

KATYONİK STERÖİD ANTİBİYOTİK CSA-13'ÜN, KOLİSTİN VE ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERLE KOMBİNASYONLARININ KİSTİK FİBROZLU HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARINA KARŞI ÜÇLÜ SİNERJİSTİK ETKİLERİ

Çağla BOZKURT-GÜZEL¹, Zayre ERTURAN², Paul B. SAVAGE³, Ayşe Alev GERÇEKER¹

¹İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

²İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

³Brigham Young University, Department of Chemistry and Biochemistry, Provo, Utah, USA

ÖZET

Bu çalışmada, yeni bir katyonik steroid antibiyotik olan CSA-13'ün kolistin ve çeşitli antibiyotiklerle kombinasyon halinde kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı oluşturduğu ikili ve üçlü sinerjistik etkisi araştırılmıştır. MİK ve MBK değerleri, CLSI'nın önerdiği mikrodilüsyon tekniği ile saptanmıştır. Antibiyotiklerin ikili ve üçlü kombinasyonlarının etkileri mikrodilüsyon "checkerboard" ve zamana bağlı öldürme yöntemleri kullanılarak ölçülmüştür. Antibiyotiklerin MİK değerleri 0.5-2 µg/ml arasında değişmektedir. MBK değerleri ise MİK değerlerine eşit yada iki katı değerindedir. Mikrodilüsyon "checkerboard" tekniği kullanılarak yapılan ikili kombinasyon çalışmalarında en fazla sinerjistik etki CSA-13-kolistin kombinasyonu ile elde edilmiştir. Zamana bağlı öldürme deneylerinin sonuçlarına göre CSA-13, hızlı bir bakterisidal etki göstermiştir. Zamana bağlı öldürme yöntemine göre kolistin tobramisin ve siprofloksasin ile olan ikili kombinasyonlarının aditif etkili olduğu saptanmıştır. Bu ikili kombinasyonlara CSA-13'ün üçüncü antibiyotik olarak eklenmesi ile sinerjistik etki ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, kolik asitten türemiş olan yeni bir katyonik steroid yapıda molekül olan CSA-13'ün de içinde bulunduğu bu üçlü kombinasyonların, kistik fibrozlu hastalardaki *P.aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisine yeni bir bakış açısı kazandıracağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: CSA-13, ikili ve üçlü kombinasyon, kistik fibroz, kolistin, *Pseudomonas aeruginosa*, zamana bağlı öldürme

SUMMARY

Investigation of Triple Synergistic Activities of the Novel Cationic Steroid Antibiotic CSA-13, With Colistin and Various Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cystic Fibrosis Patients

In this study, *in vitro* double and triple synergistic activities of the novel cationic steroid antibiotic CSA-13, with colistin, tobramycin and ciprofloxacin were assessed against *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis (CF) patients. MICs and MBCs were determined by microdilution technique according to CLSI guidelines. Combinations of CSA-13 plus colistin, together with tobramycin and ciprofloxacin were measured using checkerboard and the time-kill curve (TKC) method. Susceptibility testing demonstrated that the MICs were ranging 0.5-2 µg/ml. The MBCs were equal to or two-fold greater than those of the MICs. According to the double combination studies using the microdilution checkerboard method, synergistic interactions were most frequent with CSA-13-colistin combination. The results of TKC analysis demonstrated rapid bactericidal activity of CSA-13. Combination TKC analysis demonstrated additive effect with colistin plus tobramycin and colistin plus ciprofloxacin. The addition of CSA-13 as a third antibiotic to these combinations, led to a synergistic effect. We showed that triple combination of CSA-13, a new cationic steroid molecule derived from cholic acid offers new perspectives as a new treatment option for *P.aeruginosa* infections in CF patients.

Keywords: colistin, CSA-13, cystic fibrosis, double and triple combination, *Pseudomonas aeruginosa*, time kill curve method

İletişim adresi: Çağla Bozkurt-Güzel, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Tel: (0212) 440 00 00/13525, GSM: (0532) 624 89 86

