

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

86725

OXYBUTYNİN HCL'İN BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Abdullah GEDİK

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DIYARBAKIR - 1999

İÇİNDEKİLER

1. Giriş ve amaç	
2. Genel bilgiler	1
3. Materyal ve metod	13
4. Bulgular	18
5. Tartışma	27
6. Referanslar	32

GİRİŞ VE AMAC

Temiz aralıklı kataterizasyonla (TAK) kombine intravezikal Oxybutynin uygulaması son yıllarda giderek artan bir sıklıkta kullanılmaktadır. Yapılan bir çok klinik ve deneysel araştırmalar, temiz aralıklı kataterizasyonla kombine intravezikal uygulanan bu Oxybutynin'in üriyer enfeksiyonu artırıcı bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu durum Oxybutynin'in bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruyucu bir etkisinin olabileceği sorusunu akla getirmektedir.

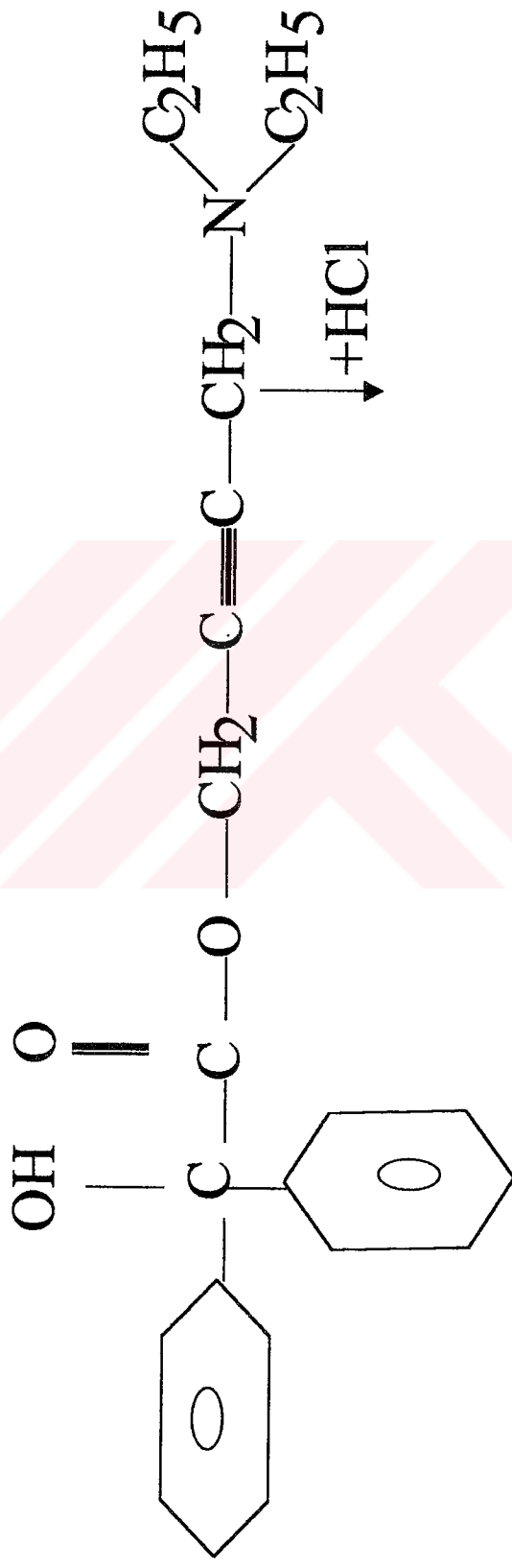
Biz çalışmamızda katater ilişkili enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilen Staf. epidermidis üzerine Oxybutynin'in etkilerini araştırdık. Yaptığımız çalışmada Oxybutynin'in bakterisidal etkisini ve biyolojik gereçlerle ilişkili enfeksiyonlarda bakterinin en önemli direnç mekanizmalarından biri olan biyofilm üzerine etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER



OXYBUTYNIN

(1,4 diethyl amino 2 butynyl phenyl cyclohexylglycolate hydrochloride)



OXYBUTYNİN

Oxybutynin chloride (1,4 dietyl amino 2 butynyl phenyl cyclohexylglycolate hidrochloride) antikolinerjik, antispazmotik ve lokal anestezi özelliği olan tersier amin yapısında bir maddedir (1). Farmakolojik olarak, detrusör kasında kolinerjik reseptör blokajı yaptığı gibi, bu kaslarda direkt relaksan etkisi de vardır. Oxybutynin'in mesane mukozası üzerine lokal analjezik etkisi de bildirilmiştir (3). Antinikotinik etkinliği yoktur.

Oxybutynin, tavşan detrusöründe Atropinin antikolinerjik etkisinin yalnızca 1/5'ini gösterirken, antispazmotik etkisi atropinden 4-10 kat daha fazladır. Baryum klorid ile indüklenmiş spazmları Atropinden 10 kat, Propanthelin'den ise 2 kat daha fazla inhibe eder (2).

Oxybutynin'in oral alınımını takiben barsaklardan emilimi iyidir, etki süresi yeterince uzundur ve geniş bir güvenlik aralığı vardır.

Diokno ve Lapides işeme bozukluklarında Oxybutynin'i ilk olarak kullanmışlar ve yararlı bir alternatif olduğunu, ürodinamik olarak etkinin 1 saat içinde başladığını, maksimum etkiye 6-8 saat içinde ulaşıldığını ve etkinin 8-10 saate kadar uzadığını rapor etmişlerdir (3).

Oral alınan ilaç barsaklardan hızla absorbe edilir ve karaciğerde metabolize edilir. Metabolizasyon sonrası aktif metaboliti olan N-desethyl oxybutynin oluşur. Bu, antikolinerjik aktiviteden sorumlu ana bölümdür (4,5).

Oxybutynin transüretal cerrahi sonrasında görülebilen mesane spazmlarında (6,7), nörojen mesanede, nokturnal enüreziste (8,9), detrusör instabilitesi ve hiperrefleksisinde kullanılır (10,11).

İşeme bozukluklarının tedavisi hem ürolog hem de hastalar için zor olabilir. Bu semptomlar cerrahi girişimler ile ilgili olabileceği gibi, nöropatik disfonksiyonlar daha sofistike araştırmalara ve tedaviye ihtiyaç gösterir. Obstrüktif olmayan nöropatik disfonksiyonlara bağlı işeme bozukluklarında ilk basamak tedavi ilaçlardır. Alternatif bir metod olan mesane eğitimi, kısa dönemde etkili olabilirken, uzun dönemde yüksek relaps oranlarına sahiptir (12).

Thompson ve Lauvetz disiklomin, propanthelin ve plasebolu çift kör bir çalışmada ateş yan etkisinin yanında Oxybutynin'e iyi bir sistometrik ve subjektif cevabın olduğunu ortaya koymuşlardır (8). Yapılan diğer çift kör çalışmalar Oxybutynin'in detrusör instabilitesi üzerine olan etkisini pekiştirmiştir (13,14).

Buttarazi enürezisi olan ve İmipramin'e cevap alınamayan 39 hastanın 31'inde Oxybutynin ile başarıyı rapor etmiştir (9). Ancak Oxybutynin ile tedavi edilen primer enüretiklerin uzun dönem takiplerinde yüksek relaps oranlarının olduğuda bildirilmiştir (15).

Oxybutynin'in klinik kullanım alanlarını ve başarısını belirleyebilmek amacıyla yapılan bir çalışmada şu sonuçlar bildirilmiştir (1);

Tablo 1: Oxybutynin'in yan etkileri;

	Hasta sayısı	Çok etkili	Sınırdaki etki
Detrüssör instabilitesi	108	61 (%56)	24 (%22,2)
Nokturnal enüresis	27	17 (%63)	5 (%18,5)
Frequency,noktüri	26	11 (%42)	7 (%26,9)
Anihibe nörojen mesane	16	7 (%44)	4 (%25)
Radyasyon sistidi	7	4 (%57)	2 (%28,5)
İnterstisyel sistit	4	3 (%75)	-
Stres inkontinans	2	1 (%50)	1 (%50)
Tüberküloz sistit	1	0	1 (%100)

Oxybutynin bir antikolinergik ajandan beklenen yan etkilere sahiptir. Palpitasyon, taşikardi, terlemede azalma, cilt döküntüleri, konstipasyon, ağız kuruması, idrar yapmada zorlanma, retansiyon, baş dönmesi, uyuşukluk, huzursuzluk, görme bozukluğu, halisünasyon gibi yan etkiler Oxybutynin'in daha çok antikolinergik özelliğinden kaynaklanır.

Aynı çalışmada Oxybutynin'in yan etkileri ise şu şekilde sıralanmıştır (1); ağız kuruluğu, konstipasyon, göz kuruluğu ve keratid , göğüste yanma ve ağrı, bulantı, kaşıntı, cilt kuruluğu, cilt döküntüleri, yüzde kızarma, hipotansiyon, konfüzyon, akut idrar retansiyonu, diare, burun kanaması, ateş, baş ağrısı, depresyon ve ilaç intoleransı. Hastalarda en sık görülen yan etki %12 oranıyla ağız kuruluğudur. Bunun yanında %10 oranında da ilaç intoleransına bağlı ilacı bırakma rapor edilmiştir.

Oxybutynin'in bu yan etkilerini minimize etmek amacıyla intravezikal uygulanması düşüncesi son yıllarda ortaya atılmıştır (3). Temiz aralıklı kateterizasyon (TAK) ile kombine intravezikal Oxybutynin instillasyonu üriner inkontinansa, anihibe mesane kontraksiyonlarında veya yüksek basınçlı mesane varlığında, detrüssör hiperrefleksisinin ve detrüssör sfinkter dissinerjisinin tedavisinde yaygın ve etkili bir tedavi olarak uygulanmaktadır (16,17).

Bu hastalarda mevcut problemin düzeltilmesi yanında, üst üriner sistemin korunmasında ve kontinansın desteklenmesinde de Oxybutynin etkilidir (18,19).

Plant ve Taylor spina bifidası olan çocuklarda mesane hiperaktivitesini kontrol etmede ve kontinansı desteklemede, Oxybutynin kullanımının iyi bir alternatif olduğunu bildirmişlerdir (20).

