

BARTONELLA HENSELAE TARAFINDAN UYARILAN ANJİOGENEZİN, İN VİVO MODEL OLARAK YUMURTA AÇIĞINDA, KABUKSUZ TAVUK EMBRİYOSU KÜLTÜRÜ ÜZERİNDE, KORYOALLANTOİK MEMBRANDA GÖSTERİLMESİ

Dr. Çağrı Ergin,¹ Dr. A. Çevik Tufan,² Dr. Cansev Yılmaz¹

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Denizli

² Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Denizli

ÖZET

Amaç: *Bartonella henselae* tarafından uyarılan anjiogenez (BIA) HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) gibi modellerde in vitro olarak gözlemlenebilmektedir. Anjiogenezin kanser ve ilaç araştırmalarında araştırıldığı farklı in vivo modellerden biri de koryoallantoik membran (CAM) modelidir. Bu çalışmada, daha önceden onkolojik anjiogenezin gösterilmesinde kullanılan YAKTEK (Yumurta açığında kabuksuz tavuk embriyosu kültürü) yöntemi CAM modeli ile birleştirilerek BIA için in vivo model olarak tanımlanmaktadır.

Materyal ve Metod: Fertilizasyondan 72 saat sonra, 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilen 8 YAKTEK modelinin her deney ve kontrol CAM bölgesine, damarların çatallanma yerlerinden 3-5 mm uzağa steril distile suda yoğun süspansiyon edilen 3 tane *B.henselae* (ATCC 49882) ile kaplanmış boncuklar bırakıldı. Boncuklar 40. ve 62. saatlerde uzaklaştırılarak altlarındaki 4 mm²lik alanlarda oluşan yeni damarlanma yapılarını kontrol grupları ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Deneyin 40. saatinde, birim alan başına, deney grubunda 22,8±1,4; kontrol grubunda 8,3±0,7 neovaskülarizasyon izlenirken, 62. saatte deney grubunda 25,6±1,8, kontrol grubunda 9,4±0,9 neovaskülarizasyon saptandı (p<0,001).

Sonuç: YAKTEK modelinde BIA varlığı gösterilmiştir. Bu modelin anjiogenez çalışmalarında kullanılması yönünden üstünlükleri bulunmaktadır. Bunlar kısaca; (a) ucuzdur, zaman ve iş gücü yönünden avantajlıdır; (b) uygulanan deney döneminde civiv embriyolarının immün sistemi aktif olmadığından ajana bağlı immün yanıt bulunmamaktadır, etki bakteriyeye doğrudan bağlıdır; (c) tek kültür ortamında farklı odaklarda birden fazla deney yapılabilir; (d) sistemin tekrarlanabilirliği kolaydır; (e) doku eldesi ve fotoğraflama kolay ve demonstratiftir. YAKTEK modelinin BIA'nın gösterilmesinde geçerli bir yöntem olduğu, anjiogenezin etyopatogeneze sorgulandığı bakteriyel etkenler içinde uygulanabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Bartonella henselae*, anjiogenezis, uyarıcı ajanlar, koryoallantoik membran **Nobel Med** 2012; 8(3): 108-112

DEMONSTRATION OF BARTONELLA HENSELAE-INDUCED ANGIOGENESIS USING CHORIOALLANTOIC MEMBRANE ASSAY ON SHELL-LESS CULTURE OF THE CHICK EMBRYO AS IN VIVO MODEL

ABSTRACT

Objective: Angiogenesis induced by *Bartonella henselae* has been demonstrated in in vitro model systems such as HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells). However, one of the in vivo model systems allowing angiogenesis studies in cancer and drug discovery studies is the chorioallantoic membrane (CAM) model. In this study, shell-less culture of the CAM has been utilized as the in vivo model for the demonstration of *Bartonella henselae* induced angiogenesis.

Material and Method: Eight shell-less CAM cultures were established 72 hours after first incubation of fertilized eggs at 37°C and 5% CO₂. One half of each CAM was used as the study group and in this half 3 *B.henselae* (ATCC 49882) soaked beads were planted in bifurcations of previously established vessels. The other half was used as a control, and sterile distilled water soaked beads were planted in bifurcations of previously established vessels.

Beads were removed after 40 and 62 hours of incubation, and newly formed vessels were counted in a 4-mm² area under each bead.