e-posta: caglabozkurt@gmail.com

Alındığı tarih: 15.05.2013, Yayına kabul: 22.11.2013

GİRİŞ

Kistik fibroz (KF), klorür iyonlarının sekresyonunda ve iyon kanallarının regüle edilmesinde rol alan bir plazma membran proteini olan kistik fibroz transmembran kondüktans regülatörü (CFTR) kodlayan gendeki mutasyon sonucunda ortaya çıkan kalıtsal bir hastalıktır. KF hastalarının akciğerlerindeki fizyopatolojik değişiklikler başta *Pseudomonas aeruginosa* olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların neden olduğu akciğer infeksiyonlarının gelişimine neden olmaktadır ve hastaların % 80'inde yaşam süreleri boyunca *P.aeruginosa*'nın etken olduğu kronik infeksiyonlar gelişmektedir⁽²⁵⁾. KF hastaları için standart antibiyotik tedavisi, akciğer infeksiyonunu önleme, ortadan kaldırma ve kontrol etme amaçlı olarak oral, intravenöz ve inhalasyon yoluyla çeşitli şekillerde uygulanmaktadır⁽⁹⁾. Tobramisin⁽³²⁾ ve aztreonam⁽²⁴⁾ gibi inhalasyonla alınan antibiyotiklerin, *P.aeruginosa* ile kronik olarak infekte olan hastaların akciğerlerinin işlevini iyileştirdiği ve alevlenmelerinin oranını azalttığı gözlenmiştir. Fakat KF hastalarında kronik infeksiyona neden olan bakteriler konvansiyonel antibiyotiklere karşı aşamalı olarak dirençli hale gelebilmektedir⁽¹⁶⁾. Bu gibi durumlarda kolistin tedavide tek seçenek olabilmektedir ve de yeni antimikrobiyallerin keşfedilmesi ihtiyacı ortaya çıkmaktadır⁽¹⁰⁾. Tedavi edilmesi güç kronik infeksiyonların etkeni olan dirençli *P.aeruginosa*'ya karşı yeni bölgeleri hedefleyen yeni antimikrobiyal maddelerin keşfedilmesi için birçok çalışmalar yapılmaktadır ve bakteri membranı sık çalışılan bir hedeftir. Hedefleri bakteriyel membran olan çoğu antimikrobiyal peptitler geniş spektrumlu antibakteriyel etkinlik göstermektedir. Ceragenin, membrana etki edebilen katyonik steroid antibiyotiklerin (cationic steroid antibiotics-CSA'lar) genel ismidir ve endojen katyonik antimikrobiyal peptitlerin peptit olmayan formları olarak geliştirilmiştir. Peptit yapıda olmayan ve tuza karşı duyarlı olmayan cerageninlerin, fazla miktarda hazırlanmaları ve saflaştırılmaları antimikrobiyal peptitlere göre daha basittir⁽¹⁰⁾. Pozitif yüklü antimikrobiyal peptitlere benzer şekilde, CSA moleküllerinin bir tarafında yüklerin düzenlendiği katyonik yüzey ve diğer tarafta ise hidrofo-

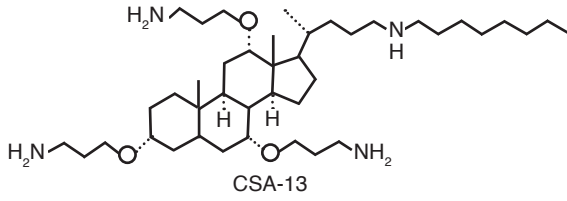
bik kalıntılar görülmektedir. CSA molekülleri kısmen elektrostatik etkileşimleri temel alan membranları hedef aldıklarından, farklı bakteri türlerini etkin bir şekilde öldürürler ve bu moleküllere karşı direnç gelişimi ihtimali düşüktür⁽³¹⁾. CSA-13, katyonik steroid antibiyotik grubu moleküllerin başında gelen bir ceragenin olup Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı oldukça etkilidir⁽¹⁰⁾.

Eski antibiyotiklerden olan kolistin (polimiksin E), *P.aeruginosa* dahil çoklu ilaç dirençli Gram negatif patojenlerin çoğuna karşı belirgin bir şekilde etkinliğini hala korumaktadır ve bu özelliği kolistini çoğu zaman KF hastalarında⁽²⁰⁾ kullanılabilecek tek etkili terapötik seçenek kılmaktadır. Günümüzde ilaç araştırma geliştirme çalışmalarında özellikle *P.aeruginosa*⁽³⁷⁾ gibi bakterilerin etken olduğu Gram negatif infeksiyonlara karşı çok az yeni ajan^(22,23,37) geliştirilebilmektedir ve bu durum bir zamanlar göz ardı edilen bir antibiyotik olan kolistin kullanımını son yıllarda belirgin bir şekilde arttırmıştır⁽²⁰⁾. Daha önceki çalışmamızda⁽³⁾, CSA-13'ün çeşitli antibiyotiklerle ikili antibiyotik kombinasyonlarının, KF hastalarından izole edilen *P.aeruginosa* suşlarına karşı sinerjik etki gösterdiği bildirilmişti. Bu çalışmadaki amacımız ise, bir önceki çalışmamızı genişleterek⁽³⁾ CSA-13'ün kolistin-siprofloksasin ve kolistin-tobramisin ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının etkisini KF hastalarından izole edilen *P.aeruginosa* suşlarına karşı, mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemi ve zamana bağlı öldürme eğrisi deneyleri kullanarak saptamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri suşları

Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kistik Fibroz Laboratuvarları'nda, farklı KF hastaların balgam ve derin boğaz salgılarından izole edilen, 40 adet *P.aeruginosa* suşu kullanılmıştır. Tüm suşların tanımı API 20 NE (bioMérieux Vitek, Marcy l'Etoile, Fransa) kiti kullanılarak yapılmıştır, bunlardan dört tanesi mukoid olarak saptanmıştır. Çalışmamızda belli dönemlerde izole edilen bu



Şekil 1. CSA-13'ün kimyasal formülü (molekül ağırlığı 822.94).

40 adet suş içinden, farklı duyarlılıklara sahip üç suş (PA1, PA2 ve PA3) konsantrasyona bağımlı aktivite deneyleri, üçlü kombinasyon ve zamana bağlı öldürme deneylerinde kullanılmak üzere rastgele olarak seçilmiştir. Bunlardan PA1 ve PA2 suşları non-mukoid olup, PA3 mukoid bir suştur. *Paeruginosa* ATCC 27853 standart suşu (Rockville, MD, ABD) çalışma boyunca kalite kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

Antimikrobiyal ajanlar

CSA-13, kolik asit "scaffold-yapılandırma" tekniği kullanılarak sentezlenmiştir (Şekil 1)⁽¹³⁾. Kolistin sülfat, Sigma Aldrich'ten sağlanmış, tobramisin ve siprofloksasin ise sırasıyla Bilim İlaç ve Bayer İlaç'tan (Türkiye) temin edilmiştir. Antimikrobik maddelerin stok çözeltileri 5,120 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmış ve -80°C'de saklanmıştır. Dondurulmuş antibiyotik çözeltileri altı ay içinde kullanılmıştır.

