

# Caco-2 İnsan Kolon Epidermal Adenokarsinom ve THP-1 İnsan Lösemi Monosit Hücre Dizilerinin Çeşitli Koşullarda *Toxoplasma gondii*'ye Karşı Sitokin Yanıtlarının ve İnsan Beta-defensin-3 Ekspresyon Değişikliklerinin Araştırılması\*

Investigation of Cytokine Responses and Variations in the Expression of Beta-defensin-3 of Caco-2 Human Colon Epidermal Adenocarcinoma and THP-1 Human Leukemia Monocyte Cell Lines in Response to *Toxoplasma gondii* Under Various Conditions

Gülay ARAL AKARSU<sup>1</sup>, Derya BİRİKEN<sup>2</sup>, Zeynep Ceren KARAHAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara.

<sup>1</sup> Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Division of Medical Parasitology, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

\* Bu çalışma, 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi (28 Eylül-4 Ekim 2013 Denizli)'nde sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 16.01.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 31.03.2017

## ÖZ

Mononükleer fagositer hücreler ve epitel hücreleri, doğal bağışıklığın başlatılması ve düzenlenmesinde etki gösteren hücrelerdir. Hem mekanik olarak hem de sitokin salınımı ile etkileşerek mukozal bağışık yanıtta etkin rol oynamaktadırlar. Bunun yanında defensinler, çeşitli hücrelerden salınarak ilk hat bağışık yanıtta etkili olduğu düşünülen mikrobisidal peptitlerdir. *Toxoplasma gondii*'ye karşı oluşan hücre salınımında IL-12 ve IL-10, sırasıyla pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar özellikleri ile konakta immünopatoloji oluşmadan enfeksiyonun kontrolünü sağlayan iki sitokindir. Bu çalışmada, Caco-2 (insan kolon epidermal adenokarsinom hücresi) ve THP-1 (insan lösemi monosit hücresi) hücre dizilerinin birlikte veya tek başlarına, canlı *T.gondii* takozoitleri ile doğrudan veya araya teması engelleyecek bir filtre konarak karşılaştırılması sonucunda, hücrelerden IL-12 ve IL-10 salınımında ve insan beta-defensin-3 (hBD-3) ekspresyonunda meydana gelebilecek değişikliklerin in vitro koşullarda gözlenmesi amaçlanmıştır. Deney kuyucuklarındaki hücrelere RH suşu takizoitlerinin eklenmesinden 24 saat sonra toplanan üst sıvılarda insan IL-12 ve IL-10 sitokinlerinin saptanması için ticari ELISA kiti (Invitrogen) üreticinin talimatları

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Gülay Aral Akarsu, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Dekanlık Binası Kat: 3 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye.  
Tel (Phone): +90 312 595 8123, E-posta (E-mail): gakarsu@yahoo.com

doğrultusunda kullanılmıştır. Deneylerden dört ve 24 saat sonra kuyucuklardan toplanan hücrelerde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kantitatif olarak hBD-3 ekspresyonu belirlenmiştir. Bu amaçla, öncelikle ticari kit (High pure RNA isolation kit, Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra yine ticari kit (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics, Almanya) ile komplementer DNA (c-DNA) elde edilmiştir. IL-12 tüm deney kuyucuklarında IL-10'dan daha fazla bulunmuştur. IL-12 salınımının, Caco-2 ve THP-1 hücre ko-kültürlerinin takizoitler ile enfekte edildiği kuyucuklarda, hücrelerin tek başlarına enfekte edildiği kuyucuklardan daha fazla olduğu gözlenmiştir. *T.gondii*'nin hücreler ile doğrudan temas ettiği veya temas etmeden inkübe edildiği kuyucuklar arasında fark olmadığı saptanmıştır. HBD-3 ekspresyonunun ölçüldüğü deneylerde ise, Caco-2 ve THP-1 hücreleri ko-kültür ortamında *T.gondii* ile enfekte edildiklerinde birbirleriyle etkileşmiş ve ayrı ayrı enfekte edildiklerinden daha fazla hBD-3 ekspresyonu göstermiştir. Bu çalışma, *T.gondii*'nin çeşitli antijenleri ile uyarılmış mononükleer hücre ve epitel hücrelerinin etkileşim içinde olduklarında, doğal bağışıklıkta rol oynayan IL-12 salınımının ve hBD-3 ekspresyonunun daha fazla olduğunu ortaya koymuştur.

