

# In Vitro Koşullarda Flukonazol ve Ketokonazol ile Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör Kombinasyonunun İnsan Nötrofil Fonksiyonları Üzerine Etkisi

Nazif Elaldı<sup>1</sup>, İlyas Dökmetaş<sup>1</sup>, Sevtap Bakır<sup>2</sup>, Mehmet Bakır<sup>1</sup>, Mehmet Şencan<sup>3</sup>, M. Zahir Bakıcı<sup>4</sup>, Hüseyin Aydın<sup>2</sup>, E. Gül Delibaş<sup>4</sup>

**Özet:** Sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan flukonazol ve ketokonazolün granülosit-koloni stimüle edici faktör (rhG-CSF) ile kombine edilmesinin polimorfonükleer lökosit (PMN) fonksiyonları üzerine etkisi araştırıldı. Sağlıklı, gönüllü üç donörden elde edilen PMN'ler, in vitro koşullarda rhG-CSF ile muamele edildikten sonra *Candida albicans* CBS 2730 blastosporlarını fagosite etme ve hücre içi öldürme gibi fonksiyonları açısından gözlemlendi. Aynı donörlerden elde edilen PMN'ler antifungal ilaçlar ve blastosporlarla birlikte inkübe edildi ve PMN fonksiyonları gözlemlendi. Üçüncü aşamada yine aynı donörlerden elde edilen PMN'ler, önceden 3000 U/ml rhG-CSF ile muamele edildikten sonra antifungal ilaçlar ve blastosporlarla birlikte inkübe edilerek PMN fonksiyonları gözlemlendi. Bulgularımız, rhG-CSF'nin sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde antifungal ilaçlarla, özellikle flukonazol ile birlikte kullanıldığında yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** G-CSF, flukonazol, ketokonazol.

**Summary:** Effects of combination with granulocyte-colony stimulating factor, fluconazole and ketoconazole on the function of human neutrophils. In this study combination of fluconazole and ketoconazole which were used in the treatment of systemic fungal infections with rhG-CSF were tested on neutrophil functions. Neutrophils which were taken from three healthy volunteers were treated with rhG-CSF in-vitro conditions. Then those neutrophils were tested with phagocytosing and intracellular killing of *Candida albicans* CBS 2730 blastospores. Neutrophils which were taken from the same donors were incubated with antifungal drugs and blastospores, and neutrophil functions tested. In the third step, neutrophils which were taken from same donors were treated with 3000 U/ml of rhG-CSF and then incubated with antifungal drugs and blastospores, and neutrophil functions tested. As a result, we concluded that rhG-CSF could be helpful in the treatment of systemic fungal infections when used with ketoconazole, and especially fluconazole.

**Key Words:** G-CSF, fluconazole, ketoconazole.

## Giriş

*Candida* ve *Aspergillus* türleri, nötropenik kanser hastalarında yaşamı tehdit eden infeksiyonlara yol açan en önemli mantarlardır (1). En sık fırsatçı mantar infeksiyonu oluşturan *Candida* türleri, *Candida* türlerinden de kliniklerde en sık izole edilen *Candida albicans*'tır. *Candida* türlerinin oluşturduğu fırsatçı infeksiyonlar, geçen 10-15 yıllık süre içinde artış göstermiş, 1985-1988 yılları arasında ABD'de nozokomiyal kandan yayılan infeksiyonların % 7.7'sini *Candida* türleri oluşturmuştur (2). PMN'ler, sistemik mantar infeksiyonlarına karşı en önemli konak savunma elemanlarıdır. Nötropeninin sistemik kandidiyaz için majör predispo-

zan faktör olduğu bilinmektedir. PMN fonksiyonlarında oluşan baskılanmalar, fırsatçı infeksiyonların kontrol edilemesine yol açar. Kullanılan birçok antifungal ilacın normal terapötik konsantrasyonlarda fungistatik olması nedeniyle başarılı tedavi için efektif fagositik hücre fonksiyonları sıklıkla önemlidir. Antineoplastik ajanlar, analjezikler, antibiyotikler ve antifungal ilaçların PMN fonksiyonları üzerinde olumlu ve olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (3,4).

Sistemik *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde poliyen yapılı amfoterisin B, toksisitesine rağmen hâlâ seçkin bir ilaç olarak kullanılmaktadır (5). Sentetik azol yapılı antifungal ilaçlar ise, halen sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde verilerin az olması nedeniyle alternatif tedavi seçenekleridir. Flukonazol ve ketokonazol, azol yapılı iki antifungal ilaçtır. Flukonazol, sistemik kandidiyaz tedavisinde ümit verici gözükmekte, nötropenik olmayan hastalarda ve stabil nötropenik hastalardaki sistemik kandidiyaz tedavisinde önerilmektedir. Ketokonazol ise, immüdüşkün (immunocompromised) hastalarda etkisiz olması nedeniyle önerilmemektedir (6-8).