Results: Neovascularization in the study group was significantly higher than that in control group (22.8±1.4 versus 8.3±0.7, respectively; p<0.001) at 40 hours of incubation. This significance was also observed at 62 hours of incubation (25.6±1.8 versus 9.4±0.9, respectively; p<0.001).

Conclusion: *Bartonella henselae* induced angiogenesis has been demonstrated in shell-less culture of CAM. This model has advantages for angiogenesis studies. These include: (a) cost efficiency (eggs, time, labor, etc.); (b) no mature immune system is available in these CAMs, thus the observed effect is attributed to the bacteria tested; (c) allowing multiple tests on individual CAMs; (d) easy reproducibility; (e) tissue sampling and photography is easily performed. Thus, shell-less culture of the CAM may be utilized in studies testing angiogenic activity of many agents including other bacteria.

Key Words: *Bartonella henselae*, angiogenesis, inducing agents, chorioallantoic membrane *Nobel Med 2012*; 8(3): 108-112

GİRİŞ

Mikrodamarların gelişmesi olarak tanımlanan anjiogenez; yara iyileşmesi, mensturasyon, gebelik ve organ oluşumu sırasında fizyolojik olarak meydana gelmektedir. Anjiogenezin patofizyolojisi hakkında araştırmaların en yoğun yapıldığı yapılar benign ve malign tümöral oluşumlardır. İndüklenen anjiogenezin bulunduğu dokularda farklı virüslerin (papova ve herpesvirüsler) in vivo varlıkları saptanmış ve anjiogeneze etki mekanizmaları gösterilebilmiştir. Ancak bakterilerin uyardığı anjiogenezin patofizyolojisi henüz açıklanamamıştır. İnsanlarda *Bartonella henselae* kanlı kistlerle karakterize peliozis hepatitis'e ve *Bartonella bacilliformis* basiller anjiomatöz ile hemanjioma benzer lezyonların oluştuğu verruga peruana gibi hastalıklara neden olur. Bu bakterilerin in vitro ortamda neonatal dermal mikrovasküler endotelial hücreler (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) kullanılarak yapılan kültürlerinde anjiogenezi uyardığı gösterilmiştir.^{1,2} Henüz *Bartonella* enfeksiyonlarının etyopatogenezinin çalışılabilirdiği in vivo model tanımlanmamıştır.

İn vivo ortamda tümöral anjiogenez ve invazyon çalışmalarında tanımlanan modeller bulunmaktadır.³ Bu modeller aynı zamanda enfeksiyöz patojenlerin patofizyolojik mekanizmalarının incelenmesinde de kullanılabilmektedir. Bu model sistemlerden en iyi

tanımlanmış olanlardan bir tanesi gelişmekte olan civciv embriyolarının koriyoallantoik membranlarının kullanıldığı modeldir. Bu modelin kullanımını kolaylaştıran ve deneylerin eks-ovo ortamda gerçekleştirilmesini sağlayan bir kültür sistemi daha önce "Yumurta Açığında Kabuksuz Tavuk Embriyosu Kültürü" (YAKTEK) olarak tanımlanmıştır.⁴ Bu modelde immün sistem henüz aktif değildir. Elde edilen veriler doğrudan etkiyi oluşturan patojene aittir.

Sunulan çalışmada; ucuz, kolay ve hızlı değerlendirilebilen YAKTEK sisteminde, civciv yumurtası koriyoallantoik membranı üzerinde, *B.henselae*'nin oluşturduğu anjiogenez in vivo modelde tanımlanmaktadır.

MATERYAL ve METOD

Sunulan çalışmada daha önceden anjiogenez modeli için tanımlanan YAKTEK modeli kullanıldı.⁴ Kısaca; YAKTEK sistemi, yolk kesesi ve albumin ile ilişkisi korunmuş tavuk embriyolarını içermektedir. Kabuk ve beraberindekiler membranlardan ayrılır ve yapının yumurtanın dışında, kültür ortamında büyümele-ri sağlanır. Tavuk yumurtaları fertilizasyonu takiben 37,5°C'da, nemlendirilmiş ortamda, 48-72 saat kuluçka makinasında inkübe edilir. Steril şartlarda uygun teknik ile kırılarak, yumurta içeriğinin bütünlüğüne zarar verilmez ve önceden hazırlanarak UV altında →

