

Staphylococcus aureus'un Makrofajlar Tarafından Fagositozu Üzerine Sigara Dumanı Ekstraktının Etkisi

Effect of Cigarette Smoke Extract on Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by Macrophages

Sibel AK¹, Serdar Abidin GÜRSES², Bekir Engin ESER³

¹ Zirve Üniversitesi EBN Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.

¹ Zirve University EBN School of Medicine, Department of Medical Microbiology, Gaziantep, Turkey.

² Zirve Üniversitesi EBN Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.

² Zirve University EBN School of Medicine, Department of Medical Biology, Gaziantep, Turkey.

³ Zirve Üniversitesi EBN Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gaziantep.

³ Zirve University EBN School of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Gaziantep, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 11.03.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.04.2016

ÖZ

Staphylococcus aureus, tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan önemli patojenlerden biridir. *S.aureus*'a bağlı enfeksiyonlara karşı ilk basamak savunmada makrofajlar tarafından fagositozu önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, sigara dumanının hem doğal hem de kazanılmış immün yanıt üzerine olumsuz etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı, sigara dumanı ekstraktının, makrofajların canlılığı ve *S.aureus*'u fagosite etme yeteneği üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Çalışmada, THP-1 hücre dizisi (insan lösemik monosit hücre kültürü) kullanılmış ve hücreler PMA (phorbol myristate acetate) ile makrofajlara dönüştürüldükten sonra, sigara dumanı ekstraktı (SDE)'nin %1, %5, %10, %25 ve %50 konsantrasyonlarına 2 ve 4 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Daha sonra propidium iyodür ile boyanan hücrelerin canlılıkları akım sitometri cihazı ile incelenmiştir. SDE'nin *S.aureus* fagositozuna etkisini incelemek için ise iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlardan birincisi olan klasik bakteriyolojik yöntemde; makrofajlar 2 saat süreyle beş farklı konsantrasyonda SDE'ye maruz bırakıldıktan sonra 100 MOI (multiplicity of infection) *S.aureus* ile enfekte edilmiştir. Bir saat inkübasyondan sonra makrofajlar PBS-%0.1 Triton X-100 ile patlatılıp seri dilüsyon yapılarak Luria-Bertani (LB) agara ekilmiş ve ertesi gün koloni oluşturan birimler (CFU) sayılarak fagosite edilen bakteri sayısı belirlenmiştir. Fagositozun tespitinde kullanılan ikinci yöntemde, SYBR® Green ile işaretli bakteriler kullanılarak akım sitometrisi ile analiz yapılmıştır. Bu yöntemde öncelikle, makrofajların enfekte olduklarını kontrol etmek için bakteriler SYBR® Green ile boyanmış ve enfeksiyon sonrası makrofajlar akım sitometri yöntemiyle incelenmiştir. SDE'nin fagositoza etkisini tespit etmek için, makrofajlar %10 ve %50 SDE'ye maruz bırakıldıktan

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Sibel Ak, Zirve Üniversitesi EBN Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kızılhisar Kampüsü 27260, Şahinbey, Gaziantep, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 342 211 6666, **E-posta (E-mail):** sibel.ak@zirve.edu.tr

