

TELİTROMİSİNİN İNSAN POLİMORF NÜVELİ LÖKOSİT FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI*

Semiha ÖZKAN*, Işıl FİDAN**, Sevgi YÜKSEL***, Turgut İMİR**

* Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

*** Ağrı Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, AĞRI

ÖZET

Polimorf nüveli lökositler (PNL), infeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bakteriyel ve fungal infeksiyonlu hastaların tedavisinde kullanılan antibiyotikler için PNL'lerin fagositoz ve hücre içi öldürme aktivitesini arttırması istenen bir özelliktir. Bu çalışmada ketolid grubu yeni bir antibiyotik olan telitromisin (HMR 3647)'in sağlıklı kişilerin PNL'leri üzerine etkisi araştırılmıştır. PNL'lerin fagositozunu ve hücre içi öldürme aktivitesini ölçmek için Candida albicans ATCC 10231 suşu kullanılmıştır. Fagositik aktivite tayininde 100 PNL içinde maya hücrelerini fagosite etmiş olan PNL'ler sayılmış, kandidasidal aktivite tayininde ise 100 PNL içinde fagosite olan maya hücrelerinden PNL'ler tarafından öldürülen maya hücreleri sayılarak % cinsinden ifade edilmiştir. Telitromisinin kontrole göre fagositoz ve hücre içi ölüm oranını arttırdığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, telitromisinin terapötik konsantrasyonlarda sağlıklı kişilerde PNL fonksiyonlarını in-vitro olarak stimüle ettiği, bu nedenle özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde infeksiyonların tedavisinde etkili olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: fagositoz, polimorf nüveli lökositler (PNL), telitromisin (HMR 3647)

SUMMARY

Investigation of in vitro Efficacy of Telithromycin on Human Polymorphonuclear Leucocyte Functions

Polymorphonuclear leucocytes (PMNLs) have a significant role on host defense against infections. It is desired that antibiotics could also increase the phagocytosis and intracellular killing activity of PMNLs in the therapy of bacterial and fungal infections in patients. In the present study, the effects of telithromycin (HMR 3647), one of the new ketolides, on the healthy human PMNLs were investigated. The C.albicans ATCC 10231 strain was used to investigate the phagocytosis and intracellular killing activity of PMNLs. The phagocyte activity index was calculated as the percentage of ingested yeast cells per 100 PMNLs, while the candidacidal index was calculated as the percentage of dead C.albicans (stained blue) ingested by 100 PMNLs. It was observed that telithromycin enhanced intracellular killing of bacteria and phagocytosis according to control cells that contain no antimicrobial agent. As a result, it was thought that telithromycin stimulate in vitro the healthy human PMNL functions at therapeutic concentrations. So, it was considered that telithromycin may have additional efficacy in the therapy of particularly immunosuppressed patients.

Keywords: phagocytosis, polymorphonuclear leucocytes (PMNLs), telithromycin (HMR 3647)

Yazışma adresi: Semiha Özkan, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Tel: (0312) 202 3263

e-posta: sozkan@gazi.edu.tr

Alındığı tarih: 02.11.2006, revizyon kabulü: 11.12.2006

(Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiş (02 / 2004-04) ve XVIII. Ulusal İmmünoloji Kongresi'nde sunulmuştur (07-10 Eylül 2005, Bursa).

GİRİŞ

Polimorf nüveli lökositler (PNL), infeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli rol oynamaktadırlar. Fagositöz ve hücre içi öldürme aktiviteleri PNL'lerin başlıca fonksiyonlarıdır. İnfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan bazı antibakteriyel ajanlar konağın immün cevabını değiştirebilirler. PNL ve antimikrobiyal ajanlar infeksiyonlarla mücadele etmek için sinerjistik etkileşim gösterirler. Kullanılan antimikrobiyal ajanların PNL'lerin fagositöz ve hücre içi öldürme aktivitesini arttırması istenilen immünomodülatör aktivitelerdir⁽⁶⁾.

Telitromisin (HMR 3647), özellikle dirençli patojenlerin neden olduğu ve toplum kaynaklı solunum yolu infeksiyonlarının tedavisi için geliştirilen semisentetik eritromisin-A derivesi olan ketolid grubundan bir antibiyotiktir. 50S ribozomal subünitesini etkileyerek mikroorganizmada protein sentezini inhibe eder⁽¹⁾.