**Anahtar sözcükler:** *Toxoplasma gondii*; defensin; THP-1; Caco-2; interlekin-10; interlekin-12.

## ABSTRACT

Mononuclear phagocytic cells and epithelial cells are effective during the initiation and regulation of the innate immune response. They have an active role in mucosal immune response both mechanically and by interaction with other cells with cytokine release. Defensins are microbicidal peptides that are expressed in various cells and are thought to be effective in the first line defense against pathogens. IL-12 and IL-10, showing proinflammatory and antiinflammatory activities, respectively, are actors of the cellular immunity and limit the infection of the host without causing immunopathology. The aim of this study was to observe the differences in the release of IL-12 and IL-10 and the expression of human beta-defensin-3 (hBD-3) in Caco-2 (human colon epidermal adenocarcinoma cell) and THP-1 (human leukemia monocytic cell) cell lines cultured alone or in co-culture, by the stimulation of *Toxoplasma gondii* tachyzoites either in direct contact with the cells or separated by an insert filter from the cells. Twenty-four hours after the addition of RH strain tachyzoites to the cells, the supernatants were collected from the experiment wells, and commercial ELISA kits (Invitrogen) were used according to the manufacturers instructions to measure IL-12 and IL-10 levels. HBD-3 expression of cells collected from the experiment wells after four and 24 hours were analyzed by using real time PCR. For this procedure, complementary c-DNA was obtained (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics, Germany) after the extraction of RNA with a commercial kit (High pure RNA isolation kit, Roche Diagnostics, Germany). IL-12 was higher than IL-10 in all experiment wells. IL-12 was induced more in the co-culture wells where Caco-2 and THP-1 cells were challenged together, than the wells in which the cells infected with *T.gondii* tachyzoites alone. No differences in respect to cytokine response were observed between the cells with which tachyzoites were in contact and the cells which were separated from the parasites with an insert. In hBD-3 experiments, Caco-2 and THP-1 cells interacted in co-culture wells when infected with tachyzoites and displayed a higher level of hBD-3 expression than the condition when they were infected alone. This study showed that, IL-12 release and hBD-3 expression, which play a role in innate immunity, are greater when various antigens of *T.gondii* interacted with stimulated mononuclear cell and epithelial cells.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; defensin; THP-1; Caco-2; interleukin-10; interleukin-12.

## GİRİŞ

Mononükleer fagositer hücreler, bağışıklığın önemli efektör hücreleridir. Epitel hücreleri ise patojenlere karşı fiziksel bir bariyer olmasının yanı sıra stratejik olarak hem patojenler hem de mononükleer hücrelerle temasta olacak şekilde konumlanmıştır. Bu nedenle, konak ve oral yolla alınan patojenler arasında bir arayüz rolü oynayan bağırsak epitel hücreleri ile makrofajların etkileşimi doğal bağışıklığı düzenleyerek mukozal homeostazı korumaktadır<sup>1</sup>. Bu hücreler doğal bağışıklığın başlatılması ve devamında

etkin role sahiptir. Bu fonksiyonlarında, polipeptit moleküller olan sitokinleri de kullanılmaktadırlar. Epitel hücreleri, sitokin salınımının yanı sıra inflamatuvar hücreler arasında bağlantı sağlayarak mukozal bağışık yanıtı aktif olarak katılmaktadır<sup>2</sup>.

IL-12 pro-inflamatuvar özellikte bir sitokin olup esas olarak mononükleer hücrelerden salgılanmaktadır. IL-10 ise hem pro-inflamatuvar sinyali baskılayan hem de bağırsak epitelinin bariyer fonksiyonunu devam ettiren antiinflamatuvar bir sitokindir<sup>3</sup>.

*Toxoplasma gondii*, hücre içi bir protozoon olarak pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarmakta ve güçlü bir hücreyel yanıtı yol açmaktadır. Tip 1 inflamatuvar sitokinler olan IFN- $\gamma$ , IL-12 ve TNF- $\alpha$  *T.gondii*'ye karşı bağışıklığın başlatılması ve düzenlenmesinde anahtar rolü oynamaktadır<sup>4,5</sup>. Protozoon, bir yandan da bu sitokinlerin salınımına neden olan sinyal yollarını inhibe etmektedir. Bu yanıtlar, hem parazitin yaşamını sürdürmesini sağlamakta hem de konakta fazladan inflamasyona bağlı immünopatolojiyi önlemektedir. Bu dengeli sistemde, karşılıklı olarak birbirlerini etkileyen pro-inflamatuvar sitokinlerden IL-12 ve bağışık yanıtı baskılayıcı sitokinlerden IL-10, doku hasarı ve ölümcül bir immünopatoloji olmadan enfeksiyonun kontrolünü sağlamada önemlidir<sup>6</sup>.

