

ANTİMİKROBİK ETKİLİ KATYONİK PEPTİTLERİN TEK BAŞINA VE KOMBİNASYON HALİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

Sibel DÖŞLER*, Bülent GÜRLER**

*İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

** İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Günümüzde, antibiyotiklere karşı görülen direncin oldukça yüksek düzeylere ulaşması, araştırmacıları yeni antimikrobik etkili kaynakların arayışına yöneltmiştir. Yakın gelecekte kullanılması düşünülen bu maddeler arasında en fazla umut vaat eden grup antimikrobik etkili katyonik peptitlerdir. Çalışmamızda farklı yapılarıdaki katyonik peptitlerden kolistin metansülfonat (kolimisin), mellitin ve nisin hastalardan infeksiyon etkeni olarak izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve *Enterococcus faecalis* suşları üzerine tek başına ve sık kullanılan antibiyotiklerden amikasin, seftazidim, imipenem, siprofloksasin, ampisilin, eritromisin ve vankomisinle kombinasyon halinde in-vitro etkileri araştırılmıştır.

Mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara göre Gram negatif bakterilerden *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarına karşı kolistin metansülfonatın MİK₉₀ değerleri sırasıyla 2 µg/ml, 0.5 µg/ml ve 1 µg/ml; mellitin ise >64 µg/ml, 8 µg/ml ve 32 µg/ml; Gram pozitif bakterilerden MSSA, MRSA ve *E.faecalis* suşlarına karşı mellitin MİK₉₀ değerleri sırasıyla 8 µg/ml, 8 µg/ml ve 8 µg/ml; nisin ise 16 µg/ml, 16 µg/ml ve 16 µg/ml olarak bulunmuştur. Antimikrobik etkili katyonik peptitlere ait MBK değerleri genellikle MİK değerlerine eşit ya da iki katı olarak bulunmuştur. Kombinasyon çalışmalarında en fazla sinerjist etki kolistin metansülfonat-siprofloksasin kombinasyonu ile (% 54) *P.aeruginosa*, kolistin metansülfonat-imipenem kombinasyonu ile (sırasıyla % 50 ve % 54) *E.coli* ve *K.pneumoniae*, nisin-imipenem kombinasyonu ile (% 67) MRSA, nisin-ampisilin kombinasyonu ile (sırasıyla % 67 ve % 47) MSSA ve *E.faecalis* suşlarına karşı elde edilmiş, denenen kombinasyonların hiçbirinde antagonist etki görülmemiştir.

Anahtar sözcükler: kolistin metansülfonat, kombinasyon, mellitin, nisin

SUMMARY

In-vitro Activities of Antimicrobial Cationic Peptides Alone and in Combination with Antibiotics

Since levels of antibiotic resistance have been increasing at an alarming rate worldwide, cationic peptides seems to be the most preferable class of antimicrobial substances in the near future as therapeutic agents. In this study, the in vitro activities of antimicrobial cationic peptides colistin methanesulphonate (colimycin), mellitin and nisin alone and in combination with frequently used antibiotics such as amikacin, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin, ampicillin, erythromycin and vancomycin were assessed in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) and *Enterococcus faecalis*.

Using the microdilution method, MIC₉₀ values of cationic peptides against Gram negative *P.aeruginosa*, *E.coli* and *K. pneumoniae* strains were 2 µg/ml, 0.5 µg/ml and 1 µg/ml with colistin methanesulphonate, >64 µg/ml, 8 µg/ml and

Yazışma adresi: Sibel Döşler, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beyazıt, İSTANBUL
Tel.: (0212) 440 02 57, GSM: (0532) 667 41 29
e-posta: sibeldosler@hotmail.com

Alındığı tarih: 11.10.2006, revizyon kabulü: 09.11.2006

*Bu çalışmanın bir bölümü 21. ANKEM Klinikler ve Tıp Bilimleri Kongresi'nde sunulmuştur (04-08 Haziran 2006, Antalya)

32 µg/ml with mellitin, respectively. Against Gram positive MSSA, MRSA and *E.faecalis* strains MIC₉₀ values were 8 µg/ml, 8 µg/ml and 8 µg/ml with mellitin, 16 µg/ml, 16 µg/ml and 16 µg/ml with nisin, respectively. The MBC values were generally equal or two times greater than those of MIC values. In combination studies synergistic interactions were most frequent with colistin methanesulphonate-ciprofloxacin combination against *P.aeruginosa* (54 %); with colistin methanesulphonate-imipenem combination against *E.coli* and *K.pneumoniae* (50 % and 54 %, respectively); with nisin-imipenem combination against MRSA (67 %) and with nisin-ampicillin combination against MSSA and *E.faecalis* (67 % and 47 %, respectively). None of the combinations showed antagonistic effect.

