

**T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

OFLOXACİN'İN POLİMORF NÜVELİ LÖKOSİT FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

(DOKTORA TEZİ)

Vet. Hek. Tanju KADİR

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Adile ÇEVİKBAŞ
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Mikrobiyoloji Bilim Dalı Başkanı**

İstanbul - 1992

ÖNSÖZ

Ofloxacin'in Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları Üzerine Etkisinin araştırıldığı bu çalışma M.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda yürütülmüştür.

Tezin hazırlanmasında yakın ilgisi, kıymetli bilgileri ve eleştirileri ile beni yönlendiren tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Adile Çevikbaş'a, her konuda bana yardımcı olan Hocam Prof.Dr. Candan Bozok Johansson'a, teşvik ve cesaretlendirmeleri ile her zaman yanımda olan hocalarım Prof.Dr. Nesrin Emekli ve Prof. Dr. Ergene Bûget'e, desteğini esirgemeyen Prof.Dr. Turay Yardımcı'ya, ayrıca çalışmalarında her türlü yardım ve ilgiyi esirgemeyen arkadaşlarım Ecz. Ersin Yemni ve Bio. Pervin Vural'a ve her zaman yakın desteklerini eksik etmeyen annem ve babam'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
Fagositoz Hakkında Genel Bilgiler	3
Fagositoz Yapan Hücreler	3
PMN Lökositlerin Yapımı	3
Fagositoz	5
Mikroorganizmalar Tarafından Fagositoz İşlemlerinin Engellenmesi	12
Ofloxacin Hakkında Genel Bilgiler	15
Enterococcus faecalis Hakkında Genel Bilgiler	17
Antimikrobik İlaçların Fagosit-Mikroorganizma Etkileşimi Üzerine Etkileri	18
Fagositik Hücrelerin İlaç-Mikroorganizma Etkileşimi Üzerine Etkileri	21
GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
1- GEREÇLER	23
1.1. Mikroorganizmalar	23
1.2. Besiyerleri	23
1.3. Çözeltiler	23
1.4. Boyalar	24
1.5. Kullanılan Antibiyotik	24
1.6. Mac Farland Tüpleri	25

1.7. Kullanılan Araç ve Aygıtlar	25
1.8. Kimyasal Maddeler	26
2. YÖNTEMLER	27
2.1.Hassasiyet Deneyi	27
2.2. PMN Lökositlerin Elde Edilmesi	28
2.3. Lökosit Canlılık Testi	29
2.4. Aderens Deneyi	25
2.4.1. Lowry Protein Deneyi	30
2.5. Kemotaksi Deneyi	31
2.5.1. İnaktif Serum Hazırlanması	31
2.5.2. Zimozan Oponizasyonu	31
2.5.3. Agoroz Jelinin Hazırlanması	31
2.6. Bakterisit Etki Deneyi	33
2.6.1. Bakteri Suşunun Hazırlanması	34
2.7. Süperoksit Ölçülmesi	36
2.7.1. Bakteri Oponizasyonu	36
BULGULAR	39
TARTIŞMA	49
ÖZET	54
SUMMARY	55
KAYNAKLAR	56

GİRİŞ VE AMAÇ

Patojen mikroorganizmalara karşı fagositlerin vücut savunmasında önemli rol oynadıkları 1881 yılında anlaşılmıştır. Yabancı partiküllerin canlının mezodermal hücreleri tarafından alınması Rus zooloğu METSCHNIKOFF tarafından aynı yılda bildirilmiştir. COLENSO RIDGEN; antibiyotiklerin keşfinden çok önce vücut savunmasında rol oynayan fagositoz olayından yararlanarak, tüberkülozu iyileştirmeyi başarmıştır (4, 57).

Antimikrobik ilaçlarla fagositler arasındaki etkileşim antimikrobik ilaçların tedavide kullanılmaları ile incelenmiştir. Bu konu ile ilgili ilk çalışmalar 1940'lı yılların başında başlamıştır. Bu yıllarda Streptomycin'in hücre içine alınan mikroorganizmalar (Mycobacterium tuberculosis, Brucella ve Staphylococcus) üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmaları takip eden diğer araştırmalarda da bazı antimikrobik ilaçların intrasellüler mikroorganizmalar üzerine etkilerinin incelenmesinde tartışılmalı sonuçlar alınmıştır. Hücre içinde çoğalan bakterilerin kendilerini antibiyotiklerin etkisinden korumaları araştırmacıları antibiyotiklerin hücre dışında çoğalan mikroorganizmaların öldürülmesinde kullanılmasına yöneltmiştir (11).

1960'lı yılların ortasında araştırmacılar, ilaçların etkileri hücre içi aktiviteden başka hücre fonksiyonları üzerinede etkilerini incelemeğe yönelmişlerdir. Bu yıllardaki çalışmalar

özellikle fagositler, antimikrobik ilaçlar ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim üzerine yoğunlaşmış ve büyük ilgi çekmiştir (11).

Antimikrobik ilaçlar, fagositler ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim oldukça karışıktır. Bu etkileşim: 1)fagositlerin mikroorganizmalar üzerine etkileri. 2)Antimikrobik ilaçların fagosit-mikroorganizma etkileşimi üzerine etkileri 3)Antimikrobik ilaçların mikroorganizmalar üzerine etkileri 4)Fagositlerin ilaç-mikroorganizma etkileşimi üzerine etkileri şeklinde olmaktadır (11).

Literatürde'de görüldüğü gibi bazı antibiyotiklerin Polimorf Nüveli Lökosit (P NL) fonksiyonları üzerine etki ettiği görülmektedir (18). Bu çalışmamızda yeni flor-kinolon grubundan olan sub-MİK'daki ofloxacin'in PMN lökositler üzerine etkisi (aderens, kemotaksi, bakterisit etki ve süperoksit oluşumu) *Enterococcus faecalis*'e karşı araştırılmıştır.

Çalışmamızda antibiyotiklere çok dirençli olan *E. faecalis* suşu seçilmiştir. Bu bakterinin kinolon grubu ve diğer antibiyotiklere dirençleri göz önüne alınarak, sub-Mik'daki ofloxacin ile in vitro 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş PMN lökositlerin *E. faecalis*'e karşı aktivitesi araştırılmak istenmiştir. Bu nedenle ofloxacin, P. N lökosit ve *E. faecalis* ilişkisi model olarak alınmıştır.

GENEL BİLGİLER

FAGOSİTOZ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

FAGOSİTOZ YAPAN HÜCRELER :

Polimorf nüveli lökositler ve makrofajlar, fagositoz yapan hücreleri oluştururlar. Her ikisi de kemik iliğinden değişik yollarla oluşurlar. PMN lökositlerin dokulara göç etmelerinden önce kan dolaşımında 6-7 saat kısa bir hayatları olmasına karşın dokularda bir kaç gün yaşarlar. P .N lökositlerde; granüller (lizozomlar), birçok antimikrobik enzim ve laktoferrin denilen maddeler bulunur (26).

Makrofajlar, dokularda haftalar veya aylarca yaşayabilirler. Monositler, makrofajların öncüsüdür ve kan dolaşımında 2-3 gün kaldıktan sonra, dokulara göç edip makrofaj şeklini alırlar (16, 26).

PMN LÖKOSİTLERİN YAPIMI :

PMN lökositlerin kemik iliğinde MULTİPOTENT stem hücrelerinden köken alırlar. Daha sonra, myeloblast, promyelosit, myelosit, metamyelosit ve çomak gibi evreler geçirerek P .N lökositlere dönüşürler. Bu arada sitoplazmalarındaki granüllerine göre nötrofil, eozinofil ve bazofil olarak ayrılırlar ve kan dolaşımına karışırlar (39).

Myeloblast: 15-20 mikron çapında bir hücre olup, yuvarlak veya oval bir çekirdeği vardır. Çekirdek oldukça büyüktür ve hücrenin büyük bir kısmını işgal eder. Dar ve granülosit ihtiva etmeyen sitoplazmaları bulunur. Çekirdeğin kromatin yapısı oldukça incedir ve retiküler bir yapıya sahiptir. 1-6 arasında nükleolus ihtiva eder. Myeloblast mitozla çoğalma yeteneğindedir ve peroksidaz negatiftir.

Promyelosit: Myeloblast'a benzer, ancak Giemsa ile boyandıklarında kırmızımsı mor boyanmış granüller görünür. Kromatin ağı myeloblada göre daha kabadır ve nükleolusları vardır. Hücre mitotik bölünme yeteneğindedir ve peroksidaz pozitiftir.

Myelosit: Çekirdeğin kromatin ağı oldukça kalındır ve nukleolus yoktur. Sitoplazmada bulunan granüller spesifikleşmiştir ve granüllerin özelliğine göre myelositler  guruba ayrılır:

- 1- Nötrofilik myelosit.
- 2- Eozinofilik myelosit.
- 3- Bazofilik myelosit.

Sitoplazma/ekirdek oranı sitoplazma lehine artmış olup erken myelosit safhasında hafif mavimsi boyanır. Genç myelosit safhasında ise sitoplazma soluk pembe boyanır.

Metamyelosit: Nisbeten küçük, hafifçe çentiklenmiş bir nukleus ihtiva eder ve sitoplazma pembe renktedir. Sitoplazmada pembemsi granüller bulunur.

Çomak U şeklinin bir çekirdeği vardır. Sitoplazmada pembe renkte boyanan granüller bulunur.

Nötrofil: Nukleus lobülerdir. Lob sayısı 2-5 arasında değişir. Sitoplazma pembe renkte boyanmıştır ve içinde çok sayıda pembemsi boyanmış granüller vardır.

Eozinofil: Hücre çapı 16 mikrondur. Nukleus genellikle iki lobludur. Eozinofil granülleri nispeten büyük yuvarlaktır ve parlak kırmızımsı portakal renginde boyanırlar.

Bazofil: Çekirdek genellikle iki lobludur. Sitoplazma yuvarlak veya oval bazofil granüller ihtiva eder ve nukleusu örterek, çekirdeğin yapısını gizlerler (39, 50).

FAGOSİTOZ :

Organizmanın enfeksiyonlara karşı nonspesifik savunmasında en etkin direnç mekanizmasını fagositoz oluşturur. Fagositoz mikroorganizmalar dahil olmak üzere, partiküler yabancı maddelerin bu işle görevli fagositler tarafından hücre içine alınarak parçalanıp sindirilmesi olayıdır. Bu olay enfeksiyonlara karşı konağın savunmasında önemli yer tutar (1, 30).

Fagositoz bir takım olayların birbirini izlediği kompleks bir işlemedir. Fagositozda ilk adım aderens (yapışma) ve kemotaksidir (16).

Kemotaksi kemotaktik (kemoatraktan) faktörlerin aracılığı ile fagositlerin bu sinyallere (fagositoz işleminin yapılacağı alana) çekilmesi olayıdır. Kemotaksi, lökositlerin vasküler endotelyuma aderensleri ile başlar. Stimule olmuş makrofajlardan sekrete edilen İL-1 ve TNF, endotel hücrelerini endothelial-Leukocyte Adhesion molekülleri (ELAM) denilen yeni yüzey reseptörü moleküllerinin ekspresyonu için endükler. ELAM'lar fagositlerin endotel hücrelerine aderenslerini kolaylaştırır. Endotel hücresi ile nötrofil arasındaki aderensin moleküler mekanizması henüz tam anlaşılmamıştır. Nötrofillerde bulunan laminin ve fibronektin gibi ekstrasellüler komponentlerin, nötrofillerin konak dokuya yapışmalarına yardım ettiği ve ayrıca yüzeylerinde CR3 reseptörü, glikoprotein ve lenfosit fonksiyon antijeni (LFA-1) ihtiva eden hücrelerin nötrofil ve endotel aderensini kolaylaştırdığı düşünölmektedir (16, 30).

Kemotaktik faktörlerin etkisi ile, enflamasyon alanına göcecek fagositler (nötrofiller ve monositler) damar endotel yüzeyinde bu şekilde oluşan yığınakta yer alan hücrelerdir. (damar lumeninde dolaşan hücreler değildir).

En önemli kemotaktik faktörler arasında konak tarafından oluşturulan; Lökotrin B4 (LTB4), C5a, C3a, C3b, C567, trombosit aktivasyon faktörü (PAF), histamin N-formyl-methionyl-leucyl-phenilalanine (FMLP), kallikren fibrin ve kollegen fragmentleri ile mikroorganizmalar tarafından salınan endotoksin, protein A, streptokinaz, glikopeptidler ve N-formil metyonil peptidler sayılabilir (15, 16, 26, 30).