BARTONELLA HENSELAE TARAFINDAN UYARILAN ANJIOGENEZİN, İN VIVO MODEL OLARAK YUMURTA AÇIĞINDA, KABUKSUZ TAVUK EMBRİYOSU KÜLTÜRÜ ÜZERİNDE, KORYOALLANTOİK MEMBRANDA GÖSTERİLMESİ

sterilize edilen, plastik çemberler üzerine yerleştirilen, yarı geçirgen film torbalarına aktarılır. Üstleri petri kutusu kapakları ile kapatılarak yine 37,5°C'de ve nemlendirilmiş inkübatörlerde saklanır. Tavuk embriyoları bu model sistem ile en az 14. gestasyonel güne kadar büyütülebilmektedirler.^{3,4}

Deneyde standart *B.henselae* ATCC 49882 (Houston-1) kökeni kullanıldı. %5 at kanlı besiyesinde üretilen *B.henselae* kökeni steril distile su içinde yoğun süspansiyon edilerek 3 defa yıkandı. Son süspansiyon 2 cc hacminde hazırlandı. Süspansiyonun içine çapları 0,8 mm olan steril boncuklar bırakılarak 2 dakika vorteksledi. Boncuklar 5 dakika süre ile oda ısısında dik durumdaki tüpte süspansiyon içinde bekletildi. Aynı zamanda bakteriyi içermeyen steril distile su içine de kontrol boncukları bırakıldı. Deney için kullanılan boncuklar deney öncesi 121°C'da 15 dakika süre ile otoklavda steril edildi.

Deneyde kullanılacak tavuk yumurtaları T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tavukçuluk Araştırma Enstitüsünden sağlandı. YAKTEK kültür sistemi üzerinde koryoallantoik membran modeli (CAM) uygulandı.³ Üç gün süre ile yumurta inkübatöründe 37°C ve nemli ortamda bekletilen 8 yumurta deneyin başlangıç gününde yukarıda tarif edildiği şekilde hazırlandı.⁴ Her embriyoya ait koryoallantoik membran sanal olarak sağ ve sol iki yarıya ayrıldı ve sağ yarılar deney grubu, sol yarılar ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Deney grubu boncuklarından birer tanesi koryoallantoik zarın sağ yarısı üzerinde, ana damarlanmanın dallanma gösterdiği 3 ayrı bölgedeki çatallanma noktalarından periferde doğru yaklaşık 3-5 mm uzağa bırakıldı (Şekil 1). Sol yarıda ise 3 farklı benzer bölgeye, steril distile suda bekletilen boncuklardan birer tane yerleştirildi. İşleme alınan yumurtalar, yumurta inkübatöründe, 37°C'de ve nemli ortamda 72 saat süre ile (embriyonik gestasyonel 4-6. günler sürecinde) takibe alındı. Deneyin 40. saatinde 2 yumurtanın koryoallantoik membranındaki veriler değerlendirilirken, diğer örnekler 62. saat içinde değerlendirildi. Değerlendirme için damarların çatallanma noktalarına yerleştirilen boncuklar kaldırılarak bu bölgede yeni oluşan damarlar disseksiyon mikroskobu altında görüntüledi.

Elde edilen verilerin deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak karşılaştırılabilmesi için; 4 mm²lik kare şeklindeki bir birim alan bilgisayar ekranı üzerindeki görüntülere kalibre edildi. Bu alan içerisinde yer alan mikrodamar sayısı hesaplandı.³ İki grup arasındaki farkın istatistiksel karşılaştırılması Mann Whitney-U testi ile yapıldı (EPI Info 2000 ver 3.3.2 CDC, Atlanta, ABD) ve istatistiki hata payı %5 kabul edildi.

Laboratuvarımızda YAKTEK model sisteminin benzer çalışmalarda uygulanabilmesi Pamukkale Üniversitesi

Tıbbi Etik Kurulu tarafından (No: 2002/42) onaylanmıştır.

