamlı olarak epitelyuma bitişik kalın bir bariyer örtüsü oluşturmaktadır (Mayer, 2003). Membranla ve sekresyonla ilişkili pek çok müsin geni identifiye edilmiştir. Mukus tabakasının diğer koruyucu faktörleri epitel hücresi tarafından lamina propriadan taşınan salgısal immunglobulin A (IgA) ve antimikrobiyal peptid ve proteinlerdir (Mayer, 2003).

Akıcı özelliği ile mekanik olarak yabancılarla mücadele eden mukus, zengin karbonhidrat yapısı gereği, içeriğindeki şeker molekülleri ile patojenleri bağlayarak interferens yapmakta, immunoglobülin, sitokin gibi maddelerin bölgeye yığılmalarına yol açmakta ve nihayet fagositik hücre aktivitesini attırmakta, laktoferrin, lizozim ya da antikorların optimal etki göstermeleri için uygun ortamı

hazırlamaktadır (Badur, 2001; Mahida, 2004; Mavris ve Sansonetti, 2004). Müsin lavaj sıvısı, lizozimin ve laktoferrinin antimikrobiyal aktivitesini etkilememektedir (Ganz, 2004).

1.1.4. Antimikrobiyal Peptit ve Proteinler

Mikroorganizmalara karşı doğal konak cevabının ilk hattını epitel hücrelerinden derive olmuş, bakteriyi öldüren veya üremesini durduran antimikrobiyal peptit ve proteinler sağlamaktadır (Dommett ve ark., 2005; Mahida, 2004). Gözyaşı ve tükürük gibi vücut salgılarında salınan lizozim, ozmotik lizis yapan ve stearik etki ile bağlanmayı engelleyen antimikrobiyal bir enzimdir. Bakteri hücre duvarını enzimatik olarak eritmesine ek olarak, enzimatik olmayan bir mekanizma ile bakteriyi öldürebilmektedir (Ganz, 2004).

Mikrobisidal etkiye sahip olan laktoferrin, midenin asit pH'sı ve üst sindirim yollarının sindirim enzimleri enfeksiyona karşı önemli kimyasal bariyer oluşturmaktadır. Laktoferrin demire şiddetli affinite gösteren bir proteindir ve demiri tutarak mikroorganizmaların ondan yararlanmalarını engelleyerek mikroorganizmaların gelişimini engellemektedir (Ganz, 2004).

İntestinal epitel hücre monolayerlerini içeren başlıca hücre tiplerinden birini oluşturan Paneth hücreleri α -defensin (kriptidin), lizozim ve tip II fosfolipaz A gibi çeşitli antimikrobiyal peptit ve proteinleri içermektedirler. Defensinler üç intramoleküler disülfid bağlarıyla karakterize edilmiş küçük, katyonik antimikrobiyal peptidlerdir. Sistein rezidülerine göre α -defensin ve β -defensin olarak sınıflandırılmaktadır. α -defensinler özelleşmiş fagositlerin organellerinde bulunan ve nonoksidatif olarak öldürülmeye aracılık eden granüllerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. β -defensinler ise çoğu mukozal alanlardaki epitel hücrelerde (ürogenital organlarda, ağız, burun, trakea, ve akciğer epitelyumunda) sentezlenmektedir. Defensinler Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterileri, mantarları, protozoaları ve virusları kapsayan geniş bir mikroorganizma topluluğunu inaktive

etme ve öldürme kapasitesine sahiptir (Cunliffe, 2003; Dommett ve ark., 2005; Quayle, 2002).

Defensinlerin patojene karşı doğal ve erken immun yanıtındaki rolleri antimikrobiyal aktivite ile sınırlı değildir. Nötrofil defensinlerinin serumda serbest durumda opsonin gibi hizmet ettiği rapor edilmektedir. Özellikle β -defensinin doğal ve kazanılmış immunité arasında bağlantı görevi gördüğü, karakteristik özellikleri ve bulunduğu yer bakımından mukozal yüzeylerdeki savunmada anahtar rol oynayan peptidlere sahip olduğu bildirilmiştir (Diamond ve ark., 2001).

Çalışmalar lizozim ve β defensin-2' nin *S. pneumoniae*'ye karşı sinerjistik olarak etki ettiğini göstermiştir (Lee ve ark., 2004). Yine lizozim, laktoferrin ve sekretuar lökosit proteaz inhibitör (SLPI) gibi temel polipeptit bileşenleri arasında da sinerjistik etkileşimler rapor edilmiştir (Ganz, 2004). Patojene karşı konak mukozal yüzeylerinde, savunmanın ilk hattını oluşturan doğal immunitenin, salınan antimikrobiyal peptidler ve diğer komponentleri birbirlerini etkilemektedir (Dommett ve ark., 2005; Lee ve ark., 2004).

Kollektin familyasının üyeleri sürfaktan A ve D proteini gibi antimikrobiyal proteinler akciğerin epitelyal yüzeyi ile hava arasında yer alırlar ve yüzey gerilimini azaltma dışında yabancı materyali tanıyıp temizlemede hemen etkili olmak suretiyle doğal immunitéye katılmaktadırlar. Sürfaktanlar, mikroorganizma yüzeyindeki karbonhidratlara bağlanarak onların agregasyonunu ve takiben nötrofil ve makrofajlarla fagositozunu sağlarlar (McCormack ve Whitsett, 2002; Kılıçturgay, 2003).

Barsak epiteli lümen içini bölgesel olarak sterilize eden kriptosidin adlı güçlü antimikrobiyal peptidleri sentezler. Bu doğal antibiyotiklerin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Abbas ve Lichtman, 2003). Yassı mukozal epitel yapısal olarak sitoplazmalarında bulunan kalprotektin eksprese eder. Bu antimikrobiyal

molekül, patojen mikroorganizmaya karşı epitel hücre direncini güçlendirmektedir (Nisapakultorn ve ark., 2001).

Uygun bir şekilde uyarılan epitel hücrelerin membranlarında, çok sayıda polimorfonükleer lökositlerce (PMNL) oluşturulan antimikrobiyal olarak bilinen bakterisidal permeabilite arttırıcı protein (BPI) eksprese edilmektedir. BPI, çok sayıda Gram negatif bakteride özgül olan LPS'lerine bağlanarak bakterisidal etki göstermektedir. Böylece BPI, epitel hücresinin Gram negatif bakteriyi öldürmesine katkıda bulunmaktadır (Ganz, 2002).

1.1.5. Mikroorganizmayı Tanıma

Mikroorganizmaların spesifik ortak yapıları doğal immün yanıtın güçlü uyarıcı durumundaki Gram-negatif bakterinin LPS'i ve peptidoglikanı, Gram-pozitif bakterinin lipoteikoik asidi, tek ve çift iplikçikli RNA ve DNA'yı içeren patojen ilişkili moleküler paternler (PAMP) olarak tanımlanmaktadır. Bunlar proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu ve hücresel NF- κ B/ I κ B yolun aktivasyonu ile sonuçlanan sinyal yollarını aktive eden transmembran reseptörleridir (Pasare ve Medzhitov, 2004; Rastogi ve ark., 2001; Quayle, 2002).

PAMP'ların tanınması farklı tipteki Toll-like Reseptörler (TLR) ile olmaktadır. TLR'ler mikroorganizmaların tanınmasında, adaptif immün cevabın kontrol edilmesinde, patojenleri tehdit ederek konaktan etkin bir şekilde eliminasyonuna neden olarak, antimikrobiyal efektör yollarının indüklenmesinde anahtar rol oynamaktadırlar. Epitel hücrelerinde invitro ve invivo olarak belirlenmiş TLR2 (peptidoglikanları), TLR4 (LPS), TLR5 (flagellini) ve TLR9 (CpG DNA) içeren birçok fonksiyonel TLR'leri ifade etmektedir (Cario ve Podolsky, 2005; Kaisho ve Akira, 2003; Pasare ve Medzhitov, 2004). Reseptörleri aktive etmek için epitelin apikal bölgesi ile mikroorganizmanın teması yeterli değildir, bunların epitelyal bariyere penetre olması zorunludur. Epitelyal bariyer içindeki patern tanıyan

mekanizmanın yerleşimi, zararsız veya simbiyotik mikroorganizmaların oluşturacağı inflamatuvar yanıtı kaçırmayı sağlıyor olabilir (Quayle, 2002).

Intestinal epitel hücrelerinin yüzeylerindeki TLR'ler kommensal mikrofloranın ligandlarını stimüle edebilmektedirler. Farelerle yapılan çalışmalarda inflamasyon esnasında böyle sinyallerin sürpriz bir rolü ortaya çıkmıştır. Hücrelerin yaşamayı sürdürdüğü ve kendini onardığını göstermişlerdir. Bu da TLR'lerin intestinal ekolojiiyi olasılıkla etkilediğini ve intestinal homeostasis ile kompleks bir ilişki olduğunu göstermektedir (Strober, 2004).

1.1.6. Fagositoz

Bakteriyel patojenler hayatta kalma ve çoğalma stratejisi olarak epitel hücresi gibi profesyonel olmayan fagositlere, fagositlerin indüksiyonunu kullanarak girerler (Sansonetti, 2001).

Epitel hücresi gibi nonfagositik hücelere bazı mikrobiyal patojenlerin girmesi için sıklıkla hücre matriksinde hücre-hücre adherensini kapsayan ökaryotik yüzey reseptörlerine bağlanabilen yüzey proteinleri eksprese etmektedirler. Bakteri yüzeyindeki protein memeli yüzeyindeki adherens molekülüne yüksek affinite ile bağlanmaktadır. Ör. E-cadherin *Listeria monocytogenes*'in yüzeyindeki Internalin A proteinine bağlanmaktadır. Bu aşamada bakteri hücresi tutunduğu bölgenin altında bulunan memeli hücrenin içinde hücre iskeletinde büyük miktarda değişikliğe neden olmakta, böylece bakteri kendisinin makropinositik bir vakuol içerisine alınmasına yol açmaktadır. Bakteriyel protein ile reseptörleri arasındaki etkileşimler, protein fosforilasyonunu, adaptör ve efektörlerin ilerlemesini ve komponentlerin aktivasyonunu içeren sinyalleri başlatmaktadır. Bu da bakterinin hücre içine alınması ile sonuçlanmaktadır. Diğer patojenler bakteri ile transmembran arasında köprü gibi etkiyebilen proteinleri bağlamak için mekanizmalar kurmaktadır (Cossart ve Sansonetti 2004; Sansonetti, 2002).

Epitel hücrelerinin mikroorganizma ile enfeksiyonu, adezyonu veya transmigrasyonu indükleyen TNF- α , IFN- γ veya IL-1 β ile uyarılırken aynı zamanda monosit adezyonunu, transepitelyal migrasyonu ve süperoksit oluşumunu indüklemekte, buna karşın monosit patlamasını başlatamamaktadır (Rosseau ve ark., 2004). Bazı araştırmacılar alveolar epitelyumda fizyolojik ve inflamasyon durumunda TNF- α sitümlasyonunun, bazaldan apikal yönüne transepitelyal monosit trafiğini belirgin bir şekilde artması ile ilişkili intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ekspresyonunun up regülasyonuna, monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1) ve CCL-5 kemokin ligandın (RANTES) polarize olmuş apikal salınımına yol açtığını, bunun da epitelyumda direkt olarak monosit trafiğinde önemli bir rolü olduğunu bildirmişlerdir (Rosseau ve ark., 2000).

Epitel hücrelerinin süperoksit oluşturması invaze olan bakteriyi oksidatif yolla öldürdüğünü göstermektedir (Battistoni ve ark., 2004). Epitel hücrelerinin patojenle mücadelesinde hücre hücre temasının yanında çözünür faktörlerin önemli olduğu ve epitel hücrelerinden salınan ürünlerin fagositlerin konak fonksiyonlarını yönlendirmede etkin olduğu bildirilmiştir (Rosseau ve ark., 2000; Rosseau ve ark., 2004).

1.1.7. Major Doku Uygunluk Molekülü (MHC) Ekspresyonu ve Profesyonel Olmayan Antijen Sunumu

Farklı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarla epitel hücrelerin yalnızca profesyonel antijen sunan hücrelerde bulunan MHC II moleküllerini eksprese ettiğini, çözünür faktörlerin bazolateral olarak taşındığını ve antijenin işlenmesinin sadece apikal yüzeyden internalizasyon ile başlatılmakta olduğunu bildirmişlerdir (Mayer, 2003; Quayle, 2002).

Mayer (2003), intestinal epitel hücrelerinin doğal immunitede T hücre yanıtı ile ilişkili olan yüzey moleküllerini eksprese ettiği ve profesyonel olmayan antijen sunan hücre olarak rol aldığını ortaya koymuştur (Mayer, 2003). Profesyonel antijen sunan hücrelerin aksine normal epitel hücreleri CD8+ suppresör T hücrelerini aktive etmektedir.

1.1.8. Sitokin ve Kemokin Salınımı

Epitel hücrelerinin epiteliumda gelişiminin, diferensiyasyonunun ve fonksiyonel statüsünün korunmasında otokrin olarak etkili olan çeşitli sitokinleri ürettiği gösterilmiştir (Okazawa ve ark., 2004). Epitel hücreleri patojenlere karşı yanıtta aynı zamanda kolektif olarak davranan IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α gibi sitokinlerin, defensin gibi antimikrobiyal peptidlerin, MCP-1, granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), RANTES gibi kemokinlerin aktivasyonunu sağlayarak doğal ve kazanılmış immunitenin başlamasına neden olmaktadır (Wilson ve ark., 1998; Pasare ve Medzhitov, 2004). IL-8 ve MCP-1 nötrofillerin ve makrofajların aktivatörü olan güçlü kemoatraktanlardır. TNF- α ' da hem nötrofillerden hem de makrofajlardan aktive olabilir ve IL-8 ve MCP-1'in salınımını daha da artırabilmektedir (Wilson ve ark., 1998).

Schilling ve ark.(2001), üropatojenik *E. coli* (UPEC)'ye karşı doğal konak savunmasını başlatan mekanizmanın mesane epitel hücresi tarafından oluşturulan sitokinler tarafından meydana getirildiğini, yine UPEC ile uyarımında adherens ve P fimbria gibi bakteriyel virulans faktörlerin epitel hücrelerinde IL-6 ve IL-8 oluşumunu artırdığını göstermişlerdir. Epitel hücresinde IL-6 ve IL-8'in sekresyonunu ve sentezini IL-1 α ve TNF- α 'nın aktive ettiği bulunmuştur. Bu sonuçlar enfeksiyonun erken evresinde sitokin-aracılı cevapta epitel hücrelerinin rolünü vurgulamaktadır (Hedges ve ark., 1994).

IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IFN- γ ve TGF- β 1 epitel hücre dizilerinden IL-6 salınımını indüklemekte ve IL-5, IL-12 ve TGF- β 1 belirgin olarak IL-8 yanıtını

arttırmaktadır. Diğer immun hücrelerle kıyaslandığında immun düzenleyici sitokinler, epitel hücresinde düşük seviyede sitokin yanıtına neden olmaktadır (Hedges ve ark., 1995).

Crane-Godreau ve Wira (2004), *E. coli*'ye cevapta epitel hücrelerin apikal yüzeylerinde immun hücrelerin aktivasyonunu ve ilerlemesi boyunca immun korumayı arttırdığı bilinen sitokin ve kemokinleri ortaya çıkardığını göstermişlerdir. *E. coli*'de makrofaj inflamatuvar proteini (MIP)-3 α ve TNF- α 'nın bazolateral salınımı artarken, *L. rhamnosus*'da bu etkinin olmaması bu cevabın seçici olduğunu desteklemektedir (Crane-Godreau ve Wira, 2004). Epitel hücresinin sitokin profili; mikroorganizma türü, patojenitesi, dozu, karşılaşma süresi ve bulunduğu mukozal alana göre değişmektedir (Ma ve ark., 2003).

Epitel hücresi yüzeyinde IFN- γ için reseptörler bulunmaktadır ve IFN- γ epiteller arası sıkı bağlantı moleküllerinin geçirgenliğini artırarak epitel hücresinin bariyer fonksiyonunu etkilemektedir (Kagnoff, 1996).

Epitel hücrelerinin salgıladığı mediatörler;

Sitokinler	IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-13, IL-15, TNF- α , TGF- α , TNF- β , İnterferon (IFN) (Boyaka ve ark, 2001; Ernst ve ark., 1999; Finkelman ve ark., 2004; Hedges ve ark., 1994; Hedges ve ark., 1995; Satsu ve ark., 2006), IL-18 (Okazawa, 2004), Eotaksin, MCP-1 (Ma ve ark., 2003), RANTES, GM-CSF, Granüosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) (Mills ve ark., 1999; Wilson ve ark., 1998) MIP-1 α , MIP-1 β (Wilson ve ark., 1998). Kompleman Proteinleri C3, C4, Faktör B
------------	---

Eikosanoidler	Araşidonik asit, LTB ₄ , PAF, PGE ₂ , PGF ₂ α (Berin ve ark., 1999; Mills ve ark., 1999).
Kemokin ligandları	CXCL-8, CCL-20, CCL-2 (Rescigno ve ark., 2001)

Epitel hücrelerinin mikroorganizma ile enfeksiyonu monosit adezyonunu ve monositin epitelden migrasyonunu başlatmakta, endotelial yüzeylerde ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu arttırmaktadır (Rosseau, 2004). Egusa ve ark.(2005), gingival epitel hücrelerine *C. albicans*'ın bağlanmasında ICAM-1'in rol oynadığını ve takiben epitel hücrelerinden IL-8 geninin ekspresyonunu indüklediğini, bunun da olasılıkla dissemine olmuş enfeksiyonların önlenmesinin yanı sıra lokal olarak nötrofillerin aktivasyonuna ve gelişimine etkin bir şekilde katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Wilson ve ark.(1998), *Salmonella typhimurium*'un adhezyon moleküllerinin intestinal epitel hücrelerinde IL-8 salınımını indüklediğini, takiben bu mikroorganizmanın adhezinlerinin murine makrofajlarında IL-1 β , IL-6, GM-CSF ve MIP-1 β , MIP-1 gibi kemokinlerin mRNA seviyelerini arttırdığını rapor etmişlerdir.

1.1.9. Diğer Medyatörlerin Salınımı

Çalışmalar epitel hücrelerinden farklı sınıflardan NO, endotelinler, araşidonik asit metabolitleri, prostaglandin (PG), lökotrien (LTB), eikozanoidler ve sitokinleri içeren proinflatuvar medyatörlerin sentezlendiğini ve salındığını göstermiştir (Berin ve ark., 1999; Hurley ve McCormick, 2004; Mills ve ark., 1999).

NO, amino asit L-arjinin'den sentezlenmektedir. Biri indüklenebilen ikisi yapısal olan nitrik oksit sentazın (NOS) 3 farklı izoformundan oluşur. NO bağışıklık sisteminin bir düzenleyicisidir. Bu etki birçok azot ve oksijen ara ürünleri ile gerçekleşir. NOS'un yapısal izoformları tarafından endogenez olarak NO' in

(pikomolar miktarda) sentezlenmesi fizyolojik homeostazın korunmasında önemlidir. NOS'un indüklenebilir formu (iNOS) tarafında çok fazla sentezlenen (nanogram miktarda) NO ise intrasellüler mikrobiyal patojenleri öldürerek veya replikasyonunu kontrol ederek doğal immün yanıtta katkıda bulunmaktadır. iNOS enzimi normal olarak vücutta sentezlenmez. LPS, sitokinler (IFN- γ , IL-1, TNF- α gibi) ile uyarıldığı zaman aktif hale geçer ve uzun süreli etkisini gösterir. LPS, IFN- γ , IL-1 ve TNF- α en önemli fizyolojik indükleyicilerdir (Bogdan ve ark., 2000; Mills ve ark., 1999; Poljakovic ve ark., 2002).

Ayrıca epitel hücreleri GM-CSF, G-CSF ve M-CSF gibi büyüme faktörlerini de oluşturarak hücrelerin hayatta kalmasına ve farklılaşmasına katkıda bulunmaktadır (Hurley ve McCormick, 2004; Mills ve ark., 1999). Epidermal GM-CSF tarafından indüklenen NO ve iNOS ekspresyonunun NF- κ B'yi aktive ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Vital ve ark., 2003). Epitel hücresi tarafından oluşturulan PG ve NO'nun immün düzenleyici etkileri yanında sekresyonun ve bariyer fonksiyonunun düzenlenmesi gibi otokrin etkileri de bulunmaktadır (Kılıçturgay, 2003).

1.1.10. Antikor Oluşumu

IgA, epitelyuma bakteri veya viral tutunmayı engelleyen ve komplemanı bağlamada başarısız olan bir antikor olarak kabul edilmektedir. Mukus tabakasında mikroorganizmalara tuzak kurarak antijenleri aglütine edebilmektedir. IgA epitel hücrelerinden oluşan glikoprotein, salınabilen komponentler tarafından luminal proteazlardan korunmaktadır (Mayer, 2003). Epitel hücrelerinin bazolateral yüzünde bulunan polimerik Ig reseptörü (pIgR) transmembran proteini olarak sentezlenmektedir. pIgR bronşiyal, ince ve kalın barsak epiteli tarafından oluşturulmaktadır. pIgR'nin ekspresyonu IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve TGF- β ile arttırılabilmektedir (Boyaka ve ark., 2001).

1.1.11. Epitel Hücresinin Diğer İmmun Hücreler ile Etkileşimi

Epitel hücrelerinin direkt hücre-hücre teması ile ya da yayılabilen aktivasyon faktörleri veya ko-faktörler aracılığıyla immün hücrelerin işlevlerini düzenlediği anlaşılmıştır (Farberman ve ark., 2004; Mori ve ark., 2003; Satsu ve ark., 2006).

Dendritik hücreler (DC), göç eden fagositik hücrelerdir, antijeni toplama ve sunma kapasitesine sahiptir. DC'in occludin, claudin-1, E-cadherin ve Beta-katenin gibi sıkı bağlantı proteinleri eksprese ettiği bildirilmiştir. DC'lerin intestinal bariyer fonksiyonundan etkilenmeksizin intestinal epitel arasından infiltre olduğu ve bakteri örneklerinin enfeksiyondan önce intestinal sistemde var olduğu ileri sürülmüştür (Rescigno ve ark., 2001).

T lenfositlerinin phorbol myristate acetate (PMA) ile muamele edildiğinde occludin eksprese ettiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar lenfositlerden occludin salınımının, T lenfositlerinin endotel ve epitel tabakalarından geçerek hem bağlanma hem de damar dışına çıkmasını kolaylaştırabileceğini ileri sürmüşlerdir. (Alexander ve ark., 1998).

İntestinal epitel hücrelerinin uyarımına cevapta sitokin sekrete edebilen efektör hücreler olduğu bilinmektedir. TNF- α , IFN- γ IL-1 β , IL-2, IL-4 ve IL-5 intraepitelyal lenfositlerden salgılanan sitokinlerdir. Bu sitokinlerden özellikle TNF- α ve IFN- γ 'nın direkt olarak intestinal epitel hücrelerinin epitel permeabitesini ve elektrogenik iyon transportu için kapasitesini değiştirmede aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir (Satsu ve ark., 2006).

Martin ve ark.(1998), intestinal epitelial hücre fonksiyonlarını düzenleyebilen inflamatuvar hücreler yoluyla makrofaj ve intestinal epitelial hücreler arasında gap-junctional (aralıklı boşluklu) bağlantının olduğunu rapor etmişlerdir.

Tip II alveolar epitelyal hücre ve alveolar makrofajları ile çok sayıda partiküllerin etkileşiminin sitokin salınımına aracılık ettiğini gösteren bir çalışmada, makrofaj-epitel ko-kültürlerinde mono-kültürlere göre sinerjistik olarak TNF- α ve MIP-2 bazal seviyelerinin arttığı ve partiküllerin invitro inflamatuvar cevaplarının makrofaj ve epitel hücreleri arasında temasa bağımlı olduğu sonucuna varılmıştır (Tao ve Kobzik, 2002).

1.1.12. T ve B Hücre Uyarımı

Epitelyal bariyerde bazolateral yüzeyine yerleşmiş olan intraepitelyal lenfositler epitel hücrelerinin farklılaşmasını ve proliferasyonunu düzenlemektedir. CD8+ T hücreleri yaygın olarak bulundurmaktadır (Inagaki-Ohara ve ark., 2005). İntraepitelyal lenfositler sitokin salgılanması, fagositlerin aktivasyonu ve enfekte hücreleri öldürmesi ile konak savunmasında rol almaktadır (Abbas ve Lichtman, 2003).