Defensinler 2-6 kDa'luk, katyonik, antimikrobiyal peptitler olup üç çift intramoleküler disülfid bağı içermektedir. İnsan defensinleri, alfa ve beta olmak üzere iki gruba ve her bir defensin grubu da kendi içinde numaralandırılarak alt gruplara ayrılmaktadır. İnsan genomu tarafından kodlanan defensinlerden olan beta-defensinlerin de konağın çeşitli hücreleri tarafından eksprese edilen antimikrobiyal peptitler olarak hem enfeksiyon etkenlerine karşı ilk hat savunmasında hem de kazanılmış bağışıklığa giden yolda önemli rollere sahip olduğu düşünülmektedir<sup>7</sup>.

Çalışmamızda, Caco-2 (insan kolon epidermal adenokarsinom hücresi) ve THP-1 (insan lösemi monosit hücresi) hücre dizilerinin birlikte veya tek başlarına, canlı *T.gondii* takizoitleri ile doğrudan veya araya teması engelleyecek bir filtre konarak karşılaştırılması sonucunda, hücrelerden IL-12 ve IL-10 salınımında ve insan beta-defensin-3 (hBD-3) ekspresyonunda meydana gelebilecek değişikliklerin in vitro koşullarda gözlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Caco-2 (DSMZ (Avrupa Kültür Koleksiyonu Organizasyonu, Almanya Kültür Koleksiyonu); ACC169) ve THP-1 (DSMZ; ACC-16), 25 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip hücre kültürü şişelerinde üretildi. Hücreler %10 oranında ısı ile inaktive edilmiş fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamin, penisilin (100 IU/ml) ve streptomisin (100 µg/ml) içeren RPMI 1640 besiyeri kullanılarak, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'de inkübe edildi. Tek tabaka halinde üreyen Caco-2 hücreleri, 5 x 10<sup>5</sup>/ml sayıda ve %95'in üzerinde canlı hücre içerecek şekilde %10 FCS ile desteklenmiş RPMI 1640 besiyeri ile sulandırıldı. THP-1 hücresi aderan olmayan hücre olduğundan süspansiyon halinde üretildi. Deneyler için bu iki hücre 24 kuyucuklu plaklara; yalnız Caco-2, yalnız THP-1 veya ikisi bir arada olacak şekilde ilave edildi<sup>1</sup>. Aderan hücre olan Caco-2 hücre dizisi, deneyden bir gece önce deney kuyucuklarına konarak tek tabaka kaplaması beklendi. Aderan olmayan THP-1 hücre dizisi ise üç günlük inkübasyonun ardından, üretildiği hücre kültürü şişesinden deney kuyucuklarına aktarıldı. İki hücrenin beraber kullanıldığı ko-kültür deney kuyucuklarında ise, tek tabaka oluşturan

Caco-2 ( $5 \times 10^5$  hücre/ml) hücrelerinin üstüne aderan olmayan THP-1 hücreleri ( $5 \times 10^5$  hücre/ml) 1:1 oranında dağıtıldı.

Virulan *Toxoplasma* suşlarına ait antijenlerin efektör hücrelerden daha fazla sitokin salınımına neden olması nedeniyle deneylerde virulan RH suşuna ait takizoitler kullanıldı<sup>8,9</sup>. Canlı takizoitler, deneylerden üç gün önce intraperitoneal olarak inoküle edilen Swiss albino farelerin periton sıvısından elde edildi. Enfekte edilen farelerin periton boşluğu 5 ml steril serum fizyolojik kullanılarak yıkandıktan sonra alınan periton sıvısı  $1000 \times g'$ de 10 dakika santrifüj edildi. Trypan mavisini ile canlılık tayini yapıldıktan sonra, deneylerde %95'in üstünde canlı olan takizoitler kullanıldı<sup>10</sup>. Hücreler, 24 kuyucuklu hücre kültürü plağında, ayrı ayrı ve beraberken 1:1 hücre:takizoit oranı sağlanacak şekilde *T.gondii* ile karşılaştırıldı. Hücre içeren kuyucuklara canlı takizoitler eklenirken, yapılacak deneyin türüne göre, ya doğrudan kuyucuğa ya da kuyucuk içine konan ve hücrelerle protozoonu ayırmaya yarayan bir filtrenin (Thincert W. Pet-membrane, 0.4  $\mu$ m; Greiner, Almanya) üstüne konuldu. *T.gondii*'nin değişik moleküllerinin doğal bağışık yanıtı uyarımadaki farklı rolleri göz önüne alınarak; hücreler ile takizoitler arasına teması kesecek ancak çözünür faktörlerin geçişine izin verecek bu filtrelili aparat kondu ve *T.gondii*'nin salgısal antijenlerinin de sitokin uyarımındaki rolü araştırıldı<sup>11</sup>.

