

İmmunosuprese BALB/c farelerde deneysel tüberküloz peritonit modeli*

Gönül Aslan¹, Mustafa Ulukanlıgil¹, İlyas Özardalı²

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi ¹Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ve ²Patoloji Anabilim Dalları, Şanlıurfa

Amaç: Kontrolsüz diabetes, lenfoma, gastrektomi, silikozis gibi durumlarda, immunosupresif ve steroid tedavilerinde ve kanserli hastalarda tüberküloz oluşma riski artmaktadır. Bu çalışmada immunosupresyon uygulanan ve uygulanmayan farelerde tüberküloz peritonit oluşum sürelerini ve histopatolojik olarak organ tutulumlarını karşılaştırmayı amaçladık. **Yöntem:** Çalışmamızda 12 immunosupresyon yapılan ve 12 sağlıklı, toplam 24 BALB/c fare kullanılmıştır. İmmunosupresyon yapılan ve yapılmayan sağlıklı fareler 10x5 CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* içeren solusyondan 0.1 ml intraperitoneal yolla enfekte edilmiştir. **Bulgular:** İmmunosupresif grupta ileri derece asit, tüm organlarda solukluk, hepatosplenomegali ve ince barsak anslarında ileri derecede genişleme tespit edilmiştir. İmmunosupresyon yapılmayan grupta az miktarda asit, organlarda solukluk ve barsak anslarında minimal düzeyde genişleme gözlenmiştir. **Sonuç:** İmmunosupresif grupta alınan örneklerin histopatolojik incelemesinde peritoneal yağlı doku ve akciğerlerde epitelooid histiositler tarafından oluşturulmuş granülom yapıları görülmesi, ancak sağlıklı grupta granülom yapılarına raslanmaması iki grup arasındaki anlamlı farkı ifade etmektedir.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, İmmunosupresyon, fare, peritonit

Experimental tuberculosis peritonitis model in immunosuppressed BALB/c Mice

Objective: The risk of infected by tuberculosis is increased at patients with lenfoma, silicosis or cancer and undergoing gastrectomy and taking immunosuppressive and steroid therapy. **Methods:** In this study, 12 BALB/c mice injected immune suppressive drugs and 12 normal BALB/c mice were used. We compared these two groups mice for suffering peritonitis and histopathological changes of visceral organs. 0.1 ml *Mycobacterium tuberculosis* strain concentrated in 10⁵ CFU/ml was injected intraperitoneally all of the mice. **Results:** More ascites, palening of visceral organs, hepatosplenomegali and widening of small intestinal loop were observed in mice given immunosuppressive drugs. Otherwise less ascites, palening of visceral organs, minimal widens of small intestines loop were observed in normal mice. **Conclusion:** Histopathological investigations revealed of fatty peritoneal tissues and granulomas consisted of epitelooid histiocytes in mice given immunosuppressive drug whereas such changes were not observed in normal mice.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, immunosuppression, mice, peritonitis

Genel Tıp Derg 1999;9(4):131-134.

*Bu çalışma, 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresinde (3-8 Ekim 1999, Antalya) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi: Yrd.Doç.Dr.Gönül Aslan, Harran Üniversitesi Araştırma Hastahanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, 63100-Şanlıurfa

Tüberküloz (Tbc) insidansı, 1980'li yıllarda sosyoekonomik durumun iyileşmesi, kemoterapötiklerin kullanımı ve hijyen kurallarına dikkat etme ile önemli ölçüde azalmasına rağmen, son yıllarda genç erişkinlerde Tbc insidansının hızla arttığı gözlenmektedir. Batı ülkelerindeki AIDS

olgularının bu artışta rol oynadığı düşünülmektedir. Ekstrapulmoner Tbc AIDS hastalarında immun yetmezliği olmayanlara göre daha yüksek oranda gözlenmektedir. Ayrıca yakın zamanlarda bu hastalarda yüksek oranda intestinal Tbc'ye rastlanmaktadır (1,2). Bununla birlikte kontrolsüz diabet, lenfoma, postgastrektomi, silikozis gibi durumlarda, İmmunosupresif ve steroid tedavilerinde ve kanserli hastalarda Tbc riski artabilir (3,4). İmmunosupresyon uygulanan ve uygulanmayan farelerde tüberküloz peritonit oluşum sürelerini ve histopatolojik olarak organların tutulumlarını karşılaştırmayı amaçladık.

