تأثير الـGranulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) لوحده ومدمجا مع Moxifloxacin في علاج الفئران التي تعاني من نقص كريات الدم البيض العدلة المخمجة بـ*Staphylococcus* aureus المنتجة للمحفظة

*ميسم سامي عبد الكريم**

استلام البحث 28، حزيران، 2009
قبول النشر 29، كانون الاول ، 2009

الخلاصة:
تم عزل وتشخيص 20 عزلة بكتيرية تعود للنوع *Staphylococcus aureus* من اخماج الجروح والاخماج المرابطة للقثاطر،اختيرت عزلة واحدة منتجة للمحفظة باستعمال طريقة غراء المصل الطري.
حقنت مجموعة من الفئران التي تعاني من نقص كريات الدم البيض العدلة نتيجة تخميجها بـ*S.aureus* المنتجة للمحفظة بكل من G-CSF وMoxifloxacin كل على حدة،ومجموعة اخرى حقنت بكل من الـ G-CSF وMoxifloxacin معا.بينت النتائج ان معدل البقاء بعد اربعة ايام في الفئران المعالجة بكل من الـ G-CSF وMoxifloxacin معا كان 40% في حين كان معدل البقاء 20% لكل من الفئران المعالجة بـكل من G-CSF وMoxifloxacin كلا على حدة وهذا يبين ان لدمج الـ G-CSF وMoxifloxacin تاثيرا تجميعيا في قتل البكتريا في حين عند حقن كلا منهما على حدا كانت ذا تاثير مماثل في قتل البكتريا ،لذا من الافضل استعمال Moxifloxacin لوحده عوضا عن استعمال G-CSF لوحده لكلفته العالية ولعدم وجود فرق بالتأثير (التأثير غير منظور).

الكلمات المفتاحية:العوامل المحفزة للمستعمرات،العنقوديات الذهبية،علاج

المقدمة:

يتسبب العلاج الكيمياوي للمرضى الذين يعانون من قلة كريات الدم البيض (Lecucytopenic patient) بتثبيط فعالية الارومات الدموية (haematopoietic cells) الموجودة بنقي العظم و المسؤولة عن نضج كريات الدم البيض العدلة (neutrophil) فضلا عن الاستجابة المناعية الخلوية، وهذا يؤدي الى زيادة نسبة حصول الخمج لديهم الذي من المحتمل ان يكون حاد مؤديا احيانا الى الموت . تحدث اكثر الاخماج خطورة عند قلة كريات الدم البيض العدلة (neutropenic period) [1] ومن احد مسببات هذه الاخماج هي العنقوديات الذهبية المنتجة للمحفظة التي تؤدي دور مهما بامراضيتها و زيادة فوعتها ومقاومتها للبلعمة وبقائها بمجرى الدم [2،3].من طرائق علاج هذه الاخماج هي استعمال الـHaematopoietic growth factor [4].

ان العوامل المحفزة للمستعمرات Colony stimulating factor(CSF) هي واحدة من العوامل المحفزة للارومات الدموية(Haematopoietic growth factor) وهي عبارة عن بروتينات سكرية تحفز تكاثر وتمايز الارومات الدموية التي تسمى السوابق (progenitor cell)وتحفز المناعة غير النوعية وزيادة قابلية كريات الدم البيض على قتل البكتريا [5]، وتوجد اربعة انواع من هذا العامل وهي Macrophage colony stimulating factor M-CSF التي تنظم انتاج الخلايا البلعمية الكبيرة و Granulocyte colony stimulating factor G-CSF التي تنظم انتاج كريات الدم البيض الحبيبية و Granulocyte-Macrophage colony stimulating factorالتي تنظم انتاج كلا من الخلايا البلعمية الكبيرة وكريات الدم البيض الحبيبية و Interleukine 3 الذي ينظم انتاج عدد من الخلايا الدموية [6،7].

تعد الـ*Staphylococcus aureus* مسببا للعديد من الامراض سيما العنقوديات الذهبية المقاومة للمثيسيلين والتي اصبحت واسعة الانتشار بالمستشفيات ومسببا رئيسا للاخماج المكتسبة من المستشفيات (Hospital acquired infection) ،لذا اصبح الاطباء بحاجة لعلاج مثالي لمثل هذه البكتريا [8]. يمتاز مضاد الموكسيفلوكساسين بامتلاكه فعالية جيدة ضد البكتريا الموجبة لملون غرام ومن ضمنها الـ *S. aureus* المقاومة للبنسيلين والمثيسيلين. كما انه يمتلك فعالية افضل عند مقارنته بالمثيسيلين والليفوفلوكساسين وبمدى فعاليه افضل بـ32 مرة مقارنة بالسبروفلوكساسين[9].

