

Bazı Antibiyotiklerin Hemodiyaliz Hastalarının Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması

Refiye GARİP, Ümran SOYOĞUL GÜRER, Burçak GÜRBÜZ, Esra DALKILIÇ, Şükrü PALANDÜZ, Fatma Nilgün AYSUNA, Azize YAMAN ŞENER

ÖZET

Çalışmamızda, terapötik derişimlerde vankomisin (40 µg/ml), daptomisin (60 µg/ml), linezolid (19 µg/ml), levofloksasin (7 µg/ml), fusidik asit (36 µg/ml) ve meropenemin (24 µg/ml) hemodiyaliz hastalarının (HD) polimorf nüveli lökosit (PMNL) fonksiyonları (fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine olan etkileri in vitro araştırıldı. PMNL'ler venöz kandan ficoll-hypaque gradient santrifüj yöntemi ile izole edildi. Fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi tayini Alexander'ın yöntemi modifiye edilerek yapıldı. Lipid peroksidasyonun göstergesi olarak MDA düzeyinin ölçümünde Beuge'nin yöntemi kullanıldı.

Tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Terapötik derişimlerde vankomisin, daptomisin, linezolid, levofloksasin, fusidik asit ve meropenem HD hastalarının HD öncesi ve HD sonrası PMNL'lerinin her iki fonksiyonunu etkilemedi ($p>0.05$). Terapötik derişimlerde vankomisin, levofloksasin, fusidik asit ve meropenemin HD hastalarının HD öncesi PMNL'lerinin MDA düzeyini artırdığı, HD sonrası ise MDA düzeyini azalttığı saptandı ($p<0.05$). Daptomisin ve linezolidin ise HD hastalarının HD öncesi ve HD sonrası PMNL'lerinin MDA düzeyini değiştirmedeği gözlemlendi ($p>0.05$).

Anahtar Sözcükler: Hemodiyaliz, oksidatif stres, polimorf nüveli lökosit fonksiyonları.

Refiye Garip, Ümran Soyoğul Gürer, Burçak Gürbüz, Esra Dalkılıç
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Şükrü Palandüz
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi
Genetik Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Fatma Nilgün Aysuna
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Nefroloji
Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Azize Yaman Şener
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye

Sorumlu Yazar: Ümran Soyoğul Gürer
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, İstanbul
E posta: umran.gurer@superonline.com
Adres: Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tıbbiye Caddesi, No: 49 34668, Haydarpaşa, Üsküdar/İstanbul-Türkiye
Telefon: 0 216 414 29 62-1190
GSM: 0535 7126142
Fax: 0216 345 29 52

GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), çeşitli nedenlere bağlı olarak böbrek fonksiyonlarının ilerleyici ve düzelmesi mümkün olmayan kaybı ile karakterize olan bir durumdur (1). Kronik böbrek yetmezliği hastalarında oksidatif stresin arttığı ve/veya antioksidan aktivitenin azaldığı bildirilmektedir. Normal şartlarda serbest oksijen radikallerinin (SOR) üretimi ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. Bu dengenin bozulması sonucunda biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara neden olan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun (LP) ana reaksiyon ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyinde artış meydana gelir. KBY hastalarında oksidatif stres; immünolojik bozukluklara, koagülopati, katarakt, amiloidoz ve ateroskleroz gibi üremik komplikasyonların gelişmesine neden olmaktadır (2,3).

Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda üremik toksisite sonucunda fagositik hücre fonksiyonlarında bozukluk

görülmektedir. Fagositik fonksiyonlarda bakterileri öldürme yeteneğinin azalması, bu tip hastalarda yaygın olarak görülmektedir. KBY'li hastaların son dönem tedavilerinde hemodiyaliz kaçınılmaz bir işlemdir; ancak diyaliz membranı ile kanın teması, serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır (4-6). Membranın aktive ettiği polimorf nüveli lökosit (PMNL)'ler; fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesine sahip, immün sistemde önemli rolleri olan hücrelerdir ve HD esnasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin en önemli kaynağıdır. PMNL'lerin aktive olması ile ortaya çıkan solunum patlamasında rol alan NADPH oksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), nitrik oksit sentaz (NOS) ve miyeloperoksidaz (MPO) gibi enzimler, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO) ve hidroklorik asit (HOCl) gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar. Fagositlerden kaynaklanan bu oksidanların yanı sıra HD'de, kullanılan membran ve diyalizat sıvıları alternatif kompleman yolunun aktivasyonunu sağlayarak hücre hasarının ilerlemesine yol açmaktadır (7).

Hemodiyaliz hastalarında infeksiyonlar; konağın immün sistemi, bakteriyel virülans ve diyaliz prosedürü gibi faktörlere bağlı olarak gelişmektedir. Tüm diyaliz hastalarına ampirik antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Seçilecek antibiyotiklerin gram pozitif ve gram negatif bakterilere etkili olmaları gerekmektedir. Bu hastalarda infeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler ile hastanın immün sistemi arasındaki ilişki çok önemlidir. Hastanın bozulmuş immün sistemi dikkate alınarak doğru antibiyotik seçiminin yapılması tedaviyi olumlu yönde etkileyecektir (8).

