

## ARAŞTIRMA

# 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

Burçak Gürbüz<sup>1</sup>, Ümran Soyoğul Gürer<sup>1</sup>, Özge Çevik<sup>2</sup>, İrfan Yalçınkaya<sup>3</sup>, Gülnaz Nural Bekiroğlu<sup>4</sup>, Adile Çevikbaş<sup>1</sup>

**ÖZET:** Çalışmamızda, terapötik konsantrasyonlarda kolistin (4 µg/ml) tek başına ve tigesiklin (0.87 µg/ml), imipenem (30 µg/ml) ve rifampisin (7 µg/ml) ile kombinasyonlarının bronşektazili hastaların polimorf nüveli lökosit (PNL) fonksiyonları (fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi) ve malondialdehit (MDA) düzeyi, süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri üzerine etkileri in vitro araştırılmıştır. PNL'ler Ficoll-hypaque gradient santrifüj yöntemi ile izole edilmiş ve fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi tayini Alexander'ın yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır. Protein tayini Bradford'un metodu kullanılarak, lipid peroksidasyonun göstergesi olarak malondialdehit (MDA) miktarı Beuge'nin metodu, süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metodu, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi Paglia ve Valentine'nin metodu, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi Hillegas ve arkadaşlarının metodu kullanılarak ölçülmüştür. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bronşektazili hastalarda kolistin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonları, fagositik aktivite ( $p < 0.0001$ ) ve hücre içi öldürme aktivitesini ( $p = 0.0113$ ,  $p = 0.0008$ ,  $p = 0.0014$ ,  $p = 0.0036$ ) kontrole göre anlamlı olarak artırırken; MDA düzeyi, SOD, GSH-Px ve MPO aktivitelerini kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır ( $p < 0.001$ ).

**ANAHTAR KELİMELER:** Antioksidanlar, bronşektazi, fagositoz, oksidatif stres

## GİRİŞ

Bronşektazi, bronş duvarının anormal, geri dönüşümsüz dilatasyonu ile seyreden kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Antibiyotik kullanımı ve aşı uygulamaları sonucu, gelişmiş ülkelerde bronşektazi insidansı azalmakta iken, gelişmekte olan ülkelerde etkin aşılama yapılamaması, tekrarlayan, iyi tedavi edilemeyen alt solunum yolu enfeksiyonları ve yüksek akciğer tüberkülozu prevalansı nedeniyle hala yaygın bir hastalık olarak görülmektedir (1,2,3).

Bronşektazili hastaların akut ataklarının tedavisinde, atakların önlenmesinde veya bakteriyel birikimi azaltmak için kullanılan antibiyotikler; oral, intravenöz veya inhalasyon yoluyla

uygulanabilir. Genel olarak antibiyotiklerle tedavi sonuçları hastalığın şiddetine bağlıdır. Hafiften ortaya bronşektazili enfeksiyonlarda tamamen eradikasyon sağlanabilir. Ancak şiddetli hastalığı olanlarda bronşiyal ağaçta kronik olarak kolonizasyon kalabilir (4).

Bakteriler solunum yoluna yerleştikten sonra oluşan inflamasyonda en sık görülen hücreler polimorf nüveli lökositler (PNL) dir. İnflamasyon bölgesine toplanan PNL'lerden serbest oksijen radikalleri (SOR = Oksidanlar) salınması doku hasarına neden olmaktadır. Ayrıca *P. aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonlarda bakteriye ait proteazların da ortama katılmasıyla bronş sıvısındaki IgG'lerin %80'inden fazlasının

## KURUM

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

<sup>3</sup>Sağlık Bakanlığı, Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

## İLETİŞİM

Burçak Gürbüz

E-posta: bgurbuz@marmara.edu.tr

Gönderilme: 17.11.2013

Revizyon: 16.12.2013

Kabul: 16.12.2013

parçalanması sonucu mikroorganizma, pulmoner makrofajların ve PNL'lerin fagositik etkisinden korunabilmektedir (5,6).

PNL'ler infeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli rol oynamaktadırlar. PNL'lerden salınan oksidanların zararlı etkileri, "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar (7).

Sağlıklı bireylerde serbest oksijen radikalleri ile antioksidan savunma mekanizması tam bir denge halinde çalışır. Oksidatif stres varlığında koruyucu kontrol mekanizmalarının yetersizliği sonucu oksidatif hasar oluşur (8,9).

İntraselüler veya ekstraselüler kaynaklı serbest oksijen radikalleri (SOR), inflamasyonun oluşumunda önemli rol oynamaktadır (7,10).

Organizmada sürekli bir şekilde oluşan SOR'un zararlı etkilerini önleyen en önemli enzimatik antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) dir (7,10).

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve serbest radikal oluşumunun bir göstergesidir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Böylelikle MDA düzeyi azalır (7,10).

Süperoksit dismutaz (SOD) lipid peroksidasyonunu inhibe eder, granülosit fonksiyonları için çok önemli bir enzimatik antioksidandır ve fagosite edilen bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır (7,10).

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px); hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan bir enzimdir ve fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller (7,10).

Miyeloperoksidaz (MPO); hasarlı doku ve inflamasyonun iyi bir göstergesidir. Nötrofillerin ve monositlerin, primer lizozomal granüllerinde yer alan bir hem enzimdir. İnflamasyon durumunda ekstrasellüler ortama salınır (7).

Bakteriyel infeksiyonlu hastaların tedavisinde kullanılan bazı antibakteriyel ajanlar konağın immün cevabını değiştirebilirler. Tedavide kullanılan antibakteriyel ajanların PNL fonksiyonlarını (fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi) arttırması istenilen bir immünomodülatör etkidir (11).

Literatür bilgilerinin ışığı altında; çalışmamızda kolistin (4 µg/ml) tek başına ve tigesiklin (0.87 µg/ml), imipenem (30 µg/ml) ve rifampisin (7 µg/ml) ile kombinasyonlarının, bronşektazili hastaların polimorf nüveli lökosit (PNL) fonksiyonları (fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi) ile malondialdehit (MDA) düzeyi, süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri üzerine in vitro etkilerini saptamayı amaçladık.

Bronşektazili hastalarda görülen infeksiyonların tedavisinde hastaların immün sistemini güçlendirici ve antioksidan enzim düzeylerini artırıcı immünomodülatör bir antibiyotik veya antibiyotik kombinasyonlarının kullanılması ile tedavide iyi sonuçlar alınabileceğini ve PNL'lerde aşırı oksijen türevlerinin oluşumunu engelleyen etkili antibiyotiklerin belirlenmesi ile bronşektazili hastaların tedavilerine olumlu sonuçlar getirilebileceğini düşünerek çalışmamızı planladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Hastalar:** T.C. Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Göğüs Hastalıkları Klinikleri'nde yatarak tedavi edilen ve yaş ortalamaları 55 olan 17 bronşektazi hastasının (hasta onay formları hastaların kendi rızaları ile doldurulup, imzalatıldıktan sonra) kanları alınarak; PNL fonksiyonları, MDA düzeyi, SOD, GSH-Px ile MPO aktiviteleri, antibiyotik etkileşimi açısından değerlendirilmiştir. Çalışma için Etik Kurul onayı, "Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonu" tarafından verilmiştir ( Tarih: 26.10.2010, sayı: 05, protokol no: 60).

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

### Antibiyotiklerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Terapötik konsantrasyonlarda, kolistin sodyum metansülfonat (Kolistin) (Sigma) 4 µg/ml (distile su), tigesiklin (Pfizer) 0.87 µg/ml (distile su), imipenem monohidrat (Sigma) 30 µg/ml (1M PBS) ve rifampisin (Sanofi Aventis) 7 µg/ml (dimetil sülfoksit) hazırlandıktan sonra steril ependorflara dağıtılarak, deneyde kullanılacakları güne kadar - 20°C'de derin dondurucuda saklanmışlardır.