- (1) Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Sivas
- (2) Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas
- (3) Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Sivas
- (4) Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas

**Tablo 1. rhG-CSF ile Gözlenen PMN Fonksiyonları\***

Konsan- trasyon (U/ml)	Fonksiyonlar			
	Fag (%)	HÖ (%)	Fİ	CHİA (%)
0	39.3±1.8	17.8±2.4	2.2±0.1	84.7±0.7
1 500	44.0±5.8	21.2±1.9	2.0±0.3	85.3±3.7
3 000	50.0±4.0	24.9±2.5	1.8±0.1	90.6±1.8
4 500	48.6±3.3	30.0±4.6	1.9±0.1	91.3±1.3
6 000	52.6±0.7	29.5±6.8	1.7±0.1	90.0±1.2

\*Bütün değerler, üç ölçümün ortalaması ± SE olarak verilmiştir.  
Fag: fagositoz oranı, HÖ: hücre içi öldürme oranı, Fİ: fagositik indeks, CHİA: *Candida*'ların hücre içine alınım oranı.

Daha önce sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan flukonazol ve ketokonazolün PMN fonksiyonları üzerine olan etkileri araştırılmış ve değişik sonuçlar elde edilmiştir (4,9-14). Yine rhG-CSF'nin ise, PMN'lerin fonksiyonlarını artırdığı bildirilmiştir (15-17). Ayrıca nötropenik farelerde geliştirilen sistemik *Candida* infeksiyonlarında tek başına kullanıldığında (18), flukonazol ve itrakonazol ile kombine edildiğinde mortalite oranını azalttığı da bildirilmiştir (19). İmmüdüştükün hastalarda gelişen sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde antifungal tedaviye ek olarak koloni stimüle edici faktör uygulamalarının hastaları bu infeksiyonlardan koruyabileceği de öne sürülmüştür (8).

Biz bu çalışmada, sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan flukonazol ve ketokonazolün in vitro koşullarda tek başlarına ve rhG-CSF ile kombine edildiğinde PMN fonksiyonları üzerine olan etkilerini incelemeyi planladık. Amacımız, triazol grubu flukonazol ile imidazol grubu iki azol yapılı antifungal ilacın rhG-CSF ile kombine edildiğinde rhG-CSF'nin daha önce deney hayvanlarında görülen yararlı etkisinin in-vitro koşullarda PMN fonksiyonları üzerinde gözlenip gözlenmeyeceğini değerlendirmektir.

#### Yöntemler

**PMN'lerin Elde Edilmesi:** PMN'ler, daha önce *Candida* infeksiyonu anamnezi olmayan 3 sağlıklı gönüllü donörden (yaş ortalaması 28 yıl) alınan kandan Verbrugh'un tanımladığı modifiye Böyum tekniğiyle elde edildi (20). Özetle, PMN'ler, 5-10 U/ml benizl alkol içermeyen heparin (Nevparin®, Bilim İlaç) ile sıvanmış injektörlere alınan kandan, dekstran (Macrodex®, Baxter) ile 45 dakika çökmeye

birakılması ve fikol (Histopaque®, Sigma, katalog no. 1077-1) ile santrifüje edilmesi ile elde edildi. Elde edilen PMN'ler, Hanks'ın dengeli tuz solüsyonu (HBSS) ile iki kez yıkandı. Sonunda hücrelerin canlılığı tripan mavisi (Sigma, katalog no. T8154) ile test edildi (boyanırsa ölü, boyanmazsa canlı) ve % 0.05 oranında sığır serum albümini (Sigma, katalog no. B 4287) içeren HBSS içinde Neubauer lamı ve lökosit pipeti yardımıyla 5x10<sup>6</sup>/ml'ye ayarlandı.

***Candida albicans*:** Araştırma boyunca *C. albicans* CBS 2730 suşu kullanıldı ve Refik Saydam Hıfzısıha Merkezi'nden sağlandı. *C. albicans*'lar, araştırmadan 24 saat önce saklama besiyerinden Sabouraud dekstroza ağara ekilip 24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. *Candida*'lar bu şartlarda psödohip veya germ tüpü oluşturmadan sadece blastospor fazında üredi. Blastosporlar, HBSS içinde 1x10<sup>7</sup>/ml'ye ayarlandı.

**AB Serumunun Hazırlanması:** AB grubu kandan elde edilen serum opsonizasyon için kullanıldı. 1 ml'lik küçük hacimler halinde -20°C'de donduruldu ve araştırmadan hemen önce oda ısısında bekletilerek çözülmesi sağlandı. *Candida*'ların opsonizasyonu için hacimce % 20'lik konsantrasyonları kullanıldı.

**İlaçlar:** Flukonazol (Triflucan®, Pfizer) piyasadan temin edildi. İlaç intravenöz infüzyon için hazırlanmış preparasyondu; 2 mg/ml konsantrasyonda ve serum fizyolojik içinde çözüldürülmüştü. İlaç, seri seyreltmelerle HBSS içinde 1-25 µg/ml konsantrasyona ayarlanıp araştırmada kullanıldı. Ketokonazol (Bilim İlaç), toz halde alınarak önce 0.2 N HCl içinde çözüldürüldü ve 50 mg/ml konsantrasyona getirildi. Takiben, steril damıtık su ile 100 µg/ml'ye ayarlandı. 1-25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlar HBSS içinde hazırlandı. Ketokonazol, araştırma süresi içinde günlük olarak hazırlanıp kullanıldı. Sitokin, rhG-CSF (Neupogen®, Roche) piyasadan sağlandı. Mililitresinde 30 milyon U (300 µg) sitokin içeriyordu ve *Escherichia coli*'den elde edilmişti.

