

Makrolitlerin Nötrofil Granülositleri İçindeki Staphylococcus aureus'un Hücre İçinde Öldürülmesi Üzerine Etkisi

Tanju KADIR (*), Adile ÇEVİKBAŞ (**)

ÖZET

Bu çalışmada eritromisin, azitromisin ve klaritromisin'in plazmada erişebildikleri konsantrasyonlarında (0.25, 1, 2 ve 20µg/ml) sağlıklı insan nötrofil granülositlerinin Staphylococcus aureus'a karşı hücre içi öldürme aktivitesi incelenmiştir. nötrofillein hücre içi öldürme aktivitesi deneyde kullanılan antibiyotik konsantrasyonları ile muamele edildikten 4 saat sonra ölçülmüştür. hücre içi öldürme, azitromisin ile tüm konsantrasyonlarda, eritromisin ve klaritromisin ile yalnız 20µg/ml konsantrasyonda kontrole göre anlamlı olarak (p<0.05) arttığı saptanmıştır. Antibiyotiklerin, öldürme endeksini 20µg/ml konsantrasyonda artırması anlamlı olarak (p<0.05) bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Eritromisin, azitromisin, klaritromisin, nötrofil, hücre içi öldürme

SUMMARY

The Effect of Macrolides on Intracellular Killing of Staphylococcus aureus In Neutrophil Granulocytes

In this study the in vitro effect of erythromycin, azithromycin and clarithromycin on the intracellular killing of S.aureus in human neutrophil granulocytes was investigated. Each drug was tested in concentrations of 0.25, 1, 2, and 20µg/ml and intracellular killing was measured for up to 4 h of incubation. Azithromycin increased significantly (p<0.05) the intracellular killing in all concentrations, however erythromycin and clarithromycin increased the intracellular killing only in concentration of 20µg/ml. All 3 antibiotics increased the killing significantly (p<0.05) in concentration of 20µg/ml relative to the control without antibiotics.

Key words: erythromycin, azithromycin, clarithromycin, neutrophil, intracellular killing.

GİRİŞ

Mikroorganizmaların fagositik hücreler tarafından fagositozu ya da hücre içinde öldürülmesi önemli bir konak savunma mekanizması olmasına rağmen, bazı mikroorganizmaların hücre içinde canlı kaldığı bildirilmiştir (1). Tekrarlayan infeksiyonlar ya da ilacın hücre içi penetrasyonunun zayıf olması, antibiyotik ile tedavinin başarısız olmasına ve Staphylococcus aureus gibi mikroorganizmanın hücre içinde canlı kalabilmesine neden olmaktadır (2,3). makrolitlerin yüksek hücre içi penetrasyonu (4,5) gözönüne alınarak, çalışmamızda bu antibiyotiklerin plazmada erişebildikleri farklı konsantrasyonlarının (0.25, 1, 2 20µg/ml) nötrofil içinde fagosi-

te edilmiş olan S. aureus'un hücre içinde öldürülmesi üzerine etkisi in vitro araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