### Polimorf Nüveli Lökositler (PNL)'in Elde Edilmesi:

Alexander ve ark. nın (12) nötrofil fonksiyonlarını değerlendirme yöntemi modifiye edilerek; Dekstran yerine Ficoll-hypaque, *S. aureus* yerine *C. albicans* kullanılmıştır.

Bronşektazili hastalardan alınan 10-15 ml. venöz kan, içinde 0.1 g/ml Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) bulunan silikon kaplı tüplere aktarılarak, 2500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında tüpün dibine çöken eritrositler ile tüpün üst kısmında bulunan plazma arasında sarımsı beyaz renkli bir tabaka (buffy coat) oluşmaktadır. Bu tabaka steril pastör pipeti ile alınarak, içinde 2.5 ml Ficoll-hypaque ve 2.5 ml Polymorphoprep bulunan tüpe konulmuş ve 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir (13,14). İşlem sonunda tüpün dibine çöken eritrositler ile üstteki monosit tabakasının arasında kalan PNL'ler pastör pipeti ile temiz ve boş bir tüpe alınarak üzerine buz soğukluğundaki 3 ml PBS ilave edilmiş 2000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek 3 kez yıkanmıştır. Yıkama sonrası PNL'ler Ca++ ve Mg++ içermeyen HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ile 1x10<sup>7</sup> hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir (13,15,16).

**Polimorf Nüveli Lökositlerin Canlılık Deneyi:** Lökositlerin canlılık tayini için, %0.9 fizyolojik tuzlu su (FTS) içinde hazırlanmış %0.5 tripan mavisi kullanılmıştır. PNL süspansiyonu ile tripan mavisi 1:1 oranında karıştırılarak oda ısısında 5 dakika bekletilmiş ve bu süre sonunda, mikroskopta mavi boyanmayan (canlı) hücreler sayılmıştır (13,17).

**Candida albicans Kökeninin Hazırlanması:** PNL'lerin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesinin değerlendirilmesinde, PNL'ler içinde boyalı ve boyasız görünümüleri mikroskopta iyi izlendiğinden *Candida albicans* kökeni kullanılmıştır (16). *C. albicans* kökeninin Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Merck) besiyerine pasajı yapılarak 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda üreyen maya kolonilerinden, Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Merck) besiyerine tekrar pasaj yapılmış ve 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde, deneylere başlamadan 1 saat önce bu pasajda

üreyen maya kültüründen SDB besiyerine tekrar pasaj yapılmış ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir (18,19). Sonraki aşamada 1 saatlik bu kültür, besiyeri bileşenlerinin maya hücrelerinden uzaklaştırılması için 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez FTS ile yıkanmıştır. Son aşamada ise maya hücrelerinin canlılığı metilen mavisi (%0.01) boyama yöntemi ile saptanmış ve maya hücrelerinin sayısı HBSS içinde 1x10<sup>7</sup> maya/ml (Mc Farland 1 standart bulanıklık tüpüne göre) olacak şekilde sulandırılarak maya süspansiyonu hazırlanmıştır (16,17,20).

**Candida albicans Oponizasyonu:** Mc Farland 1 standart bulanıklık tüpü esas alınarak hazırlanan *C. albicans* süspansiyonu, steril bir tüp içinde, sağlıklı kişilerden elde edilen taze insan serumu ile 4/1 oranında karıştırılarak 37 °C'de 30 dakika opsonize edilmiştir (17,18,21).

**Kolistinin Tek Başına ve Tigesiklin, İmipenem ve Rifampisin ile Kombinasyonlarının Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları (Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi) Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması:**

1. Seri (Kontrol) Hastaların PNL'leri (1x10<sup>7</sup> hücre/ml) + HBSS
2. Seri Hastaların PNL'leri (1x10<sup>7</sup> hücre/ml) + Kolistin (4 µg/ml)
3. Seri Hastaların PNL'leri (1x10<sup>7</sup> hücre/ml) + Kolistin (4 µg/ml) /Tigesiklin (0.87 µg/ml)
4. Seri Hastaların PNL'leri (1x10<sup>7</sup> hücre/ml) + Kolistin (4 µg/ml) /İmipenem (30 µg/ml)
5. Seri Hastaların PNL'leri (1 x10<sup>7</sup> hücre/ml) + Kolistin (4 µg/ml) /Rifampisin (7 µg/ml)

Hazırlanan 5 seri tüp 37°C'de opsonize maya süspansiyonu ilave edilmeden, çalkalayıcı etüvde 30 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir deney tüpüne opsonize maya süspansiyonundan (1x10<sup>7</sup> maya/ml) ilave edilip, aynı ortamda tekrar 30 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 25. dakikasında her bir tüpe fagosite olan ve PNL'ler tarafından öldürülen mayaların boyanması için metilen mavisi (%0.01) ilave edilmiştir. İnkübasyonun 30. dakikasının sonunda her bir tüpten lam lamel arası preparat hazırlanmış, 100 adet PNL içinde fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi gösteren PNL'ler mikroskop altında (x40 büyütme) sayılmıştır. Fagositik aktivite tayininde 100 adet PNL içinde canlı (boya almayan) maya hücrelerini fagosite etmiş olan PNL'ler sayılmış, hücre içi öldürme aktivitesi tayininde ise 100 adet PNL içinde, PNL'ler tarafından öldürülen (mavi boyanmış) maya hücrelerini içeren PNL'ler sayılarak sonuçlar % cinsinden ifade edilmiştir (17,18). PNL fonksiyonları için; değişkenlerinin dağılımı nedeniyle tüm grupların farklılığının araştırılmasında Graphpad Instant programında non-parametrik yöntem olan Two-way ANOVA testi kullanılmış, gruplar arasındaki farklılığın karşılaştırılmasında Unpaired t test with Welch correction uygulanmıştır

**Kolistinin Tek Başına ve Tigesiklin, İmipenem ve Rifampisin ile Kombinasyonlarının Oksidatif Stres, Oksidan ve Antioksidan Enzimler Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması.**

**PNL Homojenatinin Hazırlanması**

Polimorf nüveli lökosit fonksiyonlarının in vitro araştırılması deneyinde anlatıldığı gibi hazırlanan 5 seri tüp 37°C'de opsonize maya süspansiyonu ilave edilmeden, çalkalayıcı etüvde

30 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüp içerikleri, steril ependorf tüplere aktarılmış ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Antibiyotiklerin, PNL'lerden uzaklaştırılması için ependorf tüpler FTS ile 2 kez 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Dibe çöken lökositler PBS içerisinde %1 Triton X-100 içeren patlatma tamponu kullanılarak, buz içinde, ultrasonik homojenizatörde 15 sn patlatılmıştır. Elde edilen süspansiyon; protein, MDA, SOD, GSH-Px ve MPO ölçümleri için kullanılmıştır.

**Bronşektazili Hastaların PNL'lerinde Protein Tayini:** Hastaların PNL'lerinin patlatılmasından sonra, protein tayini Bradford'un (22) yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntem Commasie brilliant blue (G-250) boyasının farklı konsantrasyonlarındaki protein çözeltilerinden değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından geliştirilmiştir. Boyanın özellikle arginin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. PNL'lerin absorbanı asidik boyanın proteine bağlanmasıyla 595 nm'de okunmuştur.