sonra SYBR® Green ile işaretli bakterilerle enfekte edilip, hücre içine alınan bakteriler akım sitometri yöntemiyle medyan floresan yoğunluk ölçülerek analiz edilmiştir. Yüzde 25 ve %50 SDE konsantrasyonlarında 2 saatlik maruziyet sonrası makrofaj hücre ölümü oranı sırasıyla, %24 ve %30 iken, 4 saatlik maruziyet sonrası sırasıyla %38 ve %51 düzeyine çıktığı gözlenmiştir ($p < 0.001$). Yüzde 10 ve üzeri SDE konsantrasyonlarında 2 ve 4 saatlik maruziyetlerde hücre ölümünde ortalama 1.5 kat artış saptanmıştır ($p < 0.05$). SYBR® Green ile işaretli *S.aureus*'un kullanıldığı enfeksiyonlarda hücrelerin %99.8'inin enfekte edildiği gösterilmiştir. *S.aureus*'un makrofajlar tarafından fagositozunun %10 ve üzeri SDE konsantrasyonlarında azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.0001$). SYBR® Green ile işaretli *S.aureus* ile enfekte makrofajlarda SDE'nin %10 ve %50 olduğu durumlarda, fagosite edilen bakteri sayısını ifade eden hücre içindeki medyan floresan sinyalinin, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azaldığı izlenmiştir. Sonuç olarak bulgularımız, SDE'nin makrofajlarda, konsantrasyona ve süreye bağımlı olarak hücre canlılığını ve *S.aureus* fagositozunu azalttığını ortaya koymuştur. Ayrıca, fagosite edilen bakterilerin akım sitometri yöntemiyle analizinde, bakterilerin boyanması amacıyla SYBR® Green boyasının başarıyla kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; makrofaj; fagositoz; sigara dumanı; akım sitometri yöntemi; SYBR® Green.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the most important pathogen that causes community acquired and nosocomial infections worldwide. Phagocytosis by macrophages plays an important role in the first line defense against infections caused by *S.aureus*. On the other hand, the conducted studies have indicated that cigarette smoke has negative effects on both innate and acquired immune responses. The aim of this study was to investigate the effects of cigarette smoke on macrophage viability and their capacity of *S.aureus* phagocytosis. For this purpose THP-1 cell lines (human leukemic monocyte cell culture) were used and after the differentiation of the cells with PMA (phorbol myristate acetate) treatment, the macrophages were exposed to cigarette smoke extract (CSE) for 2- and 4-hours at concentrations of 1%, 5%, 10%, 25%, and 50%. Afterwards, the cells were stained with propidium iodide and the viability of the cells was analyzed by a flow cytometer. Two different methods were used to investigate the effect of CSE on the phagocytosis of *S.aureus*. The first one was the classical bacteriological method, in which macrophages were exposed to CSE for 2 hours in five different concentrations and were infected with 100 MOI (multiplicity of infection) *S.aureus*. After 1 hour of incubation, macrophages were lysed with PBS-0.1% Triton X-100 and plated on Luria-Bertani (LB) agar following serial dilutions. Newly formed colonies were counted and the number of bacteria phagocytosed were evaluated as colony forming units (CFU). The second method for the detection of phagocytosis was flow cytometric analysis in which SYBR® Green-labeled bacteria were used. To confirm that the macrophages were infected, bacteria were stained with SYBR® Green and macrophages were analyzed following infection via flow cytometry. Macrophages were exposed to 10% and 50% CSE and infected with bacteria stained with SYBR® Green. The level of phagocytosis was analyzed by flow cytometry in terms of median fluorescence intensity. Macrophage death rate was 24% and 30% following 2-hour exposure to 25% and 50% CSE, respectively, while 4-hour exposure increased death rate to 38% and 51%, respectively ($p < 0.001$). At 10% and higher concentrations of CSE, cell death increased with an average of 1.5-fold between 2- and 4-hour exposures ($p < 0.05$). Macrophages were successfully infected (99.8%) with SYBR® Green-stained *S.aureus*. Phagocytosis of *S.aureus* by macrophages decreased significantly upon exposure to 10% or more CSE concentrations ($p < 0.0001$). Median fluorescence intensity, which indicates phagocytosed bacterial cell number, decreased with no statistical significance when macrophages exposed to 10% and 50% CSE were infected with SYBR® Green-stained *S.aureus*. The results of this study revealed that, macrophage viability and phagocytosis of *S.aureus* were reduced depending on CSE concentration and time of exposure. In addition, it was shown that, SYBR® Green dye is a proper stain for the flow cytometric analysis of bacteria that were phagocytosed by macrophages.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; macrophage; phagocytosis; cigarette smoke; flow cytometry; SYBR® Green.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, toplum ve hastane kaynaklı pnömoni, yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit ve bakteriyemi gibi geniş yelpazede enfeksiyonlara neden olan yaygın gram-pozitif bakterilerden biridir¹. *S.aureus*'a bağlı hastalıklara karşı doğal bağışıklığın ilk basamağında profesyonel fagositik hücrelerden olan makrofajlar etkin role sahiptirler².

Sigara içenlerin içmeyenlere göre çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara önemli oranda daha fazla yatkın oldukları bilinmektedir³. Aktif içicilerin yanı sıra, sigara dumanına maruz kalan pasif içicilerde de immün sistem fonksiyonlarının etkilenmesi nedeniyle enfeksiyon hastalıklarına yakalanma riskinin yüksek olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur^{4,5}. Yapılan çalışmalarda sigaranın hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık üzerine etkileri olduğu belirlenmiştir. Hümmoral immünitenin esasını oluşturan immünoglobulin düzeylerinin, sigara içen kişilerde içmeyenlere oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir^{6,7}. Sigaranın, doğal öldürücü hücreleri azalttığı, tümör nekrozis faktör, interlökin (IL)-1 ve IL-8 gibi pro-inflamatuar sitokin ekspresyonunu önlediği ve makrofaj içerisinde nitrik oksit sentezini azalttığı tespit edilmiştir⁸⁻¹⁰. Buna karşın sigara dumanının, makrofaj hücre kültüründe *S.aureus* fagositozu üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada, stafilokok enfeksiyonlarına karşı immün yanıtın temel elemanlarından olan makrofajların fagositozu üzerine, sigara dumanının etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Hattı ve Bakteri Hazırlanması

Deneylerde hücre kültürü olarak THP-1 (insan lösemik monosit hücre kültürü) ATCC® TIB-202™ kullanıldı. Monosit hücrelerinin çoğaltılması ve makrofaj hücrelerine dönüşümü için Dao ve arkadaşlarının¹¹ uyguladıkları yöntem kullanıldı. Hücreler, %10 fetal dana serumu (FCS) (Gibco®), 100 µg/ml penisilin-streptomisin (Gibco®) ve %1 sodyum piruvat eklenmiş RPMI 1640 (Gibco®) besiyerinde çoğaltıldı. THP-1 hücrelerini makrofaja dönüştürmek için 6x10⁵/ml hücre 20 ng/ml PMA (Phorbol myristate acetate) ile birlikte 24 kuyucuklu plaklara ekilerek 20 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra deneylerde kullanıldı.