Kemotaktik uyarana cevap, fagositlerin ameboid hareketleri ile sağlanır. Böylece bu hücreler endotel hücreler arasından geçerek enflamasyon alanına ulaşır. Fagositlerin ameboid hareket yeteneğinin örneğin bir hastalık sonucu azalmış bulunması, enfeksiyonlara karşı savunmayı azaltabilir. "nötrofil hipomotilitesi" (Tembel Lökosit Sendromu) hastalığında nötrofillerdeki sitoplazmik kontraktil proteinler normal olarak polimerize olamadıklarından bu hücrelerin hareketleri yavaşlar ve enflamasyon alanına ulaşmakta gecikirler (16, 27).

Fagositoz :

Yukarıdaki olayları izleyen aşamada, partikül (Örneğin;mikroorganizma) fagosit yapacak hücre ile temasa gelir. Fagositoz iki kademe gerçekleşir (26).

1- Temas ve Tutunma (Aderens): Aderens daha sıkı ve güçlü olarak bakteri yüzeyine kaplanmış antikorlar aracılığı

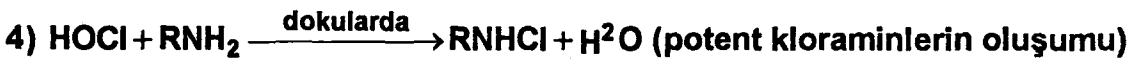
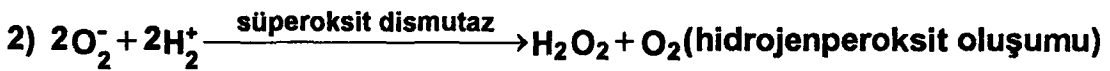
ile sağlanabilir. Antikorlar, Fab parçaları ile tutundukları bakteriyi Fc parçaları ile fagosit yüzeyindeki Fc reseptörlerine bağlarlar. Mikroorganizmanın fagositlere bağlanmasını sağlayarak fagositozu kolaylaştıran antikorlara OPSONİN ve bu olaya da OPSONİZASYON denilmektedir. Özellikle kapsüllü mikroorganizmalar opsoninlerle kaplı oldukları zaman fagositlere tutunurlar, aksi halde fagositler tutunamazlar (16).

Bakteri yüzeyine yapışmış kompleman komponentleri (C3b) de hücredeki spesifik reseptöre (CR3) bağlanarak fagositozu kolaylaştırırlar.

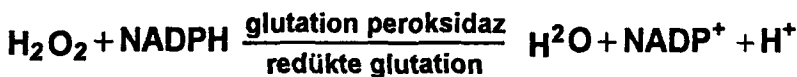
2- Sindirme : Bakteri, hücre yüzeyinde psödopodlar arasındaki girinti içine alınarak orada hapsedilir, sonra psödopodların kopması sonucu hücre içine bir kesecik (Fagozom) içine alınmış olur (Endositoz). Fagozomlar, çeşitli hidrolitik enzimleri taşıyan lizozomlar ile birleşerek Fagolizozom'ları oluştururlar. Böylece mikroorganizmaların, bu kesecikler içinde öldürölüp sindirilme işlemleri başlar (16).

Fagosite edilmiş mikroorganizmalar, hücre içine alındıktan sonra canlı kalırlarsa, spesifik antikorlardan korunmuş olarak enfeksiyonu kronik olarak sürdürebilirler veya gezici hücreler içine alındıktan sonra öldürölmeleri gerekir.

Fagozom oluşması sonunda solunum patlaması (Respiratory Burst) ve lizozomların fagozom membranı ile füzyonu sonucu fagolizozom oluşur. Fagosite edilmiş mikroorganizmaların, fagozomlar içinde öldürülmesi süperoksit-myeloperoksidaz sisteminin kombine çalışması ile meydana gelir (14, 36). Bakterisit maddelerin çoğu solunum patlaması olayında gerçekleşen karmaşık oksidatif olaylar sonucu oluşur. Solunum patlaması; Stimule olan fagositlerin oksijen metabolizmasındaki ani değişmeyi ifade etmektedir. Bu olay NADPH oksidaz denilen fagositlerde potansiyel durumda bulunan bu enzimin aktivasyonu ile başlar. Bu olaylar dizisinde hücrenin oksijen tüketimi ve oksijene olan ihtiyacı şiddetle artar. Bu olaylar dizisinde oluşan kimyasal denklemleri aşağıdaki gibi ifade edilebilirler (16, 30).



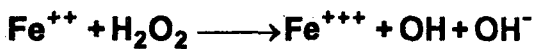
Bu arada, oluşan hidrojenperoksidin bir kısmı suya çevrilerek zararsızlaştırılır:



Reaksiyon denklemlerinde de görüldüğü gibi reaksiyonlarda süperoksit radikallerinin oluşması sırasında, diğer taraftan yeni oluşmuş H₂O₂'in bir kısmının glutatyon-bağımlı işlemlerde suya dönüştürülmesi sırasında NADPH'ın (indirgenmiş nikotinamid adenin dinukleotid) fazla tüketilmesi büyük oranda NADPH yapımına ihtiyaç göstermektedir. Bu olaylar dizisinde kaynak reaksiyon heksoz monofosfat yoludur. Hücreler bu yoldan bol miktarda glikoz oksidasyonuna yönelirler.



Fagositlerdeki solunum patlaması reaksiyonlarında ortaya çıkan ürünler bakteriyosidal etkiye sahip olanlar oksidlenmiş halojenler ve oksitleyici radikallerdir. Oksitleyici radikallerin en güçlü olanlarından biri hidrolitik radikal (OH) dir. Hidroksil radikali biyolojik sistemdeki birçok hasardan da sorumludur. Hidroksil radikallerinin oluşması, metal iyonlarının katalizlediği reaksiyonlar ile sağlanır. Burada Fe⁺⁺, muhtemelen O₂⁻'ye maruz kalmış ferritinden ortama salınmaktadır (4, 30).



Nötrofil granüllerindeki major antimikrobik proteinler ve peptidler de öldürme işleminde non oksidatif faktörler olarak yer alırlar. Azürofil granüllerde bulunan Katepsin G (serin proteaz) hidrolitik etkiye sahip olup, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler ile bazı mantarlara etkilidir. Spesifik granüllerde bulunan laktoferrin mikroorganizmaların demir kullanımını engeller, hidroksil radikallerin oluşumunu kolaylaştırır. Azürofil ve spesifik granüllerde yer alan lizozim, Gram-pozitif bakterilerin duvar yapısındaki müramik asidi yıkar. Defansinler, arginin ve sisteinden zengin antimikrobik polipeptidlerdir ve azürofil granüllerde bulunurlar. Bunlar, Gram (+) ve (-) bakteriler ve bazı virüsler üzerine etkilidir. Defansinlerin etki mekanizmaları iyi bilinmiyor. Zarfsız virüslere etkili olmayışları da dikkate alınarak, muhtemelen hedef hücrenin membran yapısını bozdukları düşünülmektedir. Bakterisit ve permeabilite arttırıcı faktör ise, Gram (-) bakterileri öldüren bir protein olup azürofil granüllerde bulunur.

Öldürülen mikroorganizmalar, lizozomal granüllerdeki litik enzimler ile (asid hidrolazlar) parçalanıp dağıtılır. Bu evre oksijene bağımsız olarak yürür. Geriye kalan artıklar "EKSOSİTOZ" veya "TERSİNE ENDOSİT" denen bir olayla hücre dışına atılabilirler.

MİKROORGANİZMALAR TARAFINDAN FAGOSİTOZ İŞLEMLERİNİN ENGELLENMESİ :

A) Kemotaksi'nin Engellenmesi:

Bazı mikroorganizmaların antijenler ve ürünleri fagositoz olayındaki birçok mekanizmaları etkilemekten sorumludur. Örneğin; S.agalactia'nin 3. tip özel antijeni, V.cholera'nın kolera toksini, E.coli'nin enterotoksini, S .aureus'un alfa toksini, S.pyogenes'in O enzimi, Cl. perfringens'in theta toksini'nin kemotaksiyi engellediği gösterilmiştir (26, 58).

B) Fagositik Hücre-Mikroorganizma Yapışmasının Engellenmesi:

Bakteri kapsülü fagositozu engeller. Kapsül komplemanı tespit edemediğinden fagositik hücre yüzeyindeki C3 reseptörü ile komplemanın etkilenmesi mümkün olamaz. Kapsüle karşı antikorun bulunması durumunda, mikroorganizma fagositozdan daha çabuk etkilenir.

Fagositozda yapışmayı engelleyen diğer mikroorganizma komponentleri Örneğin; bakteri pilusları, S .aureus'un A protein i, Streptococcus'un M proteini, S.typhi'nin Vi antijeni ve N. gonorrhoeae'nin dış membran proteinleri'dir (26).

C) Fagozom-Lizozom Füzyonunun Engellenmesi:

Bazı mikroorganizmaların hücre duvarındaki glukolipitler veya salgıladıkları bazı ürünler fagositlerde fagolizozom oluşumunu engeller. Örneğin M. tuberculosis'in hücre duvarında bulunan glikolipitler ve T.gondii'in salgıladığı bir ürün, fagozom membranının yapısını bozarak fagolizozom oluşmasını engeller. Bunun sonucunda, mikroorganizma fagositik hücrenin hidrolitik enzimlerinden kurtulur ve fagosit içinde yaşamlarını sürdürürler.

T.gondii'nin antikor ile opsonize edildiği durumda, fagositik hücrede fagolizozom meydana gelir ve T.gondii hücre içinde ölür. M. tuberculosis in antikorlarla opsonize edilmesi sonucunda, fagositik hücrede fagolizozom meydana gelir, fakat bakteri hücre içinde canlı kalabilir. Makrofajların lenfokinlerle aktive olma durumunda, yukarıdaki iki mikroorganizma makrofajlar tarafından sindirilir.

Staphylococcus içeren fagozomların lizozomlarla birleşmesi, influenza virüsü tarafından engellenir. Burada influenza virüsü fagositoz olayında oluşan myeloperoksidaz salgılanmasını inhibe eder ve fagolizozom olayı gerçekleşmez. Bunun sonucunda influenza enfeksiyonu geçiren hastalarda sekonder bakteriyel enfeksiyon görülebilir (26).

D) Lizozomal Enzimlere Direnç:

Oksijene-bağımlı olamayan mikrobisit aktiviteye karşı direnç, organizmanın yüzey komponentleri ile oluşabilmektedir. Örneğin; invitro çalışmalarda Salmonella typhimuriu'mun lipopolisakkaridinin granüler enzimlerin birleşmesini engellediği bildirilmiştir (26).

E) Mikroorganizmanın Fagozomdan Sitoplazmaya Kaçışı:

Mikroorganizma fagositik nücre içine alınıp, fagozom oluştuktan sonra, bazı durumlarda fagolizozom oluşmamakta ve mikroorganizma lizozomların hidrolitik enzimlerinden kurtularak fagositik hücrenin sitoplazmasında serbest kalmaktadır. Örneğin; Peritonuna Trypanosoma cruzi enjekte edilen farelerin makrofajları enjeksiyondan bir saat sonra elektron mikroskobu ile incelendiğinde makrofajlar içinde fagozomların görülmediği, Trypanosoma cruzi'in tripomastigot'larının sitoplazmada buldukları izlenmiştir.

Bu çalışmada da görüldüğü gibi mikroorganizmanın fagolizozom oluşumuna karşı koyarak ne şekilde sitoplazmaya kaçtığı bilinmemektedir. Ancak mikroorganizma ve fagozom membranı etkileşimi veya mikroorganizma tarafından oluşturulan bir enzim aracılığı ile olduğu düşünülmektedir.

Birçok virüs konağın fagositik hücreleri içine girip, fagozom oluşturmaktadır. Ancak fagozom-lizozom füzyonu oluşmadan önce, fagozomdan kaçmaya yavaşır. Örneğin; Vaccinia virüsü, fagositik hücrenin içine girip, fagozom oluşturur. Bu virüs ile etkilenmiş olan fagozom membranının viral lipoproteinler ile sarılması, membran erimesi ve DNA içeren çekirdeklerin sitoplazmada serbest kalması ile sonuçlanır (26).

F) Mikroorganizmaların Fagositik Hücreleri Öldürmesi:

Birçok mikroorganizmanın özellikle toksinleri, fagositik hücrenin membran yapısını ve geçirgenliğini bozarak, hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Örneğin; S.pyogenes'in oluşturduğu streptolisin O fagositik hücrenin membranındaki kolesterol ile birleşerek, fagositik hücrenin membranının bozulmasına neden olur. Ayrıca streptolisin S de hücre membranının geçirgenliğini bozarak, fagositik hücreyi öldürür (24).

Staphylococcus tarafından salgılanan lökosidin, Ps. aeruginosa'nın A toksini ve B.anthraxis'in anthrax toksinide aynı etki ile fagositik hücreleri öldürmektedir (26).