Keywords: colistine methanesulphonate, combination, mellitin, nisin

GİRİŞ

Geçtiğimiz yüzyıl boyunca birçok doğal, sentetik ya da yarı sentetik antibiyotik keşfedilmiş, bunların büyük bir bölümü tedavide kullanıma şansı bulmuş ve yaygın olarak başarıyla kullanılmışlardır. Ancak ilk antibiyotik olan penisilinin keşfinden kısa bir süre sonra penisiline karşı gelişen direnç de keşfedilmiştir. Zaman içinde diğer antibiyotikler de benzer bir kaderi paylaşmış ve günümüzde antibiyotik direnci hayati bir problem olmuştur. Antibiyotiklerle ilgili olarak yaşanan sorunlar araştırmacıları yeni antimikrobik etkili kaynakların arayışına yöneltmiştir. Bu kaynaklar arasında en fazla öne çıkan ve gelecek vaat eden grup antimikrobik etkili katyonik peptitlerdir⁽⁷⁾.

Antimikrobik etkili katyonik peptitler canlıların çevrede bulunan mikroorganizmalarla meydana gelebilecek enfeksiyonlarına karşı en etkili silahlarından ve doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Katyonik peptitler mikroorganizmalar, böcekler, amfibiyenler, sürüngenler, kuşlar, bitkiler, memeli hayvanlar ve insanlar gibi her tür canlıdan izole edilebilmektedir ve günümüzde 600'den fazla sayıda doğal antimikrobik etkili katyonik peptit bilinmektedir⁽⁹⁾. Bu maddeler Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, mantarlar, zarflı virüsler ve bazı parazitleri de içine alan çok geniş bir etki spektrumuna sahiptirler^(4,10). Ayrıca katyonik peptitlerin antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanılmaları sonucu meydana gelen sinerjistik etki ile bu antibiyotiklere dirençli olan suşlara karşı da etkili olabildikleri gösterilmiştir⁽⁶⁾.

Antimikrobik etkili katyonik peptitlerden kolistin metansülfonat (kolimisin), non-ribozomal olarak sentezlenen katyonik peptitlerden polimiksin E'nin metansülfonat türevidir olup Gram negatif bakterilere, özellikle de *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etkilidir⁽¹¹⁾. Mellitin balarısı venomundan izole edilen, 26 aminoasit uzunluğunda, α-helezonal yapıda bir katyonik peptittir ve hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir⁽¹⁾. Nisin ise, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen 34 aminoasit uzunluğunda ve lantibiyotikler (lantiyonin içeren katyonik peptitler) grubuna ait bir peptittir ve Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir⁽¹²⁾.

Çalışmamızda, enfeksiyon etkeni olarak izole edilen

P.aeruginosa, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve *Enterococcus faecalis* suşlarına karşı katyonik peptitlerden kolistin metansülfonat, mellitin ve nisinin, antibiyotiklerden amikasin, seftazidim, imipenem, siprofloksasin, ampicilin, eritromisin ve vankomisin tek başlarına ve kombinasyonları halindeki etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mikroorganizmalar: Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında hasta materyalinden izole edilen 15'er *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, MSSA, 9 MRSA ve 14 *E.faecalis* suşu, deney koşullarının standardizasyonu için ise *P.aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumoniae* ATCC 4352, *S.aureus* ATCC 29213 ve *E.faecalis* ATCC 29212 standart suşları kullanılmıştır.

Antimikrobik maddeler: Çalışmamızda kullanılan antimikrobik etkili katyonik peptitler olan kolistin metansülfonat, mellitin ve nisin Sigma-Aldrich S.R.I. tarafından sağlanmış, diğer antibiyotiklerse üretici firmalarından temin edilmiştir. İmipenem dışındaki antimikrobik maddelerin stok çözeltileri üretici firma tarafından tavsiye edilen şekilde hazırlanmış ve bu çözeltiler altı ay içinde deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmış, imipenem ise kullanılacağı zaman günlük olarak hazırlanmıştır.

