



# KOLİSTİN DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SEPSİS MODELİNDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TEDAVİSİ İLE KOLİSTİN- FOSFOMİSİN KOMBİNASYONUNUN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

**Feyza İzci Çetinkaya<sup>1</sup>, Zeynep Türe Yüce<sup>1</sup>, Gökçen Dinç<sup>2</sup>, Arzu Hanım Yay<sup>3</sup>, Demet Bolat<sup>3</sup>,  
Esmâ Eren<sup>4</sup>, Gamze Kalın Ünüvar<sup>1</sup>, Bilgehan Aygen<sup>1</sup>, Orhan Yıldız<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

<sup>3</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

<sup>4</sup>Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Kayseri



# AMAÇ

- Tedavisindeki güçlükler ve buna bağlı yüksek mortaliteye sahip kolistin dirençli *A. baumannii* insidansındaki artış endişe verici
- Kolistin dirençli *A. baumannii* ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde kolistin-fosfomisin kombine antibiyotik tedavisine destek olarak kullanılan mezenkimal kök hücrelerin tedavideki etkilerinin araştırılması

# GEREÇ VE YÖNTEM

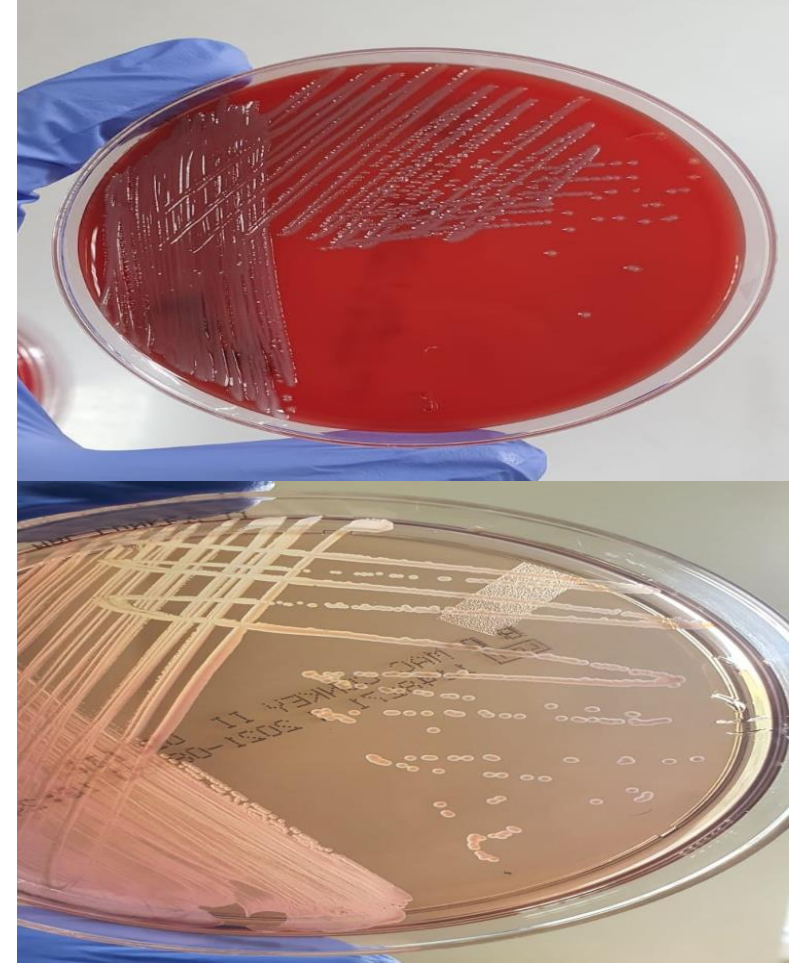
- Deneyde, 8–10 haftalık, 20-25 gr. ağırlığında olan Balb-c dişi fareler kullanıldı



ERÜTF Etik Kurul Onay: 20/089  
ERÜ BAP Proje No: TTU-2021-10624

# GEREÇ VE YÖNTEM

- Çalışmada daha önce pnömosepsis tanısı ile takip edilen bir hastanın endotrakeal aspirat kültüründen izole edilerek saklanmakta olan kolistin dirençli *A. baumannii* izolatu kullanıldı