OFLOXACİN HAKKINDA GENEL BİLGİLER :

Antibiyotiklerin çoğu mantarlardan elde edildiği halde kinolonlar tamamen laboratuvarında kimyasal maddelerden elde edilmişlerdir.

Antimalaryal ilaçlar üzerinde yapılan çalışmalar sırasında antibakteriyel etkinliği saptanan ilk kinolon naldixic acid, 60'lı yıllar boyunca Gram negatif bakterilerin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılmıştır. Yeni florlanmış kinolonlar ise, sadece Gram negatif bakterilere değil, aynı zamanda Gram pozitiflere de etkileri ile, 1985'ten sonra antimikrobik tedavide yeni bir dönem açmıştır (35, 54).

Kinolonlarla ilgili çalışmalar sürekliliğini korurken ve her yıl birkaç yeni kinolon tıbbi kullanıma sunulurken, ofloxacin en iyi incelenen kinolonlar arasında gösterilmiştir. Bu antibiyotığın etki mekanizması, bakterilerdeki DNA sentezi sırasında rol oynayan bakteriyel DNA gyrase enzimini inhibe ederek etki gösterir (35). Ofloxacin ve norfloxacin'in Enterobacteriaceae ailesi üzerine etkisinin, naldixic acid'in etkisinden daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ayrıca norfloxacin'den farklı olarak, Gram pozitif bakterilere daha az etki göstermektedir (26, 32).

Ofloxacin glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon (renal) hem renal hem biliyer sistemle elimine olur ve metabolize olmadan atılır. İdrardaki konsantrasyonlarının aynı andaki serum konsantrasyonundan 25 ila 600 katı kadar fazla olduğu bildirilmiştir (35).

Ofloxacin genellikle üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Akut alt üriner enfeksiyonlarında (üretit, sistit ve pyelit) tek doz veya üç günlük tedavilerde başarı şansı %90-100 arasında

bulunmuştur. Ayrıca salmonella enfeksiyonları, basilli dizanteri, kolera ve alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan Gram negatif basillerin tedavisinde ofloxacin başarı ile kullanılmaktadır (35).

ENTEROCOCCUS FAECALIS HAKKINDA GENEL BİLGİLER:

Genel olarak Gram pozitif koklar olup, D gurubu streptokokların enterokok türlerinden'dir. Görünümleri daha çok ikişerli diplokoklar yada kısa zincirler oluştururlar. Bu görünümleri ile Streptococcus pneumoniae'ye benzemektedirler (9).

E.faecalis: At, tavşan veya insan kanı içeren besiyerinde beta hemoliz oluştururken, koyun kanı içeren besiyerinde alfa hemoliz oluşturmaktadır. Katı besiyerinde gri parlak koloniler oluştururlar. Biyokimyasal özellikleri : %6.5 sodium klorürlü besiyerinde, %40 safralı ortamda ve 45 °C'de üreyebilmektedirler. Ayrıca eskulini hidrolize etmektedirler. Bu organizmalar insan ve bazı hayvanların bağırsak, ağız ve bazen deri normal florasında bulunurlar. Uygun koşullarda insanlarda idrar yolları enfeksiyonu, genital organ enfeksiyonları, kolestit ve yara enfeksiyonları oluşturabilir (9, 26).

E.faecalis; penicillin, Aminoglycoside'ler, cephalosporinler, clindamycin ve diğer elementlere karşı

direnç gösterirler. Yüksek dozlarda ampicillin enterokoklara etkili olurken, bazı durumlarda bu organizmaların ampicillin'e karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir. Aminoglycoside'ler (özellikle gentamicin) ile penicillin kombinasyonu, bu organizmanın yaptığı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca vancomycin'inde enterokoklara etkili olduğu bilinmektedir (8).

Antimikrobik İlaçların Fagosit-Mikroorganizma Etkileşimi Üzerine Etkileri :

1- Antimikrobik İlaçların Kemotaksi Üzerine Etkisi:

İn-vitro çalışmalarda, birçok antibiyotik'in kemotaksi üzerine olumlu veya olumsuz yönde etki gösterdiği bildirilmiştir (3, 7, 11).

Antimikrobik ilaçlar kemotaksiyi iki değişik yolla etkilemektedir:

A) İndirekt Etki:

Bazı ilaçlar bakteriyel ürünlerin salgılanmasını kontrol ederek, kemotaksiyi etkilemektedir. Örneğin; Sub-MİK'da ampicillin ile inkübe edilmiş E.coli, ampicillin ile inkübe edilmemiş E.coli kültürüne göre daha güçlü kemotaksi oluşmasına neden olmaktadır. Erythromycin ve tetracycline

bakteri tarafından salgılanan kemotaktik faktörleri azaltarak, kemotaksiyi inhibe ederler (11).

B) Direkt Etki:

Bazı ilaçlar fagositik hücrelere direkt etki ederek, kemotaksiyi olumsuz veya olumlu yönde etkilemektedir. Örneğin; Tetracyclin Ca^{++} ve Mg^{++} iyonlarına bağlanarak, bu iyonların fagositler içine girmesini engeller ve hücrenin büzülmesine neden olur (22). Bunun sonucunda kemotaksi engellenir. Antifungal ilaçlardan amphotericin B de direkt olarak kemotaksiyi engellemektedir (33, 49).

2- Antimikrobik İlaçların Fagositoz Olayındaki Sindirme ve Öldürme Üzerine Etkisi:

Bu etki de iki yönde incelenebilmektedir:

A) Direkt Etki:

Antimikrobik ilaç'ların fagositoz olayındaki sindirme ve öldürme üzerine etkisinin incelenmesinde dirençli mikroorganizmalar veya ilaçların sub-MİK'ları kullanılmaktadır. Aksi halde ilacın fagositik hücre üzerine mi, yoksa bakteri üzerine mi etki ettiğini ayırt etmek mümkün değildir. Ayrıca dirençli mikroorganizmanın B-laktamaz oluşturup oluşturmadığı da önemlidir. B-laktamaz enzimi antibiyotik gücünün azalmasına ve antibiyotiğin fagositik hücrelere karşı zayıf etki göstermesine neden olur (11).

B) İndirekt Etki:

Antimikrobik ilaçlar mikroorganizma yüzeyinde değişiklik yaparak, mikroorganizmanın fagositlere karşı duyarlı hale gelmesine neden olurlar (18, 31).

İn vitro çalışmalarda bu etkileşimde mikroorganizma sub-MİK'da ki antibiyotik ile muamele edildikten sonra, fagositik hücreler ile karşılaştırılmaktadır. Örneğin; S .aureus'un membranında bulunan A proteini kompleman ile bakterinin opsonizasyonunu zayıflatır (23). Aynı bakteri sub-MİK'da clindamycin ile muamele edildiğinde bakteri membranındaki A proteinin azalmasına bağlı olarak, mikroorganizmanın fagositler tarafından sindirilmesi kolaylaşır (20, 23). Clindamycin; S . pyogenes'in yüzeyinde bulunan M proteini üzerine etki edip, bu organizmanın fagositler ile etkileşimini kolaylaştırır (12).

Sub-MİK'da azlocillin, carbenicillin, cefoperazone, fosfomycin, netilmicin ve piperacillin ile muamele edilen S .aureus, Streptococcus, E.coli ve Pseudomonas'ın P N lökositler tarafından sindirilmesi kolaylaşır (37). Ayrıca sub-MİK'da amoxycillin ve clavulanic acid ile muamele edilen S . aureus'un P N lökositler tarafından sindirilmesinde artma olduğu görülmüştür (44).

FAGOSİTİK HÜCRELERİN İLAÇ-MİKROORGANİZMA ETKİLEŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ :

Bazı durumlarda fagositik hücreler ile mikroorganizmalar, fagositoz olayı gerçekleşmeden de birarada toplanıp, ortamda bulunan antimikrobik ilaçların aktivitesini değişime uğratırlar (11).

Fagositik hücrelerde oksidatif olmayan ve bakterisit etki gösteren (lizozim, katyonik proteinler, laktoferrin ve küçük peptidler) enzimler bulunur. Fagolizozom gerçekleşmesi sonucu, bu maddeler fagosite olmuş mikroorganizma üzerine etki gösterirler. Bu maddeler fagositoz esnasında veya fagositik hücrenin ölmesi ile dış ortama salgılanırlar (30).

Fagositik hücreler ile mikroorganizmaların bir arada toplanması sonucu, üç değişik olay meydana gelmektedir (11):

1.durumda; Bazı antimikrobik ilaçlar mikroorganizmanın morfolojik yapısında değişiklik yaparak, fagositik hücrelerin oksidatif olmayan enzimlerinin aktivitesini artırır. Örneğin; nafcillin ile muamele edilen S .aureus, fagositik hücrelerin lizozomları tarafından, antibiyotik ile muamele edilmeyen St.aureus'a oranla daha çabuk lizize uğratılmıştır.

Chloramphenicol, tetracycline, gentamicin ve streptomycin ile muamele edilen K.pneumoniae, S.minnesot ve Shigella sonni fagositik hücrelerinin oksidatif olmayan enzimlerini arttırmıştır.

2.ci durumda; Oksidatif olmayan bazı enzimler hidrofobik ilaçların, Gram negatif bakteriler içine alınmalarını kolaylaştırır. Ayrıca monositler tarafından salgılanan henüz bilinmeyen bir maddenin penicillin G nin S.aureus içine alınmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir.

3.durumda; Hücre dışı ortamın pH değeri azalmaktadır. Örneğin; hücre dışı ortamın pH değerinin 6.5 altına düşmesi sonucu, ortamda bulunan bakterinin üremesi B-laktam gurubu antibiyotikler tarafından inhibe olmasına karşın, hücre dışı ortamın pH değerinin yüksek olması durumunda bakteri üremiştir. Bu olay pH'ya bağımlı tolerans olarak adlandırılmaktadır.

Aminoglycoside gurubu antibiyotiklerin bakterisitik aktiviteleri hücre dışı ortamın pH'sına bağlı olarak değişir. pH değerinin 7.4'ün altına düşmesi, antibiyotiğin zayıf etki göstermesine neden olmaktadır. Hücre dışı ortamın pH'sının fagositler tarafından düşürülmesi Aminoglycoside'lerin bakterisit aktivitesini azaltmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. GEREÇLER

1.1. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Tıp, Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen muayene materyalinden izole edilen *Enterococcus faecalis* (24) suşu kullanılmıştır.

1.2. Besiyerleri

Mitis Salivarius Agar	(Difco)
Trypticase Soy Broth	(Difco)
Trypticase Soy Agar	(Difco)

1.3. Çözeltiler

Fosfat Buffer Saline (PBS) pH 7.4

	g/litre
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	0.15
KH ₂ HO	0.2
CaCl ₂	0.1
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.1

Distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanır.

Hanks Balanced Salts Solution (HBSS) pH 7.4

NaCl	8 g
KCl	400 mg
Na₂HPO₄	50 mg
CaCl₂ 2H₂O	60 mg
MgSO₄ 7H₂O	190 mg
NaHCO₃	350 mg
Glikoz	1 g
Fenolred	17 mg

Distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanır.

Jelatinli Hanks:

Hanks çözeltisine %1 jelatin ilavesi ile hazırlanmıştır.

% 6 Dekstran çözeltisi

% 0.9 NaCl çözeltisi

% 0.1 BaCl₂ çözeltisi

% 0.1 H₂SO₄ çözeltisi

A çözeltisi (%2 Na₂CO₃ (0.1 NaOH))

B çözeltisi (% 1 CuSO₄ 5H₂O)

(%2 NaKC₄H₄O₆)

D çözeltisi (Folin reaktifi)

1.4. Boyalar

Giemsa boyası

Tripan mavisi

1.5. Kullanılan Antibiyotik

Potensi 999 µg/mg olan Ofloxacin HCL Fako ilaç

Fabrikasından sağlanmıştır.

1.6. Mac-Farland Tüpleri

Standart bulanıklık elde etmek için laboratuvarda hazırlanan Mac-Farland 0.5 standart tüpü esas alındı. 0.1 ml %0.1 BaCl₂ 9.9 ml %0.1 H₂SO₄ ilave edilerek hazırlanmıştır.