Bu amaçla çalışmamızda, terapötik derişimlerde vankomisin (40 µg/ml), daptomisin (60 µg/ml), linezolid (19 µg/ml), levofloksasin (7 µg/ml), fusidik asit (36 µg/ml) ve meropenem (24 µg/ml) HD hastalarının HD öncesi ve HD sonrası polimorf nüveli lökosit (PMNL) fonksiyonları (fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi) ile MDA düzeyleri in vitro olarak araştırıldı.

Bu çalışma, 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri İstanbul'da (18-20 Nisan 2014) poster özeti olarak sunulmuş ve birincilik ödülü almıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar: İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı Hemodiyaliz Ünitesinde hemodiyalize giren yaş ortalaması 52±16 olan KBY'li 12 hasta çalışmaya alındı. Çalışma için Etik Kurul onayı, "Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Girişimsel Olmayan Klinik

Araştırmalar Etik Kurulu" tarafından verilmiştir (Tarih:21.03.2012, sayı: 04, protokol no: 39).

Mikroorganizma: *Candida albicans* ATCC (10231) standart kökeni kullanıldı.

Antibiyotikler : Vankomisin, Linezolid, Meropenem, Fusidik asit (Koçak Farma), Levofloksasin (Nobel İlaç) ve Daptomisin (Novartis) ilaç firmalarından temin edildi.

Antibiyotiklerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması: Daptomisin (60 µg/ml), Vankomisin (40 µg/ml), Linezolid (19 µg/ml), Meropenem (24 µg/ml), Levofloksasin (7 µg/ml) ve Fusidik asit (36 µg/ml) uygun çözücüler ile terapötik derişimlerde hazırlandıktan sonra steril endendorflara dağıtılarak, deneyde kullanılacakları güne kadar - 20°C'de derin dondurucuda saklandı.

Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)'in Elde Edilmesi: Alexander ve ark.'nın nötrofil fonksiyonlarını değerlendirme yöntemi modifiye edilerek; dekstran yerine ficoll-hypaque kullanıldı (9).

Polimorf Nüveli Lökositlerin Canlılık Deneyi: PMNL süspansiyonu ile tripan mavisini 1:1 oranında karıştırılarak oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra mikroskopta mavi boyanmayan (canlı) hücreler sayıldı (9,10).

Fagositik Aktivite ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi

Deneyi: PMNL'lerin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitelerini ölçmek için standart *C.albicans* ATCC 10231 kökeni kullanıldı. Maya hücrelerinin canlılığı metilen mavisini boyama yöntemiyle saptandı. Çalışma kontrol ve 6 deney olmak üzere 7 seri tüp içinde yapıldı. Terapötik derişimdeki vankomisin (40 µg/ml), daptomisin (60 µg/ml), linezolid (19 µg/ml), levofloksasin (7 µg/ml), fusidik asit (36 µg/ml) ve meropenem (24 µg/ml) PMNL'ler ile ayrı tüplerde 37°C'de 30 dakika çalkalayıcı etüvde inkübe edildi. *C.albicans* süspansiyonu ayrı bir tüpte taze insan serumu ile (4:1) 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ilaç ve PMNL karışımları üzerine opsonize maya hücreleri konularak tekrar 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun son 5'nci dakikasında metilen mavisini (%0,01) eklendi. Fagositik aktivite tayininde; 100 adet PMNL içinde canlı (boya almayan) maya hücrelerini fagosite etmiş olan PMNL'ler sayıldı, hücre içi öldürme aktivitesi tayininde ise; 100 adet PMNL içinde, PMNL'ler tarafından öldürülen maya hücrelerini (mavi boyanmış) içeren PMNL'ler sayılarak, % cinsinden ifade edildi (9,10).

Hemodiyaliz Hastalarının PMNL'lerinde MDA Düzeylerinin Ölçümü:

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyinin ölçümü lipid peroksidasyonun değerlendirilmesinde sık

Tablo 1: Vankomisin, Daptomisin, Linezolid, Levofloksasin, Fusidik Asit ve Meropenemin Hemodiyaliz Hastalarının HD Öncesi ve HD Sonrası PMNL'lerinin Fagositik Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri (n=12).

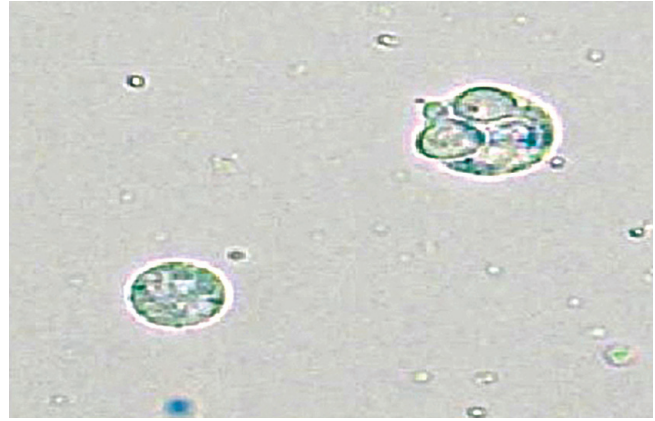
Antibiyotik	Fagositik Aktivite (%)	
	Hemodiyaliz Öncesi (n=12)	Hemodiyaliz Sonrası (n=12)
Kontrol (Antibiyotik içermeyen)	63.00 ± 13.81	57.58 ± 13.65
Vankomisin (40 µg/ml)	64.67 ± 15.74	62.42 ± 16.56
Daptomisin (60 µg/ml)	62.33 ± 16.76	57.08 ± 16.45
Linezolid (19 µg/ml)	65.83 ± 17.12	56.50 ± 18.40
Levofloksasin (7 µg/ml)	60.50 ± 15.99	62.00 ± 16.32
Fusidik asit (36 µg/ml)	65.00 ± 17.19	60.17 ± 16.82
Meropenem (24 µg/ml)	63.17 ± 17.25	60.67 ± 17.21

Elde edilen verilerin analiz sonuçları; aritmetik ortalama ± standart hata olarak ve HD öncesi ve HD sonrası 12 deney ortalaması alınarak verildi. Paired t testi uygulandı.

