

Üriner sistem epitel hücrelerinin bakterisidal aktivitesi, sitokin ve kemokin yanıtı

Bactericidal activity, cytokine and chemokine responses of the urinary system epithelial cells

Işıl Fidan , Emine Yeşilyurt, Sultan Yolbakan, Berna Erdal

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

İletişim / Correspondence: Işıl Fidan, Adres / Address: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tel: 0312 202 46 26 Faks: 0312 214 11 31 E-mail: isilfidan@yahoo.com

ÖZET

Mukozal yüzeyler mikroorganizmalara karşı savunmada ilk karşılaşma bölgeleridir. Bakteriyel infeksiyonlar mukozal sitokin sekresyonuna neden olur ve mukozal sitokinler kısmen epitel hücrelerinden kaynaklanır. Epitel hücreleri aynı zamanda antimikrobiyal peptidler de salgılar. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda *E.coli* ile uyarılmış üriner sistem epitel hücrelerinin bakterisidal aktivitesi ve sitokin ve kemokin yanıtı *in vitro* olarak araştırılmıştır. Sitokin ve kemokin düzeyleri ELISA ile, bakterisidal aktivite koloni sayma yöntemi ile incelenmiştir. *E.coli* ile uyarılmış epitel hücrelerinde MCP-1, IFN- γ ve IL-6 sitokin düzeyleri epitel hücresi bulunmayan örneklerle göre artış göstermiştir ($p<0.05$). *E.coli* ile stimüle edilen üriner sistem epitel hücrelerinde bakterisidal aktivite de gözlenmiştir. Bu bulguların ışığında, üriner sistem epitel hücrelerinin konağın immün yanıtının düzenlenmesinde aktif rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Epitel hücresi, bakterisidal aktivite, sitokin

SUMMARY

Mucosal surfaces are the first line of defence against microbes. Bacterial infection trigger mucosal cytokine secretion. The mucosal cytokines derived, in part, from epithelial cells. Epithelial cells also produce antimicrobial peptides. In this study, the cytokine and chemokine responses and bactericidal activity of the urinary system epithelial cells stimulated with different concentration of *E. coli* were assessed *in vitro*. The cytokine and chemokine levels were determined by ELISA and bactericidal activity was detected by colony counting assay. It was observed that in epithelial cells stimulated by *E.coli* the levels of MCP-1, IFN- γ and IL-6 cytokines increased compared to the samples that were not included epithelial cell ($p<0.05$). Bactericidal effect of the urinary epithelial cells stimulated by *E.coli* was also determined. In the light of these findings, it is considered that urinary system epithelial cells may play an active role in the regulation of immune response of a host.

Key words: Epithelial cell, bactericidal activity, cytokine

GİRİŞ

Üriner sistem infeksiyonları özellikle kadınlarda görülen ve en sık bakteriyel etken olarak *Escherichia coli* (*E.coli*)'nin izole edildiği infeksiyonlardır (1). Mukozal yüzeyler, konak ve bakteri arasındaki ilk karşılaşma bölgeleridir (2). Dış çevredeki mikroorganizmalar ile steril iç ortamı birbirinden ayırır ve mikroorganizmalara karşı ilk savunma sistemi olarak rol oynar (3). Epitelyal

hücreler mikrobiyal invazyonu takiben konağın mukozal inflamatuvar yanıtının başlamasında ve düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. İmmün yanıtta epitel hücrelerinin rolü son yıllarda daha iyi anlaşılmış ve bu konuyla ilgili çalışmalar giderek artış göstermiştir. Mikroorganizmalara karşı mücadelede mukozal cevabın oluşmasında etkin rol oynayan epitel hücrelerinin sitokin ve kemokin gibi maddeleri oluşturabilme kapasitesine sahip oldukları son yıllarda yapılan çalışma-

larda gözlenmiştir (4,5).

Fare modellerinde üropatojen *E.coli* suşlarının mesaneye uygulanmasının güçlü bir inflamatuvar yanıtı neden olduğu belirlenmiştir (6). Üropatojen *E.coli* ile uyarılan üriner sistem epitel hücreleri çeşitli sitokinlerin sentezini uyararak inflamatuvar yanıtı yol açar. Üroepitelyal hücrelerin sitokin yanıtının büyüklüğü bakteriyel aderans ve fimbrial ekspresyon ile ilişkilidir (5). Mukozal yüzeylerden salınan sitokinler bir yandan akut infeksiyon sırasında görülen lokal ve sistemik etkilerin oluşumuna neden olurken, diğer yandan lokal kemokin üretimi inflamatuvar hücrelerin toplanmasına ve mukozal yüzeylerden mikroorganizmaların temizlenmesine yol açar (7).

