
Siprofloksasin ve Granülosit Stimüle Edici Faktörün Polimorf Nüveli Lökositlerin *Pseudomonas aeruginosa*'ya Karşı Bakterisidal Aktivitesine Etkisi

Ayşegül ESKİTÜRK, Ülkü ERGİN

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Çalışmamızda, siprofloksasin ve granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF)'ün polimorf nüveli lökositlerin (PMNL) *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı bakterisidal aktivitesine etkisi araştırıldı. Sağlıklı gönüllülerden elde edilen lökositler farklı konsantrasyonlardaki G-CSF ve siprofloksasin ile 180 dakika boyunca inkübe edildi. G-CSF'nin tek başına verilmesi bir miktar bakterisidal etki göstermekle birlikte, bu etki PMNL'lerin bakterisidal aktivitesinden anlamlı bir fark göstermedi ($p>0.05$). İnhibitör ve subinhibitör konsantrasyonlarda siprofloksasin PMNL'lerin bakterisidal aktivitesini arttırırken ($p<0.05$), aktivitedeki artış en fazla inhibitör konsantrasyonda siprofloksasin ve 6000 Ü/mL G-CSF kombinasyonunda gözlemlendi ($p<0.01$). G-CSF'nin antibiyotiklerle kombine edilmesinin özellikle nütropenik ya da nötrofil fonksiyonları bozuk hastalarda tercih edilmesi, gerekli antibiyotik dozunun azaltılması ve olası toksik etkilerin önlenmesi açısından önemli olabilir. Bu etkinliğin belirlenmesinde geniş katımlı klinik çalışmaların yürütülmesine ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler : Siprofloksasin, G-CSF, Polimorf nüveli lökosit

SUMMARY

Effect of Ciprofloxacin and Granulocyte Colony Stimulating Factor in Bactericidal Activity of Polymorphonuclear Leukocytes Against *Pseudomonas aeruginosa*

The in vitro effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of ciprofloxacin and G-CSF on the bactericidal activity of polymorphonuclear leukocytes (PMNL) against *Pseudomonas aeruginosa* was investigated. PMNL obtained from healthy volunteers were incubated with different concentrations of G-CSF and ciprofloxacin for 180 min. Although G-CSF showed certain amount of bactericidal effect, this was statistically insignificant when compared with bactericidal activity of PMNL: The minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin as well as subinhibitory concentration enhanced the bactericidal activity of PMNL ($p<0.05$) and the maximal enhancement of activity was observed in combination of inhibitory concentration of ciprofloxacin and 6000 units/ml of G-CSF ($p<0.01$). Clinical application of this combination could initially target infections in high risk groups, particularly neutropenic patients or patients with impaired neutrophil functions in whom one can expect to decrease antibiotic dosage and prevent likely toxic effects. Effect of such a combination in patients can be evaluated by large scale clinical trials.

Key Words : Ciprofloxacin, G-CSF, Polymorphonuclear leukocytes

Polimorf nüveli lökositler (PMNL)'in infeksiyon etkeni bakteriye yönelmesi ve içine alarak öldürmesi (kemotaksi ve fagositoz) konağın en önemli savunma mekanizmalarından biridir. Bakteriyel infeksiyonlara yanıtta granülositlerin sayı ve fonksiyonel aktivitelerindeki artış birlikte rol oynar. PMNL'lerin bakterisidal aktiviteleri sistemik infeksiyonların antibiyotiklerle tedavisinde de önem taşımaktadır, çünkü hastanın tedavi edilebilmesi in vitro etkili olan bir antibiyotiğin in vivo yeterli olacak düzeyde verilmesi ve bakterinin fagositik hücrelerce yok edilmesi ile mümkün olabilmektedir.

Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) nötrofil sayı ve fonksiyonlarını arttırmak amacıyla kullanılan bir hematopoetik büyüme faktörüdür. Bu faktörün nötrofil kemotaksisini ve fagositozunu arttırdığı, solunumsal patlamayı aktive ettiği, antikora bağlı hücrel sitotoksiteyi, kompleman reseptörlerinin ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir^[1]. G-CSF'nin bir diğer etkisinin bakterisidal aktiviteyi arttırmak olduğu ve bağışıklığı uyarıcı bu faktörün verilmesiyle konağın antimikrobiyal tedaviye yanıtını ortaya çıkarmak ya da arttırmanın hedeflenebileceği de düşünülmektedir^[1]. G-CSF ve antibiyotik kombinasyonunun uygulanması ile hem konak yanıtını artırıcı hem de patojeni ortadan kaldıran bir sinerjik etki beklenebilir. Çalışmamızda bu tür bir kombinasyonun *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bakteri suşunun hazırlanması: Tüm deneylerde *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 87253) suşu kullanıldı. Müeller Hinton sıvı besiyerinde bir gece inkübasyon sonrası santrifüjle çöktürülen bakteri phosphate buffered saline (PBS)-fosfat tamponlu tuzlu su ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyon inaktive edilmiş insan serumu ile 1/10 oranında karıştırıldı ve 37°C'de 20 dakika inkübe edilerek opsonizasyon sağlandı. İnkübasyon sonrasında tekrar santrifüj edilerek bakteri peleti PBS ile çözüldü ve bakteri yoğunluğu 5x10⁶ kob (koloni oluşturan birim)/mL'ye ayarlandı.