Makrofaj hücrelerinin enfeksiyonunda *S.aureus* ATCC 25923 kullanıldı. *S.aureus* suşu daha önce kullanılmış olan metotta küçük değişiklikler yapılarak hazırlandı¹². Kısaca, tek koloni bakteri bir gece öncesinden Luria-Bertani (LB) buyyonda sallayıcı inkübatörde 18 saat süresince 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün bakteriler tekrar pasajlanarak optik dansitesi 600 nm (OD₆₀₀) de ölçüldü. OD 1 değerindeki bakteri sayısı, seri dilüsyonlar sonucu plaklara ekilip ertesi gün sayılarak 1.8 x 10⁹ bakteri olarak hesaplandı.

Sigara Dumanı Ekstraktı (SDE) Hazırlanması

Sigara dumanı ekstraktı, 9 mg zifir, 0.7 mg nikotin, 10 mg karbon monoksit içeren ticari sigaradan daha önceden uygulanan metotta küçük modifikasyonlar yapılarak elde edildi¹³. Kısaca, SDE elde etmek için vakumlu pompa yardımı ile bir adet sigaranın dumanını 10 ml RPMI 1640 besiyeri içerisinde çözüldü. Hazırlanan SDE 0.45 µm (EMD Millipore™) filtreden geçirilerek sterilize edildi. Bu konsantrasyon %100 olarak kabul edilerek, elde edildikten sonra 30 dakika içinde kullanıldı.

Tablo 1. Sigara dumanı ekstraktı (SDE)'nin farklı konsantrasyonlarının makrofaj hücre canlılığına etkisinin 4. ve 24. saatlerde akım sitometrisi ile analizi

SDE konsantrasyonu (%)		0	1	2	5	10	25	50	75	100
Hücre ölümü (%)	4 saat	26	31	36	36	39	57	75	84	89
	24 saat	27	58	64	82	89	96	98	98	99

Konsantrasyon ve Süre Belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak SDE konsantrasyon ve maruziyet süresinin belirlenmesi için bir ön çalışma yapıldı. Bu amaçla, hazırlanan SDE %1, %5, %10, %25, %50, %75 ve %100 konsantrasyonlarda 4 ve 24 saat süre makrofajlara uygulandı. Bu farklı doz ve sürelerde uygulanan SDE'nin makrofaj canlılığına etkisi propidium iyodür (PI) kullanılarak akım sitometrisi ile analiz edildi. Dört ve 24 saat SDE'ye maruz bırakıldığında değerlendirilen tüm konsantrasyonlar için 4. ve 24. saatte hücre ölümü açısından %50 üzeri konsantrasyonlarda %75 üzerinde hücre ölümü gerçekleşmesi nedeniyle sonraki deneylerde %50 ve altındaki konsantrasyonlarda 2 ve 4 saat inkübasyon uygulandı (Tablo 1).

Akım Sitometrisi ile Hücre Canlılığı Analizi

Ön çalışma sonuçlarına dayanarak SDE maruziyet süresinin 2 ve 4 saat olmasına ve konsantrasyonların %1, %5, %10 ve %50 olarak uygulanmasına karar verildi. Belirlenen doz ve inkübasyon sonrasında hücreler iki kez PBS ile yıkanarak üzerlerine 5 mM PBS-EDTA'dan 500 µl eklendi. Beş dakika sonra toplanan makrofaj hücrelerinin canlılığının tespiti için 0.1 mg/ml PI eklenerek 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından BD Accuri C6 akım sitometri cihazı (BD Biosciences, ABD) ile FL2 kanalında en az 10.000 hücre incelendi. Veriler BD Accuri CFlow Software kullanılarak analiz edildi. PI pozitif hücreler ölü hücre olarak değerlendirildi.

Enfeksiyon Modeli

Hücre kültüründe *S.aureus* enfeksiyon modeli için, daha önceden uygulanmış olan model kısmi modifikasyonlarla uygulandı¹⁴. Makrofaj hücreleri %1, %5, %10 ve %50 konsantrasyonlarda SDE'ye 2 ve 4 saat maruz bırakıldı. Daha sonra hücreler iki kez PBS ile yıkanarak %5 insan serumu eklendi. Makrofajların enfeksiyonu için 100 MOI (multiplicity of infection) olmak üzere her bir kuyucuğa 6×10^7 koloni oluşturan ünite (CFU) *S.aureus* eklendi¹⁵.