**Bronşektazili Hastaların PNL'lerinin MDA Düzeyinin Ölçümü:** Oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve hücre hasarının bir göstergesi olarak, hastaların PNL'lerinin MDA düzeylerinin ölçümü Beuge'nin (23) yöntemine göre yapılmıştır. MDA'nın tiyobarbitirik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorban spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

**Bronşektazili Hastaların PNL'lerinin SOD Aktivitesinin Ölçümü:** Çalışmamızda Sun ve ark.nın (24) yöntemine dayalı ticari kit (Cayman 706002) ile 450 nm de absorban ölçümü yapılmıştır. Nitroblue tetrazolium'un (NBT) redüksiyon hızının inhibisyonuna bağlı olarak SOD aktivitesi tayin edilmiştir.

**Bronşektazili Hastaların PNL'lerinin GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü:** Çalışmamızda, Paglia ve Valentine (25) yöntemine dayalı ticari kit (Cayman 703102) kullanılarak 340 nm de absorban ölçümü yapılmıştır.

**Bronşektazili Hastaların PNL'lerinin Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Ölçümü:** MPO tarafından oksitlenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, O-dianisidine redüklenmesi sonucu oluşan redüklenmiş ürün 460 nm'de ölçülmüştür (26,27).

Taranan metin kaldırılıp yerine bu metin yazılacak. MDA düzeyi, SOD, GSH-Px ve MPO enzimlerinin aktivite tayinleri için; değişkenlerinin dağılımı nedeniyle tüm grupların farklılığının araştırılmasında Graphpad Instant programında non-parametrik yöntem olan One-way ANOVA testi kullanılmış, gruplar arasındaki farklılığın karşılaştırılmasında Student-Newman-Keuls testi uygulanmıştır (28).

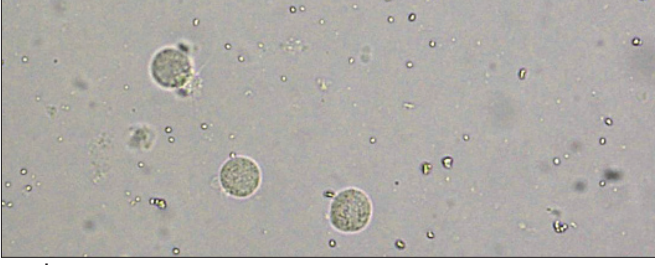
**BULGULAR**

**1-) Polimorf Nüveli Lökosit Canlılık Deneyi**

Bronşektazili hastaların kanından elde edilen PNL'lerin (5x10<sup>6</sup> PNL/ml) canlılığı; tripan mavisi (%0.5) boyama yöntemi ile yapılan inceleme sonunda %98'den büyük bulunmuştur (Şekil 1).

**2-) Kolistinin Tek Başına ve Tigesiklin, İmipenem ve Rifampisin ile Kombinasyonlarının Bronşektazili Hastaların PNL'lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri**

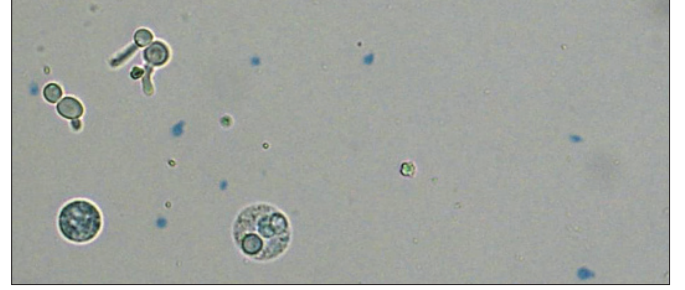
Kolistinin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının Bronşektazili hastaların PNL'lerinin



**ŞEKİL 1.** Bronşektazili hastaların PNL'leri (x40 büyütme)



**ŞEKİL 3.** Kolistin Tek Başına ve Tigesiklin, İmipenem ve Rifampisin ile Kombinasyonlarının Bronşektazili Hastaların PNL'lerinin Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri (x 40 büyütme) (PNL içinde ölmüş olan *Candida albicans* hücreleri metilen mavisi ile maviye boyanmıştır).



**ŞEKİL 2.** Kolistin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının bronşektazili hastaların PNL'lerinin fagositik aktivitesi üzerine in vitro etkileri (x 40 büyütme) (PNL içinde fagosite olmuş *Candida albicans* hücreleri).

MDA düzeyi, SOD, GSH-Px ve MPO aktiviteleri üzerine in vitro etkileri Tablo 2, Grafik 2, 3, 4 ve 5'de gösterilmiştir (n=17).

### TARTIŞMA

Bronşektazi; kronik infeksiyon, kronik öksürük, günlük pis kokulu ve yapışkan balgam atılımı, hava yollarında geri dönüşümsüz dilatasyon ve bronş duvarlarında incelleme ile karakterize bir klinik tablodur (29, 30). Bu klinik tablo, bronşektazi

fagositik aktivite ve hücre içi aktivitesi üzerine in vitro etkileri Şekil 2 ve 3, Tablo 1 ve Grafik 1'de gösterilmiştir (n=17).

### 3-) Kolistin Tek Başına ve Tigesiklin, İmipenem ve Rifampisin ile Kombinasyonlarının Bronşektazili Hastaların PNL'lerinin MDA Düzeyi, SOD, GSH-PX ve MPO Aktiviteleri Üzerine İn Vitro Etkileri

Kolistin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının Bronşektazili hastaların PNL'lerinin

**TABLO 1.** Kolistin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının bronşektazili hastaların PNL'lerinin fagositik aktivitesi ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine in vitro etkileri.

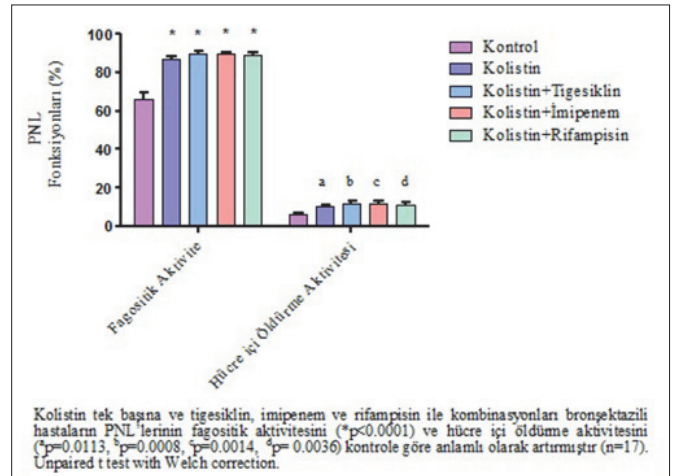
Bronşektazili Hasta Grubu	Fagositik Aktivite (%)	Hücre İçi Öldürme Aktivitesi (%)
Kontrol	66.00 ± 14.27	6.118 ± 2.848
Kolistin (4 µg/ml)	86.59 ± 7.133*	10.06 ± 5.190 <sup>a</sup>
Kolistin (4 µg/ml) + Tigesiklin (0.87 µg/ml)	89.59 ± 5.328*	11.59 ± 5.161 <sup>b</sup>
Kolistin (4 µg/ml) + İmipenem (30 µg/ml)	89.35 ± 5.384*	11.76 ± 5.739 <sup>c</sup>
Kolistin (4 µg/ml) + Rifampisin (7 µg/ml)	88.76 ± 6.119*	11.00 ± 5.511 <sup>d</sup>

Kolistin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonları bronşektazili hastaların PNL'lerinin fagositik aktivitesini (\*p<0.0001) ve hücre içi öldürme aktivitesini (<sup>a</sup>p=0.0113, <sup>b</sup>p=0.0008, <sup>c</sup>p=0.0014, <sup>d</sup>p=0.0036) kontrolle göre anlamlı olarak artırmıştır (n=17, Unpaired t test with Welch correction).