Besiyerleri

Kasyon İlaveli Mueller-Hinton Buyyon (KIMHB-25 mg/l Mg²⁺ ve 50 mg/l Ca²⁺) (Difco Laboratories, Detroit, MI) minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesinde, mikrodilüsyon "checkerboard" tekniğinin ve zamana bağlı öldürme deneylerinin uygulanmasında, Triptik Soy Agar (TSA, Difco Laboratories, Detroit, MI) besiyeri ise minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerinin ve bakteri sayımlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi

MİK değerleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından önerilen mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir^(7,8). Antimikrobik maddelerin çift kat seri dilüsyonları 256-0.06 µg/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda KIMHB'de hazırlanmıştır. İnoku-

lum, mikroplaga son konsantrasyon 5x10⁵ cfu/ml bakteri süspansiyonu olacak şekilde tatbik edilmiştir. Mikroplakların kapakları kapatılmış ve buharlaşmayı engellemek amacıyla naylon bir kılıfın içine konularak 37°C'de 18-20 saat boyunca inkübe edilmiş ve bulanıklığın görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir. MBK değerlerinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon süresinin sonunda üreme görülmeyen tüm kuyucuklardan iki kere 10'ar ul örnek alınarak petri kutularındaki TSA besiyerlerinin yüzeyine tatbik edilmiş ve 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonucunda oluşan koloniler sayılmış, başlangıç inokulumunun % 99.9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonu MBK değeri olarak belirlenmiştir⁽²⁶⁾.

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksinin belirlenmesi

Çalışmamızda katyonik steroid antibiyotik olan CSA-13'ün kolistin ile ve ayrıca kolistinin tobramisin ve siprofloksasin ile ikili kombinasyon halindeki etkilerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemi kullanılmıştır⁽³⁰⁾. "Checkerboard" yönteminin esası, dikey düzlemde antibiyotiğin denenen suşa karşı saptanan MİK değerinin iki katı konsantrasyondaki çözeltileri bir seri kuyu içinde yukarıdan aşağıya doğru MİK değerinin dört dilüsyon altına kadar, yatay düzlemde ise çalışmada kullanılan diğer antibiyotiğin aynı suşa karşı önceden saptanan MİK değerinin iki katı konsantrasyondaki çözeltileri bir seri kuyu içinde sağdan sola doğru antibiyotiğin MİK değerinin dört dilüsyon altına kadar seyreltilerek her kuyuda her iki antibiyotiğin farklı konsantrasyondaki çözeltilerini içeren kombinasyonlarının elde edilmesidir. Bu yöntemle göre, denenen antibiyotiklere ait MİK değerlerinin katları olan konsantrasyonların kullanılmasıyla iki antibiyotiğin kombinasyon halinde dilüsyonları hazırlanmıştır.

Bu çalışmada dikey düzlemde CSA-13 veya tobramisin veya siprofloksasin ile yatay düzlemde kolistin yukarıda açıklanan "checkerboard" yöntemine göre mikroplaktaki kuyulara uygulanarak oluşturulan farklı kombinasyonlar *Paeruginosa* suşlarına karşı denlenmiştir. Bu

amaçla mikropalakların içerisinde çeşitli oranlarda antibiyotik karışımları bulunan tüm kuyucuklara son konsantrasyon yaklaşık 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonu ilave edilmiş ve 37°C 'de bir gece inkübe edilmiştir. Her antimikrobik maddenin FİK değeri üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antimikrobik madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı suşa karşı saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilmiştir. FİK indeksi ise, her iki antimikrobik maddeye ait FİK değerlerinin toplanması sonucunda elde edilmiştir. Buna göre FİK indeksi ≤ 0.5 olan değerler sinerjist, $=0.5-4$ olan değerler aditif, ≥ 4.0 olan değerler ise antagonist olarak belirlenmiştir⁽²⁷⁾.

Zamana bağlı öldürme eğrilerinin belirlenmesi

Zaman bağlı öldürme deneyleri, ikili veya üçlü antibiyotik kombinasyonlarının bakterisidal etkinliklerini saptamak için gerçekleştirilmiştir⁽²⁶⁾. Deneylerde kullanılan üç suş farklı duyarlılık özelliklerine göre seçilmiştir. CSA-13'ün tek başına ve kolistin-siprofloksasin ve kolistin-tobramisin ile üçlü kombinasyonunun bakterisidal etkinliğini araştırmak için, zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemi kullanılmıştır. Her bir antibiyotik tek başına 0.25x, 0.5x, 1x, 2x ve 4x MİK'de ve 0.25x ve 1x MİK'de ikili ve üçlü kombinasyon halinde kullanılmıştır. Antibakteriyel madde içermeyen kontroller her bir suş için deneye dahil edilmiştir. İnokulum 1×10^6 cfu/ml olacak hazırlanmıştır. Canlı bakteri sayımları inokülasyondan sonra 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 24 saat aralıklarla, içinde TSA bulunan petri kutularına ekilerek belirlenmiştir. Tüm deneyler üç kez gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı öldürme eğrileri, ortalama koloni sayımları ve zamana göre grafik haline getirilerek değerlendirilmiştir ($\log^{10}$ cfu/ml). Zamana bağlı öldürme deneyleri için bakte-

ri tespitinin alt sınırı $1 \log^{10}$ cfu/ml olmuştur. Bakteriyel etkinlik ilk inokulumdan $\geq 3 \log^{10}$ cfu/ml'lik bir azalma olarak tanımlanmıştır. Sonuçlar, tek başına en etkin maddenin etkisi ile karşılaştırıldığında kombinasyonun etkisi ile yorumlanmıştır. Sinerji ve antagonizma, tek başına en etkin maddeye kıyasla 24. saatteki kombinasyon ile koloni sayımına göre, sırasıyla $2 \log^{10}$ bir azalma veya artış olarak tanımlanmıştır.

