

Salmonella typhimurium'a Dirençli Farelerin Peritoneal Makrofajlarında Akut Faz Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Hüseyin BASKIN (*), Yasemin BASKIN (**), Yavuz DOĞAN (*), İ. Hakkı BAHAR (*)

(*) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
(**) Bölge Hıfızısıhha Enstitüsü, Sağlık Bakanlığı, İzmir

ÖZET

Salmonella typhimurium'un hücre içinde oluşturduğu infeksiyonun patogenezinin açıklanabilmesi, bir çok etkenin hücre içi infeksiyonunun patogenezinin de açıklanmasında yardımcı olabilir. Fare peritoneal makrofajlarında hazırlanan hücre içi infeksiyon modeli özellikle ülkemiz araştırma koşullarında "düşük maliyetli", ancak bir "niş" oluşturabilecek çalışmalar yapılabilir, hatta yurt dışındaki araştırma kuruluşları ile işbirliği koşulları da oluşturabilir. Bu çalışmada Salmonella typhimurium'a karşı dirençli olduğu bilinen C57/BL farelerin peritoneal makrofajları hücre kültürü koşullarında infekte edilmiş ve Hoechst 33342 ve propidium iodide boyaları ile hücrelerin apoptoz yanıtları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak C57/BL farelerin oluşturduğu apoptoz yanıtının "nekrotik" doğada olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: C57/BL, apoptoz, nitrik oksit, Salmonella typhimurium, nekroz

SUMMARY

Evaluation of Acute Phase Apoptosis-Necrosis Responses in Peritoneal Macrophages of Mice Resistant to Salmonella typhimurium

Probable explanations of the pathogenesis of intracellular infections of Salmonella typhimurium can be of help for the explanations of other intracellular pathogens' s infections. Studies on these intracellular infection models with mouse peritoneal macrophages may be useful in establishing "low cost" research areas, and may support probable studies which can be defined as "niches", especially in our country research conditions, and even may be helpful to build up collaborative research studies with foreign research laboratories. In this study, peritoneal macrophages of C57/BL mice which is known to be resistant to Salmonella typhimurium, were infected with Salmonella typhimurium, and apoptosis responses were evaluated by Hoechst 33342 and propidium iodide dyes. As a result, we may say that the nature of the "resistant" response of C57/BL is mostly of "necrotic" origin.

Key Words: C57/BL, apoptosis, nitric oxide, Salmonella typhimurium, necrosis

GİRİŞ

Fizyolojik hücre ölümü, konak genomu tarafından kodlanan proteinlerle yönlendirilen bir mekanizmayla, bir organizma içindeki bir hücre öldüğünde ortaya çıkar. Bu sürecin amacı, istenmeyen konak hücrelerini öldürmektir. Öldürme süreci üç amaçla ortaya çıkar: 1. Gelişme ve homeostaz için, 2. Savunma mekanizması olarak, 3. Yaşlanma için (1). Tek hücreli canlılarda ise, çok hücrelilere benzer bir yaşlanma veya ölüm süreci olduğu şimdiye kadar bilinmemiş de, son zamanlarda yapılan çalışmalarda tek hücreli canlıların kendi nesillerinin yaşamını sürdürmesi le-

hine intihar edebildiklerini bildiren çalışmalar artmaktadır (2).

Hücre içi bir bakteri olan Salmonella typhimurium'un apoptozla ilişkileri de son derecede ilgi çekicidir. Bu bakterilerin apoptoza neden olabilmesi için invazif olmaları gerektiği ileri sürülmüştür (3). Ancak bir başka çalışmada da, makrofajların invazif etkenlerle değil, ekzojen etkenlerle apoptoza gittiği ileri sürülmüştür (4).