Bakteri Fagositozunun Tespiti

Bu amaçla iki farklı yöntem kullanıldı.

a. Klasik Bakteriyolojik Yöntem

S.aureus ile enfekte edilen makrofajlar bir saat 37°C'de inkübe edildikten sonra, hücreler üç kez PBS ile yıkanarak hücre dışındaki bakteriler elimine edildi. Fagosit edilen bakteri sayısının belirlenmesi için PBS-%0.1 Triton X-100 ile makrofajlar patlatıldı. Makrofaj hücreleri içine alınan bakteri sayısını CFU olarak belirleyebilmek için patlatılan makrofaj

hücrelerinin seri dilüsyonu yapıldı ve LB agar plaklara ekilerek 37°C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün plaklarda koloni oluşturan birimler sayılarak fagosite edilen bakteri miktarı CFU olarak değerlendirildi.

b. Flow sitometri ile fagositoz analizi

Bu amaçla öncelikle *S.aureus* 30 dakika 10 µg/ml SYBR® Green boyası ile karanlıkta inkübe edilerek işaretlendi. SYBR® Green boyasının bakteri canlılığına etkisi, boyalı bakterilerin seri dilüsyonu sonucu LB agar plaklara ekilerek değerlendirildi. SYBR® Green boyasının bakteri canlılığına etki etmediği belirlendikten sonra, bu bakteriler ile yukarıda bahsedilen enfeksiyon deney düzeneği kullanılarak makrofajlar enfekte edildi. Makrofaj hücrelerinin fagositoz yetenekleri akım sitometri cihazı kullanılarak alınan floresan sinyali (Medyan floresan yoğunluk; MFI) ile ölçüldü.

İstatistiksel analiz

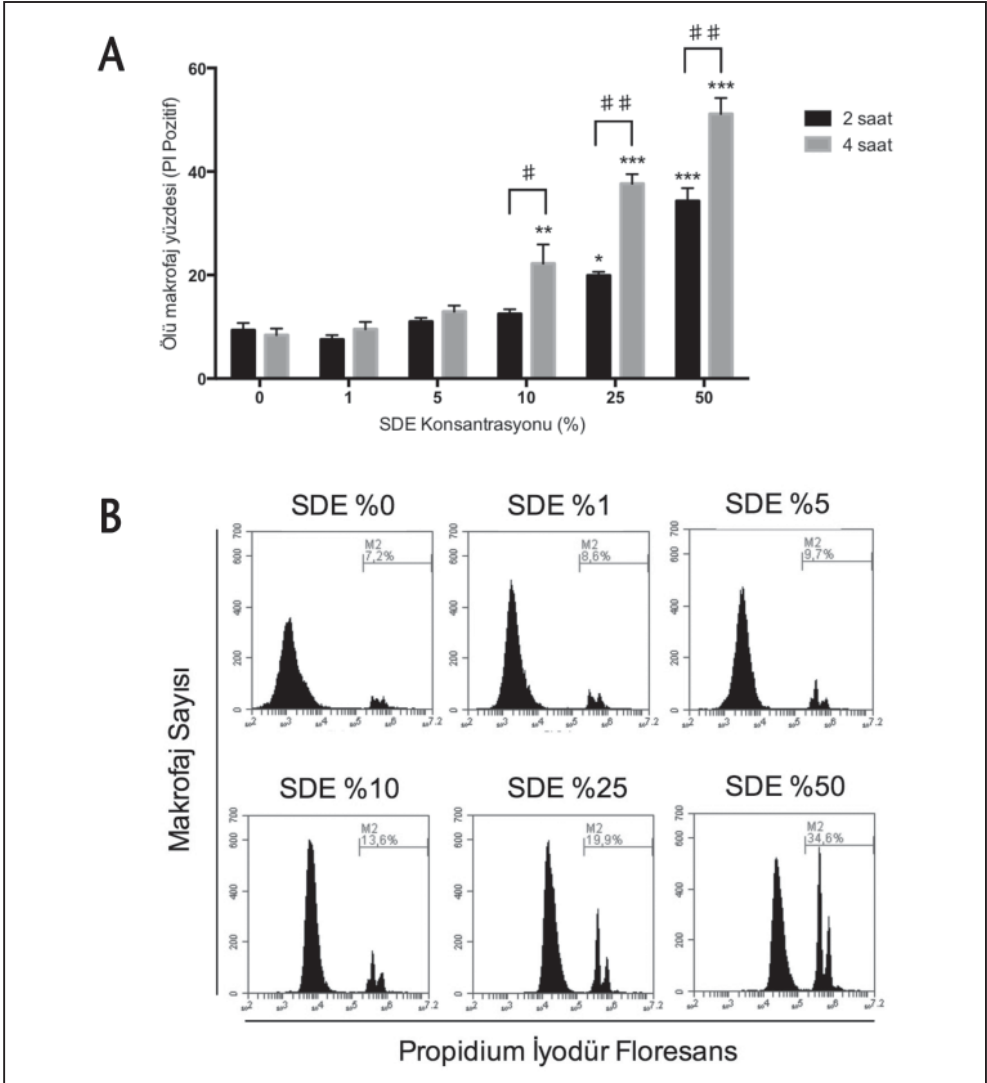
Tüm deneyler birbirinden bağımsız üç ayrı tekrar olarak çalışıldı. Verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism 7 (Graphpad Software, ABD) programı kullanıldı. Deney gruplarının karşılaştırılmasında One-way Anova testi uygulandı. Gruplar arası karşılaştırmada post-hoc test olarak Tukey testi yapıldı. Analiz sonucu $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, 2 saat SDE maruziyeti sonunda %25 konsantrasyonda kontrole göre hücre ölümünde artış belirlenmiştir ($p < 0.05$). Konsantrasyon %50'ye çıktığında kontrole göre ölüm oranı daha da artmıştır ($p < 0.01$). Bu bulgular, SDE'nin makrofaj ölümünü uyardığını göstermektedir (Şekil 1).