Besiyerleri: Mueller Hinton Buyyon (MHB, Difco) besiyeri minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesinde ve mikrodilüsyon "checkerboard" (dama tahtası) tekniğinin uygulanmasında, Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) besiyeri ise minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerinin ve bakteri sayılarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi: Çalışmamızda antibiyotiklere ait MİK değerlerinin belirlenmesinde Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından önerilen mikrodilüsyon yöntemi, antimikrobik etkili katyonik peptitlere

ait MİK değerlerinin belirlenmesinde ise CLSI yönteminin modifiye şekli olan ve katyonik peptitlerin polistiren yüzeylere bağlanma eğiliminde olması nedeniyle deney boyunca polipropilenden yapılmış malzemelerin kullanıldığı Hancock yöntemi kullanılmıştır^(5,14). Hancock yöntemine göre antimikrobik katyonik peptitlerin Eppendorf tüpleri içinde, % 0.01 asetik asit içeren % 0.02 sığır serum albumini içerisindeki 640-0.3 µg/ml'lik çift kat seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin herbirinden 11'er µl alınarak polipropilen mikroplakların (Grainer) 1-11 nolu kuyucuklarına tatbik edilmiş ve her kuyucuğa son konsantrasyon 5 x 10⁵ cfu/ml olacak şekilde 100 µl bakteri suspansiyonu ilave edilmiştir⁽⁸⁾. Mikroplaklar kapakları kapatılmış ve buharlaşmayı engellemek amacıyla naylon bir kılıfın içine konulmuş olarak 37°C'de 18-20 saat boyunca inkübe edilmiş ve bulanıklığın görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir. MBK değerlerinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon süresinin sonunda üreme görülmeyen tüm kuyucuklardan iki kere 10'ar µl örnek alınarak Petri kutularındaki TSA besiyerlerinin yüzeyine tatbik edilmiş ve 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonucunda oluşan koloniler sayılmış, başlangıç inokulumunun % 99.9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonu MBK değeri olarak belirlenmiştir⁽¹³⁾.

FİK indeksinin belirlenmesi: Çalışmamızda antimikrobik etkili katyonik peptitler ve antibiyotiklerin kombinasyon halindeki etkilerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemi kullanılmıştır⁽²⁾. Bu amaçla polipropilenden mikroplakların içerisinde çeşitli oranlarda antibiyotik karışımları bulunan tüm kuyucuklarına son konsantrasyon yaklaşık 5 x 10⁵ cfu/ml olacak şekilde bakteri suspansiyonu ilave edilmiş ve 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Her antimikrobik maddenin FİK değeri üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antimikrobik madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı suşa karşı saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilmiştir. FİK indeksi ise, her iki antimikrobik maddeye ait FİK değerlerinin toplanması sonucunda elde edilmiştir. Buna göre FİK indeksi

0.5 olan değerler sinerjistik, = 1.0 olan değerler additif, ≥2.0 olan değerler ise antagonist olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan antibiyotikler ve antimikrobik etkili katyonik peptitlerin standart ve klinik suşlara karşı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerleri tablo 1, 2 ve 3'de gösterilmiştir. Gram negatif bakterilerden *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarına karşı denenen antibiyotikler elde edilen MİK değerlerine göre sıralandığında en etkili olanlar siprofloksasin > imipenem > seftazidim > amikasin; aynı bakterilere en etkili katyonik peptitler ise kolistin metansülfonat > mellitin olarak belirlenmiştir. Tartım bazında aynı bakterilere en etkili antibiyotik sırasıyla 2 µg/ml, 0.5 µg/ml ve 0.5 µg/ml'lik MİK90 değerleriyle siprofloksasin; en etkili katyonik peptit ise sırasıyla 1 µg/ml, 0.5 µg/ml ve 2 µg/ml ml'lik MİK90 değerleriyle kolistin metansülfonat olarak bulunmuştur. Gram pozitif bakterilerden MSSA, MRSA ve *E.faecalis* suşlarına karşı denenen antibiyotikler MİK değerlerine göre sıralandığında siprofloksasin > vankomisin > imipenem > amikasin > eritromisin > seftazidim > ampicilin; katyonik peptitler ise mellitin > nisin olarak bulunmuştur. Bu Gram pozitif bakterilere tartım bazında en etkili antibiyotik sırasıyla 0.5 µg/ml, 16 µg/ml ve 2 µg/ml'lik MİK90 değerleriyle siprofloksasin; en etkili katyonik peptit ise sırasıyla 8 µg/ml, 8 µg/ml ve 8 µg/ml'lik MİK90 değerleriyle mellitin olarak bulunmuştur. Gerek bakterisit etkili antibiyotiklerin gerekse antimikrobik etkili katyonik peptitlerin MBK değerleri genellikle MİK değerlerine eşit ya da iki katı, bakteriyostatik etkili antibiyotiklerin MBK değerleri ise MİK değerlerinin 4-8 katı olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda kullanılan antimikrobik etkili katyonik peptitlerin antibiyotiklerle kombinasyon halindeki etkilerinin mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemi ile belirlenmesine ait sonuçlar tablo 4 ve 5'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre kolistin metansülfonat-siprofloksasin kombinasyonu % 54