BULGULAR

Çalışılan tüm suşlar için CSA-13, kolistin, tobramisin ve siprofloksasinin MİK aralığı 0.5-4, 0.06-2, 0.125-64 ve 0.06-64 $\mu\text{g/ml}$ iken, MİK₅₀ değerleri sırasıyla 2, 0.5, 0.25 ve 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Duyarlılık testleri, CSA-13, kolistin, tobramisin ve siprofloksasin için MİK değerlerinin sırasıyla PA1 suşu için 2, 1, 1, 2; PA2 suşu için 2, 1, 2, 2 ve PA3 suşu için ise 0.5, 1, 1, 1 $\mu\text{g/ml}$ olduğunu göstermiştir. Mukoid ve non-mukoid suşlardaki MİK'ler arasında fark görülmemiştir. MBK değerleri ise MİK değerlerine eşit ya da iki katı değerindedir. Çalışılan tüm suşlar için CSA-13, kolistin, tobramisin ve siprofloksasinin MBK aralığı 0.5-8, 0.06-4, 0.25-64 ve 0.125-64 $\mu\text{g/ml}$ iken, MBK₅₀ değerleri sırasıyla 2, 0.5, 0.25 ve 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 'dir (Tablo 1 ve 2).

Mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemi ile yapılan 40 adet suşun ikili kombinasyon çalışmalarında aditif ya da sinerjistik etki görülmüş, hiçbir kombinasyonda antagonizmaya rastlanmamıştır. CSA-13'ün kolistin ile olan kombinasyonunda % 50 oranında sinerjizm elde edilirken, çalışılan diğer kombinasyonlar olan kolistin-tobramisin ve kolistin-siprofloksasin de sinerjizm oranı sırasıyla % 25 ve % 18 olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. Antimikrobiyal ajanların 40 *P.aeruginosa* suşuna karşı oluşturduğu in vitro etkileri.

Antimikrobiyal ajanlar	$\mu\text{g/ml}$						CLSI kriterlerine göre yüzde dağılım*		
	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MBK aralığı	MBK ₅₀	MBK ₉₀	duyarlı	orta duyarlı	dirençli
CSA-13	0.5-4	2	2	0.5-8	2	4	-	-	-
Kolistin	0.06-2	0.5	1	0.06-4	0.5	2	100	0	0
Tobramisin	0.125-64	0.25	1	0.25-64	0.25	1	94	0	6
Siprofloksasin	0.06-64	0.5	2	0.125-64	0.5	4	68	8	24

*CLSI kriterlerine göre kolistin için duyarlı ve dirençli sınırları $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ ve $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, tobramisin için $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ve $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, siprofloksasin için ise $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ve $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ 'dir. CSA-13 için CLSI'da duyarlılık kriteri yoktur.

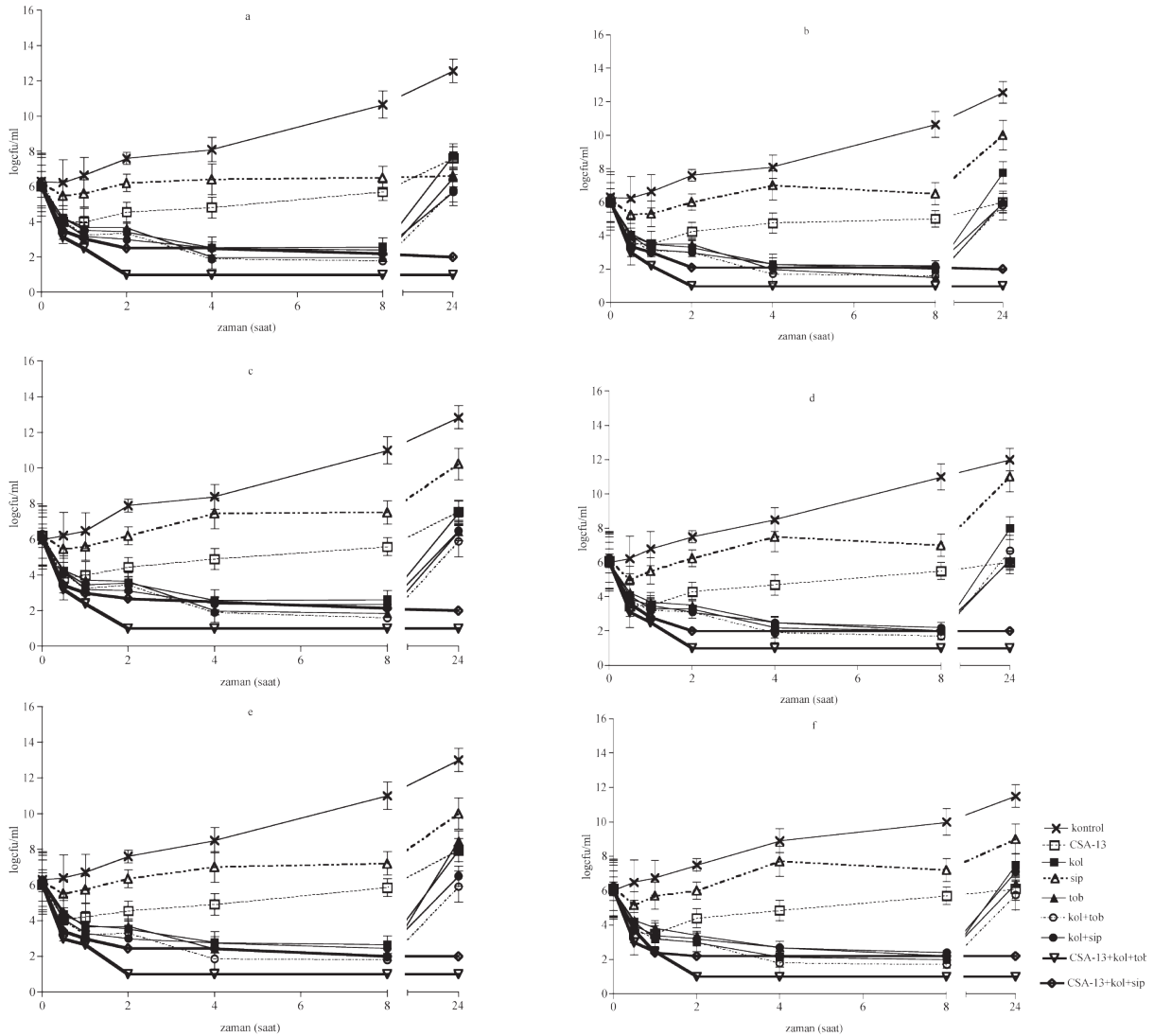
Tablo 2. PA1, PA2 ve PA3 suşlarına karşı antimikrobiyal ajanların tek başına ve kombinasyon halinde etkileri.