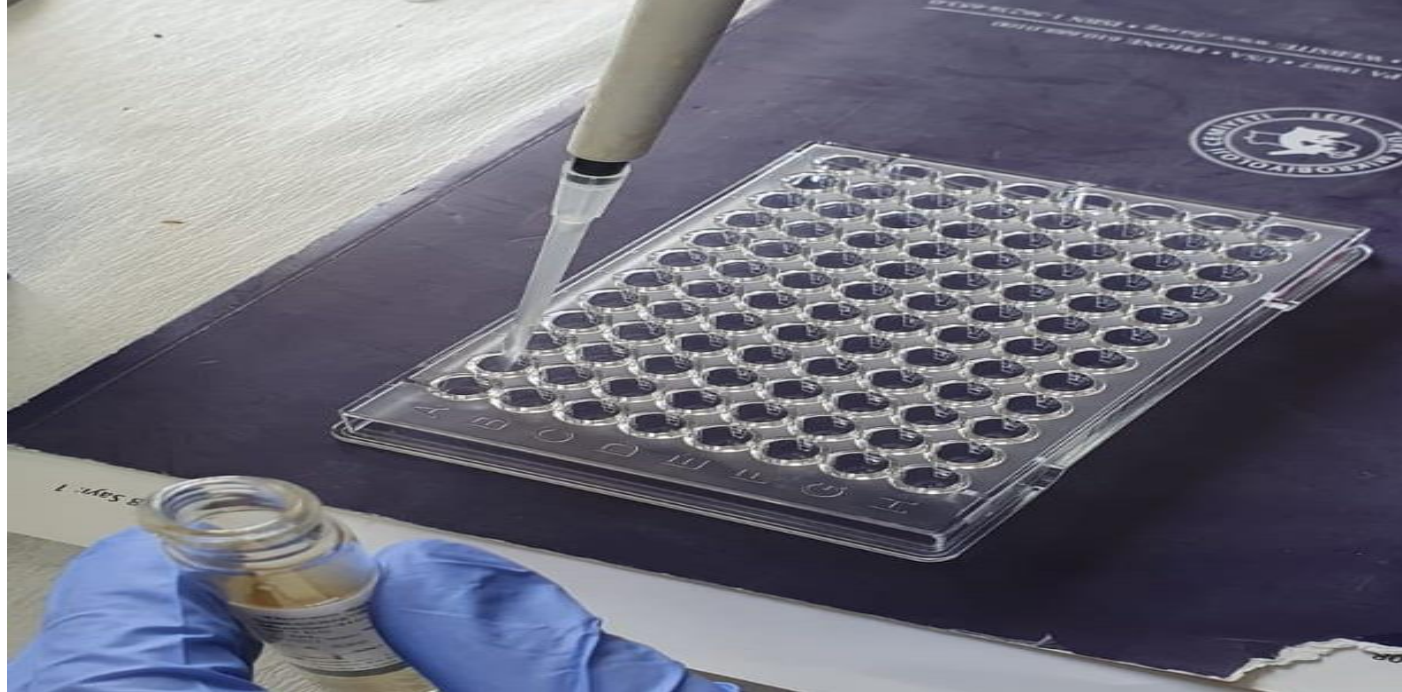


# GEREÇ VE YÖNTEM

Antibiyotik Adı	MİK ( $\mu\text{g/ml}$ )	Duyarlılık Profili
Amikasin	> 32	Dirençli
Kolistin	> 4	Dirençli
Gentamisin	> 8	Dirençli
İmipenem	> 8	Dirençli
Levofloksasin	> 2	Dirençli
Meropenem	> 8	Dirençli
Siprofloksasin	> 1	Dirençli
Trimetoprin / Sulfametaksazol	> 8/152	Dirençli

Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde önce BD Phoenix (Beckton Dickinson, ABD) otomatize sistem kullanıldı

# GEREÇ VE YÖNTEM



- Kolistin direncinin doğrulanması için sıvı mikrodilüsyon yöntemi olan The SensiTitre™ system (Thermo Fisher Scientific) kullanıldı

# GEREÇ VE YÖNTEM



İzolatin mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değeri 128  $\mu\text{g/ml}$ , dirençli olarak saptandı

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2022

# GEREÇ VE YÖNTEM

## Sepsis Oluşturan Enfeksiyon Dozunun (İnokulum Dozu) Belirlenmesi

- Bu amaçla ön çalışma yapıldı
- Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki bakteri süspansiyonlarından 0.1 ml. ikişer fareye intraperitoneal (ip) yoldan enjekte edildi
- İnokülasyondan 48 saat sonra fareler sakrifiye edilerek sepsis oluşumunu saptamak için akciğer, karaciğer, kalp ve dalak çıkarılarak triptik soy agara ekim yapıldı ve 37 °C' de inkübe edildi





# GEREÇ VE YÖNTEM

- Ekimden 18-24 saat sonra
- $\geq 2$  organın kültüründe üreme olması sepsis olarak kabul edildi
- Kolistin dirençli *A. baumannii* için “ $3 \times 10^8$ ” kob/ml (koloni oluşturan birim/ml) farelerde sepsis oluşturan inokulum dozu olarak belirlendi





# GEREÇ VE YÖNTEM

## MKH Üretimi

- Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre üretimi için 8-10 haftalık 2 adet Balb-c fare kullanıldı
- $2 \times 10^6$  hücre olacak şekilde kök hücre üretimi yapıldı

# GEREÇ VE YÖNTEM

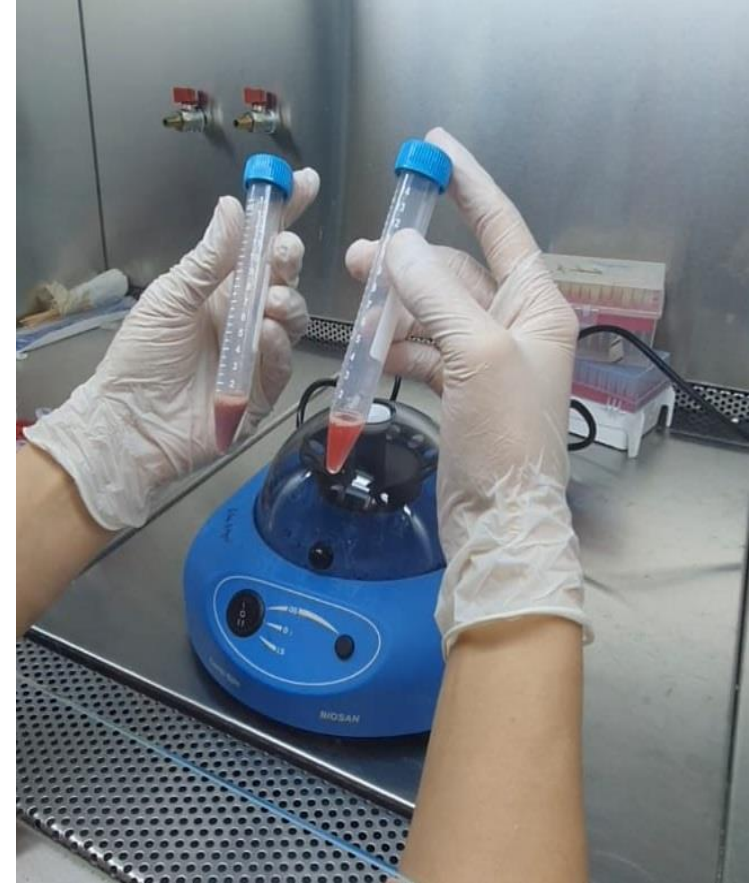
Gruplar / zaman	Negatif kontrol grubu (sadece serum fizyolojik)	Pozitif kontrol grubu (sadece bakteri)	Sadece mezenkimal kök hücre verilen grup	Sadece kolistin-fosfomisin verilen grup	Kolistin-fosfomisin+ mezenkimal kök hücre verilen grup
0. saat	SF	AB	AB	AB	AB
3. saat	-	-	MKH	K-F	MKH+K-F
7. saat	-	-	-	F	F
11. saat	-	-	-	F	F
15. saat	-	-	-	K-F	K-F
19. saat	-	-	-	F	F
23. saat	-	-	-	F	F
24. saat	İlk grup sakrifikasyon	İlk grup sakrifikasyon	İlk grup sakrifikasyon	İlk grup sakrifikasyon	İlk grup sakrifikasyon