Araştırmada sadece sitokin ile çalışılan grupta ilacın 1 500-6 000 U/ml konsantrasyonları kullanıldı. Çünkü bu konsantrasyonlar, hastalara parenteral 1.5-3 µg/kg G-CSF verilmesinden sonra ulaşılabilen serum sitokin konsantrasyonlarıdır (21). G-CSF'nin antifungal ilaçlarla kombine edildiği gruplarda ise PMN'leri önceden 3000 U/ml sitokin ile muamele ettik. Çünkü bu konsantrasyon, hem hastalarda serumda ulaşılabilen konsantrasyonu, hem de sadece sitokin

**Tablo 2. Flukonazol ve Ketokonazol ile Gözlenen PMN Fonksiyonları\***

İlaç Konsan- trasyonu (µg/ml)	Flukonazol				Ketokonazol			
	Fag (%)	HÖ (%)	Fİ	CHİA (%)	Fag (%)	HÖ (%)	Fİ	CHİA (%)
0	41.3±2.4	17.8±0.4	2.1±0.2	87.3±4.0	44.7±2.7	17.6±1.6	2.0±0.1	85.3±1.8
1	41.3±3.5	19.8±1.5	2.0±0.2	80.7±0.7	38.0±0.1	22.8±4.0	2.0±0.1	75.5±2.7
5	40.0±3.0	21.7±1.3	1.9±0.1	78.0±3.0	38.0±1.2	25.9±4.9	1.9±0.1	71.3±2.7
10	36.0±2.3	21.5±1.2	2.2±0.2	78.0±1.2	38.7±1.8	26.8±1.9	1.9±0.2	74.7±2.4
25	34.7±0.7	18.9±1.4	2.2±0.1	77.3±1.3	41.3±1.8	25.2±3.0	2.0±0.2	83.3±6.8

\*Bütün değerler, üç ölçümün ortalaması ± SE olarak verilmiştir.

Fag: fagositoz oranı, HÖ: hücre içi öldürme oranı, Fİ: fagositik indeks, CHİA: *Candida*'ların hücre içine alınım oranı.

**Tablo 3. PMN'lerin Önceden G-CSF ile Muamelesinden Sonra Flukonazol ve Ketokonazol ile İnkübe Edilmesiyle Gözlenen PMN Fonksiyonları\***

İlaç Konsantrasyonu (µg/ml)	Flukonazol				Ketokonazol			
	Fag (%)	HÖ (%)	Fİ	CHİA (%)	Fag (%)	HÖ (%)	Fİ	CHİA (%)
0	41.3±1.8	15.8±1.1	2.0±0.1	83.3±2.4	39.3±1.8	14.9±0.7	2.1±0.2	82.0±4.0
1	43.3±1.3	20.9±2.8	1.9±0.1	84.7±0.7	36.7±1.7	22.6±1.7	1.9±0.1	68.0±2.0
5	40.0±3.5	26.9±2.7 <sup>a</sup>	1.8±0.1	72.7±0.7	40.0±2.3	22.3±1.6	2.0±0.2	79.3±2.4
10	39.3±2.7	29.2±1.0 <sup>a</sup>	1.8±0.1	72.0±1.2	37.3±2.7	30.9±3.9 <sup>a</sup>	1.9±0.1	70.7±5.4
25	33.3±2.4	32.2±2.7 <sup>a</sup>	2.1±0.2	69.3±6.6	39.3±2.4	32.2±1.0 <sup>a</sup>	2.1±0.2	82.0±4.6

\* Bütün değerler, üç ölçümün ortalaması ± SE olarak verilmiştir.  
<sup>a</sup> Kontrolde önemli derecede farklı p < 0.01.  
 Fag: fagositoz oranı, HÖ: hücre içi öldürme oranı, Fİ: fagositik indeks, CHİA: *Candida*'ların hücre içine alınım oranı.

ile çalışılan grupta ortalama sitokin konsantrasyon değerini ifade ediyordu. Antifungal ilaçların klinikte güvenle ulaşılacak serum konsantrasyonları, flukonazol için 25 µg/ml, ve ketokonazol için 5 µg/ml'dir (4).

**PMN'lerin Önceden Sitokinle Muamelesi:** Sadece sitokin ile çalışılan grupta, 5 adet steril 12x75 mm kapaklı plastik tüp alındı. Daha önceden hazırlanan (5x10<sup>6</sup>/ml PMN) solüsyondan her birine 0.2 ml (1x10<sup>6</sup> PMN) mikropipet yardımıyla yavaşça aktarıldı. İlk tüp, kontrol tüpü kabul edildi ve 0.2 ml HBSS (tampon) kondu. İkinci tüpe 1 500 U/ml, 3. tüpe 3 000 U/ml, 4. tüpe 4 500 U/ml, 5. tüpe 6 000 U/ml sonuç konsantrasyon olacak şekilde sitokin içeren solüsyondan 0.2 ml mikropipet yardımıyla eklendi. Böylece PMN'lerin 4 ayrı konsantrasyondaki sitokinle muamele edilmesi sağlandı. Sitokinin antifungal ilaçlarla kombine edildiği çalışma gruplarında ise, PMN solüsyonu tüplere dağıtıldıktan sonra 1. tüp kontrol tüpü olarak kabul edilip 0.2 ml tampon, diğer 4 tüpe ise 3 000 U/ml sonuç konsantrasyon olacak şekilde sitokin içeren solüsyondan 0.2 ml eklendi. Böylece PMN'ler, fagositoz ve hücre içi öldürme işleminden önce kontrol grubu hariç 3 000 U/ml sitokinle muamele edildiler. Kapakları sıkıca kapatılan tüpler, 30 dakika süreyle 37°C'deki benmari içinde uçtan uca olacak şekilde ortalama 4 devir/dakika hızla elle çevrildiler. Bu işlem sonunda hücrelerde kümelenme görülmedi. Önceden PMN'lerin canlılığı, deney başlangıcına kadar her basamakta tripan mavisi ile test edildi. Hücreler % 95'ten fazla canlı idiler. Canlılığı % 95'ten az olan hücre solüsyonları çalışmaya alınmadı.