İntravezikal Oxybutynin'in uzun dönem takip sonuçlarını bildiren bir yayında myelodisplazili, nörojen mesanesi olan ve yüksek mesane içi basıncı bulunan ve/veya detrüssör hiperaktivitesi bulunan 39 çocuğa temiz aralıklı kateterizasyon (TAK) ile kombine intravezikal Oxybutynin'in 0,1 mg/kg dozunda steril farmakolojik bir solüsyon içinde uygulandığı belirtilmiştir. Ortalama takip süresi 27 ay olarak bildirilen bu hasta grubunda kontinansın belirgin olarak desteklendiği ve ürodinamik parametrelerin iyileştiği görülmüştür. Bu çalışmada tüm hastalara intravezikal Oxybutynin uygulanmadan önce temiz aralıklı kateterizasyon (TAK) uygulandığı ve 11 hastanın toplam 15 üreterinde vezikoüreteral reflü (VUR) olduğu bildirilmiştir. İntravezikal Oxybutynin instillasyonu yapılan bu hastaların, 4'ünde bulunan 6 üreterdeki VUR'nün ortadan kalktığı gösterilmiştir (21). Sonuç olarak intravezikal Oxybutynin instillasyonunun olumlu etkileri ağır basmaktadır. Ve hatta bu tedavi yaklaşımı ile VUR'nün nörojen mesaneli olgularda, bazen cerrahiye gerek duyulmaksızın ortadan kalkabileceği bilinmektedir.

Ratlarda renal pelvik basınçta anormal yükselmenin bir sebebidir enfeksiyondur. Enfeksiyon varlığında renal pelvik basınç, dolu mesane basıncını bile geçebilir. Bu artmış basınç değerleri, ileri dönemlerde renal skarlaşma ile sonuçlanabileceğinden, bu basınç değerlerinin düşürülmesi önemli olabilmektedir. Oxybutynin'in invivo olarak ratlarda üriner sistem enfeksiyonu ile birlikte olan ve anormal şekilde yükselmiş renal pelvik basınçları düşürmede, etkili olup olmadığını değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, Oxybutynin'in enfekte ratlardaki artmış olan renal pelvik basınç değerlerini düşürdüğü bildirilmiştir (52).

Nörojen mesaneli çocuklarda intravezikal Oxybutynin instillasyonu etkilidir ve yan etkiler oral alımına göre daha sınırlıdır.(22). Topikal uygulamanın bu yan etkilerini daha iyi değerlendirebilmek için bir çok çalışma yapılmıştır.Kendisi de bir sülfatlı polisakarit olan Heparin'in mesanenin glukozaminoglycan (GAG) tabakasını koruduğu bilinmektedir (23,24). Tersier amin yapısındaki Oxybutynin, quartener amin yapısı içeren ve Heparin

antagonisti olan Protamin sülfat gibi polisakkarit yapıları inaktive edebilir (25).

William ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları deneysel bir çalışmada intravezikal Oxybutynin uygulanan ve uygulanmayan(kontrol) gruplarında mesane mukozasında ülserasyonlar saptamışlar. Oluşan bu ülserasyonların topikal olarak verilen Oxybutynin konsantrasyonuyla ilişkisini araştırdıklarında bunun ters ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Bu otörler üriner trakt enfeksiyonlarını direkt olarak Oxybutynin uygulamasına bağlayamamışlar ve Oxybutynin konsantrasyonu arttıkça mesanede ülserasyonlara kadar varabilen yerel doku değişikliklerinin azaldığını rapor etmişlerdir (26).

Bu durum bir tersiyer amin olan Oxybutynin 'in sülfatlı polisakkarit yapısındaki biyofilmi (slime) inhibe edebileceği ve dolayısıyla bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruyucu bir etkisi olabileceği olasılığını akla getirmektedir.

1995 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, Oxybutynin'in değişik farmasötik formlarının intravezikal instillasyonunun , mesane mukozası üzerindeki histolojik etkileri değerlendirilmiştir. Parçalanmış tablet grubunda mesane mukozasında hafif derecede eozinofilik reaksiyon olduğu , saf toz formu uygulanan grupta ise daha az allerjik reaksiyon olduğu gösterilmiştir. Her iki farmasötik form arasında mikrobiyolojik olarak fark olmadığı görülmüştür (27). Özet olarak, intravezikal Oxybutynin lokal doku yanıtı açısından klinik uygulamalarda en azından hayvan çalışması düzeyinde güvenli olduğu izlenimini vermektedir.

ÜROGENİTAL SİSTEM ENFEKSİYONLARI

Ürogenital sistem enfeksiyonları terimi tanım olarak ürogenital sistem içinde mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturması anlamına gelmekle birlikte, klinik ve patolojik olarak çok geniş bir spektrum içerir. Mesanedeki idrar normalde sterildir. İdrarda bakterinin bulunması ya gerçekten enfeksiyon varlığından, yada idrarın toplanması sırasındaki kontaminasyondan kaynaklanır. Bakteriüri, semptomatik veya asemptomatik olabildiği gibi, pyüri ile birlikte veya pyürisiz olabilir.

Reenfeksiyon: İlk enfeksiyon etkeninden farklı bir etken ile ve onun eradikasyonundan bir süre sonra oluşan enfeksiyondur.

Relaps: Tedavi esnasında veya tedaviden sonra aynı etken ile devam eden enfeksiyondur.

Üriner sistem enfeksiyonlarının bakteriyolojisi (61) : Üriner sistemde enfeksiyon yapan mikroorganizmalar büyük çoğunlukla barsak florası orjinlidirler. E.coli tüm enfeksiyonların yaklaşık %85' inden sorumludur. Nasokomiyal üriner enfeksiyonlarda ise mikroorganizmaların dağılımı farklıdır. Bu hastalarda E.coli %50 oranında enfeksiyondan sorumlu bulunmuştur. Fungal enfeksiyonlar hemen yalnızca hospitalize hastalarda görülürler. Kalıcı kataterler, ürolojik enstrümantasyon ve antimikrobiyal ajanlara bağlı olarak rezistans bakteri suşlarının gelişmesi nasokomiyal enfeksiyonların ciddiyetini artırır. Ürolojik enstrümantasyon ve kataterizasyondan sonra daha çok Staphylococcus epidermidis izole edilir. B grubu Streptokok'lar, Stafilokokkus epidermidis, Candida gibi patojenler, kadınlarda vagina veya perineal cilt florasından kaynaklanırlar.

Mikroorganizmalar ürogenital sisteme genel olarak dört yoldan ulaşır:

1-Assendan yol: Genitoüriner sistemde en sık enfeksiyon oluşturan yoldur. Kadınlarda üretranın kısalığı, vaginal ve periüretral kolonizasyon assendan yolla mikroorganizmaların mesaneye ulaşmasını kolaylaştırır. Stamey'in çalışmaları başta E.coli olmak üzere, fekal flora bakterilerinin başlangıçta perine ve vaginal introitusu kolonize ettiğini ve sonra üretra boyunca mesane içine ilerlediğini göstermiştir. Erkeklerde üretranın uzunluğu ve prostatik antibakteriyel faktörün (PAF) antibakteriyel etkinliği nedeniyle üriner enfeksiyon insidansı kadınlara göre daha azdır.

Hastanede yatan hastalarda bir kez uygulanan katater sonrasında üriner enfeksiyon % 1-2 oranında görülür. Kalıcı kataterlerde eğer açık

drenaj sistemi uygulanıyorsa bu hastaların tamamına yakınında 3-4 gün içinde enfeksiyon gelişmektedir.

2-Hematojen yol: Genitoüriner enfeksiyonlarda hematojen yol nadirdir. Ancak bakteriyemilerde, böbrek ve prostat tutulumu sıktır. Hematojen yolla enfeksiyon oluşturan bakteriler en sık Stafilokok'lar, Candida, Salmonella, Mycobacterium tuberculosis'dir.

3-Lenfojen yol: Genitoüriner sisteme lenfatik yol ile mikroorganizmaların gelmesi çok nadirdir. Deneysel çalışmalarda mesane ile böbrek arasında lenfatik kanallar gösterilmiştir. Böylece obstrüksiyonlarda, assendan yol ile birlikte lenfojen yolunda rol oynayabileceği düşünülmektedir.

4-Direkt yayılım: İntraperitoneal abseler, pelvik enfeksiyonlar, vezikovaginal veya vezikointestinal fistüller direkt yayılmada rol oynayabilir.

Üriner sistemdeki savunma mekanizmaları:

Mikroorganizmaların üriner sisteme ulaşmalarını takiben bir dizi konak savunma mekanizması bakteriyel virulansa karşı koymaya çalışır. Bu savunma mekanizmaları;

İdrar:Bazı durumlarda idrar küçük bakteriyel inokulumlara karşı inhibitör hatta bakterisidal olabilir. İdrardaki en önemli inhibitör faktörler yüksek osmolalite, yüksek üre konsantrasyonu, yüksek organik asit içeriği ve düşük üriner pH'dır. Oligosakkaritler ve üromükoid (Tamm-Horsfall proteini) normal idrarda bulunur ve idrardaki bakterilerin agregasyonunu sağlayarak, bu bakterilerin mukozal yüzeylere yapışmasını inhibe edebilir. Yaşlılarda üriner enfeksiyon riskinin artması kısmen Tamm-Horsfall proteininin azalmış üriner ekskresyonuna bağlanabilir.

Belirli klinik durumlarda idrarın kimyasal kompozisyonundaki değişikliklerde idrarın bu koruyucu etkinliği azalabilir. Örneğin diabetli hastalarda idrardaki glukoz, E.coli ve C. Albicans gibi üropatojenlerin üremesini kolaylaştırır. Kadınlar, özellikle hamilelik süresince üriner enfeksiyon açısından, erkeklere göre daha uygun bir üriner pH'ya sahiptirler. İdrar pH'sı 5 civarında olduğunda, idrarda bulunan organik asitlerin antibakteriyel aktiviteye sahip anyonize forma çevrimi sonucu inhibitör etki ortaya çıkar (28).

Mesane: İdrarın antibakteriyel etkisine ilaveten mesanenin kendisinde mesaneye ulaşan bakterileri temizlemede bazı defans mekanizmalarına sahiptir. Mesanenin tam olarak boşalması üriner sistem

enfeksiyonlarına karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. İşemenin periodik yıkama etkisi enfeksiyon yapıcı mikroorganizmaları mesaneden elimine eder. Mesanenin boşalması kontamine idrarı uzaklaştırır ve üretelerden gelen taze idrarın ilavesiyle kalan az miktardaki idrar dilüe edilir. Postmiksiyonel rezidü idrar miktarı fazla ise, bakteriyel persistans (direnme) ve proliferasyon (çoğalma) kolaylaşır. Etkili işeme ile mesane boşalması bakteriyel adherense (yapışma) mekanik olarak engel olur (29).