Epitelyal hücrelerin önemli bir koruyucu özelliği de salgıladıkları anti-mikrobiyal peptidler aracılığıyla patojenleri yok edebilme yetenekleridir. Epitel hücrelerinin salgıladığı peptidler ayrıca doğal ve kazanılmış immün sistemin düzenlenmesinde önemli rol oynar (3).

Bu çalışmada, üriner sistem epitel hücrelerinin immün yanıt üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için, farklı konsantrasyonlarda *E.coli* suşu ile muamele edilmiş üriner sistem epitel hücrelerinin bakterisidal aktivitelerinin ve sitokin ve kemokin yanıtı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri suşları. Çalışmamızda *E.coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır. *E.coli* ATCC 25922 suşu Trypticase soy agar besiyerine ekilmiş ve 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün besiyeri yüzeyinden bir öze dolusu mikroorganizma toplanarak üç kez PBS (Phosphate buffer saline) içinde yıkanmış, %10 fetal calf serum (FCS) içeren RPMI-1640 içinde sulandırılmış ve tripan mavisi ile boyanarak Thoma lamında canlı mikroorganizmalar sayılmıştır. Daha sonra 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ cfu/ml konsantrasyonlarda *E.coli* içeren bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır (8).

Üriner sistem epitel hücre izolasyonu. Sağlıklı kişilerden sabah ilk akım idrarları steril idrar kabına alınarak, 50 ml'lik tüplere aktarılmış, santrifüj edilmiş ve oluşan idrar sedimenti üç kez PBS ile yıkanmıştır. Epitel hücreleri %10 FCS içeren RPMI-1640 içinde sulandırılmış, tripan mavisi ile boyanarak Thoma lamında canlı hücreler sayılmış ve besiyeri içinde 10⁵ hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde epitel hücre süspansiyonu hazırlanmıştır (9).

Üriner sistem epitel hücre (Efektör hücre=E)/ E.coli (Hedef hücre=H) deneyinde bakterisidal aktivitenin belirlenmesi. Yirmidört kuyucuklu pleytlerde efektör/hedef hücre oranları 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000 olacak şekilde ve her oran üçer kuyucuk olarak çalışılmak üzere hazırlanmıştır. Kontrol kuyucuğu olarak sadece epitel hücresi+besiyeri bulunan kuyucuk ve sadece bakteri+besiyeri bulunan kuyucuk kullanılmıştır. Pleytler 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterisidal aktiviteyi belirlemek için her kuyucuktan içerikleri alınmış uygun seri sulandırmalar hazırlandıktan sonra, kanlı agar besiyerine üçlü ekimler yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda besiyeri üzerinde oluşan koloniler sayılarak koloni oluşturan birimler (cfu) tespit edilmiş ve bakterisidal etki (BE) yüzdeleri belirlenmiştir (10).

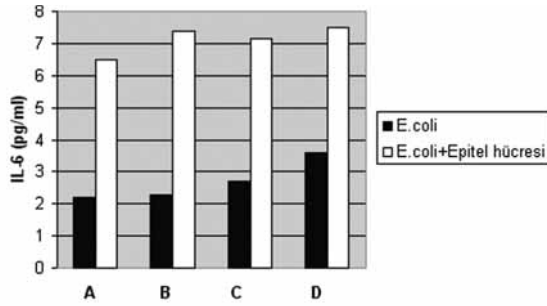
BE (%)= (Kontrol kuyucuğu ortalama cfu-deney kuyucuğu ortalama cfu/kontrol kuyucuğu ortalama cfu)x 100

Üriner sistem epitel hücre (Efektör hücre)/ E.coli (Hedef hücre) deneyinde sitokin ve kemokin düzeylerinin belirlenmesi. Farklı konsantrasyonlarda *E.coli* ile muamele edilmiş epitel hücrelerinin bulunduğu kuyucuklardaki süpernatantlar Eppendorf tüpüne toplanmış, santrifüj edilmiş ve sitokin ve kemokin düzeyleri inceleninceye kadar -80°C'de saklanmıştır. Sitokin ve kemokin düzeyleri, ELISA yöntemi ile firmanın önerileri doğrultusunda incelenmiştir (Biosource, California, USA).