Tablo 1: Antibiyotiklerin standart suşlara karşı saptanan MİK değerleri (µg/ml).

	E.coli ATCC 25922	K.pneumoniae ATCC 4352	P.aeruginosa ATCC 27853	S.aureus ATCC 29213	E.faecalis ATCC 29212
Ampicilin	-	-	-	1	1
Seftazidim	0.25	0.125	1	8	-
İmipenem	0.125	0.25	1	0.032	-
Amikasin	2	0.5	1	1	-
Eritromisin	-	-	-	0.5	1
Siprofloksasin	0.008	0.016	0.5	0.5	1
Vankomisin	-	-	-	1	1

-: Çalışılmadı.

Tablo 2: Antimikrobik maddelerin Gram negatif bakterilere karşı MİK değerleri (µg/ml).

Bakteriler / Antimikrobik maddeler	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀
P.aeruginosa (n:15)			
Seftazidim	0.125 - 256	2	4
İmipenem	0.062 - 128	1	8
Amikasin	0.125 - 8	1	2
Siprofloksasin	0.032 - >64	0.25	2
Kolistin metansülfonat	0.125 - 1	0.25	1
Mellitit	32 - >64	64	>64
E. coli (n:15)			
Seftazidim	0.062 - 16	0.125	8
İmipenem	0.032 - 0.25	0.125	0.125
Amikasin	0.5 - 4	2	2
Siprofloksasin	0.016 - 1	0.016	0.5
Kolistin metansülfonat	0.125 - 1	0.25	0.5
Mellitit	4 - 16	8	8
K. pneumoniae (n:15)			
Seftazidim	0.032 - 256	0.5	4
İmipenem	0.125 - 4	0.25	2
Amikasin	0.25 - 16	0.5	8
Siprofloksasin	0.008 - 8	0.032	0.5
Kolistin metansülfonat	0.032 - 8	0.5	2
Mellitit	4 - 64	16	32

n: Çalışılan suş sayısı.

Tablo 3: Antimikrobik maddelerin Gram pozitif bakterilere karşı MİK değerleri (µg/ml).

Bakteriler / Antimikrobik maddeler	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀
MSSA (n:15)			
Ampisilin	1 - >256	16	32
Seftazidim	1 - >256	4	16
İmipenem	0.008 - 4	0.008	0.125
Amikasin	0.25 - 2	1	2
Eritromisin	0.5 - >128	1	2
Siprofloksasin	0.062 - 0.5	0.125	0.5
Vankomisin	0.5 - 2	0.5	1
Mellitit	2 - 8	4	8
Nisin	8 - 32	8	16
MRSA (n:9)			
Ampisilin	2 - >256	32	>256
Seftazidim	4 - >256	>256	>256
İmipenem	0.032 - 64	2	32
Amikasin	0.5 - 32	32	32
Eritromisin	0.5 - >128	>128	>128
Siprofloksasin	0.25 - 32	8	16
Vankomisin	0.5 - 1	0.5	1
Mellitit	2 - 8	4	8
Nisin	1 - 32	4	16
E. faecalis (n:14)			
Ampisilin	8 - >256	32	64
Eritromisin	1 - >128	64	>128
Siprofloksasin	0.125 - 4	0.25	2
Vankomisin	0.5 - 1	0.5	1
Mellitit	2 - 8	4	8
Nisin	1 - 32	4	16

n: Denenen suş sayısı.