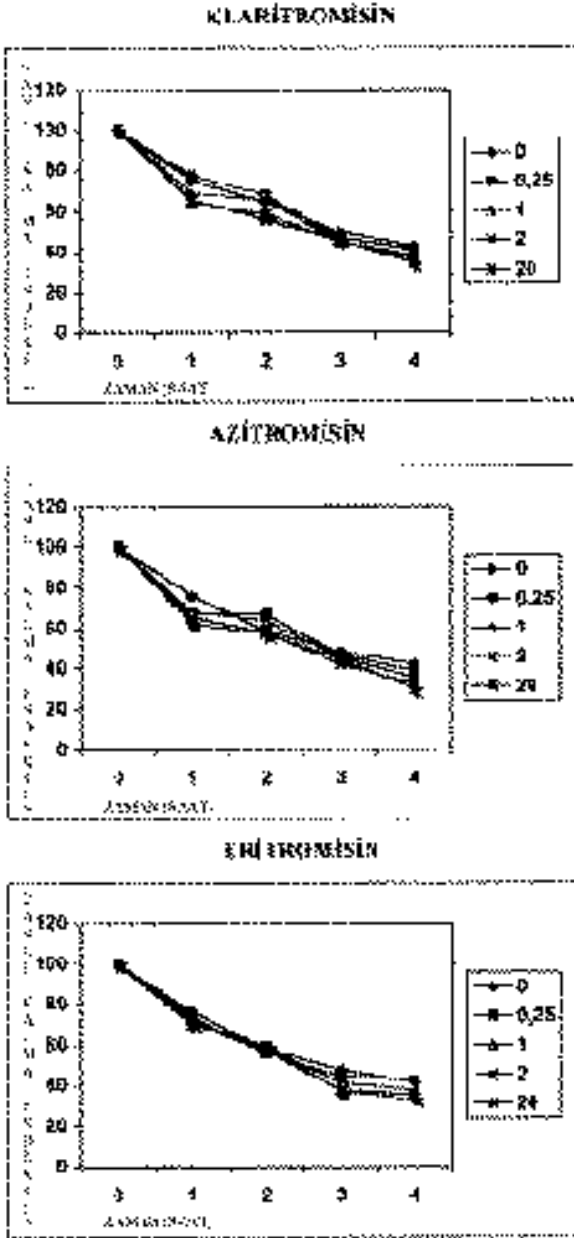
Antibiyotikler: Eritromisin (Abbot), azitromisin (Pfizer) ve klaritromisin (Abbot) distile su içinde çözülerek %40 serum içeren RPMI 1640 ortamı içinde 0.25 1, 2 ve 20µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanmıştır.

Diğer Maddeler : L-glutamin içermeyen RPMI 1640 ortamı ve Ficoll-Hypaque Sigma'dan alınmıştır. serum örnekleri ise sağlıklı gönüllülerden toplanmıştır.

S.aureus Suşunun Hazırlanması : Klinikten izole edilen S. aureus kökeninden buyyon besiyerine pasaj alınmış 18 saat 37°C de inkübe edilmiştir. S.aureus 3000 rpm de 10 dakika çevrilerek 2 kez fosfat

(* Marmara Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Nişantaşı-İstanbul

(**) Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa-İstanbul



Şekil. 0,0.25,1,2 ve µg/ml antibiyotik konsantrasyonlarında hücre içinde fagosite olmuş S. aureus'un hücre içi öldürülmesi.

tamponlu tuzlu su ile yıkanmış ve %40 serum içeren RPMI ortamı içinde bakteri sayısı ml'de 5×10^6 kob (koloni oluşturan birim) olacak şekilde sulandırılmıştır.

Nötrofil Granülositlerin Elde Edilmesi : Çalışmamızda 30-40 yaş grubu sağlıklı deneklerden kan alınmış ve Ficoll-hypaque santrifüj yöntemine uygun olarak nötrofil granülositleri elde edilmiştir (7). Hücre sayısı 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde %40 serum

içeren RPMI ortamı içinde süspansiyon edilmiştir. Hücre İçi Öldürme Aktivitesi : Nötrofil içinde S.aureus'un öldürülmesi, hücre içinde canlı bakteri sayısında azalmanın saptanması ile ölçülmüştür (8). Kısaca, nötrofiller (5×10^6 hücre/ml) ile S.aureus 1:1 (nötrofil:bakteri) oranında 5ml %40 serum içeren RPMI ortamı içinde karıştırılmış ve 37°C de 20 dakika inkübe edilmiştir. Fagositoz olayı 35 ml soğuk %40 serum içeren RPMI ortamı ilave edilmesi ile durdurulmuş ve 2 kez 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek hücre dışında kalan stafilokoklar uzaklaştırılmıştır. İçinde S.aureus bulunduran nötrofiller deneyde kullandığımız antibiyotiklerin plazma konsantrasyonları ile %40 serum içeren soğuk RPMI ortamı içinde tekrar süspansiyon haline getirilerek 37°C de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince farklı zamanlardaki karışımdan 50µL hacim alınmış, soğuk NaOH (pH=11) çözeltisi ilave edilerek karıştırılmış ve bu işlem sonucunda nötrofiller parçalanmıştır. Daha sonra fizyolojik tuzlu su içinde on - kat sulandırılmış, Jeloz besiyeri üzerine 0.1 ml hacim konmuş ve yavrulu tüp ile yayılmıştır. Petriler 37°C de 18 saat inkübe edilmiş, üreyen koloniler sayılmıştır (kob/ml).