İntestinal epitel hücresi antijen sunan hücre olarak etki etmekte ve mukozada T hücre yanıtını düzenlemektedir. Epitel hücrelerinin oluşturduğu sitokinler T hücre gelişimine ve fonksiyonuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca adezyon moleküllerinin ekspresyonu T hücrelerinin kemotaksisi ve fonksiyonuna yardımcı olmaktadır (Inagaki-Ohara ve ark., 2005). Epitel hücrelerinden üretilen IL-18 ile diğer sitokinlerden IL-7 ve IL-15'in işbirliği ile intraepitelyal lenfositlerin gelişiminde ve yayılmasında önemli bir rol oynadığı çalışmalarla gösterilmiştir (Okazawa ve ark., 2004).

Peritoneal boşlukta B lenfosit alt grubunda yer alan ve $\gamma\delta$ T lenfositlerinin analogu olan B-1 hücreleri, özgül olmayan poliklonal yanıt oluşturmaktadır. B-1 hücrelerinin çoğu fosforilkolin ve LPS gibi lipit antijenleri ve polisakkaridi için özgüdür. B-1 hücreleri epitelyal bariyeri geçebilen penetre mikroorganizmalara karşı

savunmada rol oynayan IgA, IgM ve IgG gibi natural antikorları oluşturmaktadır (Abbas ve Lichtman, 2003).

1.1.13. Doğal ve Kazanılmış İmmun Yanıtın Uyarılması

Doğal immunitenin bakteri saldırısına erken ve artmış bölgesel yanıtı inflamasyondur. İnflamasyon; lökositlerin enfeksiyon alanına göçü ve enfeksiyon ajanlarını elimine etmek için lökositlerin aktivasyonudur (Abbas ve Lichtman, 2003). İnflamasyon süreci; potansiyel tehlike çözünür inflamatuvar medyatörler veya kemotaktik ajanların lokal salınımını uyardığında başlar. Kemotaktik ajanlar ve inflamatuvar medyatörler; vasküler permeabiliteyi arttırmakta ve başlıca nötrofiller olmak üzere monosit ve lenfositlerden oluşan inflamatuvar hücreleri çekmektedir. Kemokinler doğal immün yanıtın kazanılmış yanıt dönüşü için lenfosit trafiğinin esas düzenleyicisi olmaktadır (Ganz, 2002; Hamzaqui ve Pringault, 1998; Neish, 2002).

Doğal immün yanıtın bir parçası olan epitel hücresi, antijen ile birlikte antijene özgül T ve B lenfositlerin çoğalma ve farklılaşmasını uyaran sinyali oluşturmakta, oluşan sinyali takip ederek olası kazanılmış immün yanıtı güçlendirmekte ve aynı zamanda kazanılmış yanıtın yapısını belirlemektedir (Abbas ve Lichtman, 2003). Epitel hücreleri bariyeri aşabilen invaziv patojenlere karşı akut inflamatuvar ve kazanılmış immün yanıtı başlatma yeteneğine sahip iken, lümeninde kolonize olan mikroorganizmalara karşı proinflamatuvar yanıt vermekten kaçınmakta ve tolerans geliştirmektedir (Mayer, 2003).

1.2. Makrofajlar

Doğal ve kazanılmış immün sistemin en önemli hücrelerinden birisi makrofajlardır. Primer fonksiyonları fagositoz olan mononükleer fagositik sistem veya retikülo

endotelial sistem (RES) hücreleri kemik iliğinden ayrıldıktan sonra periferel kana giren ilk hücre tipi, monositler oluşur (Smythies ve ark., 2005).

Monositler dolaşımda ve çeşitli organların interstisyumunda bulunur. Myeloid progenitörler promonositlere değişir, dolaşımda monositlere gelişir. Kandaki lökositlerin %5-8 kadarını monositler oluşturur, marginal yatakta dolaşımdakinin 2-3 katı kadar bulunur. Kandaki monositler 15-20 µm çapında, oval, at nalı, veya böbrek şeklinde nukleuslu, azurofil granüllü, geniş sitoplazmalı, lenfositlerden daha büyük hücrelerdir. Amöboid hareketlidirler. Gelişmiş golgi kompleksi, intrasitoplazmik lizozomları vardır (Delves ve ark., 2006). Lizozomlar mikroorganizma öldürmede önemli olan peroksidaz ve asid hidrolazlar içerir. Kemik iliğinde monosit rezervi azdır. İnflamasyonda kemik iliğinde yapım hızlanır. Periferel kanda monositlerin ömrü oldukça kısadır (1-3 gün) ve kan damarlarından diyapetes ile dokulara göç ederek doku makrofajlarını oluşturur (Delves ve ark., 2006).

Doku makrofajları monositlere göre daha uzun ömürlü hücrelerdir. Dokuda olgunlaşır, çevre özelliklerinden etkilenerek çeşitli hücre tiplerine farklılaşırlar (makrofaj, dendritik hücre, osteoklast). Koruyucu, iyileştirici, immun fonksiyonlar yapan hücrelerdir. Doku makrofajları, vasküler endotelyuma fikse olanlar (kupffer hücreleri, dalak ve lenf nodu makrofajları) ve gezici (alveol, periton, vücut boşluklarında dolaşanlar) olarak ikiye ayrılırlar (Delves ve ark., 2006).

1.2.1. Yerleşik ve Gezici Makrofajlar

Yaşam süresi, morfolojileri, fenotipleri farklı olan yerleşik doku makrofajları bilinmektedir (Çizelge 1.2.1). Prolifere olmazlar fakat birçok protein üretebilirler, nötrofillerin aksine uzun ömürlü hücrelerdir (Gordon 2006).

Çizelge 1.2.1. Doku makrofajları

Organ	Yer	Görev/Özellik
Kemik iliği	Stromal makrofaj	Hematopoetik hücrelerle ilişki eritroid N uzaklaştırılması
Karaciğer	Kupffer	Kandan hücre ve komplekslerin temizlenmesi
Dalak	Ak,al pulpa makrofajları	Yaşlı kan hücreleri temizliği, apoptotik B hücre fagositozu
Lenf nodu	Sinus makrofajı, medüller makrofaj	Afferent lenf Efferent lenf
Timus	Timik makrofaj	Apoptotik hücre temizliği
Barsak	Lamina propria	Endositoz
Akciğer	Alveolar makrofaj	Partikül temizliği
Beyin	Koroid pleksusd-mikroglia	Nöronlarla ilişki BOS'la ilişki
Deri	Langerhans hücre	Antijen yakalama
Üreme organları	Ovaryum, testis	Ölü hücre temizliği
Endokrin organları	Adrenal,tiroid, pankreas, gibi	Metabolik homeostasis
Kemik	Osteoklast	Kemik remodeling

Doku makrofajları ve yeni gelen makrofajlar zararlanma durumunu ve immun uyarıyı yanıtlarlar. İnflamatuvar uyarı, örneğin lokal enfeksiyon bölgesi kandan gelen monositlerle (çoğu kez diğer myeloid hücreler) zenginleşir. Monositler aktiflenmiş endotele yapışır. Diyapedes sonucu dokuda zenginleşen makrofajlar lokal etkileşim sonrası endositik reseptörleri eksprese eder, proinflamatuvar medyatör yapımı artar. Non-spesifik inflamatuvar makrofaj ile immunolojik aktif makrofaj farklıdır. Endositik veya fagositik uyarılmalar fenotipe göre farklı gelişmelere neden olur (Gordon 2006).

Hücrel adezyon mekanizmaları, sitokinler ve büyüme faktörleri, kemokinler ve kemokin reseptörlerini içeren makrofajların dağılımını ve göçünü indükleyen ve

oluşturan moleküler mekanizmalar ile ilgili tanımlamalar (Çizelge 1.2.2) henüz başlangıç aşamasındadır (Gordon 2006).

Çizelge 1.2.2. Makrofajlara etkili mediyatörler

Uyarı	Reseptör	Yanıt
Büyüme faktörü	M-CSF, GM-CSF	Büyüme, farklılaşma, yaşama
Sitokin	IFN- γ TNF- α IL-4, IL-13 IL-10	Aktivasyon Aktivasyon Alternatif aktivasyon Deaktivasyon
Kemokinler	MCP-1	Göç
Ekstrasellüler matris	Fibronektin (β_1 integrin)	Adezyon, fagositoz
Pepditler	Vazoaktif peptid	Fonksiyonlarda değişiklik
Eikosanoidler	Prostaglandin E ₂ Lökotrien B ₄	Fonksiyonlarda değişiklik
Endotel, T hücre ile hücreli ilişki	CR3 (β_2 integrin) CD80, CD86	Hücre zenginleşmesi antijen sunumu
Mikrobiyal ilişki	LPS (CD14)	Sekresyon, aktivasyon
Proteazlar	Nötral proteazlar: plasmin	Adezyon, sekresyon

Makrofajlar çoğu yerde patojeni tanıyan, yok eden, yaşlı ve ölü hücreleri temizleyen hücrelerdir. Primer yanıtta sekresyonlarıyla diğer immun hücreleri çeker, uyarır. T_H1 ve NK hücre sitokinleriyle uyarıldıktan sonra hücreli bağışıklığın hücre içi patojenler için önemli kolunu oluşturur. Yerel yığılması ile granülomlar oluşur. Makrofajlar hücre aktiviteleri, gen ekspresyonu, doku homeostazisindeki olumlu veya yıkıcı etkileri açısından heterojen gruptur. Plazma membran reseptör repertuarı ve çeşitli doku hücreleri ile ilişki sonrası sekresyon yanıtları farklıdır, hem doğal hem kazanılmış bağışıklık düzenlenmesinde rol alır. Makrofajlar bu özelliği ile bağışıklığın merkezindedir (Gordon 2006).

Dokulardaki makrofajlar fonksiyonlarına göre fagositoz yapanlar ve antijen sunan hücreler olarak ikiye ayrılabilirler. Fagositik makrofajlar, organizmada bulunan ve temizlenmesi gereken madde, mikroorganizma ve tümör hücrelerini fagositoz yaparak ortadan kaldırırlar. Eğer mikroorganizmalar özel reseptörleri veya antikör ve komplemanla kaplı olarak makrofaja yapışırsa fagositoz çok daha hızlı ve güçlü olur. Yerel makrofajlar sınırlı öldürücü etkili olduğu halde yeni gelenlerin mikroorganizma öldürücü etkisi daha fazladır (Gordon 2006).

Konak savunmasında fagositler basamaklar şeklinde görev görür; hücrelerin enfeksiyon alanına göçü; nötrofil ve monositler, endotelial hücrelerde bulunan adezyon moleküllerine bağlanarak ve enfeksiyona yanıtta oluşan kemoatraktanların etkisi ile kandan enfeksiyon alanına göç ederler. Nötrofil ve makrofaj mikrobiyal ürünleri TLR, mannoz reseptörleri (MR), G protein bağlı reseptör, Fc reseptör (FcR), kompleman reseptörleri (CR1, CR2, CR3, CR4) gibi farklı tipte reseptörler ile tanır ve yanıt verir (Gordon 2006).

1.2.2. Makrofaj Reseptörleri

Makrofaj yüzeyinde birçok reseptör vardır. Mikroorganizma ve diğer hücrelerle ilişki kurabilirler. Opsonik olan ve olmayan reseptör ayrımı önemlidir (Gordon 2006). Makrofajlarda mikroorganizmanın ortak yapılarını, antikoru, komplemanı, interferonları, TNF ve bazı bakteriyel komponentleri, glikokonjugatları, lipidleri tanıyan reseptörler bulunur. Bu ortak yapıları tanıma özelliğine sahip reseptörlere ise patern tanıyan reseptörler (PRR) denir.

Normal doku homeostasisi immun, inflamatuvar, patolojik olaylar sırasında hücreler apoptozla veya nekrozla ölürler. Apoptozla ölen hücreler makrofaj tarafından temizlenir. Apoptotik hücre temizlenmesinde etkin reseptörler çöpcü (scavenger) reseptörler (SR-A-I), CD14, vitronektin reseptörüdür. Vitronektin reseptör bağlanması antiinflamatuvar ürünlerin (PGE₂ ve TGFβ) yapımına neden

olur. Apoptotik hücrelerin etkin temizlenmemesi otoimmün hastalığa neden olur (Gordon 2006).

Mannoz Reseptör (MR): Makrofajlar çeşitli şekerleri bağlayan lektinleri eksprese ederler. Bunlardan en çok çalışılmış olanı mannoz reseptörüdür. MR endositoz, fagositoz yapabilir, homeostaz ve konak direncinde önemli rol alır. Prokaryotik ve ökaryotik hücre yapılarında zengin mannoz bulunur (Gordon 2006).

CD14 Toll-like Reseptör: Bakteri LPS hücre yanıtında rol alır. Plazma LPS bağlayan protein (LBP) LPS yanıtını artırır. TLR makrofaj LPS yanıtında esas rol oynar. Farklı mikroorganizma ilişkisinde farklı TLR rol alır (Gordon 2006).

Kompleman Reseptör (CR): Monosit/makrofaj kompleman C₃(CR₁, CR₃, CR₄) parçalanma ürünleri reseptörleri vardır ve fagositozu kolaylaştırır. Hem apoptotik hücre temizlenmesi hem konak direncinde önemlidir (Gordon 2006).

Fc Reseptörleri (FcR): Ig alt sınıfları, özellikle IgG için reseptörler vardır. Aktivasyon veya inhibisyon motifleri bulunur. Aktivasyon yanıtı fagositoz, endositoz, antikör aracılı sitotoksitedir. Farklı Fc reseptörleri enflamasyon yanıtını azaltır, doğal immünite ile kazanılmış immünite arasında geçişi hazırlar (Gordon 2006).

Opsonik olmayan fagositoz hücre içi enfeksiyona neden olmaktadır. Opsinler olmadığında reseptörler (CR3, SR-As, MR, CD14) aracılığıyla tanınan bakteri, parazit, virus hücre içine alınır. *Mycobacteria*, HIV gp 120, *Pneumocystis carini*, *Klebsiella*, *Candida albicans*'da MR ligand bulunur. Bu şekilde hücre içine giriş veya invazyon patojenin hücre içinde üreme için kaçış stratejisidir, fagozom olgunlaşması engellenir, lizozom füzyonu, asidifikasyon engellenir (*Mycobacteria*). *Legionella pneumophila*, *Salmonella*, *Leishmania*, *Listeria* farklı kaçış yolları kullanarak hücre içinde yaşamına devam eder. IFN- γ bütün bu kaçış

mekanizmalarının üstesinden gelebilir. Kazanılmış hücrel bağışıklık hücre içi enfeksiyonun başedilmesinde önemlidir (Gordon 2006).

Fagositozda makrofaj ve nötrofiller içlerine aldıkları mikroorganizmaları öldürmeye yardım eden çeşitli toksik ürünler oluşturur. Bunlardan en önemlileri bakteri için direkt toksik olan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonları (O_2^-), ve NO'dur. Bunlar lizozomal NADPH oksidaz ve solunum patlaması olarak bilinen sürecin diğer enzimleri ile meydana getirilirler (Gordon 2006).

Antijen sunucu hücreler antijen ile ilk karşılaşan ve onları lenfositlere sunan hücreler olarak bağışık yanıtta ilk adımı başlatan hücrelerdir. Sunuculuk görevi yapan makrofajlar tarafından alınan antijenlerde fagositoz olayındaki gibi parçalama ve sindirme işlemi oluşmaz. Antijenler sunucu hücrelerde henüz tam anlaşılammış özel bir hazırlık dönemi geçirirler. Daha sonra bu antijenleri, T ve B lenfositlere sunarlar ve bağışık yanıtı başlatırlar. Antijen sunuculuk görevi yapan makrofajlarda, fagositoz yapan makrofajlardan farklı olan yüzeyel reseptörler bulunur. Bu sunuşta rol oynayan en önemli yüzey molekülü HLA-DR antijenleridir (Kanzato ve ark., 2001). Ayrıca B-lenfosit, damar endotel hücresi, derideki Langerhans hücresi de antijen sunuculuk yaparlar. Sonuç olarak makrofajlar, organizmada fagositoz işlevleri ile temizlenmesi gereken maddeleri ortadan kaldırarak vücudun özgül olmayan savunmasında önemli bir rol alırlar, antijen sunuculuk görevi yaparak da bağışık yanıtın başlamasını sağlarlar (Gordon 2006).

Makrofajlar tipik olarak mikroorganizmaya karşı nötrofiller gibi hızlı yanıt oluştururlar; ancak inflamasyon alanında daha fazla kalırlar. Bu nedenle makrofajlar doğal immun yanıtın geç evresinde -enfeksiyondan sonraki 1, 2 gün içinde belirgin olan efektör hücrelerdir. Makrofaj, nötrofilden daha uzun ömürlüdür, nötrofillerin aksine tamamen farklılaşmamıştır ve hücre inflamasyon alanında bölünür (Gordon 2006).

Profesyonel fagositler çok sayıda büyük partikülü içine alabilirler. Yoğun fagositoz sırasında yüzey membranının büyük kısmı partikülle birlikte internalize edilebilir. Fagositin kendi yüzey alanından daha geniş yüzey alanını 30 dakikada internalize ettiği gösterilmiştir. Fagositin içine alınma, zararsız hale getirilme için yeterli değildir. Böylece antikorlardan korunarak hücreyi araç olarak kullanırlar, çeşitli yerlere taşınırlar. Hücre içine alındıktan sonra hücre içi öldürme işleminin başlaması gerekir. Hücre içi patojenler buna karşı direnebilir. Hücresel immunitenin makrofaj aktivasyon mekanizması ile bu tür mikroorganizmaların yok edilmesi mümkündür (Reddy, 1998).

1.2.3. Makrofaj Fenotipini Yönlendiren Sitokinler

Bakteriyel ürünlere yanıtta makrofajdan salınan önemli sitokinler IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- α 'dır. TNF- α , lokal inflamatuvar yanıtta indükleyicidir ve sistemik etkilere sahiptir. IL-8, nötrofillerin enfeksiyon alanına çekilmesine yardımcı olarak lokal inflamatuvar yanıtta katkıda bulunur. IL-12, NK hücreleri aktive eder ve CD4-T hücrelerinin T_H1 hücrelerine farklılaşmasını sağlar. Böylelikle adaptif immuniteye geçişte rol almış olur. Yine makrofaj kaynaklı sitokin ve kemokinler; nötrofillerin kandan enfeksiyon alanına göçünü sağlarlar (Janeway ve ark., 1999).

Monosit/makrofaj farklılaşmasında T_H1 ve T_H2 sitokinleri makrofaj heterojenliğini yaratır. Farklı sitokinleri ele alarak makrofajlarla yapılan çalışmalarda farklı sitokinler tarafından indüklenen gen ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir (Çizelge 1.2.3). IFN- γ proinflamatuvar antimikrobiyal aktiviteyi artırır (immün aktivasyon). IL-10 tam tersini yapar (deaktivasyon). IL-4, IL-13 etkisi alternatif aktivasyon olarak adlandırılır, proinflamatuvar ürünlere orta derecede inhibisyon vardır. Aktif makrofaj hücresel immunitenin aracı hücrelidir. Alternatif aktiflenmiş makrofaj (yenilenme olayları da dahil) humoral immuniteye aracılık eder. Makrofajlar, myeloid dendritik hücreler, NK ve T hücrelerden IFN- γ üretimini arttıran IL-12, IL-18 üretirler (Gordon, 2006).

Çizelge 1.2.3. T_{H1} ve T_{H2} sitokinlerin etkisi ile gelişen makrofaj fenotipleri

IFN- γ	T _{H1} tipi	T _{H2} tipleri		Etki
		IL-4/13	IL-10	
MHC sınıf II	++	+	-	İmmün hücre ilişkisi
Solunum patlaması	++	(-)	-	Hücrel immünite
NO	++	(-)	-	Doku zedelenmesi (tbc.)
TNF- α	++	(-)	-	Pro-inflamatuvar
IL-1				
IL-6				
Mannozil reseptör	-	++	0	Fagositoz, endositoz
Büyüme	-	+	0	İmmün lezyondaki MQ lokal büyümesi
Füzyon	0	++	0	Dev hücre Granulom (tbc.)
GF sekresyonu	-	++	+	Lezyon iyileşmesi

Ayrıca makrofajlar inflamasyonu sınırlayan sitokin oluşturur ve enfeksiyon alanında doku iyileşmesini yönlendirir. Makrofaj tarafından oluşturulan sitokinler enfeksiyonun ilk günlerinde meydana gelen lokal inflamasyon ve doğal immün yanıtın oluşumunda önemli role sahiptir (Gordon 2006).

1.2.4. Makrofaj Yanıtları

Aktif makrofajlar hem proinflamatuvar hem de supressif sitokinler üretir. İmmün ve inflamatuvar cevabı düzenler ve sürdürür. Mikroorganizma antijenleriyle karşılaşan doku makrofajı geniş etki yelpazesi olan ürün üretimine başlar, salar, etrafını etkiler (Çizelge 1.2.4). Bunlar düşük molekül ağırlıklı metabolitler, eikosanoidler, sitokinler, kompleman proteinleri, enzimler, özellikle lizozimdir. IFN- γ ile aktiflenen makrofajın, LPS gibi yüzey tetiklenmesiyle enflamasyonu yapan ürünlerin yapımı çok artar. Ortama diğer hücrelerin çekimi, adezyonu, aktivasyonu gerçekleşir. Makrofajlar aynı zamanda enflamasyonu ve immün yanıtı baskılayan TGF β , PGE2,

IL-10 gibi inhibitör moleküller salarlar. IFN- γ , IL-1, TNF- α lökosit ve diğer hücre aktiviteleri için güçlü düzenleyicilerdir. Bu sitokinler endotel hücre adezyon moleküllerini, selektinleri, makrofaj kaynaklı kemokinleri uyarır, diğer inflamatuvar hücrelerin ortamda toplanmasını sağlar. IL-6, IL-1, akut faz yanıtı mediyatörüdür. Makrofaj çıkışlı sitokinlerin uzak hedefi santral sinir sistemi, kaslar, yağ depoları ve nöroendokrin sistemdir. Sitotoksik ürünler ve elastaz, kollajenaz, ürokinaz gibi nötral proteinazlar doku hasarı, kronik enflamasyon yapabilir. Monosit kaynaklı prokoagülan/doku faktörü damar tıkanması, doku zararlanması başlatabilir (Gordon 2006).

Fagositozu takiben farklı öldürme mekanizmaları aktif makrofajda çok daha etkindir. Lizozom füzyonundan sonra yükselen pH sonra düşer. Aktif makrofajda reaktif oksijen radikalleri üretimi mikroorganizmanın içeri alınmasından hemen sonra artar. Doku makrofajları viruslar dahil bazı mikroorganizmaları ancak sayısı artmayacak kadar sınırlı öldürebilme gücündedir. Lizozim Gram pozitif hücre çeperi peptidoglikanına doğrudan etkilidir. Komplemanla zedelenmiş Gram negatif hücre çeperi de lizozime duyarlıdır (Gordon 2006).

Defensinler, makrofajların antibakteriyel aktivitelerine katılan yüksek katyonik proteinler ve polipeptidlerdir. Bazı makrofajlarda, nötrofillerde bulunur, lipid tabakalarda iyon geçirgen kanallar oluşturur. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Cryptococcus neoformans* ve zarflı virusları öldürebilirler. Doku makrofajı mikroorganizmayı içine alabilir, lizozom füzyonu yapabilir, asidifikasyon ile patojeni parçalayabilir, fakat mikroorganizma vakuolden sitosole kaçabilir (Gordon 2006).

Çizelge 1.2.4. Makrofajlardan salınan ürünler, grupları ve örnekler

Düşük molekül ağırlıklı metabolitler	Reaktif oksijen radikalleri, RNI, eikosanoidler, prostoglandinler, lökotrienler, PAF
Sitokinler	IL-1 β , TNF- α , IL-6 IFN α /IFN β , IL-10 IL-12, IL-18 TGF β MIP α/β , MCP-1, RANTES, IL-8
Adezyon molekülleri	Fibronektin Trombospondin
Kompleman	C3, diğerleri
Prokoagülan	Doku faktörü
Enzimler	Lizozim Ürokinaz (plasminojen aktivatör) Kollajenaz Elastaz

İmmün aktif makrofaj daha çok lizozim, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, büyüme faktörü ve proteinazlar üretir. Dinlenen makrofaj ile aktif makrofaj arasındaki en önemli fark H₂O₂ yapımı ve solunum patlaması ile yapılan metabolit seviyesidir.

IFN- γ ile aktiflenen makrofajda NO sentaz artar (i-NOS). NO salınımı komşu hücrelerde mikroorganizma öldürme gücünü artırır. AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome)'de makrofajın aktive olamaması nedeniyle HIV (Human Immunodeficiency Virus) persistansı, fırsatçı patojen enfeksiyonları, latent tüberküloz reaktivasyonu önemlidir. Nadir görülen IL-12 defektlerinde hücre içi patojenlere duyarlılık artar (Gordon, 2006).