İstatistiksel analiz. Değişik konsantrasyonlardaki *E.coli* suşlarına karşı epitel hücrelerinin bakterisidal aktivitelerinin ve sitokin ve kemokin yanıtının gözlenmesinde Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda düzeylerini incelediğimiz sitokinlerden IFN- γ ve IL-6, *E.coli* ile uyarılmış üriner sistem epitel hücresi içeren örneklerde epitel hücresi içermeyen örneklere göre anlamlı düzeylerde yüksek olarak bulunmuştur. Düzeyleri incelenen kemokinlerden monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) benzer şekilde üriner sistem epitel hücresinin varlığında daha yüksek düzeylere ulaşmıştır ($p<0.05$) (Şekil 1).



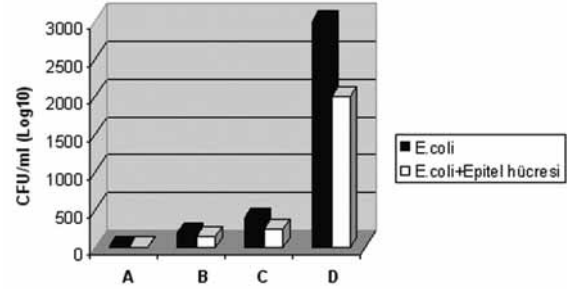
Şekil 1. *E.coli* ile uyarılmış üriner epitel hücrelerinin IL-6 salgısı (A. 10^8 cfu/ml *E.coli*; B. 10^7 cfu/ml *E.coli*; C. 10^6 cfu/ml *E.coli*; D. 10^5 cfu/ml *E.coli*)

IL-1 β düzeylerinde ise sadece 10^8 cfu/ml konsantrasyonda *E.coli* ile uyarılmış epitel hücresi bulunan örneklerde anlamlı düzeylerde artış gözlenmiş ancak diğer konsantrasyonlarda epitel hücresi içermeyen örneklere kıyasla herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

Çalışmamızda incelediğimiz antibakteriyel etkinlik sonuçlarına göre, *E.coli* ATCC 25922 suşu ile uyarılmış üriner sistem epitel hücrelerinde 1/1 E/H hücre oranında bakterisidal aktivite ortalama % 25; 1/10 E/H hücre oranında ortalama %33.3; 1/100 E/H hücre oranında ortalama %37.5 ve 1/1000 E/H hücre oranında ortalama % 33.3 olarak tespit edilmiştir.

Değişik konsantrasyonlarda *E.coli* ile uyarılmış epitel hücresinin bulunduğu kuyucuklarda epitel

hücresi bulunmayan kontrol kuyucuklarına göre *E.coli* konsantrasyonlarında istatistiksel olarak belirgin bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil 2). Bakterisidal aktivite özellikle 1/100 E/H hücre oranlarında daha belirgin olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2. *E.coli* suşlarına ile uyarılmış üriner epitel hücrelerinin bakterisidal etkisi (A. 10^8 cfu/ml *E.coli*; B. 10^7 cfu/ml *E.coli*; C. 10^6 cfu/ml *E.coli*; D. 10^5 cfu/ml *E.coli*)

TARTIŞMA

Üriner sistem epitel hücrelerinde mikroorganizma adezyonu ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, bakterisidal etki ve özellikle üriner sistem epitel hücrelerinin sitokin ve kemokin yanıtı ile ilgili sınırlı sayıda yayın vardır. Bu nedenle çalışmamızda, *E.coli* aracılığıyla oluşan epitel hücre bakterisidal aktivitesi ve sitokin ve kemokin yanıtı araştırılmıştır.

Bakteriyel infeksiyonlar sırasında oluşan mukozal sitokin üretiminde epitel hücreleri çok önemli rol oynamaktadır (5). Çalışmamızda düzeyleri incelenen sitokinlerden IFN- γ ve IL-6 *E.coli* ile uyarılmış epitel hücrelerinde kontrol örneklerine göre yüksek düzeylerde bulunmuştur. Üriner sistemin *E.coli* ile infeksiyonunun IL-6 üretimini uyardığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (11). Hedges ve ark (5) böbrek ve mesane epitelyal hücre serilerinin *E.coli* ile uyarılmasının IL-6, IL-8 mRNA'sında ve sekresyonunda artışa neden olduğunu, IL-1 α ve IL-1 β mRNA'sının arttığını ama sekrete edilen IL-1 α ve IL-1 β düzeylerinin belirlenemediğini bildirmişler ve epitel hücrelerinin sitokin aracılı yanıtının infeksiyonun erken dönemlerinde oluştuğunu belirtmişlerdir.