Telitromisin, eritromisine dirençli pnömokok ve atipik hücre içi organizmaları da kapsayan Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin büyük bir kısmına karşı kuvvetli aktiviteye sahiptir⁽¹⁴⁾.

Bu çalışmada telitromisinin terapötik konsantrasyonda sağlıklı kişilerin PNL fonksiyonları (fagositöz, hücre içi öldürme) ve mikroorganizmaların epitel hücrelerine adezyonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Antibakteriyel ajan: Telitromisinin 400 mg'lık tablet formu, steril şartlar altında dışta bulunan renkli kabuk kısmı soyulduktan sonra ezilerek kullanılmıştır. Stok solüsyonu % 1 HCl - steril distile su içinde hazırlanmış ve buradan terapötik konsantrasyonu olan 0.1 µg/ml ayarlanmıştır⁽¹²⁾.

Minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) saptanması: Telitromisinin *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu için MİK değeri mikrodilüsyon yöntemi ile 0.312 µg/ml olarak bulunmuştur⁽¹⁵⁾.

PNL'lerin elde edilmesi: PNL'ler sağlıklı gönüllülerden alınan heparinli kan örneklerinde Ficoll-Hypaque gradient santrifüj yöntemini takiben dekstran sedimantasyonu ile izole edilmiştir. PNL'lerde tripan mavisi ile canlılık % 98 olarak bulunmuştur. PNL'ler Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) içinde sulandırılarak hücre yoğunluğu 1x10⁷ hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir^(17,18).

Fagositöz ve kandidasidal aktivite: PNL'lerin fagositözünü ve hücre içi öldürme aktivitesini ölçmek için *C.albicans* ATCC 10231 suşu kullanılmıştır. Maya canlılığı metilen mavisi boyama yöntemi ile >% 99 bulunmuştur. İlacın terapötik konsantrasyonu sağlıklı gönüllülerden elde edilen

PNL'ler ile 37°C'de çalkalayıcı etüvde 30 dk inkübe edilmiştir. *C.albicans* süspansiyonu ayrı bir tüp içinde taze insan serumu (4:1) ile 37°C'de 30 dk opsonize edilmiştir. İnkübasyondan sonra ilaç ve PNL karışımı üzerine opsonize maya hücreleri konulmuş ve 37°C'de 30 dk bekletilmiştir. Karışımın son hücre yoğunluğu 5x10⁶ maya/ml ve 5x10⁶ PNL/ml olmuştur. İnkübasyonun 25. dakikasında her tüpe ölü mayaların boyanması için (1:2) metilen mavisi (% 0.01) eklenmiştir. Fagositik aktivite tayininde 100 PNL içinde maya hücrelerini fagosite etmiş olan PNL'ler sayılmış, kandidasidal aktivite tayininde ise 100 PNL içinde fagosite olan maya hücrelerinden PNL'ler tarafından öldürülen (mavi boyanmış) maya hücreleri sayılarak % cinsinden ifade edilmiştir⁽²⁰⁾.

Adezyon deneyi: Sağlıklı kişiden alınan yanak mukozası epitel hücreleri 3 kez PBS ile yıkanarak 10⁶ hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Epitel hücreleri daha sonra telitromisinin 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 MİK değerleri ile inkübe edilen bakteri süspansiyonu ile 1/1 oranında karıştırılarak tüplere konulmuş, 37°C'de 30 dk süre ile su banyosunda inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler santrifüje edildikten sonra süpernatant atılmış, pelet az miktarda PBS ile süspansiyon edilerek lam üzerinde kurutulmuştur. Fikse edildikten sonra, Gram ile boyanarak, mikroskopta 50 farklı epitel hücrelerine bağlanmış bakteriler sayılarak antibiyotik içermeyen epitel hücresi + bakteri bulunan kontrol tüpleriyle karşılaştırılmıştır⁽²³⁾.