Mesane mukozasını kaplayan yüzey müsini (glikozaminogikan, GAG) de bakteriyel adherense karşı önemli bir rol oynar. Glikozaminogikan'lar insan mesanesinin koruyucu tabakasıdır. Üroepitelyumun yüzeyinde yer alarak nonspesifik antiadherent etki gösterirler. Mesane yüzeyindeki özelleşmiş şemsiye hücreleriyle beraber impermeabilite bariyerini oluştururlar (30). Bir glikozaminogikan tekrarlayan disakkarit ünitelerinden yapılmış, dallı olmayan bir polisakkarittir.

En az 7 glikozaminogikan mevcuttur. Bunlar ;

1. Hyaluronik asit
2. Kondritin sülfat
3. Keratan sülfat 1
4. Keratan sülfat 2
5. Heparin
6. Heparan sülfat
7. Dermatan sülfat

Hyaluronik asit dışındaki tüm glikozaminogikanlar O-esterleri veya N-sülfat şeklinde sülfat gruplarını taşırlar. Hyaluronik asidin diğer GAG'larda olduğu gibi proteine bağlı olduğuna dair bir kanıt yoktur(31).

Glikozaminogikanları ve glycoproteinleri yıkıma uğratan enzim yetmezlikleri, mukopolisakkaridozlara ve mukolipidozlara neden olurlar (32).

Bakteriyel virulans faktörleri:

Her bakteri üriner sistemde enfeksiyon oluşturmaz. Üriner sistemde tutunabilen, üst üriner sisteme ulaşabilen ve normal konak şartlarında enfeksiyon oluşturabilen mikroorganizmalara, üropatojen mikroorganizmalar denir.

Mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturabilmesinin ilk basamağı üroepitelyal hücrelere yapışmalarıdır. Bu bakteriyel adherens muhtemelen en kritik virulans faktörüdür. Mikroorganizmalar bu işlemi yüzey adhezinleri ile, yani fimbrialar veya pililer vasıtasıyla

yapmaktadırlar. Bu adherens pilileri bakteriyel hücre yüzeyinde protein yapısında uzantılardır. Tipik olarak her hücrede 150-200 adet mevcuttur. Pililer elektron mikroskobu ile ve eritrositleri aglutine etme kabiliyetine göre ayrılırlar.

Fimbrialar mannoz sensitif ve mannoz rezistans olarak ayrılırlar. Tip 1 mannoz sensitif fimbriaların akut sistit ve katatere bağlı üriner enfeksiyonlarda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Mannoz rezistans fimbrialar ise P, X, S, G, M, ve IC adhezinleridir. Ayrıca nonfimbrial karakterde F adhezininde tanımlanmıştır.

Tip 1 fimbrialar sıklıkla vaginal introitus ve alt üriner sistemi kolonize eden bakterilerde bulunurken, pyelonefrit, bakteriyemi ve ürosepsisteki bakteriler daha sık olarak P ve X fimbrialara sahiptir.

Adherens, bakteriyel hücre yüzeyinde bulunan adhezinler ile üroepitelyal hücrelerin epitelyal reseptivitesi arasındaki karşılıklı etkileşimin bir sonucudur. Bakteriyel adhezinler epitelyal yüzeylerde bulunan glikoproteinlerdeki disakkarit parçacıklara tutunurlar.

Kapsüler K antijeni: Bakteriyi çevreleyen kapsüler polisakkaritlerin K antijenleri özellikle renal parankimde olmak üzere mikroorganizmaların opsonizasyon ve fagositozunu engeller.

Aerobaktin: İdrar gibi demir bulunmayan bir ortamda E.coli'nin üremesini kolaylaştıran bir transport sistemidir.

Hemolizin: Sitotoksik bir polipeptid'dir. Polimorfonükleer lökositler, monositler, fibroblastlar ve renal tübüler hücrelere toksik etkilidir.

Diğer bir bakteriyel virulans faktörü ise son yıllarda tanımlanmış olan **BIYOFİLM (SLİME)** oluşumudur. Belirli bakteriler mukozal yüzeylerde veya katater gibi yabancı cisimlerin yüzeylerinde bir biyofilm tabakası oluşturabilirler. Bu biyofilm tabakası bakteriyel exopolisakkarit ve konağın extrasellüler matrix proteinlerinden oluşur (33).

Biyofilm içinde üreyen (sesil) bakteriler antikorların etkisinden korunurlar. Aynı zamanda bu biyofilm tabakası antimikrobiyal ajanların difüzyonunda önler veya geciktirir. Bu durum genitoüriner protezler ve kalıcı kataterlerle birlikte görülen enfeksiyonların eradikasyonundaki zorlukları açıklar. Medikal alet kullanımında bakteriyel biyofilm oluşumu önemli problemlerden biridir.

Ürolojide bu medikal aletler ; kataterler, penil implantlar, üreteral veya prostatik stentler, inkontinans pedleri giderek artan bir sıklıkta kullanılmaktadır.

237 üreteral stentli hastada bakteriüri ve üreteral stent kolonizasyonunu değerlendirmek için yapılan bir çalışmada hastaların %29,9'unda bakteriüri varken, stentlerin %67,9'unda bakteriyel kolonizasyon saptandı (34).

Biyofilm formasyonu ard arda birkaç basamaktan oluşur:

1. Konağın koşullarına uygun biyofilm depozisyonu
2. Enfeksiyöz organizma retansiyonu
3. Organizmaların adhezyonu
4. Exopolimer ürünlerle yüzeye mikrobiyal yerleşim
5. Organizmaların büyüme, çoğalma ve yayılmaları

Biyofilm'in 3 esas bölümü vardır:

1. Doku yüzeyine veya materyallere yapışan birleşik film
2. Yoğun olarak organizma içeren taban film
3. Planktonik organizmaların diğer kısımlara yayıldığı dış taraftaki yüzey film

Etkili mikroskopik teknikler, yüzey film tabakasının mikrobiyal ürünlerin transportu için gerekli en önemli bölüm olduğunu ve bu bölümün antimikrobiyal ajanların biyomembran içine geçişini engelleyebileceğini göstermiştir (35).

Biyofilm oluşturan bakteriler antimikrobiyal ajanlara karşı en az 500 kez daha dirençli olduğundan, biyomembran içindeki hücreler fenotipik olarak planktonik karşılıklarından farklıdırlar (36).

1996 yılında yapılan bir çalışmada patojenik E.coli ve Enterococcus faecalis ve bunların metabolik ürünlerinin mesane hücreleri üzerine tahrip edici etkisi olduğu gösterilmiştir (37). Bu çalışma biyomembranların üriner sistemdeki zararlı potansiyel etkilerini göstermiştir. Bu nedenle biyomembranların bulunması ve eradikasyonu konusu hafife alınmamalıdır.

Bir çok çalışmada, medikal alet bulunan hastalarda gelişen biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların eradikasyonunda antimikrobiyal tedavinin etkisiz olduğu gösterilmiştir. Mevcut medikal aletin çıkarılması ile tedavi şansı artırılabilir (38).

Biyomembranları önlemek ve bunlardan korunmak için araştırılan ilginç yöntemlerden biride elektrik akımının (iontophoresis) kullanılmasıdır. Düşük konsantrasyonlardaki üropatojenlerin varlığında, 72 saat süresince insan idrarına elektrik akımı uygulanarak yapılan bir çalışmada (4 mA ile başlanır) bu akımın bakterileri inhibe ettiği gösterilmiştir (39). Ancak kolonizasyonun çok fazla olduğu durumlarda bu tedavi de başarılı olamaz.

Yapılan başka bir çalışmada ise *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyomembranları üzerine Tobramisin ile elektrik akımı kombinasyonunun etkili olduğu gösterilmiştir (40).

Seçilmiş Laktobasillerin, mikroorganizmaların katater ve petlere yapışmasını engellediği ve bu patojenlerin yüzeyden uzaklaştırılmasına neden olduğu bulunmuştur (41,42). Bunun sebebi araştırıldığında, Laktobasiller tarafından biyosurfaktanın üretildiği ve bununda üropatojenlerin yüzeye yapışmasını anlamlı derecede azalttığı görülmüştür. Bu da Laktobasillerin ürünleri ile birlikte medikal aletlere uygulanmasıyla enfeksiyonlardan korunmada ve tedavide etkili olduğu anlamına gelmektedir (43).

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus'lar Micrococcacea familyasının üyeleridirler. Bunlar gram pozitif, nonmotil, katalaz pozitif, aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Hücre duvarları peptidoglikan ve teikoik asit içerir.

Staphylococcus epidermidis'te koagülaz negatif ve mannitol fermantasyon testi negatiftir (44). Genel olarak Staphylococcus epidermidis düşük virulanslı bir organizmadır. Enfeksiyon genellikle cerrahi müdahale, katater uygulaması, protez insersiyonu veya immunsupresyon gibi durumlarda ortaya çıkar. Yoğun bakım ünitelerinde parenteral hiperalimentasyon uygulanan hastalarda santral kataterle ilişkili sepsislerde Staphylococcus epidermidis'in izole edildiği bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (45,46).

Koagülaz negatif Stafilokok'lar (KNS) insan deri ve mukoza florasında bulunan Gr (+) etkenlerdir. Bu nedenle kontaminant olarak değerlendirilen KNS'in gerçek patojen olarak önemleri son yıllarda giderek daha iyi anlaşılmaktadır (47). Bir Staphylococcus suşunun enfeksiyon oluşturabilmesi için çeşitli virulans faktörlerine sahip olması; enzim ve toksinleri içermesi gerekir.

Yapılan invivo ve invitro çalışmalarda KNS'ların bir kısmının **biyofilm** (slime) adı verilen visköz, ekstrasellüler bir madde oluşturdukları saptanmış ve bu biyofilm faktörünün plastik yüzeylere yapışmada rol oynadığı ve prostetik materyallerde kolonizasyona neden oldukları belirtilmiştir (48).

Yapılan bir çalışmada, klinikte yatan ve poliklinik hastalarından izole edilen KNS'larda biyofilm oluşumu ayrı ayrı çalışılmış ve 34

hospitalize hastanın 23'ünde, 66 poliklinik hastasının ise 14'ünde biyofilm pozitifliği saptanmıştır (49). Bu fark oldukça anlamlıdır.

Çeşitli enfeksiyonlardan izole edilen KNS'ların normal florada izole edilenden daha fazla oranda biyofilm oluşturmaları, biyofilm yapımının diğer faktörlerle birlikte patojenite kriteri olduğunu göstermektedir. Bu biyofilm faktör KNS'ları fagositoz ve degranülasyondan korur, kemotaksis ve opsonositofajiyi önler, nötrofil etkisini inhibe eder, lenfosit aktivitesini azaltır ve bu etkileri ile bakteriyel virulans kazandırır (50,51).