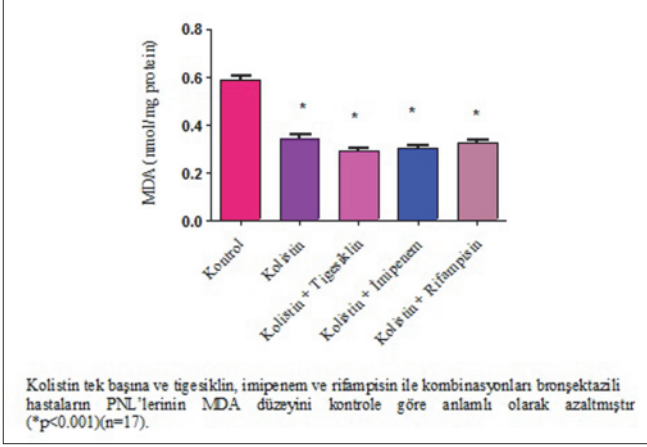
**TABLO 2.** Kolistin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının bronşektazili hastaların PNL'lerinin MDA düzeyi, SOD, GSH-Px ve MPO aktiviteleri üzerine in vitro etkileri

Bronşektazili Hasta Grubu	MDA (nmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)	GSH-Px (nmol/mg protein)	MPO (U/mg)
Kontrol	0.5876 ± 0.0643	0.0235 ± 0.0039	0.3029 ± 0.0452	0.26 ± 0.04
Kolistin (4 µg/ml)	0.3418 ± 0.0787*	0.01471 ± 0.00161*	0.1971 ± 0.0427*	0.17 ± 0.04*
Kolistin (4 µg/ml) + Tigesiklin (0.87 µg/ml)	0.2974 ± 0.0341*	0.01118 ± 0.00332*	0.1571 ± 0.0364*	0.1188 ± 0.0158*
Kolistin (4 µg/ml) + İmipenem (30 µg/ml)	0.3059 ± 0.042*	0.01118 ± 0.00332*	0.1606 ± 0.0268*	0.1365 ± 0.0384*
Kolistin (4 µg/ml) + Rifampisin (7 µg/ml)	0.3288 ± 0.0429*	0.01529 ± 0.00414*	0.1918 ± 0.0475*	0.1741 ± 0.0250*

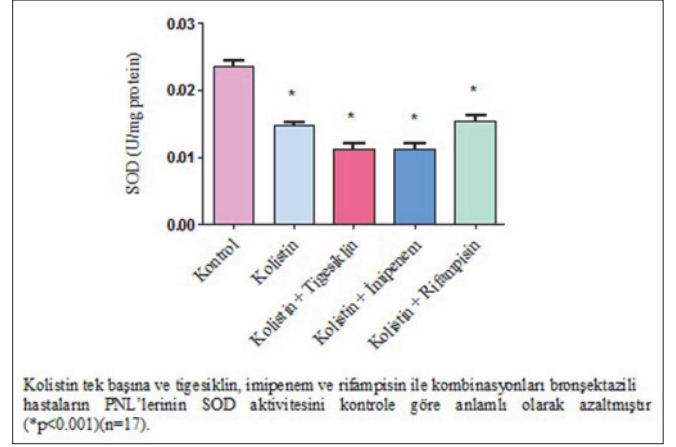
Kolistin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonları, bronşektazili hastaların PNL'lerinin MDA düzeyini, SOD, GSH-Px ve MPO aktivitelerini kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır (\*p<0.001)(n=17).



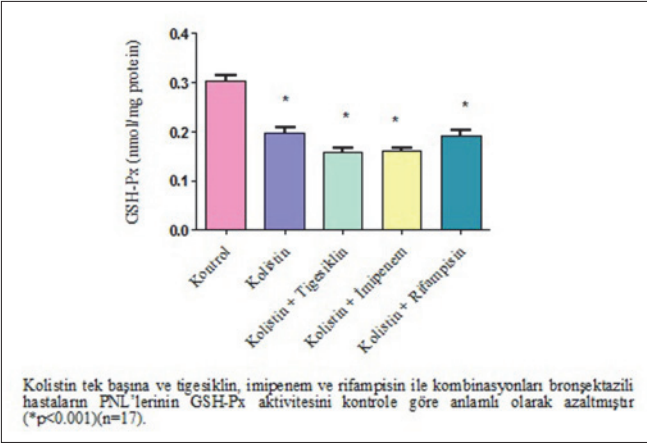
**GRAFİK 1.** Kolistin Tek Başına ve Tigesiklin, İmipenem ve Rifampisin ile Kombinasyonlarının Bronşektazili Hastaların PNL'lerinin Fagositik Aktivitesi ve Hücre İçi Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri



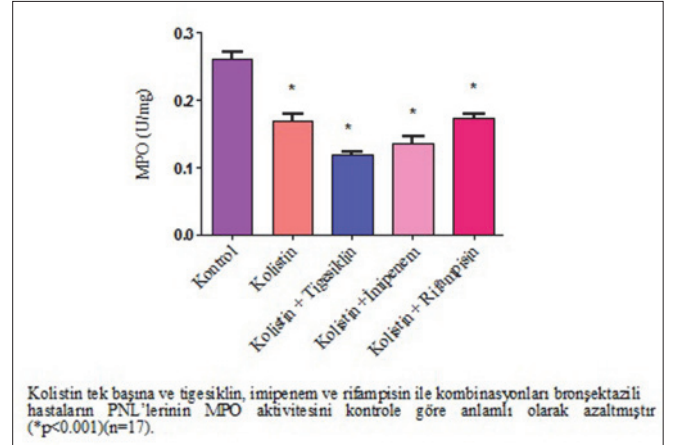
**GRAFİK 2.** Kolistinin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının bronşektazili hastaların PNL'lerinin MDA düzeyi üzerine in vitro etkileri.



**GRAFİK 3.** Kolistinin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının bronşektazili hastaların PNL'lerinin SOD aktivitesi üzerine in vitro etkileri.



**GRAFİK 4.** Kolistinin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının bronşektazili hastaların PNL'lerinin GSH-Px aktivitesi üzerine in vitro etkileri.



**GRAFİK 5.** Kolistinin tek başına ve tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının bronşektazili hastaların PNL'lerinin MPO aktivitesi üzerine in vitro etkileri.

gelişimiyle ilişkilidir ve genellikle infeksiyon sonucu drenaj bozukluğu, solunum yolu obstrüksiyonu ve/veya konak savunmasında yetersizlikle sonuçlanır (29).

Son yıllarda yapılan çalışmalar bronşektazi patogenezinde konak savunmasının ve immün yetmezliğin rolünü vurgulamaktadır, ancak bronşektazide bağışıklık sisteminin rolünü gösteren çalışmalar oldukça az sayıdadır (30).

King ve ark. (30), 103 erişkin bronşektazili hastanın kapsamlı immün fonksiyonlarını araştırdıkları bir çalışmada, kontrol grubu ile bronşektazili hastaların PNL'lerinin fagositik aktiviteleri arasında herhangi bir değişim olmadığını, 33 hastada ise nötrofillerin oksidatif patlama fonksiyonunun anormal düşük seviyede olduğunu bildirmişlerdir.

Ertürk ve ark. (11), 15 genç-erişkin kistik bronşektazili hastanın akut alevlenme olmayan döneminde PNL fonksiyonlarını araştırdıkları bir çalışmada, 8 hastanın granülosit fagositozunun ve 5 hastanın granülosit oksidatif patlama fonksiyonunun %95'in altında olduğunu bildirmişlerdir.

Ertürk ve ark. (11), cerrahi düşünülen kistik bronşektazili genç hastalarda, immünolojik araştırma ile hastalığın etyolojisinin aydınlatılmasının faydalı olacağını, bu hastaların önemli bir

kısmında nötrofillerin fagositoz ve oksidatif patlama fonksiyonlarında bozukluk olabileceğini vurgulamışlardır.