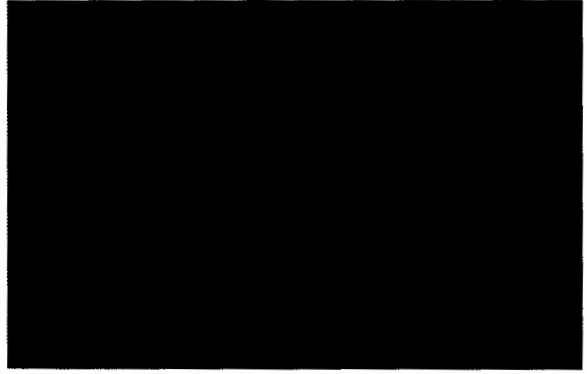
Yöntem

Çalışmamızda 12 immunsupresyon yapılan ve 12 sağlıklı 24 BALB/c dişi fare kullanıldı. İmmunosupresyon üç hafta haftada iki kez 0.2 mg deksametozon uygulanarak yapıldı. İmmunosupresyon yapılan ve yapılmayan sağlıklı gruplara ait fareler daha önce laboratuvarımızda balgam örneğinden izole ettiğimiz *Mycobacterium tuberculosis* suşu (10x5 CFU/ml) içeren solüsyondan intraperitoneal yolla 0.1 ml verilerek enfekte edildi. İşlem sonrası tüm fareler on hafta takip edildi. Gruplara antitüberküloz tedavi uygulanmadı. Onuncu haftanın sonunda tüm fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilip batinları açıldı. Peritoneal mayiden Lowenstein-Jensen besiyerine ekim yapıldı. Ayrıca mikrobiyolojik inceleme için Erlich-Ziehl-Nielsen (EZN) ve Auramin-O (fluorochrome) boyalı preparatlar hazırlandı. Akciğer ve batin içi organların makroskopik, mikrobiyolojik, histopatolojik incelemeleri yapıldı. Akciğer, karaciğer, dalak, böbrek, barsak, omentum kesitlerinden histopatolojik incelemeler yapılırken bu organların tümünden yapılan imprintler EZN ile boyanarak incelendi.

Bulgular

İmmunosupresif grupta yaklaşık ikinci haftanın sonunda ve üçüncü haftanın başında batında asit oluşumu tespit edilirken immunsupresyon uygulanmayan grupta altıncı haftadan sonra ve minimal düzeyde asit saptandı. Batin içinin makroskopik incelemesinde immunosupresif grupta ileri derece asit, tüm organlarda solukluk, hepatosplenomegali ve ince barsak anslarında ileri derecede genişleme saptandı. İmmunosupresyon

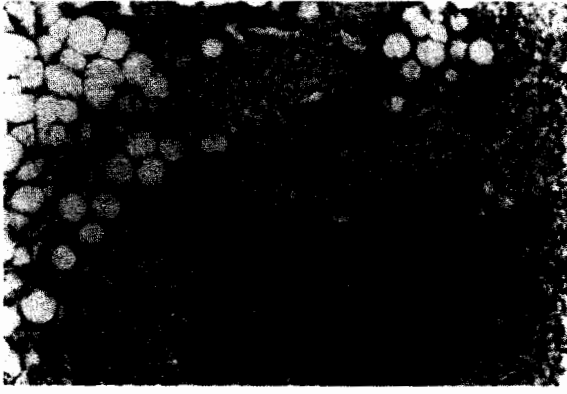
yapılmayan grupta ise az miktarda asit, organlarda solukluk, barsak anslarında minimal düzeyde genişleme gözlemlendi. İmmunosupresif gruptaki farelerden yapılan peritoneal mayi incelemesinde bol lökosit (% 80 lenfosit) ve aside alkole dirençli bakteriler (AARB) pozitif tespit edildi. Sitolojik inceleme için preparat ARB, mikrobiyolojik inceleme için auramin-rodamin ile boyandı. Auramin-rodamin boyalı preparatlarda İmmunosupresif grupta her mikroskop alanında 3-5 adet basil gözlenirken, immunsupresyon uygulanmayan grupta her mikroskop alanında basile rastlanmadı (Şekil 1).