1.7. Kullanılan Araç ve Aygıtları

Otoklav (Trans Medikal Aletler A.Ş.)(yatay)

Su banyosu (Biotip)

Etüv B 5042 (Heraeus)

Sterilizatör (Elektro-mag)

Vortex (Nüvemix)

Terazi (Bosh hassas terazi) (0.0001 g hassas)

Terazi (Mettler 0.1 g. hassas)

Santrifüj (Heraeus - Christ)

Soğutucu +4 C (Arçelik 475 T)

Derin dondurucu (Soğuk - Teknik)

Enjektör (Pharma-Plast)

Filmler (Kodak)

Mikropipetler (Gilson ve Hamilton)

Pipet pompası (Scienceware)

Ph - metre (Orion research)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-120-02)

Spektrofotometre kuvarz küvetleri (Hellma)

Mikroskop (Nikon, Alphaphot YS)

Çalkalayıcılı su banyosu (Nüve)

Deney tüpleri

Petri kutuları

1.8. Kimyasal Maddeler

Heparin (Roche)

Dekstran 70 (Dekstran DRI Kontrol No:1398 EHU)

Ofloxacin (Fako İlaç Fabrikası)

Trypticase Soy Agar (Difco)

Trypticase Soy Broth (Difco)

Baryum klorür(Merck)

Sülfürik asit (Merck)

Na₂HPO₄ Sodyum klorür(Horasan kimya)

KH₂PO₄ (Merck)

MgSO₄ 7H₂SO (Horasan kimya)

CaCl₂ (Merck)

Glukoz (Merck)

MgCl₂(Merck)

NaHCO₃ (Merck)

Fenol red(Sigma)

Trypan mavisi (Merck)

K₂HPO₄ (Merck)

Metil-p-hidroksi benzoat (Merck)

NaOH (Merck)

BSA (Bovin serum albümin) (Sigma)

Na₂CO₃ (Merck)

CuSO₄ 5H₂O (Merck)

NaKc₄H₄O₆ (Merck)

Folin reaktifi (Sigma)

Jelatin (Difco)

Mac Conkey Agar (Difco)

Sodyum bikarbonat (Merck)

Zymozan A (Sigma)
Ferrisitokrom C (Sigma)
Metanol (Merck)
Giemsa boyası (Oxoid)
Agaroz (Sigma)

2. YÖNTEMLER

2.1. Hassasiyet Deneyi

Ofloxacin'in *E. faecalis* suşuna karşı MİK'u sıvı besiyerinde dilisyon yöntemi ile yapılmıştır (14). Trypticase Soy Broth besiyeri otoklavda 121 °C 15 dakika tutularak steril edilmiştir. Ofloxacin'in HBSS içinde 1000 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi, sıvı Trypticase Soy Broth besiyerinde (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09,) µg/ml olacak şekilde sulandırılmıştır.

37 °C de 18-24 saat inkübe edilen sıvı besiyerindeki *E. faecalis* kültüründen Mac farland 0.5 standart tüpü esas alınarak hazırlanan süspansiyondan 0.5 ml (10^6 cfu/ml) her test tüpüne ilave edilmiştir. Tüpler 37 °C de bir gece inkübe edildikten sonra, tüplerdeki bulanıklık gözle incelenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, mikroorganizmanın üremesi sonucu oluşan bulanıklık dikkate alınarak, hiç bulanıklık göstermeyen dolayısı ile üreme olmayan en düşük konsantrasyondaki dilisyon minimal inhibisyon konsantrasyonu (M.İ.K) olarak saptanmıştır. Çalışmamızda sub-MİK değeri (1.56 µg/ml) deneylerde kullanılmıştır.

2.2. PMN lökositlerin Elde Edilmesi

29 yaş grubu sağlıklı kişilerden heparin (5 µg/ml) içeren steril şırınga ile 10 ml venöz kan alınmıştır. Üzerine dextran "70" in serum fizyolojik su da hazırlanmış %6 çözeltilisinden 3 ml ilave edilmiştir. 37 °C de 1 saat su banyosunda sedimente edildikten sonra, lökositten zengin plazma ayrılmıştır. Daha sonra, plazma 1200 rpm de 5 dakika santrifüjde çevrilerek, P .N lökositler çöktürülmüştür (56). P .N lökosit pelletlerine kontamine olabilen eritrositlerden kurtulmak için, lökosit pelletlerine soğuk distile su (0.1/ml) ilave edilmiş ve 30 saniye vortex te karıştırılarak eritrositler parçalanmıştır. Daha sonra karışıma (3:1) oranında soğuk NaCl (0.6M) ilave edilmiş ve 2000 rpm de 4 dakika santrifüjde çevrilmiştir (5, 28). Üst sıvı atılmış ve lökosit pelletleri soğuk PBS tamponu ile 2 defa yıkanmıştır. Total lökosit sayımı standart metod ile yapılmıştır (53). Lökosit pelletleri HBSS ile süspansiyon haline getirilmiştir (10⁷ lökosit/ml HBSS). Bakterisit etki ve süperoksit oluşumu deneylerinde %0,1 jelatin içeren HBSS kullanılmıştır.

2.3. Lökosit Canlılık Testi

Bir hacim lökosit (P .N) süspansiyonu, 1 hacim %0.5 tripan mavisi ile (1:1) karıştırılmış ve oda ısısında 5 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda mikroskop altında boyanmamış canlı hücreler sayılmıştır (44).

2.4. Aderens Deneyi

Mikrotitrasyon plaklarındaki 8 kuyuya, sub-MİK da ofloxacin ile 37 °C de 30 dakika inkübe edilmiş HBSS içinde hazırlanmış lökosit süspansiyonundan 100 µl (10^7 lökosit/ml HBSS) ilave edilmiştir. Diğer 8 kuyuya antibiyotik içermeyen HBSS içinde hazırlanmış lökosit süspansiyonundan 100 µl (10^7 lökosit/ml HBSS) ilave edilmiştir. Daha sonra mikrotitrasyon plakları %5 CO₂ içeren ortamda 37 °C de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yapışmayan hücreler HBSS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. P. N lökositlerin parçalanması için kuyulara 100 µl distile su konmuş -20 °C de dondurulup oda ısısında tekrar çözündürülmüştür (Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır) (3). Kuyulara ofloxacin ile inkübe edilmiş ve edilmemiş P. N lökositlerin protein miktarı Lowry metodu ile u.v spektrofotometrede 550 nm de ölçülmüştür (34).

Lowry Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

A- %2 Na₂CO₃ çözeltisi (100 ml 0.1 N NaOH de çözündürülerek hazırlanmıştır.

B- %1 CuSO₄ : x 5H₂O

%2 NaKC₄H₄O₆

(1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır)

C-50ml A

1 ml çözeltisinde hazırlanmış ve 1 gün içinde kullanılmıştır.

D-Folin reaktifi

2.4.1. Lowry Protein Deneyi

Protein miktarını tayin etmeke için; standart protein konsantrasyonu 1 mg/ml olan B.S.A. (Sıfır Serum Albumini) stok solüsyonundan, 50, 40, 30, 20, 10, 0 µg/ml olacak şekilde dilisyonlar hazırlanmıştır. Protein konsantrasyonu (0) µg/ml olan standart solüsyonla sıfır ayarı yapılmıştır. Küçük protein konsantrasyonlu dilisyondan başlayarak, bütün standart dilisyonlar için absorpsiyon değerleri spektrofotometrede okunmuştur. Standart dilisyonların, absorpsiyon (A) ve protein konsantrasyon (K) değerleri arasında $K=F(A)$ standart eğri çizilmiştir. Aderens deneyimizde deney ve kontrol numuneler u.v spektrofotometrede 500 nm de okunmuş, alınan absorpsanslar yukarıdaki standart protein eğrisi ile karşılaştırılarak protein miktarları hesaplanmıştır.

Aderens olayının ne miktarda gerçekleştiğini saptamak için; mikrotitrasyon plaklarındaki kuyucuklara yapışmış ofloxacin ile muamele edilmiş lökosit süspansiyonuna 1.2 ml C çözültisi ilave edilmiş ve karıştırılmış, oda ısısında 10 dakika bekletildikten sonra üzerine 40 µl folin hızla eklenip, bir saniye içinde vortex karıştırıcıda karıştırılmıştır. Aynı işlemler ofloxacin ile muamele edilmemiş kontrol örnekler 200 µl de tekrarlanmıştır.

Deney ve kontrol örneklerin spektrofotometrede absorpsans değerleri ölçülmüştür. Alınan absorpsans değerleri, standart eğriden karşılaştırılarak protein miktarları saptanmıştır.

2.5. Kemotaksi Deneyi

Bu deneyde agaroz altı yöntemi laboratuvarımızdaki koşullara göre modifiye edilerek kullanılmıştır (5, 13, 41).

2.5.1. İnaktif Serum Hazırlanması

Sağlıklı gönüllüden alınan 10 ml heparinsiz kan 3000 rpm de 15 dakika çevrilerek serum elde edilmiştir. Serum 56 °C de 30 dakika su banyosunda tutularak inaktive edilmiştir (5).

2.5.2. Zimozan Oponizasyonu

7.5 mg zimozan HBSS tamponu ile 2000 rpm de 10 dakika çevrilerek iki defa yıkanmış, çökeltiye oponizasyonu sağlamak için 0.5 ml serum ilave edilmiş ve karışım 37 °C de 20 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra karışım 2000 rpm de 10 dakika santrifüjde çevrilerek serum uzaklaştırılmıştır. Santrifüjden sonra çökelti HBSS ile bir kez yıkanmıştır. Çökelti üzerine 0.5 ml HBSS ilave edilerek zimozan oponizasyonu hazırlanmıştır (5).

2.5.3. Agaroz Jelinin Hazırlanması

150 mg agaroz 9 ml distile su ilave edilerek 100 °C de 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra üzerine 9 ml HBSS, 2 ml inaktif serum (%10) ve 7.5 mg NaHCO₃ ilave edilmiş, su banyosunda 48 °C de bekletilmiştir. Yukarıda hazırlanmış agaroz jeli (5ml) petri kutularına (Çapı 60x15mm) dağıtılmış,

jel katılaştıktan sonra petri kutuları 4 °C de buzdolabında 30 dakika bekletilmiştir. Agaroz üzerinde oluk açıcı kullanılarak 4 seri, birbirleri ile 2.4 mm mesafe olacak şekilde, 2.4 mm çapında üçlü oluklar açılmıştır (13, 41).

Kemotaksi Deneyinin Yapılışı (Şekil 1)

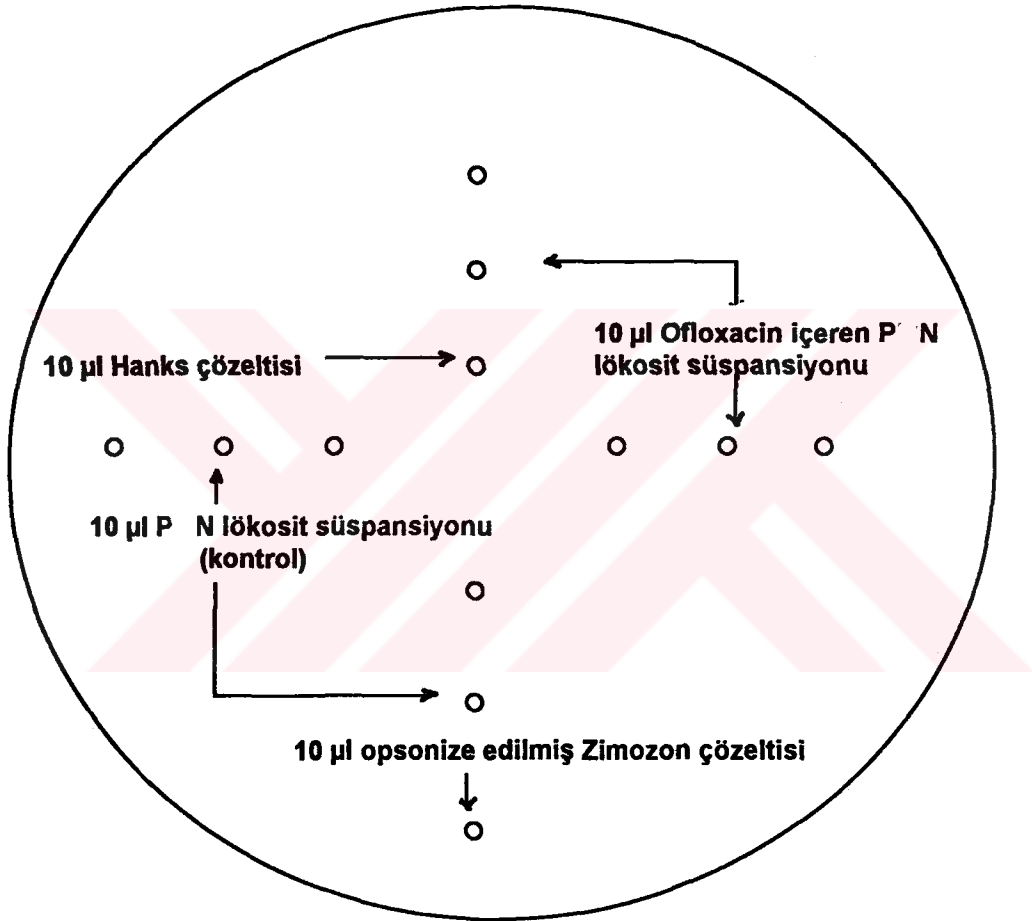
5 ml agaroz dökülen petri kutusunda açılan 2 seri 2.4 mm çapındaki 3 oluğun ortasındaki oluğa 10 µl ofloxacin ile inkübe edilmiş HBSS içindeki P N lökosit süspansiyonu, dıştaki oluğa 10 µl kemotaktik faktör olarak, yukarıda anlatılan opsonize edilmiş zimozan çözeltisi ve içteki oluğa da kemotaktik faktörün kontrolü olarak 10 µl HBSS tamponundan konulmuştur.

