

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

INVESTIGATION OF BACTERICIDAL EFFECT AND NITRIC OXIDE RESPONSES OF CACO-2 EPITHELIAL CELLS AND THP-1 MACROPHAGE CELLS AGAINST *STREPTOCOCCUS PYOGENES* AND *ESCHERICHIA COLI*

Derya BİRİKEN SALIN¹, Nurhan ALBAYRAK¹, Sulhiye YILDIZ², Hatice ÖZENCİ¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
(deryabirik@hotmail.com)

² Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Epitel hücreleri ve makrofajlar, hücreler arası ilişkiler ve inflamatuvar mediyatörlerin salınımı yoluyla doğal immün yanıtta katkıda bulunan hücrelerdir. Çalışmamızda, epitel hücreleri ile makrofajların etkileşiminin patojen mikroorganizmalarla mücadeledeki mekanizmasına açıklık getirilmesi amacıyla, *Streptococcus pyogenes* ve *Escherichia coli* ile uyarılan Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücrelerinin; tek başlarına, temas halinde iken ve temasın engellendiği ancak çözünür mediyatörlerin etkisinin devam ettiği durumlarda bakterisidal etkileri ve nitrik oksit (NO) üretimleri araştırılmıştır. Hedef hücre olarak *S.pyogenes* ve *E.coli*, efektör hücre olarak Caco-2 hücreleri ve aktive olmuş makrofaj benzeri THP-1 hücreleri 1/1 efektör/hedef hücre oranlarında ikiye ayrılarak 24 kuyucuklu mikrotiplerde karşılaştırılmıştır. Beş saatlik inkübasyonun ardından, üremenin engellenmesi deneyi için her bir kuyucuktaki süpernatant toplanmış, *S.pyogenes* için kanlı agar, *E.coli* için ise EMB agar ekilmiştir. 37°C'de bir gecelik inkübasyonun ardından plaklarda meydana gelen koloni oluşturan birimler sayılmış ve bakterisidal etki yüzdesi hesaplanmıştır. Kuyucuklardan 5 ve 24 saatlik inkübasyonlardan sonra NO üretiminin ölçümü için süpernatant toplanmış ve Griess yöntemi ile değerlendirilmiştir. Caco-2 epitel hücrelerinin tek başına *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı bakterisidal etkisi sırasıyla %21.9 ve %36.2; THP-1 ile bir ayırıcı ile ayrılmış durumda iken sırasıyla %31.8 ve %30.5 ve THP-1 ile hücre-hücre temasının gerçekleştiği durumda sırasıyla %24.4 ve %55.7 olarak tespit edilmiştir. THP-1 makrofaj hücrelerinin tek başına *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı bakterisidal etkisi sırasıyla %27.7 ve %63.9, Caco-2 ile bir ayırıcıyla ayrılmış durumda iken sırasıyla %27.5 ve %43.6, Caco-2 ile hücre-hücre temasının gerçekleştiği durumda sırasıyla %24.4 ve %55.7 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücrelerinin *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı antibakteriyel

* Bu çalışma, "1st Congress of the Society of Innate Immunity (13-16 Mayıs 2007, Ankara)"de sözlü olarak sunulmuştur.

etkinlik gösterdiği saptanmış ($p < 0.05$); bu etkinlik makrofaj hücrelerinde daha belirgin olarak izlenmiştir. Caco-2 ve THP-1 hücrelerinin *S.pyogenes* ve *E.coli* ile uyurım sonucunda oluşturduğu NO yanıtı; *S.pyogenes* ile uyarılan hücrelerde 5. saatte, *E.coli* ile uyarılan hücrelerde 24. saatte belirgin artış göstermiştir ($p < 0.05$). Sonuç olarak, makrofaj hücrelerinin bakterisidal etki ve NO yanıtı oluşturma yönünden epitel hücrelerine göre daha etkin rol oynadığı; makrofajla epitelin teması ile hücrelerin birbirlerini aktive ettiği durumda ortaya çıkan etkinin, temasın önlendiği veya tek başına yapılan uyarımlara göre daha güçlü olduğu saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Epitel hücresi, makrofaj, bakterisidal etki, nitrik oksit.