Makrofajların anti-mikroorganizma becerileri farklıdır. Monositler, değişimini tamamlamış doku makrofajlarından daha fazla reaktif oksijen metabolitleri ve myeloperoksidaz üretirler. Yeni gelenler, aktiflenenler konak direncini birinci derecede etkilerler. Lizozim, TNF- α ve IL-1 gibi proteinlerin yeni üretim yeri granülom makrofajlarıdır. Aktiflenen makrofaj mediyatörleri hücre dışına salınır.

Aktif makrofaj otoimmün hastalıkta, kronik inflamatuvar eklemde, sinir sisteminde doku zararlanmalarına katılır (Gordon, 2006).

Mukozal immün sistemin ilk görevi mukozal yüzeylerde immün savunmayı sağlamaktır. Birçok enfeksiyon hastalığı etkeni (tüm etkenlerin % 90'ı) vücuda mukoza yüzeylerini aşarak girmektedir (Ashman ve Papadimitriou 1990; Bouvet ve Fichetti 1999). Erişkin bireyde 400 m²'lik yüzey ile vücudun besin maddeleri, toksinler, allerjenler ve mikroorganizmalar ile karşılaşan en geniş bölgesinin mukozalar olduğu bilinmektedir (Acheson ve Luccioli, 2004).

1.3. *Streptococcus pyogenes* (Grup A Streptokoklar)

Streptococcus cinsi içerisinde, doğada yaygın olarak bulunan Gram pozitif, tek yönde bölünerek zincir yapan, hareketsiz, katalaz negatif, fakültatif anaerob kok şeklinde bakterilerdir. Serolojik temellere dayanan Lancefield sınıflamasında A grubu streptokok sınıfına giren *Streptococcus pyogenes*, β hemolitik bir streptokoktur (Ruoff ve ark., 2003). İnsanda anjin, yılançık, kızıl, tonsil absesi, lohusalık ateşi ve menenjit gibi akut cerahatli hastalıklar ve septisemiye neden olabildikleri gibi akut eklem romatizması ve akut glomerulonefrit gibi süperatif özellikleri olmayan post streptokoksik hastalıkların da nedeni olurlar (Brooks ve ark., 1995).

1.3.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

0.6-1.5 µm çapında oval veya yuvarlak şekilli koklardır. Sıvı besiyerlerindeki kültürlerinden yapılan preparatlarda genellikle uzun kok zincirleri halinde görülürken, katı besiyerlerindeki kolonilerinden hazırlanan preparatlarda diplokoklar veya kısa zincirli koklar halinde görülürler. Sporsuz ve hareketsizdirler. İnsan bağ dokusunda bulunan hyalüronik asitten yapılmış antijenik olmayan bir kapsüle sahiptir (Berkiten, 2005a; Söyletir ve Över, 2002). Hücre duvarında kapsülden dışarı

çıkan, epitel hücrelerine tutunmada rol alan pili bulunmaktadır (Kilian, 1998; Ruoff ve ark., 2003).

1.3.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikler

Streptokoklar fakültatif anaerob, optimal üreme ısıları 35-37°C olan bakterilerdir. Üremeleri için basit besiyerleri yeterli olsa da kan ve serum ile zenginleştirilmiş besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Kanlı agarda 24-48 saatlik inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında yarı saydam, etrafında geniş β hemoliz alanı olan, gri-beyaz renkte S (smooth) tipi, kapsüllü olanlar taze hazırlanmış besiyerlerinde M (mukoid) tipi, kapsülsüz olanlar daha küçük ve parlak koloni oluştururlar (Berkiten, 2005a; Kilian, 1998; Ruoff ve ark., 2003; Söyletir ve Över, 2002). Diğer streptokoklar gibi aerop ortamda glikozu parçalarlar. Laktik asit oluşması nedeniyle ortam pH'sı değiştiğinden bakterinin üremesi ve canlı kalması güçleşir (Berkiten, 2005a; Kilian, 1998; Ruoff ve ark., 2003).

Tam hemoliz oluşturmaları dışındaki biyokimyasal özellikleri arasında, eskülin ve arginini fermente etmeleri, basitrasine duyarlılık, genellikle maltoz, sukroz , laktoz pozitif olmaları ve inülin, mannitol ve katalaz negatif olmaları sayılabilir. Isıya ve dezenfektanlara karşı duyarlıdırlar (Kilian, 1998; Ruoff ve ark., 2003).

1.3.3. Antijenik Yapı ve Patojenite

Grup A streptokokların hücre yüzeyi çeşitli antijenik yapılar içermektedir. Majör hücre duvarı karbonhidrat antijeni olan ve gruba adını veren A antijeni, L- Rhamnoz ve N-Asetil-D-glukozamine içeren kompleks bir polisakkarittir. Hücre duvarının dış yüzeyi ile ilişkili diğer fibriler protein ise Grup A streptokokların fimbrialarında bulunan ve epitel hücrelerine tutunmada rol alarak virülans ile ilgili ve tipe özgül antijenik yapıları oluşturan M proteindir. Asit ve ısıya dirençli ve tripsine duyarlı olan M proteini, esas virulans antijenidir ve fagositlerin tutunmasını (adezyonunu)

engellerek direnç gösterir. Hücre yüzeyi ile ilgili diğer antijenler, tripsinle muameleyle dirençli, virulanstaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte Grup A streptokokları tiplendirmek için kullanılan T ve R antijenleridir (Berkiten, 2005a; Ruoff ve ark., 2003; Söyletir ve Över, 2002).

Gram pozitif bir bakteri olan Grup A streptokokların L-alanin-D-glutamil-L-lizin-A-alanin yan zincirleriyle bağlanmış olan, tekrarlayan N-acetyl-D-glucosamin-N-acetyl-D-muramic asit ünitelerinden yapılmış peptidoglikanı (Cengiz 2004), Gram negatif bakteri endotoksini ile aynı etkileri oluşturmakta (ateş, deri nekrozu, eritrosit ve trombosit erimesi gibi), farklı pek çok bakterinin peptidoglikanına benzediğinden çapraz reaksiyonlarda rol almaktadır (Berkiten 2005a; Kilian, 1998; Ruoff ve ark., 2003).

Konak hücreye tutunmayı sağlayan lipoteikoik asit, M proteini ile ilgili olduğundan M proteinine sahip suşlar, bakterinin ağız ve deride bulunan epitel hücrelerine tutunmasını sağlayarak virulansı artırır ve bir çok hücre için sitotoksik özellik gösterir (Berkiten, 2005a). Hücre duvarının bir diğer önemli komponenti hyalüronik asit yapısındaki antijenik olmayan kapsül olup, bakteriyi fagositozdan korur. Logaritmik üreme safhasında kaybolur (Berkiten 2005a; Söyletir ve Över, 2002).

Grup A streptokokların virülansında rol alan bir çok enzim ve toksinleri bulunmaktadır. Kızıl oluşumunda rol alan eritrojenik toksin, kanlı plakların yüzeyinde streptokok kolonilerinin etrafındaki hemoliz oluşumundan sorumlu olan streptolizin S, oksijene duyarlı, kuvvetli antijenik ve geçmiş veya geçirilmekte olan bir enfeksiyonunun saptanması ve takibinde kullanılan streptolizin O, kan pıhtısını eritip mikroorganizmanın enfekte dokulara hızla yayılmasından sorumlu olan streptokinaz, deri enfeksiyonlarını tanımlayan DNAz, yayılma faktörü olan hyalüronidaz ve bazı proteinleri parçalayarak bakterinin yayılmasını kolaylaştıran

proteinaz bunlardan bazılarıdır (Berkiten 2005a; Cengiz, 1999; Kilian, 1998; Söyletir ve Över, 2002; Ruoff ve ark., 2003).

1.3.4. Yaptığı Hastalıklar

Grup A streptokokların oluşturduğu hastalıklar süpüratif olanlar ve olmayanlar diye iki başlık altında toplanabilir. Süpüratif olanlar; anjin, tonsillit, farenjit, kızıl, erizipel, impetigo, puerperal sepsis, septisemi, akut bakteriyel endokardit, toksik şok benzeri hastalıklar ve nadiren sellülit, lenfanjit ve pnömonidir. Süpüratif olmayan hastalıklar, mikroorganizmanın yaptığı enfeksiyondan veya tamamen belirtisiz geçen 1-5 haftalık dönemden sonra ortaya çıkan poststreptokoksik tablolardır. Bunlar; akut romatizmal ateş ve akut glomerülonefrittir (Cengiz, 1999; Kilian, 2002 ; Söyletir ve Över, 2002; Ruoff ve ark., 2003).

1.3.5. *Streptococcus pyogenes* Konak Hücre Etkileşimi

Grup A streptokoklar epitel hücrelerini oldukça etkin bir şekilde invaze edebilmekte, takip eden transitoz mekanizması ile alttaki dokuya geçebilmektedir. Hiyalüronik asitlerinin konak hücreindeki CD4'e bağlandıktan sonra epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları gevşetiyor olması, olası bir diğer virülans mekanizmasını oluşturmaktadır (Park, 2003).

Streptokokkal M proteini epitel hücrelerindeki füköz içeren glikoproteinlere ve farinks hücrelerindeki sialik asite bağlanmakta ve epitel hücrelerine penetre olmaktadır (Park, 2003). Ayrıca grup A streptokoklarda bulunan laminin bağlayan protein de epitel hücrelerine tutunmada rol almakta, enfeksiyon sırasında ekspresyonu artmakta ve farinkse bakterinin kolonizasyonu kolaylaşmaktadır (Wahid ve ark., 2005).

Streptokoklar esas olarak ekstrasellüler mikroorganizmalar olmalarına rağmen fagositler içerisinde yaşamlarını 24 saat kadar sürdürebilmektedir; çünkü bu

mikroorganizmaların fagositer hücreler ile baş edebilecek virülans faktörleri bulunmaktadır (Medina ve ark., 2003). Bu bakterilerin antikorlara ve komplemana oldukça duyarlı olduğu göz önüne alındığında, fagositlerin streptokokların kana taşınmasından sorumlu olduğu ve fagositler içerisinde yaşamını devam ettirmesinin ek bir virülans mekanizması olduğu düşünülmektedir (Daubener ve ark., 1999). Ayrıca grup A streptokokların süperoksit dismutazlarının ekstrasellüler olarak yerleşmiş olması, konak hücresi tarafından dış ortama salınan reaktif oksijen ürünlerinden bakteriyi korumaktadır (McMillian ve ark., 2004).

Streptokok enfeksiyonu sonucu lokal savunma mekanizmaları bakteri çoğalmasını kontrol etmekte ve yayılımını önlemektedir. Kana geçtiğinde ise lokal mekanizmalar yeterli olmamakta, sitokin üretimi meydana gelmekte, T hücreleri ve muhtemelen NK hücreleri aktive olmaktadır (Daubener ve ark., 1999).

S. pyogenes'in keratinositleri invazyonu, β -defensin üretimine neden olmakta, oluşan insan beta defensini (HBD)-2 patojenik bakteriyi öldürmekte, ancak *S. pyogenes*'in HBD-2 oluşumunu indüklemesi diğer patojenik bakteriler ile karşılaştırıldığında daha zayıf olarak görülmektedir (Dinulos ve ark., 2003). HBD-1 epitel hücresinden yapısal olarak salgılanırken, HBD-2 ve 3 bakteriyel uyarana yanıt olarak oluşmakta; farklı alanların epitel hücreleri, *S. pyogenes*'e karşı farklı yanıt oluşturmaktadır (Chung ve Dale, 2004). Yüksek derecede virülan *S. pyogenes*'in oluşturduğu streptokokkal inhibitör bileşen, mukozal yanıtta rol alan lizozim, salgısal lökosit proteinaz inhibitörü, insan α -defensin 1 ve HBD-1,-2 ve 3'ü inhibe etmektedir (Ferne-King ve ark., 2004).

S. pyogenes konak hücrelerinde sitokin ve kemokin üretimine neden olmakta; oluşan ürünler Dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve T_H1 yanıtı oluşumunu uyarmaktadır (Veckman ve ark., 2004). M proteinlerine yanıt olarak CD4+ T hücrelerinde çoğalma ve bu hücrelerden IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 ve IL-6 üretimi

meydana gelmekte; M proteinine karşı oluşan immun yanıt konağı bakterinin kolonizasyonundan korumaktadır (Kerakawauchi ve ark., 1997).

S. pyogenes'e karşı konak humoral yanıtı, M proteinine karşı oluşan IgM ve IgG ile sağlanmakta, bu antikorların mikroorganizma yüzeyine bağlanması *S. pyogenes*'in nötrofiller ile öldürülmesine aracılık etmektedir (Kerakawauchi ve ark., 1997; Nilsson ve ark., 2005).

1.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli, *Enterobacteriaceae* familyasında *Escherichia* genusu içinde yer alan, insan ve hayvanların kalın barsağında yaşayan normal flora bakterisidir. Kalın barsak florası içinde, Gram negatif ve çoğu hareketli basil olan en yaygın fakültatif anaerop türdür. Barsakların normal flora üyesi olmasına rağmen aynı zamanda üriner sistem enfeksiyonu, barsak enfeksiyonları ve bakteriyemi, menenjit, pnömoni gibi barsak dışı enfeksiyonların nedenlerindedir (Baysal 2004; Bopp ve ark., 1998; Gilchrist 1995).

1.4.1. Morfolojisi ve Boyanma Özellikleri

E. coli, yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda, 1.0-1.5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak basil şeklindedir. Kültürlerde kok benzeri küçük, kısa şekilleri veya uzun, dallanan şekilleri bulunabilir. Peritriş kirpikleri ile hareketlidir, fakat hareketleri yavaştır. Hatta hareketsiz görünebilirler. Kapsüllü hareketsiz suşları da vardır (Baysal, 2004; Erdem, 1999).

1.4.2. Kültür Özellikleri

Kan, serum, asit sıvısı, glikoz gibi maddeler ilave edilmemiş adi besiyerlerinde kolay ürerler. En iyi üreme ısısı 37⁰ C ve pH: 7-7.2 dir. Buyyonda, peptonlu suda bol ürer,

homojen bulanıklık yapar. Adi agarda 2-3 mm çapında, hafif kabarık, yuvarlak, kenarları düzgün, gri-beyaz koloniler yapar. Laktoza etki etmeleri, laktoza etki etmeyen barsak patojeni Salmonella ve Shigella cinsi bakterilerden ayırt edilmelerini sağlar. Mac Conkey agarda etrafında presipite safra tuzlarının oluşturduğu pembe alanlarla çevrili kuru, pembe-kırmızı (laktoz pozitif) koloniler yapar. Eozin Metilen Blue (EMB) agarda laktoz pozitif, metalik koloniler oluşur. Pigmentsizdir (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999).

1.4.3. Antijenik Yapı

E. coli'nin somatik (O), kirpik (H) ve kapsül (K) antijenleri vardır. *E. coli* suşlarının serotiplendirilmesi, Kauffmann tarafından geliştirilen şemaya göre yapılabilir. Serotiplendirmede öncelikle O ve H antiserumları kullanılır. *E. coli* suşlarının antijen yapılarının belirlenmesi özellikle epidemiyolojik çalışmalarda yararlıdır (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999).

1.4.4. Virulans ve Patojenite Özellikleri

E. coli'nin çeşitli konaklarda, değişik dokuları enfekte edebilmek için çok sayıda virulans faktörü vardır. Bunlar yapısal faktörler veya hücre dışına salgılanan toksinler, enzimler gibi değişik ürünlerdir.

K1 kapsülü: *E. coli*, B grubu streptokoklarla birlikte yeni doğan menenjitinin en önemli etkenlerindedir. Menenjitli yeni doğanlardan izole edilen *E. coli* suşlarının %80'i K1 kapsülü taşımaktadır. İn vitro ortamlarda insan nötrofillerinin ve normal insan serumunun öldürücü etkisine karşı mikroorganizmayı dirençli kılar. K1 kapsülü ayrıca beyin omurilik sıvısında ve kanda mikroorganizmanın canlı kalmasına yardım eder (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem,1999)

Tip I (MS- Mannoze sensitif) fimbria: Mannoze reseptörlere bağlanan fimbriyalardır. Birçok ökaryotik hücreye tutunmayı sağladığı halde, patojenik fonksiyonu yoktur ve hiçbir hastalıkla ilişkili değildir. Tip I (MS) fimbria, *E. coli* suşlarının kolon mukozasına, ağız boşluğuna ve vagina mukozasına tutunmasını sağlar (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999).

Tip II (MR-Mannoze rezistent) fimbria: Tip I'den daha karmaşıktır ve değişik yapıda kolonizasyon faktörleri ve adezinler bu ad altında toplanmıştır. Bunlar S fimbria, P fimbria, X faktör ve çeşitli kolonizasyon faktörleridir. S fimbria, bakteriyemi yapan *E. coli* suşlarında bulunur. P fimbria, üropatojen *E. coli* suşlarında bulunur. Üriner yol enfeksiyonları ile ilişkilidir. Pyelonefrit yapan suşların %70'i, sistit yapan suşların %36'sı ve kolonda bulunan suşların %19'unda P fimbria bulunur. X faktör, heterolog adezinler olarak bilinen, P kan grubu antijenleri ve mannoze içeren bölgeler dışındaki alanlara tutunan ve *E. coli*'nin üropatojenitesinde önemli olan faktörlerdir. Bu faktörlere artık Dr kan grubu antijenlerine tutunmayı sağladığından dolayı Dr hemaglutinin denmektedir (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999).

Enterotoksinler: ETEC suşları, yapımı plasmidle kodlanan, ısıya duyarlı LT (kolera toksinine benzer) ve ısıya dirençli ST olmak üzere, barsaklarda aktif olan 2 ekzotoksin salgırlar.

LT, ince barsaklarda GM1 reseptörlere bağlanan B parçası beş birimden oluşan kolera toksinine benzeyen bir toksindir. Reseptörlere bağlandıktan sonra ince barsaklarda hücre içine giren A parçası, toksik etkilerden sorumludur. Adenilat siklazı aktive eder. Hücre içinde artan cAMP barsak boşluğuna bol miktarda NaCl ve sıvı salgılanmasına neden olur (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem 1999).

ST, disülfid bağları ile birbirine bağlanan, uzunlukları 18-50 aminoasit arasında değişen birkaç küçük polipeptitten oluşur. Disülfid bağları, ısıya dirençliliği sağlar.

Etkisini guanilatsiklazı aktive edip, cGMP'ın birikimiyle yapmaktadır. LT' de olduğu gibi barsak lümenine bol sıvı ve elektrolit salgılanmasına neden olur (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999).

Verotoksinler, *E. coli* suşları sitotoksik etki yapabilen verotoksinler salgırlar. O57, H7 serotipi tarafından salgılanır ve bu serotip diyare, hemorajik kolite, hemolitik üremik sendroma yol açar (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999).

1.4.5. Plazmidleri

E. coli suşlarında antibiyotiklere direnç özelliği kazandıran R plazmidler ve virulans faktörlerini kodlayan çeşitli plazmidler bulunmaktadır. (Baysal, 2004; Erdem, 1999).

1.4.6. Bakteriyosinleri

E. coli suşlarının salgıladığı bakteriyosinlere, colisin denir. Epidemiyolojik araştırmalarda kolisin incelemesi ve bakteriyosin tiplendirmesi yapılmaktadır (Erdem, 1999).

1.4.7. Yaptığı Hastalıklar

E. coli, normal barsak florasını oluşturan bakterilerindendir. Barsaklarda diyare oluşturan suşları dışında, kommensal olarak yaşarlar. Ancak vücutta başka bir organa, dokuya geçtiklerinde enfeksiyonlara neden olurlar (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999; Töreci, 2002).

Barsaklarda hafif diyareden, kolera benzeri ağır sıvı kayıplarıyla seyreden diyareye ya da beraberinde hemolitik üremik sendrom gibi hayatı tehdit eden

komplasyonları olan kanlı diyareye kadar ağırlığı değişen, gastrointestinal hastalıklara beş farklı *E. coli* grubu neden olmaktadır (Baysal, 2004; Erdem, 1999).

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC): Akut bakteriyel ishalin dünya genelinde en sık saptanan nedenidir. ETEC suşlarının ince barsakların proksimal bölgesinde yerleşmesi mikrovilluslardaki özel reseptörlere CFAI, CFAII ve E8775 gibi fimbrialarının bağlanması ile olur. ETEC suşlarının adezyonu ve enterotoksin yapımını yöneten iki farklı plazmidi vardır (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999; Töreci, 2002).

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC): Bebeklerde ve 2 yaş altındaki çocuklarda sıkça görülür, ateş, kusma, mukuslu-kansız-sulu diyare ile seyreder. EPEC, barsakta herhangi bir toksin üretmez; eritrositlere yapışma-bozma adı verilen özel bir mekanizma ile sıkı bir şekilde tutunarak ishale neden olur. EPEC, genelde yüzeye tutunmakla birlikte ETEC ve EAğEC kökenlerine kıyasla daha invazivdir ve inflamatuvar yanıtı neden olabilir. Bakterinin konak hücreye ilk basamak tutunmadan sorumlu faktörü, enteropatojenik aderens faktörü (EAF) dır (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999; Töreci, 2002).

Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC): Kolon mukozasına invazyon yapar, epitel hücreleri içinde çoğalır, epitel hücrelerini tahrip eder ve bu özelliği plazmitte kodlanmış suşlardır. Ateş, karın ağrısı, kanlı-mukuslu tipik dizanteri veya sulu diyare yapar (Baysal 2004; Berkiten, 2005b; Erdem 1999; Töreci, 2002).

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC): Kanlı diyareye ve hemolitik üremik sendroma yol açarlar. EHEC suşları lizojen bir bakteriyofaj tarafından kodlanan, Vero hücrelerine toksik etki gösteren, protein sentezini inhibe eden verotoksin salgırlar (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999; Töreci, 2002).

Enteroaggregatif *E. coli* (EAgEC): LT veya ST üretmeyen, invaziv olmayan, O ve H antijenlerine göre diğer verotiplerinden olmayan, Hep-2 ve HeLa hücrelerine tipik olarak tutunan *E. coli* suşlarını tanımlamaktadır (Baysal, 2004; Berkiten, 2005b; Erdem, 1999; Töreci, 2002).

Barsak dışında *E. coli* enfeksiyonları: Üriner sistem enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, menenjit (özellikle yeni doğanda) ve bakteriyemi'dir. *E. coli* aynı zamanda septik artrit, endoftalmit, karaciğer absesi, endokardit, osteomyelit, prostatit, sinüzit, tromboflebit ve diğer enfeksiyonlarda da görülebilmektedir (Baysal, 2004; Erdem, 1999).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Sarf Malzemeleri

Doku kültür şişesi, 25 cm² ve 75cm² (Greiner, Almanya)

Doku kültür plakları, 24 ve 96 kuyucuklu (TPP, İsviçre)

Santrifüj tüpü, 15 ve 50 ml (Greiner, Almanya)

Kryo tüp, 2 ml (Greiner, Almanya)

Serolojik pipet, 1, 2, 5, 10 ve 25 ml (LP, İtalya)

Enjektör filtre, 0,2 µm (Orange Scientific, Belçika)

Thincerts W. Pet-Membrane, 0,4 µm (Greiner, Almanya)

Eppendorf, 1,5 ml'lik (Greiner, Almanya)

Sarı ve mavi pipet ucu (Eppendorf, Almanya)

İdrar özesi (LP, İtalya)

2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Penicillin/Streptomycin (PAA, Avusturya)

L-glutamine (Biochrom, Berlin)

Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin)

DMSO (Sigma, İngiltere)

Föetal calf serum (PAA, Avusturya)

RPMI 1640 (Biochrom, Berlin)

PBS tablet (Amresco, Amerika)

Trypan blue (Biochrom, Berlin)

Blood agar base (Merck, Almanya)

Eosin Methylen Blue Agar (Merck, Almanya)

Fosforik asit (Applichem, Almanya)

Sodyum nitrit (Sigma, İngiltere)
L-name HCL (Sigma, İngiltere)
Sülfanilamid (Sigma, İngiltere)
N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorit(NED) (Sigma, İngiltere)
Phorbol myristic asid (PMA) (Sigma, İngiltere)
IL-6 ELISA ölçüm kiti (Biosource, Amerika)
IL-8 ELISA ölçüm kiti (Biosource, Amerika)
TNF- α ELISA ölçüm kiti (Biosource, Amerika)
IFN- γ ELISA ölçüm kiti (Biosource, Amerika)
Caco-2 hücre dizisi, ACC 169 (DSMZ, Almanya)
THP-1 hücre dizisi, ACC-16 (DSMZ, Almanya)

2.1.3. Araçlar

Hücre kazıyıcısı (Orange Scientific, Belçika)
Laminair flow (Bilser, Türkiye)
Vortex (Stuart, İngiltere)
Santrifüj aleti (Herolab, Almanya)
Işık mikroskobu (Nikon, Japonya)
Inverted mikroskop (Nikon, Japonya)
CO₂'li etüv (Sanyo, Japonya)
Etüv (Heraeus, Almanya)
Derin dondurucu (-80 °C) (Nuaire, Japonya)
Sıvı azot tankı (Biocane, Amerika)
Thoma lamı (Spencer, Amerika)
Otomatik pipet (Genex, Finlandiya)
Pipetör (Greiner, Almanya)
Fotoğraf makinesi (Sony, Almanya)
Spektrofotometrik mikroplak okuyucusu (Molecular Devices, Amerika)

2.1.4. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Fosfat Tampon Solüsyonun (PBS) Hazırlanması:

PBS tablet (Amresco, Amerika)	
pH (Bir tablet 100 ml deiyonize suda çözülür)	7,4 +/- 0,1
NaCl	137 mM
KCl	2 mM
Fosfat Buffer	10 mM
Otoklavda steril edilir.	