Suşlar	MİK (µg/ml)				Kombinasyonlar *			
	CSA-13	kol	tob	sip	kol+tob	kol+sip	CSA-13+kol+tob	CSA-13+kol+sip
PA1	2	1	1	2	aditif	aditif	sinerjizm	sinerjizm
PA2	2	1	2	2	aditif	aditif	sinerjizm	sinerjizm
PA3	0.5	1	1	1	aditif	aditif	sinerjizm	aditif

*kombinasyonlar zamana bağlı öldürme eğrisi deneylerine göre çalışılmıştır.
kol: kolistin, tob: tobramisin, sip: siprofloksasin

Zamana bağlı öldürme deneylerinin sonuçları, CSA-13'ün konsantrasyona bağımlı bir şekilde hızlı bakterisidal etkisi olduğunu ve 3-log'luk öldürmenin 0.25xMİK'te tüm suşlar için bir saat içinde olduğunu göstermiştir. Şekil

2'deki eğrilerden de anlaşıldığı üzere antimikrobik maddelerin tek başına 0.25x ve 1xMİK'te gösterdikleri etkiler benzer olmakla beraber, siprofloksasin diğer antimikrobiklere kıyasla daha yüksek log değerlerine sahiptir. 0.25x ve



Şekil 2. Zamana bağlı öldürme eğrileri: PA1 (a, b), PA2 (c, d) ve PA3 (e, f) suşlarına karşı antimikrobik maddelerin 0.25xMİK (a, c, e) ve 1xMİK (b, d, f) konsantrasyonda tek başına, ikili ve üçlü kombinasyon halinde etkileri.

1xMİK'te kolistin+tobramisin ve kolistin+siprofloksasin kombinasyonlarının çalışılan üç suşta aditif etkide olduğu gözlemlenmiştir. Kombinasyonlara üçüncü bir antibiyotik olarak CSA-13 eklendiğinde, üçlü ilaç kombinasyonunun her biri 0.25xMİK'te iki suşa karşı sinerjistik bir etki göstermektedir. CSA-13-kolistin-tobramisin kombinasyonun diğer üçlü kombinasyona göre üzerinde çalışılan üç suştan ikisine karşı daha etkili olduğu saptanmıştır. Antibiyotik konsantrasyonu 0.25xMİK'ten 1xMİK'e çıkarıldığında, CSA-13-kolistin-tobramisin kombinasyonunun diğer rejime göre iki suşa karşı daha etkili olduğu bulunmuştur. Tüm bunlara ek olarak, üç suşta da üçlü kombinasyonlarda 2. saat, 4. saat ve 8. saatte erken sinerjizme rastlanmıştır.

TARTIŞMA

Günümüzde *P.aeruginosa* infeksiyonlarına karşı artan antimikrobiyal direnç dünya çapında bir problem haline gelmiştir⁽¹²⁾. Bu mikroorganizma KF hastalarının solunum yollarına yerleşebilen bir patojen olup, bir kez kolonize olduğunda organizmanın yok edilmesi oldukça güçtür. KF hastalarının geleneksel antimikrobiyal tedavisi yalnızca mikroorganizma duyarlıysa bakteriyel yükü azaltarak olabilmektedir⁽³⁴⁾. Çalışmalar, *Pseudomonas*'ın hızla hipermutasyona uğrama yeteneğine sahip bir bakteri olduğunu ve tekli genlerdeki değişikliklerin antipsödomonal maddelere karşı direnç gelişiminde rol oynadığını göstermektedir⁽²⁸⁾. Direnç, monoterapi sırasında son derece kolay gelişmektedir. Bu nedenle, KF hastalarındaki kronik *P.aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisi sırasında direnci geciktirmek için kombinasyon tedavisinden yararlanılmaktadır^(1,28). KF hastalarında *P.aeruginosa* infeksiyonlarını tedavi etmek için çeşitli stratejiler mevcuttur ve standart antibiyotik tedavisi tek başına veya kombinasyon halinde kolistin ve tobramisin gibi inhalasyonla alınan antibiyotiklerin ve siprofloksasin gibi oral kinolonların kullanımını içermektedir^(2,16,21,33,36). Tedavi edilmesi güç kronik infeksiyonlarda, direnci engelleyebilecek şekilde farklı bölgeleri hedefleyen yeni antimikrobiyal maddelerin keşfine ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Bunlardan

