

ÜRİNER EPİTEL HÜCRELERİNİN FARKLI ANTİJENİK MİKTARLARDAKİ *ESCHERICHIA COLI*'YE KARŞI BAKTERİSİDAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF THE BACTERICIDAL EFFECT OF URINARY EPITHELIAL
CELLS AGAINST DIFFERENT DOSES OF *ESCHERICHIA COLI*

*Nurhan ALBAYRAK***, *Derya BİRİKEN***, *Hatice ÖZENCİ***

ÖZET: Mukozal immün sistemde epitel hücresi, özgül olmayan immün yanıtta kazanılmış immün yanıtta geçişte ve immün homeostazın regülasyon veya tolerans yönünde belirlenmesinde kavşak noktası oluşturmakta; antijene antijenin yapısı, miktarı ve sunum şekline göre nasıl bir yanıt oluşturulacağını belirlemektedir. Çalışmamızda, farklı antijenik miktarlardaki *Escherichia coli* K12'nin üriner epitel (ÜE) hücresinin bakterisidal etkisinde değişikliğe neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, 16 sağlıklı gönüllüden alınan idrar örneklerinden ÜE hücreleri hazırlanmış, bu hücreler (efektör hücre) mikropoplaklarda *E.coli* K12 (hedef hücre) ile farklı antijenik miktarlarda bir saat karşılaştırılmış ve mikroorganizma kontrolleri ile kıyaslanarak bakterisidal etki yüzdesi hesaplanmıştır. Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesi Mann-Whitney U test ile yapılmıştır. Çalışma sonunda, ÜE hücrelerinin bakterisidal etkisi 1/100.000 ve altındaki efektör/hedef hücre oranlarında ortalama %60.7, 1/1.000.000 ve üzerindeki efektör/hedef hücre oranlarında ortalama %11.3 bulunmuş, mikroorganizma miktarının artışı ile epitel hücresinin oluşturduğu bakterisidal etkinin anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiş ($p<0.001$) ve ÜE hücrelerinin *E.coli*'ye karşı doz bağımlı antibakteriyal etkinlik oluşturduğu düşüncesine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Bakterisidal etki, Escherichia coli, epitel hücre.

ABSTRACT: Epithelial cells take part in the stimulation of immune system during the conversion of nonspecific immune response to the adaptive one in the mucosal immune system. Epithelial cells also have critical roles in designating immune homeostasis towards immune regulation or tolerance. Its response type is determined according to the dose and structure of the antigen and the way it is presented. In this study, we aimed to evaluate the response

*Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nce desteklenen 2004.08.09.176 no'lu projenin bir parçası olan bu çalışma, I. Ulusal Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Sempozyumu (1-4 Nisan 2004, Kuşadası-Aydın)'da sözlü bildiri olarak sunulmuştur

**Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

of human urinary epithelial cells to different doses of *Escherichia coli* K12 by means of their bactericidal effect. Urine was collected from 16 healthy volunteers and urinary epithelial cells were prepared. The cells (effector) were stimulated with bacteria (target) in microplates for one hour with different effector/target cell ratios. At the end of the incubation period, the bactericidal effects were calculated and compared with microorganism controls. Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. Urinary epithelial cells which were stimulated by *E.coli* K12 showed dose dependent bactericidal effect, calculated mean value for bactericidal effects were 60.7% at the 1/100.000 effector/target cell ratio and 11.3% 1/1.000.000 effector/target cell ratio, indicating that the bactericidal effect was dose dependent.

Key words: Bactericidal effect, Escherichia coli, epithelial cell.

GİRİŞ

Mukozal yüzeylere tutunma, mukozal enfeksiyonun patogenezinde kritik ilk adımdır. Konağa tutunma, mikroorganizmanın dokudaki sürekliliğini kolaylaştırmakta ve inflamatuvar yanıtı tetikleyen ve mukozal hücrelere bakteri girişine neden olan konak ile etkileşimi başlatmaktadır¹. Konağın mikroorganizma ile ilk karşılaşan ve etkileşime giren hücresi epitel hücreleridir². Epitel hücreleri; bariyer fonksiyonu, defansinler gibi doğal antibiyotik fonksiyonuna sahip peptid ve kompleman oluşumu, TLR (Toll-like receptor) ve MHC molekül ekspresyonu ile antijeni tanıma, alma ve sunma işlemi, profesyonel olmayan yollar ile mikroorganizmayı fagosite etmesi, sitokin, kemokin ve adezyon moleküllerini eksprese ederek diğer immün hücreleri enfeksiyon alanına çağırması ve antikor oluşumuna katkısı ile mikroorganizma ile baş etmeye çalışmaktadır³⁻¹¹. Epitel hücreleri bu görevleri yerine getirirken, immün yanıtı 'immün tolerans' veya 'immün aktivasyon' şeklinde yönlendirmekte ve antijene; antijenin yapısı, miktarı ve sunum şekline göre nasıl bir yanıt oluşturulacağını belirlemektedir^{12,13}.

