

NİTRİK OKSİT VERİCİSİ OLAN DETA-NO'NUN *SALMONELLA TYPHIMURIUM* SUŞLARINA *IN VITRO* ETKİSİ

THE *IN VITRO* EFFECT OF NITRIC OXIDE DONOR DETA-NO ON *SALMONELLA TYPHIMURIUM* STRAINS

Ahmet Yılmaz ÇOBAN
Murat ERTÜRK

Bora EKİNCİ

Asuman BİRİNCİ

Belma DURUPINAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

Anahtar Sözcükler: *Salmonella typhimurium*, nitrik oksit, DETA-NO, diazenyumdiolat

Key Words: *Salmonella typhimurium*, nitric oxide, DETA-NO, diazeniumdiolate

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, *in vitro* olarak nitrik oksit donörü DETA-NO'nun ((Z) – 1 - [N - (2 – aminoetil) – N - (2 – amonyoetil) amino] diazen – 1 – ium – 1, 2 - diolat) 15 tane klinik ve bir standart *Salmonella typhimurium* suşuna karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerini saptamak idi. MİK değerleri NCCLS M7-A2'de önerildiği şekilde buyon mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı. Ondört klinik köken ve standart suş için MİK değerleri 2 mg/ml ve bir klinik izolat için ise 1 mg/ml olarak bulundu. Bulgular, NO vericisi DETA-NO'nun *S. typhimurium*'a etkin olduğunu göstermesine karşın, NO donörlerini *S. typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida* spp. vb. gibi hücre içi patojenlerine karşı *in-vivo* olarak kullanabilir miyiz?

SUMMARY

The aim of this study was to determine the MIC value of nitric oxide donor DETA-NO ((Z) – 1 - [N -(2 – aminoethyl) – N - (2 – ammonioethyl) amino] diazen – 1 – ium – 1, 2 - diolate) to 15 *Salmonella typhimurium* clinical isolates and a standard strain *in vitro*. The minimum inhibitory concentration (MIC) values were assayed with broth microdilution method recommended by NCCLS M7-A2. The MIC values of 14 clinical isolates and standard strain were 2 mg/ml and for one clinical isolate was 1 mg/ml. Although the results indicated that the NO donor DETA-NO was effective on *S. typhimurium*, can we use NO donors *in vivo* against intracellular pathogens such as *S. typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida* species, etc.?

GİRİŞ

Tifoid ateş insanlığı etkileyen önemli infeksiyon etkenlerindendir. Tifoit ateşin klinik belirtilerinin esas etkeni *Salmonella typhi*'dir, ancak *Salmonella paratyphi* A ve B ve nadiren *S. typhimurium* gibi diğer *Salmonella* türleri de etken olabilir (1).

Bazı bakteri türleri makrofajlarda hücre içi öldürme mekanizmalarına karşı direnç gösterebilirler ve retikulo-endotelial sistem hücrelerinde yaşayıp çoğalabilirler (2). *Salmonella typhimurium* farelerde fakültatif hücre içi bi organizmadır ve insanlarda gastro-enterite neden olur. *Salmonella typhimurium* fizyolojik ve genetik olarak iyi

karakterize edilmiş olmasına rağmen, makrofajlar içinde yaşamlarını sürdürmeleri için gerekli olan mekanizmalar konusunda pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu bakterinin fagolizozomlarda replike olduğu ve yaşadığı rapor edilmiştir (3). *Salmonella typhimurium* makrofaj içi yaşamları virulans ile bağlantılı olan ve çok iyi bilinen bir hücre içi patojen modelidir. Hücre içi yaşamları ile bir çok gen ilişkilidir, fakat hücre içi yaşamda rol alan özgül mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (4, 5).