biri olan CSA-13, ceragenin ailesinin başta gelen bir molekülüdür ve hazırlanması ve saflaştırılması antimikrobiyal peptitlere göre daha kolaydır⁽¹⁷⁾. CSA-13, vankomisin dirençli *Staphylococcus aureus*⁽⁶⁾, çoklu ilaç dirençli *P.aeruginosa*⁽⁵⁾, *Helicobacter pylori*⁽¹⁹⁾ ve *Streptococcus mutans* ile *Porphyromonas* spp.⁽¹⁵⁾ gibi periodontopatik bakteriler karşısında antimikrobiyal etkinlik göstermektedir. Ayrıca, CSA-13 vaccinia virüsü⁽¹⁴⁾ ve *Trypanosoma cruzi*⁽¹⁸⁾ karşısında da etkindir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda CSA-13'ün düşük toksisite göstermesi, bu bileşiğin insan tedavisindeki olası uygulamasını desteklemektedir⁽³⁵⁾. Bucki ve ark.⁽⁴⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, CSA-13'ün sahip olduğu hidrofobik özellikten dolayı, KF hastalarının solunum yollarında oluşan inflamasyon ve kronik infeksiyonda potansiyel olarak etkili olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmamız CSA-13'ün, KF hastalarında yaygın şekilde kullanılan antibiyotikler olan kolistin, tobramisin ve siprofloksasinle benzer MİK değerlerine sahip olduğunu göstermektedir. Chin ve ark.⁽⁵⁾ *P.aeruginosa*'ya karşı CSA-13 ile yapmış oldukları duyarlılık çalışmasında MİK₅₀ ve MBK₅₀ değerlerini 16 µg/ml bulmuştur. Bizim çalışmamızda 2 µg/ml olarak saptadığımız MİK₅₀ ve MBK₅₀ değerlerine göre, Chin ve ark.'nın bu değerlerinin yüksek olması muhtemelen o grubun suşlarının dirençli suşlar da içermesindendir.

Mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemi ile yapılan ikili kombinasyon çalışmalarında aditif ya da sinerjistik etki görülmüş, hiçbir kombinasyonda antagonizmaya rastlanmamıştır. Elde edilen bu sonuçlar özellikle CSA-13 için ümit verici olup, bizim daha önceki çalışmamızın bulgularıyla da benzerlik göstermektedir⁽³⁾.

Zamana bağlı öldürme eğrisi deneyleri klinik durumlar ile daha yakından ilişkilidir, bu teknik ile, tipik olarak yalnızca inhibitör özellikleri saptayan mikrodilüsyon "checkerboard" yönteminin aksine, bakterisidal özellik de incelenebilmektedir. Zamana bağlı öldürme eğrilerinin mikrodilüsyon "checkerboard" tekniğine göre bir diğer önemli avantajı da, antimikrobiyal özelliğin ve zaman içindeki etkileşimin dinamik bir resmini saptayabilmesidir⁽³⁰⁾. *P.aeruginosa*'ya karşı zamana bağlı öldürme eğrileri

çalışmaları genellikle aminoglikozit grubu bir antibiyotik ile oluşan kombinasyonda herhangi bir sinerjizm olup olmadığını değerlendirmeye yönelik olmuştur. Beta-laktam ve aminoglikozit grubu antibiyotiklerin kombinasyon halinde kullanımı klinik olarak iyi kanıtlanmış ve iyi belgelenmiş etkili bir tedavi olmasına rağmen, bu tedavinin *Pseudomonas* türlerine karşı beta-laktam direncini ve aminoglikozitlerin toksisitesini arttırmak gibi olumsuz etkileri de vardır⁽²⁹⁾. Chin ve ark.⁽⁵⁾ *P.aeruginosa* ile yapmış oldukları zamana bağlı öldürme çalışmasında, CSA-13'ün tek başına konsantrasyona bağımlı aktivite gösterdiğini ve sefepim ve siprofloksasin ile yapılan ikili kombinasyon çalışmalarında da sinerjistik ve aditif etkinin saptandığı belirtilmiştir. Yakın zamanda yaptığımız bir diğer çalışmamızda⁽³⁾, CSA-13'ün 50 *P.aeruginosa* suşu için MİK₅₀ değerini 2 µg/ml saptanmış, mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemi kullanarak çalışılan ikili kombinasyonlarda sinerjistik etkileşimler çoğunlukla CSA-13-kolistin kombinasyonunda görülmüş ve zamana karşı öldürme deneylerinde 2. saat, 4. saat ve 8. saatlerde erken sinerjizme rastlanmıştır. Bu nedenle, bu sinerjistik etkinin varlığı cerageninleri antimikrobiyal kemoterapide potansiyel olarak değerli hale getirmektedir. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda umut vaat eden, yeni bir katyonik steroid antibiyotik olan CSA-13'ü sub-MİK ve 1xMİK'te kolistin-tobramisin ve kolistin-siprofloksasin ile üçlü kombinasyonlarının araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışma ile CSA-13'ün, tek başına kullanıldığında, etkili bakterisidal bir madde olduğunu ve de konsantrasyona bağımlı aktivite gösterdiği saptanmıştır. Kombinasyonlara üçüncü bir antibiyotik olarak CSA-13 eklenildiğinde, üçlü ilaç kombinasyonunun her biri 0.25xMİK'te iki suşa karşı sinerjistik bir etki göstermektedir. CSA-13-kolistin-tobramisin kombinasyonun diğer üçlü kombinasyona göre üzerinde çalışılan üç suştan ikisine karşı daha etkili olduğu saptanmıştır. Antibiyotik konsantrasyonunu 0.25xMİK'ten 1xMİK'e çıkarıldığında, CSA-13-kolistin-tobramisin kombinasyonunun diğer rejime göre iki suşa karşı daha etkili olduğu bulunmuştur. Bunlara ek olarak, üçlü kombinasyonlarda üç suşta da erken sinerjizm saptanmıştır. CSA-13'ün üçüncü antibiyotik olarak