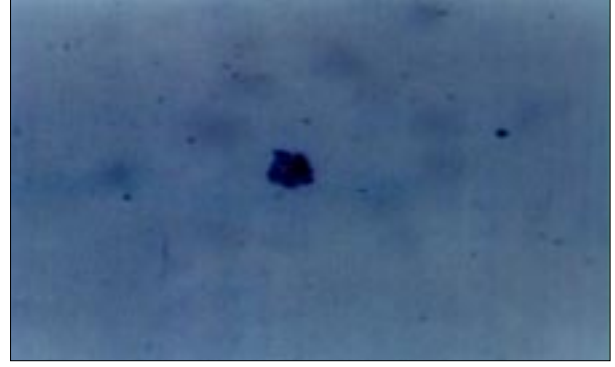
**Candida'ların Oponizasyonu:** PMN'lerin sitokin ile muamele edilmesiyle eşzamanlı olarak *Candida*'lar opsonize edildi. Daha önce hazırlanmış 1x10<sup>7</sup>/ml sayıda blastospor içeren solüsyondan steril bir tüpe 0.5 ml kondu. Üzerine % 40'lık AB serumdan 0.5 ml konup, toplam 1 ml % 20 AB serum ve 5x10<sup>6</sup>/ml blastospor içeren solüsyon elde edildi. *Candida*'lar, 30 dakika süreyle 37°C sıcaklıkta benmari içinde ortalama 4 devir/dakika hızla uçtan uca olacak şekilde elle çevrildiler. Bu işlem sırasında hücrelerde kümelenme ve psödohif oluşumu gözlenmedi. *Candida*'ların canlılığı tripan mavisi ile test edildi ve deney başlangıcına kadar hücreler % 98'den fazla canlı idiler. Canlılığı % 95'ten az olan hücre solüsyonları çalışmaya alınmadı.

**Fagositoz ve Hücre İçi Öldürülmenin Ölçülmesi:** G-CSF ve tampon ile önceden muamele edilen ve 1x10<sup>6</sup> PMN ile opsonize edilmiş 1x10<sup>6</sup> blastospor, steril 12x75 mm boyutlarındaki kapaklı 5 adet plastik tüp içine mikropipet yardımıyla yavaşça boşaltıldı. Sadece sitokin ile çalışılan grupta antifungal ilaç yerine eşdeğer hacimde tampon, sadece antifungal ilaçlarla çalışılan gruplarda ise sitokin yerine eşdeğer hacimde tampon kullanılıp ilaçların değişik konsantrasyonları tüpe eklendiler. Sitokin ve ilaçların kombine edildiği grupta önceden 3 000 U/ml sitokinle muamele edilen PMN'ler, ilaçların değişik konsantrasyonlarıyla ve eşdeğer sayıda (1x10<sup>6</sup>) blastosporla birlikte steril tüp içine eklendiler. Her çalışma grubunda deney, tüpler içinde 1 ml olan sonuç hacimde yapıldı. Tüpler, 37°C'deki benmari içinde 15 dakika süreyle 4 devir/dakika hızla uçtan uca elle çevrildiler. Bu sürenin sonunda her tüpten ayrı ayrı 0.2 ml alınarak steril, kapaklı 5 adet (12x75 mm) plastik tüp içine yavaşça boşaltıldı. Tüplere, önceden alındığı tüp ile aynı numarada olacak şekilde 1-5 arasında numaralar verildi. Yeni tüpler, 40x devirde 10 dakika süreyle santrifüje edildiler. Süpernatant kısım atılarak altta kalan PMN ve *Candida* karışımından temiz lam üzerinde yayma hazırlandı. Lamalara alındığı tüpe uygun şekilde 1-5 arasında numaralar verildi ve oda ısısında kurutulduktan sonra 15 dakika metil alkol ile tespit edildikten sonra Giemsa yöntemi ile boyandılar. Hücre içi öldürme, Schmid ve Brune metoduyla ölçüldü (22). Benmari içindeki tüpler, hücre içi öldürmenin ölçülmesi için 45 dakika daha inkübe edildikten sonra alınıp, üzerine tripan mavisinden eklendi. Oda ısısında 3 dakika bekletildikten sonra Neubauer lamı üstüne bir damla alınarak yaş preparat hazırlandı ve toplam 100 PMN tarandı. Hücreler içinde canlı (boya almamış) ve ölü (boya almış) blastosporlar ayrı ayrı her tüp için sayıldı ve kaydedildi (Resim 1). Sayım işlemi yapan araştırmacı, preparatın hangi tüpten hazırlandığını bilmiyordu. Fagositoz oranı, Giemsa ile boyanan preparatlarda her preparat için *Candida* fagosite etmiş ve etmemiş olan toplam 100 hücre sayılarak hesaplandı (Resim 2). PMN fonksiyonlarının ölçülmesinde kullanılan formüller aşağıda gösterilmiştir.