Deney kuyucuklarına takizoitlerin eklenmesinden 24 saat sonra toplanan üst sıvılarda insan IL-12 ve IL-10 sitokinlerinin saptanması için ticari ELISA kitleri (Invitrogen) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanıldı. Absorbans değerleri spektrofotometrik olarak 450 nm'de belirlendi ve protein seviyeleri pikogram/ml cinsinden hesaplandı.

HBD-3 ekspresyonunu saptamak amacı ile 4 ve 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardaki hücreler toplandı ve öncelikle ticari kit (High pure RNA isolation kit, Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak, üreticinin önerileri doğrultusunda RT-PCR için RNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra ticari kit (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics, Almanya) ile komplementer DNA (c-DNA) elde edildi. Kantitatif hBD-3 ekspresyonu, Tablo I'de belirtilen primer ve prob setleri kullanılarak, gerçek zamanlı (real time-RT) PCR ve LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics, Almanya) ile analiz edildi. RT-PCR için, yaklaşık 5  $\mu$ l cDNA örneği, LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HYBProbe (Roche Diagnostics, Almanya) kiti içeriğinde bulunan 4  $\mu$ l "master mix", 0.5  $\mu$ M her bir primer ve 0.3  $\mu$ M her bir probdan içerecek şekilde 20  $\mu$ l toplam hacim içerisinde şablon olarak kullanıldı. Karışımlar kapiller tüplere yüklendikten sonra LightCycler 1.5 cihazında (Roche Diagnostics, Almanya) 95 C°'de 10 dakika ilk denatürasyonu takiben 50 döngü boyunca 95 C°'de 15 sn denatürasyon, 54 C°'de 15 sn primer birleşmesi ve

**Tablo I.** Kantitatif RT-PCR'de Kullanılan Primer ve Problar

Gen	Primer/Prob	Dizi (5'-3')
HBD3	DEFB103A F	TGT TTG CTT TGC TCT TCC TG
	DEFB103A R	CTT TCT TCG GCA GCA TTT TC
	DEFB103A FL	AGC TGA GCA CAG CAC ACC G-FL
	DEFB103A LC	640-CCG CCT CTG ACT CTG CAA TAA TAT TTC T p

72 C°'de 15 sn uzama uygulandı. Program sonunda tek döngü 40 C°'de 30 sn soğutma işlemi uygulandı. Her çalışmanın sonunda erime eğrisi analizi uygulanarak spesifik transkriptlerin amplifikasyonu gözlemlendi. HBD3 transkript miktarları, housekeeping gen standartlarına göre ölçülen (LightCycler h-G6PDH Housekeeping Gene Set-Roche Diagnostics, Almanya) referans glukoz-6 fosfat dehidrogenaz (G6PDH) gen transkriptleri ölçüt alınarak (hedef kopya sayısı/G6PDH kopya sayısı) normalize edildi.