*جامعة بغداد-كلية العلوم-قسم التقنيات الاحيائية

توصل كلارك وجماعته [10] الى ان دمج CSF مع المضادات يزيد من الفعالية العلاجية ونتيجة لفعالية الـG-CSF مدمجا مع الموكسيفلوكساسين على تكاثر وتمايز كريات الدم البيض (leukocyte) هدفت هذه الدراسة الى تحديد دور G-CSF على تكاثر العنقوديات الذهبية بالفئران ذات العدد القليل من كريات الدم البيض.

المواد وطرائق العمل:

الحيوانات

استخدمت فئران ذكور(52 فارة) من نوع (Swiss mice) وبأوزان تراوحت ما بين 20-25 غرام تمت مراقبتها لمدة اسبوع قبل البدء بالتجربة .اعطيت الفئران العلف الحيواني الخاص بالفئران المختبرية مع مراعاة نظافة العلف وماء الشرب.

العزلات البكترية

تم عزل وتشخيص 20 عزلة بكتيرية تعود للنوع الـ*S. aureus* من مرضى يعانون من اخماج الجروح والاخماج المرابطة للقثاطر و بالاعتماد على مصنف بركي [11].

درست قدرة هذه العزلات على انتاج المحفظة باستعمال طريقة الحبرالهندي (India ink) [12] ،وتم التاكد من انتاجها للمحفظة باستعمال طريقة غراء المصل الطري [13] وتم تحضير البكتريا الاكثر انتاجا للمحفظة بتركيز 6×10^8 خلية/مليلتر بمقارنة عكورته بعكورة انابيب ماكفرلاند رقم 2 و المتمثل بLD80 [14].

تحديد دور الـG-CSF في علاج الفئران التي تعاني من نقص كريات الدم البيض نتيجة تخميجها بـ*S.aureus*

حضر الـcyclophosphamide بالاعتماد على تعليمات الشركة المجهزة (Zydus Biogen,Cadila health care limited) باذابته بالمحلول الفسيولوجي الى حين الحصول على التركيز المطلوب 100ملغم/مليلتر. حقنت الفئران بمقدار 0.2 مليليتر داخل البريتون.

تم تحضير Granulocyte –colony stimulating factor (Hoffmann_LaRoche Switzerland) بتركيز 0.4 ملغم /كغم وبحجم 0.1مليلتر حفظت بدرجة 4م° الى حين الاستعمال.مضاد الـMoxifloxacin حضر بتركيز48ملغم /كيلوغرام باستعمال الماء المقطر.

حقنت الفئران بـ0.2 مليلتر من الـcyclophsamide المحضر مسبقا وتركت لمدة 3 ايام لغرض استحداث فئران تعاني من نقص كريات الدم البيض العدلة [15] تم عد كريات الدم البيض باستعمال طريقة Differential Leukocyte Count اذا كان عدد كريات الدم البيض العدلة 59كرية دم بيضاء عدلة /مليمتر بالفئران التي تعاني من نقص كريات الدم البيض العدلة (neutropenic mice) مقارنة بالفئران الاعتيادية التي كان عدد كريات الدم البيض العدلة لها 1068كرية /مليمتر^3 ،ثم خمجت الفئران عن طريق حقن بكتريا *S. aureus* المنتجة للمحفظة المحضرة مسبقا داخل البريتون. ولتقييم فعالية دمج المضاد moxifloxacin مع الـG-CSF تم تقسيم الفئران الى مجاميع تمثلت بمجموعة حقنت بمضاد الـmoxifloxacin فقط وبتركيز 48ملغم /كيلوغرام مرتين يوميا ومجموعة حقنت بـ G-CSF فقط ولمدة 3 ايام على التوالي ومجموعة حقنت مباشرة بعد الخمج بـG-CSF وبعد ساعة من الاصابة حقنت بالمضاد ثم اعطيت الجرعة الثانية من المضاد بعد 10 ساعات من الجرعة الاولى.اما المجموعة المخمجة التي حقنت بالمحلول الفسيولوجي فهي تمثل السيطرة.