**Hücre içi öldürme oranı (%):** [(100 PMN içindeki ölü *Candida* ÷ 100 PMN içindeki canlı ve ölü toplam *Candida*) x 100]



**Resim 1.** PMN içinde ölü ve canlı blastosporlar (yaş preparat). Tripan mavisi (x400).



**Resim 2.** *Candida* blastosporlarının PMN tarafından fagosite edilmesi. Giemsa boyası (x 1000).

**Fagositoz oranı (%):** [(Fagositoz yapmış PMN ÷ sayılan PMN) x 100]

***Candida*'ların hücre içine alınım oranı (%):** [(100 PMN içindeki *Candida* ÷ 100 PMN için eklenen *Candida*) x 100]

**Fagositik indeks:** (100 PMN içindeki *Candida* ÷ fagositoz yapmış PMN).

**İstatistiksel Yöntem:** İstatistiksel değerlendirmelerde, tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ve Tukey testi kullanıldı. Değerler, ortalama ± standard hata şeklinde belirtildi. Gruplar arasındaki fark, donör sayısının azlığı nedeniyle değerlendirilemedi.

### Sonuçlar

Tek başına rhG-CSF uygulanan grupta fagositoz aktivitesi doza bağımlı olarak arttı. Aynı şekilde artan konsantrasyonlarda *Candida*'ların hücre içine alınımı artıp, fagositik indeks azaldı. Hücre içi öldürme oranında da artan konsantrasyonlarda artma gözlemlendi. Sitokin ile elde edilen bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 1).

Flukonazolün, önceden tampon ile muamele edilen PMN ve *Candida*'larla birlikte inkübe edildiği grupta ilaç, kontrol grubuna göre PMN fonksiyonları üzerinde istatistiksel anlamda önemli bir etki göstermedi ( $p>0.05$ ). Sadece fagositoz ve *Candida*'ların hücre içine alınma oranı artan konsantrasyonlarda hafif derecede azaldı. Fakat bu etkiler istatistiksel olarak önemli değildi (Tablo 2).

Flukonazolün rhG-CSF ile kombine edildiği grupta fagositoz oranı, ilacın artan konsantrasyonlarında yalnız flukonazolün kullanıldığı gruptaki gibi azalma gösterdi. Bu azalma, istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). Aynı şekilde artan konsantrasyonlarda fagositik indeks ve *Candida*'ların hücre içine alınma oranında da istatistiksel anlamda önemli bir değişiklik gözlemlenmedi ( $p>0.05$ ). İlaç, 5, 10 ve 25 mg/ml konsantrasyonlarda hücre içi öldürme oranını istatistiksel olarak önemli derecede arttırdı ( $p<0.01$ ) (Tablo 3).

Ketokonazolün, önceden tampon ile muamele edilen PMN ve *Candida*'larla birlikte inkübe edildiği grupta ilaç, PMN fonksiyonları üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkide bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 2).

Ketokonazolün rhG-CSF ile kombine edildiği grupta, fagositoz oranı, fagositik indeks ve *Candida*'ların hücre içine

alınma oranında kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ). Hücre içi öldürme oranında 10 ve 25 mg/ml konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gözlemlendi ( $p<0.01$ ) (Tablo 3).

### İrdeleme

Çalışmamızda yalnız rhG-CSF'ün kullanıldığı grupta PMN fonksiyonlarında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 1). Bulgularımız, Vechiarelli ve arkadaşları (23) ile Roilides ve arkadaşları (17)'nin bulgularıyla uyumludur. Bu araştırmacılar da bizim çalışmamızdaki gibi sağlıklı gönüllülerden elde ettikleri PMN'leri önceden G-CSF ile muamele ettikten sonra *Candida* blastosporları ile birlikte inkübe etmişler, fagositoz oranında ve hücre içi öldürme oranında istatistiksel olarak artma ya da azalma gözlememişlerdir. Yamamoto ve arkadaşları (19), PMN'leri G-CSF ve *Candida*'lar ile birlikte kültür ortamında 15 saat süreyle inkübe etmişler, bu sürenin sonunda kandidaların hücre içi öldürülmesinin arttığını bildirmişlerdir. Bober ve arkadaşları (24), PMN'leri 18 saat süreyle önceden G-CSF ile muamele ettikten sonra *Candida*'ların fagositozunun arttığını, ancak hücre içi öldürülmesinin artmadığını bildirmişlerdir. Bu bulgular bizim ve önceki araştırmacıların bulgularıyla uyumsuzdur. Bu uyumsuzluğun, PMN'lerin G-CSF ile muamele sürelerindeki farklılıktan ve kullanılan hedef hücrelerin suşlarının farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Nitekim granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ile PMN'lerin artan sürelerle muamele edilmesi, biyolojik fonksiyonlarında artış sağlamış, PMN'lerin oksidatif metabolizmasının artırılması için GM-CSF ile 2 saat süreyle muamele edilmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir (25).