Griess Çözeltisinin Hazırlanması:

Griess Çözeltisi A: 0,1 gr. N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorit (NED)/100 ml distile su. 0-4 °C'de ışıktan korunarak saklanır.

Griess Çözeltisi B: 1 gr sülfanilamid/100 ml ortofosforik asit (5%, h/h). 0-4 °C'de ışıktan korunarak saklanır.

Griess Ayıracı: 1 kısım Griess A çözeltisi+1 kısım Griess B çözeltisi. Ölçümden hemen önce hazırlanır.

10 mM nitrit standardı: Sodyum nitrit çözeltisi (69 mg sodyum nitrit/100 ml distile su). 0-4 °C'de ışıktan korunarak saklanır. 0-100 µM standart çözeltileri hazırlanır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Mikroorganizmaların Hazırlanması

Streptococcus pyogenes ATCC 49619 suşu (Refik Saydam Hıfzıssıhha Kültür Koleksiyonundan sağlandı) koyun kanlı agara ekilerek 37°C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün plak yüzeyinden bir öze dolusu mikroorganizma toplanarak PBS ile sulandırıldı. Mikroorganizma PBS içinde 3000 rpm’de 3 kez 10’ar dakika santrifüj edilerek yıkandı, bakteri pelleti %10 Fötal Calf Serum (FCS) içeren ‘ Rosewell Park Memorial Institute’ün 1640 kodlu hücre kültürü vasatı (RPMI 1640) içinde süspanse edildi. Bakteri %0,5’lik tripan mavisi ile boyandı. Boya almayan canlı hücreler Thoma lamında sayılarak mililitrede 1×10^5 bakteri olacak şekilde besiyeri ile sulandırıldı (Özenci ve ark., 2001; Dolapçı ve ark., 2003).

E. coli O75 suşu (Refik Saydam Hıfzıssıhha Kültür Koleksiyonundan sağlandı) Eosin Methylen Blue Agara (EMB) ekildi, 37°C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün plak yüzeyinden bir öze dolusu mikroorganizma toplandı ve mikroorganizma 3 kez PBS içinde 3000 rpm’de 10’ar dakika santrifüj edilerek yıkama yapıldı. Bakteri %0,5’lik tripan mavisi ile boyandı. Boya almayan canlı hücreler Thoma lamında sayılarak mililitrede 1×10^5 bakteri olacak şekilde besiyeri ile sulandırıldı.

2.2.2. Caco-2 Epitel Hücre Kültürünün Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan insan kolon epidermal adenokarsinoma hücresi (Caco-2) Avrupa Kültür Koleksiyonu Organizasyonuna bağlı olan Almanya Kültür Koleksiyonundan (DSMZ, ACC 169) sağlandı. Hücre kültürü vasatı ile sulandırılan epitel hücreleri 800 rpm’de, 4°C’de 10 dakika santrifüj edildi. %10 FCS içeren antibiyotiksiz RPMI 1640 içerisinde 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde süspanse edilerek, 25 cm² yüzeyli hücre kültürü şişelerinde üretildi. Tek tabaka halinde üreyen hücreler %0,25 Tripsin/EDTA besiyeri ilave edilerek kaldırıldı, %0,5’lik Tripan

mavisi ile boyanıp, boyanmayan canlı hücreler Thoma lamında sayıldı ve ml'de 1×10^5 canlı hücre olacak şekilde %10 FCS içeren RPMI 1640 ile sulandırıldı. 24 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 1000 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde *S. pyogenes*, *E. coli* ve kontrol olarak ikişerli kuyucuk olmak üzere konuldu, 3 saat süreyle %5 CO₂ içeren 37°C etüvde hücrelerin tutunması için inkübe edildi.

2.2.3. THP-1 Makrofaj Hücre Kültürünün Hazırlanması

2.2.3.1. THP-1 Monosit Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan insan leukemia monosit hücre kültürü (THP-1) Avrupa Kültür Koleksiyonu Organizasyonuna bağlı olan Almanya Kültür Koleksiyonundan (DSMZ, ACC-16) sağlandı. Hücre kültürü vasatıyla sulandırılan monosit hücreleri 800 rpm'de, 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi, %10 FCS içeren RPMI 1640 içerisinde 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon edilerek, 25 cm² yüzeyli hücre kültürü şişelerinde üretildi (Schwende ve ark., 1996; Tominaga ve ark., 1980; Tsuchiya ve ark., 1980).

2.2.3.2. Hücresel Diferensiyasyon (Farklılaşma)

THP-1 hücrelerini phorbol myristic asid (PMA) ile karşılaştırarak en uygun zamanda en uygun miktarda en iyi makrofaj benzeri hücrelere farklılaşmayı optimal hale getirmek için ön deneyler yapıldı. Bu amaçla süspansiyon olarak üreyen THP-1 monosit hücreleri 6 kuyucuklu plaklarda 2×10^5 /ml hücre olacak şekilde, içerisinde 10 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 60 ng/ml konsantrasyonlarda PMA bulunan %10 FCS içeren RPMI 1640 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. PMA ile muameleden sonra içerisindeki besiyerleri dököldü, 3 kez taze besiyeri ile yıkadıktan sonra üzerlerine besiyeri eklendi ve differansiye olmuş hücreler kullanılmadan önce %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Diferensiyasyon, hücrelerde yapışma ve fenotipik değişiklikler invert doku kültürü mikroskopunda gözlemleyerek

doğrulandı. Hücre canlılığı tripan mavisi ile boyanarak belirlendi (Schwende ve ark., 1996; Tominaga ve ark., 1980; Tsuchiya ve ark., 1980).

2.2.3.3. THP-1 Makrofaj Hücre Kültürü

Süspanse olarak üreyen THP-1 monosit hücrelerinin yapışan makrofaj benzeri hücrelere diferansiye olması için mililitresinde 2×10^5 monosit olacak şekilde içerisinde 20 ng/ml PMA bulunan %10 FCS içeren RPMI 1640 ile 48 saat inkübasyona bırakıldı. PMA ile muameleden sonra içerisindeki besiyeri döküldü, 3 kez taze besiyeri ile yıkadıktan sonra üzerine besiyeri eklendi. Diferansiye olmuş hücreler kullanılmadan önce %5 CO₂ içeren 37°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İçerisine besiyeri ilave edilip hücre kazıyıcısı ile kaldırılan hücreler %0,5'lik Tripan mavisi ile boyanıp, boyanmayan canlı hücreler thoma lamında sayıldı ve ml'de 1×10^5 canlı hücre olacak şekilde %10 FCS içeren RPMI 1640 içerisinde süspanse edildi, 24 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 1000 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde *S. pyogenes*, *E. coli* ve kontrol olarak ikişerli kuyucuk olmak üzere konuldu, 3 saat süreyle %5 CO₂ içeren 37°C etüvde hücrelerin tutunması için inkübe edildi (Schwende ve ark., 1996; Tominaga ve ark., 1980; Tsuchiya ve ark., 1980).

2.2.4. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Tek Başına Mikroorganizma ile Uyarılması ve Bakterisidal Etkisinin Araştırılması

Efektör hücrelerin (Caco-2 ve THP-1 hücreleri) *S. pyogenes*'e ve *E. coli*'ye karşı göstermiş olduğu bakterisidal etkiye daha önceden tanımlandığı şekilde bakıldı (Özenci ve ark., 2001; Dolapçı ve ark., 2003). Caco-2 ve THP-1 hücreleri ayrı ayrı ikişerli kuyucuklarda 24 kuyucuklu plaklarda %10 FCS içeren RPMI 1640 içerisinde mililitresinde 1×10^5 olacak şekilde konuldu. 3 saat inkübasyondan sonra hücrelerin üzerine mililitresinde 2×10^5 *S. pyogenes* ve *E. coli* ayrı ayrı ikişerli kuyucuklarda %10 FCS içeren RPMI içerisinde 500 µl ilave edilerek, 5 saat süreyle %5 CO₂

içeren 37°C etüvde inkübe edildi. Caco-2 hücresi ile 1/1 epitel hücresi/mikroorganizma oranlarında karşılaştırıldı. Kontrol olarak, *S. pyogenes*, *E. coli*, Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücreleri tek başına kullanıldı. 24 kuyucuklu plak 5-24 saat süreyle %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edildi. *S. pyogenes* için 5. saatlik inkübasyon periyodunun sonunda her bir kuyucuktan 100'er µl süpernatant alınıp uygun sulandırılmaları yapıldıktan sonra koyun kanlı agara ekildi. *E. coli* için 5 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda her bir kuyucuktan 100'er µl süpernatant alınıp uygun sulandırılmaları yapıldıktan sonra EMB agara ekimler yapıldı. Plaklar 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra meydana gelen koloni oluşturan birimler (cfu) sayıldı. Bakterisidal etki (BE) yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Özenci ve ark., 2001; Dolapçı ve ark., 2003).

$$BE (\%) = \frac{[\text{Ortalama cfu (kontrol kuyucuğu)} - \text{Ortalama cfu (deney kuyucuğu)}]}{\text{Ortalama cfu (kontrol kuyucuğu)}} \times 100$$

2.2.5. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Birlikte Mikroorganizma ile Uyarılması ve Bakterisidal Etkisinin Araştırılması

Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofajı mililitresinde 1x10⁵ hücre olacak şekilde 500'şer µl 24 kuyucuklu plakda ikişerli kuyucuk olmak üzere aynı kuyucuğa konuldu ve hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde 3 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerine mililitresinde 2x10⁵ olacak şekilde 500 µl mikroorganizma ilave edildi. Hücreler ile mikroorganizma %5 CO₂ içeren 37°C 'lik etüvde 5-24 saat karşılaştırıldı, bakterisidal etkinin hesaplanması yukarıda tarif edildiği şekilde yapıldı (Özenci ve ark., 2001; Dolapçı ve ark., 2003).

2.2.6. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Temasının Engellenmesi Durumunda Mikroorganizma ile Uyarılması ve Bakterisidal Etkisinin Araştırılması

Caco-2 epitel hücresi mililitresinde 1×10^5 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plaklara 1000 μ l konuldu, Caco-2 hücre süspansiyonun üzerine hücrelerin temasını engelleyecek ayırıcı (0,4 μ m por çaplı) yerleştirildi. Ayırıcı içine THP-1 makrofajı mililitresinde 2×10^5 hücre olacak şekilde 500 μ l konuldu ve hücreler %5 CO₂ içeren 37°C 'lik etüvde 3 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra Caco-2 hücresinin bulunduğu kuyucuğa ve makrofajın bulunduğu ayırıcıya mililitresinde 1×10^5 olacak şekilde 500'er μ l mikroorganizma ilave edildi. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C 'lik etüvde 5-24 saat inkübe edildi. Caco-2 epitel hücresinin ve THP-1 makrofajının bakterisidal etkilerinin hesaplanması yukarıda tarif edildiği şekilde yapıldı (Özenci ve ark., 2001; Dolapçı ve ark., 2003).

2.2.7. NO Miktarının Ölçülmesi

Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürleri ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda mikroorganizma ile karşılaştırıldıktan sonra 5. ve 24. saatlerde kültürlerden elde edilen süpernatantlarda Griess yöntemi ile NO tayini yapıldı. Griess yöntemi nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamit) diazotizasyonu ve NED ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına dayanır (Guevara ve ark., 1998; Ellis ve ark., 1998; Mossman 1983). Kısaca 96 kuyucuklu plaklara 100 μ l süpernatant üzerine eşit volümde Griess ayırıcı (1:1 oranında %0,1 NED ve %5 fosforik asit içinde %1 sülfanilamit) konuldu, karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra, 540 nm'de mikropleyt okuyucuda absorbanları belirlendi. Süpernatantlardaki nitrit miktarı standart nitrit kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplandı (Guevara ve ark., 1998; Ellis ve ark., 1998; Mossman 1983).

2.2.8. Sitokin Yanıtının Saptanması

Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürleri ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda mikroorganizma ile karşılaştırıldıktan sonra 5. ve 24. saatlerde kültürlerden elde edilen süpernatantlar toplanmış ve kullanılıncaya kadar -80°C 'de saklanmıştır. Sitokin seviyelerinin Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) ile ölçümü için ependorf tüpleri -80°C 'den çıkarılmış ve oda ısısına getirilmiştir. Farklı mikroorganizma ile uyarılmış ve mikroorganizmalarla uyarılmamış kontrol hücrelerinin IL-6, IL-8, TNF- α , ve IFN- γ seviyeleri ticari ELISA kitleri ile ölçülmüş, absorbansları spektrofotometrik mikropalak okuyucusunda 450 nm'de değerlendirilmiş ve protein seviyeleri pikogram cinsinden hesaplanmıştır.

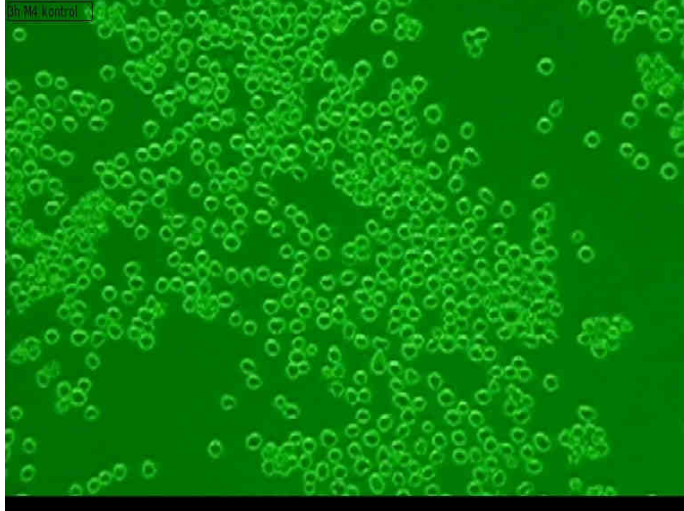
2.2.9. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmaların istatistiksel değerlendirmesi SPSS (Versiyon 11.5) programında gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi parametrik bir test istatistiği olan "Kruskal Wallis" ile, Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin *S. pyogenes* ve *E. coli*' e karşı bakterisidal etkileri arasındaki fark Conover'in önerdiği çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. Değerlendirmelerin sonucunda $p < 0,05$ olan değişkenler anlamlı olarak kabul edilmiştir (Conover ve Sons, 1980).

3. BULGULAR

3.1. THP-1 Monosit Hücre Kültürü

Hücre kültürü vasatıyla sulandırılan monosit hücreleri %10 FCS içeren RPMI 1640 içerisinde 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde süspanse edilerek, 25 cm^2 yüzeyli hücre kültürü şişelerinde üretilmiştir. PMA ile uyarılmamış hücreler yuvarlak şekilli ve kültür plaklarının plastik yüzeylerine yapışmadan süspanse şekilde üremiştir (Şekil 3.1).

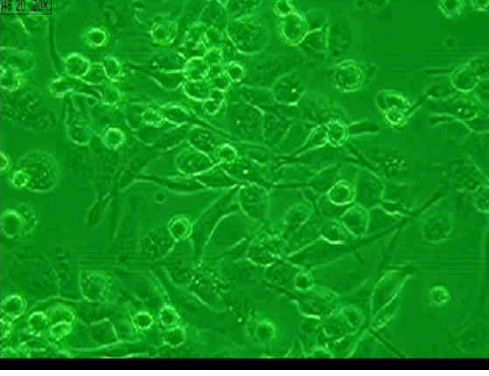


Şekil 3.1. PMA ile uyarılmamış THP-1 hücreleri

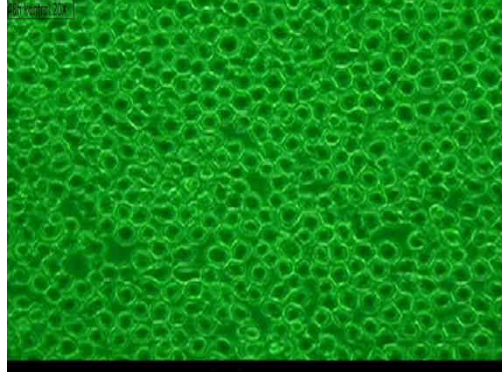
3.2. Hücresel Diferensiyasyon

Monosit hücre dizisi THP-1, PMA ile muamelesinde tüm konsantrasyonlarda diferensiyeye olmuş ve hücreler kültür plaklarının plastik yüzeylerine yapışmıştır. Adhere olmuş hücreler, şekil olarak yassı ve amöboid bir hal almakta ve hücre yüzeyinde bulunan birçok mikrovillus kaybolmaktadır. THP-1 hücrelerinde 20 ng/ml PMA ilavesi ve 48 saat inkübasyonda en belirgin fenotipik değişiklikleri ve en iyi

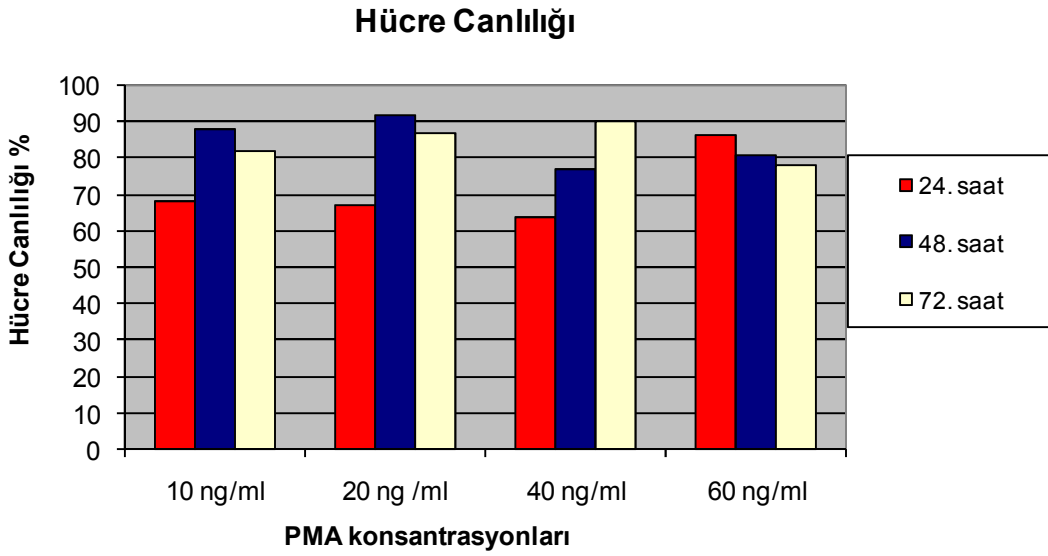
hücre canlılığını (92,2%) (Şekil 3.3) sağlayan optimum PMA konsantrasyonunu ve inkübasyon süresini elde ettik (Şekil 3.2a, 2b).



Şekil 3.2a. THP-1 hücrelerinin 20 ng/ml PMA konsantrasyonunda 48 saat inkübasyonu



Şekil 3.2b. 48. saat kontrol hücreleri



Şekil 3.3. Farklı inkübasyon periyodlarının ve PMA konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkileri

3.3. Caco-2 Epitel Hücresi ve THP-1 Makrofaj Hücre Kültürlerinin Tek Başına, Birlikte ve Temasin Engellenmesi Durumunda Mikroorganizmalara Karşı Göstermiş Olduğu Bakterisidal Etkisi

Epitel hücresi ve makrofajın tek başına, birlikte ve temasin engellenmesi durumunda 1/1 efektör hücre/hedef hücre (E/H) oranında mikroorganizmalara karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etkiyi hesaplamak için alınan süpernatanın uygun logaritmik sulandırımı yapıldıktan sonra kanlı agara ekimi yapılmış ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün koloni oluşturan birimler sayılmış, mikroorganizma kontrolleri ile karşılaştırarak bakterisidal etki yüzdesi hesaplanmıştır.

Buna göre Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve temasin engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında *S pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri sırası ile %21,96, %27,73, %24,36, %31,83 ve %27,55; yine aynı hücrelerin *E. coli*'ye karşı 5 saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri sırası ile %36,22, %63,87, %55,68, %30,51 ve %43,65 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.1).

3.3.1. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Tek Başına Mikroorganizmalara Karşı Göstermiş Olduğu Bakterisidal Etkisi

Caco-2 epitel hücresinin tek başına 1/1 E/H oranında *S pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %21,96 iken *E. coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %36,22 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.1).

THP-1 makrofaj hücre kültürünün tek başına 1/1 E/H oranında *S pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %27,73 iken *E. coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %63,87 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.1).

3.3.2. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Birlikte Mikroorganizmalara Karşı Göstermiş Olduğu Bakterisidal Etkisi

Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin birlikte 1/1 E/H oranında *S. pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %24,36 iken *E. coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %55,68 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.1).

3.3.3. Caco-2 Epitel Hücre Kültürü ve THP-1 İnsan Makrofajının Temasının Engellenmesi Durumunda Göstermiş Olduğu Bakterisidal Etkisi

Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürleri temasın engellenmesi durumunda (epitelin üstte ve makrofajın altta olduğu) 1/1 E/H oranında *S. pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %31,83 iken *E. coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %30,51 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.1).

THP-1 makrofaj hücre kültürleri ile Caco-2 epitel hücrelerinin temasın engellenmesi durumunda (makrofajın üstte ve epitelin altta olduğu) 1/1 E/H oranında *S. pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %27,55 iken *E. coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdesi %43,65 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.1).

Hücrelerin *S. pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri, mikroorganizmaya verdikleri antibakteriyel etkinlik açısından değerlendirildiğinde;

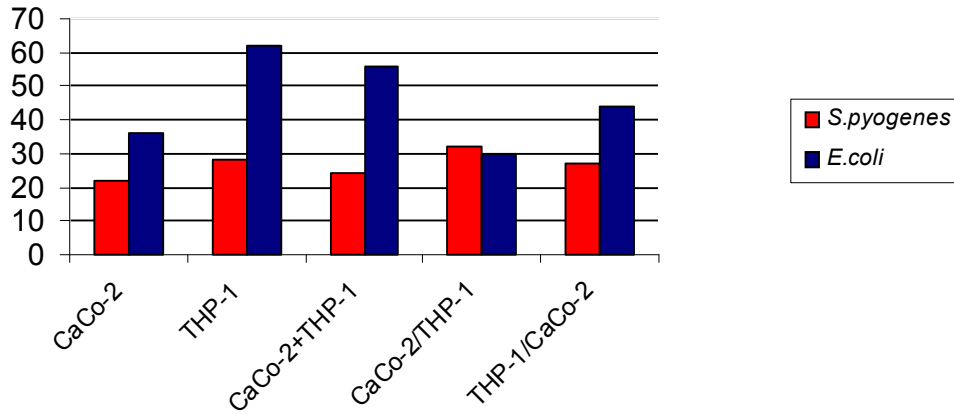
Caco-2/THP-1+ *S. pyogenes* (Sp) (%31,83)'in, Caco-2+Sp (%21,96)'ye göre anlamlı olarak yüksek bakterisidal etki gösterdiği saptanırken ($p < 0,05$) (Şekil 3.4),

hücrelerin *E. coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri, mikroorganizmaya verdikleri antibakteriyel etkinlik açısından değerlendirildiğinde THP-1+ *E. coli* (Ec) (%63,87)'nin, Caco-2+Ec (%36,22)'ye göre; Caco-2+THP-1+Ec (%55,68)'nin, Caco-2+Ec (%36,22)'ye göre; THP-1+Ec (%63,87)'nin, Caco-2/THP+Ec (%30,51)'ye göre; Caco-2+THP-1+Ec (%55,68)'nin, Caco-2/THP-1+Ec (%30,51)'ye göre; THP-1/Caco-2+Ec (%43,65)'nin, Caco-2/THP-1+Ec (%30,51)'ye göre anlamlı olarak yüksek bakterisidal etki gösterdiği saptanmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 3.4).