Pasteur ve ark. (31), 150 bronşektazi hastasında sadece bir olguda nötrofil fonksiyon bozukluğu (<0.1%) saptamışlardır.

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde değişen antibiyotik direnç profili, yeni antibiyotiklerin kullanımını zorunlu hale getirmiştir (32).

Antimikrobik etkili katyonik peptidlerden polimiksin E'nin metansülfonat türevi olan kolistin (kolimisin), gram negatif bakterilere özellikle *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etkilidir (32).

Tigesiklin; in vitro Metisilin'e dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), çoklu ilaç direnci gösteren gram negatif ve anaerobların da dahil olduğu bakterilere karşı, geniş bir etki spektrumuna sahip, sentetik bir antibiyotiktir. Tigesikline karşı direnç gelişme potansiyelinin düşük olması ve geniş etki spektrumu tigesiklini, çoklu direnç gösteren infeksiyonların tedavisinde ön sıralara taşımaktadır (33).

Rifampisin; anti-tüberküloz tedavisinde kullanılan en geniş spektrumlu antibiyotiktir. Güçlü antimikrobik etkisi nedeniyle bazı kombine ilaç tedavilerinde kullanılmaktadır (34).

İmipenem; çok yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösteren beta-laktam antibiyotiklerdendir, immün sistemin baskılandığı ciddi infeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (35).

Katyonik peptidlerin tek başına ve kombine kullanımlarının etken bakteriler üzerine etkilerini araştıran çalışmalar mevcuttur. Araştırmalar; bu peptidlerin bazı antibiyotiklerle kombinasyonunun dirençli suşlara karşı daha etkili olduğunu göstermiş olmasına rağmen, katyonik peptidlerin tek başına ve kombine kullanımlarının immün sistem üzerine etkileri araştırılmamıştır (36).

Çok ilaca dirençli bir *P. aeruginosa* kökeni ile infekte olan kronik pulmoner infeksiyonlu kistik fibrozisli (KF) 53 hastada, kolistin ile anti-pseudomonal etkili bir antibiyotik (azlosilin, piperasillin, aztreonam, seftazidim, imipenem ya da siprofloksasin) kombine tedavisinin, tek başına kolistin tedavisinden daha etkili olduğu gösterilmiştir (37).

Dizbay ve ark. (38), yoğun bakım ünitelerinde solunum yolu infeksiyonu ile ilişkili pnömoni etkeni olarak izole ettikleri, çok ilaca dirençli 25 *Acinetobacter baumannii* kökenine karşı; tigesiklin+kolistin (%72), kolistin+rifampisin (%60) ve tigesiklin+rifampisin kombinasyonlarının (%12) in vitro sinerjistik aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Döşler ve Gürler (32), kolistin metansülfat'ın gram negatif bakterilere karşı kombine ilaç kullanımının etkilerini araştırdıkları bir çalışmada; imipenem ve siprofloksasin kombinasyonlarında sinerjistik etki saptamışlardır. Araştırmacılar, aynı çalışmada *P. aeruginosa*'ya karşı kolistin metansülfonat + siprofloksasin kombinasyonunun %54 oranında sinerjistik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Mikroorganizma, antimikrobik ilaç ve konak immün sistemi arasındaki karşılıklı ilişkileri konu alan araştırmalar, özellikle immün sistemi bozuk ve baskılanmış kişilerde görülen hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamaktadır (39).

Antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmaya başlamasından sonra, bakteriyel infeksiyonlu hastaların tedavisinde kullanılan bazı antibakteriyel ajanların konağın immün sistem fonksiyonlarını etkilediği; nötrofillerin kemotaksisini, fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesini, T ve B lenfositlerinin fonksiyonlarını değiştirebileceği bildirilmiştir (39,40,41).

Tedavide kullanılan antibakteriyel ajanların PNL fonksiyonlarını (fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi) arttırmaması, istenilen bir immünomodülatör etkidir (40).

Pasqui ve ark. (35), imipenemin immün yanıtta in vivo ve in vitro etkilerini flow sitometri ile araştırdıkları bir çalışmada yüksek konsantrasyon imipenemin (30 ve 60 mg/l) diyabetik hastaların PNL'lerinin fagositik aktivitesini artırdığını, süperoksit anyon üretimini ve lenfo-monosit testlerini değiştirmediğini saptamışlardır. Araştırmacılar aynı çalışmada 15 yaşlı ve diyabetik hastaya uygulanan 7 günlük imipenem (imipenem/silastatin 1500 mg/gün) tedavisinin hastaların PNL'lerinin fagositik aktivitesini ve süperoksit anyon üretimini anlamlı olarak arttırdığını buna karşın lenfosit aktivitesini değiştirmediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kolistin (4 µg/ml) + imipenem (30 µg/ml) kombinasyonu bronşektazili hastaların PNL'lerinin fagositik aktivitesini anlamlı olarak arttırmıştır (p<0.0001). İmipenemin aynı tedavi dozunda bu olumlu etkisi

Pasqui ve ark.nun (35), deney sonuçları ile karşılaştırıldığında; çalışmamızdan alınan sonuçlar farklı metodlar kullanılmasına rağmen araştırmacıların çalışmaları ile benzer doğrultudadır. Bu durum bize flow sitometri ile alınan sonuçların, mikroskopta fagositik indeks formülü ile alınan sonuçlarla paralellik göstermesi açısından önemlidir.

Umeki (42), sağlıklılar ve yaşlı hastalar da imipenemin PNL fonksiyonları üzerine etkisini araştırdığı çalışmada; imipenemin PNL'ler tarafından üretilen süperoksit anyonunu ( $O_2^-$ ) inhibe etmediğini göstermiştir.

Sümer (43), kolistin + imipenem kombinasyonunun in vitro koşullarda sağlıklı gönüllü PNL'lerinin hücre içi öldürme aktivitesini anlamlı olarak artırdığını göstermiştir.

Bizim çalışmamızda da kolistin (4 µg/ml) + imipenem (30 µg/ml) kombinasyonu bronşektazili hastaların PNL'lerinin hücre içi öldürme aktivitesini kontrole göre anlamlı olarak arttırmıştır (p=0.0014).

Daşdelen ve ark. (44), sağlıklı gönüllülerle yaptıkları bir çalışmada rifampisin (7 µg/ml) sağlıklı gönüllülerin PNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesini kontrol değerlere göre anlamlı olarak azalttığını (p<0.05, p<0.01), imipenemin (50 µg/ml) ise PNL'lerin fagositik aktivitesini etkilemediğini ancak hücre içi öldürme aktivitesini anlamlı olarak artırdığını (p<0.05) bildirmişlerdir.

Demkow ve ark. (45), beş sağlıklı gönüllü ile yaptıkları bir çalışmada rifampisin (5 µg/ml), PNL'lerin oksidatif patlamasını inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Kritik hastalarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı *Acinetobacter* türlerinde direnç gelişimini artırmıştır. Son yıllarda çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* infeksiyonlarının alternatif tedavisinde kolistin kullanımı artmaktadır. Çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* menenjitlerinin tedavisinde intratekal kolistin kullanımı ile iyi sonuçlar alınmaktadır (46).

Karbapenemler ve diğer beta laktam ajanlara dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu menenjit olgularında, intravenöz ve intratekal kolistin ve peroral kolistin + rifampisin kombine ilaç tedavisi kullanılmaktadır (46).