Makrofajlar, bakteri hücre duvarı lipopolisakkariti (LPS) veya muramil dipeptit ile birlikte T hücre sitokinleriyle (IFN- γ) uyarıldıklarında, L-arjinini oksidize ederek sitrullin ve reaktif bir radikal olan nitrik oksit (NO) oluşmasına neden olan nitrik oksit sentetaz eksprese etmeye başlarlar. Nitrik oksit, tek başına potansiyel olarak antimikrobiyal aktiviteye sahiptir, ayrıca süperoksit anyonu ile birleşerek daha potent antimikrobiyal yapılar da oluşturabilir (6). Nitrik oksit, toprakta ve havada bulunmakta, bakteriler, hayvanlar ve bitkiler tarafından üretilmektedir (7). Nitrik oksit, viruslardan helmintlere kadar birçok patojene karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir, fakat bu aktiviteden sorumlu olan özgül reaktif nitrojen radikalleri tam belirlenememiştir (8). Son zamanlarda diazeniyumdiyolatlar olarak adlandırılan bir grup bileşiğin bu problemleri çözmede yararlı olabileceği düşünülmektedir. Diazeniyumdiyolatlar, sıvı ortamda veya ortam pH'sındaki bir değişikliğe yanıt olarak NO salan NO-nükleofil komplekslerdir. Daha da önemlisi, bu kompleksler gliseril trinitrat ve sodyum nitroprussit gibi bileşiklerin ihtiyaç duyduğu redoks reaksiyonu veya elektron transferi gibi aktivasyona gereksinim duymamaktadırlar (9, 10). Sonuç olarak, bu kompleksler kararlıdır ve biyolojik olarak kullanılabilir ve ortama belirlenebilen bir oranda NO salabilirler (9).

Bu çalışmanın amacı, *S. typhimurium*'un klinik kökenleri ve standart suşu için DETA-NO'nun ((Z)-1-[N-(2-aminoetil)-N-(2-ammonioetil) amino] diazen-1-ium-1,2-diyolat) MİK değerlerini saptamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

***Salmonella typhimurium* m suşları:** 15 tane *S. typhimurium* klinik kökeni Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan (Prof. Dr. Birsal ERDEM), *S. typhimurium* SZH KUEN 557 standart suşu ise KÜKENS-İstanbul'dan sağlanmıştır.

NO-salan bileşik: NO kaynağı olarak kullanılan DETA-NO ((Z)-1-[N-(2-aminoetil)-N-(2-ammonioetil)amino] diazen-1-ium-1,2-diyolat) bileşiği National Cancer Institute, Frederick Cancer Research Center, Frederick, MD.'den Prof. Dr. Joseph A. Hrabie ve Prof. Dr. Larry Keefer'in hediyesidir. DETA-NO, 0.1 N NaOH ile çözölmüştür.

Besiyeri ve mikrodilasyon testi: NO duyarlılık test National Committee for Clinical Laboratory Standards'ın önerileri doğrultusunda 96 kuyucuklu plaklarda yapılmıştır (11). Çalışmada Muller-Hinton besiyeri (MHB) kullanılmış ve bakteri konsantrasyonu 10^5 bakteri/ml olarak ayarlanmıştır. MİK testinde kullanılan DETA-NO'nun konsantrasyon aralığı 10-0.125 mg/ml olarak ayarlanmıştır. İnokulasyon yapılan plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. MİK değerleri, görsel olarak üremenin gözlenmediği en son kuyucuk olarak rapor edilmiş ve sonuçlar MİK değerlerinin bir alt ve bir üst konsantrasyonundan kültür yapılarak doğrulanmıştır.

BULGULAR

MİK değerleri Tablo 1'de sunulmuştur. Bir klinik suşta MİK değeri 1 mg/ml olarak, diğer klinik suşlar ve standart suşta ise 2 mg/ml olarak saptanmıştır. MİK50 ve MİK90 değerleri de 2 mg/ml olarak saptanmıştır.

