

## Akut osteomyelit tedavisinde granulocyte macrophage- colony stimulating factor (GM-CSF)'ün etkisi (Fareler üzerinde deneysel çalışma)

Ahmet Kapukaya<sup>(1)</sup>, Mehmet Subaşı<sup>(1)</sup>, Halil Kaya<sup>(2)</sup>, Cumhuri Kesemenli<sup>(3)</sup>, İbrahim Sarı<sup>(4)</sup>, Engin Kandiya<sup>(3)</sup>

*Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), hematopoietik hücrelere çeşitli kademe-lerde etki eden ve bu hücrelerin fagositik aktivitelerini artıran bir sitokindir. Bu çalışmada farelerin tibia metafizine stafilokokus aureusun direk inokulasyonu ile oluşturulan akut osteomyelitte GM-CSF'nin etkisi araştırıldı. Stafilokokus aureusların, fare tibia metafizine direkt inokulasyonu yoluyla osteomyelit oluşturuldu. Biopsi parçalarında histopatolojik olarak osteomyelit tanısı konulan 24 fare iki eşit gruba ayrıldı. Birinci gruba sadece 3.kuşak Sefalosporin, ikinci gruba ise 3.kuşak Sefalosporin ve GM-CSF tedavisi uygulandı. Fareler, X-ray, Ga-67 Sitrat sintigrafik tetkikleri ile 3 ay takip edildi (takip sırasında birinci grupta 1 fare öldü, 1 farede ise kronik osteomyelit gelişerek patolojik kırık oluştu). Üçüncü ayın sonunda öldürülen farelerden elde edilen kemik materyaller histopatolojik incelemeye alındılar. İkinci grupta bulunan 12 farede fizik muayene ve X-ray normal sınırlar içerisinde idi. Ga-67 Sitratla yapılan kantitatif sintigrafik incelemelerde ikinci grupta, birinci gruba göre 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı tutulum azlığı görüldü. Sonuç olarak GM-CSF'nin, akut osteomyelit tedavisinde yararlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu faktörün daha geniş ve kapsamlı araştırmalar yapılması durumunda daha anlamlı bilgiler vereceği kanaatindeyiz.*

**Anahtar kelimeler:** Granulocyte macrophage - colony stimulating factor, osteomyelit

### *Effect of granulocyte macrophage- colony stimulating factor on treatment of acute osteomyelitis*

*Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) is a cytokine which effects the various developmental steps of hematopoietic cells and enhances the phagocytic activity of these cells. The effect of GM-CSF on acute osteomyelitis, which was developed in rats, was investigated. For this purpose, osteomyelitis was firstly developed through the direct inoculation of Staphylococcus aureus into rat tibial metaphysis. Twenty four 5 in which diagnosis of osteomyelitis was histopathologically established were divided into two groups. Antibiotic only was given to the first group, and antibiotic as well as GM-CSF to the second group. Rats were followed-up for 3 months with plain radiographs, and scintigraphic methods using Ga-67 citrate. Materials obtained from the rats that had been killed at the end of the third month were histopathologically investigated. One rat in the first group died. Chronic osteomyelitis developed and fracture was observed in another rat. In 12 rats of the second group physical examination, plain radiographs and histopathologic findings were normal. In scintigraphic studies with Ga-67 citrate in the second group, there was a decreased uptake. Consequently, in our study GM-CSF did not show a significant effect on the treatment of acute osteomyelitis. We think that GM-CSF may be theoretically helpful in this disease, and more comprehensive and large-scale studies can give more detailed information.*

**Keywords:** Granulocyte macrophage - colony stimulating factor, osteomyelitis

Günümüzde, akut osteomyelit semptomatik tedaviyle beraber pürülan materyalin drenajı, uygun bir antibiyotik uzun süre ve yüksek dozlarda verilmesi şeklinde tedavi edilmektedir. Bu tedavi protokolü, bazı akut osteomyelit hastalarında kronikleşmeye engel olamadığı için bu hastalıkta antibiyotik verilme süresi (2, 4) ve cerrahi drenajın zamanı üzerinde tartışmalar devam etmektedir (6, 11, 16). Konak savunma mekanizmasının güçlendirilmesi enfeksiyonun ortadan kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu amaç için dışarıdan verilecek tedavinin yanında özellikle bölgesel ve sistemik savunma mekanizmalarının da yeterince aktif olması gerektiği kanısı ile konak savunma mekanizması üzerine çalışmalar özellikle yoğunluk kazanmıştır.