Koagülaz negatif Stafilokok'lar (KNS) tarafından üretilen ve hücre dışına salınan biyofilmin varlığını gösterebilmek için, çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan en sık kullanılanlar; Standart tüp yöntemi ve Congo red agar yöntemidir. Ayrıca elektron mikroskobu ile hücre dışına salınan biyofilmin varlığını göstermek, son yıllarda kullanılmaya başlanan yeni bir yöntemdir.

Standart tüp yönteminde, tüp duvarında kırmızı-pembe renkte boyanmanın varlığı biyofilm pozitif olarak değerlendirilir. Congo red agar yönteminde ise biyofilm varlığı, besiyerinde koloniler etrafında siyah renkte pigmentin görülmesi ile tanınır.

Ortamda bulunan biyofilm miktarı, makro tüp ve mikrometod yöntemleri ile belirlenebilir. Makro tüp yönteminde biyofilm miktarı +, ++, +++ şeklinde kalitatif olarak ifade edilirken, mikrometod yönteminde ise spektrofotometrik olarak ölçülen değerler ile biyofilm oluşumunu kantitatif olarak saptama olanağı vardır.

MATERYAL VE METOD



MATERYAL VE METOD

a. Bakteri suşları: Çalışmada Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi mikrobiyoloji rutin laboratuvarına gönderilen idrarlardan izole edilen ve Sceptor sistemle (API, Lot ch-B 1000601304 Becton Dickinson Europe, Cedex, France) Staphylococcus epidermidis olarak tanımlanan suşların biyofilm üretimleri hem Congo red agar metodu, hem de standart tüp yöntemleri ile belirlendi. Mevcut biyofilm miktarının tespiti ise mikrometod ile yapıldı.

Staphylococcus epidermidis suşları içerisinde 10'u güçlü biyofilm pozitif, 10'u da zayıf biyofilm pozitif gruplar olmak üzere 2 çalışma grubuna ayrıldı.

b. Biyofilm Faktörünün araştırılması:

- 1. Standart tüp yöntemi:** 1000 ml. saf su içinde 37 gr. Triptik Soy Buyyon (TSB) eritilerek hazırlanan Christensen besiyerinin pH'sı 7,3'e ayarlandı. Serolojik tüplere 5'er ml. olarak dağıtıldı ve 121 derecede 15 dakika sterilize edildi. Çalışmaya alınan suşlar Christensen besiyerine ekildi ve 24 saat etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpler boşaltıldı ve her tüpe 1 cc. 0,25'lik Safranin kondu. Tüpler 5 dakika kadar bu boyayla işleme tabi tutuldu. Bu sürenin sonunda tüplerdeki boya döküldü. Tüp duvarında kırmızı-pembe renkte film tabakasının varlığı, biyofilm pozitif olarak değerlendirildi. Tüp duvarında herhangi bir film tabakası şeklinde görünüm oluşmamışsa veya tüpte yalnızca hava-sıvı seviyesinin olduğu yerde halka şeklinde bir boya tutulumu olmuş ise sonuç negatif olarak değerlendirildi.
- 2. Congo red agar:** Bu amaçla Congo red agar besiyeri kullanıldı. Bu besiyerine ekilen Staphylococcus epidermidis suşları 18-24 saat 37 derecede etüvde enkübe edildi. Bu süre sonunda kolonilerin oluşturdukları siyah pigment miktarına göre suşların biyofilm üretim kapasiteleri belirlendi (Resim 1, Resim 2).
Congo red agar besiyerinin bileşimi:
 - Brain heart infusion agar
 - Sucrose
 - Congo red boyası



RESİM 1



RESİM 2

Resim 1’de daha yoğun olarak siyah renge boyanan alandaki suşlar kuvvetli biyofilm pozitif olarak değerlendirilirken, aynı pedri kutusunda daha zayıf biyofilm oluşturan suşlarda izlenmekte.

Resim 2’de ise daha zayıf biyofilm oluşturan suşlar görülüyor.

Mikrometod yöntemi ile Oxybutynin’in biyofilm üretimi üzerine etkisinin ölçülmesi : Bunun için 96 kuyucuklu polystyren steril mikroplate’ler kullanıldı. Bu kuyucuklara 5 değişik konsantrasyonda hazırlanmış olan Oxybutynin ile TSB (Triptik Soy Buyyon)’ da 10^5 CFU/ml. oranında sulandırılmış bakteri süspansiyonu eşit miktarlarda (0,2 ml.) bırakıldı.

Çalışmaya 20 tane değişik, biyofilm oluşturan Staphylococcus epidermidis suşu alındı. Bunlardan 10’u güçlü biyofilm oluşturan grup, 10’u ise daha zayıf biyofilm oluşturan gruptu. Hem güçlü, hem de zayıf biyofilm oluşturan suşlarda çalışma şu şekilde şematize edildi (Tablo 2);

Tablo 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Y
B	B+x	B+x	B+x	B+x	B+x	B+x	B+x	B+x	B+x	B+x	B+Y
C	C+x	C+x	C+x	C+x	C+x	C+x	C+x	C+x	C+x	C+x	C+Y
D	D+x	D+x	D+x	D+x	D+x	D+x	D+x	D+x	D+x	D+x	D+Y
E	E+x	E+x	E+x	E+x	E+x	E+x	E+x	E+x	E+x	E+x	E+Y
F	F+x	F+x	F+x	F+x	F+x	F+x	F+x	F+x	F+x	F+x	F+Y

A satırı; İlk 10 sütunda Biyofilm oluşturan 10 Staphylococcus epidermidis suşu –ki bunlar grafikte X olarak belirtildi-. 11.sütun ise kontrol grubu olarak alındı(Y). Kontrol grubunda amaç 5 değişik konsantrasyonda hazırladığımız oxybutynin solüsyonlarındaki ve/veya sıvı besiyerindeki (TSB) olası kontaminasyonu saptamaktır.

X; Biyofilm oluşturan Staphylococcus epidermidis suşları

Y;Bakteri içermeyen steril Triptik Soy Buyyon (TSB) solüsyonu

OXYBUTYNİN KONSANTRASYONLARI ;

	<u>mg/ml</u>	<u>Molarite</u>
B	5 mg/ml	$1,27 \cdot 10^{-2}$ M
C	1,667 mg/ml	$4,23 \cdot 10^{-3}$ M
D	0,5 mg/ml	$1,27 \cdot 10^{-3}$ M

	<u>mg/ml</u>	<u>Molarite</u>
E	0,167 mg/ml.	$4,23 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
F	0,05 mg/ml.	$1,27 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Oxybutynin'in bu değişik konsantrasyonları %0,9 İzotonik NaCl içinde ve steril olarak hazırlandı. Sterilizasyon Benmari aleti ile 3 gün arka arkaya solüsyonların 60°C 'de 30 dakika enkübasyonu ile sağlandı. Kontrol grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur;

B+Y; B konsantrasyonundaki Oxybutynin ile steril TSB
C+Y; C konsantrasyonundaki Oxybutynin ile steril TSB
D+Y; D konsantrasyonundaki Oxybutynin ile steril TSB
E+Y; E konsantrasyonundaki Oxybutynin ile steril TSB
F+Y; F konsantrasyonundaki Oxybutynin ile steril TSB

Mikroplate'lere eşit miktarlarda konan bakteri + Oxybutynin süspansiyonları ve TSB +Oxybutynin süspansiyonları üç ayrı enkübasyon zamanında (6, 12, 24 saat) 37°C derecede enkübe edildiler. Enkübasyon süresinin sonunda her mikroplate Fosfat buffer tuzu ile (pH :7,2) iki kez yıkandı. Daha sonra oda ısısında 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda mikroplate'ler aspire edilerek, ters çevrilip kurutma kağıtları üzerinde bekletildi. Bu işlemden sonra 450 nm mikro-elisa reader aletinde optikal dansiteler ortamdaki biyofilm miktarını kantitatif olarak saptamak amacıyla ölçüldü.

Oxybutynin'in bakterisidal etkisinin ölçülmesi ;

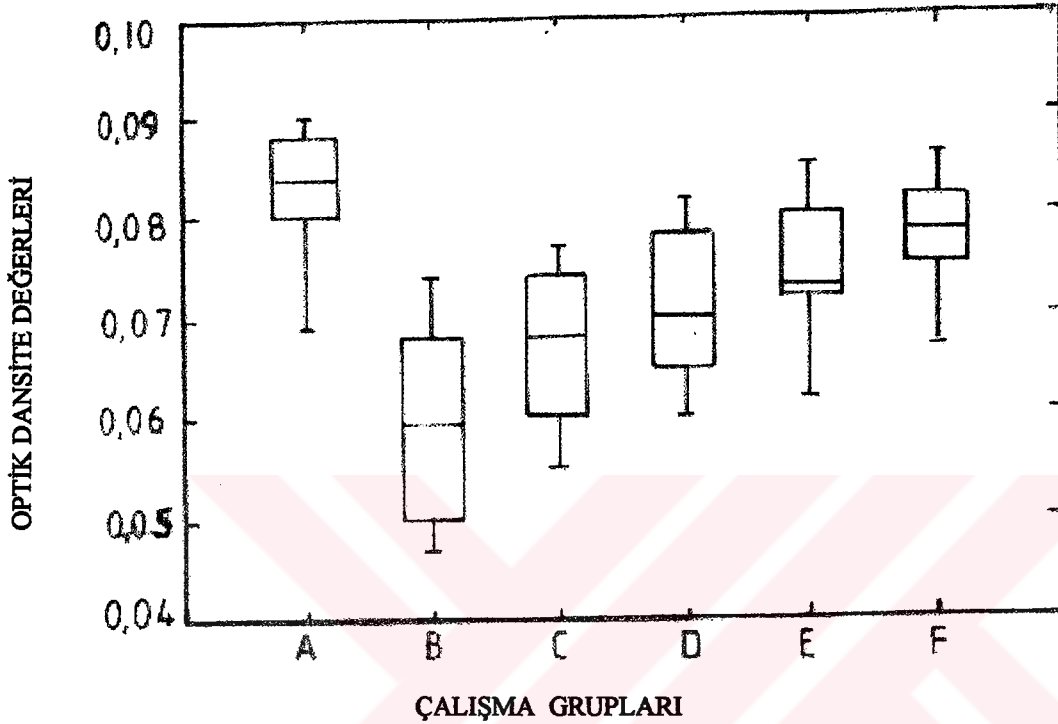
Oxybutynin 5 ayrı konsantrasyonda Staphylococcus epidermidis'in üremesi üzerine etkisi spektrofotometrik metodla ölçüldü. Her kuyucuğa 30 mikrolitre Staphylococcus epidermidis solüsyonu, 50 mikrolitre TSB solüsyonu ve değişik konsantrasyonlardaki Oxybutynin solüsyonundan 10 mikrolitre bırakıldı. Kontrol kuyucuğuna ise 30 mikrolitre Staphylococcus epidermidis ve 50 mikrolitre TSB solüsyonundan kondu.24 saatlik enkübasyondan sonra bütün kuyucuklardaki optik dansite değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Oxybutynin'in tüm konsantrasyonlarındaki optik dansite değerleri ile kontrol kuyucuklarından elde edilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

