

KARBAPENEMLERİN NİTRİK OKSİT YANITI ÜZERİNE ETKİLERİ*

Zeynep GÜLAY, Mine YÜCESOY, Nuran YULUĞ

ÖZET

Yoğun bakım hastalarında gelişen infeksiyonların tedavisinde sık kullanılan imipenem ve meropenemin, fare peritoneal makrofajlarından nitrik oksit (NO) salınımına etkileri, in-vitro bir deney sistemi ile incelenmiştir. Bu amaçla, değişen düzeylerde (0 "kontrol", 10,30,100, 300 µg/ml) imipenem veya meropenem eklenmiş fare peritoneal makrofaj kültürleri (5×10^5 hücre/ml), 1 µg/ml lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılarak, kültür süpernatantındaki nitrit düzeyleri ölçülmüştür. Sadece besiyeri içeren kontrol çukurlarında, 1., 2. ve 4. günlerde yapılan bu uyarım sonucunda sırasıyla 18.6 ± 7.3 µM, 22.2 ± 6.6 µM ve 34.2 ± 7.9 µM nitrit üretimi saptanmıştır. Kuyucuklara, imipenem (300 µg/ml) ilavesi ile bu miktarların %4.3-%8.7; meropenem (300 µg/ml) ilavesi ile de %3.8-%7.1 oranında azalma gösterdiği ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Sonuçlarımız, imipenem ve meropenemin doğal bağışıklığın bir parçası olan NO yanıtını etkilemediğini göstermektedir.

SUMMARY

The effects of carbapenems on nitric oxide response.

The effects of imipenem and meropenem which are widely used in intensive care units, on nitric oxide (NO) production by murine peritoneal macrophages were investigated in an in-vitro test model. Peritoneal macrophages (5×10^5 cell/ml) which had been cultured in the presence of varying doses (0 "control", 10,30,100, 300 µg/ml) of imipenem or meropenem, were stimulated by 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) and the resulting NO response was assessed by measuring the nitrite levels in the culture supernatants. After LPS stimulation, nitrite level in the control wells reached to 18.6 ± 7.3 µM, 22.2 ± 6.6 µM, 34.2 ± 7.9 µM on the 1st, 2nd, and 4th days of the culture respectively. When imipenem (300 µg/ml) or meropenem (300 µg/ml) were added to the wells these nitrite levels decreased by 4.3-8.7% by the former and 3.8-7.1% by the latter agents. The results were statistically insignificant.

Our results indicate that, imipenem and meropenem have a neutral effect on NO response, a member of murine immune system.

GİRİŞ

Makrofajlar, gerek insan gerekse hayvanlarda intraselüler infeksiyonların kontrolünde rol oynayan en önemli hücre gruplarındanır.

* 11. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (2-6 Haziran 1996, Kuşadası).

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, makrofajlar tarafından salınan bir serbest radikal gaz olan nitrik oksit (NO), tümör hücreleri ve çeşitli patojen mikroorganizma türlerine karşı sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir (8,10,12,19). Bilindiği gibi, NO, nitrik oksit sentaz enzimleri tarafından L-argininin terminal guanido-nitrojen atomlarından birinin oksidasyonu sonucunda oluşan bir ara üründür ve IFN- γ , IL-1 β , IL-2, TNF α ve IL-6 gibi sitokinler ve lipopolisakkarit (LPS) veya stafilokokkal ekzotoksinler gibi bakteriyel ürünler NO sentezini arttırmaktadır (4,6,9,15). Antitümöral, antifungal, antibakteriyel, antiviral ve antiprotozoal etkinlikte olduğu ve yangı gelişiminden sinir ilemesine kadar pek çok işlevi etkilediği ayrıca, septik şok gelişimindeki vazodilatatör etkisiyle ölümcül de olabildiği belirtilmektedir (1,4,8,11,12,15-17). Bu işlevsel çeşitlilik nedeniyle, NO sisteminin farmakolojik manipülasyonuna ilgi giderek artmaktadır.