İki saat SDE maruziyetinde 0, %1, %5, %10, %25 ve %50 konsantrasyonlar için hücre ölüm oranları sırasıyla %9, %7.5, %11, %12, %20 ve %34 olarak tespit edilmiştir. Hücre ölüm oranları açısından, konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında; %25 SDE'de daha düşük konsantrasyonlara göre anlamlı artış belirlenmiş (%20; $p < 0.05$); %50 SDE'de ise kendinden düşük konsantrasyonlara göre artışın daha da belirgin olduğu görülmüştür (%34; $p < 0.01$). Dört saat SDE maruziyeti sonunda, %10 konsantrasyonda kontrole göre anlamlı hücre ölümü saptanmıştır ($p < 0.05$). Bu artış %25 ve 50'de daha da belirgin hale gelmiştir ($p < 0.01$). Dört saat maruziyette SDE %10, 25 ve 50 konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında, kendinden daha düşük konsantrasyonlara göre anlamlı artış tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Aynı konsantrasyonda 2 ve 4 saatlik SDE maruziyetleri karşılaştırıldığında %10 ve %25 ile %50 konsantrasyonlara maruziyet süresi arttıkça hücre ölümünde anlamlı artış bulunmuştur (sırasıyla, $p < 0.05$, $p < 0.01$).

SDE'nin, hücre ölümü olmaksızın hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla ilk olarak yapılan klasik bakteriyolojik yöntem için fagositoz deneyinde uygulanacak SDE süresi 2 saat olarak belirlenmiştir. Bu yöntemde fagosite edilen bakteri sayısı CFU olarak değerlendirildiğinde, SDE'ye 2 saat maruz kalan makrofajlarda, fagosite edilen bakteri sayısının doza bağımlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Fagosite edilen bakteri sayısının, kontrol hücrelerinde 6.5×10^7 iken, SDE %10, %25 ve %50'de sırasıyla 1×10^7 ,



Şekil 1. SDE'nin makrofaj hücre canlılığına etkisi. a) Farklı SDE konsantrasyonları ve maruziyet sürelerinin makrofaj canlılığına etkisi. b) 2 saat maruziyette hücre ölümü deneyinin akım sitometri grafiği [SDE: Sigara dumanı ekstraktı; M2: Ölü hücre oranı; *: $p < 0.05$ (aynı saatteki SDE %0 ile karşılaştırıldığında); **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; #: $p < 0.05$ (aynı konsantrasyon farklı saatlerde karşılaştırıldığında); ##: $p < 0.001$].

1.5×10^7 , 2×10^7 CFU değerlerine düştüğü gözlenmiştir ($p < 0.05$). Bu bulgular, SDE'ye maruz kalan makrofajlarda *S.aureus* fagositozunun etkilendiğini göstermektedir (Şekil 2).

Enfekte edilen makrofajların sayısını tespit edebilmek için, SYBR® Green floresan boyalı *S.aureus*'lar literatürde ilk defa bu çalışmada makrofajlar tarafından fagositozunda kullanılmıştır. SYBR® Green kullanılmadan *S.aureus* ile enfekte edilen makrofajlar dışarıda kalacak şekilde floresan ışık şiddetine göre kapılma (R2) yapılmıştır (Şekil 3a) Daha sonra SYBR® Green

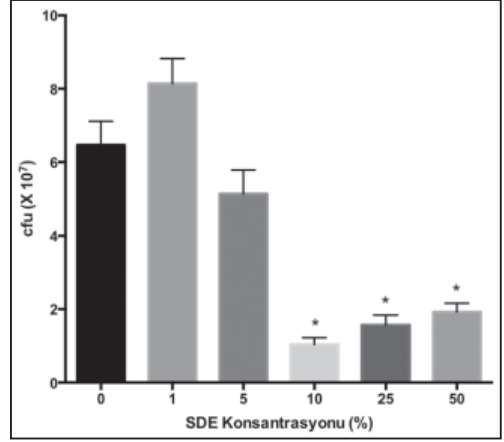
ile işaretli *S.aureus* ile enfekte makrofajlar ölçüldüğünde, makrofajların %99.8'inin kaplı alan içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3b). Bu veriler, SYBR® Green'in, makrofajların *S.aureus* fagositozunu göstermede kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