تتكون كل مجموعة من 13 فأرة،10 منها استعملت لدراسة معدل البقاء اما الثلاثة الاخيرة; استعملت لتحديد العدد الحي من البكتريا الموجودة بالفئران بعد التخميج والعلاج بكل من G-CSF والمضاد كل على حدة وبعد جمعهما معا.

النتائج والمناقشة:

اظهرت النتائج ان 5 عزلات من مجموع 20 عزلة كانت منتجة للمحفظة اختيرت عزلة واحدة منتجة للمحفظة لغرض تخميج الفئران اذ اظهرت نموا منتشرا (Diffuse type) في وسط غراء المصل الطري في كلتا دالتي الاس الهيدروجيني المتعادل 7.2 والقاعدي 8.4.

كان عدد كريات الدم البيض العدلة 59كرية دم بيضاء عدلة /مليمتر بالفئران التي تعاني من نقص كريات الدم البيض العدلة (neutropenic mice) مقارنة بالفئران الطبيعية التي كان كان عدد كريات الدم البيض العدلة لها 1068كرية /مليمتر^3 .

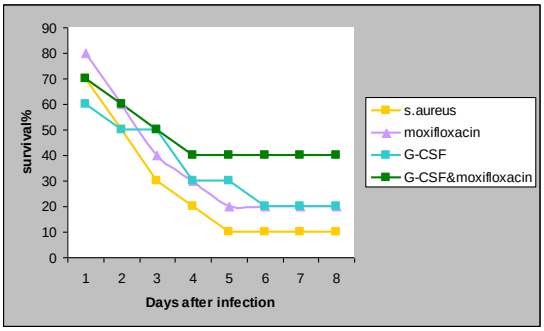
ان التاثير العلاجي لـG-CSF للفئران التي تعاني من نقص كريات الدم البيض العدلة المخمجة بالـ *S. aureus* موضحة بالشكل (1).

اظهرت النتائج انه بعد 24 ساعة من الحقن البكتيري كان معدل البقاء لكل من الفئران المحقونة بالبكتريا فقط (السيطرة) والفئران المعالجة بكل من *G-CSF* و*moxifloxacin* كل على حدة 70% و60% و80% على التوالي وعند دمج كل من *G_CSF* و*moxifloxacin* كان معدل البقاء 70% وهذه النتائج توضح ان معدل البقاء بعد 24 ساعة في كل المجاميع كان متقاربا.

اما بعد 4 ايام ,كان معدل البقاء في الفئران المعالجة بكل من *G-CSF* و*moxifloxacin* معا 40% مقارنة بفئران السيطرة التي كان معدل البقاء لها 20% في حين وصل معدل البقاء 30% لكل من الفئران المعاملة بالـG-CSF والمضاد كل على

حدة،وكانت هذه النتائج مماثلة لمعدل البقاء بعد 8 ايام اذ كان معدل البقاء 40% للفئران المعالجة بـ *G-CSF* و*moxifloxacin* معا في حين كان معدل البقاء 20% لكل من الفئران المعالجة بـ*G-CSF* و*moxifloxacin* كلا على حدة و10% بفئران السيطرة (شكل1).وهذا يدل على ان معدل البقاء عند دمج G-CSF وMoxifloxcacin كان اعلى من معدل البقاء عند استعمال كلا منهما على حدا. كما ان معدل البقاء عند استعمال G-CSF وMoxifloxcacin كل على حدة افضل من معدل البقاء لفئران السيطرة.

جاءت هذه النتيجة مقاربة لنتيجة Yasuda وجماعته [16] اذ توصل الى ان معدل البقاء بعد 7 ايام من الحقن البكتيري للفئران المخمجة ببكتريا الـ*Pseudomonas aeruginosa* والمعالجة بـCSF لوحده 43% في حين كان معدل البقاء للسيطرة 4%.كما اوضح نيلسن وجماعته [17] ان مضادات الكينولونات تزداد فعاليتها عند دمجها مع CSF وذلك لان هذه المضادات تتجمع داخل كريات الدم البيض الحبيبية التي تعد واسطة ثانوية لنقل المضاد الى البكتريا والتي تزداد عند حقن الفئران بCSF.



شكل(1)التاثير العلاجي لـ*G-CSF* لوحده ومدمجا مع الـ*Moxifloxacin* في معدل البقاء في الفئران المخمجة بالـ*S. aureus* المنتجة للمحفظة.