Çeşitli antimikrobiyal ajanların bu etkinlikleri yanısıra immünomodülatör özellikleri bulunduğu da bildirilmektedir (3,13,18). Bu da tedavi sonucunu etkilemekte veya yan etkiler çıkmasına neden olabilmektedir.

Karbapenem grubu antibiyotikler, anaeroplara dahil olmak üzere çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteri türlerine etkili beta-laktam ajanlardır (5). Bu grupta bulunan imipenem ve meropenem, kromozomal ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ile parçalanmaya dirençli olmaları, bakterisidal etkinlikleri, Gram pozitif ve negatif bakteriler üzerinde post-antibiyotik etkileri bulunması nedeniyle yaşamı tehdit edici nitelikteki infeksiyonların sağaltımında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (5). Ancak pek çok antibiyotik için olduğu gibi, karbapenemlerin de bağışıklık sistemi üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda, imipenem ve meropenemin fare peritoneal makrofajlarından NO salınımına etkileri in-vitro bir deney sistemi ile incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Fare peritoneal makrofaj kültürlerinin hazırlanması

Swiss albino farelerin (n=5), peritoneal kavileri fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkanarak peritoneal hücreleri toplanmıştır (14). Hücreler PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra, sayıları 5×10^5 olacak şekilde RPMI 1640 besiyeri (fenol kırmızısı ve antibiyotik içermeyen, %10 fetal kalf serumu "FCS", L-glutamin, 1×10^{-6} M 2-merkaptetanol eklenmiş) içerisinde süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyon 96 çukurlu plastik hücre kültür plaklarına dağıtılmıştır. Plaklar 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 2 saat inkübe edildikten ve non-adheran hücreler uzaklaştırıldıktan sonra, kontrol çukurlarına sadece RPMI 1640 besiyeri, test çukurlarına ise aynı besiyeri içerisinde değişen konsantrasyonlarda (10 μ g/ml, 30 μ g/ml, 100 μ g/ml 300 μ g/ml) imipenem (Merck Sharp Dohme Inc.) veya meropenem (Zeneca Inc.) eklenmiştir. Her konsantrasyon için üç çukur kullanılmıştır. Bu antibakteriyel ajanlarla temas süresinin NO yanıtına etkilerinin incelenmesi amacıyla, 1, 2 ve 4 gün inkübasyondan sonra, test ve kontrol çukurlarına 1 μ g/ml LPS (*Serratia marcescens* lipopolisakkariti, Sigma Chem. Comp., St Louis, Mo, ABD) eklenmiştir. Uyarım esnasında bazı çukurlara LPS yanında 1 mM L-NMMA (NG monomethyl L-arginine, Sigma) konmuştur. Bir gece 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonrası kültür süpernatantları toplanmıştır.

Nitrit düzeylerinin ölçümü

NO üretimi, bunun stabil bir son ürünü olan nitrit (NO₂) düzeylerinin ölçülmesi ile değerlendirilmiştir (9). Bu amaçla, süpernatanlardan 50 µl alınarak üzerine eşit miktarda Griess ayrıcı (% 1 sülfanilamid / %0.1 naftiletlen diamin dihidroklorid / %2.5 H₃PO₄) ilave edilmiştir. Nitrit konsantrasyonu, renk değişimi standart sodyum nitrit solüsyonununki ile karşılaştırılarak 550 nm dalga boyunda, spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

İstatistiksel testler

Meropenem ve imipenem ile inkübasyonun nitrit salınımına etkisi, Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile değerlendirilmiştir (7).

BULGULAR

Sadece besiyeri içeren kontrol çukurlarında 1., 2. ve 4. günlerde LPS uyarımı sonucunda, nitrit düzeylerinin sırası ile 18.6±7.3 µM, 22.2±6.6 µM ve 34.2±7.9 µM'a ulaştığı belirlenmiştir. Değişen konsantrasyonlarda (10,30,100,300 µg/ml) imipenem ilavesi ile bu miktarların bir günlük inkübasyon sonucunda %0-%4.3; 2 günlük inkübasyon sonucunda %0-%7.2; 4 günlük inkübasyon sonucunda ise %1.5-%8.7 oranında azaldığı saptanmıştır (p> 0.05). 10 µg/ml imipenem ilavesinin sonuçları etkilemediği gözlenmiştir.