BULGULAR

Araştırmada 8 yumurtanın her birine 3 kontrol ve 3 deney boncuğu ($n_{\text{deney}}=24$; $n_{\text{kontrol}}=24$) olarak uygulandı. Deney süresince boncukların koryoallantoik zarın içine gömülmesi ve/veya boncukların ortamdan uzaklaştırılırken değerlendirme bölgelerinin hasar görmesi nedeni ile, 40. ve 62. saatte her deney grubu boncuğa aynı koryoallantoik membran üzerinde olan bir kontrol grubu boncuk karşılık gelmek şartıyla, deney grubunda 6'şar ve kontrol grubunda 6'şar boncuk değerlendirmeye alındı.

Deney grubu ($n_{\text{deney},40.\text{saat}}=6$) 40. saatinde ana damarlar arasında boncukların yerleştirildiği bölgelerde birim alan başına $22,8\pm 1,4$, kontrol grubunda ($n_{\text{kontrol},40.\text{saat}}=6$) ise birim alan başına $8,3\pm 0,7$ neovaskülarizasyon izlendi ($p<0,001$). Grupların 62. saat sonuçlarında ($n_{\text{deney},62.\text{saat}}=6$; $n_{\text{kontrol},62.\text{saat}}=6$) değerlendirmelerinde birim alan başına deney grubunda $25,6\pm 1,8$, kontrol grubunda $9,4\pm 0,9$ neovaskülarizasyon saptandı ($p<0,001$) (Şekil 2).

TARTIŞMA ve SONUÇ

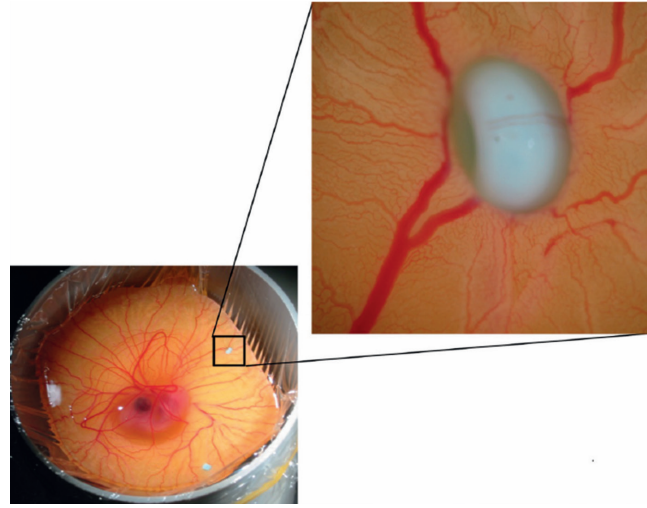
Günümüzde yeniden önem kazanan infeksiyon etkenleri arasında bulunan *B.henselae*, sessiz klinik tablo oluşturması nedeni ile birçok klinik tablonun etyolojisinde sorgulanmaktadır. Sıklıkla kedi tırmığı hastalığı etkeni olarak bilinen *B.henselae*'ye bağlı infeksiyonların etyopatogenezi konusunda en sık araştırmanın yapıldığı konu, anjiogenezi uyarmasıdır. Bartonella tarafından uyarılan anjiogenez (BIA)'in organizmada makrofajları etkilemesi, IL-8'i artırması, hücre içi kalsiyum metabolizmasına etkileri farklı modeller üzerinde gösterilmiştir.^{1,2,5-7} Bartonella tarafından infekte edilen konak hücrelerden vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) salgılanmasının, yakın ve uzak dokularda endotelial proliferasyonun artmasına neden olduğu düşünülmektedir.^{8,9} Bartonellozun oluşturduğu kanlı karaciğer kistleri (peliosis hepatis) ve dalak lezyonları bu hipotezleri destekler niteliktedir. Benzer şekilde Bartonella infeksiyonlarında cilt lezyonları da çevresinde bozuk ve farklı şekillerde endotelial hücrelerin bulunduğu çoğalan immatür kan damarları ile çevrilidir. BIA ise tümör anjiogenezine benzemektedir. Anjiogenez çok sayıda moleküler ve fizyolojik basamak ile organize edilmektedir. BIA ise bu basamakların bazı aşamalarında aktiftir ve antibiyotik tedavisi ile bu aşamalar durdurulabilmekte ve geri dönebilmektedir. Bu durum, BIA'nın benign, bakterilerin varlığına bağlı, geri dönüşümlü bir yapılanma olduğunu göstermektedir.^{1,10-12} →

Farklı bir çalışma ise, *B.henselae*'nin dolaşımında bulunan endotelial progenitor hücreleri stabilize ederek, doku düzeyinde oluşan patolojik olayların çoğalmasına neden olduğunu bildirmekte, bu mekanizmanın sepsis, doku iskemisi, anjiogenez ve immün cevapta önemli olduğunu ileri sürmektedir.¹³ Bu sonuçlar in vitro ortamlardaki yürütülen *B.henselae* patogenezi çalışmaları ile elde edilmiştir.

