

Nitrik Oksitin *Mycobacterium tuberculosis*'e Etkinliğinin İn Vitro Araştırılması

Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN, Dr. Belma DURUPINAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

- ✓ Çalışmada, nitrik oksit (NO)'in 15 klinik *Mycobacterium tuberculosis* izolatına karşı etkinliği araştırılmıştır. NO donorü olarak DETA-NO kullanılmıştır. NO için minimum inhibitör konsantrasyonlar (MİK) OADC (oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz)'li Middlebrook 7H9 buyyonda mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışmada klinik izolatlar için elde edilen MİK değerleri 0.015-0.125 mg/ml arasında bulunmuştur. NO'nun *M. tuberculosis* izolatlarına karşı etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, nitrik oksit, DETA-NO, diazeniumdiolate

- ✓ **The Investigation of The Efficacy of Nitric Oxide Against *Mycobacterium tuberculosis* In Vitro**

In this study, the efficacy of NO against 15 *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates was examined. DETA-NO was used as NO donor. Minimum inhibitor concentrations (MIC) for NO detected with microdilution method by using Middlebrook 7H9 broth with OADC (oleic acid, albumin, dextroz, catalase). In this assay detected MIC values for clinical isolates were found in a range of 0.015-0.125 mg/ml. According to our results NO was efficient to *M. tuberculosis*.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, nitric oxide, DETA-NO, diazeniumdiolate

GİRİŞ

Birçok mikroorganizma makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra fagozomlardan salınan lizozomal içerik tarafından öldürülür. Ancak bazı mikroorganizmalar makrofaj içerisinde canlılık ve çoğalmalarını sürdürebilirler. Bunlar; *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus* ve *Candida albicans*'dir⁽¹⁾.

Makrofajlar bağışık yanıt oluşmasında çeşitli uyaranlar ile aktive olarak reaktif nitrojen ara maddeleri (RNIs) ve reaktif oksijen ara maddeleri (ROIs) üretirler. Bu ara maddeler antimikrobiyal etkiye sahiptir. Makrofajların interferon-gama (IFN- γ) ile birlikte

bakteriyel hücre duvarı lipopolisakariti veya muramil dipeptid ile aktive olmaları yüksek oranda nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin eksprese edilmesine neden olur. Bu enzim, L-arjinini oksidize ederek sitrüllin ve bir RNI olan nitrik oksit (NO) üretimini sağlar. NO kendi kendine etkili bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olup, süperoksid anyonları ile kombine olarak daha etkili antimikrobiyal maddeler de oluşturabilir. Makrofajların antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili son bulgular bakterilere, mantarlara, helmintlere ve protozal patojenlere karşı etkinliklerinde, NO ve ondan derive maddelerin önemli ölçüde rol oynadığını göstermektedir. Ancak mevcut bilgiler NO'nun mikroorganizmaları öldürme mekanizmasını açıklamakta yetersiz kalmaktadır; bununla birlikte NO tarafından

indüklenen sitotoksitenin biyokimyasal temelini, hedef hücrelerdeki respiratuvar siklus ve DNA sentezinin anahtar enzimlerindeki demir-içeren bölgelerle NO'nun etkileşimine bağlı olduğu belirtilmektedir⁽¹⁾.

NO'nun antibakteriyel etkinliğinin gösterilmesinden sonra infeksiyonların tedavisindeki yeri ve antimikrobiyal ajanlarla olan etkileşimleri konusunda bir takım çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Ancak, NO'nun gaz yapısında serbest bir radikal olması nedeniyle çalışmalarda temini ve kullanımı zor görülmektedir. Diazeniumdiolate [N(O)NO] adı verilen kimyasal maddelerin sıvı ortamlarda birtakım bioregülatör maddeleri ve NO'yu salmak için ayrıştıkları bilinmektedir. Bu maddeler, DETA-NO ((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino] diazen-1-ium-1,2-diolate), SPER-NO, DEA-NO, PROLI-NO, MAHMA-NO ve PAPA-NO'dur. DETA-NO yarı ömrünün diğerlerine göre (20 saat) daha uzun olması nedeniyle in vitro çalışmalar için tercih edilmiştir^(2,3).

Bu çalışmada; NO'nun *M. tuberculosis* suşlarına karşı etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. NO kaynağı olarak da DETA-NO kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Çalışmada *M. tuberculosis* H37Rv virulan ve H37Ra avirulan standart suşları ile 15 klinik izolat kullanılmıştır. Klinik izolatlarda niasin toplanması, nitrat redüksiyonu ve pigment oluşturma özelliklerine göre tanımlanmıştır⁽⁴⁾.