# GEREÇ VE YÖNTEM

Gruplar / zaman	Negatif kontrol grubu (sadece serum fizyolojik)	Pozitif kontrol grubu (sadece bakteri)	Sadece mezenkimal kök hücre verilen grup	Sadece kolistin-fosfomisin verilen grup	Kolistin-fosfomisin+ mezenkimal kök hücre verilen grup
27. saat	-	-	MKH	K-F	MKH+K-F
31. saat	-	-	-	F	F
35. saat	-	-	-	F	F
39. saat	-	-	-	K-F	K-F
43. saat	-	-	-	F	F
47. saat	-	-	-	F	F
51. saat	-	-	-	K-F	K-F
55. saat	-	-	-	F	F
59. saat	-	-	-	F	F
63. saat	-	-	-	K-F	K-F
67. saat	-	-	-	F	F
71. saat	-	-	-	F	F
72. saat	ikinci grup sakrifikasyon	ikinci grup sakrifikasyon	ikinci grup sakrifikasyon	ikinci grup sakrifikasyon	ikinci grup sakrifikasyon

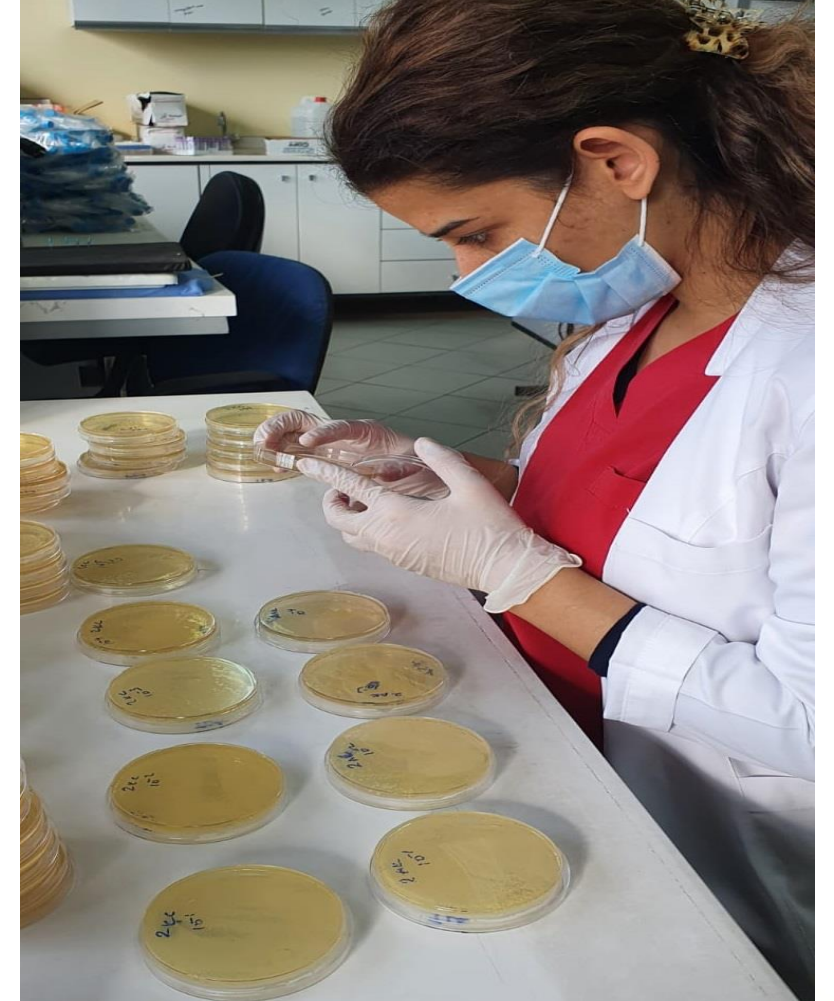
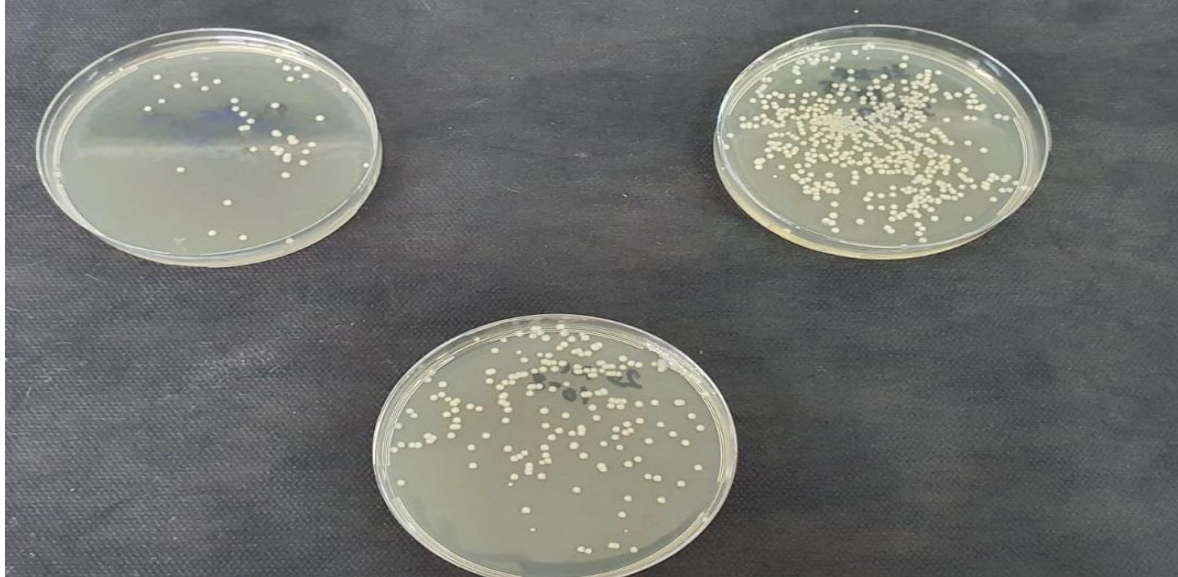
# GEREÇ VE YÖNTEM

- Farelerin sağ akciğeri ve karaciğerin yarısı serum fizyolojik içinde homojenize edildi
- 10 katlı seri dilüsyon hazırlanarak Triptik soy agara ekim yapıldı