PMNL eldesi: Her çalışma gününde sağlıklı bir donörden 20 mL venöz kan 1.5 mg/mL EDTA içeren tüplere alındı. 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj sonrası eritrositler üzerinde bulunan PMNL'den zengin tabaka (buffy-coat) içerisinde 2.5 mL Ficoll-Hypaque (Sigma) ve 2.5 mL Polymorphoprep (Nycomed) bulunan tüpe konuldu^[2]. 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra tüpün en üstünde bulunan monosit tabakası uzaklaştırılarak ortada-

ki PMNL tabakası ayrı bir tüpe alındı. Üç kez 3 mL PBS ile 1650 rpm'de yıkanan PMNL tabakası 1 mL Hank's buffered salt solution (HBSS)- Hanks'in dengeli tuz solüsyonu ile süspansiyon edildi ve Thoma lamında 5x10⁶ hücre/mL olacak şekilde ayarlandı. Tripan mavisi boyama yöntemiyle canlılık >%98 olarak tesbit edildi.

Antibiyotiğin hazırlanışı: Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) düzeyi NCCLS standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi, bir gecelik inkübasyon sonrası gözle görülebilir üremeyi engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak tanımlandı^[3].

Fagositoz deneyi: Hazırlanan PMNL ve bakteri süspansiyonları aşağıda belirtildiği şekilde karıştırılarak 37°C'de 180 dakika inkübe edildi. Siprofloksasin (Bayer) minimal inhibitör konsantrasyon (0.25 µg/mL: 1xMİK) ve subinhibitör konsantrasyonda (1/4 MİK); G-CSF (Roche) 6000 ünite/mL konsantrasyonda kullanıldı.

A serisi: (kontrol) HBSS+Bakteri süspansiyonu

B serisi: Bakteri süspansiyonu+HBSS+PMNL

C serisi: Bakteri süspansiyonu+HBSS+G-CSF

D serisi: Bakteri süspansiyonu+Siprofloksasin (MİK)

E serisi: Bakteri süspansiyonu+Siprofloksasin (MİK)+PMNL

F serisi: Bakteri süspansiyonu+Siprofloksasin (MİK)+PMNL+G-CSF

H serisi: Bakteri süspansiyonu+Siprofloksasin (1/4 MİK)

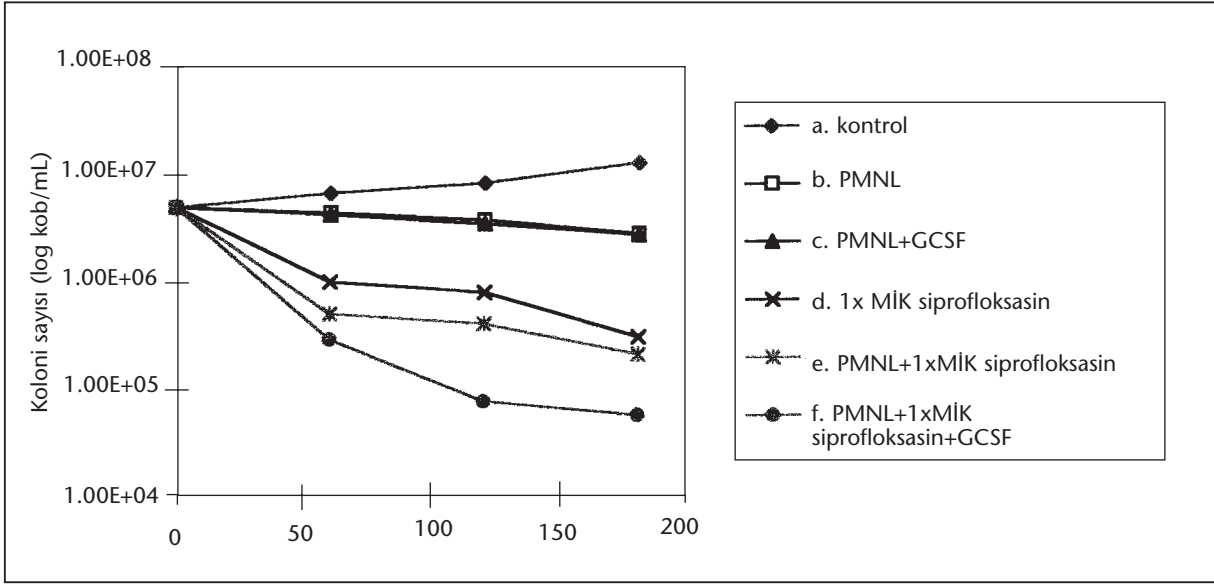
İ serisi: Bakteri süspansiyonu+Siprofloksasin (1/4 MİK)+ PMNL