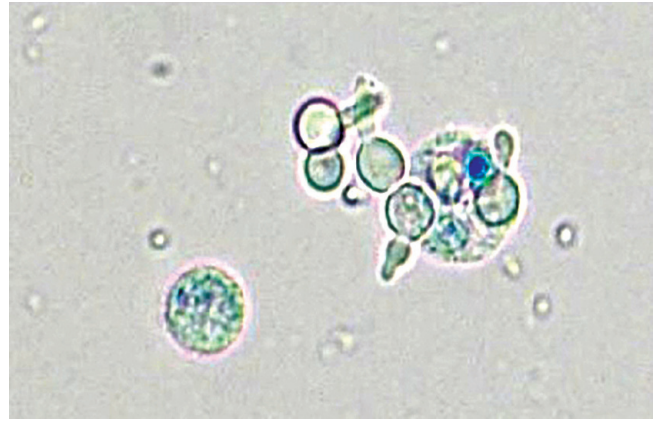
kullanılan yöntemdir. Malondialdehit düzeyleri tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu ile tespit edilmiştir (11). Yöntemin temeli, MDA ile TBA'nın reaksiyona girerek pembe renkli bir kompleks oluşturması ve ortaya çıkan rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Hemodiyaliz hastalarının hem kontrol (antibiyotik içermeyen) hem de antibiyotik (vankomisin, daptomisin, levofloksasin, linezolid, fusidik asit, meropenem) ile muamele edilmiş HD öncesi ve HD sonrası PMNL homojenatlarından 0.5 mL alınarak üzerlerine 1 mL TBA çözeltisi ilave edildi. Kaynar su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra soğutuldu. Oluşan pembe rengin absorbansı 532 nm de spektrofotometrede ölçüldü. MDA miktarları molar ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi. Örneklerin protein içerikleri Bradford yöntemine göre tayin edildi (12).

BULGULAR

Polimorf Nüveli Lökosit Canlılık Deneyi: Hemodiyaliz hastalarının kanlarından izole edilen PMNL'lerin canlılığı tripan mavisi (%0,5) ile yapılan inceleme sonunda >%98 olarak bulundu.



Resim 1: Vankomisin, Daptomisin, Levofloksasin, Linezolid, Fusidik Asit ve Meropenemin HD Hastalarının PMNL'lerinin Fagositik Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri (x 40 büyütme; PMNL içinde fagosit olmuş *Candida albicans* hücresi)



Resim 2: Vankomisin, Daptomisin, Levofloksasin, Linezolid, Fusidik Asit ve Meropenemin HD Hastalarının PMNL'lerinin Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri (x 40 büyütme; PMNL içinde ölmüş olan *Candida albicans* hücresi metilen mavisi ile maviye boyanmış).

Vankomisin, Daptomisin, Levofloksasin, Linezolid, Fusidik asit ve Meropenemin Hemodiyaliz Hastaların PMNL'lerinin Fagositik Aktivitesi ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri: Terapötik derişimlerde vankomisin (40 µg/ml), daptomisin (60 µg/ml), linezolid (19 µg/ml), levofloksasin (7 µg/ml), fusidik asit (36 µg/ml) ve meropenemin (24 µg/ml) HD hastalarının HD öncesi ve HD sonrası PMNL'lerinin her iki fonksiyonunu etkilemediği bulundu ($p > 0.05$), (Resim 1,2; Tablo 1,2; Grafik 1,2).

Vankomisin, Daptomisin, Linezolid, Levofloksasin, Fusidik Asit ve Meropenemin Hemodiyaliz Hastalarının HD Öncesi ve HD Sonrası PMNL'lerinin MDA Düzeyi Üzerine İn Vitro Etkileri: HD hastalarının PMNL'leri terapötik derişimlerde vankomisin (40 µg/ml), levofloksasin

Tablo 2: Vankomisin, Daptomisin, Linezolid, Levofloksasin, Fusidik Asit ve Meropenemin Hemodiyaliz Hastalarının HD Öncesi ve HD Sonrası PMNL'lerinin Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri (n=12).