Flukonazolün tek başına uygulandığı grupta elde ettiğimiz bulgular, Roilides ve arkadaşları (4)'nin PMN'lerin önceden ilaçla muamele edildiğinde elde ettiği bulguları, Senior ve Shaw (9)'un, önceden PMN'leri 75 dakika süreyle flukonazol ile muamele ettikten sonra *C. albicans*'ların hücre içi öldürülmesini artırmadığına dair bulgularını desteklemektedir. Akkoç ve arkadaşları (10)'na göre ise flukonazol, PMN'lerin 30. ve 90. dakikalarda hücre içi öldürme yeteneklerini artırmaktadır. Flukonazol, 0.5-10 mg/ml konsantrasyonlarda PMN'ler içine ekstraselüler konsantrasyonundan 2.2 kat kadar daha fazla oranda, hızlı bir şekilde geç-

mekte, ancak amfoterisin B'ye göre daha az hücre içi aktivite göstermektedir (26). PMN'lerin kemilüminesans (CL) cevabı, metabolik kapasitesiyle birlikte fagositoz kapasitesini de gösterir. Abruzzo ve arkadaşları (27), flukonazolün oral yolla verilmesiyle plazmada elde edilen 1.4 µg/ml pik konsantrasyonun 20 katı kadar yüksek bir konsantrasyonda bile fare dalak hücrelerinin in vitro şartlarda luminol ile CL cevabını artırmadığını göstermiştir. Buradan flukonazolün ne hücre içi öldürme, ne de fagositoz oranına önemli bir etkide bulunmadığı sonucu çıkarılabilir ki bizim bulgularımızı desteklemektedir.

PMN yerine monositlerin kullanıldığı bir çalışmada flukonazol ile monositler, birlikte 24 saat süreyle inkübe edildiğinde monositlerin hem flukonazole duyarlı, hem de dirençli *Candida* suşlarının öldürülmesini artırdığı vurgulanarak monositlerle flukonazol arasında sinerji olduğuna işaretler ve bunun flukonazolün in vivo etkinliğini açıklayabileceği öne sürülmüştür (28). Flukonazolün monositlerle olan bu sinerjisinin mekanizması bilinmemekle birlikte in vivo etkisi, in vitro *Candida*'ların germ tüpü formasyonunu engellemesiyle bağlantılı gibi gözükmektedir (26). Hedef hücre *E. coli* olduğunda PMN'lerin önceden flukonazol ile 60 dakika süreyle muamele edilmesi granül içeriğinin boşalması ve önceden muamele sırasında vakuol içinde birikmiş olan flukonazolün serbestleşmesiyle *E. coli*'lerin hücre içi öldürülme oranının arttığı, ayrıca ortamda TNF-α, interleükin-1 ve interleükin-8 gibi sitokinlerin artmadığı daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (11,12). Nassar ve arkadaşları (29), makrofajları önceden makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ile muamele ettikten sonra flukonazol ve *Cryptococcus neoformans* hücreleriyle birlikte kültür ortamında inkübe ettikten sonra flukonazol ile makrofajlar arasında *C. neoformans*'ların hücre öldürülmesinin arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmaya göre flukonazol ile M-CSF ve makrofajlar arasında sinerji bulunmaktadır ve bizim gözlemlediğimiz; flukonazol ile rhG-CSF ve PMN'ler arasında *Candida* blastosporlarının hücre içi öldürülmesindeki sinerjiyi destekler niteliktedir. Flukonazolün, iyi derecede hücre içi penetrasyonu ve yetersiz anti-*Candida* aktivite gösterdiği (26) gözönüne alınırsa, bu sinerjinin sitokin ile PMN'lerin oksidatif metabolizmasının artırılması ve flukonazolün germ tüpü oluşumuna karşı olan aktivitesi ile oluştuğunu düşünmekteyiz. Böyle bir sinerjinin klinikte sistemik kandidiyaz tedavisinde önemli olabileceğini düşünüyoruz. Nitekim bu konudaki bir deneysel araştırmada nötrojenik farelerdeki *Candida* sepsisinde G-CSF ve flukonazol kombinasyonu hem farelerdeki yaşam süresini artırmış, hem de hedef organ olduğu kabul edilen böbrek homojenat kültürlerinde *Candida* koloni sayısını azaltmıştır (19). Aynı çalışmada sitokin ile amfoterisin B ve flusitozin kombinasyonu hayvanlardaki yaşam süresini kontrol grubuna göre artıramamıştır. Araştırmacılar, flukonazolün 0.1 mg/kg gibi düşük dozlarının bile G-CSF ile kombine edilmesiyle farelerin yaşam süresinde kayda değer artma gözlemişler, kombinasyonun etkinliğinin triazol sınıfı ilaç kullanıldığında iyi olduğunu bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar Polak (30) tarafından da gözlenmiştir. Nötrojenik farelerdeki sistemik *Candida* enfeksiyonunda itrakonazol ve flukonazolün G-CSF ile kombine edilmesi farelerde kontrol grubu, G-CSF grubu ve yalnız antifungal ilaç alan gruptaki farelere göre anlamlı derecede artmış yaşam süresi

göstermiştir. Bir imidazol türevi olan ketokonazolün G-CSF ile kombine edilmesi farelerde yaşam süresini uzatmış, ancak 20. gündeki yaşam süresi flukonazol ve itrakonazolün G-CSF ile kombine edildiği gruba göre daha düşük bulunmuştur.