ABSTRACT

Epithelial cells and macrophages contribute to innate immune responses by cell to cell interactions and releasing proinflammatory mediators. In this study, we aimed to illuminate the underlying mechanisms of contribution of macrophages and epithelial cells in the struggle against pathogens. Therefore, *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* activated Caco-2 cells and THP-1 macrophage-like cells were investigated for their bactericidal activities and nitric oxide (NO) production when they were alone, in contact with each other and when their contact was blocked by continuing exposure of soluble mediators. Caco-2 epithelial cells and THP-1 macrophage cells were used as effector cells and *S.pyogenes* or *E.coli* as target cells and were incubated at an effector cell/target cell ratio of 1/1 in duplication in 24-well plates. After 5 hours incubation, supernatants were collected from each well for growth inhibition assay and were inoculated onto blood agar plates for *S.pyogenes* and eosin methylene blue agar plates 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 hours incubation for measurement of NO production by using Griess reagent. Bactericidal effect of Caco-2 cells alone against *S.pyogenes* and *E.coli* were found 21.9% and 36.2%, when seperated from THP-1 cells via an insert was 31.8% and 30.5%, and when cell-cell contact was established with THP-1 cells was 24.4% and 55.7%, respectively. Bactericidal effect of THP-1 cells alone against *S.pyogenes* and *E.coli* was 27.7% and 63.9%, when seperated from Caco-2 cells via an insert was %27.5 and 43.6%, and when cell-cell contact was established with Caco-2 cells was 24.4% and 55.7%, respectively. As a result, we found that Caco-2 epithelial cells and THP-1 macrophage cells had an antibacterial effect against *S.pyogenes* and *E.coli* ($p < 0.05$), and this effect was higher in macrophage cells than epithelial cells. NO levels in epithelial and/or macrophage cell culture supernatants collected after exposure to *S.pyogenes* and *E.coli* were significantly higher for *S.pyogenes* at 5 hours incubation and for *E.coli* at 24 hours incubation ($p < 0.05$). Moreover, it can be concluded that macrophages played a more active role than epithelial cells in bactericidal effect and NO response. Besides, epithelial cells and macrophages activated each other more when they were in contact than when they were alone or when their contact was blocked.

Key words: Epithelial cell, macrophage, bactericidal effect, nitric oxide.

GİRİŞ

Konağa mikroorganizma girişinin en sık ve önemli yolu mukozal alanlardır. Patojen konağa girdiğinde epitel hücre fiziksel bariyeri, doğal savunma mekanizmaları ve doğal sistemin uyardığı kazanılmış immün yanıt ile karşılaşmaktadır. Doğal immün sistem hücreleri arasında yer alan epitel hücresi ve makrofajlar, inflamatuvar sürecin başlangıcında ve devamında önemli rol oynar¹⁻³. Epitel hücreleri patojenlere karşı bir fiziksel bariyer olmasının yanı sıra; proinflamatuvar genlerin ekspresyonu, inflamatuvar sitokinlerin salınımı ve inflamatuvar hücreler arasında bağlantı sağlayarak mukozal immün yanıtı aktif

olarak katılmaktadır^{4,5}. Epitelyal engeli geçmiş patojenle ilk temasta bulunan hücre olarak kabul edilen makrofajlar, doğal immün ve inflamatuvar yanıtın devamını sağlamaktadır^{6,7}.

Doğal immün yanıtın bu önemli 2 hücresi arasındaki etkileşim epitelyumda gerçekleşir. Epitel hücrelerinin patojenle karşılaşma sonrası salgıladıkları çeşitli çözünür faktörler veya diğer immün hücreler ile temas sonrası salgılanan aktivasyon faktörleri veya kofaktörler tarafından makrofajlar aktive olmaktadır. Böylece bu 2 efektör hücre ve olaya katılan diğer immün efektör hücreler patojenle mücadele etmektedir^{3,8}.