Çizelge 3.1. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında *S. pyogenes* ve *E. coli*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etkinin dağılım grafiği

$\bar{x} \pm S.S$ = Ortalama \pm Standart Sapma

HÜCRELER	Caco-2 1/1 E/H		THP-1 1/1 E/H		Caco-2+THP-1 1/1 E/H		Caco2/THP-1 1/1 E/H		THP-1/Caco-2 1/1 E/H	
	$\bar{x} \pm S.S$	Ortanca (Median)	$\bar{x} \pm S.S$	Ortanca (Median)	$\bar{x} \pm S.S$	Ortanca (Median)	$\bar{x} \pm S.S$	Ortanca (Median)	$\bar{x} \pm S.S$	Ortanca (Median)
<i>S.pyogenes</i> 5. saat	21,96 \pm 5,26	20	27,73 \pm 8,29	29	24,36 \pm 7,51	24	31,83 \pm 7,40	34,65	27,55 \pm 0,80	27,50
<i>E. coli</i> 5. saat	36,22 \pm 19,25	41	63,87 \pm 14,96	64,5	55,68 \pm 12,39	57	30,51 \pm 2,75	30,8	43,65 \pm 11,79	43



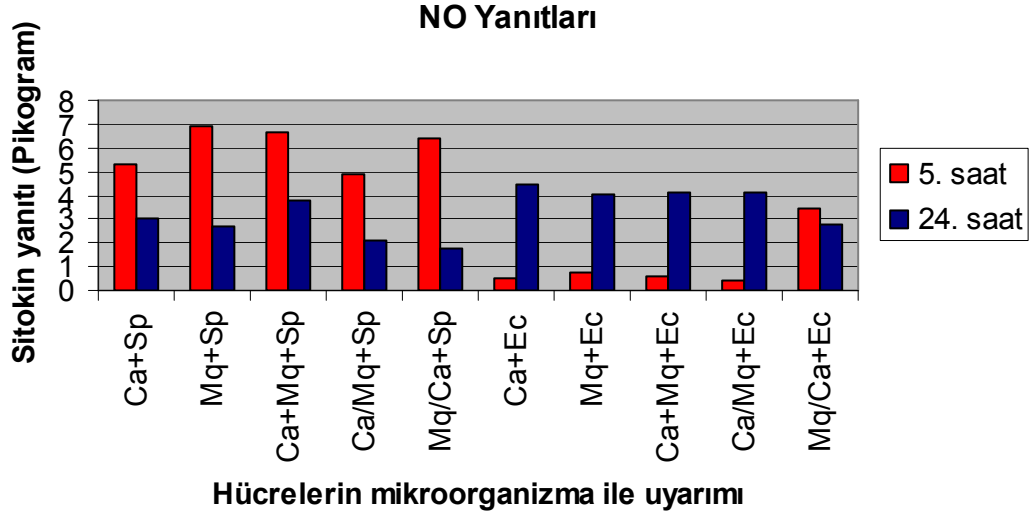
Şekil 3.4. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında *S. pyogenes* ve *E. coli*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki ortalamaları

Genel olarak bakıldığında *E. coli*'ye karşı hücrelerin 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri, *S. pyogenes*'e karşı hücrelerin 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdelerinden antibakteriyel etkinlik açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 3.4).

3.4. NO Yanıtı

İnvitro koşullarda 1/1 E/H oranlarında *S. pyogenes* ve *E. coli* ile ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda karşılaştırılan epitel ve makrofaj kültürlerinin yapısal olarak mikroorganizmalara karşı 5. ve 24. saatte oluşturmuş olduğu NO yanıtın değerlendirilmesi için alınan süpernatantlarda Griess yöntemi ile NO ölçümü yapılmış, ölçümler sonucu hücrelerin yapısal olarak ve 1/1 E/H oranlarında mikroorganizmalara karşı yanıtta NO oluşturduğu saptanmıştır (Çizelge 3.2).

5. ve 24. saat sonunda epitel ve makrofaj kültür süpernatantlarında NO yanıtının mikroorganizmalarla uyarılmamış kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p< 0,05$) (Çizelge 3.2). *S. pyogenes*'in epitel hücresi ve makrofajın ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında uyarımına karşı göstermiş olduğu NO cevabı 5. saatte *E. coli*'ye göre artmışken ($p<0,05$) (Şekil 3.5), 24. saatte *E. coli*'nin hücrelere karşı göstermiş olduğu NO yanıtının *S. pyogenes*'e göre artmış olduğu saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 3.5).



Ca= Caco-2, Mq= THP-1, Ec= *E. coli*, Sp= *S. pyogenes*

Şekil 3.5. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında *S. pyogenes* ve *E. coli*'e karşı 5. ve 24. saatte göstermiş olduğu NO yanıtları

3.5. Sitokin Yanıtı

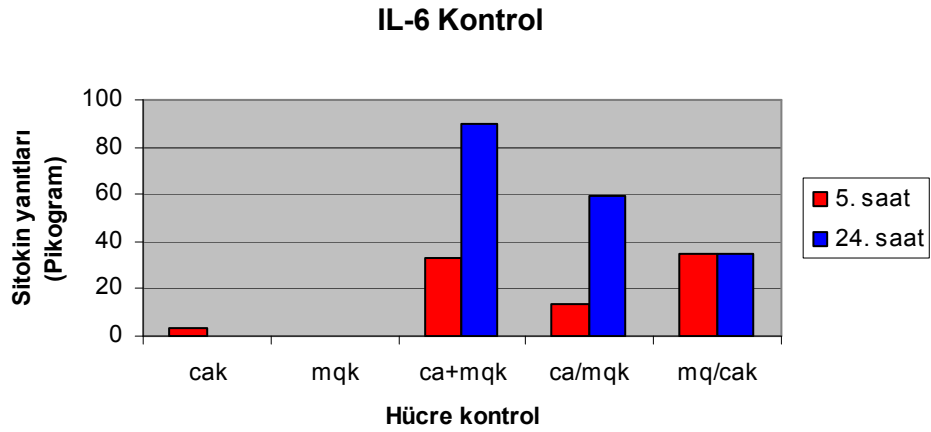
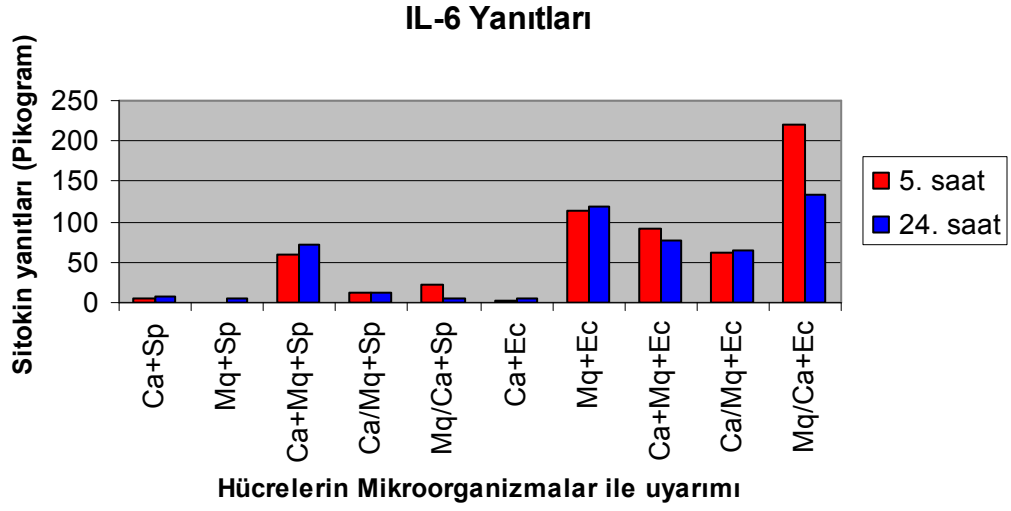
Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürleri ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranlarında *S. pyogenes* ve *E. coli* ile uyarılmış olarak ve aynı mikroorganizma ile muamele edilmeden yapısal olarak oluşturmuş olduğu sitokin yanıtının değerlendirilmesi için alınan süpernatantlarda ticari ELİSA kitleri ile IL-6, IL-8, TNF- α ve IFN- γ ölçümü yapılmış, ölçümler sonunda epitel hücresi ve makrofajın 1/1 E/H oranlarında ayrı ayrı *S. pyogenes* ve *E. coli*'e karşı yanıtta IL-6, IL-8 ve TNF- α sitokinlerini oluşturduğu saptanmıştır (Çizelge 3.2), (Şekil 3.9).

Çizelge 3.2. Hücrelerin 1/1 E/H oranlarında *S. pyogenes* ve *E. coli*'e karşı 5. ve 24. saatte oluşturdukları NO ve sitokin seviyeleri ortalamaları

GRUP		Sitokin Yanıtları-Ortalama Değerleri (Pikogram)							
		IL-6		IL-8		TNF- α		NO	
		5th Saat	24th Saat	5th Saat	24th Saat	5th Saat	24th Saat	5th Saat	24th Saat
HÜCRELER	Ca+Sp	5,34	6,51	3,81	-0,14	-15,36	-15,59	5,28	3,05
	Mq+Sp	0	3,8	17,9	0,38	10,22	-0,08	6,88	2,72
	Ca+Mq+Sp	60,55	71,6	4,02	53,85	236,19	207,83	6,68	3,76
	Ca/Mq+Sp	13,44	12,73	-0,97	-1,01	51,47	28,41	4,86	2,12
	Mq/Ca+Sp	21,85	4,53	12,8	11,93	84,35	8,13	6,37	1,77
	Ca+Ec	2,77	5,94	23,43	39,1	-17,73	-17,96	0,48	4,46
	Mq+Ec	113,79	119,25	2279,8	1829,87	787,14	274,05	0,78	4,03
	Ca+Mq+Ec	90,44	76,34	2025,5	2007,82	369,68	108,94	0,63	4,15
	Ca/Mq+Ec	60,99	63,19	1687,25	935,4	430,13	64,44	0,4	4,1
	Mq/Ca+Ec	220,1	132,43	2333,88	1945,53	935,19	248,29	3,43	2,75
KONTROL	Cak	3,048	0	16,408	14,827	-16,648	-15,59	0,069	0
	Mqk	0	0	850,164	1025,22	-11,358	-1,482	0,299	0
	Ca+Mqk	32,871	89,677	2251,93	2373,785	310,467	263,077	0,078	0
	Ca/Mqk	13,732	58,924	1227,052	2297,758	49,628	61,299	0,06	0,8
	Mq/Cak	35,071	35,018	2064,847	2289,066	108,016	56,778	0	0,262

Ca= Caco-2, Mq= THP-1, Ec= *E. coli*, Sp= *S. Pyogenes*

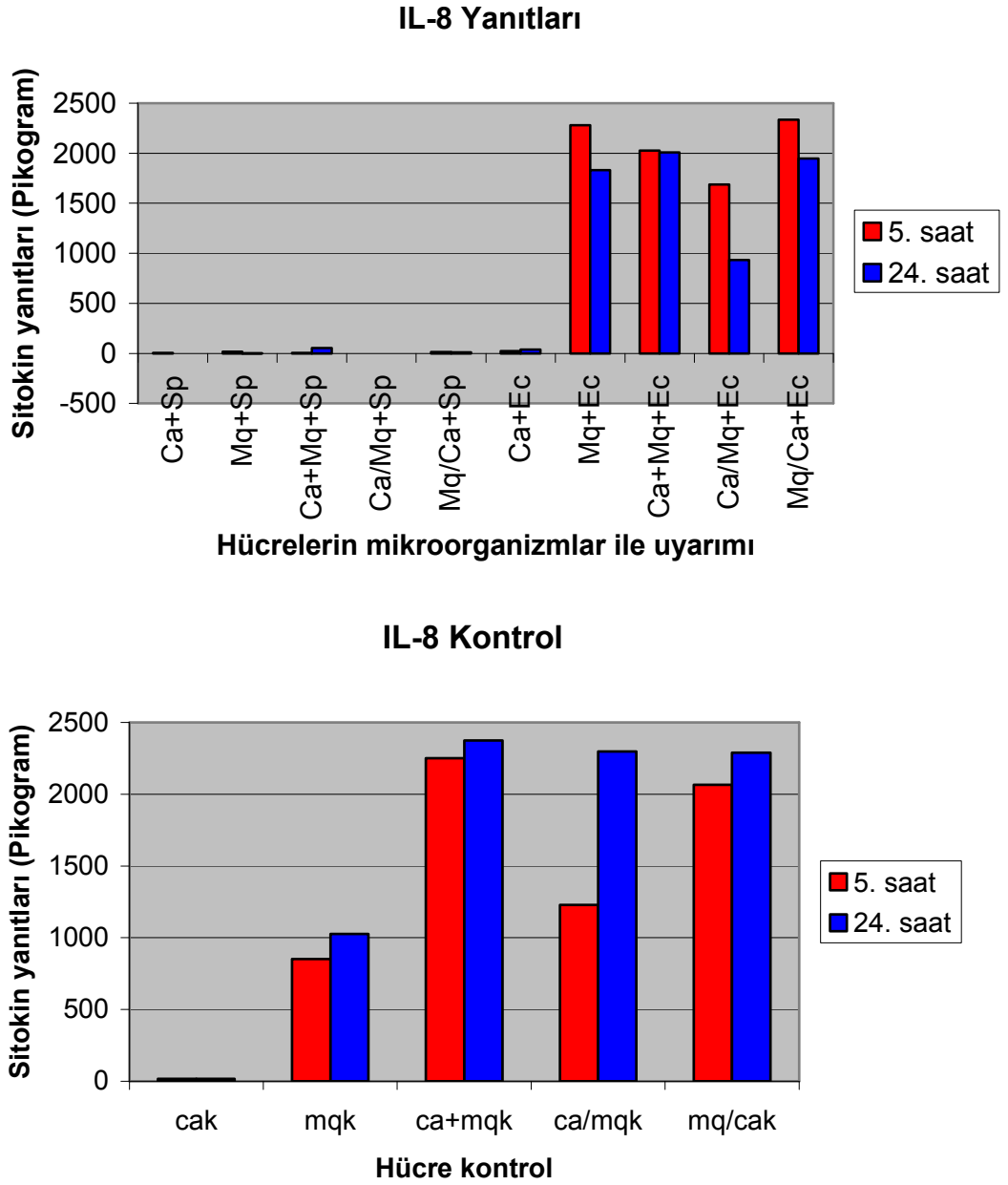
5. ve 24. saatte hücrelerin *S. pyogenes*'le uyarımı sonucu oluşan IL-6 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Ca+Mq+Sp'de IL-6 oluşumu Ca+Sp, Mq+Sp, Ca/Mq+Sp ve Mq/Ca+Sp'ye göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,05$). 5. ve 24. saatte hücrelerin *E. coli* ile uyarımı sonucu oluşan IL-6 oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Ca+Ec'de IL-6 oluşumu; Mq+Ec, Ca+Mq+Ec, Ca/Mq+Ec ve Mq/Ca+Ec'ye göre anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Hücrelerin IL-6 yanıtları ve kontrol

5. saatte hücrelerin *S. pyogenes* ile uyarımı sonucu oluşan IL-8 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). 5. saatte hücrelerin *E. coli* ile uyarımı sonucu oluşan IL-8 oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p\leq 0,05$). Ca+Ec'de IL-8 oluşumu; Mq+Ec, Ca+Mq+Ec, Mq/Ca+Ec'ye göre anlamlı olarak düşük bulunmuşken, Mq+Ec'de IL-8 oluşumu; Ca/Mq+Ec'ye göre anlamlı olarak yüksek ve Mq/Ca+Ec'de IL-8 oluşumu ise Ca+Mq+Ec ve Ca/Mq+Ec'ye göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Şekil 3.7).

24. saatte hücrelerin *S. pyogenes* ile uyarımı sonucu oluşan IL-8 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamışken ($p>0,05$), 24. saatte hücrelerin *E. coli* ile uyarımı sonucu oluşan IL-8 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p\leq 0,05$). Ca+Ec ile Mq+Ec'de IL-8 oluşumu; Ca+Mq+Ec, Mq/Ca+Ec'ye göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Şekil 3.7).

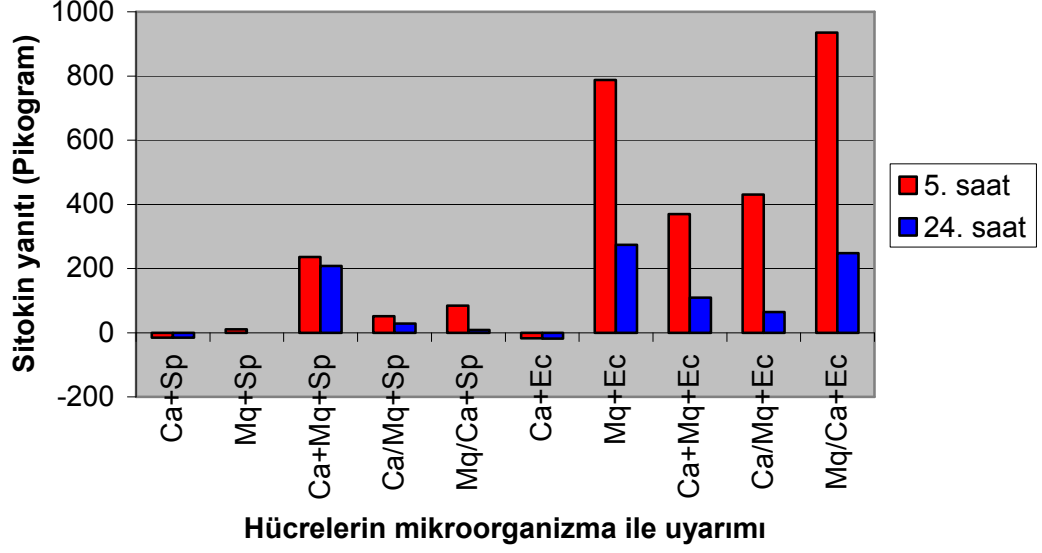


Şekil 3.7. Hücrelerin IL-8 yanıtları ve kontrol

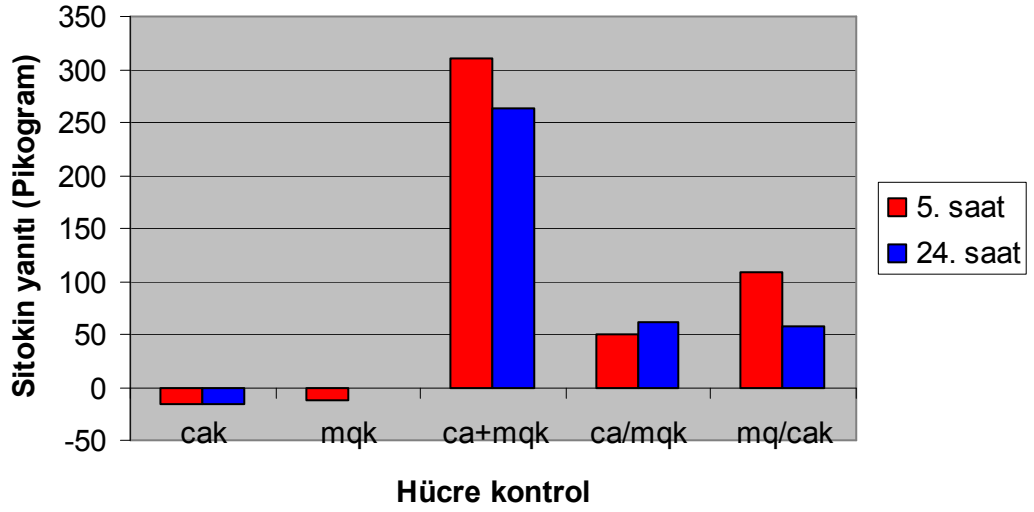
5. ve 24. saatte hücrelerin *S. pyogenes* ile uyarımı sonucu oluşan TNF- α değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Ca+Sp'de TNF- α oluşumu; Mq+Sp, Ca+Mq+Sp ve Mq/Ca+Sp'ye göre anlamlı olarak düşük, Ca+Mq+Sp'de TNF- α oluşumu; Ca+Sp, Mq+Sp, Ca/Mq+Sp ve Mq/Ca+Sp'ye göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,05$). 5. saatte hücrelerin *E. coli* ile uyarımı sonucu oluşan TNF- α değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p \leq 0,05$). TNF- α oluşumunda; Ca+Ec diğer tüm hücrelere göre anlamlı olarak düşük, Mq+Ec; Ca+Mq+Ec'ye göre anlamlı olarak yüksek saptanırken, yine TNF- α oluşumunda Ca+Mq+Ec; Mq/Ca+Ec'ye göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Şekil 3.8).

24. saatte hücrelerin *E. coli* ile uyarımı sonucu oluşan TNF- α değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Ca+Ec'de TNF- α oluşumu diğer tüm hücrelere göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Şekil 3.8).

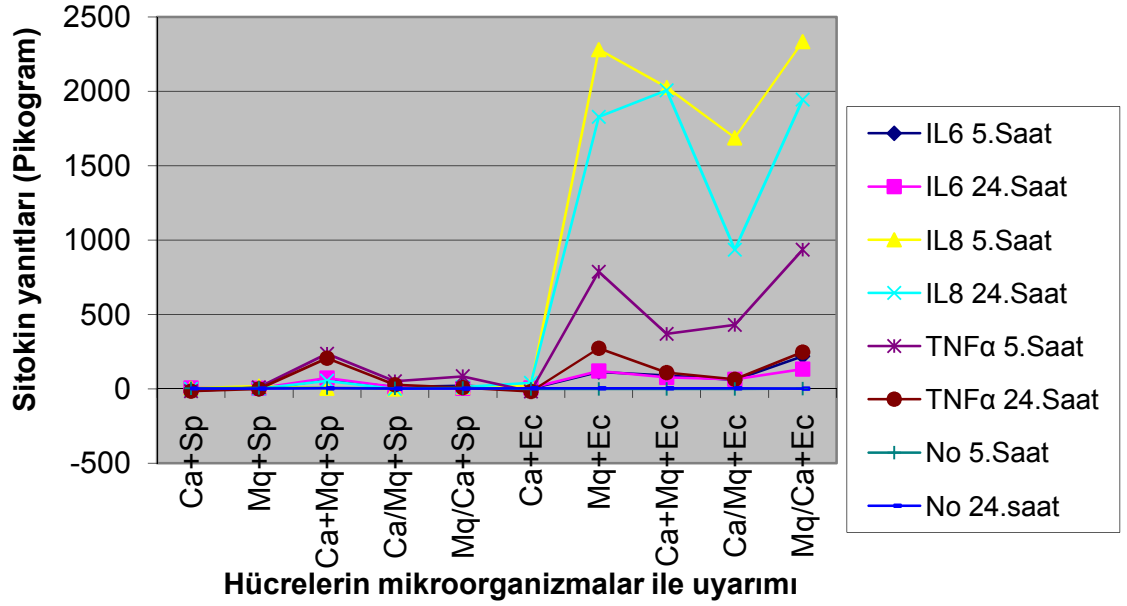
TNFalfa Yanıtları



TNFalfa Kontrol



Şekil 3.8. Hücrelerin TNF- α yanıtları ve kontrol



Şekil 3.9. Hücrelerin mikroorganizmalara karşı 5 ve 24. saatte oluşturdukları NO ve sitokin seviyeleri ortalamaları

Yine Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürleri ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranlarında *S. pyogenes* ve *E. coli* ile uyarıldıktan sonra elde edilen süpernatantlarda ELİSA kitleri ile sitokin ölçümü sonucu IFN- γ yanıtı saptanamamıştır.

4. TARTIŞMA

Doğal immun cevap patojenler tarafından oluşturulan enfeksiyonlara karşı erken savunma sistemi olarak ortaya çıkar. Bu savunma sisteminin yapıtaşları kazanılmış immun yanıtın en etkili biçimde gelişme göstermesini sağlayacak şekilde farklılaşmasında da etkili olmaktadır. Doğal immun sistemin en önemli hücreleri epitel hücresi ve makrofajlardır. Çok sayıdaki fonksiyonel rolleri göz önünde tutulursa makrofajlar ve epitel hücreleri inflamatuvar sürecin başlangıcında ve devamında önemli bir rol oynamaktadırlar (Bodet ve ark., 2005).

Epitel hücresi, bariyer fonksiyonu (Steele ve ark., 2000); defensin gibi doğal antibiyotik fonksiyonuna sahip peptid üretimi (Abbas ve Lichtman, 2003; Diamond ve ark., 2001; Acheson ve Luccioli, 2004; Strober, 1999), kompleman sentezi, TLR ekspresyonu ile antijeni tanıma ve MHC molekül ekspresyonu ile immun hücrelere antijen sunumu yapabilmesi (Acheson ve Luccioli, 2004); profesyonel olmayan yollar ile mikroorganizmayı fagosite etmesi, sitokin ve kemokin salınımı ile kazanılmış bağışık yanıtı başlatması ve yönlendirmesi (Abbas ve Lichtman, 2003; Kagnoff, 1996; Hedges ve ark., 1995), adezyon moleküllerini eksprese ederek diğer immun hücreleri enfeksiyon alanına çağırması ve antikor oluşumuna etkisi nedeniyle immun sisteme aktif olarak katkıda bulunmaktadır (Ganz, 2002; Melmed ve ark., 2003; Strober, 1999).