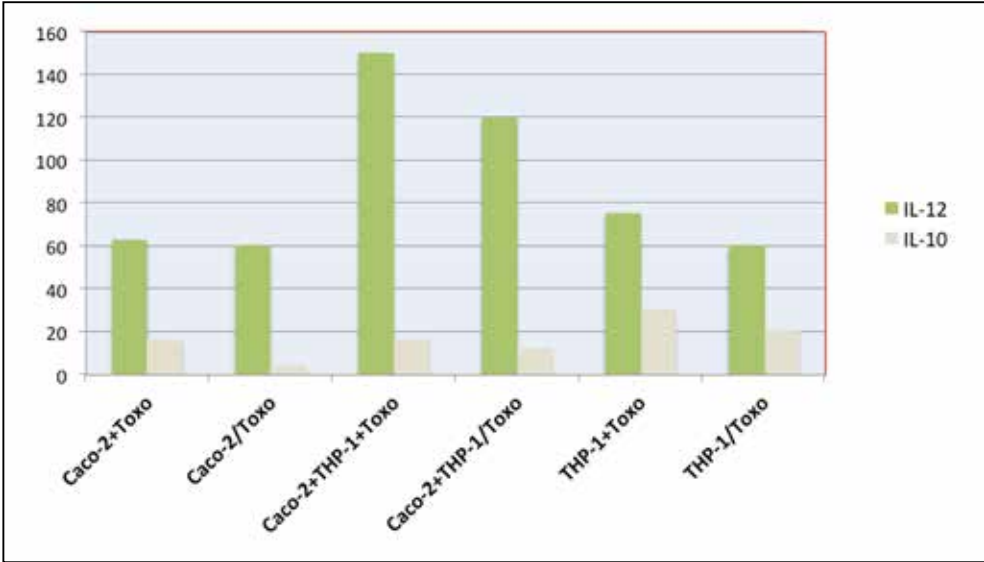
Bulgular, enfekte edilmemiş hücre kontrol kuyucuklarındaki ekspresyon miktarları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

### İstatistiksel Analiz

Bulgular, her koşul için yapılan üç adet bağımsız deneye ait verilerin ortalamaları ± standart sapmaları hesaplanarak değerlendirildi. Veriler, Student's t-test kullanılarak karşılaştırıldı ve istatistiksel anlamlılık sınırı olarak  $p \leq 0.05$  kabul edildi.

### BULGULAR

Caco-2 ve THP-1 hücre dizilerinin ayrı ayrı veya beraberken *T.gondii* ile doğrudan veya temas engellenerek inkübe edilmelerinin 24. saatinde alınan kültür üst sıvılarında ELISA ile saptanan IL-12 ve IL-10 düzeyleri (pg/ml), Şekil 1'de gösterilmiştir. IL-12 tüm deney kuyucuklarında IL-10'dan daha fazla bulunmuştur. IL-12 salınımının, Caco-2 ve THP-1 hücre ko-kültürlerinin takizoitler ile enfekte edildiği kuyucuklarda, hücrelerin tek başlarına enfekte edildiği kuyucuklardan daha fazla olduğu gözlemlenmiştir ( $p < 0.05$ ). *T.gondii*'nin hücreler ile doğrudan temas ettiği veya temas etmeden inkübe edildiği kuyucuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı saptanmıştır ( $p = 0.122$ ).



Şekil 1. Caco-2 ve THP-1 hücre dizilerinin ayrı ayrı veya beraber olacak şekilde *T.gondii* ile doğrudan veya temas engellenerek inkübe edilmelerinin 24. saatinde alınan kültür üst sıvılarında ELISA ile saptanan IL-12 ve IL-10 düzeyleri (pg/ml).

HBD-3 ekspresyonunun ölçüldüğü deneylerde ise, Caco-2 ve THP-1 hücreleri ko-kültür ortamında *T.gondii* ile enfekte edildiklerinde birbirleriyle etkileşmekte ve ayrı ayrı enfekte edildiklerinden daha fazla hBD-3 ekspresyon artışı göstermektedir ( $p < 0.05$ ). HBD-3 ekspresyonu, *T.gondii* ile teması kesilerek inkübe edilen ko-kültürde, doğrudan enfekte edilen ko-kültürden daha fazla artış göstermiştir. *T.gondii*'nin özellikle salgısal antijenlerinin enfeksiyon sonrasında erken dönemde hBD-3 ekspresyonunu uyarmasının öncelikli olarak Caco-2 hücresi kaynaklı olarak meydana geldiği görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Caco-2 hücreleri filtre ile *T.gondii*'den ayrıldığında hBD-3 ekspresyonunda kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında dört kat artış saptanırken, THP-1 hücreleri takizoitler ile direkt temas halinde iken hBD-3 ekspresyonu iki kat artmıştır. Enfeksiyondan 4 ve 24 saat sonra eksprese edilen ve normalize edilerek hesaplanmış hBD-3 transkript değerleri Tablo II'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Bağırsak epitel hücreleri *T.gondii* ile ilk karşılaşan hücreler olarak oral yolla alınan patojenin enfeksiyonunu önlemek, en azından parazit yayılımını sınırlandırmak için meydana gelen doğal bağışıklığın başlaması ve devamından sorumludur. Mononükleer hücreler de epitel hücreleri ile birlikte doğal bağışıklığa hücreler arası iletişim ve inflamatuvar mediatörlerin salınımı yoluyla katkıda bulunmaktadır. Sitokin ağı, makrofaj, epitel hücresi ve diğer bağışıklık hücreleri arasında çok yönlü iletişimi sağlamaktadır<sup>12</sup>. IL-12'nin de içerisinde bulunduğu IL-12 sitokin ailesi *T.gondii*'ye karşı hücre aracılı bağışık yanıtın başlatılması ve düzenlenmesinde pivot rolü oynamakta ve IL-12 de yardımcı T hücre cevabının önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir<sup>13</sup>. IL-10 ise antiinflamatuvar bir sitokin olarak bağışık yanıtın konağa zarar vermeyecek şekilde düzenlenmesini sağlamaktadır.