İstatistiksel analiz: Kontrol ve telitromisin içeren PNL'lerin fagositöz, hücre içi öldürme aktivitesi ve adezyon fonksiyonu üzerine olan etkilerinin karşılaştırılmasında ANOVA testi kullanılmış, p <0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

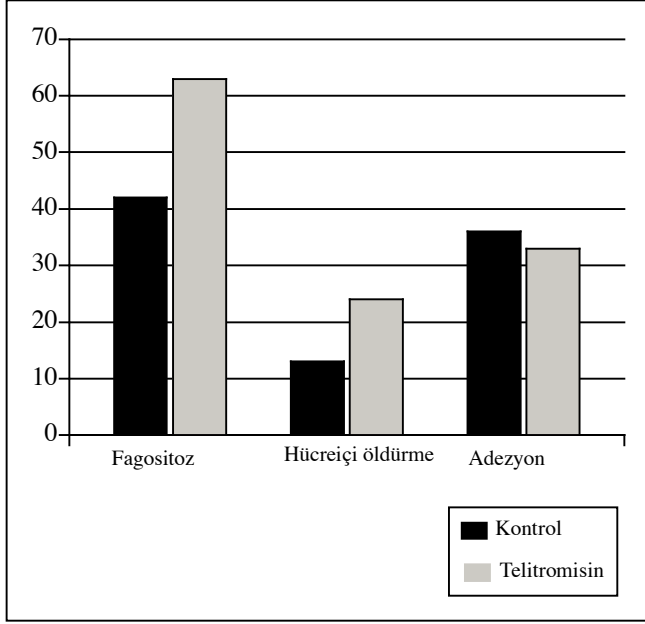
Telitromisinin antibiyotik bulunmayan kontrol tüplerine göre PNL'lerin fagositöz, hücre içi öldürme aktivitesi ve adezyon fonksiyonu üzerine yaptığı etkiler tabloda ve şekilde gösterilmiştir.

Tablo: PNL'lerin fagositöz, hücre içi öldürme özellikleri ve adezyon üzerine olan etkileri.

	Fagositöz (%)	Kandidasidal aktivite (Hücre içi ölüm) (%)	Adezyon (%)
Kontrol	41	13	38
Telitromisin	62	24	32

Telitromisin, antibiyotiğin bulunmadığı kontrol tüpüne göre PNL'lerin fagositik aktivitesini (p=0.007) ve kandidasidal aktivitesini (p=0.000) anlamlı olarak arttırmıştır. Mikroorganizmaların epitel hücrelerine adezyon fonksiyonunda telitromisin kontrol PNL'e göre bir azalmaya neden olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.319).

Şekil: Kontrol PNL ve telitromisin içeren PNL'lerin etkileri (%).



TARTIŞMA

Makrolidlerin en önemli özelliklerinden biri konak hücrelerine girebilme ve konsantr olabilmeleridir. Bu özellikleri sayesinde hücre içi patojenler tarafından oluşturulan infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadırlar^(8,10). Bu özelliklerinin dışında makrolidler fagositik hücreler başta olmak üzere hücre fonksiyonlarını değiştirebilmekte^(9,11), nötrofilleri aktive ederek akut solunum yolu etkeni mikroorganizmalara etkili olmaktadır⁽¹⁶⁾. Telitromisin, makrolid-linkozamid ailesinden yeni bir sınıf olan ketolidlerin ilki, semisentetik, eritromisin-A türevi bir antibakteriyaldir. Toplum kaynaklı pnömoni etkenlerinin, özellikle *S.aureus*'un neden olduğu akut sinüzitlerin ve tonsillit-farenjitlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Makrolid ailesinden olduğu için akut solunum yolu etkeni mikroorganizmalara nötrofilleri aktive ederek etkili olmaktadır⁽¹⁾.

PNL'lerin fagositik aktivitesini artırıcı etki özellikle immün sistemi baskılanmış, opsonizasyon ve fagositik aktivitesi bozuk hastalardaki bakteriyel infeksiyonlara karşı konak savunması için faydalıdır. Çeşitli antimikrobiyal ajanların immünomodülatör etkileri olduğu gösterilmiştir⁽²¹⁾.