NO kaynağı: Çalışmada, NO kaynağı olarak DETA-NO ((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino] diazen-1-ium-1,2-diolate) kullanılmıştır. DETA-NO saf etken maddesi Frederick Kanser Araştırma Enstitüsü'nden Prof. Dr. Joseph A. Hrabie ve Prof. Dr. Lary Keefer tarafından hediye edilmiştir. DETA-NO, etken maddenin hediye edildiği enstitünün

bilgileri doğrultusunda 0.1 N NaOH ile çözülüp, son konsantrasyonu 16 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. DETA-NO çalışmanın yapıldığı aynı günde taze olarak hazırlanmıştır.

Minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) tespit edilmesi: MİK'ler 96 kuyucuklu U tabanlı plaklarda buyyon mikrodilüsyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Besiyeri olarak OADC (oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz) içeren Middiebrook 7H9 buyyon kullanılmıştır. Taze üremiş *M. tuberculosis* kolonileri içerisinde 3-5 adet steril cam boneük ve 3-4 ml 7H9 buyyon içeren tüplere aktarılmıştır. Tüplerin ağzı iyice kapatılıp 10-15 dk vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra büyük partiküller ve aerosollerin çökmesi için 20 dk dik konumda bekletilmiştir. Daha sonra her birinden 0.5 McFarland bulanıklığında inokülüm kaynakları hazırlanmıştır⁽⁵⁾.

Hazırlanan stok NO kaynağının 100 µl 7H9 buyyon içeren kuyucuklarda seri dilüsyonları yapılarak 8-0.007 mg/ml'lik son konsantrasyonları hazırlanmıştır. Her bir izolat için herhangi bir ajan içermeyen bir kuyucuk kontrol kuyucuğu olarak kullanılmıştır. Hazırlanan inokülümden her kuyucuğa 5 µl inoküle edilmiştir. Plaklar plastik torbalar içerisine yerleştirilerek 37 °C ve %5-10 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. MİK değerleri 28 günlük inkübasyon sonrasında üremenin gözlenmediği en son kuyucuk olarak belirlenmiştir⁽⁶⁾.

BULGULAR

Çalışmada elde edilen bulgular Tablo'da sunulmuştur.

Çalışmada MİK değeri; 2 izolat için 0.015 mg/ml, 9 izolat için 0.03 mg/ml, 1 izolat için 0.06 mg/ml ve 3 izolat için 0.125 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Standart H37Rv ve H37Ra suşlarının her ikisi için de MİK değeri 0.125 mg/ml olarak saptanmıştır.

Tablo I. *M. tuberculosis* klinik izolatlarının NO MİK'lerine göre dağılımı

	0.015 mg/ml	0.03 mg/ml	0.06 mg/ml	0.125 mg/ml
Suş sayısı	2	9	1	3

TARTIŞMA

Mikobakteri infeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak bulunan, insan mortalite ve morbiditesine doğrudan etkili infeksiyonlardır. Tüm dünyada 1.7 milyar kişinin tüberküloz basili ile infekte olduğu ve her yıl 3 milyon kişinin tüberkülozdan öldüğü bilinmektedir. Tüberküloz savaşında başarı, yeni tanı ve antibiyotik duyarlılık yöntemlerinin geliştirilmesine ve yeni antimikobakteriyel ajanların bulunmasına bağlıdır^(7,8).

Son yıllarda NO'nun özellikle hücre içi patojenlere karşı antibakteriyel etkinliğinin gösterilmesi konuya ilgiliyi artırmıştır. Long ve ark.⁽⁹⁾, NO'nun mikobakterisidal etkinliğini hazırladıkları bir düzenekte in vitro olarak göstermişlerdir. Çalışmalarında, *M. tuberculosis* H37Rv suşuna 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle 0, 25, 50, 70 ve 90 ppm NO gazı verdikten sonra 28 gün inkübasyona bırakmışlardır. 28. gün sonunda plaklardaki bakteri kolonilerini saymışlar ve 24 saat ve 90 ppm NO ile muamele edilen plaklarda koloni sayısının önemli oranda azaldığını göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada çok ilaca dirençli (izoniazid ve rifampisin) *M. tuberculosis* suşu da kullanarak 3, 6, 12, 24 ve 48 saat 70 ve 90 ppm NO ile muamele edilmiştir. 28 günlük inkübasyon sonunda 48 saat hem 70 hem de 90 ppm NO'ya maruz bırakılan plaklarda herhangi bir üreme tespit edilmemiştir. Araştırmacılar NO'nun bu etkisinin bakterisidal mi yoksa inhibitör mü olduğunu tespit etmek için plakları 3 haftalık bir inkübasyona daha bırakmışlar ve NO'nun etkisinin mikobakteriyosidal olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda *M. tuberculosis* izolatları

için MİK değerleri 0.015-0.125 mg/ml arasında bulunmuştur.