Antibiyotik	Hücre İçi Öldürme Aktivitesi (%)	
	Hemodiyaliz Öncesi (n=12)	Hemodiyaliz Sonrası (n=12)
Kontrol (Antibiyotik içermeyen)	2.70 ± 1.49	2.80 ± 1.87
Vankomisin (40 µg/ml)	3.40 ± 2.22	3.56 ± 1.33
Daptomisin (60 µg/ml)	2.57 ± 1.51	3.00 ± 2.56
Linezolid (19 µg/ml)	2.38 ± 1.06	3.17 ± 2.04
Levofloksasin (7 µg/ml)	3.13 ± 0.99	2.88 ± 2.30
Fusidik asit (36 µg/ml)	2.44 ± 2.56	2.75 ± 1.98
Meropenem (24 µg/ml)	3.11 ± 1.69	3.36 ± 1.43

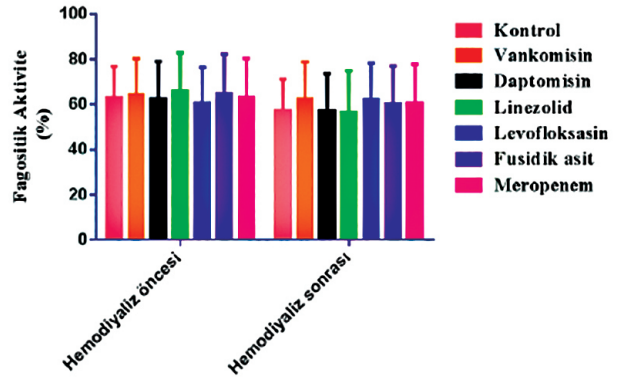
Elde edilen verilerin analiz sonuçları; aritmetik ortalama ± standart hata olarak ve HD öncesi ve HD sonrası 12 deney ortalaması alınarak verildi. Paired t testi uygulandı.

Tablo 3: Vankomisin, Daptomisin, Linezolid, Levofloksasin, Fusidik Asit ve Meropenemin HD Hastalarının HD Öncesi ve HD Sonrası PMNL'lerinin MDA Düzeyi Üzerine İn Vitro Etkileri (n=12).

Antibiyotik	MDA (nmol/mg protein)	
	Hemodiyaliz Öncesi (n=12)	Hemodiyaliz Sonrası (n=12)
Kontrol (Antibiyotik içermeyen)	1.7 ± 0.8	3.3 ± 3.2
Vankomisin (40 µg/ml)	3.6 ± 2.0*	2.7 ± 1.9
Daptomisin (60 µg/ml)	2.9 ± 2.7	3.4 ± 3.2
Linezolid (19 µg/ml)	2.2 ± 1.3	3.0 ± 2.4
Levofloksasin (7 µg/ml)	2.9 ± 1.8*	3.8 ± 3.7
Fusidik asit (36 µg/ml)	2.9 ± 1.9*	2.6 ± 1.9
Meropenem (24 µg/ml)	3.2 ± 2.7*	3.2 ± 3.1

* p<0.05 (HD öncesi kendi kontrolü ile karşılaştırıldı).

Elde edilen verilerin analiz sonuçları; aritmetik ortalama ± standart hata olarak ve HD öncesi ve HD sonrası 12 deney ortalaması alınarak verildi. Paired t testi uygulandı.



Grafik 1: Vankomisin, Daptomisin, Levofloksasin, Linezolid, Fusidik Asit ve Meropenemin HD Hastalarının HD Öncesi ve HD Sonrası PMNL'lerinin Fagositik Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri.

(7 µg/ml), fusidik asit (36 µg/ml) ve meropenem (24 µg/ml) ile inkübe edildiklerinde, kontrole göre HD hastalarının HD öncesi PMNL'lerinin MDA düzeyini anlamlı bir şekilde artırdı (p<0.05).

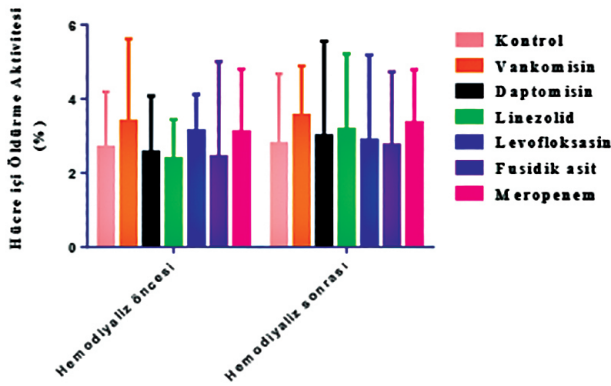
Çalışmamızda kontrol ile karşılaştırıldığında; daptomisin ve linezolidin HD hastalarının HD öncesi PMNL'lerinin MDA düzeyini etkilemediği bulundu (p>0.05). Vankomisin, daptomisin, linezolid, levofloksasin, fusidik asit ve meropenemin HD hastalarının HD sonrası PMNL'lerinin MDA düzeyini ise etkilemediği görüldü (p>0.05), (Tablo 3, Grafik 3).