S.aureus fagositozunun tespitinde kullandığımız ikinci yöntemde, SYBR® Green ile işaretli bakterilerin hücre içine alınmasının akım sitometri yöntemiyle gösterilmesinin ardından, SDE'nin *S.aureus* fagositozuna etkisinin araştırılması için makrofajlara %10 ve %50 konsantrasyonlarda SDE, iki saat uygulanmıştır. Makrofajlarda akım sitometrisi ile elde edilen MFI'ların, %10 ve %50 konsantrasyonlarda SDE uygulanan hücrelerde, kontrole oranla sırasıyla %2 ve %49 azaldığı saptanmış ($p > 0.05$); ayrıca daha az sayıda bakteri fagosite eden makrofaj sayısının arttığı gözlenmiştir (Şekil 3c).

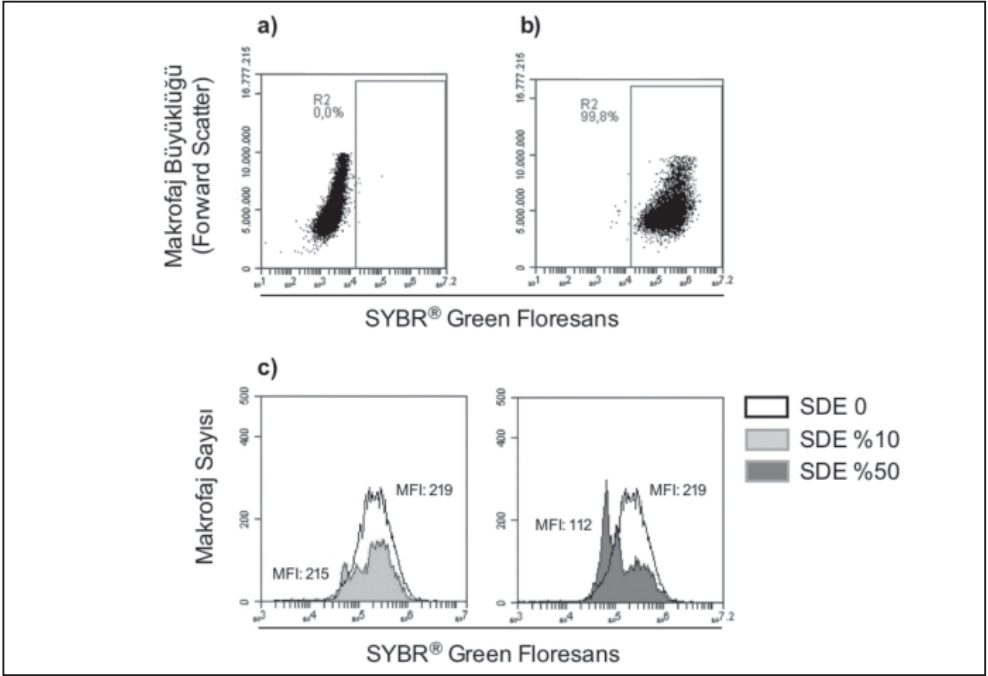
TARTIŞMA

Çalışmamızın verileri, sigara dumanı maruziyetinin, makrofajların canlılığını doz ve süre ile orantılı olarak azalttığını göstermiştir. Aynı sürede, artan dozlarda SDE'ye maruz bırakılan makrofajlarda, hücre ölümünün anlamlı oranda arttığı tespit edilmiş; benzer şekilde SDE konsantrasyonları sabit tutulup maruziyet süresi uzatıldığında da makrofaj ölümlerinin arttığı izlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, sigara dumanının, bakteriyel enfeksiyonlarda ilk basamak savunmada rol alan epitel hücresi, nötrofil ve keratinositler üzerine sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir^{10,16,17}. Yang ve arkadaşları¹⁸, SDE'nin makrofaj canlılığına etkisini inceledikleri çalışmada, hücre ölümünü tespit etmek için hücrelerden salınan LDH seviyesini ölçmüşlerdir. Bu araştırmacılar, LDH seviyesinin, %1 ve %2.5 SDE konsantrasyonlarında 24 saat süre ile maruziyette değişmediğini, %5 SDE konsantrasyonunda ise anlamlı oranda arttığını bildirmişlerdir. Bizim ön çalışmamızda da, SDE'ye 24 saat maruziyette %1 ve üzeri konsantrasyonlarda hücre ölümünde 2 kattan daha fazla artış, %25 ve üzeri konsantrasyonlarda ise hücrelerin tamamına yakınının öldüğü akım sitometri yöntemiyle tespit edilmiştir (Tablo I). Bu ön çalışma sonuçlarımıza dayanarak, 24 saat ve %50 üzeri konsantrasyonlara maruziyet ile hücrelerin %90'ından fazlasının ölmesi nedeniyle, uzun süre ve yüksek konsantrasyonlar devam eden çalışmalarda kullanılmamıştır.