Çalışmamızda; konak ile epitelyum hücreleri (EH) arasındaki etkileşim ile başlayan, ortama salgılanan çözünür maddelerin olaya karışması ile büyüyen ve EH'nin mikroorganizma ile mücadelesinin bir sonucu olarak görülen bakterisidal etkideki değişimlerin, mikroorganizma dozu ile ilişkisini belirlemek için; insan üriner epitel hücresinin, üriner yolların yaygın bir patojeni olan *Escherichia coli* K12'nin farklı miktarları ile uyarımının bakterisidal etkide değişikliğe neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Epitel Hücreleri: Antibiyotik almayan ve sigara kullanmayan sağlıklı 16 erişkin bireyin sabah ilk akım idrarları steril idrar kabına alındı, 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve hücreler 1200 rpm'de 10 dakika çöktürüldü. Çökelti üç kez "Hanks Balanced Salt Solution" (HBSS) ile yıkandı, süpernatant yıkama işlemlerinden sonra sırasıyla 800 - 200 - 800 rpm'de 10'ar dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemlerinin sonunda elde edilen üriner epitel hücreleri (ÜEH), %10 fetal dana serumu (FCS)

içeren RPMI1640 besiyerinde sulandırıldı, tripan mavisi ile boyanarak thoma lamında sayıldı ve %95 saflıkta elde edilen ÜEH, 10^4 hücre/ml olacak şekilde sulandırıldı¹⁴⁻¹⁶.

Bakteri Suşu: Refik Saydam Hıfzıssıhha Kültür Koleksiyonundan alınan *E.coli* K12 suşu EMB (Eosin Methylene Blue) agara ekildi, 37°C'de inkübe edildi ve ertesi gün plak yüzeyindeki koloniler toplanarak 3 kez fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı. Bakteri çökeltisi %10 FCS içeren RPMI1640 besiyerinde sulandırıldı, tripan mavisi ile boyanarak thoma lamında sayıldı ve ml'de 10^5 - 10^{11} dilüsyonlarında bakteri içeren süspansiyonlar hazırlandı¹⁴⁻¹⁶.

Antibakteriyel Etkinin Değerlendirilmesi: Bu amaçla, üremenin engellenmesi deneyi daha önceden tarif edildiği şekilde mikroorganizma oranları değiştirilerek yapıldı. Kısaca; ÜEH ve *E.coli*, mikroplaklarda 1/10-1/10.000.000 efektör hücre/hedef hücre (E/H) oranlarında 37°C ve %5 CO₂'li etüvde bir saat boyunca karşılaştırıldı. Bu sürenin sonunda kuyucuklardan seri dilüsyonlar yapıldı ve uygun sulandırımardan EMB agara ekimler gerçekleştirildi. Etüve kaldırılan agarlarda ertesi gün koloni oluşturan birimler (cfu) sayıldı ve mikroorganizma kontrolleri ile kıyaslanarak bakterisidal etki (BE) yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı¹⁴⁻¹⁶:

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

İstatistiksel Değerlendirme: Bu amaçla Mann-Whitney U testi kullanıldı. 1/10, 1/100, 1/1.000 ve 1/10.000 E/H hücre oranları Grup I. ve 1/100.000, 1/1.000.000 ve 1/10.000.000 E/H oranları Grup II. olarak alındı.

B U L G U L A R

Çalışmamızda; üremenin engellenmesi deneyinde, *E.coli* K12 ile mikroplaklarda farklı E/H oranlarında bir saat boyunca karşılaştırılan ÜEH'nin, *E.coli* K12'ye karşı antibakteriyel etkisinin I. grupta (%60.7), II. gruba (%11.3) göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo I). I. ve II. gruplarda bakterisidal etki gücü arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 1).