# GEREÇ VE YÖNTEM

Koloniler 37 °C'de 20-24 saat inkübasyon sonrası akciğer ve karaciğerdeki bakteri yükü kob/ gr. olarak hesaplandı

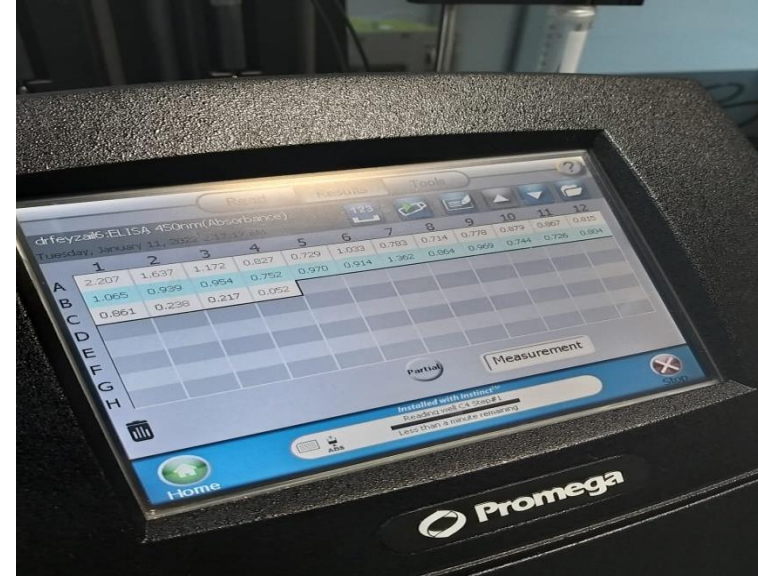
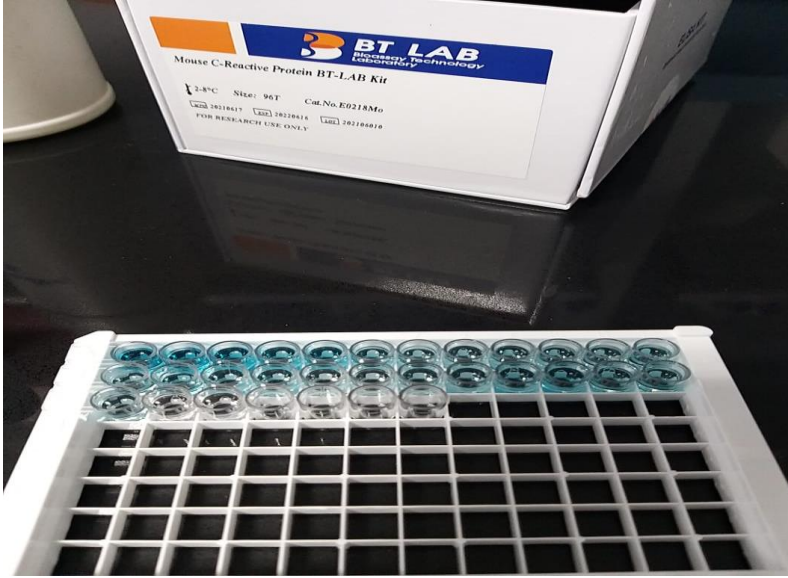


# GEREÇ VE YÖNTEM

## Histopatolojik Değerlendirme

- Akciğer, karaciğer ve böbrek dokusunun histopatolojik incelenmesi yapıldı
- Değerlendirme, dokuya özgü hücresel dejenerasyon, hemoraji ve mononükleer hücre infiltrasyonu parametrelerinin her biri için;
  - 0: bulgu yok
  - 1: hafif
  - 2: orta
  - 3: şiddetli

# GEREÇ VE YÖNTEM



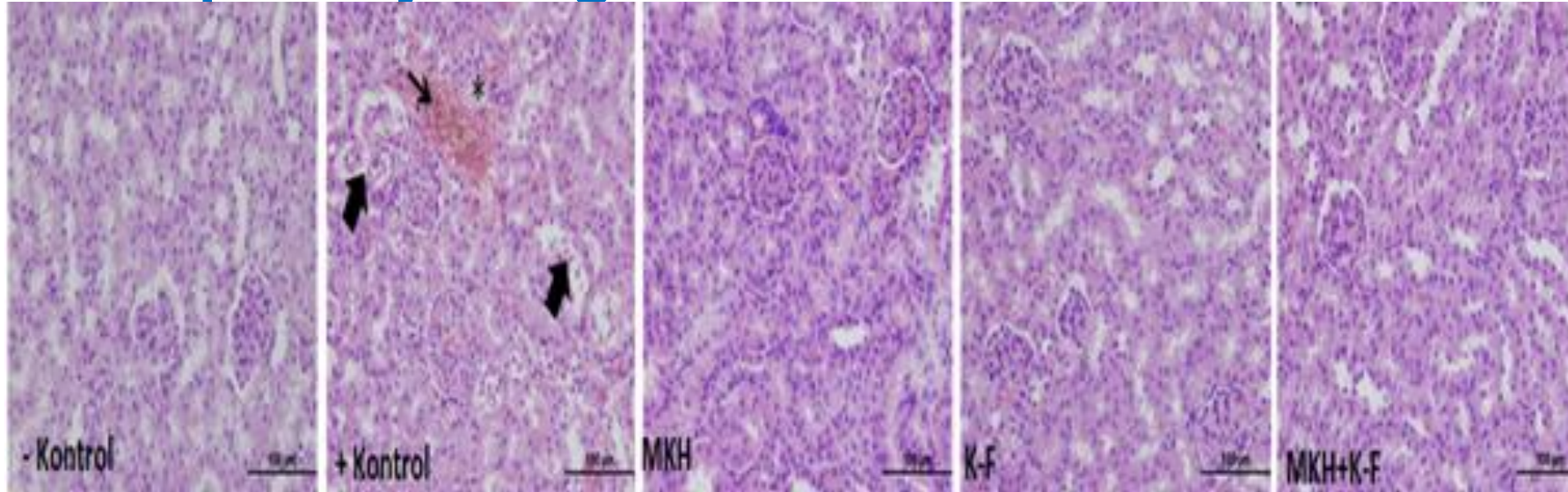
## Sitokin Analizi

- Farelerden intrakardiyak olarak alınan kanlar ELİZA yöntemi ile IL-6 ve CRP düzeyleri çalışıldı