eklenmesinin kolistin-tobramisin kombinasyonunun bakteriyel etkinliğini arttırmış olması gözlemlenen sinerjizmi açıklamaktadır. Öte yandan, tobramisin in vitro olarak *Pseudomonas*'a karşı sinerjistik özellikte bir madde olarak etki etmektedir ve tobramisin bu etkisi en iyi beta-laktam kombinasyonlarında gözlemlenmektedir^(11,38). Çalışmamızın sonucuna göre, test ettiğimiz tüm antibakteriyel maddeler konsantrasyona bağımlı bakterisidal etki gösterirken, diğer antibiyotikler ile CSA-13'ü birleştirmek ümit vaat edici görünmektedir. CSA-13, Gram negatif organizmaların hem dış membranını hem de sitoplazmik membranını geçirgen hale getirmekte ve böylelikle antimikrobiyallere karşı duyarlılık meydana getirmektedir^(5,27).

Bu çalışma kinolon veya aminoglikozit grubundan bir antibiyotik ile birlikte polimiksin grubundan kolistin ve katyonik steroid bir antibiyotik olan CSA-13'ün kombinasyon halindeki etkilerini KF hastalarından izole edilmiş *P.aeruginosa* suşlarına karşı inceleyen ilk çalışmadır. Özet olarak, bir önceki çalışmamızı genişleterek⁽³⁾, kolik asitten türetilmiş bir molekül olan CSA-13'ün üçlü kombinasyonlarının KF hastalarındaki *P.aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisine yeni bir bakış açısı kazandıracağını düşünmekteyiz. Sonuç olarak, monoterapi sırasında *P.aeruginosa*'ya karşı direnç gelişimi sık olduğundan, umut vaat eden yeni bir molekül CSA-13'ü kolistin ve tobramisin ile üçlü kombinasyonlarda kullanmak; direncin oluşumunu önlemek veya geciktirmek ve bu organizma karşısında sinerjistik etkileşim kazanmak için yararlı olabilir. Ancak in vitro koşullarda elde edilen bulgularımızın in vivo koşullarda yapılan deneylerle ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Teşekkür: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma birimince desteklenmiştir. Proje numarası: 2925.

KAYNAKLAR

1. Arda B. Dirençli non-fermantatif Gram negatif bakteri infeksiyonlarının tedavi ve yönetimi, *ANKEM Derg* 2011;25(Ek 2):45-9.

2. Bozkurt-Guzel C, Gerceker AA. In vitro activities of various antibiotics, alone and in combination with colistin methanesulfonate, against *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients, *Chemotherapy* 2008;54(2): 147-51. <http://dx.doi.org/10.1159/000119741> PMID:18322363
3. Bozkurt-Guzel C, Savage PB, Gerceker AA. In vitro activities of the novel ceragenin CSA-13, alone or in combination with colistin, tobramycin and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients, *Chemotherapy* 2011;57(6):505-10. <http://dx.doi.org/10.1159/000335588> PMID:22286090
4. Bucki R, Sostarecz AG, Byfield FJ, Savage PB, Janmey PA. Resistance of the antibacterial agent ceragenin CSA-13 to inactivation by DNA or F-actin and its activity in cystic fibrosis sputum, *J Antimicrob Chemother* 2007;60(3):535-45. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm218> PMID:17584802
5. Chin JN, Jones RN, Sader HS, Savage PB, Rybak MJ. Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant *P. aeruginosa*, *J Antimicrob Chemother* 2008;61(2):365-70. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm457> PMID:18079128
6. Chin JN, Rybak MJ, Cheung CM, Savage PB. Antimicrobial activities of ceragenins against clinical isolates of resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(4):1268-73. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01325-06> PMID:17210765 PMCID:PMC1855519
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Seventh Edition: Approved Standard M7-A7, Wayne, PA, USA, (2006).
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement. M100-S20, Wayne, PA, USA, (2010).
9. Cystic Fibrosis Trust Antibiotic Working Group. Antibiotic treatment for cystic fibrosis: report of the UK Cystic Fibrosis Trust antibiotic working group, 3. baskı, Cystic Fibrosis Trust, Kent (2009).
10. Epand RF, Pollard JE, Wright JO, Savage PB, Epand RM. Depolarization, bacterial membrane composition, and the antimicrobial action of ceragenins, *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(9): 3708-13. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00380-10> PMID:20585129 PMCID:PMC2934994
11. Falagas ME, Bliziotis IA. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents* 2007;29(6):630-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.12.012> PMID:17306965
12. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999, *Clin Infect Dis* 2001;32(Suppl 2):S146-55. <http://dx.doi.org/10.1086/320186> PMID:11320454
13. Guan Q, Li C, Schmidt EJ. Preparation and characterization of cholic acid-derived antimicrobial agents with controlled stabilities, *Org Lett* 2000; 2(18):2837-40. <http://dx.doi.org/10.1021/ol0062704> PMID:10964378
14. Howell MD, Streib JE, Kim BE et al. Ceragenins: a class of antiviral compounds to treat orthopox infections, *J Invest Dermatol* 2009;129(11):2668-75. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2009.120> PMID:19516269
15. Isogai E, Isogai H, Takahashi K, Okumura K, Savage PB. Ceragenin CSA-13 exhibits antimicrobial activity against cariogenic and periodontopathic bacteria, *Oral Microbiol Immunol* 2009; 4(2):170-2. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00464.x> PMID:19239645
16. Kunz AN, Brook I. Emerging resistant Gram-negative aerobic bacilli in hospital-acquired infections, *Chemotherapy* 2010;56(6):492-500. <http://dx.doi.org/10.1159/000321018> PMID:21099222
17. Lai XZ, Feng Y, Pollard J et al. Ceragenins: cholic acid-based mimics of antimicrobial peptides, *Acc Chem Res* 2008;41(10):1233-40. <http://dx.doi.org/10.1021/ar700270t> PMID:18616297
18. Lara D, Feng Y, Bader J, Savage P, Maldonado R. Anti-trypanosomatid activity of ceragenins, *J Parasitol* 2010;96(3):638-42. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2329.1> PMID:19958044 PMCID:PMC2891312
19. Leszczynska K, Namiot A, Fein DE et al. Bactericidal activities of the cationic steroid CSA-13 and the cathelicidin peptide LL-37 against