İmmün yanıtta yer alan hücrelerin sayıca çokluğu kadar fonksiyonel olarak aktif olması da önemlidir. Sigaranın, immün sistem hücrelerine olan sitotoksik etkisinin yanı sıra hücre fonksiyonları üzerine de etkileri vardır. Phipps ve arkadaşları¹⁹, fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, sigara içirilen farelerde alveolar makrofaj sayısının içmeyenlere oranla



Şekil 2. Makrofaj hücrelerinde farklı sigara duman ekstrakta (SDE) konsantrasyonlarında *S.aureus* fagositozunun bakteriyolojik yöntemle; makrofajların patlatılarak hücre içine alınan bakterilerin seri dilüsyonu sonucu agar plaklara ekilmesi sonucu elde edilen koloni oluşturan birimlerin (cfu) sayılarak değerlendirilmesi (*: $p < 0.05$).



Şekil 3. Makrofajların *S.aureus*'u fagositozunun akım sitometri yöntemiyle analizi. a) *S.aureus* ile enfekte makrofajlar; b) SYBR[®] Green ile işaretli *S.aureus* ile enfekte makrofajlar; c) SDE'ye maruz bırakılmış makrofajların SYBR[®] Green ile işaretli *S.aureus*'u fagositozunun analizi (MFI: Medyan floresan yoğunluk x 10³).

6 kat arttığı halde pulmoner enfeksiyonlara direncin azaldığını göstermişlerdir. Makrofaj aktivasyonu belirteçlerinden biri olan fagositoz, bakterinin elimine edilmesinde doğal bağışıklığın önemli işlevlerinden biridir²⁰. Sigara dumanına maruz kalan makrofaj hücrelerinin, apoptotik nötrofil ve epitel hücrelerini fagosite edemedikleri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir^{13,21}. Ayrıca SDE'nin, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* gibi farklı bakterilerin fagositozuna etkisinin incelendiği çalışmalarda, fagositozun azaldığı belirlenmiş; bu bozulmanın lateks boncukların fagositozunda gerçekleşmediği, dolayısıyla fagositozdaki bozulmanın bakteriye özgül olduğu ortaya konulmuştur^{19,22}. Bizim çalışmamızda, makrofajların *S.aureus* fagositozunu araştırmak için farklı iki yöntem kullanılmıştır. Bunlardan ilki olan bakteriyolojik yöntem; fagositik hücrelerin patlatılıp, fagosite edilen bakterilerin agar plaklarına ekilmesi ve ertesi gün sayılması esasına dayanan klasik mikrobiyolojik yöntemdir²³. Bu yöntem, pahalı ekipmanlar gerektirmemesi nedeniyle her laboratuvarında uygulanabilmesine karşın, çok sayıda dilüsyon yapılması, agar plaklara ekim ve ertesi gün koloni sayımı ile uzun ve uğraştırıcı bir metottür. Çalışmamızda klasik mikrobiyolojik yöntemle baktığımızda, normal ortamdaki makrofaj hücrelerine enfeksiyon için ilave edilen *S.aureus*'ün %83'ü fagosite edilirken, sigara dumanına %10, %25 ve %50 konsantrasyonlarda maruz kalan hücrelerde fagositozun sırasıyla 6.2, 4.1 ve 3.4 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). İki saat uygulanan %10 SDE sonucu hücre ölümünde anlamlı artış olmamasına rağmen, fagositoz 6.2 kat azalmıştır ($p < 0.001$). Bu

durum, sigara dumanının makrofaj canlılığının etkilenmediği %10'luk konsantrasyonunun, makrofaj fonksiyonu üzerine olan direkt etkisi olarak yorumlanabilir.

Çalışmamızda kullandığımız ikinci yöntem, floresan ile işaretli bakteriler kullanılarak akım sitometrisi ile fagositoz esasına dayanmaktadır²³. Bu çalışmada, literatürde ilk defa SYBR® Green floresan ile işaretli *S.aureus* kullanarak akım sitometrisi ile makrofaj hücrelerinde fagositoz araştırılmıştır. Mikrobiyolojik yöntemde sadece hücre içinde canlı olan bakteriler tespit edilebilirken, akım sitometri yönteminde kullanılan SYBR® Green, DNA'ya bağlandığı için, hücre içine alınan canlı ve ölü tüm bakterileri tespit edebilmektedir. Pahalı bir ekipman gerektirmesine rağmen, uygulanma kolaylığı ve daha duyarlı sonuç vermesi açısından akım sitometrisi avantajlı bir yöntemdir²³. Makrofajların fagositoz yeteneğini ölçtüğümüz akım sitometri yönteminde, makrofajların %99.8'inin SYBR® Green ile işaretli *S.aureus* ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Ayrıca makrofajlar tarafından fagosite edilen bakteri sayısının, SDE'nin %10 ve %50 konsantrasyonlarında azaldığı; özellikle %50 konsantrasyonda daha az sayıda bakteri fagosite eden makrofaj sayısının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3). Klasik mikrobiyolojik yöntemde fagosite edildikten sonra ölen bakterileri tespit etme imkanı yok iken, akım sitometri yöntemi hem canlı hem de ölü bakteriyi fagosite edildikten sonra gösterebilmektedir. Bu durum çalışmamızda fagositozun tespitinde kullanılan iki yöntem arasındaki oransal farkı açıklamaktadır.