# BULGULAR

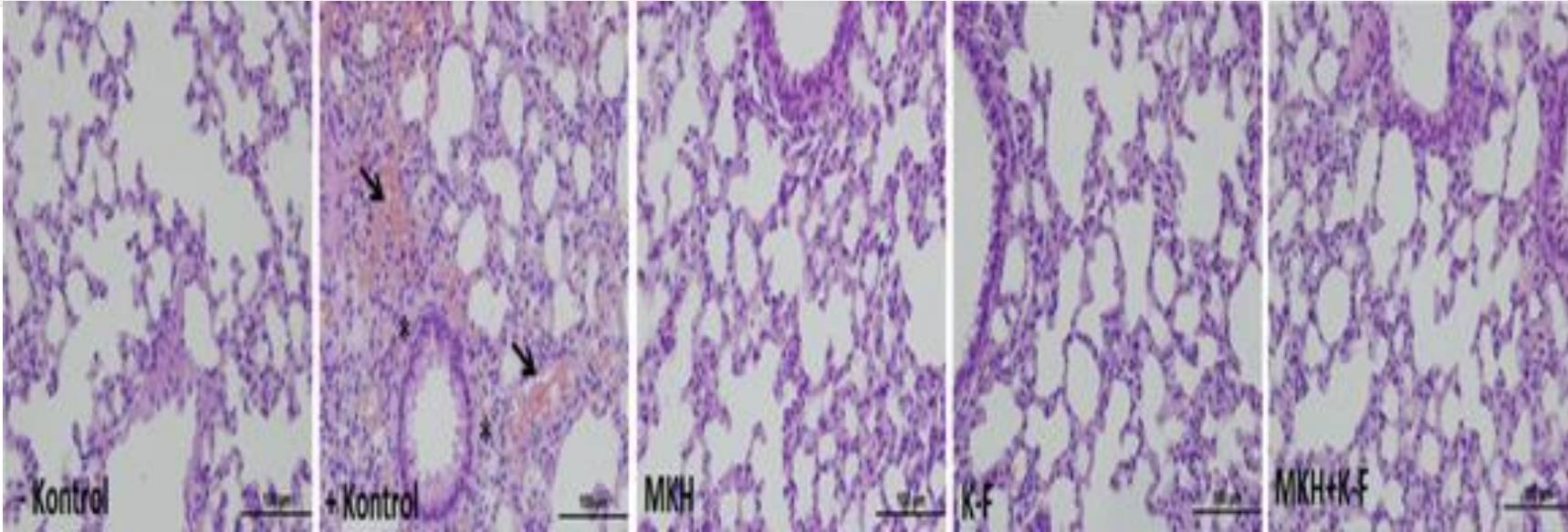
## Histopatolojik Değerlendirme



### Böbrek Dokusu

- Pozitif kontrol grubunun böbreklerinden alınan doku örnekleri, özellikle proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde dejenerasyon, intertübüler alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve hemoraji gibi yoğun dejeneratif değişiklikler
- MKH ve MKH+K-F gruplarına ait mikroskopik böbrek kesitlerinde, pozitif kontrol grubuna kıyasla tübüler yapıda bir iyileşme ve minimal hücresel dejenerasyon gösterdiği gözlemlendi

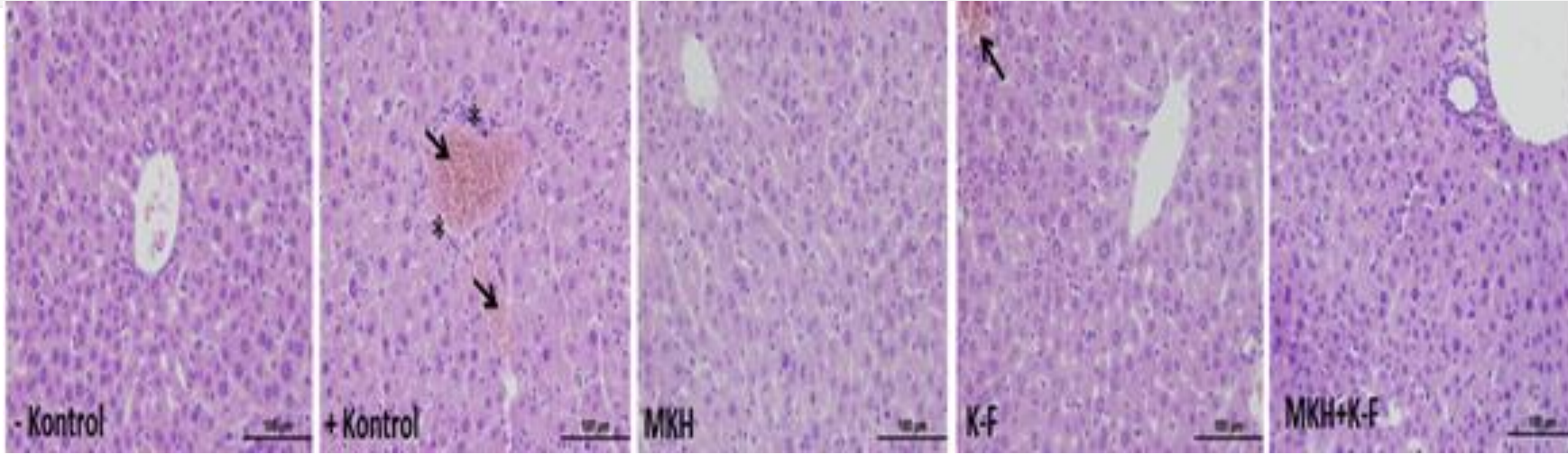
# BULGULAR



## Akciğer Dokusu

- Pozitif kontrol grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu, alveoler duvarda kalınlaşma ve belirgin hemoraji gibi önemli histopatolojik değişiklikler
- Pozitif kontrol grubunda gözlenen hasar tüm deney grupları içinde özellikle K-F grubunda önemli derecede azalmıştı
- MKH verilen deney grupları ise pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doku dejenerasyonunda dikkate değer bir azalmanın olduğu görüldü

# BULGULAR



## Karaciğer Dokusu

- Pozitif kontrol grubundan alınan karaciğer doku numuneleri, santral ven etrafında sinüzoidal dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve hemoraji gösterdi
- K-F grubunda orta derecede hepatosit vakuolizasyonu, sinüzoidal dilatasyon ve hemoraji gözlemlendi
- MKH ve MKH+K-F gruplarında dejenerasyonun minimal düzeyde olduğu görüldü