BULGULAR



Grafik 1 ; Güçlü biyofilm oluşturan Staf. epidermidis suşlarında 6. saat optik dansite ölçüm sonuçları



A; Ortamda Oxybutynin bulunmayan ve biyofilm oluşturan Staf. Epidermidis suşları grubu

B; Ortamda 5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

C; Ortamda 1,667 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

D; Ortamda 0,5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

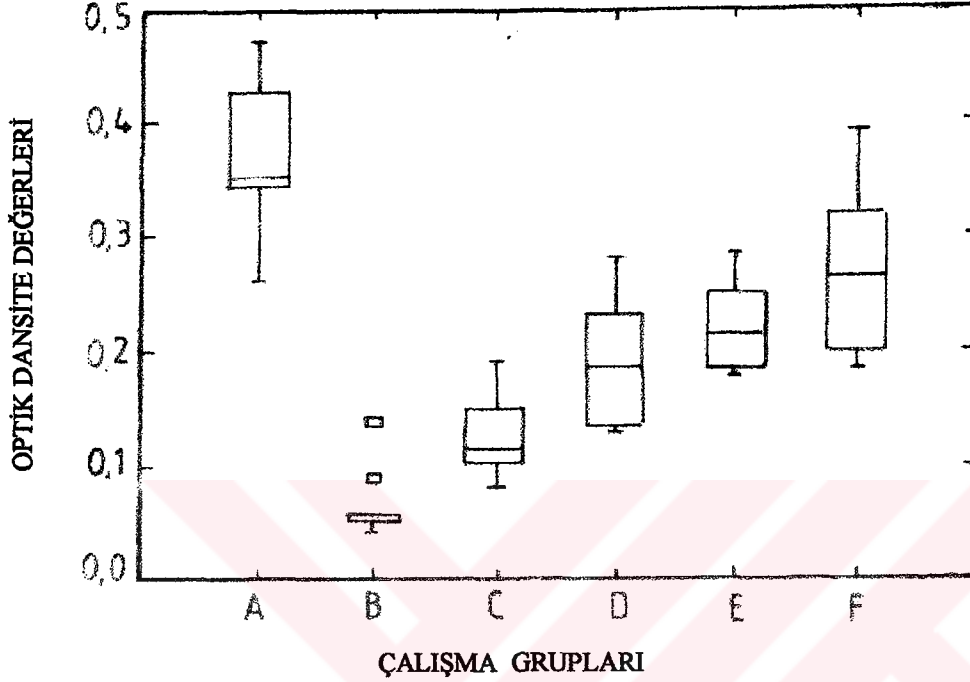
E; Ortamda 0,167 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

F; Ortamda 0,05 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

Bakteriler tarafından salınan ve bir eksopolisakkarit olan biyofilm miktarı ortamda arttıkça, spektrofotometrik olarak okunan optikal dansite değerleri yükselir.

Grafik 1'de Oxybutynin bulunmayan A grubundaki optikal dansite ölçüm değerlerinin diğer tüm gruplardan yüksek olduğu görülmektedir. 5 mg/ml Oxybutynin içeren B grubundaki optikal dansite ölçümleri ile E(0,167mg/ml) ve F (0,05 mg/ml) gruplarındaki optikal dansite ölçümleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Grafik 2 ; Güçlü biyofilm oluşturan Staf. epidermidis suşlarında 12. saat optik dansite ölçüm sonuçları



A; Ortamda Oxybutynin bulunmayan ve biyofilm oluşturan Staf. Epidermidis suşları grubu

B; Ortamda 5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

C; Ortamda 1,667 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

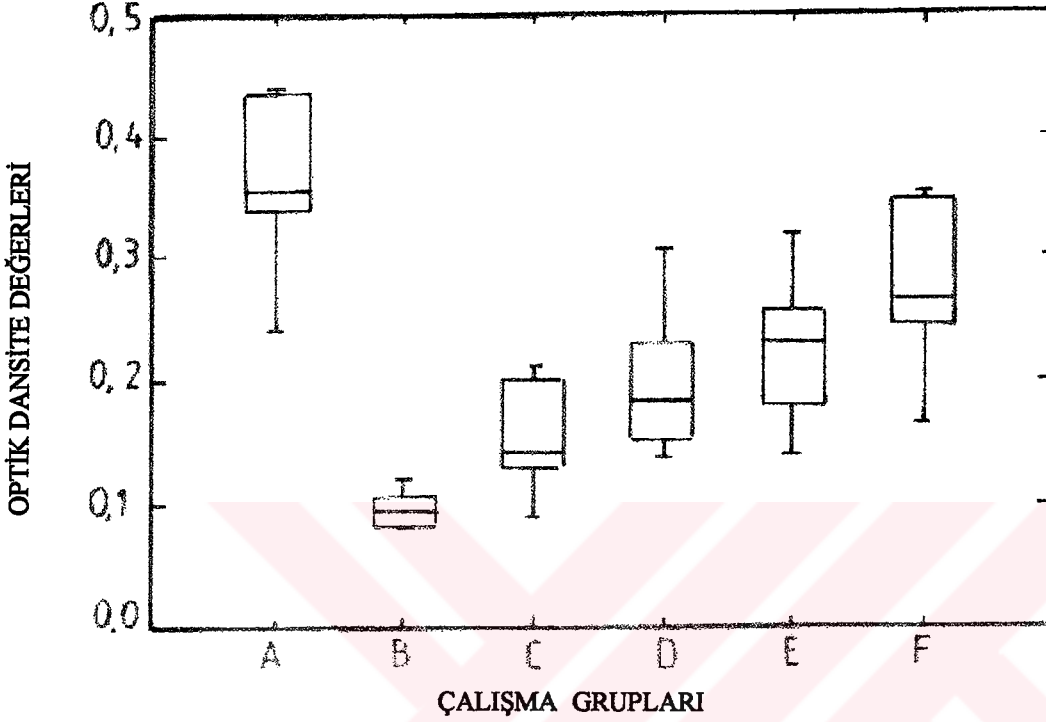
D; Ortamda 0,5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

E; Ortamda 0,167 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

F; Ortamda 0,05 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

Grafik 2'de ; Oxybutynin bulunmayan A grubundaki optikal dansite ölçüm değerlerinin diğer tüm gruplardan yüksek olduğu görülmektedir. En yüksek Oxybutynin konsantrasyonu içeren B grubundaki (5mg/ml) optikal dansite ölçüm değerlerinin, D (0,5mg/ml), E (0,167mg/ml), F (0,05mg/ml) konsantrasyonlarındaki optik dansite ölçüm değerlerine göre farkı istatistiksel olarak anlamlıdır. ($p < 0,01$). C grubunun , B grubundan farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, E ve F gruplarına göre farkı anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,01$)

Grafik 3 ; Güçlü biyofilm oluşturan Staf. epidermidis suşlarında 24. saat optik dansite ölçüm sonuçları



A; Ortamda Oxybutynin bulunmayan ve biyofilm oluşturan Staf. Epidermidis suşları grubu

B; Ortamda 5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

C; Ortamda 1,667 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

D; Ortamda 0,5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

E; Ortamda 0,167 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

F; Ortamda 0,05 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

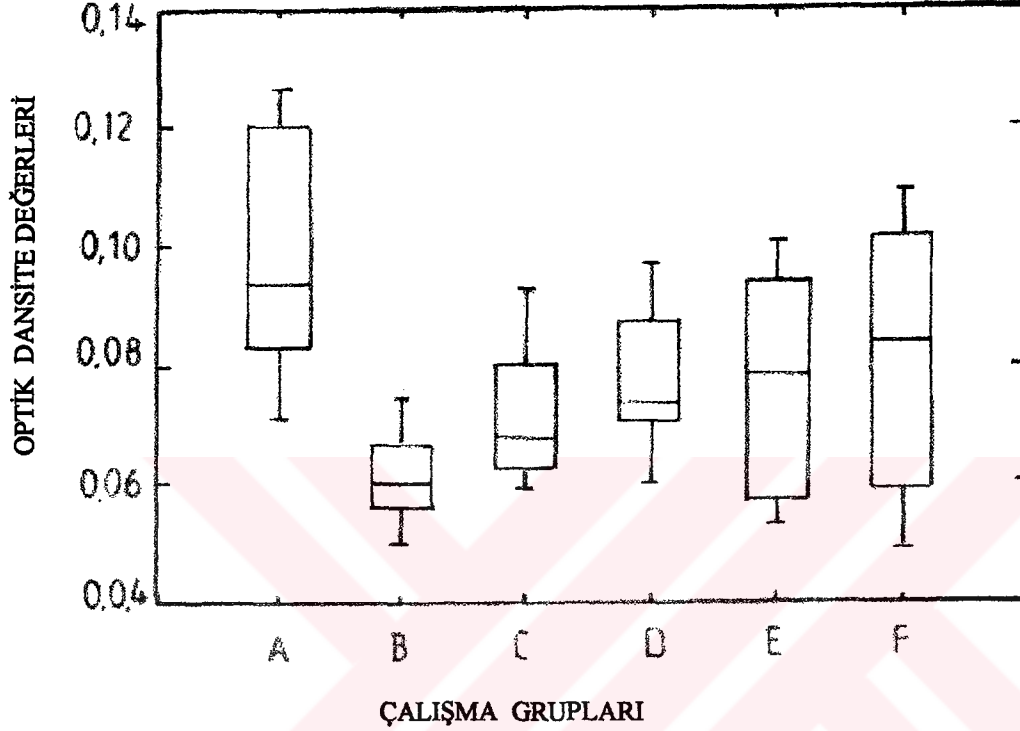
Grafik 3 'te Oxybutynin bulunmayan A grubundaki optikal dansite ölçüm değerlerinin diğer tüm gruplardan yüksek olduğu görülmektedir. B grubundaki optikal dansite ölçüm değerlerinin C grubu hariç diğer gruplara göre oldukça düşük olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. ($p < 0,01$)

Güçlü biyofilm oluşturan Staf. epidermidis suşlarının 6. , 12. ve 24. saatler sonunda yapılan optikal dansite ölçüm sonuçlarına göre genel olarak şu sonuçlar elde edilmiştir;

1. Oxybutynin konsantrasyonu azaldıkça optikal dansite değerleri yükselmektedir.
2. Sadece bakteri suşlarının bulunduğu, Oxybutynin içermeyen A grubunda 6., 12. ve 24. saatlerde optikal dansite ölçüm değerleri Oxybutynin içeren diğer bütün gruplardan yüksek bulunmuştur.
3. B grubu (5mg/ml), en yüksek Oxybutynin konsantrasyonunu içeren gruptur. Bu konsantrasyon optikal dansite ölçüm değerlerini düşürmede en etkin konsantrasyon olarak görünmekte ve etkisi 6.saatte başlamaktadır. Maksimum etki 12. saatte gözlenmiş ve bu etki 24. saate kadar belirgin bir azalma göstermeksizin devam etmiştir.