Sigaranın, bakteriyel enfeksiyonlara karşı duyarlılığı artırması, immün sistem hücreleri üzerindeki etkilerinin yanında, bakteriyel virülans faktörlerini artırmasına da bağlı olabilir. McEachern ve arkadaşları²⁴, SDE'ye maruz bırakılan metisiline dirençli *S.aureus*'un makrofajlar tarafından öldürülmeye 4 kat daha dirençli olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda, SDE'ye maruz bırakılan makrofajlar *S.aureus* tarafından enfekte edilmeden önce SDE'den yıkanarak uzaklaştırıldıkları için *S.aureus* SDE'den etkilenmemiştir. Dolayısıyla fagositozdaki azalma oranı, bakteri kaynaklı olmayıp makrofaj kaynaklıdır. Sonuç olarak çalışmamızda, sigara dumanına maruziyette, doğal bağışıklıkta rol alan etkin hücrelerden olan makrofajların canlılığının ve önemli enfeksiyon etkeni olan *S.aureus*'u fagosite etme yeteneklerinin zarar gördüğü belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu etkilerin altta yatan moleküler mekanizmalarının açıklığa kavuşturulabilmesi için ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Sancak B. *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance. Mikrobiyol Bul 2011; 45(3): 565-76.
2. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol 2005; 3(12): 948-58.
3. Bagaitkar J, Demuth DR, Scott DA. Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection. Tob Induc Dis 2008; 4:12.
4. Erdem E, Karakoç F. Sigara dumanı maruziyetinin prenatal ve erken çocukluk immün sistemi üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri J Allergy-Special Topics 2009; 2(2): 1-6.
5. Arvas A, Baş V, Gür E. Süt çocukluğu döneminde edilgen sigara içiminin alt solunum yolu enfeksiyonu gelişimine etkisi. Turk Pediatri Ars 2009; 44(1): 12-7.
6. Arcavi L, Benowitz NL. Cigarette smoking and infection. Arch Intern Med 2004; 164(20): 2206-16.
7. Deveci F, Furgut T, Akbulut H, Kırkıl G, Muz MH. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan ve sigara içen sağlıklı olgularda serum immünglobulin düzeyleri. Solunum Hastalıkları Derg 2002; 13(4): 246-55.

8. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, et al. Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139(1): 194-8.
9. Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE. Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of IL-1R-associated kinase, p38, and NF-kappaB in alveolar macrophages stimulated with TLR2 and TLR4 agonists. *J Immunol* 2007; 179(9): 6097-106.
10. Guzik K, Skret J, Smagur J, et al. Cigarette smoke-exposed neutrophils die unconventionally but are rapidly phagocytosed by macrophages. *Cell Death Dis* 2011; 2: e131.
11. Dao DN, Kremer L, Guérardel Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun* 2004; 72(4): 2067-74.
12. Chang YC, Yang CY, Sun RL, Cheng YF, Kao WC, Yang PC. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Sci Rep* 2013; 3: 1863.
13. Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(6): 748-55.
14. Guldaz N, Bayrakal V, Bahar IH. Evaluation of the relationship between microenvironment and biofilm and coagulase responses of *Staphylococcus aureus* strains under the effect of gentamicin. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 19-26.
15. Bouchard DS, Rault L, Berkova N, Le Loir Y, Even S. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(3): 877-85.
16. Kode A, Yang SR, Rahman I. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respir Res* 2006; 7:132.
17. Cervellati F, Muresan XM, Sticozzi C, et al. Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells. *Toxicol In Vitro* 2014; 28(5): 999-1005.
18. Yang SR, Chida AS, Bauter MR, et al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291(1): L46-57.
19. Phipps JC, Aronoff DM, Curtis JL, Goel D, O'Brien E, Mancuso P. Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2010; 78(3): 1214-20.
20. Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE. Antimicrobial mechanisms of macrophages and the immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 2015; 4(4): 826-68.
21. Noda N, Matsumoto K, Fukuyama S, et al. Cigarette smoke impairs phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages via inhibition of the histone deacetylase/Rac/CD9 pathways. *Int Immunol* 2013; 25(11): 643-50.
22. Martí-Lliteras P, Regueiro V, Morey P, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun* 2009; 77(10): 4232-42.
23. Hampton MB, Winterbourn CC. Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232(1-2): 15-22.
24. McEachern EK, Hwang JH, Sladewski KM, et al. Analysis of the effects of cigarette smoke on staphylococcal virulence phenotypes. *Infect Immun* 2015; 83(6): 2443-52.