sinerjistik etki ile *P.aeruginosa*; kolistin metansülfonat-imipenem kombinasyonu sırasıyla % 50 ve % 54 sinerjistik etki ile *E.coli* ve *K.pneumoniae*, nisin-imipenem kombinasyonu % 67 sinerjistik etki ile MRSA, nisin-ampisilin kombinasyonu ise sırasıyla %

67 ve % 47 sinerjistik etki ile MSSA ve *E.faecalis* suşlarına karşı en etkili kombinasyonlar olarak saptanmıştır. Denenen kombinasyonların hiçbirinde antagonist etki saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Günümüzde hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli yer tutan ve antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde dirençli olmaları nedeniyle infeksiyonlarının tedavisi güç olan patojenlerin başında *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *K.pneumoniae* gibi Gram negatif ve MRSA ya da vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) gibi Gram pozitif bakteriler yer almaktadır. Gerek çalışmamızda gerekse yayınlanmış olan diğer çalışmalarda elde edilen bulgular, bu bakterilerde klinik kullanımda olan antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde antibiyotik direnci geliştiğini göstermektedir. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) tarafından bildirilen raporlarda da bu bakterilerin çeşitli antibiyotiklere karşı, özellikle yoğun bakım ünitelerinde, çok yüksek oranda direnç geliştirdikleri ve bu direnç oranlarının her yıl daha da arttığı belirtilmiştir⁽¹⁵⁾.

Çalışmamızda, antibiyotiklere karşı direnç problemi nedeniyle geleceğin antibiyotikleri olacağı düşünülen antimikrobik etkili katyonik peptitlerden kolistin metansülfonat, mellitin ve nisin önemli hastane infeksiyonu etkenlerinden *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, MSSA, MRSA ve *E.faecalis* suşlarına tek başlarına ve antibiyotiklerle kombinasyon halindeki etkileri araştırılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçlara göre kolistin metansülfonatın başta *P.aeruginosa* olmak üzere Gram negatif bakterilere etkili olduğu ve MİK değerlerinin, tartım bazında en etkili antibiyotik olarak belirlenen siprofloksasinin MİK değerleriyle karşılaştırılabilir düzeyde olduğu görülmüştür. Nisin Gram pozitif bakterilere, mellitin ise hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı etkili oldukları, bu maddelerin MİK değerlerinin çok düşük olmamasına rağmen çalışmadaki diğer antibiyotiklerin çoğundan farklı olarak MİK90 değerlerinin MİK50 değerlerinden sadece iki

Tablo 4: Antimikrobik etkili katyonik peptitlerle oluşturulan kombinasyonların Gram negatif bakterilere karşı etkisi*.

Kombinasyon	P. aeruginosa		E. coli		K. pneumoniae	
	Sinerjist	Additif	Sinerjist	Additif	Sinerjist	Additif
Kolistin metansülfonat +						
Seftazidim	30	70	28	72	46	54
İmipenem	33	67	50	50	54	46
Amikasin	40	60	27	73	33	67
Siprofloksasin	54	46	9	91	27	73
Mellitin +						
Seftazidim	-	-	17	83	23	77
İmipenem	-	-	29	71	15	85
Amikasin	-	-	27	73	27	73
Siprofloksasin	-	-	17	83	25	75

*Antagonist etkiye rastlanmadı; -: Çalışılmadı.

Tablo 5: Antimikrobik etkili katyonik peptitlerle oluşturulan kombinasyonların Gram pozitif bakterilere karşı etkisi*.

