

Farklı Periodontopatojenlerin RAW 264.7 Makrofajları Tarafından Fagositozunun Değerlendirilmesi

Evaluation of Different Periodontopathogens Phagocytosis by RAW 264.7 Macrophages

Nur Balcı¹ <https://orcid.org/0000-0001-7986-7085>
Adile Salehli² <https://orcid.org/000-0003-1102-1571>
Esat Buğrahan Toksöz³ <https://orcid.org/0000-0003-2561-3084>
Metin Cetin⁴ <https://orcid.org/0000-0001-9963-8407>
Melis Yılmaz¹ <https://orcid.org/0000-0003-3435-1856>
Sevda Er⁵ <https://orcid.org/0000-0002-8210-0915>

¹ İstanbul Medipol Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² Uşak Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı, Uşak Türkiye

³ Özel Poliklinik Diş Hekimi, Iğdır, Türkiye

⁴ Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kocaeli, Türkiye

⁵ Anadolu Üniversitesi, Yunus Emre Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Programı, Eskişehir, Türkiye

Atıf/Citation: Balcı, N., Salehli, A., Toksöz E.B., Çetin, M., Yılmaz, M., Er, S., (2020). Farklı Periodontopatojenlerin RAW 264.7 Makrofajları Tarafından Fagositozunun Değerlendirilmesi. Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 41(3), 223-229.

ÖZ

Amaç: Periodontitis, spesifik periodontal patojenlerin ileri doku kaybına neden olduğu kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Kronik inflamatuvar hastalıklarda, bakterilerin makrofaj gibi özel fagositik hücreler tarafından fagositozu, inflamasyonun çözünmesi için önemlidir. Periodontal hastalıklardaki çeşitli bakteriler, fagositoz mekanizmasına karşı farklı davranışlar sergileyebilmektedir ve bununla ilgili bilgiler sınırlıdır. Bu nedenle farklı suşların spesifik patojenik davranışlarının periodontitisteki rolünü daha iyi anlamak için *Enterococcus faecalis* ve *Prevotella intermedia*'nin fagositozunu araştırmayı amaçladık.

Yöntem: Çalışmada *E. faecalis* ve *P. intermedia* ağız klinik izolatları, RAW 264.7 makrofaj hücreleriyle 37 ° C 'de % 5 CO₂ ortamında 1 saat inkübe edilmiştir. Floresanla etiketlenen bakterilerin fagositozunu ölçmek için akım sitometrisi yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışmada elde edilen veriler, *E. faecalis* bakterisinin RAW 264.7 makrofaj hücreleri tarafından fagositoza önemli ölçüde dirençli olduğunu, ancak *P. intermedia*'nin dirençli olmadığını göstermiştir ($p < 0.05$).

Sonuç: Bu çalışma, periodontal hastalık patogenezinde görülen farklı bakteri türlerinin makrofajların fagositozuna yakınlığı arasında bir fark olduğunu göstermektedir ve *E. faecalis* fagositoza karşı direnç göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Fagositoz, *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia*, Periodontitis

ABSTRACT

Objectives: Periodontitis is a chronic inflammatory disease in which specific periodontopathogens play a role in the advanced tissue loss process. The phagocytosis of invading bacteria by macrophages is important for resolution of inflammation in chronic inflammatory diseases. Little is known about the different bacteria strains and their attitude towards phagocytosis process in periodontal disease. We aimed to investigate the phagocytosis of *Enterococcus faecalis* and *Prevotella intermedia* for better understand the role of specific pathogenic behaviors of different strains on periodontitis.

Methods: *E. faecalis* and *P. intermedia* were incubated with RAW 264.7 macrophages at 37°C and 5% CO₂ for 1 hour. A flow cytometric method was used to measure phagocytosis of fluorescently labeled bacteria.

Results: The study included clinical isolates of *E. faecalis* and *P. intermedia*. Data obtained showed that *E. faecalis* was significantly resistant to phagocytosis by RAW 264.7 macrophages but not *P. intermedia* ($p < 0.05$).

Conclusion: This study suggests that there is a difference in susceptibility to phagocytosis by macrophages between different strains of bacteria which are seen in the periodontal disease pathogenesis and there is a resistance of *E. faecalis* to phagocytosis.

Keywords: Phagocytosis, *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia*, Periodontitis

GİRİŞ

Periodontitis, gingiva ve altında yatan kemik gibi dişi destekleyen dokuların yıkımına sebep olan inflamatuvar bir hastalıktır¹. Periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde mikrobiyal dental plak (biyofilm) ve konağın biyofilme karşı gösterdiği cevap öncelikli rol oynamaktadır¹. Periodontal hastalıkta konağı indükleyen biyofilm polimikrobiyaldir; ancak hastalığın ilerlemesinden sorumlu belirli patojenik bakterileri içermektedir. Bu patojenik bakterilerden en önemlileri *Porphyromonas gingivalis*(*P.gingivalis*), *Tannerella forsythia*(*T. forsythia*), *Treponema denticola*(*T. denticola*), *Fusobacterium nucleatum*(*F. Nucleatum*), *Prevotella intermedia*(*P. intermedia*) ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'tır(*A. actinomycetemcomitans*)².