Grafik 4 ; Zayıf biyofilm oluşturan Staf. epidermidis suşlarında 6. saat optik dansite ölçüm sonuçları



A; Ortamda Oxybutynin bulunmayan ve biyofilm oluşturan Staf. Epidermidis suşları grubu

B; Ortamda 5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

C; Ortamda 1,667 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

D; Ortamda 0,5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

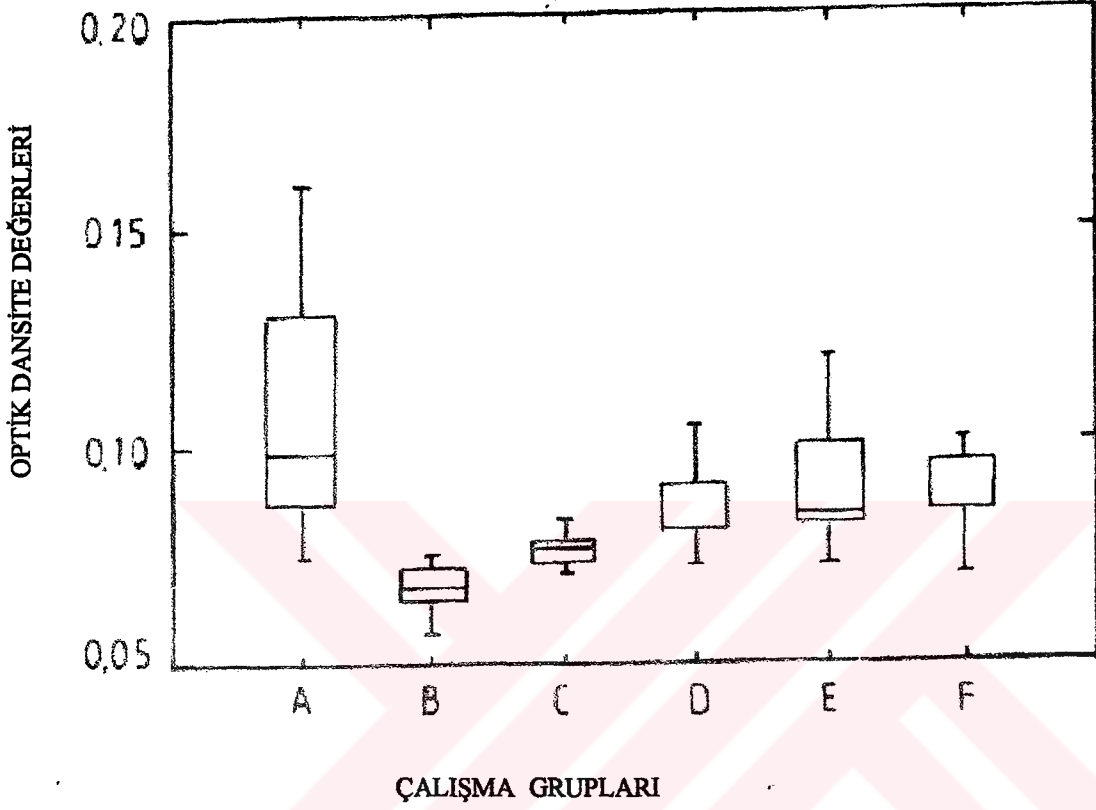
E; Ortamda 0,167 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

F; Ortamda 0,05 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

Grafik 4'te Oxybutynin bulunmayan A grubunun 6. saatteki optik dansite değerleri B (5mg/ml), C (1,667 mg/ml) ve D (0,5mg/ml) gruplarının optik dansite değerlerine göre farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

Oxybutynin içeren B, C, D, E ve F grupları arasında 6. saatte optik dansite değerleri açısından fark anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Grafik 5 ; Zayıf biyofilm oluşturan Staf. epidermidis suşlarında 12. saat optik dansite ölçüm sonuçları



A; Ortamda Oxybutynin bulunmayan ve biyofilm oluşturan Staf. Epidermidis suşları grubu

B; Ortamda 5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

C; Ortamda 1,667 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

D; Ortamda 0,5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

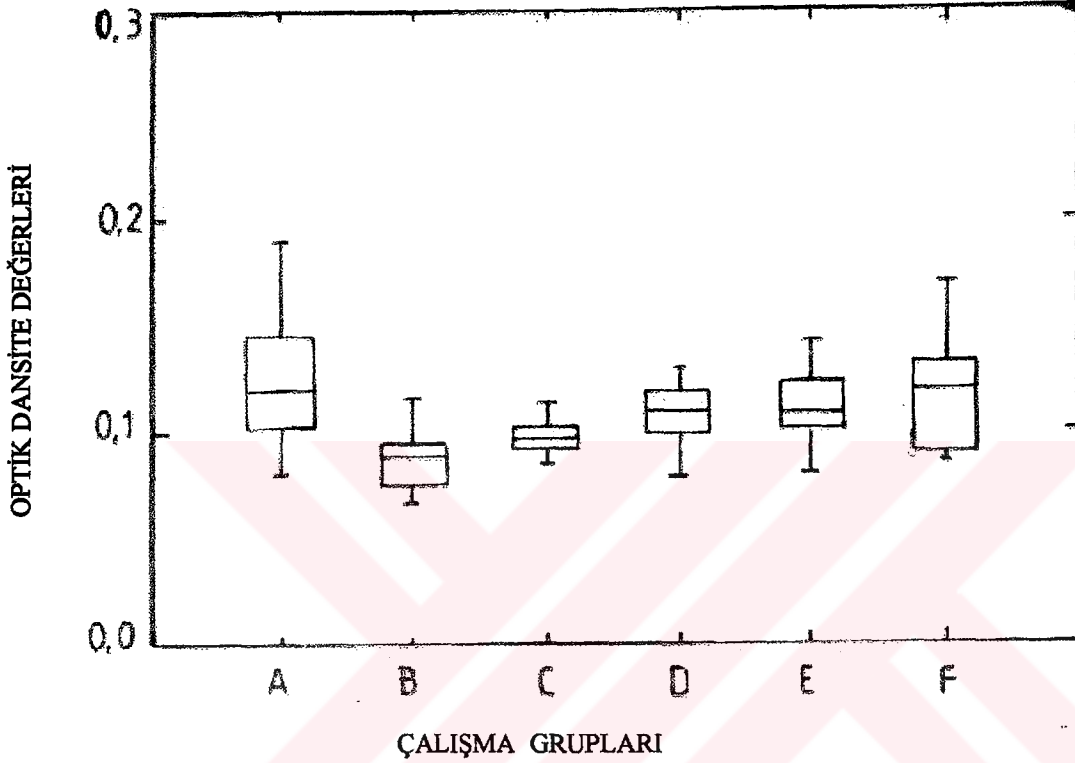
E; Ortamda 0,167 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

F; Ortamda 0,05 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

Oxybutynin içermeyen A grubundaki optik dansite değerleri, Oxybutynin içeren B, C, D gruplarının optik dansite değerleri ile karşılaştırıldığında bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

B grubunun optik dansite değerleri, E ve F gruplarının optik dansite değerleri ile karşılaştırıldığında bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

Grafik 6 ; Zayıf biyofilm oluşturan Staf. epidermidis suşlarında 24. saat optik dansite ölçüm sonuçları



A; Ortamda Oxybutynin bulunmayan ve biyofilm oluşturan Staf. Epidermidis suşları grubu

B; Ortamda 5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

C; Ortamda 1,667 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

D; Ortamda 0,5 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

E; Ortamda 0,167 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

F; Ortamda 0,05 mg/ml Oxybutynin'in bulunduğu grup

Oxybutynin içeren B ve C gruplarının optik dansite değerleri ile Oxybutynin içermeyen A grubundaki optik dansite değerleri, karşılaştırıldığında bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). B grubunun optik dansite değerleri ile C, D, E gruplarının optik dansite değerleri karşılaştırıldığında bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ancak B grubu ile F grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

Zayıf biyofilm oluşturan Staf. epidermidis suşlarının 6. , 12. ve 24. saatler sonunda yapılan optikal dansite ölçüm sonuçlarına göre genel olarak şu sonuçlar elde edilmiştir;

1. Oxybutynin konsantrasyonu azaldıkça optik dansite yükselmektedir. Ancak bu yükselme hızı güçlü biyofilm oluşturan suşlara oranla daha düşüktür.
2. Oxybutynin içermeyen A grubunda 6., 12. ve 24. saatlerde optikal dansite ölçüm değerleri, Oxybutynin içeren diğer bütün gruplardan yüksek bulunmuştur.
3. En yüksek Oxybutynin içeren B grubu, güçlü biyofilm oluşturan grupta olduğu gibi, optikal dansiteyi düşürme açısından yine en etkin grup olarak görülmüştür. Ancak bu etkisi güçlü biyofilm oluşturan grupta olduğu kadar belirgin değildir.
4. Genel olarak, zayıf biyofilm oluşturan grupta değişik konsantrasyonlardaki Oxybutynin'in biyofilm üzerine etkisi, güçlü biyofilm oluşturan gruba göre daha azdır.

TARTIŞMA



Mikrobiyal biyofilm, mikroorganizmaları immobilize halde bir arada tutulmasını sağlayan ve yüzeylerini solit bir yapıymış gibi kaplayan mikrobiyal orijinli, organik polimer bir matrix yapısıdır. Biyofilmlerin varlığı 2 majör problemi de beraberinde getirir ;

1. Medikal alet kullanımına bağlı gelişen enfeksiyonlar.

2. Spinal kord yaralanması olan hastalarda sıkça görüldüğü gibi, enfeksiyonun eradikasyonuna ve komplikasyonların gelişmesine majör bir bariyer oluşturması.