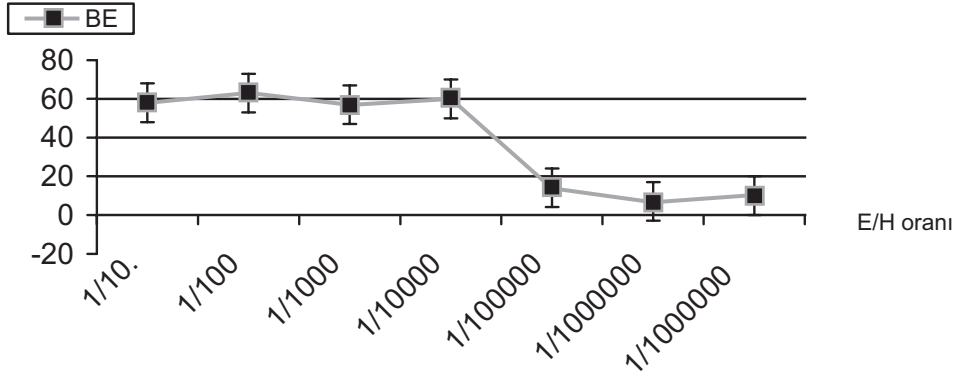
Tablo I: Farklı E/H Hücre Oranlarında Üriner Epitel Hücrelerinin Bakterisidal Etkisi (%)

	Grup (E/H oranları)	
	I (1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000)	II (1/100.000, 1/1.000.000, 1/10.000.000)
Ortalama±SS*	60.7±2.3	11.3±2.1
Ortanca	61	10.5

* Standart sapma.

T A R T I Ş M A

Konağa mikroorganizma girişi ve hastalık oluşumunun en sık ve önemli yolu mukozal alanlardır². Mukozal immün sistemde epitel hücreleri; özgül olmayan immün yanıtta kazanılmış immün yanıtta geçişte ve immün homeostazın regülasyon veya



Şekil 1: Farklı E/H oranlarında, ÜEH'nin *E.coli* K12 suşuna karşı gösterdiği bakterisidal etki yüzdeleri.

tolerans yönünde belirlenmesinde bir kavşak noktası oluşturmakta ve antijene, mikroorganizma ile karşılaştığı doz ve karşılaşma süresine göre nasıl bir yanıt oluşturulacağını belirlemektedir¹².

Çalışmamızda; üriner epitel hücrelerinin, üriner sistem enfeksiyonlarından en sık izole edilen etken olan *E.coli*'nin logaritmik artış gösteren süspansiyonları ile uyarılması ve değişen antijen dozunun bakterisidal etkide farklılığa neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Konu ile ilgili daha önceki çalışmalarda, düşük mikroorganizma miktarlarında (efektör/hedef hücre oranı: 1/1 ve 1/10) pek çok epitel hücre tipinin, farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki oluşturduğu gösterilmiştir¹⁴⁻¹⁷. İdrardan elde edilen epitel hücreleri ile yapılan bir çalışmada; hücreler üropatojenik *E.coli* ile 1/1000 E/H oranında 0, 15, 30 ve 45 dakika boyunca uyarılmış ve zamana bağlı bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir¹⁸. Bu çalışma, epitel hücrelerinin yüksek mikroorganizma miktarlarına da antimikrobiyal etki ile yanıt verdiğini vurgulamıştır¹⁸.

Epitel hücrelerinin düşük veya yüksek mikroorganizma miktarlarına antibakteriyel etkinliği ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte, değişen mikroorganizma miktarlarına vermiş olduğu yanıtlar ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ellmerich ve arkadaşlarının¹⁹ çalışmasında, *Streptococcus bovis*'in artan miktarlarına KB (human oral epidermoid carcinoma) hücresinin IL-8 seviyesinde yükselme ile yanıt verdiği tespit edilmiştir. İnsan kolon epitel hücre dizileri ile yapılan bir çalışmada, hücreler kolera toksini ve toksinin B alt birimi ile inkübe edilmiş; B alt biriminin epitel hücrelerinden IL-10 mRNA'sı ve protein üretiminde, kolera toksininin ise IL-8 ve IL-6 mRNA ekspresyonunda doza bağımlı özgül artışa neden olduğu belirlenmiştir¹³. Üriner epitel hücre dizileri ile yapılan bir başka bir çalışmada da, hücreler *Pseudomonas aeruginosa* lipopolisakaridi ve *Staphylococcus aureus* peptidoglikanı ile farklı zamanlar ve farklı miktarlarda uyarıldığında, zaman ve doza bağlı olarak IL-8 yanıtının oluştuğu gösterilmiştir²⁰. Agace ve arkadaşları²¹ ise, epitel hücrelerinin doza bağlı olarak nötrofil migrasyonunu etkilediğini saptamışlardır.

Bilgilerimize göre, doza bağlı bakterisidal etkideki değişimlerle ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, üriner epitel hücrelerinin *E.coli* K12'ye karşı birinci saatte 1/100.000 ve altındaki E/H oranlarında ortalama %60.7, 1/1.000.000 ve üzerindeki E/H oranlarında ortalama %11.3 bakterisidal etki gösterdiği, dolayısıyla bu etkinin doza bağımlı olarak değiştiği belirlenmiştir.