- Helicobacter pylori* in simulated gastric juice, *BMC Microbiol* 2009;9:187.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-187>
PMid:19728885 PMCID:PMC2748089
20. Li J, Nation RL, Turnidge JD et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections, *Lancet Infect Dis* 2006;6(9):589-601.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70580-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70580-1)
21. Littlewood JM, Miller MG, Ghoneim AT, Ramsden CH. Nebulised colomycin for early pseudomonal colonisation in cysticfibrosis, *Lancet* 1985;13(1):865.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(85\)92222-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(85)92222-6)
22. Livermore DM. The need for new antibiotics, *Clin Microbiol Infect* 2004;10(Suppl 4):S1-9.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1465-0691.2004.1004.x>
PMid:15522034
23. Livermore DM. The threat from the pink corner, *Ann Med* 2003;35(4):226-34.
<http://dx.doi.org/10.1080/07853890310001609>
PMid:12846264
24. McCoy KS, Quittner AL, Oermann CM, Gibson RL, Retsch-Bogart GZ, Montgomery AB. Inhaled aztreonam lysine for chronic airway Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178(9):921-8.
<http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200712-1804OC>
PMid:18658109 PMCID:PMC2577727
25. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis, *J Clin Microbiol* 2003;41(9):4009-15.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.9.4009-4015.2003>
PMid:12958218 PMCID:PMC193835
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents-Approved Guideline M26-A, Wayne, PA, USA, (1999).
27. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them, *J Antimicrob Chemother* 2003;52(1):1.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg301>
PMid:12805255
28. Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blázquez J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections, *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(11):4226-33.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.11.4226-4233.2004>
PMid:15504845 PMCID:PMC525420
29. Owens RC Jr, Banevicius MA, Nicolau DP, Nightingale CH, Quintiliani R. In vitro synergistic activities of tobramycin and selected beta-lactams against 75 gram-negative clinical isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(11):2586-88.
PMid:9371376 PMCID:PMC164171
30. Pillai SK, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Antimicrobial Combinations, "Lorian V (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine" kitabında s.365-440, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2005).
31. Polat ZA, Savage PB, Genberg C. In vitro amoebicidal activity of a ceragenin, cationic steroid antibiotic-13, against Acanthamoeba castellanii and its cytotoxic potential, *J Ocul Pharmacol Ther* 2011;27(1):1-5.
<http://dx.doi.org/10.1089/jop.2010.0041>
PMid:21142940
32. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis, *N Engl J Med* 1999;340(1):23-30.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199901073400104>
PMid:9878641
33. Ratjen F, Döring G, Nikolaizik WH. Effect of inhaled tobramycin on early Pseudomonas aeruginosa colonisation in patients with cystic fibrosis, *Lancet* 2001;358(9286):983-4.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06124-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06124-4)
34. Regelman WE, Elliott GR, Warwick WJ, Clawson CC. Reduction of sputum Pseudomonas aeruginosa density by antibiotics improves lung function in cystic fibrosis more than do bronchodilators and chest physiotherapy alone, *Am Rev Respir Dis* 1990;141(4 Pt 1):914-21.
http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/141.4_Pt_1.914
PMid:2109558
35. Saha S, Savage PB, Bal M. Enhancement of the efficacy of erythromycin in multiple antibiotic-resistant gram-negative bacterial pathogens, *J Appl Microbiol* 2008;105(3):822-8.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03820.x>
PMid:18452533
36. Taccetti G, Campana S, Neri AS, Boni V, Festini F. Antibiotic therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis, *J Chemother* 2008;20(2):166-9.
PMid:18467240
37. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America, *Clin Infect Dis* 2006;42(5):657-68.
<http://dx.doi.org/10.1086/499819>

Katyonik steroid antibiyotik CSA-13'ün, kolistin ve çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonlarının kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı üçlü sinerjistik etkileri

PMid:16447111

38. Tam VH, Schilling AN, Lewis RE, Melnick DA, Boucher AN. Novel approach to characterization of combined pharmacodynamic effects of antimic-

robial agents, *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(11):4315-21.

<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.11.4315-4321.2004>

PMid:15504858 PMCID:PMC525451