# BULGULAR

## Histopatolojik Skorumanın Değerlendirilmesi

Parametreler	Gruplar					
	Pozitif Kontrol	MKH	MKH+K-F	K-F	Negatif Kontrol	P
Histopatoloji, akciğer Mean $\pm$ SD	2.00 $\pm$ 0.60 a	1.17 $\pm$ 0.83	0.91 $\pm$ 0.70	0.73 $\pm$ 0.78	0.33 $\pm$ 0.57	<0.001
Histopatoloji, karaciğer Mean $\pm$ SD	2.25 $\pm$ 0.62 b	1.00 $\pm$ 0.85	0.82 $\pm$ 0.60	1.18 $\pm$ 0.75	0.33 $\pm$ 0.57	<0.001
Histopatoloji, böbrek Mean $\pm$ SD	2.33 $\pm$ 0.65 c	1.00 $\pm$ 0.60	0.72 $\pm$ 0.64	1.54 $\pm$ 0.82	0.33 $\pm$ 0.57	<0.001

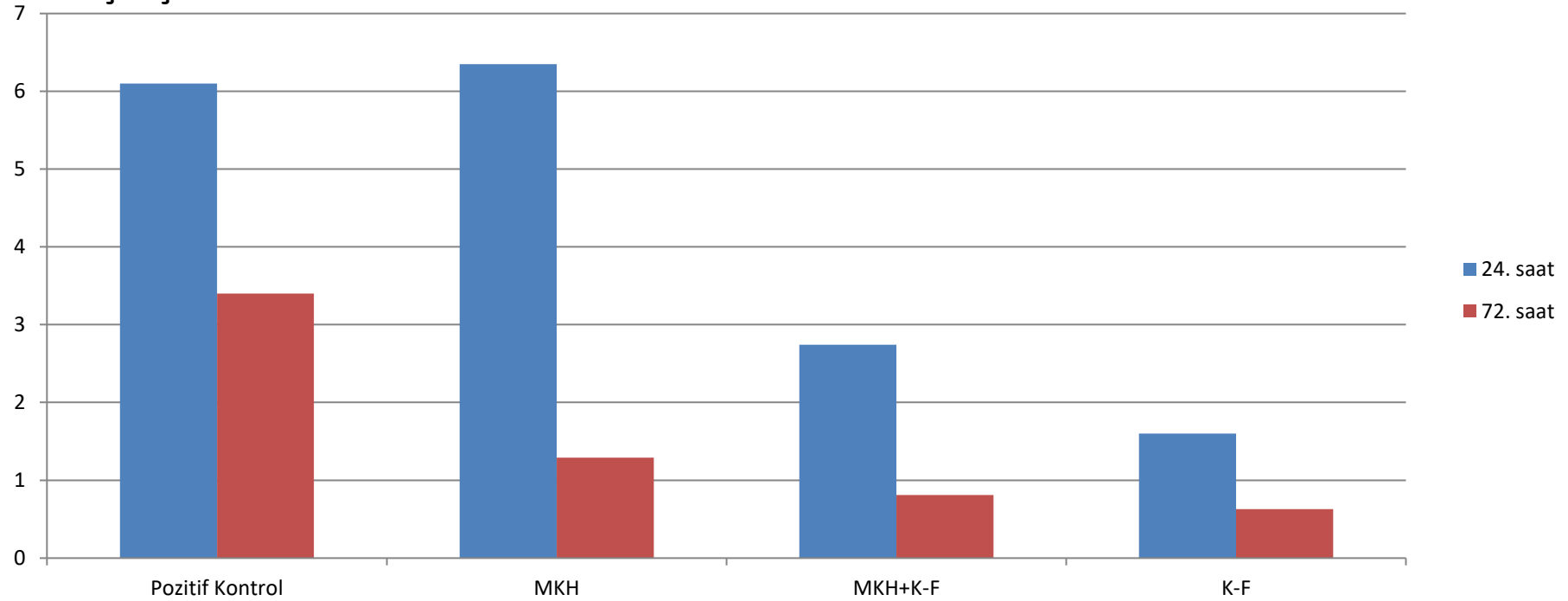
a:  $p=0.006$  MKH-K-F,  $p=0.001$  K-F,  $p=0.001$  negatif kontrol

b:  $p=0.001$  MKH,  $p<0.001$  MKH-K-F,  $p=0.007$  K-F,  $p=0.001$  negatif kontrol