*Toxoplasma* için giriş kapısı olan enterik mukozada yer alan epitel hücrelerine giren protozoonlar kısa sürede takizoitlere dönüşmekte ve vücuda yayılmaya çalışmaktadır. Bağışık yanıtta rol alan çok çeşitli mekanizmalar içerisinde defansinlerin de doğal ve kaza-

**Tablo II.** Enfeksiyondan 4 ve 24 Saat Sonra Eksprese Edilen ve Normalize Edilerek Hesaplanmış hBD-3 Transkript Değerleri

	HBD-3 (4. saat)	HBD-3 (24. saat)
Caco-2	0.005	0.003
Caco-2 + T. g	0.006	0.004
Caco-2/T. g	0.020	0.006
THP-1	0.003	0.011
THP-1 + T.g	0.007	0.001
THP-1/T.g	0.003	0.003
Caco-2 + THP-1	0.001	0.005
Caco-2 + THP-1 + T.g	0.017	0.037
Caco-2 + THP-1/T.g	0.021	0.043

nılmış bağışıklık arasındaki arayüzde önemli bir rolleri olduğu düşünülmektedir. Bu küçük peptitler; insanda epitel hücreleri, mononükleer fagositer hücreler, nötrofiller tarafından yapısal olarak ve/veya mikrobiyal ürünlere ya da sitokinlere yanıt olarak üretilmektedir<sup>14</sup>. Çeşitli insan hücrelerinin bakteriler ile uyarımı sonucu defensin ekspresyonlarındaki değişiklikler ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, parazitler ve defensin ilişkisi üzerine yapılmış çalışma sayısı sınırlıdır. *Cryptosporidium parvum* ile yapılan bir çalışmada, enterik beta-defensinlerin bazı alt gruplarının bu parazit ile uyarıldığı ortaya konmuştur<sup>15</sup>. *Acanthamoeba castellanii*'nin korneal epitel hücresi ve ülser kazıntı örneklerinde hBD2 ve hBD3 ekspresyonunu uyardığı saptanmıştır<sup>16</sup>. HBD3 ile ilgili son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise, bu defensinin çeşitli bakterilerin uyarımı ile epitel hücrelerinden üretildiği ve salındığı bildirilmiştir<sup>17</sup>. HBD3'ün mononükleer fagositer hücreler üzerinden bağışık yanıtı düzenleme mekanizmaları üzerinde çalışılmaktadır<sup>18</sup>.

Çalışmamızda, daha önceden uyarılmamış monosit ve bağırsak epitel hücrelerinin ikisinden de *T.gondii* takizoitleri ile ilk karşılaşması sırasında sitokin salınımı saptanmıştır. Bu hücrelerin takizoitler ile temas etmeleri ve filtre ile temas engellenerek aynı besiyeri içine konmaları durumları arasında sitokin salınımı açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p= 0.122$ ). IL-12 salınımı ise IL-10 salınımından daha erken başlamış ve daha fazla miktarda olmuştur ( $p< 0.05$ ). Çalışmamızda daha önceden uyarılmış hücrelerle yapılan çalışmalarda saptanan sitokin miktarlarından daha düşük miktarlarda sitokin ölçülmüştür. Bu bulgular Aldebert ve arkadaşlarının<sup>3</sup> bulguları ile uyumludur. Bu araştırmacılar monositlerin canlı takizoitler, takizoitlerin ekskretuar-sekretuar antijenleri ve total takizoit lizatı ile uyarımı arasında sitokin cevabı açısından bir fark olmadığını ve IL-12 yanıtının ölü takizoitlerle hücrenin uyarımından daha fazla olduğunu bildirmiştir<sup>3</sup>.