Nötrofiller ve antimikrobiyal ajanlar birlikte infeksiyonlara karşı sinerjistik etki gösterebilmektedirler⁽¹⁹⁾. Mikroorganizmaların kısa sürede yok edilmelerinde, antimikrobiyal ajanların fagositler içerisine girebilmeleri önemlidir. Hücre dışı mikroorganizmaları öldürmeye yeten konsantrasyondaki beta-laktam antibiyotiklerden nötrofillerin içindeki stafilokoklar etkilenmezken, rifampin gibi nötrofillerin içine girebilen

antibiyotiklerden etkilendikleri gösterilmiştir⁽¹³⁾. Telitromisinin hücre içi bakterilerde eritromisin, azitromisin ve klaritromisine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir^(2,4). Pek çok makrolidin PNL'in fagositozunu ve bakteriyel fonksiyonu in-vitro olarak arttırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir^(5,12). Bunun yanısıra telitromisin, *Mycobacterium avium* ile yapılan in-vitro deneylerde aktivitesi zayıf olmasına karşın, farelerde oluşturulan *M.avium* infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aktivite göstermiştir⁽³⁾. Bu sonuç tedavisi güç olan diğer *Mycobacterium* türlerinin de telitromisin aktivitesi açısından değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada semisentetik eritromisin-A derivesi olan telitromisinin terapötik konsantrasyonlarda sağlıklı insan PNL üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda telitromisinin PNL'ler tarafından *C.albicans* blastosporlarının fagositozunda ve hücre içi ölüm fonksiyonunda anlamlı düzeyde bir artış oluşturduğu belirlenmiş ve telitromisinin PNL fonksiyonlarından fagositoz ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine immünomodülatör etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Kadir ve ark.⁽⁷⁾ klaritromisinin saf toz şekli ve klinikte kullanılan tablet formu arasında PNL'lerin fagositoz aktiviteleri ve kandidasidal kapasiteleri yönünden fark olup olmadığını araştırmışlardır. Sonuçta her iki ilaç formu ile fagositoz değerlerinde değişme olmazken, tablet formu ile yapılan deneylerde kandidasidal kapasitede azalma olmuştur. Çalışmamızda telitromisinin tablet formu kullanılmış, ancak klaritromisinde olduğu gibi kandidasidal kapasitesinde bir azalma görülmemiştir. İleriki çalışmalarda saf toz ile de çalışılarak ikisi arasında fark olup olmadığı araştırılabilir, ancak uygulamada kullanılan telitromisin tablet formunun hem fagositoz hem de hücre içi ölüm fonksiyonunu arttırması önemlidir.