J serisi: Bakteri süspansiyonu+Siprofloksasin (1/4 MİK)+PMNL+G-CSF

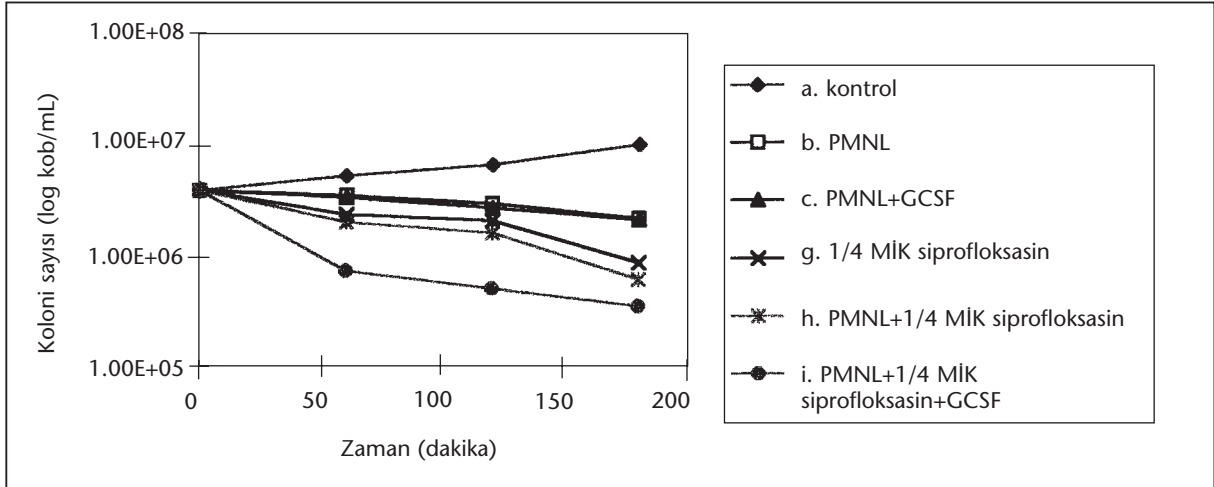
Sıfırıncı dakika, 60, 120 ve 180. dakikalarda her bir karışımdan 10 µL alınarak 5 mL distile suyla karıştırıldı ve vortekslendi. Bu solüsyondan 10 µL ve 100 µL alınarak Müeller-Hinton agar plaklarına ekim yapıldı, 37°C'de bir gecelik inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayıldı. Deneyler beş kez tekrarlanarak guruplar arası farklılıkların belirlenmesinde one way analysis of variance-ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Şekil 1 ve 2'de PMNL'lerin *P. aeruginosa*'ya karşı bakterisidal etkisi ve G-CSF ve siprofloksasinin tek başlarına ya da kombine verildiklerinde bu etki-



Şekil 1. *P. aeruginosa*'nın minimal inhibitör konsantrasyonda siprofloksasin ve G-CSF ile etkileşimi (Şekil 1, e ile d arasındaki fark: $p<0.05$, e ile f arasındaki fark: $p<0.01$)



Şekil 2. *P. aeruginosa*'nın subinhibitör konsantrasyonda siprofloksasin ve G-CSF ile etkileşimi (Şekil 2, h ile g arasındaki fark: $p<0.05$, h ile i arasındaki fark: $p<0.05$)

ye katkıları görülmektedir. G-CSF'nin tek başına verilmesi bir miktar bakterisidal etki göstermiş ancak bu etki PMNL'lerin bakterisidal aktivitesinden anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0.05$). Siprofloksasin inhibitör ve subinhibitör konsantrasyonda PMNL'lerin bakterisidal aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p<0.01$). Çalışmamızın en çarpıcı sonucu ise G-CSF'nin siprofloksasin ile kombine edildiğinde sinerjistik etki göstererek PMNL'lerin bakterisidal aktivitelerinde artmaya yol açtığının belirlenmesidir. Bu etki inhibitör ve subinhibitör konsantrasyonlarda ve test edilen tüm zamanlarda gözlenmektedir.