Konağın savunma mekanizmaları üzerine etkili olan hematopoietik büyüme faktörleri (HBF) hakkındaki bilgiler ilk defa 1977 yılında gündeme getirilmiştir (3). Daha sonraki yıllarda ise HBF'lerin moleküler ve selüler biyolojisi hakkında geniş bilgiler elde edilmeye başlanmıştır (9, 15). Granulocyte macrophage - colony stimulating factor (GM-CSF) nötrofil, monosit ve eozinofil gibi hücrelerin proliferasyonunu stimüle edip bu hücrelerin fagositöz ve öldürücü yeteneklerini artıran bir hemopoietik büyüme faktörüdür. Bu özelliklerinden dolayı, kanser tedavisi yanında son yıllarda enfeksiyon hastalıklarında da kullanılmaya başlanılmıştır (1, 8, 18).

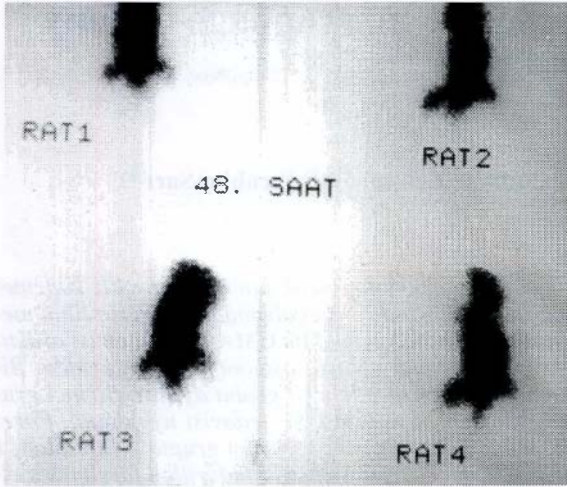
Bu çalışmada GM-CSF'ün matur lökosit fonksiyonunu artırıcı özelliği ve diğer fonksiyonları göz

(1) Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Yrd. Doç.

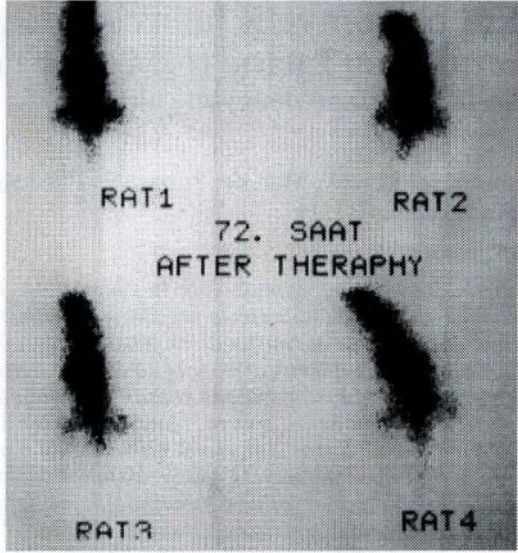
(2) Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Doç. Dr.

(3) Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

(4) Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Doç. Dr.



Şekil 1: Farelerin Ga-67 sitratla çekilen sintigrafik görüntüleri



Şekil 3: Antibiyotik uygulanan bir grup ratın Ga 67 sitratla alınan sintigrafik görüntüsü

küle edildikten 72 saat sonra tüm farelerin Ga-67 Sitratla 24.,48. ve 72. saatlerde hem histopatolojik, hem de kantitatif statik ölçümler yapıldı (Şekil 1). Ga-67 Sitrat ile sintigrafik tetkik neticesinde 32 denekte akut osteomyelit lehine bulgular tespit edildi. Ancak bu farelerin sadece 24'üne histopatolojik olarak tanı teyit edildi. Histopatolojik olarak osteomyelit tanısı konulan 24 fare, iki gruba ayrılarak her gruba farklı tedavi uygulandı.