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar bakteriyel biyofilmler konusundaki bilgilerimizi arttırmakla birlikte ne yazık ki, bakteriyel biyofilmlerin üriner sistem enfeksiyonları üzerindeki etkilerini belirleyen çalışmalar pek azdır.

Biyofilm konseptinin gelişmesi üriner sistem enfeksiyonlarının saptanması, önlenmesi ve tedavisi konusundaki yaklaşımların yeniden gözden geçirilmesine neden olabilecek düzeyde önem taşıdığı düşüncesindeyiz.

Bakteriyel biyofilmler mikroorganizmaların medikal gereçlere yapışması ve antimikrobiyal ajanlara karşı direnç göstermesinde rol aldığı gibi, bakterilerin doku yüzeyine yapışması ve invaziv enfeksiyon oluşturmasında da rol almaktadır.

Biyofilm varlığı makro tüp yöntemi ve spektrofotometrik mikro yöntemle gösterilebilir. Mikro yöntem makro tüp yöntemiyle kıyaslandığında, mikro yöntem değerlendirme açısından daha üstündür. Çünkü tüp yöntemiyle biyofilm oluşumunu +, ++, +++ gibi göreceli olarak değerlendirmek mümkün ise de özellikle zayıf pozitif olan suşların değerlendirilmesi tamamen testi yapanların yaklaşımına bağlı kalitatif bir değerlendirme olmaktadır.

Buna karşın spektrofotometrik-mikro yöntemde zayıf pozitifliğin objektif olarak değerlendirilmesi mümkündür. Bu nedenle çalışmamızda biyofilm varlığı mikro yöntem ile gösterilmeye çalışıldı.

Bu çalışmamızda mikroorganizma olarak Staphylococcus epidermidis seçilmesinin temel nedeni, Staphylococcus epidermidis'in medikal gereç kullanımı ile ilişkili enfeksiyonlarda önemli rol oynaması ve Staphylococcus epidermidis'in biyofilm yapısı üzerindeki bilgilerin diğer mikroorganizmalara oranla literatürde daha fazla oranda dökümente edilmesinden kaynaklandı.

Bu çalışmamızda spinal yaralanma ve diğer nedenlere bağlı olmak üzere gelişen nörojenik mesaneli hastaların tedavisinde birlikte kullanılan temiz aralıklı kataterizasyon (TAK) ve intravezikal Oxybutynin

kullanımında klinik bilgilerimize ve daha önce yayınlanmış, klinik ve deneysel çalışmalara ışık tutmak amacıyla Oxybutynin'in bakteriyel biyofilm etkileşimini ortaya koymaya çalıştık.

Landau ve Bonney (26,27) yaptıkları deneysel çalışmalarda intermittan mesane kataterizasyon ve intrakaviter Oxybutynin uygulamalarına bağlı olmak üzere deney gruplarında üriner enfeksiyon eğiliminin artmadığını vurgulamışlardır. Bunun da ötesinde Bonney yüksek Oxybutynin konsantrasyonlarında Oxybutynin'in histolojik olarak kataterizasyon ve enfeksiyonun istenmeyen etkilerinden koruyucu bir özellik taşıdığını saptamıştır. Bu ilginç bulgu Oxybutynin'nin üriner enfeksiyonları engellemede nörojen mesaneli hastalarda mesane fonksiyonlarının düzenlenmesinin de ötesinde üriner enfeksiyonlara karşı koruyucu etkisi olduğunu akla getirmektedir.

Teichman ve arkadaşları bir quartener amin olan protamin sülfatın biyofilmin yüzey proteoglikanları üzerine direkt yıkıcı etki yaparak bakteriyel viabiliteyi olumsuz etkilediğini ve bakterisidal etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Otör bu çalışmasında protamin sülfatın bir quartener amin olduğunu ve sülfatlı polisakkarit yapılarına karşı biyokimyasal affinitesi nedeniyle protaminin polisakkarit yapısındaki Staphylococcus epidermidis'in biyofilm yapısını bozduğu ve buna bağlı olarak da viabilitesini azalttığını hipotize etmiştir (53).

Bu verilerden yola çıkarak tersier amin yapısındaki Oxybutynin'in polisakkarit yapısındaki bakteriyel biyofilmlerle olumsuz yönde etkileşebileceğini ve bakterisidal seviyeye varabilen etkisinin olabileceğini hipotize ettik. Yaptığımız pilot çalışmada, biyofilm oluşumunu değerlendirdiğimiz 5 ayrı Oxybutynin konsantrasyonunun Staphylococcus epidermidis'in üremesi üzerine olan etkisi öncelikle değerlendirildi. Spektrofotometrik olarak Oxybutynin'in hiçbir konsantrasyonunun bakteriyel üremeyi engellemediğini gördük.

Bonney ilginç olarak çalışmasında üriner sistem enfeksiyonunu kontrol grubu ve intravezikal Oxybutynin uygulanan gruplarda eşit oranda görüldüğünü bildirmesine karşın, yüksek konsantrasyonlarda intravezikal Oxybutynin uygulanan grupta mukozal ülserasyonların daha az görüldüğünü rapor etmiştir (26). Bu verilerden yola çıkarak tersier amin yapısındaki Oxybutynin'nin, ya polisakkarit biyofilm yapısını biyokimyasal yönden bozarak ya da bakteriyel biyofilm yapımını engelleyerek invaziv mesane enfeksiyonlarını engelleyebileceğini düşündük.

Çalışmamızda yüksek konsantrasyonlardaki Oxybutynin’li ortamda bakteriyel biyofilm oranının spektrofotometrik ölçümleri sonucunda kontrol grubuna ve düşük konsantrasyonlardaki Oxybutynin gruplarına oranla anlamlı düzeyde düşük bulduk.

Bu durum Oxybutynin HCl’in biyofilm yapısını tahrip ettiği ya da bakteriyel biyofilm yapısını engellediği şeklinde yorumlanabilir.

Ne şekilde olursa olsun bu durum biyofilmden yoksun bakterilerin mukozaya yapışma, invaziv enfeksiyon oluşturma ve antimikrobiyal tedaviye direnci azaltmasına yol açar.

Biyofilm ilişkili enfeksiyonlarda antimikrobiyal tedavi çoğu kez etkili değildir. Yine çoğu kez bu enfeksiyonların eradikasyonu için tıbbi gerecin (katater, v.s.) çıkartılması gerekmektedir. Çünkü biyofilmler bakteri için stres yaratan olumsuz çevre koşullarında (örn.; memeli doku defans mekanizması olan Fe^{++} den yoksun ortam yaratılması, ya da ortamda antimikrobiyal ajan bulunması, gibi koşullarda) bakterinin hayatta kalmasını sağlar (54,55).

Son yıllarda bakteriyel biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde biyofilmlerin eradikasyonu antibakteriyel tedavinin ayrılmaz bir parçası olabileceğini gösteren çalışmalar vardır.

Jass elektrik akımı (iontophoresis) ile *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının biyofilm bağlarını kırarak Tobramisin’e yanıtın arttığını göstermiştir (40).

Hayvan çalışmalarından biliyoruz ki intravezikal Oxybutynin uygulanımı üriner trakt enfeksiyonlarını arttırmamaktadır. Hatta yüksek konsantrasyonlarda enfeksiyona bağlı lokal doku harabiyetini azalttığını biliyoruz. Çalışmamızda gösterdiğimiz Oxybutynin’in *Staphylococcus epidermidis*’deki exopolisakkarit yapısındaki biyofilm üretimini azaltması bu gözlemlerin açıklaması olabilir. Unutulmamalıdır ki invitro çalışmaların sonuçları direkt olarak invivo şartlara yansıtılmamalıdır. Bununla birlikte amin yapısı nedeniyle intravezikal uygulanan Oxybutynin HCl’inin mesane yüzey mukozasını döşeyen yine polisakkarit yapısındaki glikozaminoglikan (GAG) tabakası ile de etkileşime girebileceği ve bakteriyel biyofilm oluşumunu engelleyerek gösterdiği pozitif etkisini, olumsuz bir şekilde glikozaminoglikan (GAG) tabakasında oluşturacağı hasarla dengeleyebileceği bir olasılıktır.

Amark ve arkadaşları (21) tarafından yapılan nörojenik mesaneli çocuklarda intravezikal Oxybutynin tedavisinin uzun dönem takip sonuçlarını bildiren çalışmada asemptomatik bakteriüri ve alt üriner sistem enfeksiyonunda artış bildirilmesine karşın klinik uygulamalarda

Oxybutynin HCl'nin üriner trakt enfeksiyonlarını arttırdığına yönelik taradığımız literatürlerde bunun dışında bir bilgiye rastlayamadık (56,57,58,59,60).

Sonuç olarak; intravezikal Oxybutynin uygulanımı nörojenik mesane disfonksiyonlarını düzeltmekle kalmayıp, direkt olarak bakterisidal bir etki göstermemekle birlikte, bakteriyel biyofilm yapısını azaltarak, biyofilm ilişkili enfeksiyonların sıklığını ve/veya komplikasyonlarını azaltabilir.