Fagositoz bakterisi, parazit, ölü hücreler, hücresel ve yabancı debrisler gibi büyük parçaların profesyonel fagositler (nötrofiller, dendritik hücreler, monositler ve makrofajlar) tarafından yutulup öldürülmesi, yok edilmesi olarak tanımlanmaktadır³. Bir mikroorganizma vücuda girdiğinde, profesyonel fagositler mikroorganizmaya bağlanmakta, mikroorganizmaları yutmakta ve öldürmektedir. Bu süreçte makrofajlar ve dendritik hücreler, istilacının antijenik molekülleri ile bağlanarak diğer bağışıklık hücrelerine sunulmakta, böylece inflamatuvar yanıt tetiklenmektedir. Bir savunma yanıtı olan inflamasyonda fagositoz önemli bir süreçtir. Bakterilerin fagositoz ile temizlenmesindeki herhangi bir bozukluk ya da yetersizlik, romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir⁴. Ayrıca periodontitis ve romatoid artrit hastalığının patogenezi açısından ortak risk faktörlerini paylaştığı bilinmektedir⁵. Bu nedenle ağız içi gibi kompleks bir mikro çevrede bakterilerin defektif olarak fagosite edilmesinin periodontitis gibi inflamatuvar bir hastalığa yol açabileceği mantıklı gibi görünmektedir.

P. intermedia oral mukozada bulunan gram negatif, siyah pigmentli ve anaerobik bir bakteridir⁶. *P. intermedia*'nin hamilelik gingivitis, nekrotizan ülseratif gingivitis ve periodontal hastalığın ilerlemiş yıkıcı formundan sorumlu olduğu bilinmektedir⁷. Bu bakteri, farklı virülans faktörlerine sahiptir. Örneğin yüzeyinde bulunan fimbrialar ile epitelyal hücrelere tutunarak hücre ve doku içine invaze olabilirken, salgıladığı fosfolipaz enzimi ile konak hücresinin bütünlüğünü bozarak hastalığın ilerlemesine sebep olabilmektedir⁸. *P. intermedia*'nin diğer virülans faktörlerinden biri de biyofilm oluşturabilmesidir⁹. Yamanaka ve ark. EPS'nin bakteri patojenitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacı ile yaptıkları bir hayvan deneyi çalışmasında, EPS salgılayan *P. intermedia*'nin salgılamayanlara göre hücresel olarak insan polimorfonükleer lökositleri (PMNL) tarafından daha zor fagosite edildiklerini yani bu durumun klinik yansımaları olarak EPS salgılayan *P. intermedia* varlığında apse formasyonunun daha kolay oluştuğunu bildirmiştir⁹.

E. faecalis sporsuz formda, fakültatif anaerob, gram-pozitif bir koktur¹⁰. Ağız içinde bu bakteri çoğunlukla enfekte olmuş kök kanalları, periradiküler apseler ve endodontik lezyonlar ile ilişkilendirilmektedir¹¹. Souto ve Colombo (2008), periodontal olarak sağlıklı 56 ve kronik periodontitisli 169 hastanın dahil edildiği bir çalışmada hastalık durumunda *E. faecalis* prevalansını değerlendirmiştir¹². Çalışma sonucunda tüm örneklerin %34.9'unda *E. faecalis*'in mevcut olduğu; ancak kronik periodontitis varlığında subgingival biyofilm ve tükürükte *E. faecalis* oranının anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir. Bu sonuç *E. faecalis*'in, kronik periodontitisin yıkıcı doğasına katkı sağlayabileceğini düşündürmüştür. *E. faecalis*, agregasyon maddesi salgılamak, hücre duvarında lipoteikoik asit yapısına sahip olma, hiyaluronidaz ve jelatinaz enzimlerini üretmesi gibi birçok virülans faktörlerine sahiptir ve bu faktörler konak cevabını değiştirerek inflamasyonun artışına neden olabilmektedir¹³. *E. faecalis*'in virülans faktörlerinden biri olan agregasyon maddesinin nötrofil ve makrofaj fagositozundaki etkisini değerlendiren deneysel bir çalışmada, *E. faecalis*'in agregasyon maddesinin insan nötrofilleri tarafından opsoninden bağımsız bakteriyel fagositoza aracılık ettiği; ancak dikkat çekici bir şekilde, fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmeye karşı dirençli oldukları ortaya konmuştur. Ayrıca araştırmacılar, bu hücre içi direncin sadece nötrofiller ile sınırlı olmadığını aynı zamanda monosit türevli makrofajlar ve murin makrofaj hücre dizisi J774'teki hücreler gibi diğer fagositlerde de gözlemlendiğini bildirmiştir.

Dokuların bakterisi, virüs gibi patojenler ve/veya fiziksel, kimyasal etkiler gibi diğer yaralayıcı etkenlere karşı gösterdiği fizyolojik bir savunma yanıtı olan inflamasyonda fagositozun önemi belirgindir. Özellikle patojenik bakterilerin salgı sistemleri ve yüzey özellikleri gibi virülans faktörlerini kullanarak makrofajların fagositoz yeteneğini modüle edebildiği ve bu durumun inflamasyonun çözünmemesi yani hastalık ile sonuçlandığı bilinmektedir^{13,14}.