Bassetti ve ark. (47), çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii*'nin neden olduğu, nozokomiyal pnömonili 19 hasta ile bakteriyemili 10 hastaya intravenöz kolistin sülfometat sodyum (2 milyon IU/günde 3 kez) + rifampisin (10 mg/kg/12 h.) kombine ilaç tedavisinin klinik ve mikrobiyolojik yanıtını değerlendirdiklerinde, infeksiyona bağlı ölüm oranının %21 (6/29) olduğunu görmüşlerdir. Böbrek yetmezliği olan 3 hastada ise kolistine bağlı nefrotoksitenin geliştiği, diğer hastalarda ise nefrotoksite gözlemediklerini bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların bulgularına göre çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* ile meydana gelen ciddi infeksiyonların tedavisinde, kolistin + rifampisin kombine ilaç tedavisinin etkili ve güvenli olduğu görülmektedir.

Biz de çalışmamızda *A. baumannii* üzerine etkili olan kolistin (4 µg/ml) + rifampisin (7 µg/ml) kombinasyonunun bronşektazili hastaların PNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesini anlamlı olarak (p<0.0001 ve p= 0.0036) artırdığını saptadık. İn vitro tek başına kolistin ve rifampisin ile kombine kullanımlarının her iki PNL fonksiyonu üzerine

immünomodülatör etki göstermesi ve aynı kombine tedavinin klinik iyileşme sağlaması bulgularımızı desteklemektedir.

Ayrıca çalışmamızda; kolistin (4 µg/ml) + tigesiklin (0.87 µg/ml), kombinasyonu bronşektazili hastaların PNL'lerinin fagositik aktivitesini ( $p < 0.0001$ ) ve hücre içi öldürme aktivitesini ( $p=0.0008$ ) kontrole göre anlamlı olarak artırmıştır.

Nötrofillerin primer fonksiyonu fagositoz ve mikroorganizmaların sindirimi olmasına rağmen bu hücrelerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu yakın hücrelere zarar verir. Fagositik kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünoşüpresif ve mutajenik etki gösterirler. İskemi ve reperfüzyon sonucu akciğerlerde nötrofil birikimi olur. Bu nötrofillerden ortama salınan serbest radikaller akciğer hasarına neden olur (48).

Oksidatif stres oluşturan serbest radikaller ve reaktif oksijen metabolitleri, malign hastalıklar yanında, akciğer fibrozisi, bronşektazi, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) başta olmak üzere birçok akciğer hastalıklarının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (49).

Organ ve dokulara yayılan birtakım hastalıklardan kaynaklanan aşırı oksidatif strese karşı, zaman zaman koruyucu antioksidan sistemler yetersiz kalmakta bu da hastalığın daha da ilerlemesine hatta istenmeyen pek çok komplikasyonun hızlı bir şekilde ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Sürekli oksijene maruz kalan solunum yolları ve akciğerlerde bu ihtimal çok daha fazla ortaya çıkmaktadır (49).

Mitokondirilerde gelişen biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda serbest radikal üretiminde artış meydana geldiği belirtilmektedir. Yapılan araştırmalarda, bazı antibiyotiklerin oksidatif streşi artırarak serbest radikal üretimini tetiklediği ve buna bağlı olarak antioksidan sistemi zayıflattığı bildirilmiştir (50).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı antibiyotiklerin SOR ürünlerine, SOD ve GSH-Px aktivitelere etkili olduğu gösterilmiştir. Kobaylarda gentamisin'in, kardiyak SOD ve GSH-Px aktivitesini ve renal GSH-Px aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (51).

Farelerde tetrasiklinin, hepatik SOD aktivitesini azalttığı, sefaloridin böhrekteki SOR ürünlerini azalttığı, roksitromisin, kloramfenikol ve tetrasiklinin fagositik hücrelerde SOR ürünlerini inhibe ettiği, bir antineoplastik ajan olan bleomisin akciğerlerdeki SOR ürünlerini azalttığı gösterilmiştir. (51). Sisplatin ve gentamisin, dokulardaki MDA ve GSH düzeylerinde değişikliklere neden oldukları gösterilmiştir (52).

Rayaman (34), çalışmasında alerjik astımlı hastaların PNL'lerinde MDA düzeyini sağlıklı gönüllülere göre anlamsız olarak düşük bulmuş, hasta PNL'lerinin siprofloksasin (2.5 µg/ml) ile muamelesinden sonra ise MDA düzeyinin anlamlı olarak arttığını bildirmiştir.

Olveira ve ark. (53), bronşektazili hastaların PNL'lerinde SOD aktivitesinin azaldığını, buna bağlı olarak da plazma lipid peroksidasyonunun, sağlıklı kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda; kolistin (4 µg/ml) tek başına ve kolistin (4 µg/ml) + tigesiklin (0.87 µg/ml), kolistin (4 µg/ml) + imipenem (30 µg/ml), kolistin (4 µg/ml) + rifampisin (7 µg/ml) kombinasyonları bronşektazili hastaların PNL'lerinin MDA düzeyini ve SOD aktivitesini anlamlı olarak azaltmıştır ( $p < 0.001$ ).

Çalışmamızda kullandığımız antibiyotiklerin, bronşektazili hastaların PNL'lerinde oluşan oksidatif streşi azaltarak, MDA düzeyinin artışını baskıladığını düşünmekteyiz.

GSH-Px solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı antioksidandır (54).

Lökositlerin aktiviteleri için gerekli bir enzim olan GSH-Px'in fagositoz sırasında lökositler tarafından kullanılması sonucu miktarı azalmaktadır (55). GSH-Px aktivitesinde azalma hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (54).

Öztop ve ark. (56), çalışmalarında astım hastalarının stabil döneme geçtiklerinde serum GSH-Px ve SOD düzeylerini anlamlı olarak düşük, MDA düzeylerini de anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır.

Yine yapılan bir çalışmada bir aminoglikozid grubundan olan amikasinin antioksidan enzimlerin aktivitesini anlamlı derecede artırdığı bildirilmiştir (57).

Bizim çalışmamızda; kolistin (4 µg/ml) tek başına ve kolistin (4 µg/ml) + tigesiklin (0.87 µg/ml), kolistin (4 µg/ml) + imipenem (30 µg/ml), kolistin (4 µg/ml) + rifampisin (7 µg/ml) kombinasyonları bronşektazili hastaların PNL'lerinin GSH-Px aktivitesini kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır ( $p < 0.001$ ).

PNL'ler içine fagosite olan mikroorganizmalar fagozom içinde artan MPO aktivitesi ve SOR oluşumu sonucunda son ürün HOCl (hipokloröz asid) ile öldürülmektedir (58). Bu nedenle PNL gibi fagositik hücrelerde MPO ve SOR'ların artışı mikroorganizmaların eradikasyonu açısından önemlidir.

Rayaman (34), sağlıklı gönüllülerin, sistemik lupus eritamatozus, romatoid artrit, diabetes mellitus ve alerjik astımlı hastaların lökositlerinde MPO miktarını araştırdığı çalışmasında; tüm hasta gruplarının MPO miktarının sağlıklı gönüllülere göre anlamsız olarak düştüğünü, siprofloksasin ile muamele sonrasında ise MPO miktarının kontrole göre anlamlı olarak ( $p < 0.001$ ) arttığını bildirmiştir.

Bizim çalışmamızda; kolistin (4 µg/ml) tek başına ve kolistin (4 µg/ml) + tigesiklin (0.87 µg/ml), kolistin (4 µg/ml) + imipenem (30 µg/ml), kolistin (4 µg/ml) + rifampisin (7 µg/ml) kombinasyonları bronşektazili hastaların PNL'lerinin MPO aktivitesini kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır ( $p < 0.001$ ).

Son zamanlarda hastalıkların tedavisinde, antioksidan tedavinin önemli bir yer tutacağına inanılmaktadır. Bu tedavinin başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için ise reaktif oksijen metabolitlerinin ve çeşitli antioksidan mekanizmaların her bir hastalığı keskin rolünün çok iyi belirlenmiş olması gerekmektedir (59).