Makrofajlar; genellikle doğal immun/inflamatuvar cevabı başlatan ve istila eden patojenle ilk temasta bulunan hücre olarak kabul edilmektedir (Blau ve ark., 1997; Delves ve ark., 2006; Farberman ve ark., 2005; Janeway ve ark., 1999; Kanzato ve ark., 2001; Smythies, 2005). Ne var ki epitel hücreleri stratejik olarak hem inhale olmuş patojenlerin hem de hareket eden makrofajların temasta bulunduğu yerdir. Intestinal epitel hücreleri ile immun hücrelerin çözünür faktörler aracılığıyla birbirlerini etkiledikleri yer intestinal epitelyumdur. Epitel hücreleri direkt hücre-hücre teması ile ya da yayılabilen aktivasyon faktörleri veya ko-faktörler salarak

makrofajları aktive edebilirler (Farberman ve ark., 2004; Mori ve ark., 2003; Satsu ve ark., 2006).

Çalışmamızda Caco-2 hücreleri ve THP-1 hücreleri invitro koşullarda ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 24 kuyucuklu plaklarda karşılaştırılarak, epitel hücre dizisinin ve makrofaj hücre dizisinin 1:1 E/H oranlarında mikroorganizmalara karşı uyarımının bakterisidal etkide, NO ve sitokin üretiminde değişikliğe neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için de Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofajın ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda kültürleri yapıp mikroorganizmalar ile karşılaştırılan hücrelerden elde edilen süpernatantlarda etkileşimden sorumlu olan doğal immün yanıtın oluşumuna aracılık eden NO, IL-6, IL-8, TNF- α ve IFN- γ seviyelerine ve epitel ve makrofajın hücresel etkilerinin birlikte ve temasın engellenmesi durumunda oluşturduğu çözünür faktörlerin yansıması olan bakterisidal etkisine bakılmıştır.

Konak savunmasında epitel hücresinin mukozal yüzeylerdeki doğal ve kazanılmış immün cevabın düzenlenmesindeki önemi iyi bir şekilde anlaşılmış ve bu konuyla ilgili yapılan pek çok çalışma ile de gösterilmiştir.

Çeşitli çalışmalarda fare vaginal epitel hücrelerinin *Candida albicans*'ın üremesini belirgin bir şekilde azalttığı (Steele ve ark., 1999), insan oral epitel hücrelerinin *C. albicans*'ın üremesini hücre-hücre teması ile engellediği (Steele ve ark., 2001), Caco-2 intestinal epitel hücrelerinin çeşitli *Candida* türlerinin üremesini engellediği gösterilmiştir (Özenci ve ark., 2001).

Behçet hastalığı olan olgularda, ilk savunma bölgesi olan ağız mukozası epitel hücrelerinin streptokoklara karşı bakterisidal etkinliğinin, sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiş, ağız epitel hücrelerinin bakterisidal etkisinin sağlıklı bireylerde önemli bir konak savunması olduğu sonucuna varılmıştır (Dolapçı ve ark., 2003).

Üriner ve oral epitel hücrelerinin farklı *E. coli* suşlarına karşı bakterisidal gücü araştırılmış ve ağız epitel hücrelerinin antibakteriyel etkinliğinin üriner epitel hücrelerinkinden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Albayrak ve ark., 2005).

Albayrak ve ark.(2006b) tarafından, idrar epitel hücrelerinin *E. coli*'ye karşı oluşturmuş olduğu bakterisidal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, idrar epitel hücresi *E. coli* ile 1/10, 1/10⁻¹, 1/10⁻², 1/10⁻³, 1/10⁻⁴, 1/10⁻⁵, 1/10⁻⁶ E/H oranlarında 6 saat karşılaştırılmış ve üremenin engellenmesi deneyi sonucunda idrar epitel hücrelerinin 1/10, 1/10⁻¹, 1/10⁻², 1/10⁻³ E/H oranlarında ortalama %60,7, 1/10⁻⁴, 1/10⁻⁵, 1/10⁻⁶ E/H oranlarında ortalama %11,3 bakterisidal etki gösterdiği bulunmuştur.

Albayrak ve ark.(2006a) çalışmalarında, *S. pyogenes* ile uyarılan ağız mukozası epitel hücresi ve KB hücresinden IL-6, IL-8 ve IL-10'nun yapısal olarak oluştuğu saptanmış, farklı *S. pyogenes* miktarları ile uyarımı bu sitokinlerin üretiminde doz ve zamana bağlı olarak değişiklikler olduğunu göstermişlerdir.

İnhale edilen patojenlerle mücadele etmede erken uyarıyı başlatabildikleri için distal hava boşluklarını döşeyen ve nöbetçi veya gözcü olarak etki eden akciğerdeki alveolar epitel hücrelerin konak savunmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Farberman ve ark., 2004).

Bordetella türleri ile uyarılan epitel hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada (Lopez-Boado ve ark., 2005), sadece *Bordetella bronchiseptica*'nın flagellinin sitokin, kemokin ve konak cevap gen ekspresyonunu uyaran güçlü inflamatuvar faktör olduğu bildirilmiştir.

Kagnoff ve Eckmann (1997), *Salmonella*'ya maruz bırakılmış insan kolonik epitel hücrelerinde monosit kemoattractan protein, TNF ve GM-CSF onkogenezi regüle eden graft interlökinleri içeren kemo-attractanlar ve çok sayıda

proinflamatuvar mediatörlerin ekspresyonu ve salınımının artmış olduğunu göstermişlerdir.

Schilling ve ark.(2001), üropatojenik *E. coli* (UPEC)'ye karşı doğal konak savunmasını başlatan mekanizmanın mesane epitel hücresi tarafından oluşturulan sitokinler tarafından oluştuğunu, sadece tip 1 pili'nin epitel hücrelerinde IL-6 oluşumunu aktive etmek için yeterli olmadığını, mesane içinde *E. coli*'ye karşı konak cevabında artan bakteri invazyonu için LPS'in gerekli olduğunu saptamışlardır.

Yine Hedges ve ark.(1992), Gram negatif bakteriler ile stimülasyona cevapta epitel hücrelerinin IL-6 sekrete ettiklerinin gösterildiği bir çalışmada, bakterilerle uyarıldığı zaman epitel hücrelerinin IL-6'nın esas kaynağı olabileceğini ve mesane epitel hücrelerinde onların adheziv özelliklerine bakmadan bakteriler ve onların ürünleri ile maruz bırakıldıktan sonra IL-6 aktivitesinin arttığını, aksine böbrek hücre dizisinde ise adhere olan bakteriler ve adhesin pozitif P fimbriaların adhere olmayan bakteriler ve adhesin negatif P fimbriyalardan belirgin bir şekilde daha fazla IL-6 aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Albayrak ve ark.(2006a)'nın yaptığı çalışmada *S. pyogenes* ile uyarılan ağız mukozası epitel hücresinin 1. saatte ortalama %38,7, 6. saatte ortalama %54,5 ve doza bağlı bakterisidal etki gösterdiği; insan ağız epitel hücre dizisinin (KB) ise 1. saatte ortalama %36,3 ve 6. saatte ortalama %37,7 bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ise Caco-2 epitel hücresi, THP-1 makrofaj hücre kültürleri ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında *S. pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri sırası ile %21,96, %27,73, %24,36, %31,83 ve %27,55; yine aynı hücrelerin *E. coli*'ye karşı 5 saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri sırası ile %36,22, %63,87, %55,68, %30,51 ve %43,65 olarak saptanmıştır.

Genel olarak bakıldığında *E. coli*'ye karşı hücrelerin 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri, *S. pyogenes*'e karşı hücrelerin 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdelerinden antibakteriyel etkinlik açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 3.4). Ayrıca hücrelerin *E. coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri, makrofaj ve her iki hücrenin birlikte olduğu kültürlerde epitelin tek başına ve temasın önlendiği kültürlerle göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuçlara göre makrofajın bakterisidal etki yönünden epitel hücrelerine göre daha etkin rol oynadığını ayrıca makrofajla epitelin teması ile birbirlerini aktive ederek temasın önlendiği kültürlerle göre daha fazla bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Makrofajlar ve epitel hücreleri doğal immuniteye hücreler arası iletişim ve inflamatuvar mediatörlerin salınımı yoluyla katkıda bulunmaktadır. Mukozalarda sitokin ve kemokinlerin oluşumu ile sağlanan sitokin ağı; makrofajlar ve epitel hücresi arasında çift yönlü iletişimi sağlamaktadır (Hedges, 1995; Sangari ve ark., 1999). Makrofaj ve epitel hücrelerinin doğal immun cevapta davranışlarının incelendiği in vitro çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır.

Kronik peridontitisin major etkeni olan *Porphyromonas gingivalis*'in konak cevabında major rol oynayan epitel hücresi ve makrofajların etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmada farklı suşlarla muameleyi takiben *P. gingivalis*'in makrofaj/epitel ko-kültür modellerinde proinflamatuvar sitokinleri (IL-1 β ve IL-6) ve kemokinleri (IL-8 ve RANTES) stimüle edebildiğini; ayrıca bu inflamatuvar mediatörlerin sekresyon seviyesinin kullanılan bakteri suşlarına, kullanılan makrofaj/epitel hücre oranına ve kullanılan E/H değerine bağlı olduğunu saptamışlardır (Bodet ve ark., 2005).

Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücrelerinin ko-kültürü yapılarak, intestinal lamina propria subepitelial bölgede lokalize olmuş makrofajların araştırıldığı bir çalışmada (Kanzato ve ark., 2001), subepitelial makrofajların, yalnızca dış faktörler (patojenler ve yiyecek komponentler gibi) tarafından değil

aynı zamanda intestinal epitelyum yoluyla da stimüle olabildiği inflamatuvar ve immun yanıtta intestinal epitelyumdan salınan parakrin faktörlerin intestinal makrofajların fagositik kapasitesini arttırdığı ileri sürülmüştür.

Tip II alveolar epitelyal hücre ve alveolar makrofajları ile çok sayıda partiküllerin etkileşiminin sitokin salınımına aracılık ettiğini gösteren bir çalışmada, makrofaj-epitel ko-kültürlerinde mono-kültürlere göre sinerjistik olarak TNF- α ve MIP-2 bazal seviyelerinin arttığı ve partiküllerin invitro inflamatuvar cevaplarının makrofaj ve epitel hücreleri arasında temasa bağımlı olduğu sonucuna varılmıştır (Tao ve Kobzik, 2002).

Hyperoxia ile indüklenen akciğer inflamasyonunda epitel hücresi ile makrofajlarda IL-8 salınımının ve hücre-hücre temasının etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Hjorth ve ark., 2003), İnsan akciğer adenokarsinoma hücre dizisi (A549) pulmonary epitel hücreleri ve THP-1 monosit/makrofaj hücreleri tek başına, ko-kültürle temasta veya teması önlenerek incelendiğinde, tek başına kültüre edilen hücrelerin hiç birinde IL-8 miktarı farkedilir bir şekilde üretilmediği, temasın önlendiği ko-kültürlerde azaldığı, temasın olduğu ko-kültürlerde ise IL-8 seviyesinin artmış olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonuçlar ile Hyperoxia'da makrofaj cevabı epitel hücresi ile temasının potansiyel olarak görüldüğünü vurgulamışlardır.

Kronik periodontitisin üç önemli etiyolojik ajanı olan *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* ve *Tannerella forsythia* ile tek başına veya birlikte enfeksiyonu takiben makrofaj/epitel ko-kültür modellerinde inflamatuvar cevabın araştırıldığı bir çalışmada (Bodet ve ark., 2006), bu mikroorganizmaların tek başına ve kombine bir şekilde tüm hücreyi veya LPS'leri ile HeLa hücre dizisi ve U937 hücre dizisinden oluşan bir invitro ko-kültür modeli ile muamele edilmiş stimülasyonu takiben IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , RANTES, PGE2 ve MM-9'un tek başına ve birlikte olarak yapılan enfeksiyonlarda indüklendiği gösterilmiştir. Ayrıca *Treponema denticola*'nın tek başına veya kombine durumunda RANTES seviyesinin belirgin bir şekilde azaldığı, *Porphyromonas gingivalis* ve *Tannerella*

forsythia ile muamelede RANTES seviyesinin arttığını, sonuç olarak da bakteriyal veya LPS karışımlarıyla yapılan testlerde kemokinlerin, sitokinlerin, PGE2 ve MMP-9 oluşumunda sinerjik etkinin olmadığını bildirmişlerdir.

İntestinal epitel hücrelerinde makrofajların etkilerinin analizini yapmak için ko-kültürü kullanılarak bir in vitro model sisteminin kurulduğu bir çalışmada (Satsu ve ark.,2006), Caco-2 hücre monolayerlerinde, THP-1 ile birlikte kültürü yapıldığında epitel hücrelerinde laktat dehidrojenaz salınımının arttığı ve monolayerlerde transepitelial elektriksel resistansın azalması ile zarar gördüğü, bunun da makrofajlardan salınan çözüner faktörlerden dolayı olduğu sonucuna varılmıştır.

Yine aynı tip bir çalışmada (Watanabe ve ark., 2004), epitel hücresi ve makrofajın ko-kültürü yapılmış olan besiyeri içerisine anti TNF- α antikorunu eklenerek epitel hücresindeki bu bozulma belirgin bir şekilde baskılanmış, araştırmacılar Caco-2 hücre monolayerlerinde THP-1'den salınan TNF- α 'nın hasara neden olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Farberman ve ark.(2005), UV-ışınlarına maruz kalmış *E. coli* ile uyarılan Tip II epitel hücrelerinde yayılabilir sinyallerin salındığını, bunların makrofaj aktivasyonunu yansıtan fagositozu ve hücre yüzey kabarmalarında bir çok uzun filopodia'nın, lamellipodia ve hücre yassılaşmasında artışın olduğu gibi morfolojik değişiklikleri başlattığını ve bunun da NO ve iNOS oluşumu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

İntestinal epitelial hücreler ve immun hücreler arasındaki direkt etkileşimi analiz etmek için kurulan hücre kültürü sisteminde membranın alt kısmında monolayer olarak üretilen Caco 2 hücresinin apikal yerine eklenen MCP-1, β -kemokinin insertün üst kısmında bulunan THP-1 hücrelerinin kemotaksisine (IL gibi kemotaktik faktörlerle hücrelerin enfeksiyon alanına gelmesi) neden olduğu ileri sürülmüştür (Mori ve ark., 2003).

Atmosferdeki partiküllerle maruz kalmayı takiben İnsan alveolar makrofaj ve bronşial epitel hücrelerinin (HBEC) ko-kültürlerinde GM-CSF, M-CSF, MIP-1 β , MCP-1, IL-6 ve ICAM-1'in mRNA'ları alveolar makrofaj veya HBEC mono kültürlerine ya da kontrol ko-kültürlere göre seviyelerinin arttığını, kontrol gruplarına göre 24 saat maruz kalmayı takiben toplanan ko-kültür süpernatantlarında GM-CSF, M-CSF, MIP-1 β ve IL-6 yükseldiğini, alveolar makrofaj ve HBEC arasında GM-CSF, MIP-1 β ve IL-6 oluşumunda sinerji olduğu yapılan çalışmalarla bulunmuştur (Ishii ve ark., 2005).

Alveolar makrofaj (AM) ve alveolar epitel tip II (TII) hücreler arasındaki etkileşimi farklı interaksiyon durumları (ayırıcı ile ayırarak yada birlikte ko-kültür şeklinde) ve farklı uyarılar (basal, LPS yada silica) altında incelendiği bir çalışmada (Kanj ve ark., 2006), epitel hücrelerinden salınan sürfaktanların makrofaj aktivitesi üzerine inhibitör etki gösteriyor gibi görüldüğü; temasın önlendiği kültürler AM/TII hücre etkileşimlerini incelemek için birlikte olan kültürlerden daha iyi olduğunu; AM/TII hücre etkileşimleri hücre kültürlerine (transwell yada miks) ve maruz kalma durumlarına bağlı olduğunu; Oksidantlar, TNF- α , IL- β , prostaglandinler, leukotrienler olasılıkla AM/TII hücre etkileşimlerinden etkilendiğini ve indirekt olarak düzenlendiği sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızda kullandığımız Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücrelerinin invitro koşullarda ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda yapısal ve indüklenbilir olarak pikogram seviyesinde IL-6, IL-8 ve TNF- α oluşturduğu tespit edilmiştir. Hücrelerden hem yapısal hem de indüklenbilir yanıtın oluşması, enfeksiyona yanıtta genel ve özgül konak doğal savunmasının varlığını göstermektedir

Sitokinler, mikroorganizmalara karşı salgılanan immun ve inflamatuvar reaksiyonları düzenleyen polipeptid moleküllerdir. Sitokin sekresyonu kendini sınırlayıcı özelliktedir. Etkileri sıklıkla birbiriyle kesişen etkilerdir. Genellikle diğer sitokinlerin sentez ve etkilerini değiştirebilirler. Etkileri lokal veya sistemik olabilir

(otokrin, parakrin ve endokrin). Proinflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF gibi) inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ve görev alanına çağrılmasında ve efektörlerin uyarılmasında rol almakta, antiinflamatuvar sitokinler (IL-10 ve TGF- β gibi) konağın korunması ve doku hasarının aşırıya kaçmasının engellenmesi için oluşturulmaktadır (Abbas ve Lichtman, 2003).

Çalışmamızda, 5. ve 24. saatte *S. pyogenes* ile uyarılmış Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücreleri birlikte temasın olduğu kültürlerde IL-6 seviyesinin diğer hücelere (epitel hücresi ve temasın önlendiği durumlarda) göre artmış olduğu bulunmuştur. *E. coli* ile uyarılmış hücrelerde ise 5. ve 24. saatte epitel hücresinin tek başına kültürüne göre makrofajın tek başına kültüre edildiği, hücrelerin temasın önlendiği ve temasın olduğu kültürlerde IL-6 seviyesinin artmış olduğu bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 3.6).

S. pyogenes ile uyarılmış hücrelerde 5. ve 24. saatte Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücreleri tek başına, birlikte ve teması önlenerek incelendiğinde hiç birinde IL-8 miktarı farkedilir bir şekilde üretilmediği; *E. coli* ile uyarılmış hücrelerde 5. saatte epitel hücresinin tek başına kültüre edilenlere göre; makrofajın tek başına kültüre edildiği, hücrelerin temasın önlendiği ve temasın olduğu kültürlerde IL-8 seviyesinin artmış olduğu bulunmuşken makrofajın tek başına kültüre edildiği kültürlerdeki IL-8 seviyesi, temasın önlendiği kültürlerde göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 3.7). 24. saatte ise *E. coli* ile uyarılmış hücrelerde epitel hücresinin tek başına kültürüne göre, makrofajın tek başına kültüre edildiği, hücrelerin temasın önlendiği ve temasın olduğu kültürlerde ise IL-8 seviyesinin artmış olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,05$) (Şekil 3.7).

S. pyogenes ile uyarılmış hücrelerde 5. saatte Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücreleri tek başına, birlikte ya da teması önleyerek incelendiğinde; epitel hücresinin tek başına kültüre göre; makrofajın tek başına kültüre edildiği, hücrelerin temasın önlendiği ve temasın olduğu kültürlerde TNF- α seviyesinin artmış olduğu bulunmuştur. Ayrıca 5. ve 24. saatte *S. pyogenes* ile uyarılmış hücrelerde epitel

hücresi ve makrofaj hücreleri birlikte temasın olduğu kültürlerde TNF- α seviyesinin diğer hücrelere (epitel hücresi ve temasın önlenmediği durumlarda) göre artmış olduğu bulunmuştur. *E. coli* ile uyarılmış hücrelerde 5. ve 24. saatte ise epitel hücresinin tek başına kültürüne göre makrofajın tek başına kültüre edildiği, hücrelerin temasın önlenmediği ve temasın olduğu kültürlerde ise TNF- α seviyesinin artmış olduğu bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 3.8).

Yine Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürleri ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranlarında *S. pyogenes* ve *E. coli* ile uyarıldıktan sonra elde edilen süpernatantlarda IFN- γ yanıtı saptanamamıştır.

Bu çalışmada Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücreleri invitro koşullarda ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 24 kuyucuklu plaklarda karşılaştırılarak, epitel hücre dizisinin ve makrofaj hücre dizisi 1:1 E/H oranlarında mikroorganizmalarla uyarılmış, 5 ve 24. saat sonunda hücrelerin birlikte, ayrı ayrı ve temasın engellenmesi durumunda NO yanıtları da değerlendirilmiştir.

Makrofaj ve epitel hücre yanıtı sitokin üretimi ile sınırlı olmayıp nitrik oksit (NO) üretimini düzenleyen enzimleri de uyarır (Castranova, 2004). Hücreler arasındaki etkileşim sonucunda NO'nun salınımı için sitokinlerin devreye girmesine gereksinim vardır. Ancak hücrelerin ve sistemlerin birbiriyle etkileşimi tam olarak açıklanamamıştır. NO, vücudun savunma yanıtları içinde 'oksijene bağımlı sistem' de yer alırken, gaz olma özelliği nedeniyle de hücreden-hücreye rahatlıkla geçerek 'mesajcı' işlevini yerine getirmektedir (Chandran ve ark., 1998).

Bakteri ve IFN- γ veya yüksek miktarda LPS ile uyarılan makrofajlar çok miktarda NO üreterek yabancı hücrelerde (bakteri, parazit, tümör hücreleri) sitostatik ve/veya sitotoksik etki yaratmaktadır. İndüksiyon sonrası NO sentezi saatlerce hatta günlerce sürebilir. Monosit ve makrofajların solunumsal patlaması sırasında reaktif oksijen ara ürünlerinin varlığında IFN- γ , TNF- α , GM-CSF gibi sitokinler

artmaktadır (Bogdan ve ark., 2000; Hino ve ark., 2005; Mills ve ark., 1999; Poljakovic ve ark., 2002).

Bizim sonuçlarımız göstermiştir ki 5 ve 24. saat sonunda epitel ve makrofaj kültür süpernatantlarında NO yanıtı mikroorganizmalarla uyarılmamış kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 3.5). *S. pyogenes*'in hücrelere karşı göstermiş olduğu NO cevabı 5. saatte *E. coli*'ye göre artmışken, 24 saatte *E. coli*'nin hücrelere karşı göstermiş olduğu NO yanıtı *S. pyogenes*'e göre artmış olduğu gözlemlenmiştir.

S. pyogenes'in hücrelere karşı göstermiş olduğu etki ile 5 ve 24. saatte sitokinlerin (IL-6 ve TNF- α da hücrelerin birlikte olduğu durumlar dışında) farkedilir bir şekilde üretilmediği buna karşın NO'nun arttığı gözlemlenmiştir. *S. pyogenes*'in erken dönemde NO cevabı daha fazla gibi görünmekte, *E. coli*'nin başka mekanizmaları indükleyerek erken dönemde bakterisidal etkide etkin olduğu varsayılabilir. Burada NO yanıtı ile sitokin yanıtı arasında bir korelasyonun olmadığı görülmektedir.

Genel olarak bakıldığında *E. coli*'ye karşı hücrelerin 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri ve sitokin yanıtları *S. pyogenes*'e karşı hücrelerin 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki ve sitokin yüzdelerinden antibakteriyel etkinlik açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çalışmamızda *E. coli*'nin *S. pyogenes*'e göre oluşturduğu proinflamatuvar yanıtlarından çok daha fazla sitokin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda araştırılan çoğu Gram negatif bakterinin (*E. coli*, *Neisseria meningitidis* ve *Neisseria gonorrhoeae*) Gram pozitif türlerin (*Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis*) oluşturduğu proinflamatuvar yanıtlarından çok daha fazla sitokin oluşumuna neden

olduğu gösterilmiş; Gram pozitif bakterilerin çoğunlukla normal flora elemanı olması ve bu yüzden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını daha zayıf olarak indüklediği ve antiinflamatuvar sitokinleri uyardığı, böylece konak ile uyum içinde yaşadığı varsayılmıştır (Wilson ve ark., 1998).

Ayrıca farklı hücrelerin aynı bakterilerin oluşturduğu sinyallere farklı sitokin yolunun oluşumu ile cevap verdikleri görülmektedir (Wilson ve ark., 1998). Bakterilerin özellikleri de bu cevaptan etkilenebilmektedir. Makrofajlarda inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu için kritik ya da önemli faktörlerden birisi LPS'dir (Schilling ve ark., 2001).