Günümüze kadar klinik hastalık durumlarının patogenezinin aydınlatılması amacıyla patojenik bakterilerin farklı fagositler tarafından fagositoza karşı direncini değerlendiren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak literatürde, ağız mikrobiyomunda yer alan ve periodontal hastalık açısından patojenitesi birbirinden farklı bakterilerin makrofajlar tarafından fagositozunun değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada periodontal hastalık patogenezinde etkinliği farklı olan bakterilerin, birbirileri ile etkileşiminden bağımsız olarak fagositoz miktarlarının farklı olacağını varsayılmıştır. Bu nedenle çalışmada periodontal hastalık açısından disbiyotik olan *P. intermedia* ve kommensal olan *E. faecalis* bakterilerinin makrofajlar tarafından fagositozunun *in-vitro* olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Makrofaj Hücre Kültürü

Fare (BALB/c-erkek) RAW 264.7 makrofajları (Amerikan Doku Tipi Kültürü, Manassas, USA) Yeditepe Üniversitesi, İstanbul Laboratuvarlarından temin edilmiştir. Hücreler %10 fetal bovine serum(FBS), %1 penicillin(100 U/ mL) / streptomycin(100 µg/mL) ve 2mM L-glutamine içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) (Gibco, USA) besi yerinde üretilmiştir. Üretilen hücreler her 2 günde bir pasajlanmıştır. Hücrelerin canlılığı tripan mavisi boyası (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kullanılarak değerlendirilmiştir. Canlılık testleri sonucunda hücrelerin %90 canlı olduğu gözlemlendi. (Resim 1).



Resim 1: RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin TB ile boyanmış canlılık testi görüntüsü (x40)

Bakteriyel kültür ve büyüme koşulları

Çalışmada *E. faecalis* ve *P. intermedia* ağız klinik izolatları kullanılmıştır. İzolatlar İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarından temin edilmiştir. *E. faecalis* izolatları %5 CO₂'li ortamda 37°C'de Brain Heart Infusion (BHI) broth besiyerinde 24 saat inkübe edilmiştir. *P. intermedia* izolatları %80-90 N₂, %5-10 H₂, %5-10 CO₂ ortamında %5 koyun kanı içeren besiyerinde 48 saat inkübe edilerek üretilmiştir.

Fagositoz Deneyi

E. faecalis ve *P. intermedia* bakterileri, 1x PBS içinde 12.000 rpm 'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Bakteri pelletleri CFSE (488nm) (CellTrace™ CFSE, Life Technologies, ABD) final konsantrasyonu 500 ng/mL olacak şekilde 2 mL PBS (Phosphate buffered saline, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) içinde 8 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. CFSE etiketli bakteriler (GFP-yeşil) PBS içinde 2 kez yıkanmış ve fagositoz deneyi için hazırlanmıştır.

RAW 264.7 makrofajları DMEM besiyerinde 12 gözlü plaka içinde %5 CO₂ ortamında 37 °C'de en az 30 dk makrofaj adherensini sağlamak için inkübe edilmiştir. CFSE etiketli bakteriler, bakteri hücre konsantrasyonu 5:1(bakteri:makrofaj) olacak şekilde plakalara eklenmiştir. Plakalar 37 °C' de 60 dk inkübe edilmiştir. Hücreler, adhere olmayan bakterilerin uzaklaştırılması için 2 kez yıkanmış ve ekstraselüler floresan (hücre yüzeyinde ancak yutulmamış bakteri) %0.2 tripan mavisi boyası ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler tekrar yıkanmış ve akım sitometri(C6 BD Accur, Flow Cytometer) ile analiz edilmiştir. Ayrıca floresan görüntüleme kon-fokal Axiovert S100 mikroskobu (Carl Zeiss LSM 780 NLO) ile yapılmıştır. Negatif kontrol grubu 5 µM cytochalasin-d (Cyto D) (Cayman Chemical, Michigan ABD) ile aktin inhibe edilerek oluşturulmuştur. Floresan boyalı bakterileri içeren makrofaj sıklığı % pozitif hücre olarak tanımlanırken, makrofajların fagositoz açısından direkt fonksiyonu ölçen objektif bir birim olarak kabul edilen fagositotik indeks (PI=% pozitif hücre (CFSE) x ortalama Floresan yoğunluğu/100) ile fagositoz değerlendirilmiştir.

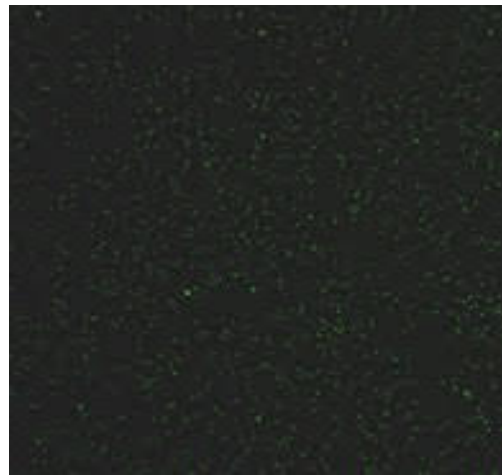
İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanılmıştır. Çalışma verileri parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Dunn's testi kullanılmıştır. Anlamlılık p<0.05 düzeyinde değerlendirilmiştir.