İmmün sistem üzerine olumsuz etkileri olan antimikrobiklerin bilinçsiz kullanımı, dirençli mikroorganizmalar ile gelişen infeksiyonlarda, konağın doğal direncini ortadan kaldırır ve infeksiyonun daha ciddi boyutlar kazanmasına neden olur. İmmün sistem üzerine olumsuz etkileri bilinen antimikrobiklerin bilinçsiz kullanımı belki de immün sistemin üstesinden gelebileceği bir infeksiyona karşı hastayı tamamen savunmasız bırakabilecektir. İmmün sistemi güçlendirme ve düzeltme yeteneğini bir arada bulduran ilaçların doğru seçimi özellikle immün sistemi baskılanmış hastaların tedavisinde yararlı olabilecektir (38).

Sonuç olarak;

Literatür bilgileri ve çalışmamızdan edindiğimiz verilerimizin doğrultusunda; antibiyotiklere karşı direnç problemi nedeni ile geleceğin antibiyotiği olarak görülen kolistinin tek başına ya da immünmodülatör aktiviteye sahip tigesiklin, imipenem ve rifampisin ile kombinasyonlarının bronşektazili hastaların PNL fonksiyonları üzerine olumlu etkilerinin olabileceğinin bilinmesinin, tedaviye immünoterapötik bir yaklaşım getirebileceği görüşündeyiz. İn vitro çalışmamızın klinik çalışmalar ile desteklenmesinin, bronşektazili hastaların tedavisinde yeni ufuklar açabileceği kanısındayız.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPKO) tarafından (SAG-C-DRP-210311-0047 no ile) desteklenmiştir.

Çalışmada kullanılan Tigesiklin etkin maddesi Pfizer, Rifampisin etkin maddesi Sanofi-Aventis firmasından sağlanmıştır.

## In vitro investigation of the effects of colistin alone with and tigecycline, imipenem and rifampicin combinations on polymorphonuclear leukocyte functions, oxidative stress, oxidant and antioxidant enzymes in patients with bronchiectasis.

**ABSTRACT:** In our study was investigated the in vitro effects of Colistin(4 µg/ml), alone with the combination of tigecycline(0.87 µg/ml), imipenem (30 µg/ml) and rifampicin (7 µg/ml) at therapeutic concentrations and malondialdehyde (MDA) level, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and myeloperoxidase (MPO) activity on polymorphonuclear leukocyte (PMN) functions (phagocytic and intracellular killing activity) of patients with bronchiectasis. PMNLs 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 levels were determined by Beuge's method, SOD, GSH-Px and MPO activities were assayed by Sun's, Paglia and Valentine's and Hillegas's, methods respectively. All results are statistically evaluated. Phagocytic ( $p<0.0001$ ), and intracellular killing activity ( $p=0.0113$ ,  $p=0.0008$ ,  $p=0.0014$ ,  $p=0.0036$ ) in the PMN of patients with bronchiectasis significantly increased when compared to the control. Enzyme activity (SOD, GSH-Px and MPO) and MDA level significantly decreased ( $p<0.001$ ) in patients with bronchiectasis when compared to the control.

**KEY WORDS:** Antioxidants, bronchiectasis, phagocytosis, oxidative stress

## KAYNAKLAR

1. Arslan S. Bronşektazi: demografi, risk faktörleri ve lokalizasyonları. Cumhuriyet Tıp Derg 2009; 31:140-4.
2. Babayigit A, Olmez D, Uzuner N, Cakmakci H, Tuncel T, Karaman O. A neglected problem of developing countries: Noncystic fibrosis bronchiectasis. Ann Thorac Med 2009; 4:21-4.
3. Kömür N, Tertemiz CK, Akkoçlu A, Gülay Z, Yılmaz E. Bronşektazi olgularında Pseudomonas aeruginosa kolonizasyonu ve klinik yansımaları. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 2006; 54:355-62.
4. Ofluoğlu R. Bronşektazi Tedavisindeki Son Gelişmeler. Solunum Hastalıkları 2008; 19:83-8.
5. Özçelik U. Kistik Fibrozis akciğer hastalığında patogenez. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2004; 47:299-302.
6. Güzel BÇ, Gerçek AA. The Molecular Biology and Pathogenesis of Cystic Fibrosis. Turkish J Infect 2006; 20:73-8.
7. Dede MA. Deneysel Kolit Modelinde Drotrecogin Alfa (Activated, Xigris)'nin Bakteriye Translokasyonu Önlemede Etkinliğinin Değerlendirilmesi. T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Isparta, 2007. (Danışman Yrd. Doç.Dr. Celal Çerçi).
8. Fırat SŞ, Canacankatan N, Korkmaz B, Yıldırım H, Tamer L, Sarı N A, Tunçtan B. Endotoksemik Sıçanların Karaciğerinde Artan Oksidatif Stres Üzerinde İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz İnhibisyonunun Etkisi. Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2008; 1:28-35.
9. Günaldı M. Kan Selenyum Düzeyi ve Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Akut Miyokart Enfarktüsü Gelişimi Üzerine Etkisi. T.C. Sağlık Bakanlığı Ok Meydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi II. İç Hastalıkları Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2009. (Klinik Şefi Doç.Dr. Ayşen Helvacı).
10. Kumbul K. Deneysel İntestinal İskemi ve Reperfüzyon Modelinde Caffeic Acid Phenethyl Ester'in Akciğer Hasarını Önlemedeki Etkinliği. T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Isparta, 2007. (Danışman: Yrd. Doç.Dr. Ömer Rıdvan Tarhan).
11. Özkan S, Fidan I, Yüksel S, İmir T. Telitromisin'in İnsan Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları Üzerine Etkisinin İn-Vitro Araştırılması. ANKEM Derg 2006; 20:229-32.
12. Alexander JW, Windhorst DB, Good RA. Improved tests for the evolution of neutrophil function in human disease. J Lab Clin Med 1968; 72: 136-48.