Ketokonazolün PMN'lerin fagositoz yeteneği üzerine olan etkisiyle ilgili bulgularımız önceki çalışmalarla uyumludur (4,13,14). Abruzzo ve arkadaşları (31), ketokonazolün serumda terapötik olarak ulaşılabilen pik konsantrasyonlarında (3.5-16 µg/ml) fare dalak hücrelerinin CL cevabını azalttığını, dolayısıyla hücre fonksiyonlarına zararlı etkide bulunduğunu belirtmiştir. Senior ve Shaw (9) da 1-8 µg/ml konsantrasyonlarda fare dalak hücrelerinin proliferasyonunu ve 20 mg/ml konsantrasyonda da insan PMN'lerinin *Candida*'ların hücre içi öldürülmesini azalttığını bildirmiştir. Roilides ve arkadaşları (4), PMN'leri önceden ketokonazol ile 30 dakika süreyle muamele ettikten sonra *Candida*'ların hücre içi öldürülmesini artırdığını ve ketokonazolün terapötik konsantrasyonlarda PMN'lerin kemotaksi yeteneğini artırıp, süperoksid yapımını azalttığını göstermiştir. Bu araştırmacılar, *Candida*'ların hücre içi öldürülmesinin artırılmasını, germinasyonun engellenmesi ve takiben PMN'lerin *Candida*'ları öldürmesini kolaylaştırmasıyla açıklamışlardır. Cockayne ve Odds (32)'un ketokonazolün *Candida* hiflerinin uzamasını azalttığı, Johnson ve arkadaşları (13)'nin ketokonazole duyarlı *C. albicans* suşlarının germ tüpü oluşumunu engellediği yönündeki bulguları Roilides ve arkadaşları (4)'nin bulgularını destekler niteliktedir. Johnson ve arkadaşları (13)'na göre de ilacın bu etkisi, PMN'lerin *Candida*'ları öldürmesinde önemlidir. Rensburg ve arkadaşları (14), sağlıklı gönüllülere oral yolla tek doz 400 mg ketokonazol uygulamış, 2 saat sonra bu gönüllülerden elde ettiği PMN'lerin motilitesinin arttığını, bu etkinin siklik Guanozin monofosfat (cGMP) seviyesinin artması nedeniyle olabileceğini ve aynı etkinin ilacın in vitro uygulanmasıyla elde edilemediğini belirtmektedir. Aynı araştırmacılar, in vitro ortamda PMN'lerin post-fagositik hegzoz monofosfat şantı ve myeloperoksidaz aracılı iyodinasyonunun etkilenmediğini ve hastaların hücre ve humoral bağışıklık sistemlerinde baskılanma gözlenmediğini bildirip, ketokonazolün gerçek etkisinin PMN'lerin göç yeteneklerini düzeltmesi olduğuna inandıklarını da bildirmişlerdir.

PMN'lerin önceden 3000 U/ml rhG-CSF ile muamele edildikten sonra ketokonazolün artan konsantrasyonlarıyla inkübe edildiğinde 10 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarda *Candida* blastosporlarının hücre içi öldürülmesini artırmasının nedeni bilinmemektedir. Bunun nedeninin anlaşılabilmesi için ileri araştırmalar gerekmektedir.

Antifungal ilaçların ve sitokinlerin insan PMN'lerinin fagositik ve mikrobisid fonksiyonları üzerine olan etkilerinin araştırılmasıyla bulunan sonuçlar, birbirleriyle çelişkiler göstermekte, kullanılan yöntem, uygulanan ilaçların konsantrasyonlarına ve hedef hücrelerin türüne göre değişmektedir. Araştırmalar sonucu elde edilen sonuçların birbirine karşılaştırması, aynı testler ve yöntemler, aynı hedef hücrelerin kullanılması halinde bile suşların farklılığı nedeniyle zordur (3). Bulunan sonuçların bu çerçevede değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Bulgularımız, nötrojenik ve nötrofil fonksiyonları bozuk olan hastalarda gelişen sistemik mantar enfeksiyonları-

nın tedavisinde özellikle flukonazol ile olmak üzere azol yapılı antifungal ilaçlarla birlikte rhG-CSF'ün birlikte kullanılmasının PMN fonksiyonları üzerinde yararlı olabileceğini göstermektedir. Daha önce G-CSF ile flukonazolün nötrope-nik farelerdeki sistemik *Candida* infeksiyonlarında kombine edilmesiyle gözlenen yararlı etkisi bize göre bu iki ilacın *Candida*'ların hücre içi öldürülmesinin artırılmasındaki sinerjiyle kısmen açıklanabilir. Benzer sinerjiyi rhG-CSF ile ketokonazol arasında da gözlemledik. Ama bu sinerji ketokonazolün 10 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarında oluştu. Bu konsantrasyonların ketokonazol için yüksek serum değerlerini ifade etmesinin bilinmesi, in vitro koşullarda elde ettiğimiz rhG-CSF ile ketokonazol arasındaki böyle bir sinerjinin bize göre klinikte önemli olmayabileceği sonucunu doğurabilir.