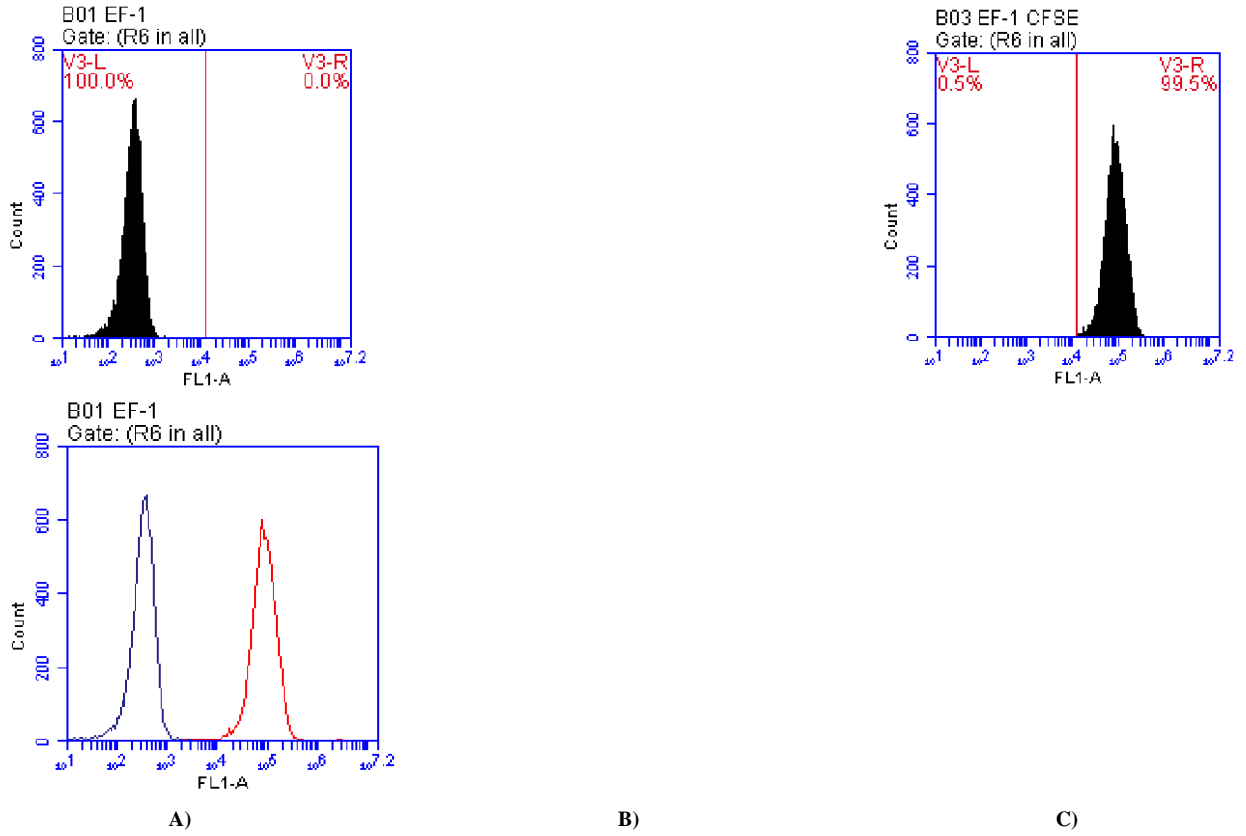
BULGULAR

Bakterilerin CFSE (FLI-A: FITC) ile Etiketlenmesi

E. faecalis ve *P. intermedia* bakterilerinin yeterince etiketlendiğini doğrulamak için akım sitometrisi yapılmış ve veriler mikroskopik görüntüler ile teyit edilmiştir. Grafik 1(a-c) ve resim 2 bakterilerin CFSE'yi etkili bir şekilde aldığını ve parlak bir şekilde floresanlandığını göstermektedir.



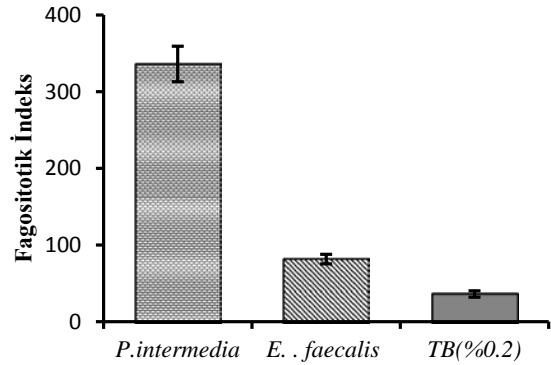
Resim 2: CFSE boyalı bakterilerin temsili fotomikrografı (x40). Görüntüler Axiovert S100 konfokal mikroskobu ile elde edilmiştir (Carl Zeiss LSM 780 NLO).