بعد زرع الدم اجري عد حي للبكتريا للفئران المعالجة بـ*G_CSF* و*moxifloxacin* معا لم يلاحظ بها اي نمو في حين وصل عدد البكتريا 90×10^{7} خلية/مليلتر بالفئران المعاملة بالمضاد لوحدة و 150×10^{8} خلية /مل بالسيطرة بعد 24 ساعة من حقن البكتريا.

اما بعد 3 ايام ،فان فئران السيطرة فقط ظهر بها نمو بكتيري وصل الى 60×10^{6} خلية/مليلتر في حين ان بقية المجاميع المتمثلة بالفئران المعاملة بـ*G-CSF* والفئران المعاملة بكل من *G-CSF* و*moxifloxacin* معا لم يظهر بها نمو بكتيري،اما بعد 8 ايام فكانت جميع الفئران المعالجة دون نمو بكتيري (جدول1).

و من خلال النتائج المستحصلة يمكننا الاستنتاج ان هناك فعلا تجميعيا بين الـ*G-CSF* و*moxifloxacin* عند دمجهما معا وذلك لعدم وجود نمو بكتيري بعد اليوم الاول (جدول1) وقد جاءت هذه النتيجة مغايرة لنتيجة سترين وجماعته [18] الذي توصل الى انه لا يوجد تاثير مفيد لـ*G-CSF* في فعالية الـ*moxifloxacin* عند استعمال الانواع *E.coli* و*Bacillus fragilis* علما ان هذه الانواع تختلف عن النوع المستعمل في الدراسة كونها عصويات .الاولى منها سالبة لملون غرام.

وتوصل باحثون اخرون [19] الى ان *E.coli* غير المنتجة للمحفظة يتم قتلها بسهولة عن طريق المتمم في حين ان الـ*E.coli* المنتجة للمحفظة يتم قتلها عن طريق كريات الدم البيض العدلة ولقتل مثل هذه البكتريا احتاجوا لتنشيط هذه الخلايا التي تتم بعدة طرائق منها حقن الفارة بـ*CSF* والتي ادت لحصول انخفاض حاد بعدد البكتريا.

جدول(1) التاثير العلاجي لـ*G-CSF* لوحده ومدجا مع الـ*Moxifloxacin* في العدد الحي للبكتريا في الفئران المخمجة بالـ*S. aureus* المنتجة للمحفظة ومقارنتها بالسيطرة.

الوقت	بدون علاج	نوع العلاج المستعمل بعد التخميج بـ*S.aureus* عدد البكتريا خلية مكونة للمستعمرة/مليلتر		
		Moxifloxacin	G-CSF	*G-CSF&moxifloxacin*
يوم واحد	150×10^{8}	90×10^{7}	85×10^{8}	لايوجد
3 ايام	60×10^{6}	لايوجد	لايوجد	لايوجد
8 ايام	40×10^{6}	لايوجد	لايوجد	لايوجد

اما عند بيان تاثير الـ*G-CSF* و*moxifloxacin* كل على حدة فكان متقاربا كما مبين بالجدول(1) مما يدل على ان *G-CSF* و*moxifloxacin* كلا على حدة لهما التاثير نفسه في قتل البكتريا.

المصادر:

1. Cruciani, M;Rampazo, R.; Malena, M. 1996. Prophylaxis with fluoroquinolone for bacterial infections in neutropenic patient:a meta analysis. Clin infect dis 239(4):795-805.
2. ÓRiordan,K and Lee,J.C. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide. clin microbiology review 17(1) :218-234.
3. Chambers,H.F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? emerg. Infect. Dis. 7(1):178-182.