TARTIŞMA

Sistemik infeksiyonların tedavisinde sadece bakterinin verilen antibiyotiğe duyarlı olması ve serumda yeterli doza ulaşması değil, bakterinin fagositik hücrelerce uzaklaştırılması da önem kazanmaktadır. İdeal bir antimikrobiyal ajanın hücre dışındaki mikroorganizmalara karşı etki gösterirken, fagositik hücrelere girerek hücre içi mikroorganizmaları da inaktive edebilmesi beklenmektedir.

Hematopoetik hücreler üzerine etki ederek hematopoezi etkileyen spesifik faktörlerin varlığı yaklaşık 30 yıldır bilinmektedir ve bu faktörlerin izole

edilmesi, saflaştırılması ve klonlanmasıyla interlökinler ve koloni stimüle edici faktörler gibi tedavi edici maddelerin kullanıma girmesi mümkün olmuştur. G-CSF 1986 yılından beri kanser hastalarında nötropeni tedavisinde kullanılmakta ve bu hastalarda nötrofil sayısını artırarak infeksiyon sıklığını ve hastanede kalma süresini azalttığı savunulmaktadır^[4]. G-CSF nötrofil öncülerinin spesifik reseptörlere bağlanarak çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamakta, aynı zamanda olgun nötrofillere de bağlanarak kemotaksisi arttırmakta ve kemoatraktanlar cevap olarak süperoksid yapımını arttırmaktadır^[4].

G-CSF'nin infeksiyon hastalıklarında kullanımı son yıllarda gündemde olan konulardan biridir. 1980'lerin sonlarına doğru çeşitli deneysel infeksiyon modelleri oluşturularak bu konuya açıklık getirilmeye başlanmıştır. Cairo ve arkadaşları yeni doğmuş fareleri B grubu streptokoklarla infekte edip oluşturdukları neonatal sepsis modelinde, yaşama oranını tedavi verilmeyen grupta %4, yalnız G-CSF alan grupta %9, yalnız antibiyotik verilenlerde %28 olarak saptamışken, bu oran antibiyotik+G-CSF kombinasyonunda %92'ye ulaşmıştır^[5]. Silver ve arkadaşlarının farelerde *P. aeruginosa* ile oluşturdukları yarı infeksiyonu modelinde tekli tedavi ile kombinasyon tedavisi karşılaştırılmış ve en yüksek yaşama oranı gentamisin+G-CSF kombinasyonu verilen farelerde saptanmıştır^[6]. Tavşanlarda *P. aeruginosa*'yla oluşturulan aortik endokardit modelinde G-CSF siprofloksasin ile kombine edildiğinde bakteriden 72 saat sonra verilen G-CSF'nin antibakteriyel etkinliği olmamış ve yüksek dozda uygulandığı zaman bile siprofloksasinin etkisini artırıcı bir etki gözlenmemiştir. Aksine 30 dakika içinde verilen G-CSF bakteriyel vejetasyonlardaki bakteri sayısını azaltmış ancak G-CSF'nin profilaktik verilmesi siprofloksasinin antibakteriyel etkinliğini arttırmamıştır^[7]. Domuzlara damar yoluyla *P. aeruginosa* verilerek oluşturulan sepsis modelinde ise bakteriyel infüzyondan 30 dakika önce G-CSF uygulanması daha hafif bir tablo oluşturduğu gibi mortaliteyi engellemiş ve yazarlar sepsis tedavisine G-CSF'nin eklenebileceğini savunmuşlardır^[8].

Bu umut verici deneysel çalışma sonuçları klinisyenleri G-CSF+antibiyotik kombinasyonunun etkinliğini araştırmaya yönlendirmiştir. G-CSF'nin nötropenik hastalardaki infeksiyon sayı ve sıklığını azalttığı bilinmektedir. Kronik nötropenisi olan hastalarda gerçekleştirilen çok merkezli bir çalışmada G-CSF'nin kemik iliğindeki olgun nötrofil sayısını arttırdığı, infeksiyon sayı ve süresinde %50'lik, antibiyotik kul-

lanım süresinde %70'lik bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir^[9]. Maher ve arkadaşları febril nötropenik hastalarda standart piperasilin veya tobramisin tedavisinden 12 saat önce bir gruba G-CSF (filgastim, Roche) bir gruba plasebo vererek iki grubu kıyasladıklarında filgastim alan grupta febril nötropeninin, hastanede kalma süresinin ve antibiyotik verme süresinin daha kısa sürdüğünü saptamıştır^[10]. Mitchell ve arkadaşları ise çocuk hastalarda yaptıkları benzer bir çalışmada antibiyotik tedavisinden 24 saat önce uyguladıkları G-CSF ile aynı sonuçları elde etmişlerdir^[11].