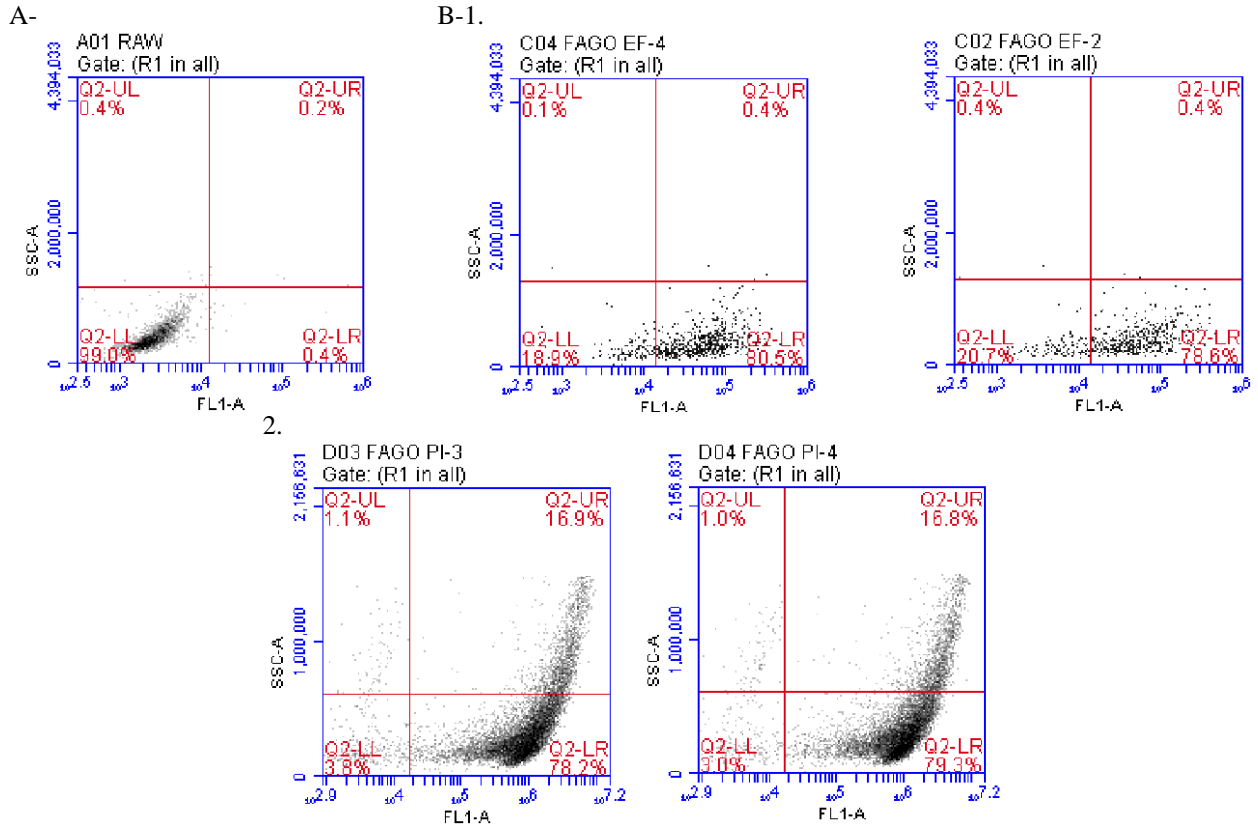
Grafik 1: Bakterilerin CFSE (500 ng/mL) ile boyanması. Etiketlenmemiş (A-negatif kontrol grubu) ve CFSE etiketli (B) bakterilerin ileri ve yan saçılma grafikleri. Bununla birlikte, etiketlenmemiş (mavi-negatif kontrol) ve CFSE (kırmızı)etiketli bakteriler arasındaki floresandaki değişimi gösterilmektedir (C).

E. faecalis, *P. intermedia*'ya göre RAW 264.7 makrofaj fagositozuna karşı daha dirençlidir

Gram pozitif anaerob bir bakteri olan *E. faecalis* ile gram negatif anaerob bir bakteri olan *P. intermedia*'nin makrofajlar tarafından *in vitro* fagositozunun sonuçları grafik 2 ve 3'de özetlenmektedir. Fagositotik indeks ölçümlerine göre, *E. faecalis*'in ortalama PI değeri 81,65 iken, *P. intermedia*'nin 336,17'dir. *P. intermedia* RAW 264.7 makrofajları tarafından istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha fazla fagosite edilmiş, *E. faecalis* fagositoza daha fazla direnç göstermiştir. ($p < 0.05$; Grafik 2). Fagositoz yüzdesi değerlendirildiğinde, *E. faecalis*'in ortalama %79.5 oranında, *P. intermedia*'nin ise %78.7 oranında fagosite edildiği gözlenmiştir. Fagositoz yüzdesi açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmamıştır (Grafik 3).



Grafik 2: *E. faecalis* ve *P. intermedia* bakterilerinin makrofajlar tarafından fagositozu. Hücreler, Cyto D ile oluşturulan negatif kontrol grubu dahil olacak şekilde adhere olmayan bakterilerin uzaklaştırılması için 2 kez yıkanmış ve ekstraselüler floresan (hücre yüzeyinde ancak yutulmamış bakteri) % 0.2 tripan mavisi boyası (TB) ile uzaklaştırılmıştır. Fagositoz, fagositotik indeks ($PI = \% \text{ pozitif hücre (CFSE)} \times \text{ortalama floresan yoğunluğu} / 100$) ile değerlendirilmiştir. Veriler 2 ayrı deney ortalamalarının ortalama(ort) \pm standart sapma (SS)'ni temsil etmektedir. * $p < 0.05$.