I Grup: 12 fareye 3. Kuşak sefalosporin erişkin dozunun 1/10'u parenteral olarak 3 hafta süre ile verildi.

II. Grup: Bu grupta bulunan 12 fare birinci gruptaki dozda ve sürede antibiyotiğe ilave olarak GM-CSF, 5 mikro-gram/kg /gün dozunda cilt altına 7 gün süreyle verildi.

## Sonuçlar

Tedaviye alınan farelerin tümü fizik muayene, üç hafta aralarla çekilen direkt grafilerle, tanı aşamasında ve üçüncü ayın sonunda tekrarlanan sintigrafisi ile ayrıca yedinci günde ve üçüncü ayın sonunda histopatolojik olarak incelendiler.

I. Grup: Farelerden biri sintigrafik incelemeler esnasında öldü. Kalanların, üçüncü ayın sonunda yapılan incelemeleri neticesinde sadece birinde kronik enfeksiyon meydana geldi ve daha sonra patolojik kırık oluştu. Kalanların, fizik muayenesi ve direkt grafileri normal olarak değerlendirildi.

II. Grup: İncelemeye alınan tüm deneklerin, fizik muayene ve direk grafileri normal olarak değerlendirildi.

Üçüncü ayın sonunda, farelere 1mCi Ga-67 Sitrat verilerek 24.,48.,72. saat statik görüntüleri tekrarlandı (Şekil 2, 3). Osteomyelit oluşturulan sol bacaktan ve karşı taraf aynı bölgeden (sağ bacak) ilgi alan-

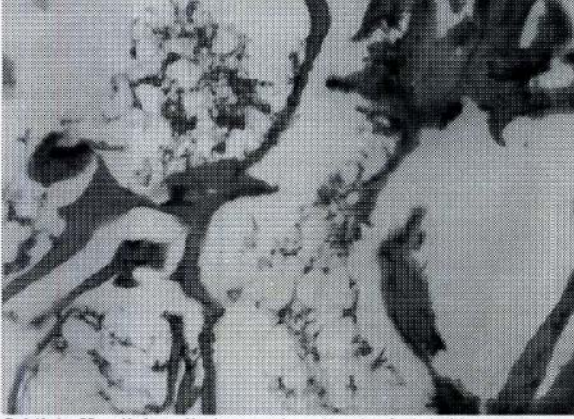


Şekil 2: GM-CSF uygulanan bir grup ratın Ga 67 sitratla alınan sintigrafik görüntüsü

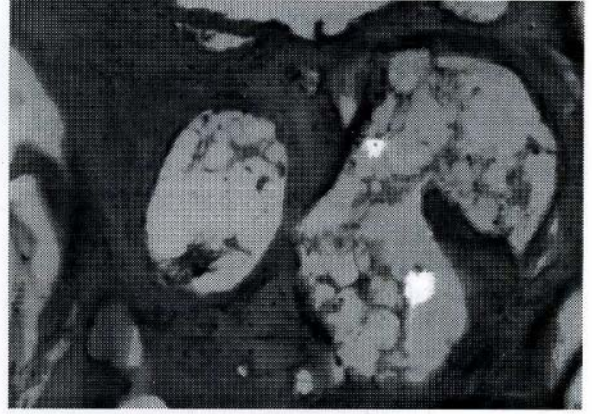
önüne alınarak, osteomyelit oluşturulmuş fareler üzerinde faktörün etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