Makrofaj ve epitel hücre yanıtının inflamasyon ile ilgili bir parçası nitrik oksit (NO) üretimidir⁹. NO “oksijene bağımlı sistem” ile etkisinin yanı sıra gaz olma özelliği nedeniyle de hücreden hücreye rahatlıkla geçerek “mesajcı” işlevi görmektedir. Hücreler arasındaki etkileşim sonucunda NO’nun salınımı gerçekleşmekte, ancak hücrelerin ve sistemlerin birbiriyle etkileşimi tam olarak bilinmemektedir¹⁰.

Bakteri ve interferon- γ (IFN- γ) veya yüksek miktarda lipopolisakkarid (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 solunum patlaması sırasında reaktif oksijen ara ürünlerinin varlığında IFN- γ , tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör gibi sitokinler artmaktadır¹¹⁻¹⁴.

Bu çalışmada, epitel hücresi ile makrofaj etkileşiminin patojenle mücadeledeki mekanizmasına açıklık getirilebilmesi amacıyla, *Streptococcus pyogenes* ve *Escherichia coli* ile uyarılan intestinal epitel hücresi ve makrofaj hücrelerinin tek başlarına, hücre-hücre teması halinde iken ve hücre-hücre temasının engellendiği ancak bir hücreden salgılanan mediyatörlerin diğer hücreyi etkilediği durumlarda bakterisidal etkileri ve NO üretimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Refik Saydam Hıfızısıhha Kültür Koleksiyonundan sağlanan *S.pyogenes* ATCC 49619 suşu koyun kanlı agarda, *E.coli* O75 suşu ise EMB (Eosin Methylene Blue) agarda bir gecelik inkübasyonun ardından efektör mikroorganizma olarak kullanılmak üzere 1×10^5 bakteri/ml olacak şekilde hazırlandı¹⁵⁻¹⁷.

Avrupa Kültür Koleksiyonu Organizasyonundan (DSMZ; Almanya Kültür Koleksiyonu, ACC169) temin edilen insan kolon epidermal adenokarsinoma hücreleri (Caco-2) 25 cm² yüzeyli hücre kültürü şişelerinde üretildi. Tek tabaka halinde üreyen hücreler ml’de 1×10^5 canlı hücre olacak şekilde %10 FCS içeren RPMI 1640 ile sulandırıldı. THP-1 (insan lösemi monosit hücre kültürü; DSMZ, ACC-16) hücreleri makrofaj benzeri hücrelere farklılaştırmak için 2×10^5 monosit/ml süspansiyonu 20 ng/ml PMA (phorbol myristic acid) ile 48 saat inkübe edildi. Daha sonra hücrelerden PMA’nın etkisini uzaklaştırmak için 3 kez taze besiyeri ile yıkandı ve hücreler deney öncesinde %5 CO₂ içeren 37°C’lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücre kazıyıcısı ile kaldırılan hücreler 1×10^5 hücre

re/ml olacak şekilde %10 FCS içeren RPMI 1640 içerisinde süspanse edildi¹⁹. Her iki hücre de 24 kuyucuklu mikropaklara; epitel hücresi tek başına, makrofaj hücresi tek başına, epitel hücresi ve makrofaj bir arada ve epitel hücresi ile makrofaj hücre ayırıcısı (Thincert W.Pet-membrane, 0.4 µm; Greiner, Almanya) ile ayrılmış olarak dağıtıldı. Plaklar, mikroorganizma ile uyarım öncesi 3 saat süreyle %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde hücrelerin tutunması için inkübe edildi¹⁵⁻¹⁸.

Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücrelerinin *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı göstermiş olduğu bakterisidal etki ve NO üretimini değerlendirmek için 3 saat tutunma amacıyla bekletilen hücrelerin üzerine her parametre için ikişer kuyucuk olacak şekilde ml'sinde 1×10^5 *S.pyogenes* ve *E.coli* bulunan süspansiyonlardan ayrı ayrı ilave edildi. Kontrol olarak, *S.pyogenes*, *E.coli*, Caco-2 epitel hücreleri ve THP-1 makrofaj hücreleri tek başına kullanıldı. Beş saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyucuktan 100'er µl süpernatant alınıp uygun sulandırılmaları yapıldıktan sonra *S.pyogenes* için koyun kanlı agara, *E.coli* için EMB agara ekimler yapıldı. Plaklar 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra meydana gelen koloni oluşturan birimler (cfu) sayıldı. Bakterisidal etki (BE) yüzdesi şu formüle göre hesaplandı¹⁵⁻¹⁸: $BE (\%) = \{ [ortalama \text{ cfu (kontrol kuyucuğu)} - ortalama \text{ cfu (deney kuyucuğu)}] / ortalama \text{ cfu (kontrol kuyucuğu)} \} \times 100$

Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücrelerinin NO salınımını değerlendirmek için mikroorganizma ile uyarımından 5 ve 24 saat sonra kültür süpernatantları toplandı ve Griess yöntemi ile NO tayini yapılana kadar -80°C'de saklandı. Nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamit) diazotizasyonu ve NED (naphthyl ethylenediamine) ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına dayanan Griess yöntemi kısaca, 96 kuyucuklu plaklara 100 µl süpernatant üzerine eşit volümde Griess ayırıcı (1/1 oranında %0.1 NED ve %5 fosforik asit içinde %1 sülfanilamit) konularak uygulandı. Karışım 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 540 nm'de absorbansları belirlendi. Süpernatantlardaki nitrit miktarı standart nitrit kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplandı²⁰.

Çalışmaların istatistiksel değerlendirmesi SPSS (versiyon 11.5) programında gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi parametrik test Kruskal Wallis ile, Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı bakterisidal etkileri arasındaki fark Conover'ın önerdiği çoklu karşılaştırma testi ile yapıldı. Değerlendirmelerin sonucunda $p < 0.05$ olan değişkenler anlamlı olarak kabul edildi²¹.

BULGULAR

Çalışmamızda, 1/1 efektör hücre/hedef hücre oranında Caco-2 epitel hücrelerinin *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdelere bakıldığında; Caco-2 hücresinin tek başına *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı bakterisidal etkisi sırasıyla %21.9 ve %36.2, THP-1 ile bir ayırıcıyla ayrılmış durumda iken THP-1'in mikroorganizma uyarımı sonucu salınan çözünür faktörlerin Caco-2'yi etkilemesi durumunda sırasıyla %31.8 ve %30.5, THP-1 ile hücre-hücre temasının gerçekleştiği durumda

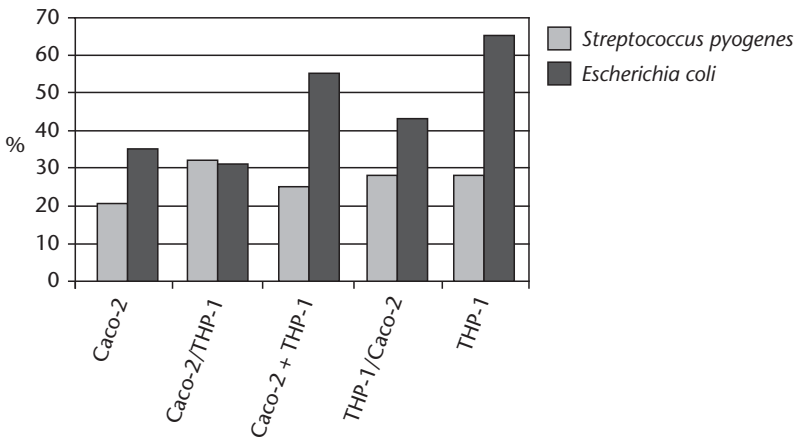
ortalama sırasıyla %24.4 ve %55.7 olarak tespit edilmiştir (Tablo I). Caco-2 hücrelerinin *S.pyogenes*'in uyarımı durumunda temas olmadan THP-1 hücrelerin çözünür faktörlerin etkisi altında göstermiş olduğu bakterisidal etkisi, tek başına gösterdiği bakterisidal etkisinden anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 1). Ayrıca Caco-2 hücrelerinin *E.coli* ile uyarımı sonucu Caco-2 ve THP-1'in birlikte göstermiş olduğu bakterisidal etkisi, hem Caco-2'nin tek başına hem de THP-1'in çözünür faktörlerinin etkisi altında göstermiş olduğu bakterisidal etkisine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 1).