Aynı petri kutusunda açılmış olan diğer iki seri 2.4 mm çapındaki 3 oluğun ortasındaki oluğa ofloxacin ile inkübe edilmemiş HBSS içindeki P N lökosit süspansiyonundan 10 µl konmuştur. Diğer oluklara yukarıda ki işlemlerin aynısı uygulanmıştır.

Daha sonra petri kutuları %5 CO₂ içeren nemli ortamda 37°C de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, P N lökositleri agaroz altında fikse etmek için 3 ml metanol ilave edilmiş ve petri kutuları +4 °C de 18 saat bekletilmiştir (41).

Fiksasyondan sonra, agaroz besiyeri petri kutusundan çıkarılmadan Giemsa boyası (1/10) ile 30 dakika boyanmıştır. Daha sonra agaroz üzerinden boya uzaklaştırılmış ve petri

kutusu HBSS (3ml) ile üç kez yıkanmıştır. Agaroz altında PMN lökositlerin kemotaktik faktöre (zimozan) göçü mikroskop altında (10xbüyütme) incelenmiştir. Sub-MİK da inkübe edilmiş ve edilmemiş P N lökositlerin kemotaktik faktöre olan göçü mm olarak ölçülmüştür (21, 41).



Şekil 1- Şematik olarak kemotaksi deneyi

2.6. Bakterisit Etki Deneyi

Bu deneyde Nielsen'in yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (2, 43).

2.6.1. Bakteri Suşunun Hazırlanması

Trypticase Soy Broth besiyerine (1 ml), E.faecalis'in pasajı yapılmış ve besiyeri 37 °C de 18 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra bakteri süspansiyon 3000 rpm de 10 dakika santrifüjde çevrilmiştir. Üst sıvı alınmış ve bakteri 2 kez fizyolojik tuzlu su ile yıkanmıştır (3000 rpm de 10 dakika). Üzerine 1 ml jelatinli HBSS ilave edilmiş ve bakteri süspansiyonu spektrofotometrik metod ile 10^6 cfu/ml ya ayarlanmıştır (6).

Bakterisit Etki Deneyinin Yapılışı

Bu deney altı adet (14x89 mm) tüpte yapılmıştır (Şekil 2).

A) 1. ve 2. tüplerin herbirine; 125 µl ofloxacin ile inkübe edilmiş HBSS içindeki lökosit süspansiyonu (10^7 bakteri/ml HBSS), 100 µl bakteri süspansiyonu (10^7 bakteri /ml HBSS) ve 25 µl inaktive edilmiş serum (%10) konmuştur.

B) 3. ve 4. tüplere; 125 µl ofloxacin ile inkübe edilmemiş HBSS içindeki lökosit süspansiyonu ve yukarıdaki diğer maddelerin aynısı ilave edilmiştir.

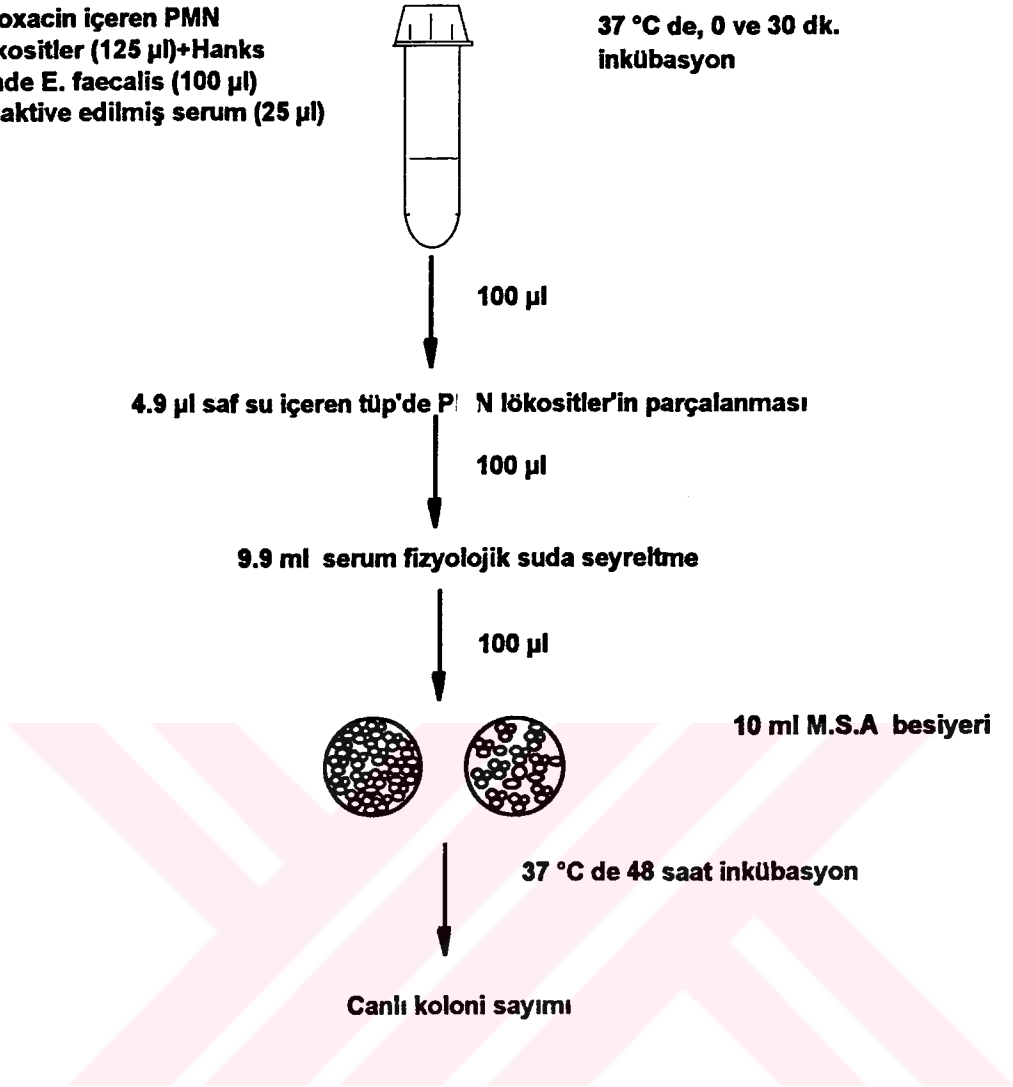
C) 5. ve 6. tüplere ise, kontrol olarak 125 µl PMN lökosit içermeyen HBSS tamponu konmuş ve A-B de anlatılan maddelerin aynısı ilave edilmiştir.

Fagositoz karışımı içeren A,B, ve C kontrol tüpü %5 CO₂ li ortamda 37 °C de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra her tüpteki karışımdan 100 µl alınmış ve üzerine 4.9 ml steril distile su ilave edilerek 1/50 defa sulandırılmıştır. PMN lökositlerin patlatılması için karışımlar hızlı bir şekilde pipetlenmiştir. Bunlardan alınan 100 µl örnekler 9.9 ml fizyolojik tuzlu suda 1/100 sulandırılmıştır. Sulandırılan karışımlardan 100 µl örnekler alınmış ve eritildikten sonra 48°C ye soğutulmuş 10 ml Mitis-Salivarius Agar ile petride karıştırılmıştır. Petri kutuları 37 °C de 48 saat inkübe edilmiştir.

0 zaman ile 30 dakikalık kontrol ve deneyin 48 saat inkübasyonundan sonra petri kutularında üreyen bakterilerin koloni sayımı yapılmıştır.

**Ofloxacın içeren PMN
Lökositler (125 µl)+Hanks
içinde E. faecalis (100 µl)
+inaktive edilmiş serum (25 µl)**

**37 °C de, 0 ve 30 dk.
inkübasyon**



Şekil 3- Şematik olarak bakterisit etki deneyi

2.7. Süperoksit Ölçülmesi

Süperoksit ölçülmesi için gereken deneysel yöntemlerden modifiye edilerek kullanılmıştır (6, 22, 46, 52, 59).

2.7.1. Bakteri Opsonizasyonu

Trypticase Soy Broth besiyerinde 37 °C de 18 saat inkübe edilen bakteri süspansiyonu, 3000 rpm de 10 dakika santrifüjde çevrilmiştir. İki defa serum fizyolojik ile yıkanmış

ve üzerine 1 ml inaktive edilmiş serum ilave edilerek 37 °C de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, karışım 3000 rpm de santrifüjde çevrilerek serum uzaklaştırılmıştır. Üzerine 1 ml jelatinli HBSS ilave edilerek, bakteri süspansiyonu (10^6 cfu/ml) olacak şekilde sulandırılmıştır (5).

Süperoksit Ölçülmesi Deneyinin Yapılışı

Süperoksidin ölçülmesi bakterisit etki deneyinde olduğu gibi 6 adet (14x98) tüplerde yapılmıştır (Şekil 3).

A) 1. ve 2. tüplere; 100 µl ofloxacin ile inkübe edilmiş HBSS içindeki lökosit süspansiyonu 100 µl opsonize edilmiş *E.faecalis* süspansiyonu (10^7 cfu/ml), 5 µl opsonize edilmiş zimozan ve 95 µl ferrisitokrom C çözeltisi konmuştur.

B) A deneyinin kontrolü olarak 3. ve 4. tüplere; 100 µl ofloxacin ile inkübe edilmemiş HBSS içindeki lökosit süspansiyonu (10^7 /ml) ve A deneyindeki maddelerin aynısı ilave edilmiştir.

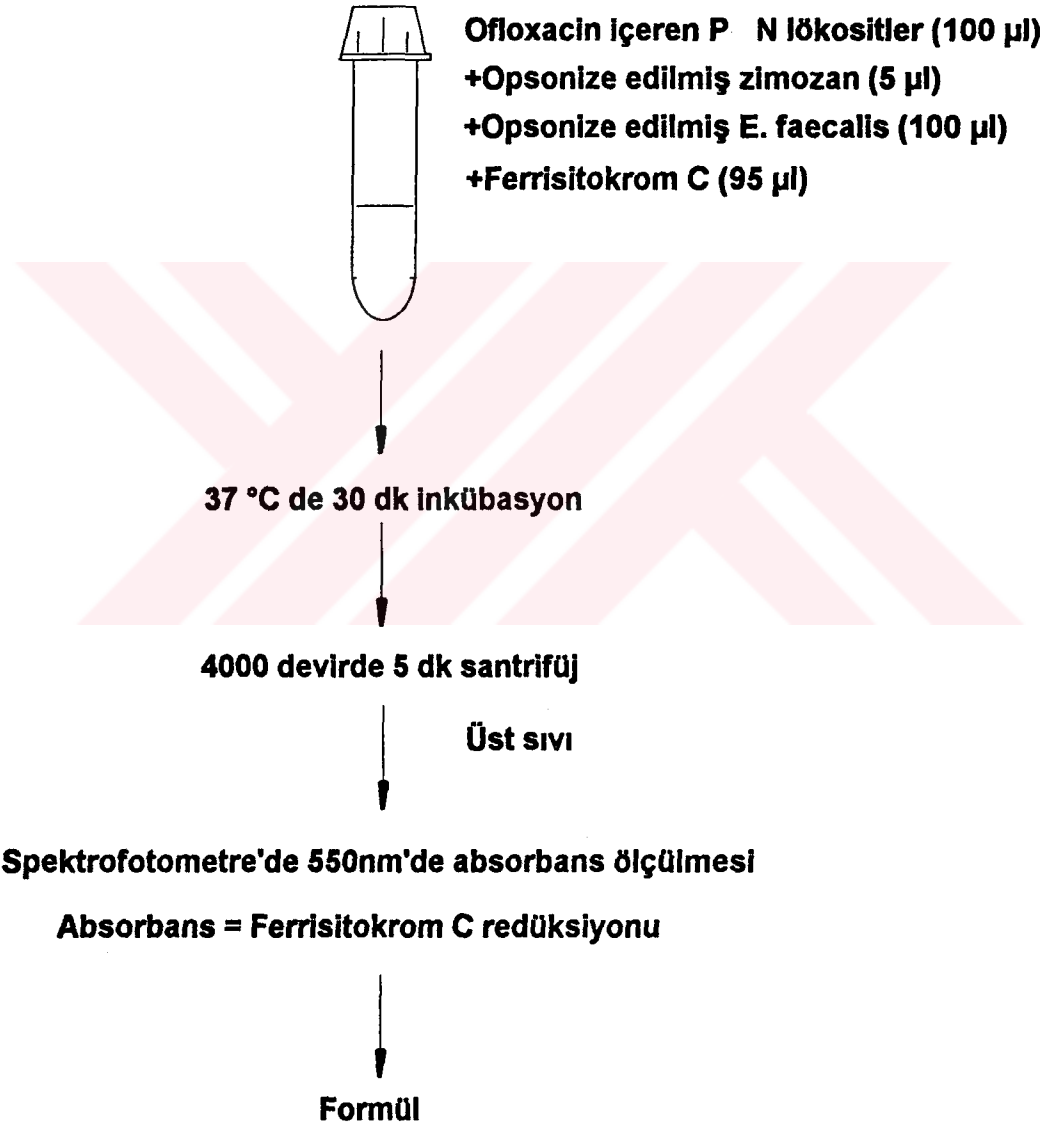
C) 5. ve 6. tüplere ise, P N lökosit içermeyen 100 µl HBSS tamponu konmuş ve tüpe A,B deneyindeki aynı maddeler ilave edilmiştir.