13. Soyoğul Ü. Candida albicans'a Karşı Flukonazol'un İnsan Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları Üzerine Etkisinin Araştırılması, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 1994. (Danışman Prof. Dr. Adile Çevikbaş)
14. Veringa EM, Verhoef J. Clindamycin at subinhibitory concentrations enhances antibody- and complement-dependent phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes of Staphylococcus aureus. *Chemotherapy* 1987; 33:243-9.
15. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97:77-89.
16. Roilides E, Walsh TJ, Rubin M, Venzon D, Pizzo PA. Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:196-201.
17. Morán FJ, Puente LF, Pérez-Giraldo C, Hurtado C, Blanco MT, Gómez-García AC. Effects of cefpirome in comparison with cefuroxime against human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33:57-62.
18. Pallister CJ, Warnock DW. Effect of antimicrobial and antineoplastic drugs alone and in combination on the phagocytic and candidacidal function of human polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23:87-94.
19. Richardson MD, Scott G, Shankland GS. Effect of cilofungin on phagocytosis and intracellular killing of Candida albicans by human neutrophils. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11:22-6.
20. Pascual A, García I, Conejo C, Perea EJ. Uptake and intracellular activity of fluconazole in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:187-90.
21. Arda M. Bakterilerde üremenin Ölçülmesi. İçinde: Temel Mikrobiyoloji; Ed.: Prof. Dr. Mustafa Arda. Genişletilmiş İkinci Baskı. Medisan Yayın Serisi, Medisan Yayınevi, Ankara, 2000; 46:1-10.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
23. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 53:302-11.
24. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34:497-500.
25. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte GPx. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-69.
26. Hillegass LM, Griswold DE, Brickson B, Albrightson-Winslow C. Assesment of myeloperoksidase in whole rat kidney. *J Pharmacol Method* 1990; 24:285-95.
27. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78:206-9.
28. Ural A, Kılıç İ. Bilimsel Araştırma Süreci ve SPSS ile Veri Analizi. 1. Baskı. Detay Yayıncılık, Ankara. 2005.
29. Çelik Ü, Kocabaş E. Çocuklarda kronik akciğer hastalıklarının antibiyotik tedavisinde yeni yaklaşımlar. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2008; 56:353-63
30. King PT, Hutchinson P, Holmes PW, Freezer NJ, Bennett-Wood V, Robins-Browne R, Holdsworth SR. Assessing immune function in adult bronchiectasis. *Clin Exp Immunol* 2006; 144:440-6.
31. Pasteur MC, Helliwell SM, Houghton SJ, Webb SC, Foweraker JE, Coulden RA, Flower CD, Bilton D, Keogan MT. An investigation into causative factors in patients with bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1277-84.
32. Döşler S, Gürler B. Antimikrobik Etkili Katyonik Peptidlerin Tek Başına ve Kombinasyon Halindeki Etkilerinin Araştırılması. *ANKEM Dergisi* 2006; 20:173-9.
33. Ünal S. Gram Pozitif İnfeksiyonların Tedavisinde Yeni Ajanlar. *ANKEM Derg* 2008; 22 (Ek 2): 297-306.
34. Rayaman P. Sağlıklı ve Hasta Polimorf Nüveli Lökositlerinde Miyeloperoksidaz ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesinin İlişkisi ve Bazı İlaçların Miyeloperoksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması. T.C. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji Doktora Tezi, İstanbul, 2010. (Danışman: Prof. Dr. Adile Çevikbaş).
35. Pasqui AL, Di Renzo M, Bruni F, Fanetti G, Campoccia G, Auteri A. Imipenem and immune response: in vitro and in vivo studies. *Drugs Exp Clin Res* 1995; 21:17-22.
36. Kaleli İ. Antibiyotiklerin İmmünomodülatör Etkileri. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitapçığı 2007; s:160-2.
37. Falagas EM, Kasiakou KS. Colistin: The Revival of Polymyxins for The Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin Infect Diseases* 2005; 40: 1333-41.
38. Dizbay M, Tozlu KD, Özdemir K, Arman D. "Extensive-Drug Resistant (XDR), Acinetobacter baumannii İzolatlarında Tigesiklin ve Kolistin Kombinasyonunun İn-Vitro Sinerjistik Aktivitesi. *ANKEM Derg* 2009; 23 (Ek1): 1.
39. Çevikbaş A. Antimikrobiyal ilaçların İmmün sisteme Etkisi. İçinde: Farmasötik Mikrobiyoloji Kitabı. Editörler: Abbasoğlu U, Çevikbaş A., Kısım III, Bölüm 7, Efil Yayınevi, 2010; s: 242-260.
40. Özkan S, Fidan I, Yüksel S, İmir T. Telitromisin'in İnsan Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları Üzerine Etkisinin İn-Vitro Araştırılması. *ANKEM Derg* 2006; 20: 229-32.
41. Şener G, Yeğen ÇB. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Derg* 2009; 22:5-13.
42. Umeki S. Effects of respiratory tract infections and antibiotic therapy on NADPH oxidase activity. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1992; 30:2069-74.
43. Sümer B. Antimikrobik Etkili Katyonik Peptidler, Bazı Antibiyotikler ve Kombinasyonlarının Polimorf Nüveli Lökosit (PNL) Fonksiyonları Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2008. (Danışman: Doç.Dr. Ümran Soyoğul Gürer).
44. Daşdelen N, Soyoğul Gürer Ü, Çevikbaş A, İmamoğlu Ç, Johansson C. PNL fonksiyonlarını inhibe eden ve immünomodülatör etki gösteren antibiyotiklerin kombine kullanımlarının insan PNL fonksiyonları üzerine etkisinin in vitro araştırılması. *Türk Mikrob Cem Derg* 1999; 29:17-22.

- 45.** Demkow U, Małkowska-Zwierz W, Rogala E, Skopińska-Rózewska E, Lewandowski Z. Effect of antituberculous drugs, isoniazid, pyrazinamide and rifampicin, on chemiluminescence of the human polymorphonuclear leukocytes. *Folia Biol (Praha)* 1995; 41:257-62.
- 46.** Memikoğlu KO, Alkaya AF, Azap A, Köken Z, Serdaroğlu H, Çakır T. Kolistin ve Rifampisinle Başarılı Şekilde Tedavi Edilen *Acinetobacter baumannii* Menenjitisi. *Türk Anest Rean Der Dergisi* 2008; 36:194-6.
- 47.** Bassetti M, Repetto E, Righi E, Boni S, Diverio M, Molinari MP, Mussap M, Artioli S, Ansaldi F, Durando P, Orengo G, Bobbio Pallavicini F, Viscoli C. Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:417-20.
- 48.** Özbal Y. Temel immünoloji. I. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 2000.
- 49.** Değer S, Değer Y, Ertekin A, Gül A, Biçek K, Özdal N. *Dictyocaulus viviparus* ile Enfekte Sığırlarda Lipit Peroksidasyon ve Antioksidan Durumunun Saptanması. *Türkiye Parazitol Derg* 2008; 32:234-7.
- 50.** Civan A, Keçeci T. Ginseng Uygulamasının Sporcularda ve Sedanterlerde Nitrik Oksit ve Malondialdehit Üzerine Etkisi, Selçuk Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Bilim Dergisi 2010; 12:232-8.
- 51.** Yazar E, Tras B. Effects of fluoroquinolone antibiotics on hepatic superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in healthy and experimentally induced peritonitis mice. *Revue Méd Vét* 2001; 152:235-8.
- 52.** Karahan İ, Yılmaz S, Ateşşahin A. Ratlarda Cisplatin ve Gentamisin Kan ile Karaciğerde Oluşturdukları Oksidatif Stres Üzerine Likopenin Etkileri. *F.Ü. Sağlık Bil Dergisi* 2006; 20; 39-43.
- 53.** Oliveira G, Oliveira C, Dorado A, García EF, Rubio E, Tinahones F, Soriguer F, Murri M Cellular and plasma oxidative stress biomarkers are raised in adults with bronchiectasis. *Clin Nutr* 2013; 32:112-7.
- 54.** Wheeler CR, Salzman JA. Automated Assay for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activity. *Anal Biochem* 1990; 184:193-9.
- 55.** Şimşek H, Aksakal M. Subklinik mastitisli ineklerde kan ve sütte lipit peroksidasyon ve bazı antioksidanlar üzerine E vitamini etkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2005; 52:71-6.
- 56.** Öztop A, Demir A, Saydam N, Öztop İ, Çelikten E. Astım Bronşiyale Olgularında Serum Glutasyon Peroksidaz, Süperoksid Dismutaz ve Malonil Dialdehid Düzeyleri ve Astım Şiddeti ile İlişkisi. *Solunum Hastalıkları* 2002; 13:239-45.
- 57.** Klemens JJ, Meech RP, Hughes LF, Somani S, Campbell KC. Antioxidant Enzyme Levels Inversely Covary with Hearing Loss After Amicacin Treatment. *J Am Acad Audiol* 2003; 14:134-43.
- 58.** Güney Y, Hiçsönmez A, Andrieu NM, Kurtman C, Özel Ü, Bilgihan A, Dizman A Farklı Dozlardaki İyonize Radyasyonunun Kobay Akciğer Dokusundaki Miyeloperaksidaz Aktivitesindeki Etkisi. *Acta Oncol* 2005; 38: 20-4.
- 59.** Kavas ÖG. Reaktif Oksijen Metabolitlerine Fizyopatolojik Yaklaşım, *Ankara Tıp Mecmuası* 1994; 47:579-92.