Çalışmamızdaki efektör hücreler olan Caco-2 ve THP-1 hücrelerinin yalnız veya ko-kültür ortamında mikroorganizmalara verdiği yanıtı inceleyen bir araştırmada, bu iki hücrenin beraber bulunduğu durumlarda, tek başlarına ortaya koyduklarından daha fazla bakterisidal etki ve NO yanıtı görüldüğü bildirilmiştir<sup>1</sup>. Çalışmamızda da bu iki hücrenin iletişim içinde bulunmasının hem sitokin salınımı hem de defensin ekspresyonuna olumlu yönde etki ettiği gözlenmiştir ( $p< 0.05$ ).

İnsan hücreleri ile yapılan çalışmalarda, daha fazla çalışılan fare deneylerinden farklı sonuçlar çıkabilmektedir<sup>19</sup>. Örneğin çalışmamızda düşük bir yanıt olarak gözlenen IL-10 uyarımı farelerde daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır<sup>5</sup>. Ayrıca çalışmamızda 24 saatten daha uzun bir inkübasyon yapılmamasında IL-10 düzeylerinde meydana gelebilecek bir yükselmeyi saptayamamış olmamızı açıklayabileceği düşünülmüştür. IL-12 ve IL-10'un *T.gondii* ile enfekte bağışıklık hücrelerinde birbirlerine zıt etki gösterdikleri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda da IL-10'un inflamasyonu dengeleyici etkisi nedeni ile daha geç salınabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, her iki hücrenin de *T.gondii*'ye karşı sitokin yanıtının olduğu, IL-12 yanıtının IL-10'dan daha fazla olduğu, IL-12'nin iki hücre beraber olduğunda daha fazla salındığı, 24. saatte sitokin salınımının arttığı, filtre ile hücre takizoit temasının kesildiği kuyucuklarda da uyarımın bulunduğu ve anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir.

Literatürde *Toxoplasma* ve defensinlerle ilgili yapılan az sayıda çalışma arasında Morampudi ve arkadaşlarının<sup>20</sup> çalışmasında, *T.gondii*'nin hBD-2 ekspresyonunun modülasyonu ile bağışık yanıtı değiştirebileceği öne sürülmüştür. Bağırsak epitel hücrelerinin çeşitli *T.gondii* genotipleri tarafından uyarılması sonucu defensin türlerinde meydana gelen değişiklikler araştırılmış ve hBD-1 ve hBD-3'ten ziyade hBD-2'nin eksprese olduğu ve erken dönemde *T.gondii* tarafından baskılandığı bildirilmiştir<sup>20</sup>. Bu bulgu da *T.gondii*'nin defensin baskılamasını bir kaçış mekanizması olarak kullanabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, Tanaka ve arkadaşlarının<sup>21</sup> 2010 yılında ilk kez insan alfa-defensin-5'in *T.gondii*'nin agregasyonuna ve ölümüne yol açtığını göstermesinin ardından, protozoon DNA'sı ile uyarılan bağırsak epitel hücrelerinde parazit invazyonuna gerek kalmadan alfa-defensin-5 uyarımı ile *T.gondii*'ye karşı bağışık yanıtın başlatılabildiği de gösterilmiştir<sup>21,22</sup>. Bizimse ilk bulgularımız, *T.gondii* uyarımının bağırsak epitel hücreleri ve monositlerde hBD-3 ekspresyonunda az da olsa bir artışa neden olduğunu göstermektedir. Ko-kültürlerde daha fazla ekspresyonun saptanması ise defensin ekspresyonunun patojen dışında sitokinlerden de pozitif yönde etkilenebileceğini göstermektedir. Çalışmalarımızın bulgularına göre, sitokin salınımı da en fazla ko-kültür ortamında saptanmıştır.