Sonuçların değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri : Hücre içinde canlı kalma endeksi (SI), t zamanda hücre içi canlı bakteri sayısı ile 0 zamanda hücre içi canlı bakteri sayısı karşılaştırılmış ve aşağıdaki formüle göre yüzde olarak belirlenmiştir (8).

$$SI_t = [(kob/ml)_t / (kob/ml)_0] \times 100$$

Antibiyotik öldürme endeksi (KI) ise aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$KI_t; \text{antibiyotik} = [(SI_t; \text{kontrol} - SI_t; \text{antibiyotik}) / SI_t; \text{kontrol}] \times 100$$

İstatistiksel hesaplamalarda t testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Venöz kanda elde edilen nötrofillerin canlılığı %95 olarak bulunmuştur. Hücre içinde öldürme aktivitesinin saptanmasında kullanılan S.aureus'un %90'ını nötrofiller tarafından fagosite olmuştur. Deneyde kullandığımız antibiyotiklerin farklı plazma konsantrasyonlarında (0.25,1, 2 ve 20µg/ml) mu-

amele edilen nötrofillerin hücre içi öldürme aktivitesi azitromisin'in tüm konsantrasyonlarında, eritromisin ile klaritromisin'in yalnız 20µg/ml konsantrasyonunda anlamlı ($p < 0.05$) olarak artmıştır (Şekil). Eritromisin ve klaritromisin'in diğer konsantrasyonlarında kontrol nötrofillere göre gözlenen farklılıklar istatistiksel açıdan anlamsız olarak bulunmuştur. Makrolidlerin öldürme indeksi ise (KI); azitromisin %40± 2, eritromisin %27 ±3 ve klaritromisin'in %24±2 olduğu saptanmıştır. her 3 antibiyotiğin öldürme indeksi anlamlı ($p < 0.05$) olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Çalışmamızda eritromisin, azitromisin ve klaritromisin'in nötrofil tarafından fagosite edilmiş *S.aureus*'un hücre içinde öldürülmesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu konu ile ilgili yapmış olduğumuz literatür taramalarında birçok araştırmanın yapıldığını, ancak elde edilen sonuçları birbirine ters düşen farklı sonuçlar olduğu gözlenmiştir. Örneğin, Milatoviç (9) in vitro koşullarda insan nötrofillerinin hücre içine fagosite edilen stafilokokları 3 saat içinde öldürdüğünü, bu olayın makrolitler tarafından etkilenmediğini bilirmiştir. Anderson ve ark. (10) yapmış oldukları in vitro çalışmada, hücre içine fagosite edilen *S.aureus*'un hücre içinde öldürülmesinin makrolitler tarafından engellendiğini göstermişlerdir. Aynı sonucu Labro ve ark.(11) çalışmaları ile bildirmişlerdir. Diğer çalışmalarda (12-14) *S.aureus*'un hücre içinde öldürülmesinin makrolitler ve kinolonlar tarafından artırıldığı gösterilmiştir. Bu denli çelişkili sonuçların ortaya çıkmasında birçok yorum yapılmış ise de, klinik çalışmalarda hücre içine penetrasyonu yüksek olan antibiyotiklerin in vivo hücre içi patojenlere karşı daha etkili olduğu klinik çalışmalarda bildirilmiştir (15-18).

Çalışmamızda *S.aureus*'un nötrofiller içinde öldürülmesi azitromisin ile tüm konsantrasyonlarda, eritromisin ve klaritromisin ile yalnız 20µg/ml konsantrasyonda belirgin bir şekilde artmıştır. her 3 antibiyotiğin öldürme endeksindeki artış anlamlı bulunmuştur. azitromisin ve diğer makrolidlerin nötrofiller içinde öldürme aktivitesi üzerine etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemektedir. Hücre içinde antibiyotiğin birikmesi, *S.aureus*'u direkt olarak öldürebileceği

yada bakteriyi nötrofillerin bakterisit etkisine karşı daha duyarlı hale getirebileceği bildirilmişti (13). Azitromisin'in denenen plazma konsantrasyonlarında nörofillerin hücre içi öldürme aktivitesini arttırmasını azitromisin'in nötrofil içine penetrasyonunun diğer makrolidlere oranla daha yüksek olduğundan (19) kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; çalışmamızda kullandığımız makrolidlerin nötrofillerin hücre içi öldürme aktivitesini arttırdığını, özellikle azitromisin'in daha etkili olduğunu görmekteyiz. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklı bakteri kökenlerinin ve adı geçen çalışmalarda araştırmacıların kullandıkları yöntemlerin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle antibiyotiklerin nötrofilfonksiyonları üzerine etkilerini araştıran yöntemler standartize edilmeli, elde edilen bulgular in vivo çalışmalarla da kanıtlanmalıdır (20,21).

