

In Vitro Koşullarda Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktörün Amfoterisin B ve Lipozomal Amfoterisin B ile Kombinasyonunun İnsan Nötrofil Fonksiyonları Üzerine Etkisi

Nazif Elaldı¹, İlyas Dökmetaş¹, Sevtap Bakır², Mehmet Bakır¹, Mehmet Şencan³, M.Zahir Bakıcı⁴, Hüseyin Aydın², E. Gül Delibaş⁴

Özet: Sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan amfoterisin B (amB) ve lipozomal amfoterisin B (lip amB)'nin rekombinan insan granülosit-koloni stimüle edici faktörü (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'ün artan konsantrasyonları ile muamele edildikten sonra *Candida albicans* CBS 2730 suşu blastosporlarını fagosite etmesi ve hücre içi öldürmesi gibi fonksiyonları gözlemlendi. İkinci aşamada aynı donörlerden elde edilen PMN'ler antifungal ilaçların artan konsantrasyonları ve *C. albicans* blastosporlarıyla birlikte inkübe edildi ve PMN fonksiyonları gözlemlendi. Üçüncü aşamada ise aynı donörlerden elde edilen PMN'ler, önceden rhG-CSF'nin 3000 U/ml konsantrasyonuyla muamele edildikten sonra antifungal ilaçların artan konsantrasyonları ve *C. albicans* blastosporları ile birlikte inkübe edildi ve PMN fonksiyonları gözlemlendi. Bulgularımız, rhG-CSF'nin sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde antifungal ilaçlarla birlikte, özellikle nötroopenik hastalarda kullanıldığında yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: G-CSF, amfoterisin B, lipozomal amfoterisin B, nötroopeni.

Summary: *In vitro* effects of granulocyte-colony stimulating factor in combination with amphotericin B and liposomal amphotericin B on human neutrophil functions. In this study combination of amphotericin B and liposomal amphotericin B, which were used in the treatment of systemic fungal infections with rhG-CSF were tested on human polymorphonuclear leukocyte (PMN) functions. In the first step, PMNs which were taken from three healthy volunteers were treated with rhG-CSF in-vitro conditions, and then PMNs were tested with phagocytosing and intracellular killing capacity of *C. albicans* CBS 2730 blastospores. In the second step, PMNs which were taken from the same donors were incubated with antifungal drugs and blastospores, and PMN functions tested. In the third step, PMNs which were taken from same donors were treated with rhG-CSF and then incubated with antifungal drugs and blastospores, and PMN functions tested. As a result we concluded that rhG-CSF could be helpful in the systemic fungal infections when used with antifungal agents, especially in neutropenic patients.

Key Words: G-CSF, amphotericin B, liposomal amphotericin B, neutropenia.

Giriş

Kortikosteroidler, sitotoksik ilaçlar, radyasyon, geniş spektrumlu antibiyotikler, organ transplantasyonu, diğer cerrahi işlemler ve immünolojik hastalıklar fırsatçı infeksiyonlara yatkınlık yaratırlar. Lösemi, HIV infeksiyonu, nötroopeni ve diğer hemotalojik hastalıkları olanlar, diyabetikler, fırsatçı mantar infeksiyonlarına özellikle duyarlıdırlar (1). *Candida* türleri, fırsatçı sistemik mantar infeksiyonlarının en sık etkenidir (2). Son 10-15 yıl içinde *Candida*'ların oluşturduğu infeksiyonların sıklığı artmıştır (3). Polimorfonükleer lökosit (PMN)'ler, sistemik mantar infeksiyonlarına karşı en önemli nonspesifik konak savunma elemanlarıdır. Herhangi

bir nedenle PMN sayısının azalması, fonksiyonlarındaki baskılanma, infeksiyonların ilerlemesine ve kontrol edilememesine neden olur (4). Nitekim lösemik hastalardaki sistemik mantar infeksiyonlarının %90'ı nötroopenik hastalarda gelişir (5).

Daha önce sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal ilaçların PMN fonksiyonları üzerine olan etkileri araştırılmış ve değişik sonuçlar elde edilmiştir. Bu araştırmalarda amfoterisin (amB)'nin PMN'lerin fagositoz yeteneği üzerinde olumsuz (4,6,7); hücre içi öldürme yeteneği üzerine ise olumlu (8,9) etkisi olduğu bildirilmiştir. Lipozomal amB (lip amB)'nin ise PMN fagositozuna olumlu ya da olumsuz etkisi olmadığı, yüksek konsantrasyonlarda hücre içi öldürme oranını artırdığı gösterilmiştir (8).