## Gereç ve yöntem

Dicle Üniversitesi Hayvan Araştırma Lâboratuvarında (DÜSAM) üretilen ve ağırlıkları 150-200 gr. arasında değişen 1.5 aylık Sprague Dawley tipi fareler denek olarak kullanıldı. Enfeksiyon oluşturmak için, mikrobiyoloji lâboratuvarında McFarland 5. tüpünün bulanıklılığına göre hazırlanan patojen Stafilokok aureuslar kullanıldı. Farelere, ketamin hidroklorid (0.8/Mg/Kg) intramusküler verilerek anestezi altında tibia proksimali steril şartlar altında operasyona hazırlandı. Bu bölgeye 1cm uzunluğunda cilt insizyonu yapılarak kemiğe ulaşıldı. Korteks 0.5mm çapındaki ince uçlu Kirschner teliyle açılarak medüllaya ulaşıldı. Daha sonra bu bölgeden 0.05 ml (yaklaşık olarak 104) canlı mikroorganizma medüller bölgeye inoküle edilerek açılan bölge dental yapıştırıcı ile kapatıldı. Cilt sütüre edilerek operasyona son verildi. Mikroorganizmalar, metafizer bölgeye ino-



Şekil 4 : Kemik lamelleri arasında yoğun lenfosit infiltrasyonu (H. E. X100)



Şekil 5 : Kemik lamelleri arasında seyrek lenfosit infiltrasyonu (H. E. X100)

ları (ROİ) çizilerek sayımlar elde edildi. Daha sonra bu sayımların istatistiksel çalışmaları yapıldı. Her iki grubun tedavi öncesi ve sonrası tutulum ortalama değerleri kendi içlerinde Wilcoxon testi ile değerlendirildiğinde tutulum azalması anlamlı bulundu ( $p<0.01$ ). Yine aynı grupların tedavi öncesi ve sonrası değerleri Mann-Withney U testi ile değerlendirildiğinde tedavi sonrası 48. saatteki ortalama değerlerinin II. grupta azalma lehine olacak şekilde anlamlı ( $p<0,05$ ) bulundu.

Bütün farelerden yedinci günde (GM-CSF'nin sonlandırıldığı gün) biyopsi alındı. Yapılan incelemeler sonunda ikinci grupta belirgin lökosit artışı gözlenirken, birinci grupta bu artış daha azdı. Ayrıca üçüncü ayın sonunda yapılan histopatolojik incelemelerde, birinci grupta kronik osteomyelit gelişen birinin haricinde, diğerlerinde bulgular birbirine yakın olup yer yer fokal sahalar halinde yoğun kronik iltihabi hücre infiltrasyonu dikkati çekmekteydi (Şekil 4). İkinci grupta ise kronik iltihabi hücre infiltrasyonu görülmekle birlikte, infiltrasyonun daha seyrek olduğu dikkati çekti (Şekil 5).

## Tartışma

Son yıllarda, mikroorganizmaların antimikrobial ajanlara karşı direnç mekanizmalarını kullanmaları nedeniyle enfeksiyonların tedavisinde güçlükler görülmektedir. Antibiyotiklerin yanlış ve aşırı şekilde kullanımları, hemen hemen tüm patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı dirençli genler taşımalarına neden olmuştur (20). 1950'li yıllara kadar osteomyelitler antibiyotiklerin tek başına uygulanması ile başarılı şekilde tedavi edilirken, günümüzde çeşitli tedavi protokollerinin uygulanması ile aynı oranda başarı elde edilememektedir (6). Daha sonraki yıllarda preantibiyotik dönemde gündemde olan cerrahi drenaj, tekrar gündeme getirilerek tartışılmaya başlanmıştır. Bir kısım yazarlar cerrahi drenajın tedaviye eklenmesinin başarı şansını artıracaklarını iddia ederken (11, 16), bazıları ise, hastalığın akut fazında cerrahinin yeri olmadığını iddia etmektedirler (14, 21). Bütün bu tartışmalarla birlikte bazı olgularda akut osteomyelitin kronikleşmesine engel olunamamaktadır (6, 10, 19). Çünkü koagülaz negatif sta-

filokok izolatların %60-90'ının metisiline karşı dirençli olduğu günümüzde enfeksiyonların mevcut tedavilerle kontrol altına alınması oldukça güçtür.