Kombinasyon	MSSA		MRSA		E. faecalis	
	Sinerjist	Additif	Sinerjist	Additif	Sinerjist	Additif
Nisin +						
Ampisilin	67	33	-	-	47	53
Seftazidim	29	71	50	50	-	-
İmipenem	17	83	67	33	-	-
Amikasin	15	85	43	57	-	-
Eritromisin	17	83	20	80	13	87
Siprofloksasin	23	77	44	56	29	71
Vankomisin	40	60	29	71	43	57
Mellitin +						
Ampisilin	33	67	-	-	11	89
Seftazidim	21	79	50	50	-	-
İmipenem	25	75	33	67	-	-
Amikasin	30	70	57	43	-	-
Eritromisin	8	92	20	80	13	87
Siprofloksasin	23	77	22	78	14	86
Vankomisin	10	90	13	87	36	64

*Antagonist etkiye rastlanmadı; -: Çalışılmadı.

kat fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, diğer birçok katyonik peptitte olduğu gibi mellitin ve nisinin MİK değerlerinin de bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençli olup olmama durumuna göre fazla değişmediğini göstermiş, benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir⁽⁷⁾.

Mikrodilüsyon “checkerboard” yöntemi ile yapılan kombinasyon çalışmalarında additif ya da sinerjist etki görülmüş, hiçbir kombinasyonda antagonist etki belirlenmemiştir. Kolistin metansülfonatın Gram negatif bakterilere karşı kombinasyon halindeki etkileri araştırılmış ve özellikle siprofloksasin ve imipenem ile olan kombinasyonlarında sinerjist etki saptanmıştır. İlginç olarak *P.aeruginosa*'ya karşı en etkili kombinasyon % 54 oranında sinerjist etkiyle kolistin metansülfonat-siprofloksasin olmakla birlikte bu kombinasyon *E.coli* ve *K.pneumoniae*'ye karşı sırasıyla % 9 ve % 17 oranlarıyla en düşük sinerjist etkiyi göstermiştir. Bu sonuçlara göre, kolistin metansülfonatın antibiyotiklerle birlikte olan etkisinin bakteri türlerine göre oldukça değişken olabildiği ve bunun daha geniş kültür koleksiyonları üzerinde detaylı bir çalışmayla araştırılması gerektiği düşünülebilir.

Mellitinin *P.aeruginosa* suşlarına yüksek MİK değerlerinde etki göstermesi nedeniyle Gram negatif bakterilerden *E.coli* ve *K.pneumoniae*'ye ve Gram pozitif bakterilere karşı kombinasyon halindeki etkileri araştırılmış ve Gram negatif bakterilere karşı genellikle additif etkili olduğu, sinerjist etkinin ise % 15 - 30 oranlarında görüldüğü saptanmıştır. Gram pozitif bakteriler üzerine olan etkilerine bakıldığında ise mellitinle amikasin ve beta-laktam grubu antibiyotiklerden seftazidim ve imipenemin içinde bulunduğu kombinasyonlarla MRSA suşları üzerine MSSA suşlarından daha fazla sinerjist etki elde edilmiş (sırasıyla % 57, % 50 ve % 33), *E.faecalis* suşlarına karşı ise genellikle additif etki saptanmıştır. Bu sonuçların özellikle yoğun bakım üniteleri gibi yerlerde sık görülen ve direnç problemi nedeni ile eldeki antibiyotiklerle tedavi edilmesi zor olan MRSA infeksiyonları için oldukça ümit verici olduğu ve daha fazla sayıda bakteri ile yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülebilir.

Nisinin içinde bulunduğu kombinasyonların Gram pozitif bakteriler üzerine olan etkisine bakıldığında tüm kombinasyonlarla MRSA suşlarına karşı MSSA suşlarından daha fazla sinerjist etki elde edilmiş ve tüm bakterilere karşı en fazla sinerjist etkinin beta-laktam grubu antibiyotiklerle oluşturulan kombinasyonlarla elde edildiği saptanmıştır. MRSA suşlarına en etkili kombinasyonun % 67 oranında sinerjist etki ile nisimipenem olduğu ve bunu seftazidimin takip ettiği, MSSA ve *E.faecalis* suşlarına ise sırasıyla % 67 ve % 47 oranlarında sinerjist etki ile nisimampisilin kombinasyonunun en etkili olduğu ve bunu vankomisin takip ettiği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar mellitinle elde edilenlerde olduğu gibi özellikle MRSA infeksiyonları için ümit verici olup başka araştırmacıların bulgularıyla da benzerlik göstermektedir⁽⁴⁾.