REFERANSLAR

1. Kırkalı,Z., Whitaker, R.H.: The use of Oxybutynin in urological practice. *International Urology and nephrology* 19 (4), pp. 385-391, 1987.
2. Fredericks, C.M., Green, R.L., Anderson, G.F.: Comparative invitro effects of imipramine, Oxybutynin, and flavoxate on rabbit detrusor. *Urology* 12,487, 1978.
3. Diokno, A.J., Lapidés, J.: Oxybutynin: A new drug with analgesic and anticholinergic properties. *J Urology* 108,307, 1972.
4. Lindeke ,B., Hallström,G., Johansson, C., Ericsson, K., Olsson, L.I., Strömberg, S.: Metabolism of Oxybutynin: establishment of desethyl-oxybutynin and Oxybutynin N-oxide formation in rat liver preparations using deuterium substitution and gas chromatographic mass spectrometric analysis. *Biomed. Mass . Spec. , 8 : 506, 1981.*
5. Aaltonen, L. , Allonen, H., Iisalo, E., Juhakoski, A., Kleimola, T., Sellman, R.: Antimuscarinic activity of Oxybutynin in the human plasma quantitated by a radioreceptor assay. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 55:100, 1984.
6. Wein, A.J., Hanno, P.M., Raezer, D.M., Benson, G.S.: Effect of Oxybutynin chloride on bladder spasm following transurethral surgery. *Urology*, 12, 184, 1978.
7. Paulson, D.F.: Oxybutynin chloride in control of post-transurethral vesical pain and spasm. *Urology*, 11, 237, 1978.
8. Thompson, I.M., Lauvetz, R.: Oxybutynin in bladder spasm ,neurogenic bladder and enuresis. *Urology*, 8, 452, 1976.
9. Buttarazzi, P.J.: Oxybutynin chloride (Ditropan) in enuresis. *J Urol*, 118, 46, 1977.
10. Brooks, M.E., Braf, Z.F.: Oxybutynin chloride (Ditropan)-clinical uses and limitations. *Paraplegia*, 18, 64, 1980.
11. Awad, S.A., Gajewski, J.B.: Ditropan versus Probanthine in multiple sclerosis patients with detrusor hyperreflexia. Abstract of the 8th Annual Meeting of the AUA. No. 249, p. 176.
12. Holmes, D.M., Stone, A.R., Barry, P.R., Richards, C.J., Stephenson, T.P. : Bladder training: 3 years on. *Br. J Urol* , 55, 660, 1983.
13. Moisey, C.U. , Stephenson, T.P., Brendler, C.B.: The urodynamic and subjective results of treatment of detrusor instability with Oxybutynin chloride. *Br J Urol* 52, 472, 1980.
14. Riva, D., Casolti, E.: Oxybutynin chloride in the treatment of female idiopathic bladder instability. Results from double blind treatment. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, 11, 37, 1984.
15. Stephen, A. , Koff, S. A. ; Enuresis. *Campbell's Urology*. Walsh, P., Retik, B.A., Vaughan, E.D., Wein, J.A. 7. Baskı,s:2055-2068 cilt:2.
16. Kasabian, N.G., Bauer, S.B., Dyro, F.M., Colodny, A.H. , Mandell, J., Retik, A.B.: The prophylactic value of clean intermittent catheterization and anticholinergic medication in newborns and infants with myelodys-plasia at risk of developing urinary tract deterioration. *Am J Dis Child* 146:840-843, 1992.

17. Baskin, L.S., Kogan, B.A., Bernard, F.: Treatment of infants with neurogenic bladder dysfunction using anticholinergic drugs and intermittent catheteriation. *Br J Urol* 66:532-534, 1990.
18. Naglo, A.S., Nergardh, A., Boreus, L.: Influence of atropine and isoprenaline on detrusor hyperactivity in children with neurogenic bladder . *Scand J Urol Nephrol* 15:97-102, 1981.
19. Naglo, A.S.: Continence training of children with neurogenic bladders and hyperactivity of the detrusor: Effect of atropine. *Scand J Urol Nephrol* 16:211-217, 1982.
20. Plant, N.D. , Taylor, C.M.: The use of Oxybutynin in children with spina bifida. *Rew Contemp Pharmacother* 5:209-215, 1994.
21. Amark, P., Bussman, G., Eksborg, S.: Follow-up of long-time treatment with intravesical Oxybutynin for neurogenic bladder in children. *Eur Urol* 34 :148-153, 1998.
22. Greenfield, SP, Fera, M.: The use of intravesical Oxybutynin chloride in children with neuropathic bladder. *J Urol* 146:532-534, 1991.
23. Ruggieri, M.R. , Hanno, P.M., Samadzadeh, S., Johnson, E.W., Levin, R.M.: Heparin inhibition of increased bacterial adherence following overdistension, ischemia and partial outlet obstruction of rabbit urinary bladder. *J Urol* 136:182, 1986.
24. Ruggieri, M.R. , Hanno, P.M. , Levin, R.M. : Reduction of bacterial adherence to catheter surface with heparin. *J Urol* 138:423, 1987.
25. Massad, C.A., Kogan, B.A., Trigo Rocha, F.E.: The Pharmacokinetics of intravesical and oral Oxybutynin chloride. *J Urol* 148:595, 1992.
26. William W. Bonney, Robert A. Robinson, Robert J. Thobald, Jr.: Topical effect of intravesical Oxybutynin. *J Urol* 150, 1522-1525, 1993.
27. Ezekiel H. Landau, Leo C.T. Fung, Paul S. Thorner, Marc W. Mittelman, Venkata R. Jayanthi, Bernard M. Churchill, Gordon A. McLorie, Robert E. Steckler, Antoine E. Khoury: Histologic studies of intravesical Oxybutynin in the rabbit. *J Urol* 153,2022-2024, 1995
28. Fowler, J.E.: Urinary tract infections in women. *Urol Clin North Am*, 13:673-683, 1986.
29. Parsons, C.L: Pathogenesis of urinary tract infections: bacterial adherence, bladder defense mechanisms. *Urol Clin Nort Am*, 13:563-568, 1986.
30. Parsons, C.L., Boychuck, D., Jones, S., Hurst, R., Callahan, H.: Bladder surface glycosaminoglycans: An epithelial permeability barrier. *J Urol* 143:139, 1989.
31. Glycoproteins and proteoglycans in Harper's Biochemistry, 1988. Twenty-first edition. Robert K. Murray. Chapter 54,589-606. Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut/Los Altos, California.
32. Piraud, M., Boyer, S., Matthieu, M., Maire, I: Diagnosis of mucopolisaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis : a study of 2000 urine samples. *Clin. Chim. Acta* 221:171, 1993.
33. Reid, G.: Biofilms in urinary tract infections. *Current Opinion in Urology* 7:61-64, 1997.

34. Farsli, H.M.A., Mosli, H.A., Al-Zematy M.F., Bahnassy, A.A., Alvarez, M.: Bacteriuria and colonization of double-pigtail ureteral stents: log-term experience with 237 patients. *J Endourol* 9:469-472, 1995.
35. Caldwell, D.E.: Cultivation and study of biofilms communities. In *microbial biofilms*. Edited by Lappin-Scott H.M., Costerton J.W. Chambridge, U.K.:Chambridge University Press; 64-79, 1995.
36. Reid, G., Bailey, R.R.: Biofilm infections: implications for diagnosis and treatment. *N Z Med J* 109:41-42, 1996.
37. Reid, G., Brooks, H.J.L., Bialkowska, H., Valvano, M.: Bacteriuria in spinal cord injured patients. In *Antibiotic Terapy in Urology*. Edited by Mulholland S.G. Philadelphia: J.B. Lippincott-Raven; 187-199, 1996.
38. Khardori, N., Yassien, M.: Biofilms in device-related infections. *J Indust Microbiol* 15:141-147, 1995.
39. Whong, H.Y., Reidl, C.R., Griffith, D.P.: The effect of iontophoresis on bacterial growth in urine. *J Urol* 154:1944-1947, 1995.
40. Jass, J., Costerton, J.W., Lappin-Scott, H.M.: The effect of electrical currents and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Indust Microbiol* 15:234-242, 1995.
41. Reid, G., Tieszer, C.: Use of lactobacilli to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* to catheters. *Int Biodeter Biodegrad* 34:73-83, 1995.
42. Reid, G., Tieszer, C., Lam, D.: Influence Of lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to diapers. *J Indust Microbiol* 15:248-253, 1995.
43. Velraeds, M.M.C., van der Mei, H.C., Reid, G., Busscher, H.C. : Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl Environ Microbiol* 62:1958-1963, 1996.
44. Recommendations of subcommittee on taxonomy of staphylococci and micrococci. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* 15:109-10, 1965.
45. Christensen, G.D., Bisno, A.L., Parisi, J.T., McLaughlin, B., Hester, M.G., Luther, R.W.: Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Arin Intern Med* 96:1-10, 1983.
46. Forse, R.A., Dixon, C., Bernard, K., Martinez, L., McLean, A.P., Meakins, J.L.: *Staphylococcus epidermidis*: an important pathogen. *Surgery* 86:507-14, 1979.
47. Sonnenwirth, A.O., Jarret, L.(eds.): *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. St. Lois: CV Mosby Co, 1990.
48. Davenport, D.S., Masanary, K.M., Pfaller, M.A., Bae, M.J., Streed, S.A., Hierholzer, W.S.: Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* 153:332, 1986.
49. Fındık, D., Tuncer, İ., Kaloğlu, G.: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen koagülaz-negatif stafilkokların tiplendirilmesi ve slime faktör üretiminin araştırılması. *Mikrobiyol Bült* 30:19-24, 1996.
50. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., et al: Adherence coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices, *J Clin Mikrobiol* 22:57, 1991.

51. Noble, M.A., Grant, S.K., Hasen, E.: Characterization of a neutrophil inhibitory factor from clinically significant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 162:909, 1990.
52. Barret, E., Cowan and Linda, M.: Oxybutynin decreases renal pelvic pressures in normal and infected rat urinary tract. *J.Urol.* 160: 882-886, 1998 .
53. Teichman, Joel M.H., Stein, Paul C., Parsons, C. Lowell: Quaternary amine (Protamine Sulfate) is bactericidal to *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Diseases* 167:1500-1, 1993.
54. Deighton, M., Borland, R.: Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infection and Immunity*, Oct., 4473-4479, 1993.
55. Elçi, S., Atmaca, S., Gül, K.: Effect of iron limitation on the amount of slime produced by strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Cytobios* 84:141-146, 1995.
56. Kaplinsky, R., et al.: Expanded follow-up of intravesical Oxybutynin chloride use in children with neurogenic bladder.: *J.Urol*, 156: (2 Pt 2) 753-756, 1996
57. Painter, M. et al. : Long-term intravesical Oxybutynin chloride therapy in children with myelodysplasia.: *J Urol.* 156 (4) :1459-1462, 1996
58. Buyse, G., Waldeck, K. et al.: Intravesical Oxybutynin for neurogenic bladder dysfunction: less systemic side effects due to reduced first pass metabolism. : *J.Urol.*, 160: 892-896, 1998.
59. Buyse, G., et al.: Intravesical application of a stable Oxybutynin solution improves therapeutic compliance and acceptance in children with neurogenic bladder dysfunction.: *J.Urol.*, 160 (3 Pt 2):1084, 1998
60. Kasabian, NG., et al.: The use of intravesical Oxybutynin chloride in patients with detrusor hypertonicity and detrusor hyperreflexia.: *J. Urol*, 151 (4) : 944-945, 1994
61. Gökalp, A., Mutlu, N., Öner, A. ; Ürogenital sistemin nonspesifik infeksiyonları. *Temel Üroloji.* Anafarta, K., Göğüş, O., Bedük, Y., Arıkan, N. 1. Baskı. S;450