Albayrak ve ark. (8) ağız epitel hücrelerinin

Streptococcus pyogenes ile uyarımının IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokinlerin üretiminde doza bağlı olarak farklı yanıtlar oluşturduğunu ve IL-6 seviyesinin 1. saatte bakteri ile uyarılmış epitel hücrelerinde anlamlı artış oluştururken, IL-10 seviyesinde fark gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Agace ve ark (2) üriner sistem epitel hücre serilerinde ve insan monositlerinde *E. coli* ile aktive edilmiş bir sitokin yanıtının bulunduğunu ve üriner epitel hücrelerinin sirkülasyondaki monositlerden daha etkin şekilde sitokin yanıtını sınırladığını ve bu şekilde epitel hücrelerinin mukozal yüzeylerin mikroorganizma ile temasını sınırlandırabileceğini ve diğer doku kompartmanlarının bütünlüğünün sağlanmasında rol oynayabileceğini bildirmişlerdir.

IFN- γ , IL-1, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler patojene karşı oluşan epitelyal yanıtı artırır ve adezyon moleküllerinin ifadenmesini uyarak fagosit göçünü artırır (3). Çalışmamızda sadece yüksek konsantrasyonda *E. coli* varlığında IL-1 β düzeylerinde artış görülmüş olması, epitel hücrelerinin sitokin salgılaması ile bakteri yükünün varlığı arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür. IL-1 endotel hücrelerine fagositik hücrelerin yapışmasını ve insan renal tubuler hücrelerde ICAM-1 ifadenmesini arttırdığı için, *E. coli* ile uyarılmış üriner epitel hücrelerinde sentezinin artmış olması idrar yolu infeksiyonları sırasında IL-1'in infeksiyon bölgesine nötrofil gibi fagositik hücrelerin toplanmasını artırarak bakterilerin yok edilmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (2).

Üriner IL-6 seviyesinin idrar yolu infeksiyonu bulunan hastalarda yükseldiği ancak serum seviyelerindeki yükselişin ancak febril bir infeksiyon olduğu zaman görüldüğü bildirilmiştir (2). Bu durumda üriner sistem infeksiyonlarında üriner IL-6'nın lokal orijinli olduğu yani sirkülasyondan değil, bakterilerin aktive etmesine bağlı olarak üriner sistem epitel hücre kaynaklı olarak seviyelerinin artış gösterdiği düşünülmektedir. IL-6 immünoregülatuar ve proinflamatuvar etkili bir si-

tokin olduğu için, çalışmamızda da gözlemlendiği gibi epitel hücrelerin *E. coli* ile uyarımını takiben artış göstermesi de epitel hücrelerinin patojene karşı immün yanıtındaki etkin rolünü göstermektedir.

Mukozada lokal olarak salgılanan sitokinlerin türü hangi hücrelerin aktive edileceğini belirlemektedir. Aynı zamanda epitel kaynaklı sitokinlerin dolaşma geçmeleri sistemik etkiler oluşturmaktadır (5). Bu nedenle epitel kaynaklı bu sitokin ağı konağın immün sisteminin regülasyonunda önemlidir.

E. coli infeksiyonu sırasında epitel hücre aktivasyonunun fimbria aracılığıyla olduğu ve bununda in vivo ve invitro sitokin sekresyonuna neden olduğu, bakteriyel aderensin önlenmesinin epitelyal sitokin yanıtını inhibe ettiği düşünülmektedir (7).

Kemokinler hasarlı bölgelere hücrelerin göç etmesinde etkin rol oynarlar. Mukozal infeksiyonlar kemokin yanıtına neden olur. MCP-1 gibi kemokinlerin farelerde mukozada bulunduğu ve infeksiyon sırasında yükseldiği bildirilmiştir (12). Çalışmamızda MCP-1'in *E. coli* varlığında epitel hücrelerden sentezinde bir artış olduğu gözlenmiştir. Godaly ve ark (13) bir kemokin olan IL-8'in *E. coli* ile uyarılmış üriner sistem epitel hücrelerinde sekresyonunu arttırdığını ve IL-8'in de *E. coli*'nin uyardığı nötrofil transepitelyal migrasyonunda rol oynadığını bildirmişlerdir.

Epitelyal hücrelerin antibakteriyel etkileri mukozadaki mikroorganizmalara karşı doğal bir konak savunması oluşturabilir (4). Epitel hücrelerinin salgıladığı antimikrobiyal peptidler gram negatif bakteri, gram pozitif bakteri, fungus ve zarflı virüsler için geniş bir aktiviteye sahiptir. Aynı zamanda antimikrobiyal peptidler doğal ve kazanılmış bağışıklığın düzenlenmesinde de aktif rol oynarlar (3).