Bu sonuçlara göre makrofajın bakterisidal etki ve sitokin yanıtı yönünden epitel hücrelerine göre daha etkin rol oynadığını ayrıca makrofajla epitelin teması ile birbirlerini aktive ederek temasın önlendiği kültürlerle göre daha fazla bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bizim çalışmamız epitel hücresi ile makrofajın hücre-hücre temasının etkilerinin incelendiği benzer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Agace ve ark., 1993; Bodet ve ark., 2006; Hjorth ve ark., 2003; Ishii ve ark., 2005; Pechkosky ve ark., 2002; Tao ve Kobzik, 2002; Wottrich ve ark., 2004).

Bodet ve arkadaşlarının (2005) çalışmasında *P. gingivalis*'in makrofaj/epitel ko-kültür modellerinde IL-1 β , IL-6, IL-8 ve RANTES'i stimüle edebildiğini tespit etmişlerdir. Tao ve Kobzik (2002) epitelyal hücre ve makrofajları ile çok sayıda partiküllerin etkileşimini gösteren bir çalışmada, makrofaj-epitel ko-kültürlerinde mono-kültürlere göre sinerjistik olarak TNF- α ve MIP-2 bazal seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir. Hjorth ve arkadaşları (2003) ise Hyperoxia ile indüklenen akciğer inflamasyonunda epitel hücresi ile makrofajlarda IL-8 salınımının incelendiği bir çalışmada tek başına kültüre edilen hücrelerin hiç birinde IL-8 miktarı farkedilir bir şekilde üretilmediği, temasın önlendiği ko-kültürlerde azaldığı, temasın olduğu ko-kültürlerde ise IL-8 seviyesinin artmış olduğu göstermişlerdir. Hino ve arkadaşlarının (2005), A549 epitel hücresi ve makrofaj hücre dizisi ile ko-kültürünün yapıldığı bir çalışmada, epitel hücreleri yüksek sitotoksitite ve kültür vasatlarında NO yüksek

konsantrasyonlarda ölçülmüş, epitel hücrelerindeki sitotoksitenin LPS ile aktive edilen makrofajlarla temastan sonra meydana geldiği, bu etkilerinde makrofaj tarafından salınan NO'in sorumlu olduğu sonucuna varmışlardır.

Diğer çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda temasın olduğu ko-kültürlerde sitokin seviyesinin artmış olduğu makrofaj cevabının epitel hücresi ile temasının potansiyel olarak görüldüğü, ayrıca sitokin oluşumunda monosit-makrofaj hücre dizisinin epitel hücre dizisinden daha büyük rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Ancak epitel hücreleri onların stratejik yerinden dolayı patojenlere karşı ilk yanıtı veren ve direkt hücre-hücre teması ile veya yayılabilen aktivasyon faktörleri ya da ko-faktörler salarak makrofajları aktive edebilen ve doğal immun/inflamatuvar cevaba katılımı sağlayan hücre olması açısından oldukça önemlidir.

Bu in vitro deneylerin belli sınırlamaları vardır. İnvitro çalışmalarda kanser hücre dizileri kullanılmaktadır. Ko-kültüre edilmiş insan epitelial hücreleri ve monositleri invitro benzer fenotipik şekilleri olduğu için bu hücreler seçilmiştir (Auwerx, 1991; Kanzato ve ark., 2001; Sambuy ve ark., 2005; Tsuchiya ve ark.,1980). Bu ko-kültür modelinin invivo da ortaya çıkabilen epitel-makrofaj etkileşimini incelemek için uygun olduğu görülmüştür. İnvivo olarak oluşan inflamatuvar cevapta yalnızca epitel-makrofaj teması dışında çözünür faktörler ve diğer hücre tipleri (endothelial hücreler, fibroblastlar ve diğer inflamatuvar hücreler) ile temasına da gerek duyulmaktadır. Bu kompleks etkileşimleri araştırabilmek için çeşitli hücre tiplerinin de bu çalışmalara katılması gerekmektedir.

Bulgularımız sonucunda mikroorganizmalarla uyarılan epitel hücresinin tek başına oluşturduğu sitokin yanıtları, makrofajın tek başına, hücrelerin temasın önlenmediği ve temasın olduğu kültürlerdeki sitokin yanıtlarına göre düşük olduğu; makrofajın ise bakterisidal etki ve sitokin yanıtı yönünden epitel hücresine göre daha etkin rol oynadığını bulunmuştur. Ayrıca bu çalışma ile makrofaj-epitel ko-kültürlerinde mono-kültürlere göre sitokinlerin bazal seviyelerinin yükseldiğini ve mikroorganizmalara karşı invitro inflamatuvar cevaplarının makrofaj ve epitel

hücreleri arasında temas ile arttığı saptanmıştır. Hücrelerin bakterisidal etkisi ve sitokin yanıtları kullanılan bakteri suşlarına, kullanılan makrofaj/epitel hücre oranına, hücre kültürlerinin durumuna (insertle ayırarak temasın önlendiği ya da birlikte ko-kültürü yapıldığı), hücre tiplerine, kullanılan E/H değerine ve zamana bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca farklı hücrelerin aynı bakterilerin oluşturduğu sinyallere farklı sitokin yolunun oluşumu ile cevap verdikleri görülmektedir (Wilson ve ark., 1998).

Farklı hücreler, farklı mikroorganizmalar ve hücrelerin mikroorganizma ile birlikte olmasındaki ve süresindeki değişiklikler; hücrelerin farklı yanıt oluşturmalarına, sitokin ve NO yanıtlarının nitelik ve niceliklerinin değişik olmasına yol açacak dolayısı ile değişik immun yanıt oluşturan hücrelerin flora ile ilişkileri de farklı olacaktır (Hino ve ark., 2005; Wilson ve ark.,1998).

Günümüzde doğal immunité immun sistemin en çok araştırılan konusunu oluşturmaktadır. Doğal immüitenin temel mekanizmasını oluşturan epitel hücresi ve makrofajın etkileşimi dışında diğer immün hücrelerin ve diğer çözünür faktörlerin de zaman ve doza bağlı değişen proinflamatuvar ve antiinflamatuvar yanıtının daha iyi anlaşılması; mukozal aşı çalışmalarına, hastalıkların patogenezlerinin araştırılmasına ve doğal immun tedaviye özellikle antitümör mekanizmaları etkili hale getirmek için gelişen tekniklere büyük katkılarda bulunacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Caco-2 epitel hücresi, THP-1 makrofaj hücre kültürleri ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında *S. pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri sırası ile %21,96, %27,73, %24,36, %31,83 ve %27,55; yine aynı hücrelerin *E. coli*'ye karşı 5 saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri sırası ile %36,22, %63,87, %55,68, %30,51 ve %43,65 olarak saptanmıştır.
2. *E. coli*'ye karşı hücrelerin 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri, *S. pyogenes*'e karşı hücrelerin 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdelerinden istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
3. *S. pyogenes*'in bakterisidal etkisi; tek başına mikroorganizmalar ile kültürleri yapıldığında makrofajların epitel hücresine göre; epitel ve makrofajların birlikte kültürü tek başına epitel hücre kültürüne göre yüksek bulunmuştur.
4. *E. coli*'nin bakterisidal etkisi; makrofaj ve her iki hücrenin birlikte olduğu kültürlerde epitelin tek başına ve temasın önlendiği kültürlerle göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
5. 5 ve 24. saat sonunda epitel ve makrofaj kültür süpernatantlarında NO yanıtı mikroorganizmalarla uyarılmamış kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. *S. pyogenes* ile uyarılan hücrelerde 5. saatte anlamlı olarak NO cevabı artarken, *E. coli* ile uyarılan hücrelerde 24. saatte NO yanıtının anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır.
6. Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücrelerinin invitro koşullarda ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda bazal ve indüklenebilir olarak

pikogram seviyesinde IL-6, IL-8 ve TNF- α oluşturduğu tespit edilmiştir.

7. 5. ve 24. saatte *S. pyogenes* ile uyarılmış Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücreleri birlikte temasın olduğu kültürlerde IL-6 ve TNF- α seviyelerinin diğer hücelere (epitel hücresi ve temasın önlendiği durumlarda) göre artmış olduğu bulunmuştur. *E. coli* ile uyarılmış hücrelerde ise 5. ve 24. saatte epitel hücrelerinin tek başına kültürüne göre makrofajın tek başına kültüre edildiği, hücrelerin temasın önlendiği ve temasın olduğu kültürlerde IL-6 , IL-8 ve TNF- α seviyelerinin artmış olduğu bulunmuştur.
8. *S. pyogenes*'in hücelere karşı göstermiş olduğu etki ile 5 ve 24. saatte sitokinlerin (IL-6 ve TNF- α da hücrelerin birlikte olduğu durumlar dışında) farkedilir bir şekilde üretilmediği buna karşın NO'in artığı gözlemlenmiştir. Burada NO yanıtı ile sitokin yanıtı arasında bir korelasyonun olmadığı tespit edilmiştir.
9. Makrofajın bakterisidal etki ve sitokin yanıtı yönünden epitel hücresine göre daha etkin rol oynadığı ayrıca makrofajla epitelin teması ile birbirlerini aktive ederek temasın önlendiği kültürlerde göre daha fazla bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

İnvivo olarak oluşan inflamatuvar cevapta yalnızca epitel–makrofaj teması dışında çözümler ve diğer hücre tipleri (endothelial hücreler, fibroblastlar ve diğer inflamatuvar hücreler) ile temasına da gerek duyulmaktadır. Bu kompleks etkileşimleri araştırabilmek için çeşitli hücre tiplerinin de bu çalışmalara katılması gerekmektedir. Hücrelerin bakterisidal etkisi ve sitokin yanıtları kullanılan bakteri suşlarına, kullanılan makrofaj/epitel hücre oranına, hücre kültürlerinin durumuna (insertle ayırarak temasın önlendiği ya da birlikte ko-kültürü yapıldığı), hücre tiplerine, kullanılan E/H değerine ve zamana bağlı olarak değişmektedir.

Günümüzde doğal immünite immun sistemin en çok araştırılan konusunu oluşturmaktadır. Doğal immüitenin temel mekanizmasını oluşturan epitel hücresi ve makrofajın etkileşimi dışında diğer immün hücrelerin ve diğer çözünür faktörlerin de zaman ve doza bağlı değişen proinflamatuvar ve antiinflamatuvar yanıtının daha iyi anlaşılması, mukozal aşı çalışmalarına, hastalıkların patogenezlerinin araştırılmasına ve doğal immun tedaviye özellikle antitümör mekanizmaları etkili hale getirmek için gelişen tekniklere büyük katkılarda bulunacaktır.

ÖZET

Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücrelerinin *Streptococcus pyogenes* ve *Escherichia coli*'ye karşı bakterisidal etki, nitrik oksit ve sitokin yanıtlarının araştırılması

Epitel hücresi ve makrofajlar doğal immun cevabın başlangıcında ve devamında önemli bir rol oynarlar. Bu hücrelerin doğal immun cevaba hücreler arası ilişkiler ve inflamatuvar mediatörlerin salınımı yoluyla katkıda bulduklarına inanılmaktadır. Makrofajlar, genellikle doğal immun/inflamatuvar cevabı başlatan ve istila eden patojenle ilk temasta bulunan hücre olarak kabul edilmektedir. Epitel hücreleri stratejik olarak hem patojenlerin hem de makrofajların temasta bulunduğu yerdir. Bu çalışmada, Caco-2 ve THP-1 hücrelerinin ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda farklı mikroorganizmalarla uyarılması sonucu oluşan bakterisidal etki, NO ve sitokin üretiminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Hedef hücre olarak *S. pyogenes* ve *E. coli*, efektör hücreler olarak Caco-2 hücreleri ve aktive olmuş makrofaj benzeri THP-1 hücreleri 1:1 E/H oranlarında ikiye ayrı ayrı olarak 24 kuyucuklu plaklarda karşılaştırılmıştır. 5 saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyucuktaki süpernatant üremenin engellenmesi deneyi için kuyucuklardan toplanmış, *S. pyogenes* için kanlı agara ve *E. coli* için ise EMB agara ekilmiştir. 37°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra plaklarda meydana gelen koloni oluşturan birimler sayılmış ve bakterisidal etki yüzdesi hesaplanmıştır. Kuyucuklardan 5 ve 24 saatlik inkübasyonlardan sonra NO ve sitokin üretiminin ölçümü için süpernatant toplanmış ve IL-6, IL-8, TNF- α ve IFN- γ seviyeleri ticari ELİSA kitleriyle değerlendirilmiştir. Çalışmaların istatistiksel değerlendirmesi Kruskal-Wallis testi ve multiple comparison testi ile yapılmıştır.

Caco-2 epitel hücresi, THP-1 makrofaj hücresi ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 1/1 E/H oranında *S. pyogenes*'e karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri sırası ile %21,96, %27,73, %24,36, %31,83 ve %27,55; yine aynı hücrelerin *E. coli*'ye karşı 5 saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri sırası ile %36,22, %63,87, %55,68, %30,51 ve %43,65 olarak saptanmıştır.

5. ve 24. saat sonunda epitel ve makrofaj kültür süpernatantlarında NO yanıtında kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). *S. pyogenes* ile uyarılan hücrelerde 5. saatte anlamlı olarak NO cevabı artarken, *E. coli* ile uyarılan hücrelerde 24. saatte NO yanıtının anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).

Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücreleri invitro koşullarda ayrı ayrı, birlikte ve temasın engellenmesi durumunda 5. ve 24. saatte *S. pyogenes*'e karşı sitokinlerin seviyelerinde, IL-6 ve TNF- α da hücrelerin birlikte olduğu durumlar dışında farkedilir bir değişiklik olmazken ($p>0,05$), *E. coli* ile uyarılmış hücrelerde 5. ve 24. saatte IL-6, IL-8 ve TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p\leq 0,05$). Hücrelerin bakterisidal etkisi ve sitokin yanıtları, kullanılan bakteri suşlarına, hücrelerin ilişki durumuna göre değişiklik göstermektedir. Makrofajın bakterisidal etki ve sitokin yanıtı yönünden epitel hücrelerine göre daha etkin rol oynadığını ayrıca makrofajla epitelin teması ile birbirlerini aktive ederek, temasın önlenmediği ve tek başına yapılan kültürlerle göre daha fazla bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Epitel hücresi, Makrofaj, Bakterisidal etki, Nitrik oksit, IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ

SUMMARY

Investigation of bactericidal effect, nitric oxide and cytokine responses of Caco-2 epithelial cells and THP-1 macrophage cells against *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli*

Epithelial cells and macrophages play major roles in the initiation and maintenance of innate immune response. These cells are believed to contribute to innate immune response by intercellular communications and secretion of inflammatory mediators. The macrophage is usually regarded as the first cell to interact with an invading pathogen and initiate an innate immune/inflammatory response. Epithelial cells are strategically located to interact with both pathogens and macrophages. In this study, it was aimed to compare bactericidal capacity, NO and cytokine production of macrophages and epithelial cells alone, mixed and separated, against different bacteria.

Caco-2 cells and activated macrophage-like THP-1 cells as effector cells and *S. pyogenes* or *E. coli* as target cells were incubated at an effector cell/ target cell ratio of 1/1 in duplication 24 well plates. Cells untreated with bacteria were used as control group. After 5 h incubation, supernatants were collected from each well for growth inhibition assay and were inoculated onto blood agar plates for *S. pyogenes* and EMB for *E. coli*. Following overnight incubation at 37°C, bactericidal effect rate was calculated by counting the colony forming units. The supernatants were also collected after 5 and 24 h incubation for measurement of NO and cytokines namely, IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ production by using Griess reagent and commercial ELISA tests, respectively. Kruskal-Wallis test and multiple comparison test were used for statistical analysis.

We found the mean values for bactericidal effects of Caco-2 cells and THP-1 cells alone, mixed and separated by a filter insert as 21,96%, 27,73%, 24,36%, 31,83%, 27,55% on *S. pyogenes* and as 36,22%, 63,87%, 55,68%, 30,51%, 43,65% on *E. coli*, respectively. Our results showed a statistically significant increase in NO levels in epithelial and/or macrophage cell culture supernatants collected after 5 h exposure compared to control cells ($p < 0.05$). Contrary to *S. pyogenes* which stimulated NO production at 5 h incubation greater than 24 h incubation, NO increase for *E. coli* was maximum at 24 h incubation ($p < 0.05$).

When Caco-2 epithelial cells and THP-1 macrophages were incubated in vitro with *S. pyogenes* alone, mixed and separated for 5 and 24 hours, there were no statistically significant changes in the levels of cytokines except for IL-6 and TNF- α when the cells were mixed ($p > 0.05$). On the other hand, cells which were stimulated with *E. coli* showed statistically higher levels of IL-6, IL-8 and TNF- α at 5 and 24

hours ($p \leq 0.05$). Bactericidal effect and cytokine response of cells depend on the bacterial strain used and cell interaction conditions. Macrophages play a more active role than epithelial cells in bactericidal effect and cytokine response. Besides, epithelial cells and macrophages activate each other when mixed more than alone or separated.

Keywords: Epithelial cell, Macrophage, Bactericidal effect, Nitric oxide, IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ

KAYNAKLAR

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. (2003). Cellular and Molecular Immunology, Fifth edition, Ed. Saunders, Philadelphia. pp.: 243-298.
- ACHESON, D.W.K, LUCCIOLI, S. (2004). Mucosal Immune Responses. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*. **18**: 387-404.
- AGACE, W., HEDGES, S., ANDERSSON, U., ANDERSSON, J., CESKA, M., SVANBORG, C. (1993). Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun*. **61**: 602-609.
- ALBAYRAK, N., BİRİKEN, D., ÖZENCİ, H. (2005). İnsan ağız ve üriner sistem epitel hücrelerinin farklı *Escherichia coli* suşlarına karşı bakterisidal etkisinin araştırılması. *Mikrobiyol. Bül.*, **39**(2): 161-167.
- ALBAYRAK, N., BİRİKEN, D. ÖZENCİ, H. (2006a). İnsan ağız epitel hücresinin farklı antijenik miktarlardaki *Streptococcus pyogenes*'e karşı bakterisidal etkisinin ve sitokin yanıtının araştırılması. *Mikrobiyol Bül*, **40**(1-2): 29-37.
- ALBAYRAK, N., BİRİKEN, D. ÖZENCİ, H. (2006b). Üriner epitel hücrelerinin farklı dozlardaki *Escherichia coli*'e karşı bakterisidal etkisinin araştırılması. *Mikrobiyol. Bül.*, **40**(3): 195-200.
- ALEXANDER, J.S., DAYTON, T., DAVIS, C., HILL, S., JACKSON, T.H., BLASCHUK, O., SYMONDS, M., OKAYAMA, N., KEVIL, C.G., LAROUX, F.S., BERNEY, S.M., KIMPEL, D. (1998). Activated T-lymphocytes Express occludin, a component of tight junction. *Inflammation*, **22**(6): 573-582.
- ASHMAN, R.B., PAPADIMITRIOU, J.M. (1990). What's new in the mechanisms of host resistance to *C. albicans* infection. *Path. Res. Pract.*, **186**: 527-34.
- AUWERX, J. (1991). The Human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, **15**; **47**(1): 22-31
- BADUR, S. (2001) Mukozal bağışıklık yapı taşları, işlevi ve aşı çalışmaları: *İmmünolojide gelişmeler III*, 75-86.
- BATTISTONI, A., AJELLO, M., AMMENDOLA, S., SUPERTI, F., ROTILIO, G., VALENTI, P. (2004). Involvement of reactive oxygen species in bacterial killing within epithelial cells. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **17**: 71-76.

- BAYSAL, B. (2004). *Escherichia coli*, Ed; Cengiz, A.T., *Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, 454-458.
- BERIN, C.M., McKAY, D.M., PERDEU, M.H. (1999). Immune-epithelial interactions in host defense. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**(4): 16-25.
- BERKİTEN, R. (2005a). Gram Pozitif koklar. Ed. Bozkaya, E., *Tıbbi Mikrobiyoloji 2. Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları*. Nobel Tıp kitabevleri. s. 1-29.
- BERKİTEN, R. (2005b). Fakültatif Anaerop Gram Negatif Çomaklar, Ed. Bozkaya, E., *Tıbbi Mikrobiyoloji 2. Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları*. Nobel Tıp kitabevleri. s. 51-97.
- BLAU, H., RIKLS, S., VAN IWAARDEN, J.F., MCCORMACK, F.X., KALINA, M. (1997). Nitric oxide production by rat alveolar macrophages can be modulated in vitro by surfactant protein A. *Am. J. Physiol.* **272**: 1198-1204.
- BODET, C., CHANDAD, F., GRENIER. (2005). Modulation of cytokine production by *Porphyromonas gingivalis* in a macrophage and epithelial cell co-culture model. *Microbes Infect.*, **7**: 448-456.
- BODET, C., CHANDAD, F., GRENIER. (2006). Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microbes and Infection*, **8**(1); 27-35.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M., DİEFENBACH, A. (2000). The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews*, **173**: 17-26.
- BOPP, C.A., BRENNER, F.W., WELLS, J.G., STROCKBINE, N.A. (1998). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In *Manual of Clinical Microbiology* (ed: Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover), p.: 459-474.
- BOUVET, J.P., FICHETTI, V.A.(1999). Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infect. Immun.*, **67**(6): 2687-2691.
- BOYAKA, P.N., MARINARO, M., FUJİHASHI, K., MCGHEE, J.R. (2001). Host defenses at mucosal surfaces. In *Clinical Immunology Principles and Practice* (ed. R.R. Rich, T.A. Fleischer, W.T. Shearer, B.L. Kölzin, H.W. Schroeder), pp. 20.1-20.18.
- BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., ORNSTON, L.N. (1995). The Streptococci. *Medical Microbiology*, Prentice-Hall International Inc, Appleton-Lange, Norwalk, Connecticut, p: 192-205.

- CONOVER, W.J., SONS, J.W. (1980). Practical Nonparametric Statistics 2nd Chapter 5. Some methods based on ranks, Section 5.2, several in dependent samples. Multiple Comparison Test. p.: 229-239.
- CARIO, E., PODOLSKY, D.K. (2005). Intestinal epithelial tolerance versus intolerance of commensals. *Molecular Immunology*, **42**(8): 887-893.
- CASTRANOVA, V. (2004). Role of nitric oxide in the progression of pneumoconiosis *Biochemistry (Mosc)*, **69**(1): 32-7.
- CENGİZ, A.T. (1999). *Streptococcus*, Ed; Ustaçelebi, Ş; *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, 349-365.
- CHANDRAN, S., SRIDHAR, N., VEERANJANEYULU, A. (1998). Nitric Oxide: Concepts, Current Perspectives and Future Therapeutic Implication. *Indian Journal of Pharmacology*, **30**: 351-366.
- CHUNG, W.O., DALE, B.A. (2004). Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. *Infection and Immunity*, **72**: 352-358.
- COSSART, P., SANSONETTI, P.J. (2004). Bacterial Invasion: The paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science*, **304**: 242-248.
- CRANE-GODREAU, M.A., WIRA, C.R. (2004). Effect of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* on Macrophage Inflammatory Protein 3 α , Tumor Necrosis Faktor Alpha, and Transforming Growth Factor β Release by Polarized Rat Uterine Epithelial Cells in Culture. *Infection and Immunity*, **72**(4): 1866-1873.
- CUNLIFFE, R.N. (2003). α -Defensin in the gastrointestinal tract, *Molecular Immunology*, **40**: 463-467.
- DAUBENER, W., HUCKE, C., SEIDEL, K., HADDING, U., MACKENZIE, C.R. (1999). Interleukin-1 inhibits gamma interferon-induced bacteriostasis in human uroepithelial cells. *Infection and Immunity*, **67**: 5615-5620.
- DIAMOND, D.L., KIMBALL, J.R., KRISANAPRAKORNKIT, S., GANZ, T. (2001). Detection of β -defensins secreted by human oral epithelial cells. *J. Immunol. Methods.*, **256**: 65-76.
- DINULOS, J.G., MENTELE, L., FREDERICKS, L.P., DALE, B.A., DARMSTADT, G.L. (2003). Keratinocyte expression of human beta defensin 2 following bacterial infection: role in cutaneous host defense. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **10**:161-166.