1/1 efektör hücre/hedef hücre oranında THP-1 makrofaj hücrelerinin *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdelere bakıldığında; THP-1 makrofaj hücrelerinin tek başına *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı bakterisidal etkisi sırasıyla %27.7 ve %63.9, Caco-2 ile bir ayırıcıyla ayrılmış durumda iken Caco-2 hücrelerinin mikroorganizma uyarımı ile salınan çözünür faktörlerin THP-1'i etkilemesi durumunda sı-

Tablo I. Caco-2 Epitel Hücresi ve THP-1 Makrofaj Hücre Kültürlerinin Ayrı Ayrı, Birlikte ve Hücre Temasının Engellenmesi Durumunda *Streptococcus pyogenes* ve *Escherichia coli*'ye Karşı 5. Saatte Göstermiş Olduğu Bakterisidal Etki Yüzdeleri

	Caco-2		Caco-2/THP-1 Caco-2'nin etkisi		Caco-2 + THP-1		THP-1/Caco-2 THP-1'in etkisi		THP-1	
	Ort. ± SS	Ortanca	Ort. ± SS	Ortanca	Ort. ± SS	Ortanca	Ort. ± SS	Ortanca	Ort. ± SS	Ortanca
<i>Streptococcus pyogenes</i>	21.9 ± 5.2	20	31.8 ± 7.4	34.6	24.4 ± 7.5	24	27.5 ± 0.8	27.5	27.7 ± 8.3	29
<i>Escherichia coli</i>	36.2 ± 19.2	41	30.5 ± 2.7	30.8	55.7 ± 12.4	57	43.6 ± 11.8	43.0	63.9 ± 14.9	64.5

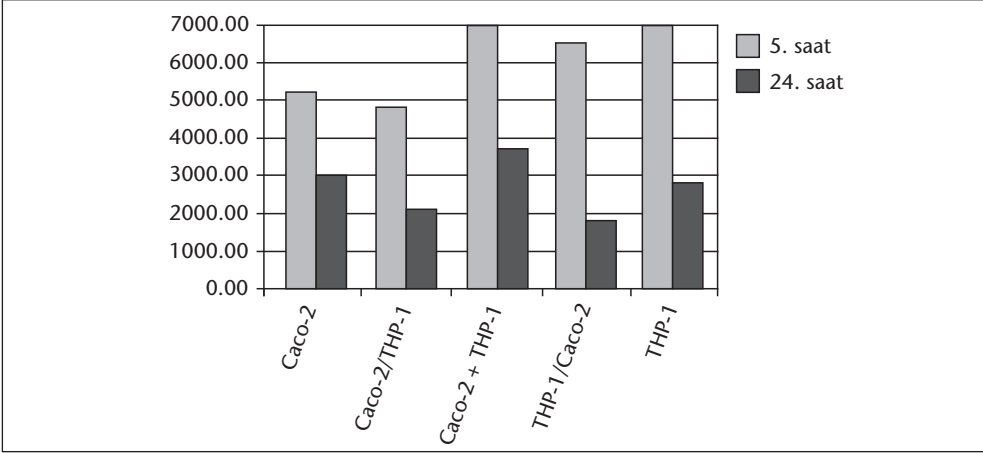
SS: Standart sapma, Ort: Ortalama.