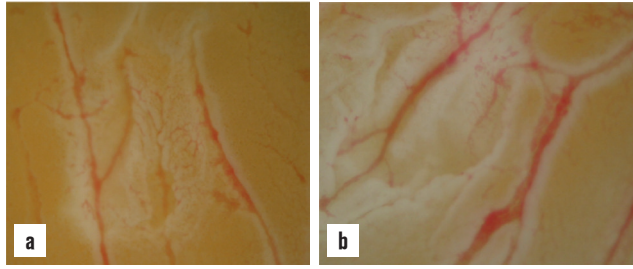
Özellikle nedeni bilinmeyen, ancak etyopatogenezinde anjiogenezin varlığının gösterildiği hastalık grupları *B.henselae* infeksiyonları yönünden sorgulanmaktadır.¹²⁻¹⁶ *B.henselae*'nin kültürlerde güç üretilebilmesi, HUVEC, insan mikrovasküler endotelial hücreleri (HMEC-1) gibi modellerde intrasellüler çalışılabilmesi, seroloji ve moleküler yöntemler ile tanısındaki problemler *B.henselae* ile araştırma imkanlarını sınırlamaktadır. Aynı zamanda bakterinin oluşturduğu infeksiyonun ileri evrelerindeki değişiklikler öngörülemezdir. Hücre kültürü yöntemlerinde, bakterinin kendisine ait oluşumlar ve özellikleri incelenebilmektedir. Bu yöntemler ile hücre-hücre ve çevre-hücre ilişkileri gözlemlenebilmektedir. Aynı zamanda Bartonella bakterileri içeren besiyerlerinde hücre düzeyindeki etki in vitro araştırılabilmektedir.⁷

Sunulan çalışmada tarif edilen yöntem, in vivo bakteri olan *B.henselae*'nin konakta oluşturduğu enfeksiyonlarda BIA'nın gözlemlenebileceği bir modeli tanımlamaktadır. Elde edilen veriler bakterinin konak dışında oluşturduğu enfeksiyonların meydana getirdiği yapılanmaları göstermiştir ve *B.henselae*'nin meydana getirdiği anjiogenez in vivo ortamda değerlendirilebilmektedir.

Bu çalışmada temelinde civciv embriyolarının gelişimleri sürecinde koryoallantoik membranlarını potansiyel anjiogenik deney ortamı olarak kullanan bu sistem YAKTEK tekniği ile birleştirilmiştir.^{3,4} Bu deney düzenine diğer olası in vivo memeli anjiogenez model sistemlerinden farklılıkları ve üstünlükleri vardır: ucuzdur (kültür materyali yumurtadır, zaman ve iş gücü yönünden avantajlıdır); civciv embriyolarında gelişim sürecinde immün sistem aktif olmadığından, anjiogenez gibi özellikle immün yanıtta da önem taşıyan bir olgu sadece denenmekte olan enfeksiyöz ajan



Şekil 1. İn-vivo anjiogenez çalışma düzeni (62. saat)



Şekil 2. Anjiogenezin in-vivo modelde gösterilmesi. (a) Damarlanmanın arttığı test bölgesi, Pozitif sonuç, Deney grubu, 40. saat; (b) Negatif sonuç, Kontrol grubu, 62. saat

yönü ile değerlendirilebilmekte, ajana bağlı immün yanıt söz konusu olmamaktadır; tek kültür ortamında farklı odaklarda birden fazla deney yapılabilen, kontrol ve deney grupları eş membran üzerinden test edilebilmektedir; sistemin tekrarlanabilirliği kolaydır ve dolayısı ile yüksek denek sayılarına kolaylıkla ulaşılabilir; istemden doku eldesi ve fotoğraflama oldukça kolay ve demonstratiftir ve sisteme ait biyolojik ve fizyolojik literatür zengindir, ancak sunulan çalışma bakteriyel patogenezi çalışmalarındaki ilk rapordur.