Çalışmamızda, telitromisinin mikroorganizmaların epitel hücrelerine adezyon fonksiyonu üzerine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltıcı bir etki oluşturduğunun gözlenmesi, bu antimikrobiyal ajanın mikroorganizmaların epitele tutunup, infeksiyon oluşturmasını engelleyerek de terapötik etki gösterebileceğini düşündürmüştür. İnfeksiyon gelişiminde ilk basamak olan adezyon mekanizması üzerine en etkili antimikrobiyal ajanın belirlenmesi infeksiyonların erken dönemlerde önlenmesi açısından da önem taşımaktadır. Vazifeh ve ark.⁽²²⁾ telitromisinin insan PNL'lerinin bakterisidal aktivitesini düzenlediğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak çalışmamızda, telitromisinin terapötik konsantrasyonlarda PNL fonksiyonlarını in-vitro olarak stimüle ettiği görüldüğü için, özellikle immün sistemi baskılanmış, opsonizasyon ve fagositik aktivitesi bozuk hastalardaki infeksiyonların tedavisinde etkili olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Ackermann G, Rodloff AC: Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647)-the first ketolide, *J Antimicrob Chemother* 2003;51(3):497-511.
2. Baltch AL, Smith RP, Ritz WJ, Franke MA, Michelsen PB: Antibacterial effect of telithromycin (HMR 3647) and comparative antibiotics against intracellular *Legionella pneumophila*, *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(1):51-5.
3. Bermudez LE, Inderlied CB, Kolonoski P, Wu M, Aralar P, Young LS: Telithromycin is active against *Mycobacterium avium* in mice despite lacking significant activity in standard in vitro and macrophage assays and is associated with low frequency of resistance during treatment, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(8):2210-4.
4. Bonnefoy A, Guitton M, Delachaux C, Le Priol P, Girard AM: In vivo efficacy of the new ketolide telithromycin (HMR 3647) in murine infection models, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(6):1688-92.
5. Edelstein PH, Edelstein MAC: In vitro activity of the ketolide HMR 3647 (RU 6647) for *Legionella* spp., its pharmacokinetics in guinea pigs, and use of the drug to treat guinea pigs with *Legionella pneumophila* pneumonia, *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(1):90-5.
6. Gemmell CG: Antibiotics and neutrophil function-potential immunomodulating activities, *J Antimicrob Chemother* 1993;31 (Suppl B):S23-33.
7. Kadir T, İzzettin FV, Cevikbas A, Johansson CB, Clark P: In vitro effects of claritromycin on human polymorphonuclear leukocyte functions, *Chemotherapy* 2000;46(3):198-203.
8. Labro MT: Intraphagocytic penetration of macrolide antibiotics, "Bryskier A, Butzler JP, Neu HC, Tulkens PM (eds): *Macrolides: Chemistry, Pharmacology and Clinical Use*" kitabında s. 379-88, Arnette-Blackwell, Paris (1993).
9. Labro MT: Effect of macrolides on host natural defenses, "Bryskier A, Butzler JP, Neu HC, Tulkens PM (eds): *Macrolides: Chemistry, Pharmacology and Clinical Use*" kitabında s. 389-408, Arnette-Blackwell, Paris (1993).
10. Labro MT: Intracellular bioactivity of macrolides, *Clin Microbiol Infect* 1996;1(Suppl 1):S24-30.
11. Labro MT: Effects of macrolides on leukocytes and inflammation, "Zinner SH, Young LS, Acar JF (eds): *Expanding Indications of the New Macrolides, Azalides and Streptogramins*" kitabında s. 101-16, Marcel Dekker, New York (1997).
12. Mandell GL, Coleman E: Uptake, transport, and delivery of antimicrobial agents by human polymorphonuclear neutrophils, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(6):1794-8.
13. Mandell GL, Vest TK: Killing of intraleukocytic *Staphylococcus aureus* by rifampin: in-vitro and in-vivo studies, *J Infect Dis* 1972;125(5):486-90.
14. Mathers DL, Hassman J, Tellier G: Efficacy and tolerability of once-daily oral telithromycin compared with clarithromycin for the treatment of community-acquired pneumonia in adults, *Clin Ther* 2004; 26(1): 48-62.
15. NCCLS (Çeviri editörü Gür D): *Antibiyotik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onikinci Bilgi Eki, M100-S12*, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara (2002).
16. Parnham MJ: Immunomodulatory effects of antimicrobials in the therapy of respiratory tract infections, *Curr Opin Infect Dis* 2005;18(2):125-31.
17. Pascual A, Garcia I, Conejo C, Perea E: Uptake and intracellular activity of fluconazole in human polymorphonuclear leukocytes, *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(2):187-91.
18. Richardson MD, Scott G, Shankland GS: Effects of cilofungin on phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by human neutrophils, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;11(1):22-8.
19. Root R, Isturiz R, Molavi A, Metcalf JA, Malech HL: Interactions between antibiotics and human neutrophils in the killing of staphylococci, *J Clin Invest* 1981;67(1):247-59.
20. Soyoğul Ü: *Candida albicans'a karşı flukonazolün insan polimorf nüveli lökosit fonksiyonları üzerine in vivo etkisinin araştırılması*, M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul (1994).
21. Van VB-Vanholder R, De PP, Vogelaers D, Ringoir S: Immunomodulating effects of antibiotics: literature review, *Infection* 1996; 24(4):275-80.
22. Vazifeh D, Abdelghaffar H, Labro T: Effect of telithromycin (HMR 3647) on polymorphonuclear neutrophil killing of *Staphylococcus aureus* in comparison with roxithromycin, *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(5):1364-74.
23. Vidya KC, Mallya PS, Rao PS: Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentrations of antibiotics, *Indian J Med Microbiol* 2005;23(2):102-5.