4. Groopman,J.E; Molina, J.M and Scadden,S.T.1449.haematopoietic growth factors :Biology and clinical application .engl j med.55 (4):321-324
5. Williams, J.L. 2004. cellular homeostasis and hematopoiesis in clinical laboratory hematology by Shirlyn B.McKenzie:8-41.Pearson prentice hall. united state.
6. Metcalf,D. 1986. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophafe colony stimulating factors.Blood.67 (3);257-267.
7. Quezado, Z., C.Parent, W. Karazi, M.Depietro, C.Natanson, W. Hamond, R. L.Danner, X. Cui, Y, FitzmS. M. Banks, E. Gerstenberg, and P.Q. Eichacker. 2001. Acute G-CSF therapy is not protective during lethal *E.coli*sepsis. AM.J. physiology. Regulatory interactive Comp.physiolo.281:R1177-R1185.
8. Bozdogan,B., Esel, C.Whitener, F.A. Browne, and P.C. Appelbaum. 2003. antibacterial susceptipility of a vancomycin –resistant Staphylococcus aureus strain isolated at hershy medical center .J.Antimicrob.chemother.52(5):864 -868.
9. Clark,S.C and Kamen,R. 1987. The human hematopoietic colony-stimulating factors.Science.236 (4806):1229-37.
10. Culley, C. M; Lacy, M. K; Klutman, N. and Edward, B. 2001. Moxifloxacin: clinical efficacy and safety;j health sys pharm; 558(5):379-388.
11. Holt, J. C; Krieg, N. R; Sneath, A.; Staley,J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergeys manual of determination bacteriology.9th edition Williams and wiken.
12. Cruickshank, R.; Duguid, J.P; Marmion, B.P. and Swain,R.H. 1975. medical microbiology. twelve edition Churchill livingstone.
13. Finkelstein,R.A. and Sulkin,E. 1958. characteristic of coagulase positive and coagulase negative staphylococci in serum soft agar.J of bacteriology.:75(3) :339-344.
14. Nelly A. Kuklin, Desmond J. Clark, Susan Secore, James Cook, Leslie D. Cope, Tessie McNeely, Liliane Noble, Martha J. Brown, Julie K. Zorman, Xin Min Wang, Gregory Pancari, Hongxia Fan, Kevin Isett, Bruce Burgess, Janine Bryan, Michelle Brownlow, Hugh George, Maria Meinz, Mary E. Liddell, Rosemarie Kelly, Loren Schultz, Donna Montgomery, Janet Onishi, Maria Losada, Melissa Martin, Timothy Ebert, Charles Y. Tan, Timothy L. Schofield, Eszter Nagy, Andreas Meineke, Joseph G. Joyce, Myra B. Kurtz, Michael J. Caulfield, Kathrin U. Jansen, William McClements, and Annaliesa S. Anderson 2006. A Novel *Staphylococcus aureus* Vaccine: Iron Surface Determinant B Induces Rapid Antibody Responses in Rhesus Macaques and Specific Increased Survival in a Murine *S. aureus* Sepsis Model .infect immunity;74(4):2215-2223.
15. Buisman, A.M.; Langermans, J.A.M. and Furth,R.V.1998.effect of Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor on the number of leucocyte and course of *Listeria monocytogens infection* in naïve and leucocytopenic mice. Immunology; 93(1):73-97.
16. Yasuda,H.; Ajiki,Y; Shimozato, T.; Kasahar, M.; Kawada, H.; Iwata, M and Shimzu, K. 1990. Therapeutic efficacy of granuolocyte colony stimulating factor alone and in combination with antibiotics against *p.aeruginosa* infection in mice.Infect and immunity; 58(8):2502-2509.

infection abcesses in mice. Antimicrib agents and chemother; 49(9):3668-3675.

19. Cross, A.; Asher, L.; Seguin, M.; Yuan, L.;Kelly, N.;Hammack, C. and Sadoff, J. 1995. The importance of lipopolysaccharide initiated cytokine mediated host defence mechanism in mice against extraintestinally invasive *E.coli*. The j of clin Investigation; 96(2):676-686.

17. Nielsen,S.L.,Obel,N.M.,Storgaard, and Andersen, P.L.1997.The effect of quinolones on the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* in neutrophil granulocytes. J antimicrob agents and chemother. 39(5):617-622.

18. Stearne, L.E.; Vonk, A.G.; Kullberg, B.J. and Gyssen, I.C. 2005. effect of recombinant murine granulocyte colony stimulating factor with or without fluoroquinolone therapy on mixed

Effect of Granulocyte-colony stimulating factor with or without Moxifloxcacin therapy on capsulated *Staphylococcus aureus* infection in neutropenic mice

Maysem Sami Abdulalkareem*

*Baghdad University, College of Science, Biotechnology Department

Abstract:

Twenty bacterial isolates were identified as *Staphylococcus aureus* collected from wounds and catheters related infections. A capsulated *S. aureus* isolate was chosen after performing serum soft agar test, for this study Neutropenic mice were challenged with capsulated *S. aureus ,and the effect of G-CSF* with or without moxifloxacin was studied.

The results indicated that the addition of G-CSF to moxifloxacin therapy have a synergistic effect in the killing of the bacteria, while when each G-CSF and moxifloxacin were used seperately have a similar effect on bacterial killing. It was found that the moxifloxacin has the same activity as G_CSF but is less costly than the latter one.