A, B tüplerdeki reaksiyon karışımları ve C kör tüpü %5 CO₂ içeren ortamda 37 °C de 30 dakika inkübe edilmiştir. Üst sıvı alınmış ve ferrisitokrom C redüksiyonu spektrofotometrede 550 nm de ölçülmüştür. Reaksiyon

sonunda oluşan süperoksit miktarı aşağıda formülle hesaplanmıştır (22).

Formül:

O_2 (nmol)=absorbans (A) X inkübasyon karışım hacmi X47.4



Süperoksit (nmol) = Abs x Karışım miktarı x 47.4

Şekil 3- Şematik olarak süperoksit ölçülmesi deneyi

BULGULAR

2.1. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tayini

Ofloxacin'in E. Faecalis (24) suşuna karşı (10^6 cfu/ml) sub-MİK değeri (1/2 MİK) 1.56 mg/L olarak bulunmuştur.

2.2. Lökosit (P N) Canlılık Testi

Canlılık testinde, P N lökositlerin %98'i canlı olarak bulunmuştur.

2.3. Ofloxacin'in Aderens Üzerine Etkisi :

Ofloxacin ile inkübe edilmemiş ve Sub-MİK da ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerin protein miktarı Tablo 1 de görülmektedir.

Protein miktarları kontrol grubunda 42.5, 41, 43.2, 33, 35.8,34.2, 32.5, 34.2, $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunduğu halde deney grubunda Sub-MİK'da ofloxacinden etkilenen P N lökositlerdeki protein miktarı 41.2, 43.4, 47, 43.6, 47.8, 39.2, 37.4, 37 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.

Sub-MİK'da ofloxacin aderensi, kontrole göre anlamlı olarak arttırmıştır (t: 2.35, $p=0.05$ paired T. test). Protein ortalama konsantrasyonları Sub-MİK'da ofloxacin'in 42.07 ± 4.10 $\mu\text{g/ml}$, kontrol grubunda ise $37.05 + 4.44$ $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.

Tablo 1. Sub-MİK da ofloxacin'in P N lökositlerin aderensi üzerine etkisi

Total protein miktarları (µg/ml)

Numune No	Sub-MİK da ofloxacin ile inkübe edilmiş P N'lerde (Deney) aderens (1.56 µg/ml)	Ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N'lerde (kontrol) aderens
1	41.2	42.5
2	43.4	41
3	47	43.2
4	43.6	33
5	47.8	35.8
6	39.2	34.2
7	37.4	32.5
8	37	34.2

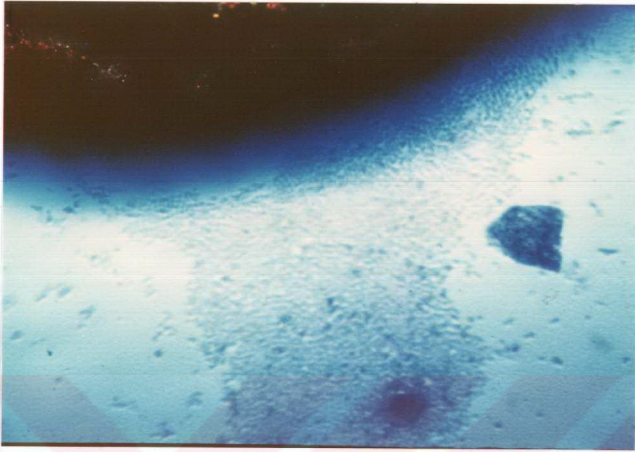
Tablo 2. Sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerin (deney) ve ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N lökositlerin (kontrol) mikrotitrasyon plaklarındaki yüzeye aderensi

Antibiyotik	Konsantrasyon	Aderens(µg/ml)	S.D.
Kontrol	-----	37.05	4.43
Ofloxacin	1.56	42.70	4.10
t: 2.36	P=0.05	(Paired T-test)	

2.4.Ofloxacin'in Kemotaksi Üzerine Etkisi:

Sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerin kemotaktik faktöre (zimozan) olan göçü 1.3 mm, ofloxacin ile muamele edilmemiş kontrol P N lökositlerde kemotaktik faktöre göç 1.0 mm olarak bulunmuştur. Sub-MİK'deki ofloxacin P N lökosit göçünü az da olsa arttırmıştır. Resim 1. de deney sonuçları görülmektedir.





Resim 1.a
(Deney)



Resim 1.b
(Kontrol)

2.5.P N Lökositlerin Bakterisit Etkisi Üzerine Ofloxacin'in Etkisi

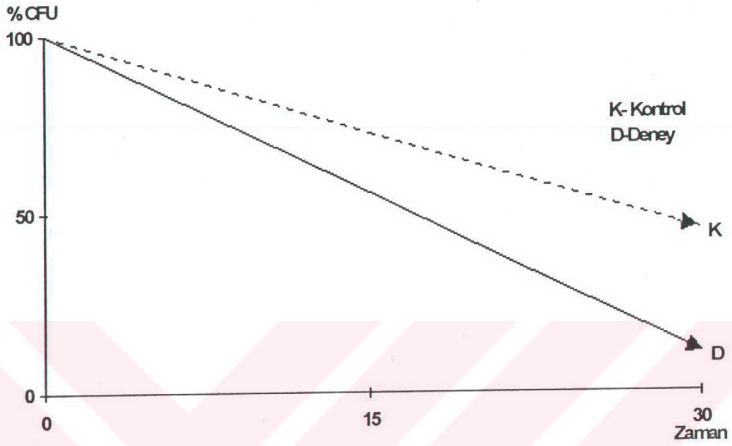
Sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerin bulunduğu fagositoz karışımından (0) zamanda alınan örnekte cfu sayısı yaklaşık 100 cfu/ml, 30 dakikada 11 cfu/ml bulunmuştur. Ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N lökositlerin bulunduğu fagositoz karışımından (0) zamanda alınan örnekte cfu sayısı yaklaşık 100 cfu/ml, 30 dakikada 45 cfu/ml saptanmıştır.

Deney sonuçlarında görüldüğü gibi sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerin fagositoz oranı %89 görülürken, kontrol grupta, ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N lökositlerin fagositoz oranının %55 görülmüştür.

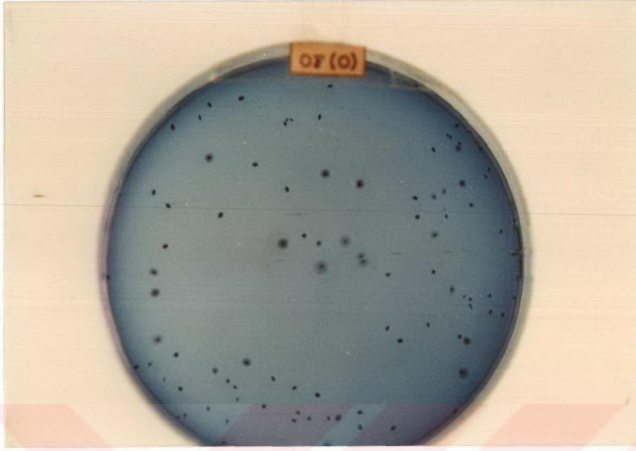
Deney sonuçları: Tablo 3, Şekil 4, Resim 2, 3 ve 4 görülmektedir.

Tablo 3 Sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş (deney) ve ofloxacin ile inkübe edilmemiş (kontrol) P N lerin *E.faecalis*'e karşı bakterisit etkisi:

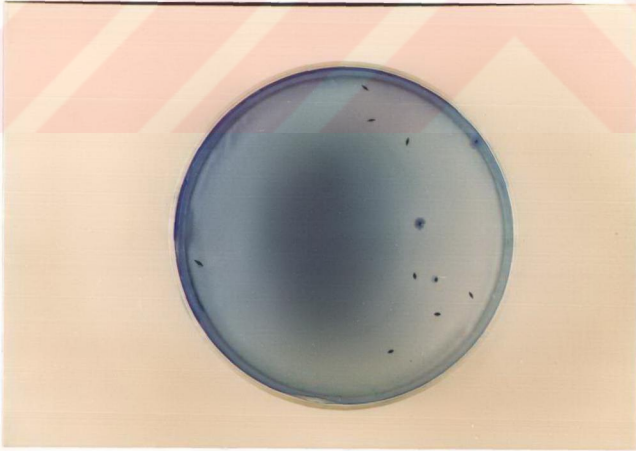
Zaman (dakika)	Sub-MİK'da ofloxacin miktarı (1.56 mg/l)	
	Kontrol (cfu/ml)	Deney (cfu/ml)
0	100	100
30	45	11



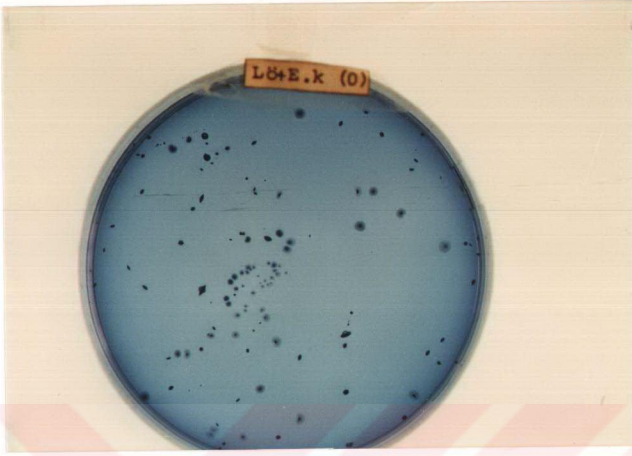
Şekil 4- Sub-MİK'da ofloxacin ile 30 dakika inkübe edilmiş (deney) ve ofloxacin ile inkübe edilmemiş (kontrol) P N'lerin *E.faecalis*'in total sayısı üzerine bakterisit etkisi (cfu%).



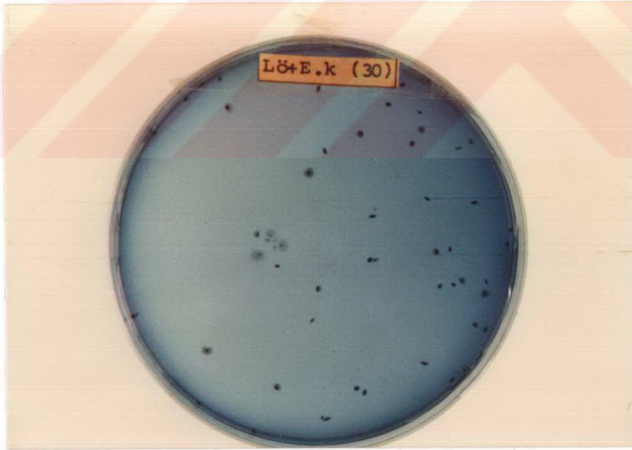
Resim 2a. Sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş P. N lökositlerin bulunduğu fagositoz karışımından (0) zamanda alınan örnekte (100 µl) üreyen *E. faecalis* kolonilerinin Mitis Salivarius Agarda görünüşü.