Epitel hücrelerinin mikroorganizmaya karşı konak savunması; antimikrobik bileşenleri oluşturmaları, fagositer hücreleri ve kazanılmış hücreleri uyarmaları ile olmaktadır. Mikroorganizmanın artışı ile bakterisidal etkinin belirgin şekilde azalması, mikroorganizmanın miktarına göre hücrelerin savunmasının değiştiğini düşündürmektedir. Olasılıkla belli bir miktarın üzerindeki mikroorganizma girişine karşı epitel hücresi tolerans ile yanıt vermektedir. Farklı mukozal hücreler, farklı zamanlar, farklı mikroorganizmalar, farklı E/H hücre oranları, hücrelerin mikroorganizma ile birlikte olmasındaki ve süresindeki değişiklikler, hücrelerin farklı yanıt oluşturmaya neden olmaktadır. Epitel hücrelerinin mikroorganizmalara karşı yanıtının daha iyi anlaşılması için, hücresel ve çözünür faktörlerin mikroorganizma üzerindeki tek başına ve diğer faktörler ile birlikte etkilerinin daha ayrıntılı olarak araştırılmasına ihtiyaç vardır. Mukozal epitel hücrelerinin doza bağlı değişen immün yanıtının daha iyi anlaşılması, mukozal aşı çalışmalarına büyük katkılarda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Godaly G, Frendeus B, Proudfoot A, et al. Role of fimbriae-mediated adherence for neutrophil migration across *Escherichia coli*-infected epithelial cell layers. *Mol Microbiol* 1998; 30: 725-34.
2. Ganz T. Epithelia: Not just physical barriers. *PNAS* 2002; 99: 3357-8.
3. Nochi T, Yuki Y, Terahara K, et al. Biological role of Ep-CAM in the physical interaction between epithelial cells and lymphocytes in intestinal epithelium. *Clin Immunol* 2004; 113: 326-39.
4. Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, et al. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human β -defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microb Infect* 2005; 7: 1117-27.
5. Schaefer TM, Fahey JV, Wright JA, Wira CR. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly (I:C). *J Immunol* 2005; 174: 992-1002.
6. Astorza B, Cortes G, Crespi C, et al. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect Immun* 2004; 72: 1767-74.
7. Acheson DWK, Luccioli S. Mucosal immune responses. *Best Prac Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 387-404.
8. Rosseau S, Wiechmann K, Moderer S, et al. *Moraxella catarrhalis*-infected alveolar epithelium induced monocyte recruitment and oxidative burst. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 32: 157-66.
9. Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* 2004; 5: 678-84.
10. Ernst PB, Song F, Klimpel GR, et al: Regulation of the mucosal immune response. *Am J Med Hyg* 1999; 60: 2-9.
11. Humlicek AL, Pang L, Look DC. Modulation of airway inflammation and bacterial clearance by epithelial cell ICAM-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L598-607.
12. Mavris M, Sansonetti P. Epithelial cell responses. *Best Prac Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 373-86.

13. Ma D, Wolvers D, Stanisiz AM, Bienenstock J. Interleukin-10 and nerve growth factor have reciprocal upregulatory effects on intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R1323-9.
14. Albayrak N, Biriken D, Özenci H. İnsan ağız ve üriner sistem epitel hücrelerinin farklı *Escherichia coli* suşlarına karşı bakterisidal etkisinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39: 161-7.
15. Dolapci I, Albayrak N, Boyvat A, Ozenci H. Antibacterial capacity of oral (epithelial) cells from healthy donors and patients with Behçet's disease. *Arc Dermatol Res* 2003; 295: 124-6.
16. Özenci H, Çelik Hİ, Tekeli FA, Aksoy AM. Comparison of growth inhibition effect of CaCo2 human epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils on various *Candida* species. *Turkish J Infect* 2001; 15: 527-32.
17. Nomanbhoy F, Steele C, Yano J, Fidel PL. Vaginal and oral epithelial cell anti-*Candida* activity. *Infect Immun* 2002; 70: 7081-8.
18. Mannhardt W, Becker A, Pytze M, et al. Host defense within the urinary tract. I. Bacterial adhesion initiates an uroepithelial defense mechanism. *Pediatr Nephrol* 1996; 10: 568-72.
19. Ellmerich S, Djouder N, Schöller M, Klein JP. Production of cytokines by monocytes, epithelial and endothelial cells activated by *Streptococcus bovis*. *Cytokine* 2000; 12: 26-31.
20. Shimizu T, Yokota S, Takahashi S, et al. Membrane-anchored CD14 is important for induction of interleukin-8 by lipopolysaccharide and peptidoglycan in uroepithelial cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 969-76.
21. Agace WW. The role of the epithelial cell in *Escherichia coli* induced neutrophil migration into the urinary tract. *Eur Respir J* 1996; 9: 1713-28.