c:  $p<0.001$  MKH,  $p<0.001$  MKH-K-F,  $p<0.001$  negatif kontrol

# BULGULAR

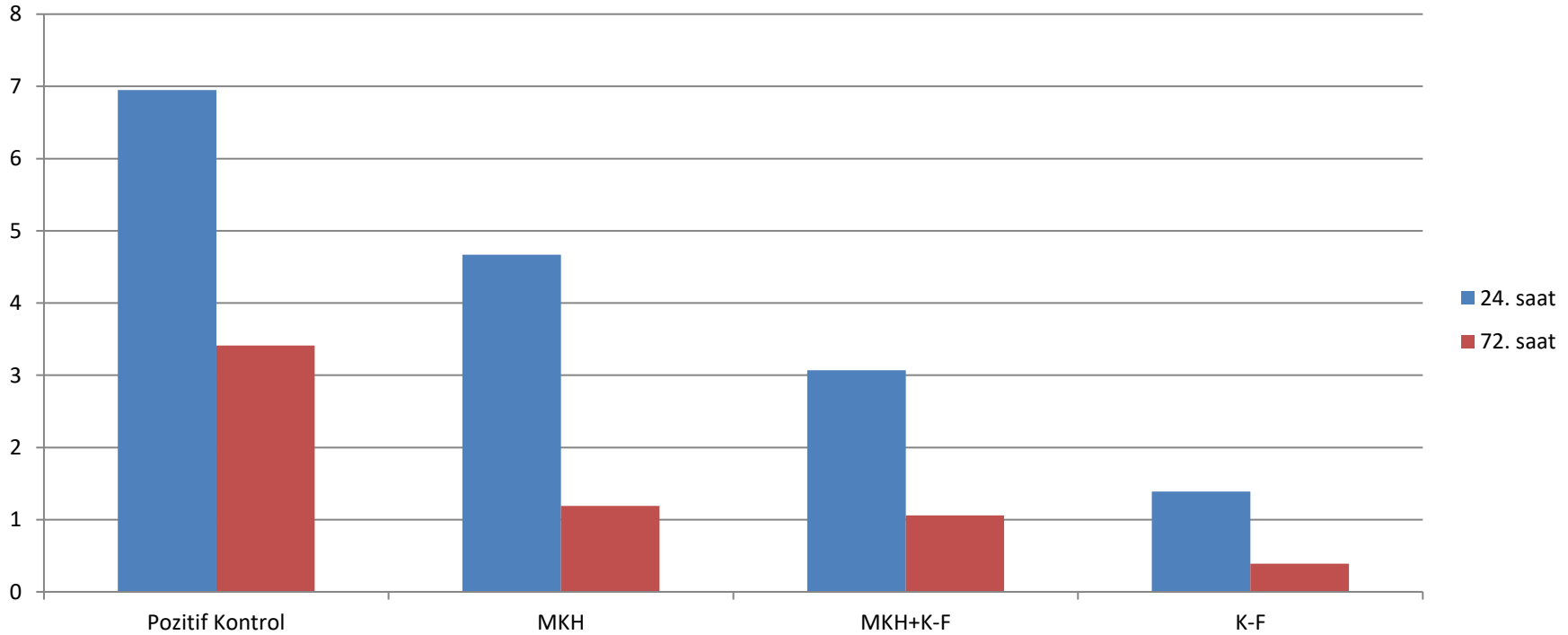
Deney gruplarının akciğer dokusundaki 24 ve 72. saatteki bakteri yüklerinin karşılaştırılması



MKH grubunun 24. ve 72. saatteki bakteri yükleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ( $p= 0.008$ )

# BULGULAR

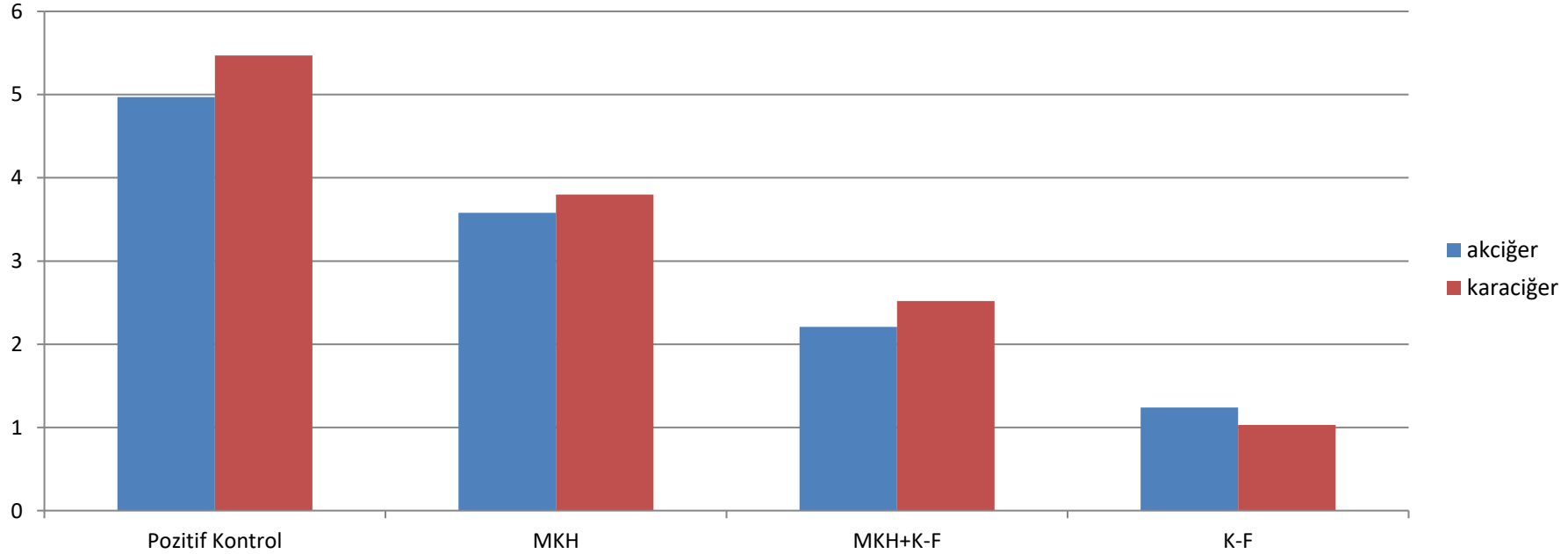
Deney gruplarının karaciğer dokusundaki 24 ve 72. saatteki bakteri yüklerinin karşılaştırılması



MKH, MKH+K-F ve pozitif kontrol grubunun 24. ve 72. saatteki bakteri yükleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (sırasıyla  $p= 0.008$ ,  $p=0,039$ ,  $p= 0,019$ )

# BULGULAR

Akciğer ve karaciğer dokusundaki bakteri yüklerinin gruplar arasında karşılaştırılması