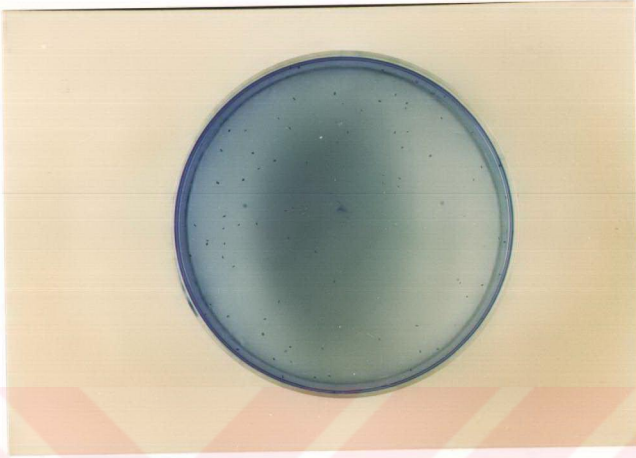
Resim 2b. Sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş P. N lökositlerin bulunduğu fagositoz karışımından (30') zamanda alınan örnekte (100 µl) üreyen *E. faecalis* kolonilerinin Mitis Salivarius Agarda görünüşü.



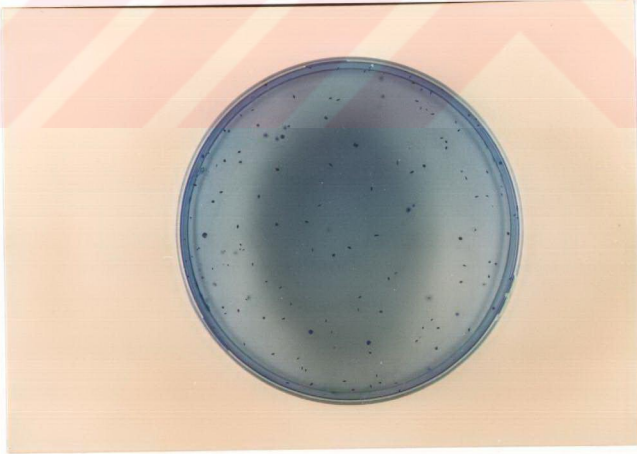
Resim 3a- Ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N lökositlerin bulunduğu fagositoz karışımından (0) zamanda alınan örnekte (100 µl) üreyen *E.faecalis* kolonilerinin Mitis Salivarius Agar da görünüşü.



Resim 3b. Ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N lökositlerin bulunduğu fagositoz karışımından (30') zamanda alınan örnekte (100 µl) üreyen *E.faecalis* kolonilerinin Mitis Salivarius Agar da görünüşü.



Resim 4a. P N lökositlerin bulunmadığı fagositoz karışımından (0) zamanda alınan örnekte (100 µl) üreyen E.faecalis kolonilerinin Mitis Salivarius Agar da görünüşü.



Resim 4b. P N lökositlerin bulunmadığı fagositoz karışımından (30') zamanda alınan örnekte (100 µl) üreyen E.faecalis kolonilerinin Mitis Salivarius Agar da görünüşü.

2.6 Ofloxacin'in Süperoksit Üzerine Etkisi

Sub-MİK'da ofloxacin ile 37 °C de inkübe edilmiş P N'ler (deney) ile ofloxacin ile inkübe edilmemiş (kontrol) P N'lerin *E.faecalis*'e karşı oluşturduğu süperoksit anyon miktarı Tablo 4 de görülmektedir. Süperoksit miktarı deney grubunda 5.74 nmol/10⁶ lökosit, kontrol grubunda 4.37 nmol/10⁶ lökosit olarak bulunmuştur.

Deney sonuçlarına göre Sub-MİK'da ofloxacin P N lökositlerin süperoksit oluşumunu attırmaktadır.

Tablo 4. Sub-MİK'da ofloxacin ile 37 °C de 30 dakika inkübe edilmiş P N lökositlerin (deney) ve ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N lökositlerin (kontrol) *E.faecalis* suşuna karşı oluşturduğu süperoksit miktarı.

Antibiyotik	Konsantrasyon (mg/l)	Süperoksit (nmol/10 ⁶ P. NL)
Kontrol	-----	4.37
Ofloxacin	1.56	5.74

* Değerler üçlü çalışmaların ortalamasıdır.

Tartışma

Bu çalışmada sub-MİK'da ofloxacin ile 37 °C de 30 dakika inkübe edilmiş P N lökosit fonksiyonlarında (aderens, kemotaksi, bakterisit etki, süperoksit oluşumu) bir artış olduğu saptanmıştır.

Literatürde görüldüğü gibi in vitro koşullarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların in vivo uygulanması, bazı durumlarda tehlikeli olabilir. Örneğin; norfloxacin'in in vitro Gram pozitif bakterilere etkisinin diğer kinolonlardan daha az olmasına karşın, in vitro bu antibiyotığın P N lökositlerin S . aureu'a karşı fagositoz ve bakterisit etkisini arttırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte klinik değeri yüksek olan ciprofloxacin'in in vitro P N lökositlerin bakterisi etkisine aynı etkiyi göstermemiştir (10). Bu çelişkili sonuçlar, in vitro ve in vivo koşullardaki konsantrasyon ve farmakokinetik farklılıkların sonucu olabilir (10). Antibiyotik kullanan hastalarda, kan hücrelerinin fagositoz fonksiyonları üzerine yapılmış çalışmalar çok azdır. Ayrıca immun sistemi normal işleyen sağlıklı gönüllülerde in vivo antibiyotik etkinliğini araştıran incelemeler çok azdır (7).

Çalışmamızda; sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerde aderens, 42.70 ± 4.10 µg/ml iken, ofloxacin ile inkübe edilmemiş kontrol P N lökositlerde 37.05 ± 4.44 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu bulgular sub-MİK'da ofloxacin'in P N lökositlerin aderensini arttırdığını göstermektedir. Ofloxacin'in in vitro plastik yüzeye yapışması

ile ilgili her hangi bir literatüre rastlanmamıştır. Ancak Vander ve Husson (3) yaptıkları çalışmada 6mg/L konsantrasyonda rifampicin ile anamycin'in in vitro aderens üzerine önemli ölçüde arttırıcı etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar kullandıkları iki antibiyotiğin aderens üzerine etki mekanizmaları hakkında bilgi vermemişlerdir.

Çalışmamızda sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerin kemotaktik faktöre doğru göçü 1.3 mm, ofloxacin ile inkübe edilmemiş kontrol P N lökositlerin göçü 1.0 mm olarak bulunmuştur. Sub-MİK'da ki ofloxacin, P N lökosit göçünü az da olsa arttırmıştır.

Birçok antibiyotiğin kemotaksi üzerine etkisi incelenmiştir. Ancak incelenen antibiyotiklerin kemotaksi üzerine etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemektedir. Bu konu ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Örneğin; P N lökositlerin damar endotelinin yüzeyine yapışmasının zayıflatılması, antibiyotiğin Ca ve Mg iyonları ile birleşerek hücrenin büzülmesine neden olması, P N lökositlerinin membran sıvısının değişikliğe uğraması veya kemotaktik faktörlerin aktive olması sonucu olabilir (3). Boogaerts ve arkadaşlarının (10, 17) yapmış oldukları çalışmada P N lökositlerin kemotaktik faktöre (bakteri fragmentleri) doğru göçünün ofloxacin (1mg/L, 10/L) tarafından arttırıldığı bildirilmiştir. Lombard ve arkadaşları (7) çalışmalarında ofloxacin, pefloxacin ve norfloxacin'in kemotaksi üzerine önemli derecede etki göstermediklerini bildirmişlerdir.

Antibiyotiğin PMN lökositler tarafından alınmasının, lökosit içinde canlı kalabilen Patojen mikroorganizmaların öldürülmesinde önemi bildirilmiştir (29). Her zaman antibiyotiğin hücreler tarafından alınmasının, onun hücre içinde intrasellüler aktivite gösterebilmesi için yeterli olmadığı gösterilmiştir. Örneğin; Pascial ve arkadaşları (42, 45) ciprofloxacın ve ofloxacın'ın hücre içine yeterli miktarda alındığında, fagositik hücre içine alınan St.aureus'u öldürdüğü halde, St.epidermidis'e etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan antimikrobik ilacın PMN lökosit içinde birikmesi, bazen hücrenin normal fonksiyonları için tehlikeli olabilir. Örneğin; Hücre içine girebilen bir antibiyotik olan rifampicin, hücrenin normal fonksiyonlarını azalttığı ve lenfosit fonksiyonu üzerine immunosüpresif etki gösterdiği bildirilmiştir (25).

Deneylerde fagositoz karışımında antibiyotik içeren Hanks'ın ve serumun bulunması, ortamda bulunan bakteri üzerine etki ederek bakteri sayısının azalmasına neden olabilir (11). Böylece bakteri sayısındaki azalma lökositler tarafından mı, HBSS içinde bulunan antibiyotik veya serum tarafından mı olmaktadır kesin olarak bilmek mümkün değildir (5, 11). Bu nedenle deneylerimizde ofloxacın ile inkübe edilmiş P N lökositler, E.faecalis'e karşı fagositoz işlemine tabi tutulmadan deney başlangıcında Hanks içindeki ofloxacın yıkama işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Ayrıca serumun antimikrobik etkisi ısı ile uzaklaştırılmıştır. Fagositoz da aldığımız sonuçlar, yukarıda anlatıldığı gibi antibiyotik

tarafından etkilenen P N lökositlerin fonksiyonlarından kaynaklanmaktadır.

Çalışmamızda; ofloxacin ile inkübe edilmiş PMN lökositlerin E.faecilis'e karşı bakterisit etkisi 0 zamanda yaklaşık %0, 30 dakikada %89 olurken, ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N lökositlerin bakterisit etkisi 0 zamanda yaklaşık %0, 30 dakikada %55 olarak bulunmuştur. Bu bulgular sub-MİK'da ofloxacin'in P N lökositlerin E. faecalis'e karşı fagositoz hızını arttırdığını göstermektedir. P N lökositlerin fagositoz hızının artmasında, çeşitli faktörlerin rolü olabilir. Ofloxacin'in liposolubilitesi ve lökosit içine diffüze olma kabiliyeti ciprofloxacin ve enoxacin'den daha fazla olduğu gösterilmiştir (19, 32). Nielsen ve Nielsen'in (43) çalışmalarında, P N lökositler içine alınan ofloxacin'in fagosite edilmiş bakteri ile teması sonucu, bakterinin daha duyarlı hale geldiğini ve lökosit içinde bulunan antimikrobik sistemin duyarlılığının arttığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda da, antimikrobik sistemin elemanlarından olan süperoksit oluşumunda bir artış saptanmıştır. Ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerde süperoksit oluşumu 5.74 nmol/10⁶ lökosit, kontrol lökositlerde 4.37 nmol/10⁶ lökosit olarak bulunmuştur. Bu bulgular ofloxacin'in süperoksit oluşumunu arttırdığını göstermektedir.

Nielsen ve Nielsen'in (43) yapmış oldukları çalışmada, sub-MİK'da ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerin *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı bakterisit etkinin, ofloxacin ile inkübe edilmemiş kontrol P N lökositlere oranla daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Boogaerts ve arkadaşları (10) çalışmalarında P N lökositlerde süperoksit oluşumundan sorumlu olan hekzoz monofosfat yolunun, ofloxacin tarafından stimule edildiğini bildirmişlerdir. Tramb ve arkadaşlarının (55) yapmış oldukları çalışmada, ofloxacin'in lökosit içinde bulunan *S. marcescens* üzerine bakterisit etkisi rifampicin ile karşılaştırılmış ve üç saat süre içinde, ofloxacin'in bakterisit etkisi %99, rifampicin'in etkisi %97 oranında bulunmuştur.

Literatür ve bulgularımızın ışığı altında, ofloxacin'in P N lökositlerin fonksiyonlarını arttırıcı etkisi yanında intrasellüler aktivitesinin yüksek olması nedeni ile intrasellüler enfeksiyonların tedavisinde ve PMN lökositlerdeki süperoksit oluşumunun az olduğu kronik granülomatoz'lu hastalarda, lökositlerinde süperoksit oluşumunu stimule edici profilaktik bir ilaç olarak kullanılabileceği düşünülebilir .