S. typhimurium infeksiyonuna dirençte nitrik oksid (NO) üretiminin rolü bilinmektedir (5), C57BL fare-

lerin bakteri ile infeksiyonunda yüksek NO yanıtı elde edilmiş (6), ayrıca alkol alımının C57BL farelerde S. typhimurium infeksiyonuna direnci düşürdüğü tespit edilmiştir (7). BALB/c farelerin ise S. typhimurium infeksiyonuna duyarlı olduğu bilinmektedir (8). Literatürde dirençli farelerin apoptozla ilişkileri ele alınmamıştır. Bu çalışmada S. typhimurium infeksiyonuna dirençli farelerin bu özelliklerinin apoptozla ilişkisi sorgulanacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suç: Salmonella typhimurium, KUEN 1357, S1-28-9. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanmıştır. Kültürler infekte edilmeden önce bakteriler, optimal üreme konumuna ulaşmaları için, Luria-Bertoni Medium (LBM: Bacto Tryptone 10.0 gr, yeast extract 5.0 gr, NaCl 5.0 gr, Bacto agar 15.0 gr, Deionize su 800 mL)' da bir gece 37°C' de inkübe edilmişlerdir.

Fareler: Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Multidisiplin Laboratuvarı, Deney Hayvanları Merkezi'nden sağlanan BALB/c ve C57 fareler çalışmada kullanılmıştır. Çalışmaya yalnızca 8-12 haftalık dişi fareler alınmıştır.

Peritoneal makrofajların eldesi: Çalışmalarda uyarılmamış, doğal halde elde edilen makrofajlar kullanılmıştır. BALB/c ve C57 fareler arasındaki direnç farklılıklarını göstermek için, 96'lık pleyt çalışmalarına paralel gidecek şekilde BALB/c fareler de katılmıştır. Makrofajların eldesi Ellerman-Eriksen ve ark (9), tanımladığı şekilde yapılmıştır, Fareler usulüne uygun olarak servikal dislokasyonla öldürüldükten sonra, sırtüstü yatırılarak ekstre-mitelerinden iğnenmiştir. Karın derisi alkolle silindikten sonra steril makasla karın boşluğu açılarak, % 5 fetal calf serum (FCS) lu-heparinli (0, 4 mL/100 mL)-steril fosfatla tamponlanmış tuzlu suyla (PBS) periton boşluğu yıkanmış ve makrofajlar uygun koşullarda laboratuvar ortamına alınmıştır. Makrofajlar steril koşullarda % 5'lik FCS' lu RPMI-1640 (10. 000 U/mL Penisilin+10 mg/mL Streptomisin) ile yıkanarak sayımları yapılmış ve 2x10⁶/mL olacak şekilde 24 gözlü pleytlere lamellerin üzerine dağıtımları yapılmış, daha sonra 37°C ve % 5 CO₂' li ortamda bir gecelik kon-

trol inkübasyonları yapılmıştır. Ertesi gün M.O.I (multiplicity of infection) 1:1 olacak şekilde hücreler 60 dakika 37°C, % 5 CO₂' li ortamda infekte edilmiş, sürenin sonunda 200 mg/mL gentamisinli RPMI-1640 ile çukurlar 3 kez yıkanmış, böylece hücre dışındaki bakteriler öldürülmüştür. Bir çok çalışma bu antibiyotığın hücre içi bakterilerin üremesini engellemediğini göstermiştir (10) Bu aşamadan sonra makrofajların 100 mg/mL gentamisin içeren RPMI-1640 ile 37°C, % 5 CO₂' li ortamda inkübasyonu sürdürülmüştür.

Apoptozun değerlendirilmesi: Deneylerde 24 saatlik sonuçlar değerlendirilmiştir. Deneylerde C57 farelerin makrofajlarında oluşacak olası apoptoz-nekroz, Hoechst 33342 (HOE) ve propidium iodide (PI) boyaları ile saptanmıştır (11). Yöntem kısaca şöyledir: Hücreler 15 dakika 37°C' de HOE ile inkübe edilmiş (5 mg/mL, PBS' te). Süre sonunda hücreler sıcak PBS ile yıkandıktan sonra hemen PI (1mg/mL PBS' te) ile boyanıp, lamel pleytten kaldırılmış ve lama kapatılıp floresan mikroskopta (Jena Lumar, Carl Zeiss Jena, Germany) (eksitasyon dalga boyu 330-380; engelleme filtersi: 420 nm) apoptoza giren-nekroza giren hücreler değerlendirilmiştir.