Tablo 1. *Salmonella typhimurium* suşlarına karşı DETA-NO'nun MİK değerleri

Kökenler	DETA-NO'nun MİK değerleri (mg/ml)
Standart suş	2
Klinik kökenler	
1	1
2	2
3	2
4	2
5	2
6	2
7	2
8	2
9	2
10	2
11	2
12	2
13	2
14	2
15	2

MİK50= 2 mg/ml; MİK90= 2 mg/ml

TARTIŞMA

Birçok infeksiyonun ortaya çıkmasında konak makrofajları ile bakteriyel patojenler arasındaki ilişki önemli bir kriterdir (4). *Salmonella*'lar hücre içi patojenleridir. *Salmonella*'ların hücre içi popülasyonu ve yaşamları makrofajların sahip olduğu çeşitli faktörlerle inaktive olabilmektedir. Bu faktörler içerisinde; reaktif nitrojen radikalleri (RNI); NO, NO₂ vb. ve reaktif oksijen radikalleri (ROI) süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri, hidrojen perok

sit vb. bulunmaktadır (4, 6). Fagositler tarafından üretilen ROI'lerden *Salmonella*'ların korunmasını sağlayan bir çok gen bulunmaktadır. Bu genlerin içerisinde, DNA onarımından sorumlu recA ve recBC, süperoksit dismutaz için sodA ve katalaz için katE ve katG veya oxyR (4). pag C, msgA ve spiA ise makrofajlar içinde yaşamlarını sürdürmeleri için önemlidir. Buna ek olarak, metL geni de NO direncinde önemli bir role sahiptir (5, 8). *Salmonella typhimurium* konakta kalıcılığını sürdürmek için birkaç mutasyon yeteneğine sahiptir ve indüklenebilir NO sentez aktivitesinin inhibisyonu belki de en büyük adaptasyondur (12).

DETA-NO *Candida* türlerine etkin olarak bulunmuş olup (DETA-NO'nun MİK değeri 2 mg/ml), azollerle de yine *Candida* türlerine karşı sinerjistik etkili olduğu rapor edilmiştir (9). Ekzojen NO, ilaçlara duyarlı laboratuvar suşu H37Rv ve çoklu ilaca (izoniazit ve rifampin) dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarına karşı mikobakterisidal etkinlik göstermektedir. Akciğer tüberkülozlu hastalarda hücre dışı basillere ekzojen NO'nun zarar verebileceği rapor edilmiştir (13). Nitrik oksit vericisi DETA-NO disk difüzyon yöntemi ile metL *S. typhimurium*a karşı denendiğinde etkinliği gösterilmiştir (8). Bu çalışmada *S. typhimurium* suşlarına karşı DETA-NO'nun MİK değerlerini 1 ve 2 mg/ml olarak saptanmıştır.

Bu bulgular, NO donörü DETA-NO'nun hücre içi patojen olan *S. typhimurium*a karşı etkin olduğunu göstermektedir.

Diazeniyumdiolatlar (DETA-NO, SPER-NO, DEA-NO, PROLI-NO, PAPA-NO ve MAHMA-NO), ortama hızlı bir

şekilde (bir-iki dakika) veya yavaş olarak (bir kaç gün) 2 mol NO salabilirler (9, 10). Nitrik oksit, kardiyovasküler, immün, merkezi ve periferik sinir sistemleri üzerinde önemli role sahiptir (9). Yeni nitrik oksit vericileri olan NONOate'lerin *in vitro* ve *in vivo* olarak vazodilatör olarak etki gösterdiği rapor edilmiştir (14). Nitrik oksit salar diazeniyumdiolatların etkin olarak fare derisinde dağıldığı gösterilmiştir (15). Seksen ppm NO gazı iki haftaya kadar hipoksik solunum yetmezlikli ve persistan akciğer hipertansiyonlu yenidoğanlarda herhangi bir yan etkileri gözlenmeksizin uygulanabilmiştir ve NO gazının kullanımının çok güvenli olduğu rapor edilmiştir (16, 17). *In vitro* olarak yapılan bir çalışmada (18), DETA-NO ile muamele edilen sıçan vasküler düz kaslarında sitotoksik bir etki gözlenmemiştir (18), ancak NO vericilerinin *in vivo* kullanımı konusunda henüz kesin bilgiler yoktur.