Epitel hücrelerinde çeşitli patojenlerin defensin ekspresyonuna etkisi konusunda daha fazla çalışma olmakla birlikte mononükleer fagositer hücrelerde defensin ekspresyonu konusundaki az sayıda çalışma, bu durumun hücre tipine ve patojene göre değiştiğini göstermektedir<sup>7</sup>. Çalışmamız bilgilerimize göre, *T.gondii*'nin, interlökin salınımı ve defensin ekspresyonu üzerine etkisinin beraber ve çoklu hücre etkileşiminde incelendiği ilk çalışmadır. Gelecekte bu yöntemle yapılacak araştırmalar, hem hücrelerin etkileşimi hem de doğal bağışık yanıtın bileşenleri konusunda daha aydınlatıcı olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Salin DB, Albayrak N, Yıldız S, Özenci H. Caco-2 epitel hücresi ve THP-1 makrofaj hücrelerinin *Streptococcus pyogenes* ve *Escherichia coli*'ye karşı bakterisidal etki ve nitrik oksit yanıtlarının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2009; 43(3): 373-81.
2. Hyun J, Romero L, Riveron R, et al. Human intestinal epithelial cells express interleukin-10 through toll-like receptor 4-mediated epithelial-macrophage crosstalk. J Innate Immun 2015; 7(1): 87-101.
3. Aldebert D, Durand F, Mercier C, Brenier-Pinchart MP, Cesbron-Delauw MF, Pelloux H. *Toxoplasma gondii* triggers secretion of interleukin-12 but low level of interleukin-10 from the THP-1 human monocytic cell line. Cytokine 2007; 37(3): 206-11.
4. Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, et al. Mice with a selective impairment of IFN- $\gamma$  signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN- $\gamma$ -activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. J Immunol 2010; 184(2): 877-85.
5. Dogruman-Al F, Fidan I, Celebi B, et al. Cytokine profile in murine toxoplasmosis. Asian Pacific J Trop Med 2011; 4(1): 16-9.
6. Iqbal J, Al-Awadhi M. Toxoplasmosis: role of cytokines in disease modulation and tissue pathology. Annals Clin Pathol 2016; 4(7): 1090-5.
7. Wassing GM, Bergman P, Lindborn L, van der Does AM. Complexity of antimicrobial peptide regulation during pathogen-host interactions. Int J Antimicrob Agents 2015; 45(5): 447-54.
8. Rodgers L, Wang X, Wen X, Dunford B, Miller R, Suzuki Y. Strains of *Toxoplasma gondii* used for tachyzoite antigens to stimulate spleen cells of infected mice in vitro affect cytokine responses of the cells in the culture. Parasitol Res 2005; 97(4): 332-5.
9. Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. J Immunol 2004; 172(6): 3686-94.



10. Belloni A, Villena I, Gomez JE, et al. Regulation of tumor necrosis factor alpha and its specific receptors during *Toxoplasma gondii* infection in human monocytic cells. *Parasitol Res* 2003; 89(3): 207-13.
11. Pollard AM, Knoll LJ, Mordue DG. The role of specific *Toxoplasma gondii* molecules in manipulation of innate immunity. *Trends Parasitol* 2009; 25(11): 491-4.
12. Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 2009; 39(1): 23-39.
13. Quan JH, Chu JQ, Kwon J, et al. Intracellular Networks of the PI3K/AKT and MAPK Pathways for Regulating *Toxoplasma gondii*-Induced IL-23 and IL-12 Production in Human THP-1 Cells. *PLoS One* 2015; 10(11): e0141550.
14. Duits LA, Ravensbergen BEP, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of b-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* 2002; 106(4): 517-25.
15. Zaalouk TK, Bajaj-Elliott M, George JT, Mc Donald V. Differential regulation of beta-defensin gene expression during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 2004; 72(5): 2772-9.
16. Otri AM, Mohammed I, Abedin A, et al. Antimicrobial peptides expression by ocular surface cells in response to *Acanthamoeba castellanii*: an in vitro study. *Br J Ophthalmol* 2010; 94(11): 1523-7.
17. Haarmanna H, Steinerb T, Schreiberd F, et al. The role and regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced human beta-defensin 3 expression in human pulmonary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 467(1): 46-52.
18. Zhu C, Bao NR, Chen S, Zhao JN. HBD-3 regulation of the immune response and the LPS/TLR4-mediated signaling pathway. *Exp Ther Med* 2016; 12(4): 2150-4.
19. Sher A, Tosh K, Jankovic D. Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. *Cell Mol Immunol* 2016; 13(1): 1-7.
20. Morampudi V, Braun MY, D'Souza S. Modulation of early  $\beta$ -defensin-2 production as a mechanism developed by type I *Toxoplasma gondii* to evade human intestinal immunity. *Infect Immun* 2001; 79(5): 2043-50.
21. Tanaka T, Rahman MM, Battur B, et al. Parasitocidal activity of human alpha-defensin-5 against *Toxoplasma gondii*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46(6): 560-5.
22. Santamaria MH, Perez Caballero E, Corral RS. Unmethylated CpG motifs in *Toxoplasma gondii* DNA induce TLR9 and IFN- $\beta$ -dependent expression of  $\alpha$ -defensin-5 in intestinal epithelial cells. *Parasitology* 2016; 143(1): 60-8.