Şekil 1. İmmunosupresyon uygulanan grupta, Auramin-rodamin boyalı preparatlarda her mikroskop alanında tüberküloz basillerinin görünümü

Organlardan yapılan imprintlerde İmmunosupresif grupta ve sağlıklı grupta AARB raslanmadı. İmmunosupresyon uygulanan grupta, organlardan alınan örneklerin histopatolojik incelemesinde peritoneal yağlı doku ve akciğerlerde epitelooid histiositler tarafından oluşturulmuş granülom yapıları görüldü. Granülom yapılarının çevresinde lenfosit ve plazmositler görülmekteydi (Şekil 2).

Diğer organlarda ise değişen derecelerde mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu izlendi. Sağlıklı grupta granülom yapılarına raslanmadı. Ancak peritoneal yağlı doku içinde daha belirgin olmak üzere mononükleer iltihabi infiltrasyon saptandı. Dördüncü haftanın sonunda kültürde üremeler kaydedildi, tüm kültürler altıncı haftanın sonunda değerlendirildiğinde supresyon uygulanan gruptaki ekimlerden üçünde, sağlıklı gruptaki ekimlerin beşinde üreme kaydedilmedi.



Şekil 2. İmmunosupresyon uygulanan grupta organlardan alınan örneklerin histopatolojik incelenmesinde granülom yapılarının çevresinde lenfosit ve plazmositler görülmektedir

Tablo. İmmunosupresyon uygulanan ve uygulanmayan gruplardaki bulguların değerlendirilmesi

	İmmunosupresif grup	Kontrol grubu
EZN	(+) % 80 lenfositöz	(±) % 40 lenfositöz
Auramin-O	Her alanda 3-5 adet basil	3-5 alanda 1-3 adet basil
Löwenstein-jensen by. üreme	9 farenin peritoneal mayi kültürde üreme (+)	7 farenin kültürde üreme (+)
Organların makroskopik görünümü	İleri asit, tüm organlarda solukluk, hepatosplenomegali, solukluk ve ince barsak anslarında belirginanslarında genişleme	Asit miktarı az, genişleme minimal
Organların histopatoloji görünümü	AARB (-) Peritoneal yağlı doku ve akc'de granülom mevcut	AARB (-) Granülom yapılarına rastlanmadı

(+) pozitif, (-) negatif, (±) 3 farede EZN pozitif, 9 farede negatiftir.

Tartışma

Çeşitli nedenlerle uzun süreli immunosupresif tedavi alan birçok olguda intestinal tbc geliştiği bildirilmektedir (5-7).

Farelerde deneysel Tbc çeşitli amaçlara göre çeşitli yollarla (intravenöz, intraperitoneal veya aerosol olarak) oluşturulmaktadır (8,9).

BALB/c farelerinde intravenöz ve intraperitoneal yolla latent enfeksiyon oluşturulan bir çalışmada steroid uygulamasının latent enfeksiyonu reaktifte ettiği bildirilmektedir (8).

Çalışmamızda steroid latent enfeksiyonu reaktifte etmek amaçlı değil sağlıklı farelerin enfekte edilmeden önce immunosupresyonu amacıyla kullanılmış, bu kullanımda da benzer etki gözlenmiştir.

M. tuberculosis 'e karşı moxifloxacin ve cinafloxacın aktivitesinin invivo ve invitro değerlendirildiği araştırmada, dişi Swiss farelerin 6.2×10^6 basil ile intravenöz yolla enfekte edildiği bildirilmiş, 30 günlük hayatta kalma oranları, dalak ağırlığı, dalakta ortalama CFU/ml'de koloni sayımı ve makroskopik akciğer lezyonları değerlendirilmiştir (10).

Direkt mikroskopik incelemede floresan (Auramin-O) boyanın kullanılması yöntemin duyarlılığını önemli ölçüde artırdığı ve değerlendirmeyi kolaylaştırdığı için tercih edilmiştir. Tüberküloz peritonit ve perikarditte, asit ve perikardiyal sıvıda AARB tayininin sensitivitesinin düşük olduğu, extrapulmoner Tbc'de kültürün değerinin pulmoner Tbc'ye göre daha düşük olduğu bildirilmektedir. Tbc peritonitte asit sıvısı kültürü için % 45-69 sensitivite oranları bildirilmektedir (11).