Antibiyotiklerle ilgili olarak yaşanan direnç problemi nedeni ile üzerlerinde yoğun olarak çalışılan antimikrobik etkili katyonik peptitler etkilerini “kendi geçişlerini destekleyen yol” adı verilen bir mekanizmayla göstermektedirler. Katyonik peptitler, kendi geçişlerini destekleyen yolla dış membrandan geçişleri sırasında kendileriyle birlikte diğer antibiyotiklerin de hücre içine girişine olanak sağlamaktadır⁽¹⁶⁾. Bu durum, bakterinin dış membranında geçirgenliğin azalması sonucunda çeşitli antibiyotiklere direnç geliştiren bakterilerin, yeniden duyarlı hale gelmelerini ve bu şekilde antibiyotiklerle katyonik peptitlerin birbirlerinin etkilerini arttırmalarını sağlamaktadır. Ayrıca antimikrobik etkili katyonik peptitleri etkileyebilen az sayıda direnç mekanizması bulunmakta olup bunlar da antibiyotiklere direnç mekanizmalarından bağımsız olarak işlemektedir. Bu nedenle katyonik peptitlere karşı direnç gelişmesi zor ve nadir bir durumdur⁽¹⁷⁾.

Tüm bu olumlu özellikleri gözönüne alındığında antimikrobik etkili katyonik peptitlerin yakın gelecekte, infeksiyon hastalıklarının tedavisinde, önemli bir direnç problemi ile karşılaşmaksızın tek başlarına ya da diğer antibiyotiklerle oluşturdukları sinerjist etkileri ile güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bunun olabilmesi için devam eden faz II ve faz III klinik çalışmalarının yanısıra katyonik peptitlerin gerek stabilite, toksisite, immünojenite gibi özellikleri ile farmakokinetik ve farmakodinamik parametreleri gibi konularda, gerekse antimikrobiyal etkinliği konusunda daha fazla araştırma yapılmalı ve uygun formülasyonları hazırlanarak ilaç haline getirilmeleri gerekmektedir. Çalışmamızın da bu konudaki araştırmalara yardımcı olacağını ve katyonik peptitlerin yakın gelecekte yeni ve etkili bir antibiyotik grubu olarak yer alacağını umuyoruz.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: T-73/23072002).

KAYNAKLAR

1. Bechinger B: Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, mellitin and alamethicin, J Membr Biol 1997;156 (3):197-211.
2. Eliopoulos GM, Moellering Jr RC: Antimicrobial combination, “Lorian V (ed.): Antibiotics in Laboratory Medicine, 4. baskı” kitabında s. 330-96, William and Wilkins, Baltimore (1996).
3. Ganz T, Lehrer RI: Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications, Mol Med Today 1999;5(7):292-7.
4. Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F ve ark: In vitro susceptibility

- tests for cationic peptides: comparison of broth microdilution methods for bacteria that grow aerobically, *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(6):1694-6.
5. Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Scalise G: In-vitro activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38(2):115-8.
 6. Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, Paggi AM, D'Errico MM, Scalise G: Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Peptides* 2000;21(8):1155-60.
 7. Hancock RE: Peptide antibiotics, *Lancet* 1997;349(9049):418-22.
 8. Hancock RE: Minimal inhibitory concentration (MIC) determination for cationic antimicrobial peptides by the modified microtitre broth dilution method. Recently modified methods used by the Hancock Laboratory, Vancouver, B.C. (1998).
 9. Hancock RE: Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *Lancet Infect Dis* 2001;1(3):156-64.
 10. Kamysz W, Okroj M, Lukasiak J: Novel properties of antimicrobial peptides, *Acta Biochim Pol* 2003;50(2):461-9.
 11. Martin EC, Chase GD, Cox HR: *Rhemington's Pharmaceutical Sciences*, 13. baskı, s.1272, Mack Publishing Co., Eoston, Pa (1965).
 12. McAuliffe O, Ross RP, Hill C: Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action, *FEMS Microbiol Rev* 2001;25(3):285-308.
 13. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents, Approved Guideline. M26-A*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa (1999).
 14. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard M7-A5, 5th ed.*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa (2000).
 15. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report: Data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004, *Am J Infect Control* 2004;32(8):470-85.
 16. Sawyer JG, Martin NL, Hancock RE: Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun* 1988;56(3):693-8.
 17. Yeaman MR, Yount NY: Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol Rev* 2003;55(1):27-55.