Grafik 3: RAW 264.7 makrofajları tarafından fagosite edilmiş bakterilerin akım sitometri dağılım grafiği analizi (fagositoz yüzdesi). A. CFSE ile etiketlenmemiş makrofaj izole hücrelerin hafif saçılma özellikleri. SSC, yan saçılma, FL1-A, GFP(yeşil) etiketli. B. Farklı bakteriler makrofaj plakalarına eklenmiş ve 1 saat inkübe edilmiştir. Sol alt kadran fagositoz edilememiş negatif hücreler, sağ alt kadran, RAW 264.7 makrofajları tarafından fagosite edilmiş GFP-etiketli *E. faecalis*(1) ve *P.intermedia* (2) türleri. Fagositoz yüzdesi her grafikte gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Makrofaj gibi fagositlerin bakteri, parazit, ölü hücreler, hücrel ve yabancı debrisleri fagosite edebilmesi inflamatuvar yanıtın erken döneminde konak savunması ve inflamasyonun çözünmesi açısından kritik bir basamak olarak kabul edilmektedir. İnflamasyonun çözünmesi, doku homeostazisinin ve doku sağlığının devamlılığı için bir esastır. Bu çalışmada, inflamatuvar bir hastalık olan periodontitiste inflamasyonun çözünmesini, farklı oral bakterilerin makrofajlar tarafından fagositoz miktarının karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın verileri, *E. faecalis*'in *P. intermedia*'ya göre RAW 264.7 makrofaj hücreleri fagositozuna karşı daha dirençli olduğunu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. Bulgularımız, *E. faecalis*'in planktonik hücrelerinin makrofajlar tarafından fagositoza karşı daha dirençli olduğunu gösteren daha önce yapılmış araştırmalarının sonuçlarını desteklemektedir^{15,16}. Baldassarri ve ark. (2005) biyofilm oluşturduğu bilinen koşullar altında üretilen *E. faecalis* suşları ile yapılan deneysel bir çalışmada, EPS pozitif hücrelerin enfekte sıçan peritoneal makrofajlarında, EPS negatif olan izojenik suşlara kıyasla 24 saatten fazla hayatta kaldığı bildirilmiştir¹⁶.

İki suş arasındaki bu hayatta kalma farkının EPS ve diğer hücre yüzeyi bileşenlerinden etkilenen biyofilm matrisi için geçerli olduğu düşünülebilir. Bununla birlikte, *E. faecalis*'in nötrofil granülositleri, monositler ve makrofajlar gibi konakçı hücrel savunma mekanizmalarından kaçınabilme yetenekleri bulunmaktadır. Gentry-Weeks ve ark. *E. faecalis*'in fare peritoneal makrofajlarında, *Lactococcus lactis* ve *Escherichia coli* gibi bağırsak florasının diğer üyelerine kıyasla hücre içinde ve hücreye karşı 72 saat daha fazla hayatta kalabildiğini göstermiştir¹⁷. Her ne kadar bizim çalışmamızda bakterilerin hücre içi canlı kalabilme kabiliyeti değerlendirilmemiş olsa da, *E. faecalis* güçlü bir periodontopatojen olan *P. intermedia* 'ya kıyasla fagositoza karşı daha fazla direnç göstermiştir. Belirtilen özellikleri nedeniyle *E. faecalis*'in periodontal inflamasyon ve doku yıkımı ile ilişkili olabilecek çeşitli virülans faktörlerine sahip olabileceği ayrıca bu bakteri türünün varlığının periodontal hastalık oluşumu için gerekli olan kompleks mikrobiyotaya çeşitli besinler ve bağlanma alanlarını sağlayabileceği düşünülebilir. Gözlemimiz bu bakterinin virülans özelliklerini kullanarak hastalık oluşturma kabiliyetini arttırdığını yansıtmada önemli olabilir.