Çalışmamızda makroskopik incelemede immunosupresif grupta ileri derece asit, tüm organlarda solukluk, hepatosplenomegali ve ince barsak anslarında ileri derecede genişleme tespit edildi. İmmunosupresyon yapılmayan grupta az miktarda asit, organlarda solukluk, barsak anslarında minimal düzeyde genişleme gözlemlendi. Periton mayisinde bol lökosit (% 80 lenfosit) ve AARB görüldü. İmmunosupresif grupta her mikroskop alanında 3-5 basil gözlenirken, immunosupresyon uygulanmayan grupta her alanda basile rastlanmadı. İki grup arasında histopatolojik görünüm ve mikrobiyolojik (basil sayısı ve kültürde üreme) açıdan anlamlı farklar gözlemlendi. İmmunosupresif grupta alınan örneklerin histopatolojik incelemesinde peritoneal yağlı doku ve akciğerlerde epitelooid histiositler tarafından oluşturulmuş granülom yapılarının görülmesi, ancak sağlıklı grupta granülom yapılarına rastlanmaması, iki grup arasındaki anlamlı farkı ifade etmektedir.

Çalışmamızda hayatta kalma süreleri kullanılan deney hayvanı sayısının yeterli olmadığı için değerlendirilmemiştir. Ancak benzer çalışmalarda enfeksiyon gelişimini ve ağırlığını artırdığı için

immunosupresyonun hayatta kalma süresini azalttığı bildirilmektedir (10).

Çalışmamızda daha önceki araştırmalarla benzer şekilde immunosupresyonun tbc peritonit gelişimini aktive ederek peritonit gelişim süresini kısalttığı ve organ tutulumunu yaygınlaştırdığı tespit edilmiştir. İleri dönemlerde denenen antitüberküloz tedavi çalışmalarında kullanılabilir hayvan ve basil sayılarını değerlendirebilmemiz açısından çalışmamızın model olacağı düşüncesindeyiz

Kaynaklar

1. Han JK, Kim SH, Choi BI, Yeon KM, Han MC. Tuberculous colitis. Dis Colon Rectum 1996;39:1204-9.
2. Braun MM, Cote TR, Rabkin CS. Trends in death with tuberculosis during in AIDS era. JAMA 1993;269:2865-8.
3. Rieder HL, Snider DE, Cauthen GM. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. Am Rev Respir Dis 1990;141:374-81.
4. Haas DW, Des Prez RM. Mycobacterium tuberculosis. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, editors. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churcill-Livingstone; 1995. p.2213-43.
5. Epstein BM, Mann JH. CT of Abdominal tuberculosis. AJR 1982;139:861.
6. Ağildere AM, Coşkun M, Demirhan B, Karakayalı H, Niron EA, Haberal M. Renal transplantasyon olgusunda gelişen ileoçekal tüberkülozun bilgisayarlı tomografi (BT) bulguları. Diyaliz Transplantasyon Yanık 1996;9:43-7.
7. Moray G, Karakayalı H, Şenel MF, Köseoğlu F, Bilgin N, Haberal M. 744 renal transplant alıcısında tüberküloz insidansı ve bir intestinal tüberküloz vakasının takdimi. Diyaliz Transplantasyon Yanık 1996;9:53-6.
8. Phyu S, Musrafa T, Hofstad T, Nilsen R, Fosse R, Bjune G. A mouse for latent tuberculosis. Scand J Infect Dis 1998;30:59-68.
9. Cooper AM, Calahan JE, Keen M, Behsle JT, Orme IM. Expression of memory immunity in the lung following re-exposure to Mycobacterium tuberculosis. Tuber Lung Dis 1997;78:67-73.
10. Ji B, Lounis N, Maslo C, Truffot-Pernot C, Bonnafous P, Grosset J. In vitro and invivo activities of moxifloxacin and clinafloxacin aganist Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:2066-9.
11. LoBue PA, Catanzaro A. The diagnosis of tuberculosis. Dis Mon 1997;43:185-246.