İSTATİSTİK

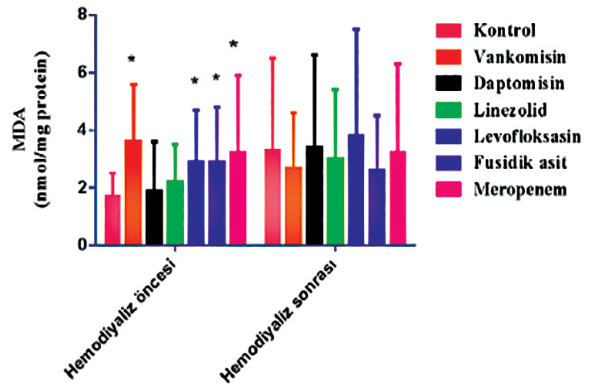
Çalışmamızda, HD öncesi ve HD sonrası elde edilen verilerin analiz sonuçları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldı ve GraphPad InStat, sürüm 3.05 programında Paired t testi uygulandı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), oksidatif stres ile seyreden klinik tablolardan biridir. KBY'de hastalığın oluşturduğu toksik etkiler PMNL'leri olumsuz yönde etkiler (13). KBY hastalarının tedavi seçeneklerinden olan hemodiyaliz (HD), oksidatif stresi artırarak hastanın immün sistemini bozmakta ve infeksiyonlara karşı duyarlılığını arttırmaktadır. İnfeksiyonlar ve böbrek yetmezliği hücrel ve humoral yanıtta belirgin değişikliklere, lenfosit ve granülosit fonksiyonlarında bozulmalara neden olmaktadır (14). Dolayısıyla bu hasta grubunun kullanacağı antibiyotiklerin immün sisteme olumsuz bir etki göstermemesi istenmektedir (15,16). İmmün sistem üzerine olumsuz etkileri olan antimikrobiklerin kullanımı sonucu dirençli



Grafik 2: Vankomisin, Daptomisin, Linezolid, Levofloksasin, Fusidik Asit ve Meropenemin HD Hastalarının HD Öncesi ve HD Sonrası PMNL'lerinin Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri.



Grafik 3: Vankomisin, Daptomisin, Linezolid, Levofloksasin, Fusidik Asit ve Meropenemin HD Hastalarının HD Öncesi ve HD Sonrası PMNL'lerinin MDA Düzeyi Üzerine İn Vitro Etkileri.

mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların gelişimi artar, konak direnci düşer ve infeksiyon ciddi boyutlar kazanır. Bu nedenle antimikrobiklerin doğru yerde ve doğru şekilde kullanılması immün sistemi bozulmuş olan KBY hastalarının tedavisinde yarar sağlayacaktır.

Tüm diyaliz hastalarına ampirik antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Seçilecek antibiyotiklerin gram pozitif ve gram negatif bakterilere etkili olmaları gerekmektedir. Etkenlerin 2/3'ü gram pozitif bakteriler olduğundan kateter ilişkili bakteriyemi durumunda ampirik tedavide glikopeptid antibiyotikler (vankomisin veya teikoplanin) kullanılmaktadır. HD hastalarında sık vankomisin kullanılması nedeniyle diyaliz hastaları vankomisine dirençli enterokok (VRE) yönünden artmış risk altındadır ve VRE epidemileri gözlenmektedir (17,18).

Antimikrobiyal direnç küresel bir tıbbi sorundur ve metisilin direnci *S. aureus* izolatları arasında artmaya devam etmektedir. Daptomisin ve linezolid gibi yeni antimikrobiyal ajanlar, dirençli bu organizmaların neden olduğu komplike enfeksiyonların tedavisi için tarif edilmiştir. Tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır ve bazı durumlar dışında, neredeyse hiç kullanılmamaktadır (19,20).

Antibiyotiklerin optimal terapötik etkilerinin, konağın bağışıklık sistemi sağlıklı iken ortaya çıktığını immün sistemi baskılanmış olgularda bazı antibiyotiklerin işlevlerinin yerine getiremediklerini kanıtlayan çalışmalar yapılmıştır (19).

Birçok farmakolojik ajan nötrofillerden granüler enzim salınımını inhibe eder. Prostaglandin E, teofilin, dibütiril siklik adenosin monofosfat, 2-kloroadenosin, izoprotorenol ve adrenalin gibi bileşiklerin hücre içi adenosin-3'-5'-monofosfat seviyesini artırarak bu inhibisyonu yaptıkları

ileri sürülmüştür. Yine aynı şekilde tetrasiklin, fenilbutazon, thioridazin, klorokin, kolşisin, sitokalsin-B, vinblastin ve kortikosterooidlerin fagositoz olayını inhibe ettikleri bildirilmiştir (20, 21).

Literatürlerde daptomisin dışında, vankomisin linezolid, levofloksasin, fusidik asit ve meropenemin HD hastalarının PMNL fonksiyonları üzerine in vitro etkileri ile ilgili az sayıda çalışmaya rastladık.

Mehes ve ark. (22), düşük derişimlerdeki vankomisin (0, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 4 ve 8 mg/l) HD'li hasta PMNL'lerinin *S. aureus* suşlarına karşı fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesini etkilemediğini bulmuşlardır.

Moran ve ark. (23), vankomisin (1-50 µg/ml) insan PMNL'leri üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında; her iki antibiyotiğin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine etkili olduğunu ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığını göstermişlerdir (p<0,019).

Pedra ve ark. (24), terapötik derişimlerdeki (10, 25, 50, 75 ve 100 µg/ml) vankomisin insan nötrofillerinin hücre içi öldürme aktivitesini arttırdığını saptamışlardır.

Çalışmamızda terapötik derişimde vankomisin, HD hastalarının HD öncesi ve HD sonrası PMNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesini etkilemediğini saptadık (p>0.05).

Literatürlerde daptomisin PMNL fonksiyonları üzerine etkisini inceleyen çalışmalara rastlanmamıştır. Çalışmamızda tedavi seçenekleri oldukça sınırlı olan ve bazı durumlar dışında, neredeyse hiç kullanılmayan daptomisin ve linezolid gibi yeni antimikrobiyal ajanların HD hastalarının PMNL fonksiyonlarından fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktiviteleri üzerine in vitro etkileri

araştırıldı ve terapötik derişimde daptomisin (60 µg/ml) ve linezolidin (19 µg/ml), HD hastalarının HD öncesi ve HD sonrası PMNL'lerinin fagositik aktivitesini ve hücre içi öldürme aktivitesini etkilemediği saptandı (p>0.05).