Konağın enfeksiyona olan yanıtının değiştirilmesine yönelik çalışmalar, günümüzde daha da ilgi uyandıran bir görüş olmuştur. Bu alana araştırmacıların yönelmesinde diğer bir neden ise, mevcut antibiyotiklerin spesifik mikroorganizmaların haricinde konak savunma mekanizması kuvvetli hale getirildikten sonra başka mikroorganizmalara da etkili olabileceği iddiasıdır. Bu iddialardan yola çıkarak yakın zamanlarda farklı myeloid hücre grubunu uyaraabilen bazı hemotopoitik büyüme faktörleri (HGF), enfeksiyon sırasında fagositlerin sayı ve fonksiyonlarını artırabilme yetenekleri nedeniyle dikkatleri üzerine toplamıştır. HGF'ler, konak savunmasıyla ilgili hemotopoitik hücrelerin sayılarını artırır ve bu hücrelerin kemotaksisini artırarak yaşam döngüsünü uzatır. Ayrıca hemotopoitik hücrelerin fagositik aktivitesini de artırır (12). Bu etkilerinden dolayı hem nötropenik hem de non-nötropenik konaklarda enfeksiyona karşı konak savunmasında faydalı olabileceği düşünülerek çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (5, 13).

GM-CSF, kemik iliğinin erken öncül aşamasında görev alan ve nötrofil, eozinofil ve monosit oluşumunu etkileyen, hemotopoitik faktörlerden biridir. Konak savunma mekanizmasının çeşitli kademelerinde görev yaparak fagositik etkinin artırılmasında önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (7, 17, 22, 23, 24). Bu görüşlerin ışığı altında GM-CSF'nin etkisini osteomyelit oluşturulan denekler üzerinde denedik. Sintigrafik çalışmada I. grubun tedavi öncesi ve sonrası 24., 48. ve 72. saatleri ortalama değerleri, aynı şekilde II. grubun ortalama değerleri kendi aralarında istatistiksel olarak Wilcoxon testi ile değerlendirildiğinde anlamlı olarak ( $p<0.01$ ) bulundu. Ga-67 Sitratla her iki grubun tedavi öncesi ve sonrası kantitatif sintigrafik değerleri karşılaştırıldı. Tedavi sonrası 48. saatte Maun-Whitney U testine göre anlamlı ( $p<0.05$ ) fark bulundu. Sintigrafik çalışmalarda tutulum ilk 24 saatte en az olurken 48. saatte en yüksek seviyeye çıkarak 72. saatte düşebilmektedir. Bulgularımızda bu doğrultudadır.

Histopatolojik olarak ilk haftada yapılan incele-

mede, GM-CSF verilen grupta belirgin bir lökosit artışı dikkati çekti. I. grupta bu denli bir lökosit artışı görülmedi. Sintigrafi ile uyumlu olduğu görülmektedir. Lökosit artışı vücudun normal bir savunma mekanizmasına da bağlanabilir. Bunun ayrımı için yapılması gereken, ancak imkanlar nedeniyle gerçekleştiremediğimiz lökosit fonksiyonlarının araştırılmasıdır. Üçüncü ay sonunda yapılan histopatolojik incelemeler, düşüncemizi doğrular nitelikte idi.

Sonuç olarak, verilen antibiyotikler, enfeksiyonun ortadan kaldırılmasında nötrofillerle birlikte çalışmaktadır. Bu bakımdan günümüzde enfeksiyon ancak konak savunma mekanizmasını kuvvetlendirerek ve antibiyotik verilerek ortadan kaldırılabilir. Bu düşünceden yola çıkarak osteomyelitli vakalarda GM-CSF'ün tedaviye eklenilmesiyle başarı şansını yükseltebileceğini düşünmekteyiz. Aldığımız sonuçlar bu tezi doğrular niteliktedir. Vaka sayısının azlığı ve uzun süre kontrollerin yapılamaması kesin bir sonuç vermemizi engellemektedir. Uzun süreli ve yeterli sayıda çalışmaların yapılması bu konuya daha da açıklık getireceği kanaatini taşımaktayız. Ayrıca bu faktörün kronik osteomyelitlerde de çalışılmasının daha belirgin sonuç verebileceğini düşünmekteyiz.