Sonuç olarak, DETA-NO *S. typhimurium*a karşı etkili görülmesine rağmen, acaba NO vericisi DETA-NO'yu *S. typhimurium*, *M. tuberculosis*, *Candida* spp. vb. gibi hücre içi patojenlere karşı *in vivo* olarak kullanabilir miyiz? sorusuna yanıt vermek bu gün için olanaklı görünmemektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızın yürütülmesi için DETA-NO'yu hediye eden ve nasıl kullanılacağı konusunda bilgiler veren Sayın Prof Dr. Joseph A. Hrabie ve Sayın Prof. Dr. Larry Keefer'e, ayrıca *Salmonella typhimurium* klinik kökenlerini sağlayan Sayın Prof. Dr. Birsal Erdem'e şükranlarımızı sunarız.

KAYNAKLAR

1. Umezawa K, Akaike T, Fujii S, Suga M, Setoguchi K, Ozawa A, Maeda H. Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect Immun* **1997**; 65: 2932-40.
2. Balland O, Pinto-Alphandary H, Viron A, Puvion E, Andrement A, Couvreur P. Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* and treated with (3H) ampicillin loaded nanoparticles. *J Antimicrob Chemother* **1996**; 37: 105-15.
3. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci* **1986**; 83: 5189-93.
4. Buchmeier NA, Libby SJ. Dynamics of growth and death with in a *Salmonella typhimurium* population during infection of macrophages. *Canad J Microbiol* **1997**; 43: 29-34.
5. Groisman EA, Ochman H. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **1997**; 5: 343-49.
6. Kuby J. Cells and organs of the immune system. In: Kuby J, ed. *Immunology*. New York: Freeman and Co, **1997**: 47-82.
7. Bryk R, Griffin P, Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **2000**; 407: 211-15.
8. De Groote MA, Testerman T, Xu Y, Stauffer G, Fang FC. Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium*. *Science* **1996**; 272: 414-16.
9. McElhaney-Feser G, Rauli RE, Cihlar RL. Synergy of nitric oxide and azoles against *Candida* species *in vitro*. *Antimicrob Agent Chemother* **1998**; 42: 2342-6.
10. Fitzhugh AL, Keefer LK. Diazeniyumdiolatlar. pro-and antioxidant applications on the "NONOates". *Free Radic Biol & Med* **2000**; 28: 1463-9.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. Approved Standard M7-A2. Villanova, PA: NCCLS, **1990**.

12. **Eriksson S, Björkman J, Borg S, Syk A, Pettersson S, Andersson AI, Rhen M.** *Salmonella typhimurium* mutants that downregulate phagocyte nitric oxide production. *Cellular Microbiol* **2000**; 2: 239-50.
13. **Long R, Light B, Talbot JA.** Mycobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. *Antimicrob Agent Chemother* **1999**; 43: 403-5.
14. **Homer K, Wanstall J.** *In vitro* comparison of two NONOates (novel nitric oxide donors) on rat pulmonary arteries. *Eur J Pharmacol* **1998**; 356 49-57.
15. **Smith DJ, Simmons ML.** Transdermal delivery of nitric oxide from diazeniumdiolates. *J Control Release* **1998**; 51: 153-9.
16. **The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group.** Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure *N Engl J Med* **1997**; 336: 597-604.
17. **Roberts JD Jr, Fineman JR, Morin FC, et al. for the Inhaled Nitric Oxide Study Group.** Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. *N Engl J Med* **1997**; 336: 605-10.
18. **Moradian DL, Hutsell TC, Keefer LK.** Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro*. *J Cardiovas Pharmacol* **1995**; 25: 674-78.