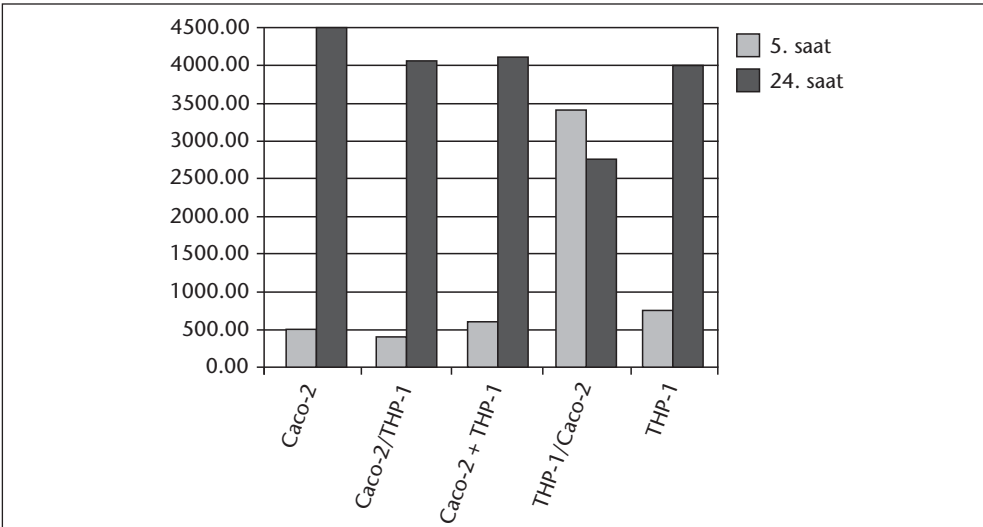
Şekil 1. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve hücre temasının engellenmesi durumunda *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri.

rasıyla %27.5 ve %43.6, Caco-2 ile hücre-hücre temasının gerçekleştiği durumda ortalama sırasıyla %24.4 ve %55.7 olarak tespit edilmiştir (Tablo I).

Hücrelerin 5. saatte göstermiş olduğu bakterisidal etki yüzdeleri antibakteriyel etkinlik açısından değerlendirildiğinde; *E.coli*'ye karşı saptanan etki *S.pyogenes*'e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Ayrıca, THP-1 makrofaj hücrelerinin *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı gösterdiği bakterisidal etki Caco-2 epitel hücrelerinin etkisinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 1).



Şekil 2. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve hücre temasının engellenmesi durumunda *S.pyogenes*'e karşı 5. ve 24. saatteki NO yanıtları (pM).



Şekil 3. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücre kültürlerinin ayrı ayrı, birlikte ve hücre temasının engellenmesi durumunda *E.coli*'ye karşı 5. ve 24. saatteki NO yanıtları (pM).

Bu çalışmada efektör hücreler (*S.pyogenes* ve *E.coli*) ile 1/1 oranında karşılaştırılan hedef hücrelerin (Caco-2 ve THP-1) NO üretimi, uyarım yapılmadan (kontrol) ve uyarım yapıldıktan sonra 5. ve 24. saatlerde değerlendirilmiş ve epitel hücrelerinin ve makrofajın NO üretimi, *S.pyogenes* ve *E.coli* ile uyarım öncesine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Caco-2 ve THP-1 hücrelerinin *S.pyogenes* ile uyarımın 5. saatinde 24. saatine göre, *E.coli* ile uyarımın 24. saatinde 5. saatine göre NO üretimleri anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 2,3). Caco-2 ve THP-1 hücrelerinin tek başına veya bir arada oluşturdukları NO miktarı istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 2,3).

TARTIŞMA

Doğal immün yanıt, enfeksiyonlara karşı erken savunmada ortaya çıkmakta ve edinisel immün yanıtın etkinleştirilmesinde rol almaktadır. Yapılan çalışmalarda, mukozal yüzeylerdeki doğal ve kazanılmış immün yanıtın düzenlenmesinde epitel hücrelerinin önemli rolü olduğu belirlenmiştir^{3,5}, bu hücrelerin hem antibakteriyel hem de antifungal etkinlik gösterdiği ve bu etkinin antijen dozuna bağlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir^{15-18,22}. Bizim çalışmamızda, Caco-2 epitel hücresi gibi THP-1 makrofaj hücrelerinin *S.pyogenes* ve *E.coli*'ye karşı bakterisidal etki gösterdiği saptanmış ve *E.coli*'ye karşı oluşan bakterisidal etkinin *S.pyogenes*'e karşı olan antibakteriyel etkiden anlamlı olarak daha yüksek olduğu izlenmiştir. Ayrıca, makrofaj hücrelerinin ve epitel hücresi-makrofaj teması sonucunda her iki hücrenin *E.coli*'ye karşı göstermiş olduğu bakterisidal etki belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur.