TEŞEKÜR

Sağlık - 1998/44 no'lu projemizi maddi yönden destekleyen Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu'na teşekkür etmeyi bir boç biliriz.

KAYNAKLAR

1. Moulder JW : comparative biology of intracellular parasitism, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 49:298 (1985).
2. Tulkens PM: Intracellular distribution and activity of antibiotics., Eur J Clin Microbiol Infect Dis 10: 100 (1991).
3. Yancey RJ, Sanches MS, Ford CW : Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* with polymorphonuclear neutrophils, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 10:107 (1991).
4. Prokesch Rc, Hand WL : Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes, Antimicrob Chemother 21:373 (1982).
5. Foulds G, Shepard RM, Johnson RB : The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues, Antimicrob Agent Chemother 25(A): 73 (1990).
6. Carbon C : Clinical relevance of intracellular and extracellular concentrations of macrolides, Infection 23:10 (1995).
7. Boyum A : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, Scand J Clin Lab 21(97): 77 (1968).
8. Nielsen SL, Black FT, Storgaard M, Obel N : Evaluation of method for measurement of intracellular killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophil granulocytes,

APMIS 103:460 (1995).

9. Milatovic D : Intraphagocytic activity of erythromycin, roxithromycin and azithromycin, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9:33 (1990).

10. Anderson R, Joon G, van Rensberg CEJ : An invitro investigation of the intracellular bioavailability of amoxicillin, clindamycin, and erythromycin for *Staphylococcus aureus*, *J Infect Dis* 153:593 (1986).

11. Labro MT, el Benna J, Babin-Chevaye C : Comparison of the in vitro effect of several macrolides on the oxidative burst of human neutrophils, *J Antimicrob Chemother* 24:561 (1989).

12. Schwab JC, Mandel GL : The importance of penetration of antimicrobial agents into cells, *Infect Dis Clin North Am* 3:461 (1989).

13. Nielsen SL, Obel N, Storgaard M, Anderson PL : The effect of quinolones on the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* in neutrophil granulocytes, *J Antimicrob Chemother* 39: 617 (1997).

14. Sato K, akaki T, Tomioka H : Antimicrobial activities of benzoxazinorifamycin KRM-48, clarithromycin and evofloxacin against intracellular *Mycobacterium avium* complex phagocytosed by murine peritoneal macrophages, *J Antimicrob Chemother* 41:77 (1998).

15. Steingrinnsson O, Olofsson JH, Thorarrinsson H, Ryan RW, Johnson RB- Tilton RC : Azithromycin in the

treatment of sexually transmitted disease, *J Antimicrob Chemother* 25 (A): 109 (1990).

16. Mallory S : Azithromycin in comparison with cephalexin in the treatment of skin and structure infections, *Am J Med* 91 (2B): 91 (1991).

17. Laurent K : Efficacy, safety and tolerability of azithromycin versus roxithromycin in the treatment of acute lower respiratory tract infections, *J Antimicrob Chemother* 37 : 115 (1996).

18. Mantero L : A Comparative study of the efficacy safety and tolerability of azithromycin and cefaclor in the treatment of children with acute skin and/or soft tissue infections, *J Antimicrob Chemother* 37 © : 125 (1996).

19. Gladue RP, Bright GM, Isaacson RE, Newborg MF : In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62, 993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection, *Antimicrob Agents Chemother* 33:277 (1989).

20. Deric K- Soyoğlu-Gürer Ü, Çevikbaş A, Johansson C : Ketokonazol ile inkübe edilmiş insan marofajlarının *Candida albicans*'a karşı hücre içi öldürme aktivitesinin in vitro araştırılması, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 28:91 (1998).

21. Çevikbaş A, Johansson C : İmmunosupresif hastalarda fungal infeksiyonlar ve kemoterapide yeni yaklaşımlar, *Marmara Üniv. Ecz Derg* 9 : 187 (1993).