Ballesta ve ark. (25), linezolidin terapötik derişimde (2, 10 ve 20 µg/ml) insan PMNL'lerinin metisilin duyarlı ve dirençli *S.aures* ve vankomisin duyarlı ve dirençli *Enterococcus faecalis*'e karşı fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine etkisini incelemişler ve etkisiz olduğunu saptamışlardır.

Naess ve ark. (26) yaptıkları çalışmada, 10-60 µg/ml derişimlerdeki linezolidin insan PMNL fonksiyonları (fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi) üzerine etkisinin anlamlı olmadığını bulmuşlardır.

Araştırmacıların bulguları bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Cömerter ve ark. (27), levofloksasinin (2.8 µg/ml) tablet dozaj formunun sağlıklı gönüllülerden elde edilen nötrofillerin fagositik aktivitesini hammadde formuna göre anlamlı olarak azalttığını; 5.7 µg/ml tablet dozaj formunun ise hem fagositik hem de hücre içi öldürme aktivitesini azalttığını; 11.4 µg/ml derişimdeki levofloksasinin hammadde formunun ise sadece fagositik aktiviteyi azalttığını bulmuşlardır (p<0.05).

Çalışmamızda terapötik derişimde levofloksasinin (7 µg/ml) HD hastalarının HD öncesi ve HD sonrası PMNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesini değiştirmedeği saptandı (p>0.05).

Nielsen ve ark. (28), 64 µg/ml derişimdeki fusidik asidin 3 farklı *S.aureus* suşlarına (A, B ve D) karşı PMNL'lerin hücre içi öldürme aktivitesi üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında; 3 farklı *S. aureus* suşundan sadece ikisine (B ve D) karşı etkili olduğunu göstermişlerdir (p<0.0003).

Çalışmamızda terapötik derişimde fusidik asidin (36 µg/ml) HD hastalarının HD öncesi ve HD sonrası PMNL'lerinin fagositik aktivitesini ve hücre içi öldürme aktivitesini etkilemediği saptandı. (p>0.05).

Matera ve ark. (29), yaptıkları çalışmada yüksek derişimlerdeki meropenemin (50-200 µg/ml) insan PMNL'lerinin fagositik aktivitesini artırdığını, düşük konsantrasyonlardaki meropenemin (5, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml) ise hücre içi öldürme aktivitesini etkilemediğini bulmuşlardır.

Herrera-Insúa ve ark. (30), 4x0.25 µg/ml MİK derişimindeki meropenemin insan PMNL'lerinin *Escherichia coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı hücre içi öldürme aktivitesini arttırdığını saptamışlardır (p<0.05).

Çalışmamızda, kontrol ile karşılaştırıldığında; terapötik derişimlerde meropenemin (24 µg/ml) HD hastalarının HD öncesi ve HD sonrası PMNL'lerinin fagositik aktivitesi ile hücre içi öldürme aktivitesini etkilemediği saptandı (p>0.05).

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, doku hasarında serbest radikaller tarafından meydana getirilir ve oksidatif stresin ölçülmesinde kullanılır (31,32). Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda yaygın olarak görülen enflamasyon sırasında aktif nötrofillerden üretilen SOR'lar ve klorlu oksidan bileşikler oksidatif stresi bu hastalarda tetikleyebildiği gibi hemodiyaliz sırasında diyaliz membranı ile etkileşen nötrofiller ve üremik toksinlerde SOR düzeylerinde artışa neden olarak oksidatif stresi arttırmaktadır (1,3,7). Bu nedenle tedavi aşamasında kullanılan antibiyotiklerin PMNL'lerde oksidatif strese etkisinin belirlenmesi tedavi stratejisine katkı sağlayabilir. Literatürde HD hastalarının PMNL'lerinde MDA düzeyleri üzerine vankomisin, daptomisin, linezolid, levofloksasin, fusidik asit ve meropenemin etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Ancak bazı antioksidanların hemodiyaliz sırasında oluşan oksidatif strese karşı etkisi araştırılmıştır. Silmarin ve E vitamini takviyesinin hemodiyaliz hastalarında plasma MDA düzeylerini azalttığı ve eritrosit glutatyon peroksidaz düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (33). HD sırasında uygulanan heparinin de antioksidan etkisi bildirilmiştir (34).