- DELVES, P.J., MARTÍN, S.J., BURTON, D.R., ROITT, I.M. (2006). Innate immunity. In: *Roitt's Essential Immunology*, Eleventh Edition, USA, Blackwell publishing, p.: 1-20.
- DOLAPCI, I., ALBAYRAK, N., BOYVAT, A., OZENCI, H. (2003). Antibacterial capacity of oral (epithelial) cells from healthy donors and patients with Behçet's disease. *Archives of Dermatological Research*, **295**: 124-126.
- DOMMETT, R., ZILBAUER, M., GEORGE, J.T., BAJAJ-ELLIOTT, B.M. (2005). Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Molecular Immunology*, **42**(8): 903-912.
- EGUSA, H., NIKAWA, H., MAKIHIRA, S., JEWETT, A., YATANI, H., HAMADA, T. (2005). Intercellular Adhesion Molecule 1-Dependent Activation of Interleukin 8 Expression in *Candida albicans*-Infected Human Gingival Epithelial Cells. *Infect. Immun.*, **73**(1): 622-626
- ELLIS, G., ADATIA, I., YAZDANPANA, M., MAKELA, S.K. (1998). Nitrite and nitrate analyses: A clinical Biochemistry perspective. *Clin. Biochem.*, **31**: 195-220.
- ERDEM, B. (1999). *Enterobacteriaceae*, Ed. Ustaçelebi Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, 471-517
- ERNST, P.B., SONG, F., KLIMPEL, G.R., HAEBERLE, H., CROWE, S.E., YE, G., REYES, V.E. (1999). Regulation of the mucosal immune response. *The American Journal of Medicine and Hygiene*, **60**: 2-9.
- FARBERMAN, M.M., DEMELLO, D.E., HOFFMANN, J.W., RYERSE, J.W. (2005). Morphologic changes in alveolar macrophages in response to UVEC-activated pulmonary Type II epithelial cells. *Tissue and Cell*, **37**(3); 213-222.
- FARBERMAN, M.M., HOFFMANN, J.W., RYERSE, J.W., DEMELLO, D.E. (2004). Diffusible signal to murine alveolar macrophages from lipopolisaccaride and *Escherichia coli*-stimulated lung Type II epithelial cells. *Inflamm. Res.*, **53**: 475-483.
- FERNIE-KING, B.A., SEILLY, D.J., LACHMANN, P.J. (2004). The interaction of streptococcal inhibitor of complement (SIC) and its proteolytic fragments with the human beta defensins. *Immunology*, **111**: 444-452.
- FINKELMAN, F.D., SHEA-DONOHUE, T., MORRIS, S.C., GILDEA, L., STRAIT, R., MADDEN, K.B., SCHOPF, L. (2004). Interleukin-4 and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol. Rev.*, **201**: 139-155.
- GANZ, T. (2002). Epithelia: Not just physical barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences US*, **19** (99): 3357-3358.

- GANZ, T. (2004). Antimicrobial polypeptides, *Journal of Leukocyte Biology*, **75**: 34-38.
- GILCHRIST, M.J.R. (1995). Enterobacteriaceae: Opportunistic Pathogens and Other Genera. Murray, Baron, Tenover and Tenover (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, p.: 457-464.
- GORDON, S. (2006). Mononuclear phagocytes in immune defence. In: *Immunology*, Seventh Edition, Ed.: Male, D. Brostoff, J. Roth, D.B. Roitt, USA: Mosby Elsevier, p.: 181-202.
- GUEVARA, I., IWANEJKO, J., DEMBINSKA-KIEC, A. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reactions. *Clin. Chim. Acta.*, **274**: 177-188.
- HALLER, D., HOLT, L., PARLESAK, A., ZANGA, J., BAUERLEIN, A., SARTOR, R.B., JOBIN, C. (2004). Differential effect of immune cells on non-pathogenic Gram-negative bacteria-induced nuclear factor- κ B activation and pro-inflammatory gene expression in intestinal epithelial cells. *Immunology*, **112**: 310-320.
- HAMZAQUI, N., PRINGAULT, E. (1998). Interaction of microorganisms, Epithelium, and lymphoid cells of the mucosa-associated lymphoid tissue. *Annals New York Acad Sci.*, **859**: 65-74.
- HEDGES, S., AGACE, W., SVENSSON, M., SJÖGREN, A.J., CESKA, M., SVANBORG, C. (1994). Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network. *Infection and Immunity*, **62**: 2315-2321.
- HEDGES S., AGACE W., SWANBORG C. (1995). Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol.*, **3**: 266-270.
- HEDGES, S., SVENSSON, M., SVANBORG. (1992). Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation in vitro. *Infect. Immun.*, **60**(4): 1295-1301.
- HINO, M., KOHCHI, C., NISHIZAWA, T., YOSHIDA, A., NAKATA, K., INAGAWA, H., HORI, H., MAKINO, K., TERADA, H., SOMA, G. (2005). Innate-immune therapy for lung carcinoma based on tissue-macrophage activation with lipopolysaccharide. *Anticancer Res.*, **25**(6A): 3747-3754.
- HJORT, M.R., BRENYO, A.J., FINKELSTEIN, J.N., FRAMPTON, M.W., LOMONACO, M.B., STEWART, J.C., JOHNSTON, C.J., D'ANGIO, C.T. (2003). Alveolar Epithelial Cell-Macrophage Interactions Affect Oxygen-Stimulated Interleukin-8 Release. *Inflammation*, **27**(3): 137-145.
- HURLEY, B.P., MCCORMICK, B.A. (2004). Intestinal epithelial defense systems protect against bacterial threats. *Current Gastroenterology Reports*, **6**: 355-361.

- HUTTNER, K.M., BEVINS, C.L. (1999). Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defence. *Pediatric Research*. **45**: 785-794.
- INAGAKI-OHARA, K., SAWAGUCHI, A., SUGANUMA, T., MATSUZAKI, G., YUKIFUMI, N. (2005). Intraepithelial lymphocytes express junctional molecules in murine small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **331**: 977-983.
- ISHII, H., HAYASHI, S., HOGG, J.C., FUJII, T., GOTO, Y., SAKAMATO, N., MUKAE, H., VINCENT, R., VAN EEDEN, S. (2005). Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric in release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Journal List Respir Res.*, **6**(1): 87.
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M., CAPRA, D.J. (1999). Immunobiology, *The Immune System In Health and Disease*, Forth Edition, Elsevier Science Ltd/Gardland.
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. (2001). Innate Immunity, Penelope Austin (ed), *Immunobiology*, 5th ed. Garland Publishing, Chapter 2, New York and London, pp. 33-79.
- KAGNOFF, M.F. (1996). Mucosal immunology: new frontiers. *Immunology Today*. **17**: 57-59.
- KAGNOFF, M.F., ECKMANN, L. (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.*, **100**: 6-10.
- KAISHO, T., AKIRA, S. (2003). Toll-like receptors. *Ann. Rev. Immunol.*, **21**: 335-376.
- KANJ, R.S., KANG, J.L., CASTRANOVA, V. (2006). Interaction between primary alveolar macrophages and primary alveolar type II cells under basal conditions and after lipopolysaccharide or quartz exposure. *J. Toxicol. Environ. Health A*, **69**: 1097-1116.
- KANZATO, H., MANEBE, M., SHIHIMIZU, M. (2001). An invitro approach to the evaluation of the cross talk between intestinal epithelium and macrophages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (2): 449-451.
- KERAKAWAUCHI, H., KURONO, Y., MOGI, G. (1997). Immune responses against *Streptococcus pyogenes* in human palatine tonsils. *Laryngoscope*, **107**: 634-639.
- KILIAN, M. (1998). *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In *Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (ed. A. Balows and B.I. Duerden), pp. 633-655

- KILIÇTURGAY, K. (2003). Doğal İmmünite. *İmmünoloji*, Nobel & Güneş Tıp Kitabevi, 3. Baskı, 203-248.
- LEE, H.Y., ANDALIBI, A., WEBSTER, P., MOON, S.K., TEUFERT, K., KANG, S.H., LI, J.D., NAGURA, M., GANZ, T., LIM, D.J. (2004). Antimicrobial activity of innate immune molecules against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Infect Dis.* **4**: 12.
- LOPEZ-BOADO, Y.S., COBB, L.M., DEORA, R. (2005). *Bordetella bronchiseptica* flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells. *Infect. Immun.*, **73**(11): 7525-7534.
- MA, D., WOLVERS, D., STANISZ, A.M., BIENENSTOCK, J. (2003). Interleukin-10 and nerve growth factor have reciprocal upregulatory effects on intestinal epithelial cells *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **284**: R1323-R1329.
- MAHIDA, Y.R. (2004). Epithelial cell responses. *Best Practice and Research of Clinical Gastroenterology*. **18**: 241-253.
- MARTIN, C.A., HOMAIDAN, F.R., PALAIA, F.R., BURAKOFF, R., EL-SABBAN, M.E. (1998). Gap junctional communication between murine macrophages and epithelial cell lines. *Cell. Adhes. Commun.*, **5**(6): 437-449.
- MATHEW, B., PARK, G.P., CAO, H., AZIM, A.C., WANG, X., VAN BREEMEN, R.B., SADIKOT, R.T., JOHN W. CHRISTMAN, J.W. (2007). Inhibitory (kappa) B kinase 2 activates airway epithelial cells to stimulate bone marrow macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **36**: 562-572.
- MAVRIS, M., SANSONETTI, P. (2004). Epithelial cell responses. *Best Practice and Research of Clinical Gastroenterology*, **18**: 373-386.
- MAYER, L. (2003). Mucosal Immunity. *Pediatrics*. **111**: 1595-1600.
- MCCORMACK, F.X., WHITSETT, J.A. (2002). The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J. Clin. Invest.*, **109**(6): 707-712.
- MCMILLIAN, D.J., DAVIES, M.R., GOOD, M.F., SRIPRAKASH, K.S. (2004). Immune response to superoxide dismutase in group A streptococcal infection. *FEMS Immunology in Medical Microbiology*, **40**: 249-56.
- MEDINA, E., GOLDMANN, O., TOPPEL, A.W., CHHATWAL, G.S. (2003). Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence

and systemic invasion. *Journal of Infectious Disease*, **187**: 597-603.

- MELMED, G., THOMAS, L.S., LEE, N., TEFAY, S.Y., LUKASEK, K., MICHELSEN, K.S., ZHOU, Y., HU, B., ARDITI, M., ABREU, M.T. (2003). Human Intestinal Epithelial Cells Are Broadly Unresponsive to Toll-like Receptor 2-Dependent Bacterial Ligands: Implications for Host-Microbial Interactions in the Gut. *J. Immunol.*, **170**: 1406-1415.
- MILLS, P.R., DAVIES, R.J., DEVALIA, J.L. (1999). Airway Epithelial cells, Cytokines, and Pollutants. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **160**(5): 38-43.
- MORI, A., SATSU, H., SHIMIZU, M. (2003). New model for studying the migration of immune cells into intestinal epithelial cell monolayers. *Cytotechnology*, **43**: 57-64.
- MOSSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, **65**: 55-63.
- NEISH, A.S. (2002). The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes and Infection*. **4**: 309-317.
- NILSSON, M., WEINEISEN, M., ANDERSSON, T., TRUEDSSON, L., SJOBRING, U. (2005). Critical role for complement receptor 3 (CD11b/CD18), but not for Fc receptors, in killing of *Streptococcus pyogenes* by neutrophils in human immune serum. *European Journal of Immunology*, **35**: 1472-81.
- NISAPAKULTORN, K., ROSS, K.F., HERZBERG, M.C. (2001). Calprotectin Expression Inhibits Bacterial Binding to Mucosal Epithelial Cells. *Infect Immun.*, **69**(6): 3692-3696.
- OKAZAWA, A., KANAI, T., NAKAMARU, K., SATO, T., INOUE, N., OGATA, H., IWAO, Y., IKEDA, M., KAWAMURA, T., MAKITA, S., URASHIHARA, K., OKAMATA, R., YAMAZAKI, M. (2004). Human intestinal epithelial cell-derived interleukin (IL)-18, along with IL-12, IL-7 and IL-15, is a potent synergistic factor for the proliferation of intraepithelial lymphocytes. *Clin Exp Immunol.*, **136**: 269-276.
- ÖZENCİ, H., ÇELİK, H.İ., TEKELİ, F.A., AKSOY A.M. (2001). Comparison of Growth Inhibition Effect of CaCo2 Human epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils on various *Candida* species. *Turkish Journal of Infection*, **15**: 527-532.
- PARK, J.B. (2003). Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Experimental and Molecular Medicine*, **35**: 325-335.
- PASARE, C., MEDZHITOV, R. (2004). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*, **6**(15): 1382-1387.

- PECHKOVSKY, D.V., ZISSEL, G., STAMME, C., GOLDMANN, T., JAFFE, H.A., EINHAUS, M., TAUBE, C. (2002). Human alveolar epithelial cells induce nitric oxide synthase-2 expression in alveolar macrophages. *Eur. Respir. J.*, **19**: 672-683.
- POLJAKOVIC, M., KARPMAN, D., SVANBORG, C., PERSSON, K. (2002). Human renal epithelial cells Express iNOS in response to cytokines but not bacteria. *Kidney International*, **61**(2): 444
- QUAYLE, A.J. (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *Journal of Reproductive Immunology*, **57**: 1-29; 61-79.
- RASTOGI, D., RATNER, A.J., PRINCE, A. (2001). Host bacterial interaction in the initiation of inflammation. *Pediatric Respiratory Reviews*, **2**: 245-252.
- REDDY, V.M. (1998). Mechanism of *Mycobacterium avium* complex pathogenesis. *Frontiers in Bioscience*, **3**: d525-531.
- RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA, G., BONASÍO, R., GRANUCCI, F., KRAEHENBUHL, J.P., RICCIARDI-CASTOGNOLI, P. (2001). Dendritic cells Express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol.*, **2**(4): 361-367.
- ROSSEAU, S., SELHORST, J., WIECHMANN, K., LEISSNER, K., MAUS, U., MAYER, K., GRIMMEINGER, F., SEEGER, W., LOHMEYER, J. (2000). Monocyte Migration Through the Alveolar Epithelial Barrier: Adhesion Molecule Mechanisms and Impact of Chemokines. *The Journal of Immunology*, **164**: 427-435.
- ROSSEAU, S., WIECHMANN, K., MODERER, S., SELHORST, J., MAYER, K., KRULL, M., HOCKE, A., SLEVOGT, H., SEEGER, W., SUTTORP, N., SEYBOLD, J., LOHMEYER, J. (2004). *Moraxella catarrhalis*-infected alveolar epithelium induced monocyte recruitment and oxidative burst. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **32**: 157-166.
- RUOFF, K.R., WHILEY, A., BEIHGTON, D. (2003). *Streptococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology* (ed: Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover), p.: 405-421.
- SAMBUI, Y., DE ANGELIS, I., RANALDI, G., SCARINO, M.L., STAMMATI, A., ZUCCO, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell and functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, **21**(1): 1573-6822.

- SANGARI, F., PETROFSKY, M., BERMUDEZ, L.E. (1999). Mycobacterium avium infection of epithelial cells results in inhibition or delay in the release of interleukin-8 and RANTES. *Infect. Immun.*, **67**: 5069-5075.
- SANSONETTI, P. (2001). Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. *Seminars in Immunology*, **13**(6): 381-390.
- SANSONETTI, P. (2002). Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut*, **50**: 1112-1118.
- SATSU, H., ISHIMOTO, Y., NAKANO, T., MOCHIZUKI, T., IWANAGA, T., SHIMIZU, M. (2006). Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor- alpha. *Experimental Cell Research*, **312**(19): 3909-3919.
- SCHILLING, J.D., MULVEY, M.A., VINCENT, C.D., LORENZ, R.G., HULTGREN, S.J. (2001). Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. *The journal of Immunology*, **166**: 1148-1155.
- SCHWENDE, H., FITZKE, E., AMBS, P., DIETER P. (1996). Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol.*, **59**(4): 555-561.
- SMYTHIES, L.E., SELLERS, M., CLEMENTS, R.H., MOSTELLER-BARNUM, M., MENG, G., BENJAMIN, W.H., ORENSTEIN, J.M., PHILLIP D. SMITH, P.D. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest.*, **115**(1): 66-75.
- SÖYLETİR, G., ÖVER, U. (2002). Beta hemolitik Streptokoklar. Ed: Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Cilt 2. Nobel Tıp Kitabevleri, s: 1478-1488
- STEELE, C., LEIGH, J., SWOBODA, R., FIEDEL, P.J. (2000). Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells. *Journal of Infectious Disease*, **185**: 1479-1485.
- STEELE, C., LEIGH, J., SWOBODO, R., OZENCİ, H. A., FIEDEL, P.L. (2001). Potential role for a Carbohydrate Moiety in Anti-Candida Activity of Human Oral Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, **69** (11); 7091-7099.
- STEELE, C., OZENCİ, H., LUO, W., SCOTT, M., FIEDEL, P.L. (1999). Growth inhibition of *Candida* by Vaginal Cells from naive mice. *Medical Mycology*, **37**: 251-259.

- STRIZ, I., SLAVCEV, A., KALANIN, J., JARESOVA, M., RENNARD, S.I. (2001). Cell-cell contacts with epithelial cells modulate the phenotype of human macrophages, *Inflammation*, **25**: 241-246.
- STROBER, W. (1999). Interactions between epithelial cells and immune cell in the intestine. *Annals New York Academy of Sciences*, 37-45.
- STROBER, W. (2004). Epithelial cells pay a Toll for protection. *Nature Medicine*, **10**: 898-900.
- TAO, F., KOBZÍK, L. (2002). Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am. J. Resper. Cell. Mol. Biol.*, 26(4): 499-505.
- TOMINAGA, T., SUZUKI, M., SAEKI, H., MATSUNO, S., TACHIBANA, T., KUDO, T. (1980). Establishment of an Activated Macrophage Cell Line, A-THP-1, and its Properties. *Tohoku J. Exp. Med.*, **186**: 99-119.
- TÖRECI, K. (2002). Escherichia Türleri. Ed: Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Cilt 2. Nobel Tıp Kitabevleri, s: 1564-1575.
- TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGOCHI, Y., KOBAYASHI, Y. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1 cells). *Int J Cancer*, **26**: 171-176
- QUAYLE, A.J. (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *Journal of Reproductive Immunology*, **57**: 1-29; 61-79.
- VECKMAN, V., MIETTINEN, M., PIRHONEN, J., SIREN, J., MATIKAINEN, S., JULKUNEN, I. (2004). *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **75**: 764-71.
- VITAL, A.L., GONCALA, M., CRUZ, M.T., FIGUEIREDO, A., DUARTE, C.B., LOPES, M.C. (2003). Dexamethasone prevents granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced nuclear factor-kappaB activation, inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in a skin dendritic cell line. *Environ. Health. Perspect.*, **111**(1): 85-92.
- WAHID, R.M., YOSHINAGA, M., NISHI, J., MAENO, N., SARANTUYA, J., OHKAWA, T., JALIL, A.M., KOBAYASHI, K., MIYATA, K. (2005). Immune response to a laminin-binding protein (Lmb) in group A streptococcal infection. *Pediatrics International*, **47**: 196-202.

- WATANABE, F., SATSU, H., MOCHIZUKI, T., NAKANO, T., SHIMIZU, M. (2004). Development of the method for evaluating protective effect of food factors on THP-1-induced damage to human intestinal Caco-2 monolayers. *Biofactors*, **21**(1-4): 145-147.
- WELSH, D.A., MASON, C.M. (2001). Host defense in respiratory infections. *Medical Clinics of North America*, **85**: 1329-1347.
- WILSON, M., SEYMOUR, R., HENDERSON B. (1998). Bacterial perturbation of cytokine Networks. *Infection and Immunity*, **66**: 2401-2409.
- WOTTRICH, R., DIABATE, S., KRUG, H.F. (2004). Biological effects of ultrafine of model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, **207**(4): 353-361.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Derya
Soyadı: Biriken Salın
Doğum yeri ve tarihi: Ankara / 09.10.1967
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Evli
İletişim adresi ve telefonu: Gayret Mahallesi, Basın-İş Blokları B-1 No: 8
Yenimahalle/Ankara
0312 310 30 10 / 397-366, 0312 344 36 01

II- Eğitim

1984-1988 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Lisans)
1998-2001 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı (Master)
2002-2007 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı (Doktora)
Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

1988-2001 Biyolog
2001-2007 Uzman Biyolog

IV- Mesleki Deneyimleri

Hücre Kültürü
Virus İzolasyonu
Titrasyon
Nötralizasyon
İmmunfloresan
İmmunperoksidaz
Enzyme Immunoassay
Hemaglutinasyon
Elektroforez
In house PCR
Real-time PCR

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Viral Hepatitle Savaşım Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayımlar

Biriken, D., Yıldız, S., Özkul, A., Özsan, M. (2004). Klinik Olarak Herpetik Keratit veya Keratokonjunktivit Ön Tanısı Alan Hasta Örneklerinde Herpes Simpleks Tip 1 Virusunun Araştırılması. Mikrobiyol. Bül., 38: 51-59.

Albayrak, N., Biriken, D., Özenci, H. (2005). İnsan ağız ve üriner sistem epitel hücrelerinin farklı *Escherichia coli* suşlarına karşı bakterisidal etkisinin araştırılması. Mikrobiyol. Bül., 39: 161-167.

Albayrak, N., Biriken, D., Özenci, H. (2006). Üriner epitel hücrelerinin farklı dozlardaki *Escherichia coli*'e karşı bakterisidal etkisinin araştırılması. Mikrobiyol. Bül., 40(3): 195-200.

Albayrak, N., Biriken, D., Özenci, H. (2006). İnsan ağız epitel hücrelerinin farklı antijenik miktarlardaki *Streptococcus pyogenes*'e karşı bakterisidal etkisinin ve sitokin yanıtının araştırılması. Mikrobiyol. Bül., 40(1-2): 29-37.

Posterler

In Vitro Cultivation Of Toxoplasma Gondii In Various Cell Cultures, 3rd Balkan Conference Of Microbiology, September 4-6 2003, İstanbul.

Sözlü sunum, Keratitis ve Keratokonjunktivitis Olgularında Herpes Simplex Virusunun Hücre Kültürü İzolasyonu ve Direkt İmmünoperoksidaz Tekniği İle Gösterilmesi. 1. Ulusal Viroloji Kongresi, 21-25 Eylül 2003, Kuşadası-Aydın.

Kemik İliği ve Böbrek Transplantasyonu Yapılan Hastalarda Sitomegalovirus

(CMV) DNA'sının Araştırılması. 1. Ulusal Viroloji Kongresi, 21-25 Eylül 2003, Kuşadası-Aydın.

In Vitro Cultivation Of Toxoplasma Gondii In Various Cell Cultures, 3rd Balkan Conference Of Microbiology, September 4-6 2003, İstanbul.

Investigation of Bacterisidal effects of Human Oral and Uroepithelial cells. 4th Balkan Congress of Immunology. Turkish Journal of Immunology, Vol 9, No 2, Supplement, p: 179, İstanbul, Turkey, 5-8 September 2004.

Üretral hücrelerin farklı miktarlardaki *E.coli*'ye karşı bakterisidal etkisinin araştırılması. I. Ulusal Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Sempozyumu, Sempozyum kitapçığı, s: 85, Kuşadası-Aydın, Türkiye, 1-4 Nisan 2004.

Investigation of dose dependent bacterisidal effect and cytokine response of human oral epithelial cells to *Streptococcus pyogenes*. 16th European Congress of Immunology, 6-9 Sept., 2006, Paris.

Sözlü sunum, Biriken, D., Albayrak, N., Yılmaz, Ş., Özenci, H. (2007). Induction Of Cultured Human Monocytic THP-1 Leukemia Cells By Phorbol 12-Myristate 13-Acetate. 1st Congress of the Society of Innate Immunity. Experimental and Clinical transplantation 5(1): 23. Ankara, Turkey.

Sözlü sunum, Biriken, D., Albayrak, N., Özenci, H. (2007). Evaluation Of Bactericidal Effect and Nitric Oxide Response Of Caco-2 Epithelial And THP-1 Macrophage Cell Lines Against Different Microorganisms. 1st Congress of the Society of Innate Immunity. Experimental and Clinical transplantation 5(1): 23. Ankara, Turkey.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Ödüller

A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden üçüncülükle mezun oldum (1988).

Projeler

İnflamatuvar barsak hastalıklarında oluşan immun cevap ve bunun anti-*Saccharomyces cerevisiae* antikoru ile ilişkisi, 2002, Ankara.

İnsan ağız epitel hücresinin farklı antijenik miktarlardaki *Streptococcus pyogenes*'e karşı bakterisidal etkisinin ve sitokin yanıtının araştırılması, 2004, Ankara.

KB epitel hücresi ve THP-1 insan makrofajının *Streptococcus pyogenes* ve *Escherichia coli*'ye karşı bakterisidal etkilerinin araştırılması, 2005, Ankara.

Seminerler

Floresan Antikor Tekniği ve Kullanım Olanakları

Moleküler Tanı Yöntemleri ve Kullanım Olanakları

Hücre Kültürleri ve Kullanımı

VIII- Diğer Bilgiler

4th Deutsch- Türkisches Symposium, September 12-17, 1995, Ankara, Turkey

Uygulamalı İmmüositokimya Teknikleri Kursu, 7-9 Mayıs 1997, Ankara

4th National Viral Hepatitis Symposium, November 4-6, 1998, Ankara

Kan ve Kan Ürünleri İle Bulaşan Enfeksiyon Hastalıklarının Tanısında Moleküler Biyoloji Yöntemlerinin Kullanımı Kursu, 2-5 Nisan 2003, İstanbul

3rd Balkan Conference Of Microbiology, September 4-6 2003, İstanbul