Meropenemin nitrit salınımına etkileri incelendiğinde; 1. ve 2. günlerde sadece bu ajanın düzeyinin 300 µg/ml olduğu çukurlarda nitrit düzeylerinin kontrole göre %3.8-%4.0 oranlarında azaldığı belirlenmiştir. 4 gün inkübasyon sonunda ise, 10,30,100,300 µg/ml meropenem içeren çukurlardaki nitrit düzeylerinde sırasıyla %0.8, %0.6, %6.4 ve %7.1 oranında azalma saptanmıştır (p> 0.05). Her iki karbapenem türevinin eklendiği çukurlarda saptanan nitrit düzeyleri kontrol çukurları ile kıyaslandığında, değerler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, bu ajanlarla ön inkübasyon süresinin de sonuçları etkilemediği gözlenmiştir. Bulgular tabloda özetlenmiştir.

TARTIŞMA

NO, başta makrofajlar olmak üzere çeşitli hücreler tarafından sentezlenen ve konak immün yanıtından şok gelişimine kadar pek çok süreçte rol alan bir serbest radikal gazdır (4,8,12). Bu nedenle, tedavide kullanılacak antibakteriyel ajanların NO salınımı üzerine etkisinin bilinmesi önemli olmaktadır. Son 20-30 yıldır, antimikrobiyal ajanların konak bağışık yanıtını değiştirebildiğine ilişkin veriler giderek artmaktadır (3,13,18). Bunlar ayrıca, subinhibitör konsantrasyonlarda kullanıldıklarında bakterilerin yüzey yapılarını değiştirerek, fagositoz ve hücre içi öldürme gibi bağışık işlevleri dolaylı olarak da etkileyebilmektedirler (2,3). Antimikrobiyal ajanların bu etkileri, yaşamı tehdit edici nitelikteki infeksiyonların tedavisinde ve/veya immün sistemi baskılanmış hastalarda kullanıldıklarında özellikle önemli olmaktadır. Genel olarak, imipenemin de aralarında olduğu çeşitli beta-laktam ajanların terapötik düzeylerde uygulanmasıyla, fagositoz ve hücre içi öldürme işlevlerinde belirgin bir değişiklik görülmediği bildirilmektedir (3). Ancak, mikroorganizmalar fagositoz değerlendirilmesi öncesinde subinhibitör konsantrasyonlarda imipenem ile inkübe edildiklerinde, olasılıkla yüzey yapılarının değişmesi sonucunda, fagositoz ve sitotoksositeye duyarlılıkları artmaktadır (2,3).

Tablo. Değişen düzeylerde imipenem ve meropenem ile ön inkübasyonun peritoneal makrofajlardan NO salınımına etkileri.

	Ön inkübasyon süresi					
	1. gün		2. gün*		4. gün	
	Nitrit (µM)	İnhibisyon (%)** _α	Nitrit (µM)	İnhibisyon (%)** _α	Nitrit (µM)	İnhibisyon (%)** _α
Kontrol (besiyeri)	1.2 ± 0.3	-	1.3 ± 0.5	-	2.3 ± 0.9	-
Kontrol+LPS	18.6 ± 7.3	-	22.2 ± 6.6	-	34.2 ± 7.9	-
İmipenem+LPS						
10 µg/ml	19.5 ± 7.4	-	22.6 ± 6.5	-	34.2 ± 7.7	-
30 µg/ml	18.5 ± 7.6	0.5	22.6 ± 6.9	-	33.7 ± 8.2	1.5
100 µg/ml	18.0 ± 6.9	3.2	21.3 ± 4.0	4.00	31.9 ± 11.9	6.7
300 µg/ml	17.8 ± 6.1	4.3	20.6 ± 5.9	7.20	31.2 ± 10.2	8.7
Meropenem+LPS						
10 µg/ml	18.7 ± 7.9	-	22.2 ± 6.6	-	33.9 ± 14.5	0.8
30 µg/ml	19.0 ± 8.2	-	22.8 ± 5.3	-	34.0 ± 13.2	0.6
100 µg/ml	18.6 ± 7.4	-	21.2 ± 5.7	4.50	32.0 ± 13.7	6.4
300 µg/ml	17.9 ± 8.0	3.8	21.3 ± 6.8	4.00	31.8 ± 14.3	7.1

* Karbapenemler ile ön inkübasyon sonrası LPS ile uyarıldığı gün.