Çalışmamızda HD hastalarının PMNL'leri terapötik derişimlerde vankomisin (40 µg/ml), levofloksasin (7 µg/ml), fusidik asit (36 µg/ml) ve meropenem (24 µg/ml) ile inkübe edildiklerinde, kontrole göre HD hastalarının HD öncesi PMNL'lerinin MDA düzeyi anlamlı bir şekilde arttı (p<0.05). Ancak aynı antibiyotiklerin HD hastalarının HD öncesi artmış olan MDA düzeyini HD sonrası azalttığı saptandı. Bulgularımız antibiyotiklerin MDA düzeyi üzerine antioksidan bir etki yaparak immünomodülatör özellik gösterdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda kontrol ile karşılaştırıldığında; daptomisin ve linezolidin HD hastalarının HD öncesi PMNL'lerinin MDA düzeyini etkilemediği bulundu (p>0.05). Vankomisin, daptomisin, linezolid, levofloksasin, fusidik asit ve meropenemin HD hastalarının HD sonrası PMNL'lerinin MDA düzeyini ise etkilemediği görüldü (p>0.05). Bu sonuçlar terapötik derişimlerde vankomisin, levofloksasin, fusidik asit ve meropenemin HD'nin oksidatif stresi artırması sonucunda PMNL'lerdeki H₂O₂'in MPO enzimi tarafından HOCl ve OH gibi SOR radikallerine dönüşümünü engelleyerek hücre membranındaki lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermektedir.

Hemodiyaliz hastaları antibiyotiklere dirençli suşların bulaşması açısından risk altındadırlar. Bu hastaların sık hastaneye yatmaları, özellikle uzun süreli antibiyotik kullanımı ve cerrahi girişimler bunun nedeni olmaktadır. Bu çalışma hastalığın ve tedavi protokollerinde yer alan antibiyotikler ve antibiyotik dışı ilaçların konağın immün sistem yanıtları üzerindeki inhibitör veya modülatör etkilerinin de göz önüne alınmasının önemini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; KBY'deki HD olgularında, vankomisin, daptomisin, linezolid, levofloksasin, fusidik asit ve meropenemin immün sistem hücre fonksiyonlarına ve

MDA üzerine olumsuz etki oluşturmadığı görüldüğünden, çalışmamızın klinik olarak da desteklenmesi sonucunda bu antibiyotiklerin HD hastalarının bakteriyel infeksiyonlarının tedavisinde yararlı olacağı kanısındayız.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: SAG-C-DRP-210311-0047), İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı Hemodiyaliz Ünitesinden sorumlu başhemşire Özlem Düzgün'e, Koçak Farma, Nobel ve Novartis ilaç A.Ş.'ne teşekkür ederiz.

In Vitro Investigation of The Effects of Some Antibiotics on Polymorphonuclear Leukocyte Functions and Oxidative Stress in Hemodialysis Patients.

ABSTRACT

In our study we were investigated the in vitro effects of therapeutic concentrations of vancomycin (40 µg/ml), daptomycin (60 µg/ml), linezolid (19 µg/ml), levofloxacin (7 µg/ml), fusidic acid (36 µg/ml) and meropenem (24 µg/ml) on the malondialdehyde (MDA) levels and polymorphonuclear leukocyte (PMN) functions (phagocytic and intracellular killing activity) in hemodialysis patients. PMNs were isolated from venous blood by ficoll-hypaque

gradient centrifugation method. Phagocytic activity and intracellular killing activity were assayed by modified Alexander's method. MDA level was detected by Beuge method which is as an indicator of lipid peroxidation. All results was evaluated by statistically. Vancomycin, daptomycin, linezolid, levofloxacin, fusidic acid and meropenem at therapeutic concentrations did not affect both PMN functions of HD patients before and after HD ($p>0.05$). It was observed that vancomycin, levofloxacin, fusidic acid and meropenem at therapeutic concentrations increased PMN's MDA levels of HD patients before HD but decreased MDA levels after HD ($p<0.05$). Daptomycin and linezolid did not change PMN's MDA levels of HD patients before and after HD ($p>0.05$).

Keywords: Hemodialysis, oxidative stress, polymorphonuclear leukocyte functions.

KAYNAKLAR

1. Kaya H, Polat F, Odabaş AR, Çetinkaya R, Kiki İ. Kronik hemodiyaliz hastalarında lipid peroksidasyonu. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi* 2000; 2:90-4.
2. Ayköse MG. Kronik Böbrek Yetmezliği Nedeni ile Hemodiyaliz Tedavisi Gören Cinsel Disfonksiyonlu Erkeklerde Gonadal Fonksiyonların ve Testosteron Replasman Tedavisinin Değerlendirilmesi. Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Üroloji Kliniği, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2006. (Danışman: Prof. Dr. Selami Albayrak).
3. Chugh SN, Jain S, Agrawal N, Sharma A. Evaluation of oxidative stress before and after haemodialysis in chronic renal failure. *J Assoc Physicians India* 2000; 48:981-4.
4. Çeliker H, Elkiran B, İlhan N, Günel Aİ, Doğukan A. Hemodiyaliz ve periton diyalizinin oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi* 2001; 10:88-92.
5. Ögüş E, Yılmaz FM, Yılmaz H, Duranay M, Yücel D. Hemodiyaliz ve periton diyalizi hastalarında serum malondialdehit düzeyleri ve oksidasyona yatkınlık. *T Klin J Med Sci* 2004; 24:316-22.
6. Özşahin EA, Yazıcı C, Köse K, Utaş C, Tokgöz B. Hemodiyaliz hastalarında plazma malondialdehit ve tiyol seviyeleri. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2004; 13:8-14.
7. Köken T, Kahraman A, Serteser M, Gökçe Ç. Hemodiyaliz ve oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004; 5:9-13.
8. Badur S. Antimikrobiklerin immün sisteme istenmeyen etkinlikleri. *Klinik Dergisi* 1991; 3: 105-8.
9. Alexander JW, Windhorst DB, Good RA. Improved tests for the evaluation of neutrophil function in human disease. *J Lab Clin Med* 1968; 72:136-48.
10. Roilides E, Walsh TJ, Rubin M, Venzon D, Pizzo PH. Effect of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:196-201.
11. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 53:302-11.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 7: 248-54.
13. Büyükbaş S, İnal A, Atalay H. Hemodiyaliz hastalarında oksidatif aktivitenin değerlendirilmesi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2007; 5:105-10.
14. Hazar A. Akciğer kanserli hastalarda malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasite (TAOK) düzeyi ölçümü ile oksidan-antioksidan dengenin araştırılması. Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp-Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık tezi, İstanbul, 2006. (Danışman: Dr. Armağan Hazar).
15. Abbasoğlu U, Çevikbaş A. Farmasötik Mikrobiyoloji. Efil Yayınevi Ltd. Şti., İstanbul, 2011.
16. Kılıçtılgay K. İmmün modülatör olarak antibiyotikler. *ANKEM Dergisi* 1993; 7:157-60.