Hem makrofaj hem de epitel hücreleri tarafından oluşturulan NO'nun hücreler arası etkileşim sonucunda meydana geldiği ileri sürülmekte, ancak mekanizma tam olarak bilinmemektedir¹⁰. Bu çalışmada, epitel hücre ve makrofajın hücre-hücre teması ve çözünür faktörler ile etkileşimi sağlanmış ve Caco-2 epitel hücresi ile THP-1 makrofaj hücrelerinin NO üretimindeki değişimleri izlenmiştir. Çalışmamızda 5 ve 24 saatlik uyarım sonucunda Caco-2 hücresi ile THP-1 makrofaj hücrelerinin NO yanıtı, mikroorganizmalarla uyarılmamış hücrelere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 2). Ayrıca, hücre-hücre temasının gerçekleştiği durumlarda NO yanıtının arttığı gözlenmiştir. Farberman ve arkadaşlarının⁷ yaptıkları çalışmada, inaktif *E.coli* ile uyarılan tip II epitel hücrelerinden yayılabilir sinyallerin salındığı, bunların makrofaj aktivasyonunu yansıtan fagositozu ve hücrede morfolojik değişiklikleri başlattığı ve bunun da NO ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Alveoler makrofaj ve alveoler tip II epitel hücreleri arasındaki etkileşimin, temasın olduğu ve olmadığı durumlarda incelendiği bir çalışmada, temas ile NO üretiminin gerçekleştiği saptanmıştır²³. A549 epitel hücresi ile makrofaj hücrelerinin kokültürünün yapıldığı bir diğer çalışmada, epitel hücrelerinde sitotoksosite ve NO miktarı yüksek konsantrasyonlarda ölçülmüş, epitel hücrelerindeki sitotoksitenin LPS ile aktive edilen makrofajlarla temastan sonra meydana geldiği ve bu etkiden makrofaj tarafından salınan NO'nun sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır¹².

Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular, epitel hücresi ile makrofajın hücre-hücre temasının etkilerinin incelendiği benzer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur²⁴⁻³⁰. Diğer çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda da, temasın olduğu kokültürlerde bakterisidal etkinin ve NO yanıtının artmış olduğu, makrofaj yanıtında epitel hücresi ile temasın güçlendirici bir etki yaptığı, ayrıca bakterisidal etkide monosit/makrofaj hücre dizisinin epitel hücre dizisinden daha büyük rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Ancak epitel hücreleri stratejik konumlarından dolayı patojenlere karşı ilk yanıtı veren, aktivasyon faktörleri veya kofaktörler salarak ya da direkt hücre-hücre temasıyla makrofajları aktive edebilen ve doğal immün/inflamatuvar yanıtı katılımı sağlayan bir hücre olması açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızda ayrıca, makrofaj-epitel kokültürlerinde monokültürlere göre bakterisidal etkinin yükseldiği ve mikroorganizmalara karşı in vitro inflamatuvar yanıtın hücre-hücre teması ile arttığı da belirlenmiştir. Hücrelerin bakterisidal etkisi ve NO yanıtları; kullanılan bakteri suşlarına, kullanılan makrofaj/epitel hücre oranına, hücre kültürlerinin durumuna, hücre tiplerine, kullanılan efektör/hedef hücre değerine ve zamana bağlı olarak değişmektedir.