McElhaney-Feser ve ark.⁽²⁾, NO'nun *Candida* türlerine karşı tek başına ve azollerle kombine olarak etkilerini araştırmışlardır. NO kaynağı olarak DETA-NO, DEA-NO ve MAHMA-NO'yu denemişlerdir. Bunlardan DETA-NO'nun yarı ömrünün daha uzun (20 saat) olması nedeniyle NO kaynağı olarak kullanımının diğerlerinden daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu nedenle NO kaynağı olarak DETA-NO tercih edilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında *Candida* türlerine karşı DETA-NO'nun MİK değerini yaklaşık 2 mg/ml olarak bulmuşlar ve ketokonazol, flukonazol ve mikonazolün her biriyle sinerjistik etkisini saptamışlardır. Bu çalışma sonucunda *Candida* infeksiyonlarının tedavisi için yeni stratejiler geliştirilmesinde DETA-NO veya benzer özellikteki kimyasalların kullanılışlı olabileceği rapor edilmiştir.

De Groote ve ark.⁽¹⁰⁾, çalışmalarında metL mutant *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına karşı NO donörü DETA-NO'nun ve O₂-üreten redoks-cycling ajan paraquatın (PQ) disk diffüzyon metod ile etkili olduğunu göstermişlerdir.

Çoban ve ark.⁽¹¹⁾, NO'nun *Salmonella enterica* serovar Typhimurium klinik izolatlarına karşı etkinliğini araştırmışlar ve NO kaynağı olarak DETA-NO kullanılmışlardır. Çalışmalarında, 15 klinik izolattan bir izolat için MİK değeri 1 mg/ml tespit edilirken, diğerleri için 2 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

Candida ve *Salmonella enterica* serovar Typhimurium izolatlarına karşı MİK değeri 1-2 mg/ml olarak belirlenirken, bu çalışmada *M. tuberculosis* için 0.015-0.125 mg/ml

arasında tespit edilmiştir. Bu da NO'nun tüberküloz basillerine daha etkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu bulgularımız, DETA-NO gibi NO kaynakları kullanılarak ileri in vitro ve in vivo çalışmalara gereksinim olduğunu düşündürmektedir. Belki de ileride hücre içi ve çok ilaca dirençli infeksiyonların tedavisinde antibiyotikler yanısıra NO'nun antibakteriyel bir ajan olarak kullanılabilmesi gündeme gelecektir.

Geliş tarihi : 06.11.2001

Yayına kabul tarihi : 27.02.2002

Yazışma adresi:

Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

55139 Kurupelit, SAMSUN

KAYNAKLAR

1. Kuby J. Cells and organs of the immune system In: Immunology. New York: Freeman and Company, chapter 3 1997; s. 47-82.
2. McElhaney-Feser G, Rauli RE, Ciala RL. Synergy of nitric oxide and azoles against *Candida* species in vitro. Antimicrob Agent Chemother 1998; 42: 2342-2346.
3. Fitzhugh AL, Keefer LK. Diazeniumdiolates: pro-and antioxidant applications on the "NONOates". Free Radical Biology & Medicine 2000; 28: 1463-1469.
4. Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı. Samsun Otak AŞ. 1999; s49-69.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Mycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*; Tentative Standard M24-T 1995; NCCLS, Villanova, PA.
6. Leite CQ, Beretta AL, Anno IS, et al. Standardization of broth microdilution method for *Mycobacterium tuberculosis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95: 127-129.
7. Badak FZ. Tüberküloz tanısında yeni yöntemler. 3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 31 1997; 89-97.
8. Yüce A. Mikobakteriyel direncin saptanmasında yeni yöntemler. 3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 31 1997; 98-108.
9. Long R, Light B, Talbot JA. Mycobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 403-405.
10. De Groote MA, Testerman T, Xu Y, et al. Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium*. Science 1996; 272: 414-416.
11. Çoban AY, Ekinci B, Birinci A, ve ark. Nitrik oksit vericisi DETA-NO'nun *Salmonella typhimurium* izolatlarına etkisinin in vitro araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 2002; 16: 201-204.