17. Parlar E. Diyaliz hastalarının nozokomiyal enfeksiyon kontrolü. Hastane Enfeksiyonları: Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi 2008; 60: 121-9.
18. Karkaç E, Tanboğa B. Periton diyalizi hastalarında staphylococcus aureus ve vankomisin dirençli enterokok taşıyıcılığı ve bu mikroorganizmaların neden olduğu invaziv enfeksiyonların değerlendirilmesi. Tıp Araştırmaları Dergisi 2013; 11:116-23.
19. Gillissen G. Side effects of antibiotics on immune response parameters and their possible implications in antimicrobial chemotherapy. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A 1988; 270:171-99.
20. Bayram A, Vural Ö, Bakan E. Nötrofil fagositozu. Türkiye Klinikleri 1985; 5:276-9.
21. Demiray E, Bekmen N. Helicobacter pylori enfeksiyonu ve fagositoz. Mikrobiyoloji Bülteni 2008; 42:177-84.
22. Mehes L, Tasko S, Szekely A, Toth A, Ungvari E, Erdei I, Dombradi Z, Szabo J, Marodi L. Phagocytosis and intracellular killing of heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strains. J Med Microbiol 2011; 61:198-203.
23. Morán FJ, Puente LF, Pérez-Giraldo C, Blanco MT, Hurtado C, Gómez-García AC. Activity of vancomycin and teicoplanin against human polymorphonuclear leukocytes: a comparative study. J Antimicrob Chemother 1991; 28:415-8.
24. Pedrera MI, Barriga C, Rodriguez AB. Intracellular activity of both teicoplanin and vancomycin against Staphylococcus aureus in human neutrophils. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1995; 18:123-8.
25. Ballesta S, Pascual A, Garcia I, Perea EJ. Effect of linezolid on the phagocytic functions of human polymorphonuclear leukocytes. Chemotherapy 2003; 49:163-6.
26. Naess A, Stenhaug Kilhus K, Nystad TW, Sørnes S. Linezolid and human polymorphonuclear leukocyte function. Chemotherapy 2006; 52:122-4.
27. Cömerter H, Kadir T, Okuyan B, Sancar M, İzzettin VF. Assessment of levofloxacin effect on human neutrophil functions in vitro. Turk J Pharm Sci 2013; 10:19-24.
28. Nielsen SL, Black FT. Extracellular and intracellular killing in neutrophil granulocytes of Staphylococcus aureus with rifampicin in combination with dicloxacillin of fusidic acid. J Antimicrob Chemother 1999; 43:407-10.
29. Matera G, Berlinghieri MC, Foca A. Meropenem: effects on human leukocyte functions and interleukin release. J Antimicrob Agents 1995; 5:129-33.
30. Herrera-Insúa I, Pérez P, Martínez P, Gómez-Lus ML, Prieto J. Meropenem-induced alteration of the susceptibility of Escherichia coli and Staphylococcus aureus to the bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. J Antimicrob Chemother 1997; 39:223-8.
31. Gürbüz B, Gürer SÜ, Çevik Ö, Yalçınkaya İ, Bekiroğlu GN, Çevikbaş A. Bronşektazili hastalarda kolistin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının polimorf nüveli lökosit fonksiyonları, oksidatif stres, oksidan ve antioksidan enzimler üzerine etkilerinin in vitro araştırılması. Marmara Pharm J 2014; 18:26-35.
32. Rayaman P, Rayaman E, Cevikbaş A, Demirtunç R, Şehirli Ö.A, Gürer S.Ü. The effect of some antibiotics on polymorphonuclear leukocyte (PMN) functions and PMN's myeloperoxidase activity, glutathione and malondialdehyde levels of patients with type 2 diabetes mellitus in vitro. MUSBED 2013; 3:200-7.
33. Roozbeh J, Shahriyari B, Akmalı M, Vessal G, Pakfetrat M, Raees Jalali GA, Afshariani R, Hasheminasab M, Ghahramani N. Comparative effects of silymarin and vitamin E supplementation on oxidative stress markers, and hemoglobin levels among patients on hemodialysis. Ren Fail 2011; 33:118-23.
34. Nassiri AA, Hakemi MS, Soulati M, Marashian M, Rahbar K, Azizi F. Effects of heparin and dalteparin on oxidative stress during hemodialysis in patients with end-stage renal disease. Iran J Kidney Dis 2009; 3:162-7.