#### Kaynaklar

- Hawkins C, Armstrong D. Fungal infections in the immunocompromised host. *Clin Haematol* 1984; 13: 599-630
- Wright WL, Wenzel RP. Nosocomial candida, epidemiology, transmission, and prevention. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 411-25
- Pallister CJ, Johnson EM, Warnock DW, Elliot PJ, Reeves DF. In-vitro effects of liposome-encapsulated amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B-deoxycholate (Fungizone) on the phagocytic and Candidacidal function of human polymorphonuclear leucocytes. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 313-20
- Roilides E, Walsh TJ, Rubin M, Venzon D, Pizzo PA. Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 196-201
- Richardson MD. Systemic fungal infections. *Care Crit Ill* 1994; 10: 258-61
- Bodey GP, Bowden RA, Büschner T, et al. International Conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 43-59
- Hay RJ. Overview of the treatment of disseminated fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28 (Suppl B): 17-25
- Walsh TJ, Pizzo A. Treatment of systemic fungal infections: Recent progress and current problems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 460-75
- Senior DS, Shaw JTB. In vitro effects of fluconazole (UK-49,858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on *Candida* blastospore destruction by human polymorphonuclear leucocytes. *Int J Immunopharmacol* 1988; 10: 169-73
- Akkoç T, Soyoğul Ü, Çevikbaş A, Johansson C. Flukonazol, amfoterisin B ve interferon α-2a kombinasyonlarının insan polimorf nüveli lökositlerinin kemotaksisi ve *Candida albicans*'a karşı hücre içi ölüm aktivitesinin in vitro araştırılması [Özet]. In: Ağaçfidan A, Badur S, Külekçi G, eds. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (7-10 Mayıs 1996, Antalya) Program ve Özet Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti & Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 1996: 189
- Zervos EE, Bass SS, Robson MC, Rosemurgy AS. Fluconazole increases bactericidal activity of neutrophils. *J Traum* 1996; 41: 10-4
- Zervos EE, Fink GW, Norman JG, Robson MC, Rosemurgy AS. Fluconazole increases bactericidal activity of neutrophils through non-cytokine-mediated pathway. *J Traum* 1996; 41: 465-70
- Johnson EM, Warnock DW, Richardson MD, Douglas CJ. In vitro effect of itraconazole, ketoconazole and amphotericin B on the phagocytic and Candidacidal function of human neutrophils. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18: 83-91
- Van Rensburg CEJ, Anderson R, Joone G, van der Merwe MF, Eftychis HA. The effects of ketoconazole on cellular and humoral immune functions. *J Antimicrob Chemother* 1983; 11: 49-55
- Wang JM, Chen GC, Colella S, et al. Chemotactic activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1988; 72: 1456-60
- Lindemann A, Hermann F, Oster W, et al. Hematologic effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignancy. *Blood* 1989; 74: 2644-51
- Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis* 1991; 163: 579-83
- Uchida K, Yamamoto Y, Klein TW, Freidman H, Yamaguchi H. Granulocyte colony-stimulating factor facilitates the restoration of resistance to opportunistic fungi in leukopenic mice. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 293-300
- Yamamoto Y, Uchida K, Klein TW, Friedman H, Yamaguchi H. Immunomodulators and fungal infections: use of antifungal drugs in combination with G-CSF. In: Friedman H, et al. eds. *Microbial Infections*. New York: Plenum Press, 1992: 231-41
- Verbrugh HA, Peters R, Peterson KK. Phagocytosis and killing of staphylococci by human polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. *J Clin Pathol* 1978; 31: 539-45
- Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis* 1991; 163: 579-83
- Lehrer RI, Stiehm RS, Fischer TJ, Lowell SY. Severe Candidal Infections, clinical perspectives, immune defence mechanism, and current concepts of therapy. *Ann Intern Med* 1978; 89: 91-106
- Vecchiarelli A, Monari C, Baldelli F, et al. Beneficial effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on fungicidal activity of polymorphonuclear leukocytes from patients with AIDS. *J Infect Dis* 1995; 171: 1448-54
- Bober LA, Grace MJ, Catherine Pugliese-Sivo, et al. The effect of GM-CSF and G-CSF on human neutrophil function. *Immunopharmacology* 1995; 29: 111-19
- Gasson JC, Golde DW, Weisbart RH. Colony-stimulating factors and host defence. *Ann Intern Med* 1989; 110: 297-303
- Pascual A, Garcia I, Conejo C, Perea EJ. Uptake and intracellular activity of fluconazole in human polymorphonuclear leucocytes. *Antimicrob Agent Chemother* 1993; 37: 187-90
- Abruzzo GK, Fromtling RA, Turnbull TA, Giltinan DM. Effects of bifonazole, fluconazole, itraconazole, and terbinafine on the chemiluminescence response of immune cells. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 61-8
- Garcha UK, Brummer E, Stevens DA. Synergy of fluconazole with human monocytes or monocyte-derived macrophages for killing of *Candida* species. *J Infect Dis* 1995; 172: 1620-23
- Nassar F, Brummer E, Stevens DA. Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) induction of enhanced anticryptococcal activity in human monocyte-derived macrophages: Synergy with fluconazole for killing. *Cell Immunol* 1995; 164: 113-8.
- Polak A. Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) on candida infections in normal and immunosuppressed mice. *Mycoses* 1991; 34: 109-18
- Abruzzo GK, Giltinan DM, Capizzi TP, Fromtling RA. Influence of six antifungal agents on the chemiluminescence response of mouse spleen cells. *Antimicrob Agent Chemother* 1986; 29: 602-7
- Cockayne A, Odds FC. Interactions of *Candida albicans* yeast cells, germ tubes and hyphae with human polymorphonuclear leucocytes in vitro. *J Gen Microbiol* 1984; 130: 465-71