ÖZET

Bu çalışmada ofloxacin'in Sub-MİK'da *E.faecalis*'e karşı P N lökosit fonksiyonlarından aderens, kemotaksi, bakterisit etki, süperoksit oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Sub-MİK'da ofloxacin ile daha önceden 37 °C de 30 dakika inkübe edilen P N lökositlerin fonksiyonlarında bir artış saptanmıştır. Ofloxacin'in aderens üzerine etkisi Lowry yöntemi ile plastik yüzeye yapışan hücrelerin protein miktarı ölçülerek bakılmıştır. Ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerde ölçülen protein miktarı $42.7 \pm 4.10 \mu\text{g/ml}$, ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N'lerde $37.05 \pm 4.44 \mu\text{g/ml}$ bulunmuştur. Kemotaksi deneyi agarozaltı jel yöntemi ile yapılmıştır. Ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerin kemotaktik faktöre doğru göçü 1.3 mm, ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N lökositlerin göçü 1.0 mm olarak gözlenmiştir. Bakterisit etki tayini 0 ve 30 dakika zamanlarda incelenmiştir. 0 zamanda antibiyotikli ve antibiyotiksiz olan fagositoz karışımından alınan örnekler de üreyen *E.faecalis* kolonileri 100 (cfu/ml), 30 dakika sonra antibiyotikli ve antibiyotiksiz olan fagositoz karışımından alınan örneklerde koloni sayımı sıra ile 11 ve 45 (cfu/ml) bulunmuştur. Ofloxacin'in süperoksit oluşumu üzerine etkisi, ferrisitokrom C redüksiyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile araştırılmıştır. Ofloxacin ile inkübe edilmiş P N lökositlerde süperoksit miktarı $5.74 \text{ nmol}/10^6$ lökosit, ofloxacin ile inkübe edilmemiş P N lökositlerde $4.37 \text{ nmol}/10^6$ gözlenmiştir.

SUMMARY

In this investigation, the effect of ofloxacin in sub-MIC on PMN leukocyte functions (adherence, chemotaxis, bactericidal activity, and superoxide production) against *E.faecalis* was studied.

The incubation of PMNL with ofloxacin for 30 minutes at 37 °C showed an increase in above mentioned PMNL functions. The effect of ofloxacin on adherence was measured using Lowry method by determining the amount of cell proteins adhered to plastic surface. The amount of protein in incubated of PMNL with ofloxacin was 42.7 ± 4.10 µg/ml, while in control, it was 37.05 ± 4.44 µg/ml. Chemotaxis experiment was performed by under Agaroz method. Migration distances of PMNL towards chemotactic factor for incubated PMNL with ofloxacin and control PMNL were 1.3 mm, 1.0mm respectively, The bactericidal activity of PMNL was studied at 0 time and after 30 minutes. At 0 time, the number of *E.faecalis* colonies in phagocytic mixture with ofloxacin and without ofloxacin was approximately 100 cfu/ml, while after incubation for 30 minutes, the number of colonies with ofloxacin was 11 cfu/ml and without ofloxacin it was 45 cfu/ml. The effect of ofloxacin on superoxide production was investigated by measuring ferricytochrom C reduction spectrophotometrically. The amount of superoxide formed in incubated PMNL with or without ofloxacin were 5.7 nmol/ 10^6 PMNL and 4.37 nmol/ 10^6 PMNL respectively.

KAYNAKLAR

1. Akiko IO et al: Purification and characterization of Aseanostatins: Actinamycet-derived Fatty acid inhibitors to myeloperoxidase release from human polymorphonuclear leukocytes, J Anitibiot 44: (5) 524-531 (1991).

2. Alexandev J and Good R : Effect of antibiotics on the bactericidal activity of human leukocytes, J Lab Clin Med 71: (6) 971-983 (1968).

3. Auwera PV, Husson M : Influence of rifampicin and ansamycin on motility and adherence of human neutrophils studied in vitro, J Antimicrob Chemother 24: 347-353 (1989).

4. Babior BM : Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes, J Med 298:659-666 (1978).

5. Babior BM, Cohen HJ: Measurement of neutrophil Function: phagocytosis, degranulation, the respiratory burst and bacterial cline M.J, PP 1-38 Churchill livingstone, NewYork, Edinburgh, London, and Melbourne, USA (1981).

6. Babior BM, Ruby S, Kipnes and Curnutte TJ : The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent, J Clin Invest 52: 741-744 (1973).

7. Badur S : Antimikrobiklerin immun sistemi istenmeyen etkileri, Klinik Derg. 4 : (3) 105-108 (1991).

8. Baron E. and Finegold S : Diagnostic Microbiology, 351 California (1990).

9. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları, Bilgehan Basımevi 71-72 Bornova İzmir (1990).

10.Boogaerts MA, Malbrain S, Scheers W, Verwilghen RL: Effects of Quinolones on granulocyte function in vitro, Infection 14: (4) 258-262 (1986).

11.Bruck van den R J: Antimicrobial drugs, mikroorganizms, and phagocytes, Rev Infect Dis 11: (2) 213-245 (1989).

12.Curtis G. et al : Potentiation of opsonization and phagocytosis of Streptococcus pyogenes following growth in the presence of clindamycin, J Clin Invest 67 : 1249-1256 (1981).

13.Cutler E J : A simple invitro method for studies on chemotaxis, Exp Biol Med , 147: 471-474 (1974).

14.Çetin E T : Genel ve Pratik Mikrobiyoloji, 441-442 İstanbul (1973).

15.Dahinden C, Fehr J, and Hugli T : Role of cell surface contact in the kinetics of superoxide production by granulocytes, J Clin Invest 72: 113-121 (1983).

16.Daniel P, Stites MD, Abba I. Terr MD : Basic and Clinical Immunology California 143 : (1991).

17.Desnottes JF: Quinolones et phagocytes, Pathol Biol 35:1426-30 (1987).

18.Durmaz Ö : Biyolojik yanıtı değiştirici ajan olarak antibiyotikler, Lancet 8738 : 400-401 (1991).

19.Easmon C. and Crane J: Uptake of ciprofloxacin by human neutrophils, J Antimicrob Chemother 16 : 67-73 (1985).

20.Etel M, Veringa, J. Verhoef: Clindamycin at subinhibitory concentrations enhances antibody and complement-dependent phagocytosis by Staphylococcus aureus, Chemotherapy 33: 243-249 (1987).

21.Freeman G, Elisabeth, Catherine A. Dalton and Feter M. Brooks: A Nycodenz gradient method for the purification of neutrophils from the peripheral blood of rats, J Immunol Methods 139: 241-249 (1991).

22.Gabler WL, Cramer HR: Supression of human neutrophil functions by tetracyclines, J Periodont Res 26: 52-58 (1991).

23. Gemmel C, and Dowd A: Regulation of protein A biosynthesis in Staphylococcus aureus by certain antibiotics: its on phagocytosis by leukocytes, J Antimicrob Chemother 12 : 587-597 (1983).

24. Hirsch J, Bernheimer A, and Weissman G: Motion picture of the toxic action of streptolysins on leukocytes, The J Exp Med 118 : 223-227 (1963).

25. Hoger PH, et al : Uptake, intracellular activity , and influence of rifampin on normal function of polymorphonuclear leukocytes, Antimicrob Agents Chemother 28:(5) 667-674 (1985).

26. Howard B, Klaas J, Rubin S, Weissfeld A, Tilton R : Clinical and Pathogenic Microbiology, 14-25 Toronto (1987).

27. Jefre L. et al: A visual assay for quantitating neutrophil chemotaxis in a collagen gel matrix, J Immunol Methods 141: 41-52 (1991).

28. Jensen P, and Kharazmi A : Computer assisted image analysis assay of human neutrophil chemotaxis in vitro, J Immunol Methods 144 : 43-48 (1991).

29. Judith K. Park and R.C. Dow: The uptake and localization of tetracycline in human blood cells, Br J Exp Pathol 51-179 (1970).

30.Kılıçturgay K, Gökıramk F, Töre O, Göral G, Helvacı S: Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji, 109-123 Onur Yayıncılık (1992).

31.Labro M, Amit N, Babin C, Hakim J : Cefodizime (HR 221) potentiation of human neutrophil oxygen-independent bactericidal activity, J Antimicrob Chemother 19: 331-341 (1987).

32.Lockley M, Wise R, and Dent J: The pharmacokinetics and tissue penetration of ofloxacin, J Antimicrob Chemother 14 : 647-652 (1984).

33. Lohr M, Snyderman R : Amphotericin B alters the affinity and functional activity of the oligopeptide chemotactic Factor receptor on human PMN leukocytes; J Immunol 129 : 1594 - 99 (1982).

34.Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A.L. Rendall R. S: Protein measurement with the folin phenol reagent, J Biol Chem 3: 265 (1952).

35.Meço O, Willke A, Balık I ve Kurt H : Antimicrobiyal Kemoterapi Günleri, 92-97 Ankara (1992).

36.Menegazzi R, Zabucchi G, Zuccato P, Cramer R, Piccinini C and Patriarca P: Oxidation of homovanillic acid as a selective assay for eosinophil peroxidase in eosinophil peroxidase-myeloperoxidase mixtures and its use in the detection of human eosinophil peroxidase deficiency, J Immunol Methods 137: 55-63 (1991).

37.Milatovic D: Influence of subinhibitory concentrations of antibiotics on opsonization and phagocytosis of Pseudomona aeruginosa by human PMN leukocytes, Eur J Clin Microbiol 3 : (4) 288-293 (1984).

38.Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, and Niwa Y: Effect of antibiotics on the generation of reactive oxygen species, J Invest Dermatol 86: 449-453 (1986).

39.Müftüoğlu E: Klinik Hematoloji ve Immunoloji, Diyarbakır 233-238 (1988).

40.Murray P, Drew W, Kobayashi G, Thompson J : Medical Microbiology, 82-83 London (1990).

41.Nelson D. Robert, Quie G. Paul and Simmons L. Richard: Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes, J Immunol 115: (6) 1650-1656 (1975).

42.Neu H.C, Wenta H: 1 st International Ciprofloxacin Workshop, 220-223 Leverkusen (1985).

43.Nielsen B and Nielsen H: bactericidal effect of polymorphonuclear leukocytes on Pseudomonas aeruginosa pre-incubated in ofloxacin, acta Path Microbiol Immunol Scand Sect B 95: 227-232 (1987).

44.Pascual A Martinez Martinez L, Aragon J, Perea EJ: Effect of Amoxicillin and clavulanic Acid, Alone and in combination on human polymorphonuclear leukocyte function against Staphylococcus aureus, Eur J Clin Microbiol 8: (4) 277-281 (1989).

45.Pascual A, Martinez-Martinez L, Perea EJ : Effect of ciprofloxacin and ofloxacin on human polymorphonuclear leukocyte activity against Staphylococci, Chemotherapy 35 : 17-22 (1989).

46.Pick E, Mizel D: Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader, J Immunol Methods 46 : 211-226 (1981).

47.Reeves D S, Bywater H A, Holt and White L O: In vitro studies with ciprofloxacin, a new 4-quinolone compound, J Antimicrob Chemother 13: 333-346 (1984).

48.Repo H, Leirisalo M, Kosunen U T: Neutrophil chemotaxis under agarose: a statistical analysis and comparison of the chemotactic response of cells from different donors, J Immunol Methods 46: 227-242 (1981).

49.Roilides E, Thomas J, Rubin M, Venzon D, and Philip A: Effect of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro, Antimicrob Agents Chemother 34 : (2) 196-201 (1990).

50.Roitt G: Essential Immunology, 1-14 Oxford-London-Edinburg (1989).

51.Sabrinah E, Chapman K, Wasvary SJ and Seligman BE: Superoxide anion production from human neutrophils measured with an improved kinetic and endpoint microassay, J Immunol Methods 142: 95-104 (1991).

52.Shapiva L, Borinski R, Sela M.N and Soskohme A : Superoxide formation and Chemiluminescence of peripheral polymorphnuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients, J Clin Periodontol 18 : 44-48 (1991).

53.Sonnenwrith A, Jarett L: Gradwohl's Clinical Laboratory and Diagnosis, 794-796 London (1980).

54. Tanaka M, Otsuki M, Une T, and Nishino T : I-vitro and in vivo activity of DR-3355, an optically active isomer of ofloxacin, J Antimicrob Chemother 26 : 659-666 (1990).

55. Traub W, Spohr M, and Baver D : Intraphagocytic bactericidal activity of ofloxacin compared with that of aztreonam and ceftriaxone against *Serratia marcescens*, Zbl Bakt Hyg A 261 : 85-94 (1986).

56. Verhoef J, Peterson KP, Quie PG : kinetics staphylococcal opsonization, attachment, ingestion and killing by human PMN leukocytes : A Quantitative assay using (³H) thymidine labeled bacteria, J Immunol Methods 14 : 303-311 (1977).

57. Wesley J, Windhorst D, and Good R : Improved tests for the evaluation of neutrophil function in human disease, J Lab Clin Med 72 : 136 -147 (1968).

58. Wilson M: Effect of bacterial Endotoxins on neutrophil function, Rev Infect Dis 7 : (3) 404-418 (1985).

59. Yoshimasa N, Tomoyuki K, Junko S, Taeko T, Setsuyashi U, Michiharu S : Novel inhibitors of superoxide anion generation OPC-15160 and OPC-15161, J Antibiot 44 : (1) 52-57 (1991).