## Kaynaklar

- Bermudez LE, Martinelli J, Petrofsky M : Recombinant GM-CSF enhances the effects of antibiotics against Mycobacterium avium complex infection in the being mouse model. *Infect Dis*. 169: 575-580, 1994.
- Blockey NJ, Watson JT: Acute osteomyelitis in children. *J Bone Joint Surg* 52 (B): 77-87, 1970.
- Burgess AW, Camakaris J, Metcalf D: Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung conditioned medium. *J Biol Chem* 252: 1998-2002, 1977.
- Cole WG, Dalziel RE, Leitle S: Treatment of acute osteomyelitis in childhood. *J Bone Joint Surg* 64 (B) :218-223, 1982.
- Dale DC: Potential role of colony stimulating factor in the prevention and treatment of infectious disease. *Clin Infect Dis*, 18 supp. 2: 180-188, 1994.
- Emslie K.R, Nade S: Pathogenesis and treatment of acute osteomyelitis: Evaluation of current views with reference to an animal model. *Rev Infect Dis*. 8: 841-849, 1986.
- Fleischmann J, Golde DW, Gasson JC: GM-CSF primes neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to the major physiological chemoattractants. *Blood* 69: 18-23, 1986.
- Frenck RW, Sarman G, Harper TE: The ability of recombinant GM-CSF to protect neonatal rats from septic deaths due to Staphylococcus aureus. *Infect Dis*. 162 :109-114, 1990.
- Gasson JC: Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 77: 1131-1135, 1991.
- Gillespie WS, Mayo KM: The management of acute hematogenous osteomyelitis in the antibiotic era: A study of the outcome. *J Bone Joint Surg*. 63 (B): 126- 131, 1981.
- Harris N.H: The place of surgery in acute osteomyelitis. *J Bone Joint Surg* 49 (B): 219-223, 1962
- Ikebuchi K, Ihle JN, Hirai Y et al: Synergistic factors of stem cell proliferation: further studies of the target stem cell and the mechanism of stimulation by interleukin-1 and interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 72 : 2007-2014, 1988.
- Khwaja A, Linch DC: Hemopoietic growth factor in the treatment of infection in non-neutropenic patients. *J Antimicrob Chem* 33 :679-683, 1994.
- La Monte LR, Anderson AP: Acute hematogenous osteomyelitis in children. *J. Ped. Orthop*. 7: 579-584, 1987
- Lieschke GJ, Burgess AW: Granulocyte colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (parts-I and II). *N Engl J Med* 327: 28-34, 1992
- Mollan RAB, Piggot J: Acute osteomyelitis in children. *J Bone Joint Surg* 59 (B): 2-6, 1977.
- Morrisey PJ, Bressler L, Park LS: GM-CSF augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen-presenting cells. *Immunology* 139: 113-119, 1987
- Murray HW, Cervia JS, Hariprasad J: Effect of recombinant GM-CSF in experimental visceral leishmaniasis. *Clin Invest* 95: 1183-1192, 1995
- Muşdal Y: Akut hematogen osteomyelitinin tedavisi. *Hacettepe Dergisi* 1: 23-25, 1991.
- Tomasz A: A multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria: a report on the Rockefeller University Workshop. *New Engl J Med* 330:1247-1251, 1994
- Waldvogel FA, Vasey H: 'Osteomyelitis': the past decade. *N Engl J Med*. 303:360-70, 1980
- Weisbart RH, Kacena A, Schuh A et al: GM-CSF induces human neutrophil IgA - mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism. *Nature* 332: 647-648, 1988
- Weisbart RH, Golde DW, Gasson JC: Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors. *Immunology* 137: 3584-3587, 1986
- Young K, Addison IE, Johnson B et al: Role of leukocyte integrands in phagocyte responses to GM-CSF: In vitro and in vivo studies on leukocyte adhesion deficiency neutrophils. *J British Haematology* 77: 150-157, 1991.

## Yazışma adresi:

Yard. Doç. Dr. Ahmet Kapukaya  
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı  
Diyarbakır, Türkiye