Günümüzde doğal immünite, immün sistemin en çok araştırılan konusunu oluşturmaktadır. Doğal immünitenin temel mekanizmasını oluşturan epitel hücresi ve makrofajın etkileşimi dışında diğer immün hücrelerin ve diğer çözünür faktörlerin de zaman ve doza bağlı değişen proinflamatuvar etkilerinin daha iyi anlaşılması, inflamasyon ile seyreden pek çok hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Mayer L. Mucosal immunity. *Pediatrics* 2003; 111: 1595-600.
2. Bodet C, Chandad F, Greiner D. Modulation of cytokine production by *Porphyromonas gingivalis* in a macrophage and epithelial cell co-culture model. *Microbes Infect* 2005; 7: 448-56.
3. Farberman MM, Hoffmann JW, Ryerse JS, deMello DE. Diffusible signal to murine alveolar macrophages from lipopolisaccaride and *Escherichia coli*-stimulated lung type II epithelial cells. *Inflamm Res* 2004; 53: 475-83.
4. Ganz T. Epithelia: not just physical barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3357-8.
5. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997; 100: 6-10.
6. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Innate immunity, pp: 1-20. In: Roitt's Essential Immunology. 2006, 11th ed. Blackwell Publishing, USA.
7. Farberman MM, deMello DE, Hoffmann JW, Ryerse JS. Morphologic changes in alveolar macrophages in response to UVEC-activated pulmonary type II epithelial cells. *Tissue Cell* 2005; 37: 213-22.
8. Mori A, Satsu H, Shimizu M. New model for studying the migration of immune cells into intestinal epithelial cell monolayers. *Cytotechnology* 2003; 43: 57-64.
9. Castranova V. Role of nitric oxide in the progression of pneumoconiosis. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69: 32-7.
10. Chandran S, Sridhar N, Veeranjanyulu A. Nitric oxide: concepts, current perspectives and future therapeutic implication. *Indian J Pharmacol* 1998; 30: 351-66.
11. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173: 17-26.
12. Hino M, Kohchi C, Nishizawa T, et al. Innate-immune therapy for lung carcinoma based on tissue-macrophage activation with lipopolysaccharide. *Anticancer Res* 2005; 25: 3747-54.
13. Mills PR, Davies RJ, Devalia JL. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 38-43.

14. Poljakovic M, Karpman D, Svanborg C, Persson K. Human renal epithelial cells express iNOS in response to cytokines but not bacteria. *Kidney Int* 2002; 61: 444-55.
15. Özenci H, Çelik Hİ, Tekeli FA, Aksoy AM. Comparison of growth inhibition effect of Caco-2 human epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils on various *Candida* species. *Turkish J Infect* 2001; 15: 527-32.
16. Albayrak N, Biriken D, Ozenci H. Bactericidal effects of human oral and urinary system epithelial cells against different *Escherichia coli* strains. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39: 161-7.
17. Albayrak N, Biriken D, Ozenci H. Investigation of the bactericidal effect of urinary epithelial cells against different doses of *Escherichia coli*. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40: 195-200.
18. Albayrak N, Biriken D, Ozenci H. Investigation of bactericidal effect and cytokine response of the oral epithelial cells against different antigenic doses of *Streptococcus pyogenes*. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40: 29-37.
19. Schwende H, Fitzke E, Ambis P, Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 555-61.
20. Guevara I, Iwanek J, Dembinska-Kiec A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reactions. *Clin Chim Acta* 1998; 274: 177-88.
21. Conover WJ. *Practical Nonparametric Statistics*, pp: 229-39. 1980, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
22. Steele C, Leigh JE, Swoboda RK, Fidel PL Jr. Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells. *J Infect Dis* 2000; 185: 1479-85.
23. Kanj RS, Kang JL, Castranova V. 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* 2006; 69: 1097-16.
24. Agace W, Hedges S, Andersson U, Andersson J, Ceska M, Svanborg C. Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1993; 61: 602-9.
25. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microbes Infect* 2006; 8: 27-35.
26. Hjort MR, Brenyo AJ, Finkelstein JN, et al. Alveolar epithelial cell-macrophage interactions affect oxygen-stimulated interleukin-8 release. *Inflammation* 2003; 27: 137-45.
27. Ishii H, Hayashi S, Hogg JC, et al. Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Respir Res* 2005; 6: 87.
28. Pechkovsky DV, Zissel G, Stamme C, et al. Human alveolar epithelial cells induce nitric oxide synthase-2 expression in alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2002; 19: 672-83.
29. Tao F, Kobzik L. Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 499-505.
30. Wottrich R, Diabate S, Krug HF. Biological effects of ultrafine of model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int J Hyg Environ Health* 2004; 207: 353-61.