P. intermedia 'nın konak içindeki kontrolü güçtür ve bu güçlük, *P. intermedia* 'nın birçok antibiyotiğe karşı direnci dahası biyofilm oluşturabilme yeteneğine bağlanmaktadır¹⁸. Ayrıca kök kanalı enfeksiyonlarında, özellikle *P. intermedia* ile ilişkili bakteriyel türlerin nötrofil gibi fagositik hücreler üzerindeki sitotoksik aktivitesi nedeniyle enfeksiyonların devam etmesine katkıda bulunabileceği ve bulaşıcı apseler oluşturabileceği gösterilmiştir¹⁹. *P. intermedia* 'nın fagositozu ile ilgili sonuçlarımız, Conrads ve ark.'nın(1999) bakterilerin insan PMNL'leri tarafından fagositozunu araştırdıkları çalışma sonuçları ile uyumludur. Bu çalışmada araştırmacılar *P. gingivalis* ve *P. nigrescens* suşlarının fagositoza değişen oranlarda dirençli bulunurken, *P. intermedia* suşlarının çok azının fagositoza karşı hafif dereceli bir direnci olduğunu gözlemişlerdir²⁰. Bizim bulgularımızın aksine, çalışmamızda *P. intermedia* ile karşılaştırılan *E. faecalis*'e benzer anaerobik gram pozitif bir kok olan *Streptococcus milleri* 'nin dentoalveoler apselerden izole edilen serum ile opsonize *P. intermedia*' ya göre PMNL'ler tarafından daha kolay fagosite edildiği bildirilmiştir²¹. Bu sonuçlar bizim bulgularımızı desteklememektedir. Verilerdeki tutarsızlık, kullanılan metodoloji ve bakteri suşlarının kaynağı gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilmektedir. Geçmişte yapılan ilgili araştırmalar genellikle sadece geleneksel plaka sayma tekniği ile fagositoz yüzdesini hesabıyla gerçekleştirilmiştir²¹. Fagositoz yüzdesi makrofajlar tarafından yutulan bakterinin objektif miktarını yansıtmayabilir. Bu çalışmada ise, FACS (Fluorescence-activated cell sorting) ve adhere olmayan bakterilerin uzaklaştırılması gibi ek, daha ileri hücre biyolojik yaklaşımları kullanılmıştır.

Periodontitis ile ilişkili patojenlerin 2 ana fagositik hücre olan nötrofil ve makrofajlar tarafından fagositozunu inceleyen farklı çalışmalar bulunmaktadır^{22,23}. Lenzo ve ark. (2016) opsonize olmayan farklı suşlardaki *P. gingivalis* 'lerin, makrofaj ve nötrofiller tarafından fagositoz miktarını değerlendirdikleri bir çalışmada, makrofaj ve nötrofillerin farklı *P. gingivalis* suşlarının, fagosite olma miktarında farklılıklar olduğunu ve bu farklılıkların suşların kapsül, dış zar veya fimbriadaki farklılıklara bağlanabileceğini bildirmişlerdir²³. Ayrıca araştırmacılar, kompleman-3 reseptörüne bakteriyel fimbrianın bağlanması ile *P. gingivalis*'in makrofaj istilasından kaçabileceğini ve ortamın pH'sını düşürerek fagositoza karşı direnç gösterebileceğini ileri sürmüştür. Periodontopatojen bir diğer bakteri olan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 'ın yüzeyinde fimbria varlığı nedeniyle agregasyon ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir²⁴. Ayrıca fimbria varlığı nedeniyle *A. actinomycetemcomitans* 'ın fagositik hücre reseptörleri ile bakteriyel yüzeydeki opsoninler arasındaki teması önleyerek fagositozunu engellediği gösterilmiştir²⁵. Bu

özellikler *A. actinomycetemcomitans* 'ın bağışıklık yanıtının erken aşamalarında hastalığın ilerlemesini hızlandıracak faktörleri etkileyebildiğini göstermektedir.

Birçok inflamatuvar hastalığın ilerlemesinde bakterilerin fagositoza karşı direnci ve bakterilerin konak hücrelerine invaze olma yetenekleri önemli basamakları oluşturmaktadır. Normal floradaki bakterilerin periodontopatojenler gibi bir kısmı, potansiyel patojeniteye sahip olabilmektedir. Bu patojenlerin hücre içi hayatta kalma yeteneği ve hücrelere karşı gösterdiği cevap, bakterilerin bağışıklık sisteminden kaçmasına ve muhtemelen yayılmasına olanak sağlayarak periodontitis gibi kronik inflamasyona sebep olabilir. Bu çalışmada, ağız mikrobiyomunda yer alan periodontal hastalık açısından farklı patojenitelere sahip *P. intermedia* ve *E. faecalis*'in makrofaj fagositozu açısından değerlendirilmiştir. Farklı oral bakterilerin deneysel olarak makrofajlar tarafından fagositozlarının değerlendirilmesi, periodontal hastalıklarda mikrobiyomun davranışını açıklamaya yardımcı olabilecektir. Bununla birlikte, bakteriyel fagositozun bakteri türüne göre makrofaj cevabını dolayısıyla periodonsiyumda hastalığı tetikleyip tetiklemediğini belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Özet olarak, patojenik bakterilerin fagositik sürecini etkilediği mekanizmaları anlamak için fagositozdaki tüm adımların ve bakterilerin virülans faktörlerinin bu adımlar üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmadaki yaklaşımımız, periodontal hastalıkta rolü olduğu bilinen ve patojeniteleri birbirinden farklılık gösteren 2 oral bakterinin makrofaj hücreleri ile etkileşiminde fagositoz adımının periodontal inflamasyon açısından bulgular sağlayan analizler kullanarak incelenmesini sağlamıştır.