Boya bize canlı hücreleri (normal çekirdek); membrana yapışık apoptotik hücreleri (parlak mavi kromatin); membran-geçirgen apoptotik hücreleri (parlak kırmızı kromatin); nekrotik hücreleri (kırmızı, büyümüş çekirdek); piknotik/nekrotik hücreleri (parlak kırmızı-parçalı çekirdek) görüntüleyebilmektedir. Bu boyayla hücreler sayılarak indeks çıkarılmış ve hücrelerin apoptoza mı / nekroza mı gittiği sorusuna yanıt bulunmaya çalışılmıştır.

Bakterilerin hücre içi yerleşiminin değerlendirilmesi: Benzer koşullarda 96'lık pleytlerde hazırlanmış makrofaj kültürlerindeki (5x10⁵) bakteriler de (M.O.I 1:1), aynı sürelerde inkübe edilmiş ve 24 saatin sonunda, makrofajların steril distile suyla patlatılmasından sonra LB besiyerine koloni ekimi yapılarak 37°C' de CFU (colony forming unit) cinsinden oluşumları değerlendirilmiştir.

BULGULAR

LBM' de yapılan CFU değerlendirmelerinde 24 saat sonunda, BALB/c farelerin peritoneal makrofajla-

rında (3×10^4 bakteri/mL) ve C57 farelerin peritoneal makrofajlarındaki (3×10^3 bakteri/mL) bakterilerin üremelerinde farklılık görülmektedir (Şekil 1).

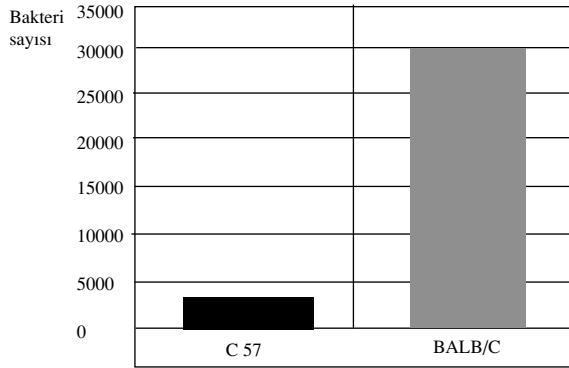
M.O.I 1:1 ile infekte edilmiş makrofajların apoptoz-nekroz oranları Şekil 2’ de sunulduğu gibidir. Yirmi dört saat sonunda dirençli olan hücrelerde “% ölüm indeksi” nekroza eğilimli bulunmuştur (% 25 apoptoz - % 75 nekroz).

TARTIŞMA

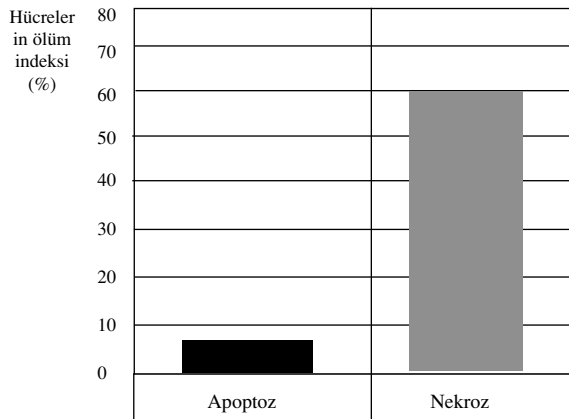
S. typhimurium insanlarda sınırlı bir gastroenterit yaparken, farelerde tifo benzeri sistemik bir hastalığa neden olur. *S. typhimurium* kültür ortamında karşılaştıkları duyarlı hücrelerin membranlarını bozarak hücre içine girerler (10).

Çalışmamızda BALB/c ve C57 farelerde ilk 24 saat

Şekil 1. *Salmonella typhimurium*’a dirençli (C57) ve duyarlı (BALB/c) farelerde 24 saat sonundaki hücre içi bakteri üremeleri



Şekil 2. *Salmonella typhimurium*’a dirençli (C57) farelerde 24 saat sonundaki oluşan apoptoz-nekroz ölüm indeksi(%).



boyunca, hücre içindeki bakteri üremeleri arasında anlamlı fark görülmüştür. Bu fark direnç-duyarlılık paternleri arasındaki farkı yansıtmaktadır.