Çalışmamız temel laboratuvar şartlarında oluşturabilecek, eksternal etkilere ve bu etkilerin karşılaştırmalı değerlendirmelerine açık olan bu sistemi kullanarak *B.henselae*'nin meydana getirdiği anjiogenezin in-vivo ortamda değerlendirilebildiğini göstermiştir. Bu durum patojenin tedavisine yönelik ileriki araştırmalarda in vivo şartları sağlayabilir.

Dr. Çağrı Ergin Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Denizli cagri@pau.edu.tr
22 / 02 / 2010 • 17 / 02 / 2011

KAYNAKLAR

1. Kirby JE. In vitro model of Bartonella henselae-induced angiogenesis. Infect Immun 2004; 72: 7315-7317.
2. Cerimele F, Brown LF, Bravo F et al. Infectious angiogenesis: Bartonella bacilliformis infection results in endothelial production of angiopoietin-2 and epidermal production of vascular endothelial growth factor. Am J Pathol 2003; 163: 1321-1327.
3. Tufan AC, Satioglu-Tufan NL. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. Curr Cancer Drug Targets 2005; 5: 249-266.

BARTONELLA HENSELAE TARAFINDAN UYARILAN ANJIOGENEZİN, İN VİVO MODEL OLARAK YUMURTA AÇIĞINDA, KABUKSUZ TAVUK EMBRİYOSU KÜLTÜRÜ ÜZERİNDE, KORYOALLANTOİK MEMBRANDA GÖSTERİLMESİ

4. Tufan AC. Yumurta açığında, kabuksuz tavuk embriyosu kültürü (Yaktek) modeli: uygulaması ve bilimsel kullanım alanları. Pamukkale Üniv Tıp Fak Derg 2002; 8: 4-9.
5. McCord AM, Resto-Ruiz SI, Anderson BE. Autocrine role for interleukin-8 in Bartonella henselae-induced angiogenesis. Infect Immun 2006; 74: 5185-5190.
6. Resto-Ruiz SI, Schmiederer M, Sweger D, et al. Infect Immun Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during Bartonella henselae infection. Infect Immun 2002; 70: 4564-4570.
7. McCord AM, Cuevas J, Anderson BE. Bartonella-induced endothelial cell proliferation is mediated by release of calcium from intracellular stores. DNA Cell Biol 2007; 26: 657-663.
8. Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, et al. Evidence of a leading role for VEGF in Bartonella henselae-induced endothelial cell proliferations. Cell Microbiol 2001; 3: 623-632.
9. Maeno N, Oda H, Yoshiie K, et al. Live Bartonella henselae enhances endothelial cell proliferation without direct contact. Microb Pathog 1999; 27: 419-427.
10. Chian CA, Arrese JE, Pierard GE. Skin manifestations of Bartonella infections. Int J Dermatol 2002; 41: 461-466.
11. Scheidegger F, Ellner Y, Guye P, et al. Distinct activities of Bartonella henselae type IV secretion effector proteins modulate capillary-like sprout formation. Cell Microbiol 2009; 11: 1088-1101.
12. Dehio C. Bartonella-host-cell interactions and vascular tumour formation. 2005; Nat Rev Microbiol 2005; 3: 621-631.
13. Salvatore P, Casamassimi A, Sommese L, et al. Detrimental effects of Bartonella henselae are counteracted by L-arginine and nitric oxide in human endothelial progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105: 9427-9432.
14. Berryessa NA, Johnson LR, Kasten RW, Chomel BB. Microbial culture of blood samples and serologic testing for bartonellosis in cats with chronic rhinosinusitis. J Am Vet Med Assoc 2008; 233: 1084-1089.
15. H Fischer A, van der Loo B, M Shär G, et al. Serological evidence for the association of Bartonella henselae infection with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Clin Cardiol 2008; 31: 469-471.
16. Levy I, Rolain JM, Lepidi H, et al. Is pyogenic granuloma associated with Bartonella infection? J Am Acad Dermatol 2005; 53: 1065-1066.