SONUÇ

Bakterilerin, fagositozu modüle edebilme yetenekleri periodontitis ve benzeri inflamatuvar hastalıkların patogenezinin önemli bir basamağını oluşturmaktadır. Bu deneysel çalışma, ağız için hastalıklarda rollere sahip olduğu bilinen bakterilerden, *E. faecalis* 'in makrofajlar tarafından fagositoza karşı *P. intermedia*'ya göre daha dirençli olduğunu göstermiştir. Bağışıklık sistemi ve mikrobiyom arasındaki ilişkilerin insan sağlığına katkıda bulunmasının önemine dair artan kanıtlar ışığında, bu etkileşimlerin mekanizmalarını anlamak, özellikle antimikrobiyal direncin artan prevalansı göz önüne alındığında, yeni önleyici ve terapötik yaklaşımlar için kritik önem taşımaktadır. Sonuç olarak, bakterisavunma hücreleri ilişkisini değerlendirecek ilave çalışmalara hücre cevabı ve inflamasyonun farklı yönleri açısından ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000* 2007; 75(1):317-329.
2. Radakovic S, Andreoli N, Schmid S et al. Taurolidine Acts on Bacterial Virulence Factors and Does Not Induce Resistance in Periodontitis-Associated Bacteria-An In-Vitro Study. *Antibiotics* 2020; 7:9(4).
3. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(12):964-74.
4. Olivares-Morales MJ, De La Fuente MK, Dubois-Camacho K et al. Glucocorticoids Impair Phagocytosis and Inflammatory Response Against Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *Front Immunol* 2018; 9:1026.
5. Kaur S, White S, Bartold PM. Periodontal disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Dent Res* 2013; 92(5):399-408.
6. Finegold SM, Strong CA, McTeague M, Marina M. The importance of black pigmented gram-negative anaerobes in human infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994; 6(2-3):77-82.
7. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms:difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002; 28:12-55.
8. Bulkacz J, Faull KF. Multiple extracellular phospholipase activities from *Prevotella intermedia*. *Anaerobe* 2009; 15(3):91-4.
9. Yamanaka T, Yamane K, Furukawa T et al. Comparison of the virulence of exopolysaccharide-producing *Prevotella intermedia* to exopolysaccharide non-producing periodontopathic organisms. *BMC Infect Dis* 2011; 11:228.
10. Bayram E., Özkoçak I. Role and Treatment of the Enterococcus Faecalis in Secondary Endodontic Infections. *Kocatepe Medical Journal* 2014; 15(1):79-84.
11. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of Enterococcus faecalis With Different Forms of Periradicular Diseases. *Journal of Endodontics* 2004; 30(5):315-20.
12. Souto R, Colombo AP. (2008) Prevalence of Enterococcus faecalis in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol* 2008; 53(2):155-60.
13. Kayaoglu G1, Ørstavik D. Virulence factors of enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(5):308-20.
14. Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K et al. Enterococcus faecalis bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun* 1999; 67(11):6067-75.
15. Daw K., Baghdayan AS, Awasthi S, Shankar N. (2012) Biofilm and planktonic Enterococcus faecalis elicit different responses from host phagocytes in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 65:270-282.
16. Baldassarri L, Bertuccini L, Creti R et al. Glycosaminoglycans mediate invasion and survival of Enterococcus faecalis into macrophages. *J Infect Dis* 2005; 191: 1253-1262.
17. Gentry-Weeks CR, Karkhoff-Schweizer R, Pikiş A, Estay M, Keith JM. Survival of Enterococcus faecalis in Mouse Peritoneal Macrophages. *Infection and Immunity* 1999; 67(5):2160-5.
18. Burns E, Eliyahu T, Uematsu S, Akira S, Nussbaum G. TLR2-dependent inflammatory response to Porphyromonas gingivalis is MyD88 independent, whereas MyD88 is required to clear infection. *J Immunol* 2010; 184(3):1455-1462.
19. Matsui A, Jin JO, Johnston CD, Yamazaki H, Hourihaddad Y, Rittling SR. Pathogenic Bacterial Species Associated with Endodontic Infection Evade Innate Immune Control by Disabling Neutrophils. *Infect Immun* 2014; 82(10):4068-79.
20. Conrads G, Herrler A, Moonen I, Lampert F, Schnitzler N. Flow cytometry to monitor phagocytosis and oxidative burst of anaerobic periodontopathic bacteria by human polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res* 1999; 34(3):136-44.
21. Lewis MA, Milligan SG, MacFarlane TW, Carmichael FA. Phagocytosis of bacterial strains isolated from acute dentoalveolar abscess. *J Med Microbiol* 1993; 38(2):151-4.
22. Ji S, Hyun J, Park E, Lee BL, Kim KK, Choi Y. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. *J Periodont Res* 2007; 42(5):410-419.
23. Lenzo JC, O'Brien-Simpson NM, Cecil J, Holden JA, Reynolds EC. Determination of Active Phagocytosis of Unopsonized Porphyromonas gingivalis by Macrophages and Neutrophils Using the pH-Sensitive Fluorescent Dye pHrodo. *Infect Immun* 2016; 84(6):1753-1760.
24. Permpnich P., Kowolik MJ., Galli DM. (2006) Resistance of Fluorescent-Labelled Actinobacillus Actinomycetemcomitans Strains to Phagocytosis and Killing by Human Neutrophils. *Cell Microbiol* 2006; 8(1):72-84.
25. Holm A., Kalfas S., Holm SE. (1993) Killing of Actinobacillus Actinomycetemcomitans and Haemophilus Aphrophilus by Human Polymorphonuclear Leukocytes in Serum and Saliva. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(3): 134-140.