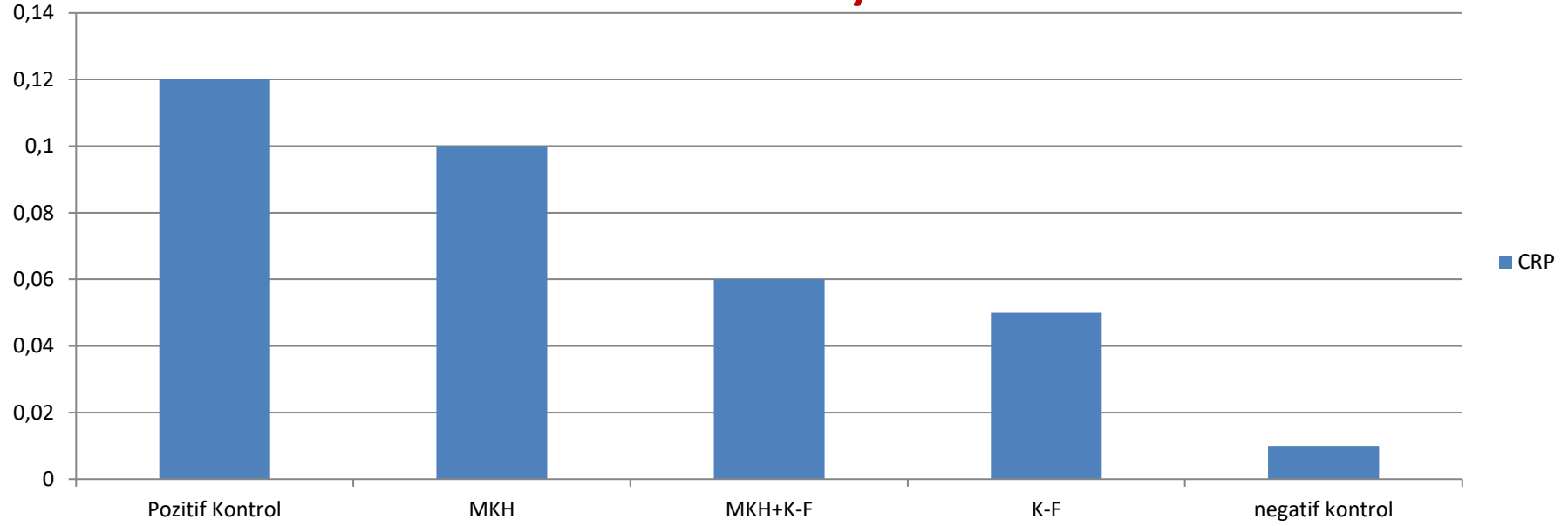


Akciğer ve karaciğer dokusunda pozitif kontrol grubu, MKH+K-F ve K-F grubuna göre bakteriyel yükte istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı (sırasıyla  $p=0.026/0.022$ ,  $p= 0.001/ 0.001$ )

# BULGULAR

## Sitokin Çalışması

### CRP Düzeyi

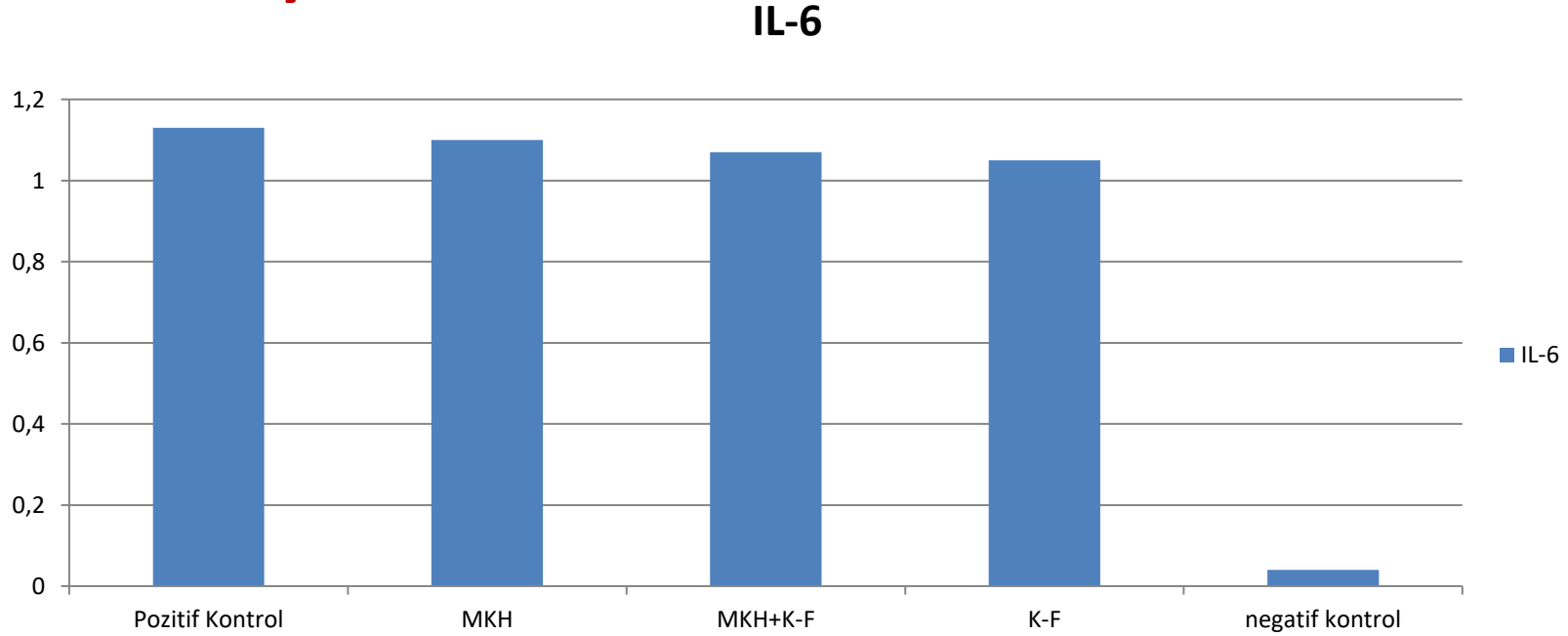


Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı



# BULGULAR

## IL-6 düzeyi



Negatif kontrol grubunda diğer gruplara göre anlamlı düşük saptandı ( $p < 0.001$ )

Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır

# SONUÇ

- Kolistin dirençli *A. baumannii* sepsis modelinde kolistin-fosfomisin kombinasyonu uygulaması ile akciğerdeki histopatolojik hasar daha az izlenirken, akciğer ve karaciğerdeki bakteri yükünde de azalma gözlemlendi
- Antibiyotik kombinasyonuna MKH uygulamasının da eklenmesi ile böbrek ve karaciğer dokusundaki histopatolojik hasardaki azalma daha da belirginleşti
- Akciğer ve karaciğer bakteri yükleri arasında belirgin bir farklılık izlenmedi
- Çalışmanın 72. saatinde kurban edilmiş ve iki doz MKH uygulanan gruplarda bakteriyel klirensin daha da belirgin olduğu gözlemlendi
- Kolistin dirençli *A. baumannii* sepsisi tedavisinde kolistin-fosfomisin tedavisine MKH eklenmesinin bakteriyel yükteki azalma ve histopatolojik hasarı engelleme açısından anlamlı olabileceği düşünüldü



**SABRINIZ İÇİN TEŞEKKÜR EDERİM**