** Kontrolle göre nitrit düzeyinde saptanan azalma yüzdesi.

α p>0.05.

Karbapenem türevleri olan imipenem ve meropenem, diğer beta-laktam ajanlara benzer şekilde bakteri hücre duvar sentezini bozarak antibakteriyel aktivite gösterirler (5). Geniş etki spektrumları nedeniyle, özellikle yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaktadırlar. Bu ajanların diğer beta-laktam ajanlara benzer şekilde fagositik hücre sitozolüne girdiği ancak burada birikmediği bildirilmektedir (20). Bu özellikleri ve yaygın kullanımları nedeniyle çalışmamızda imipenem ve meropenemin fare peritoneal makrofajlarından NO salınımına etkileri incelenmiştir. Her iki ajan ile 1, 2 ve 4 günlük inkübasyonun peritoneal hücrelerden nitrit salınımını ancak minimal oranlarda etkilediği ve bunun istatistiksel açıdan önemli olmadığı saptanmıştır. Literatür incelemelerinde benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, imipenem ve meropenem, doğal bağışıklığın bir parçası olan nitrik oksit yanıtını etkilememektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Adams LB, Hibbs JBJ, Taintor RR, Krahenbuhl JL: Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*, *J Immunol* 144:2725 (1990).
- 2- Adinolfi LE, Bonventre PF: Enhanced phagocytosis, killing and serum sensitivity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* treated with subMIC of imipenem, *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1012 (1988).
- 3- Adinolfi LE, Tripodi MF, Adreana A, Utili R: Antimicrobials and biological activities of immune system, *10th Mediterranean Congress of Chemotherapy* Kongre kitabında s.3, Antalya (1996).
- 4- Anggard E: Nitric oxide: mediator, murderer and medicine, *Lancet* 343: 1119 (1994).
- 5- Chambers HF, Neu HC: Other beta-lactam antibiotics, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4.baskı" kitabında s.264, Churchill Livingstone, New York (1995).
- 6- Chesrown SE, Mannier J, Visner G, Nick HS: Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, IFN γ , TGF β and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 200: 126 (1994).
- 7- Dawson-Saunders B, Trapp RG: *Basic and Clinical Biostatistics*, 2. baskı, Appleton and Lange, Connecticut (1994).
- 8- De Groode, Fang FC: NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide, *Clin Infect Dis* 21 (Suppl 2): S162 (1995).
- 9- Ding AH, Nathan C, Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production, *J Immunol* 141:2407 (1988).
- 10- Hibbs JBJ, Taintor RR, Vavrin Z: Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite, *Science* 235: 473 (1987).
- 11- James SL: Role of nitric oxide in parasitic infections, *Microbiol Rev* 59: 533 (1995).
- 12- Koshland DE Jr: The molecule of the year, *Science* 258: 1861 (1992).
- 13- Miltenburg AMM: The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes, *Antimicrob Agents Chemother* 40: 934 (1996).
- 14- Mishell BB, Shigi SM: *Selected Methods in Cellular Immunology*, 3.baskı, WH Freeman and Co, New York (1980).
- 15- Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J* 6: 3051 (1992).

- 16- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327: 524 (1987).
- 17- Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation, *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1251 (1988).
- 18- Riesbeck K, Sigvardsson M, Leanderson T, Forsgren A: Superinduction of cytokine gene transcription by ciprofloxacin, *J Immunol* 153:543 (1994).
- 19- Stuehr DJ, Marletta MA: Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide, *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7738 (1985).
- 20- Tulkens PM: Intracellular distribution and activity of antibiotics, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 100 (1991).