Çalışmamızda siprofloksasin ve G-CSF'nin tek başına ve kombine olarak verildiğinde PMNL'lerin *P. aeruginosa*'ya karşı bakterisidal aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Siprofloksasinin subinhibitör konsantrasyonunda dahi PMNL'lerin bakterisidal aktivitesine katkıda bulunduğu ve G-CSF'nin bu aktiviteyi anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir. G-CSF ve PMNL kombinasyonunun gram negatif bakterilere karşı etkisini araştıran az sayıdaki çalışmada G-CSF'nin ofloksasin ve seftazidimin *E. coli*'ye karşı bakterisidal aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir^[12-13]. Bu durumda G-CSF'nin terapötik etkisinin nötrofil sayısında artışın yanı sıra antimikrobiyal madde ile fagositik hücreler arasındaki ilişkinin etkilenmesi şeklinde de açığa çıkabileceği düşünülebilir. G-CSF'nin antibiyotiklerle kombine edilmesinin özellikle nötropenik ya da nötrofil fonksiyonları bozuk hastalarda tercih edilmesi, gerekli antibiyotik dozunun azaltılması ve olası toksik etkilerin önlenmesi açısından önemli olabilir. Bu etkinliğin belirlenmesinde geniş katılımlı klinik çalışmaların yürütülmesine ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Dale DC, Lies C, Summer W, et al. Granulocyte colony stimulating factor- role and relationships in infectious diseases. *J Infect Dis* 1995;172:1061-75.
2. Ferrante A, Thong YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes from human peripheral blood by the ficoll-hypaque method. *J Immun Med* 1980;36:109-15.
3. National Committee for Laboratory Standards. Dilution procedures for susceptibility testing of aerobic bacteria. Approved standards. M7A3, Villanova: NCCLS Publication, 1993.
4. Welte K, Gabrilove J, Bronchud M, et al. Filgastim (r-metHuG-CSF): The first ten years. *Blood* 1996;88:1907-29.
5. Cairo MS, Mauss D, Kommareedy S, et al. Prophylactic or simultaneous administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in the treatment of group B streptococcal sepsis in neonatal rats. *Pediatr Res* 1990;27:612-6.

6. Silver GM, Gamelli RL, O' Reilly M. The beneficial effect of granulocyte colony stimulating factor on survival after *Pseudomonas* burn wound infection. *Surgery* 1989; 106:452-9.
7. Ignes S, Fantin B, Elbim C, et al. Critical influence of timing of administration of granulocyte colony stimulating factor on bacterial effect in experimental endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2702-9.
8. Haberstroh J, Breuer H, Lucke I, et al. Effect of recombinant human granulocyte stimulating factor on hemodynamic and cytokine response in a porcine model of *Pseudomonas* sepsis. *Shock* 1995;4:216-24.
9. Dale DC, Bonilla MA, Davis MW, et al. A randomized controlled phase III trial of recombinant human colony stimulating factor for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* 1993;81:2496-2501.
10. Maher DW, Lieschke GJ, Green M, et al. Filgrastim in patients with chemotherapy induced febrile neutropenia. *Ann Intern Med* 1994;121:492-8.
11. Mitchell PLR, Morland MJ, Dick G, et al. Clinical benefits and cost savings of interventional G-CSF therapy in patients with febrile neutropenia following chemotherapy. *Blood* 1995;86:500 a abstract no. 1989, (Suppl 1).
12. Kropec A, Lemmen SW, Grundman HJ, et al. Synergy of simultaneous administration of ofloksasin and granulocyte colony stimulating factor of *Escherichia coli* by human neutrophils. *Infection* 1995;23:298-300.
13. Dashner FD, Grundmann H, Anding K, et al. Combined effect of human neutrophils, ceftazidime and granulocyte colony stimulating factor on killing of *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:536-9.

Yazışma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül ESKİTÜRK

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

81326 Haydarpaşa - İSTANBUL

Makalenin Geliş Tarihi: 26.08.1997 Kabul Tarihi: 19.11.1997