Çalışmamızda *E. coli* ATCC 25922 suşu ile uyarılmış üriner sistem epitel hücrelerinde 10^5 cfu/ml *E. coli* konsantrasyonunda bakterisidal aktivite ortalama % 25; 10^6 cfu/ml konsantrasyonda ortalama %33.3; 10^7 cfu/ml konsantrasyonda ortalama %37.5 ve 10^8 cfu/ml konsantrasyonda ortalama

% 33.3 olarak tespit edilmiştir. Antibakteriyel etkinin *E.coli* konsantrasyonu arttığında daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda tespit etmiş olduğumuz üriner sistem epitel hücrelerinin antibakteriyel etkinliklerinde epitel hücreleri tarafından salgılanan antimikrobiyal peptidlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

Albayrak ve ark (10) idrar epitel hücrelerinin antibakteriyel etki gücünün 10^5 cfu/ml mikroorganizma konsantrasyonunda *E.coli* K12 suşuna karşı %34.7, *E.coli* 075 suşuna karşı %29.2 olduğunu tespit etmişler ve ağız epitel hücrelerinin antibakteriyel etkisinin idrar epitel hücresinden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda benzer şekilde 10^5 cfu/ml mikroorganizma konsantrasyonunda *E.coli* ATCC 25922 suşunun bakterisidal etkisini % 33.3 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda in vitro kültür koşullarda elde edilen bu sonuçların in vivo sağlam mukozal koşullardaki hücrelerin fonksiyonlarını tam olarak yansıtamayabileceğinin farkındayız ancak in vivo koşullarda daha etkili sonuçlarında elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, üriner sistem epitel hücrelerinin patojenlere karşı antibakteriyel etkisinin olduğu ve proinflatuvar sitokin ve kemokinler salgılayarak fagositik hücreleri infeksiyon sahasına topladığı ve mukozal yüzeylerin immün sistem regülasyonundaki etkilerinde epitelyal hücrelerinin etkin bir rol oynayabildiğini düşünülmüştür. Patojenle mücadele sırasında üriner sistem epitel hücrelerinin etki gösteren faktörlerinin belirlenmesi özellikle tekrarlayan idrar yolu infeksiyonu görülen kişilerde tedavi seçenekleri açısından yeni yaklaşımlara ışık tutacaktır.

Kaynaklar

1. Vidya KC, Mallya PS, Rao PS: Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23: 102-105.
2. 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: 602-609.
3. Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 2003; 21: S2/12-S2/23.
4. Dolapci I, Albayrak N, Boyvat A, Ozenci H. Antibacterial capacity of oral (epithelial) cells from healthy donors and patients with Behçet's disease. *Arch Dermatol Res* 2003; 295: 124-126.
5. Hedges S, Agace W, Svensson M, Sjögren A, Ceska M, Svanborg C. Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network. *Infect Immun* 1994; 62: 2315-2321.
6. Hunstad DA, Justice SS, Hung CS, Lauer SR, Hultgren SJ. Suppression of bladder epithelial cytokine responses by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2005; 73: 3999-4006.
7. Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 99-105.
8. Albayrak N, Biriken D, Özenci H. İnsan ağız epitel hücresinin farklı antijenik miktarlardaki *Streptococcus pyogenes*'e karşı bakterisidal etkisinin ve sitokin yanıtının araştırılması. *Mikrobiyol Bül* 2006; 40: 29-37.
9. Svanborg Eden C, Eriksson B, Hanson LA. Adhesion of *Escherichia coli* to uroepithelial cells in vitro. *Infect Immun* 1977; 18: 767-774.
10. Albayrak N, Biriken D, Özenci H. İnsan ağız ve üriner sistem epitel hücrelerinin farklı *E.coli* suşlarına karşı bakterisidal etkisinin araştırılması. *Mikrobiyol Bül* 2005; 39: 161-167.
11. Savkovic SD, Koutsouris A, Hecht G. Attachment of a non-invasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect Immun* 1996; 64: 4480-4487.
12. Steele C, Fidel PL. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun* 2002; 70: 577-583.
13. Godaly G, Proudfoot AEI, Offord RE, Svanborg C, Agace WW. Role of epithelial Interleukin-8 (IL-8) and neutrophil IL-8 receptor A in *Escherichia coli*-induced transuroepithelial neutrophil migration. *Infect Immun* 1997; 65: 3451-3456.