S. typhimurium’a dirençli farelerin makrofajlarında 24 saatte oluşan apoptoz-nekroz indeksinin, nekroz lehine olduğu gözlenmiştir. *S. typhimurium*’a dirençli olan C57 farelerin 24 saat içinde BALB/c farelere oranla, hücre içine daha az bakteri aldıkları, bu süreç boyunca da “nekroz” un ön planda olduğu görülmüştür.

Hücre içine girişi sırasında *S. typhimurium*, hücre içi kalsiyum düzeyleri, fosfolipaz A2 aktivitesi ve lökötrien üretimi gibi ikincil mesajcıların artışı, protein kinaz artışı tetikler. İkincil mesajcılar programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) aktivasyonunda rol oynayabilir (1). Bu bulgular elde ettiğimiz sonuçlarda, “nekroz” un ön planda oluşunu destekler niteliktedir.

Bu deneysel modellerle yapılan çalışmalar araştırmacıya hem infeksiyon modelini ayrıntısıyla tasarlama şansı tanımakta hem de infeksiyon etkenlerinin patojenitelerini tanımlama şansı yanında, aynı zamanda bağışıklık sisteminin çalışma koşulları hakkında karşılıklı bilgi verebilmektedir.

Bundan sonraki deneylerde, *S. typhimurium*’a dirençli ve duyarlı farelerin apoptoz-nekroz yanıtlarının karşılaştırılması ve bu yanıtlara eşlik eden olası yolları (pathway) irdelemeye çalışacağız.

KAYNAKLAR

1. Vaux DL and Strasser A: The molecular biology of apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 93: 2239 (1996).
2. Shub DA: Bacterial viruses. Bacterial altruism?. Curr Biol 6: 555(1994).
3. Monack MD, Raupach B, Hromockyj EA and Falkow S: *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. Proc Natl Acad Sci USA. 93: 9833 (1996).
4. Mohr S, McCormick ST and Lapetina GE: Macrophages resistant to endogenously generated nitric oxide-mediated apoptosis are sensitive to exogenously added nitric oxide donors: Dichotomous apoptotic response independent of caspase 3 and reversal by the mitogen-activated protein kinase (MEK) inhibitor PD 098059. Proc Natl Acad Sci USA 95: 5045 (1998).
5. Shiloh UM, Nathan FC: Reactive nitrogen intermedia-

tes and the pathogenesis of Salmonella and Mycobacteria. *Curr Opin Microbiol* 3:35 (2000).

6. Schwacha GM, Meissler JJ, Jr, and Eisenstein KT: Salmonella typhimurium infection in mice induces nitric-oxide mediated immunosuppression through a natural killer cell-dependent pathway. *Infect Immun* 66:5862 (1998).

7. Sibley D, Jerrels RT: Alcohol consumption by C57BL/6 mice is associated with depletion of lymphoid cells from the gut-associated lymphoid tissues and altered resistance to oral infections with Salmonella typhimurium. *J. Infect Dis* 182:482 (2000).

8. Mastroeni P, Harrison JA, Chabalgoiti JA, Hormaeche CE: Effect of interleukin-12 neutralization on host resistance and gamma interferon production in mouse typhoid. *Infect Immun* 64:189 (1996).

9. Ellerman-Eriksen S, Liberto CM, Ianello D, Mogensen SC: X-linkage of the early in vitro gamma/beta interferon response of mouse peritoneal macrophages to HSV type 2. *J Gen Virol* 67: 1025 (1986).

10. Gahring CL, Heffron F, Finlay BB, Falkow S: Invasion and replication of Salmonella typhimurium in animal cells. *Infect Immun* 58:443 (1990).

11. Lee Y-J, Shacter E: Bcl-2 does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death. *Blood* 12: 4480 (1997)..