Özellikle nötroopenik hastalar olmak üzere, immüdüştün (immunocompromised) hastalardaki sistemik mantar infeksiyonlarında antifungal tedavinin etkili olduğunun kanıtlanmadığı bildirilmiştir (10). Antifungal tedaviye ek olarak konak savunmasının interferonlar, interlökinler ve koloni stimüle edici faktörler (CSF) ile

- (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)	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

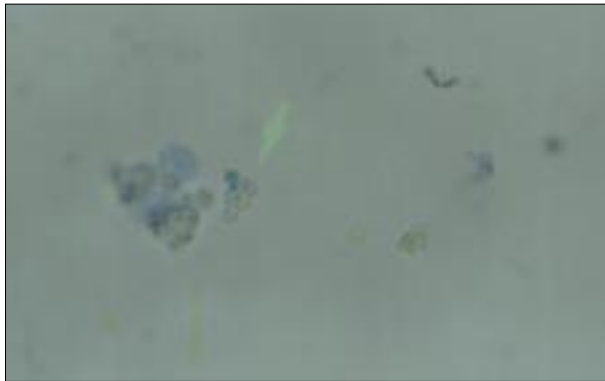
güçlendirilmesi önemli bir tedavi yaklaşımıdır. İmmüdüskün hastalara CSF'lerin uygulanması, bu hastaları, yaşamı tehdit eden mantar infeksiyonlarından korur (11).

Antifungal ilaçların PMN fonksiyonları üzerine olumlu ve olumsuz etkileri (9); rhG-CSF'nin ise onların fonksiyonlarını düzelttiği (12-14) ve sayısını artırdığı (15) bilinmektedir. Biz bu çalışmada konak savunmasının güçlendirilmesi amacıyla antifungal tedaviye eklenmesi önerilen rhG-CSF'yi in vitro koşullarda amB ve lip amB ile kombine ederek, bu kombinasyonun PMN fonksiyonları üzerine olan etkisini inceledik.

Yöntemler

PMN'lerin Elde Edilmesi: PMN'ler, daha önce *Candida* infeksiyonu anamnezi olmayan 3 sağlıklı gönüllü donörden (yaş ortalaması 28 yıl) alınan kandan Verbrugh ve arakadaşları (16)'nın tanımladığı modifiye Böyum tekniğiyle elde edildi. Özetle, PMN'ler, 5-10 U/ml benzil alkol içermeyen heparin (Nevparin[®], Bilim İlaç) ile sıvanmış injektörlere alınan kanın, dekstran (Macrodex[®], Baxter) ile 45 dakika çökmeye bırakılması ve fikal (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 %0.5 oranında sığır serum albümini (Sigma, katalog no. B 4287) içeren HBSS içinde Neubauer lamı ve lökosit pipeti yardımıyla 5x10⁶/ml'ye ayarlandı.

***Candida albicans*:** Araştırma boyunca Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden sağlanan *C. albicans* CBS 2730 suşu kullanıldı. *Candida*'lar araştırmadan 24 saat önce saklama besiyerinden



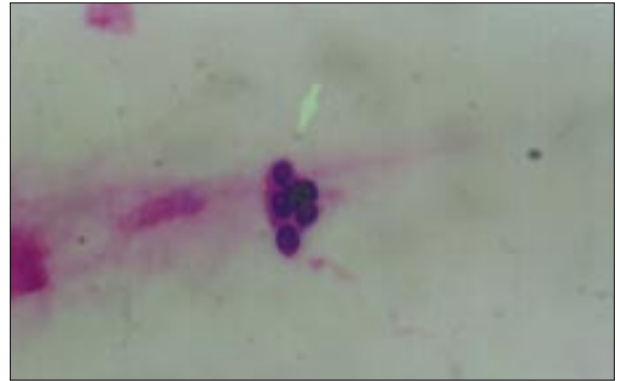
Resim 1. PMN içinde ölü ve canlı blastosporlar (yaş preparat). Tripan mavisi (x400).

Sabouraud dekstroz agara ekilip 24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. *Candida*'lar bu şartlarda psödohif veya germ tübü oluşturmada sadece blastospor fazında üredi. Blastosporlar, HBSS içinde 1x10⁷/ml'ye ayarlandı.

AB Serum: 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 çözünmesi sağlandı. *Candida*'ların opsonizasyonu için hacimce %20'lik konsantrasyonları kullanıldı.

İlaçlar: AmB dezoksikolat (Fungizone[®], E.R. Squibb & Sons) piyasadan sağlandı. Bir flakonda 50 mg amB desoksikolat içermekteydi. Damıtık su içinde çözüldürülerek 5 mg/ml'ye, takiben %5 glikoz solüsyonuyla 1 mg/ml'ye ayarlandı. İlaç, 0.1-10 µg/ml arasındaki sonuç sulandırımına HBSS içinde getirildi. Lip amB (AmBisome[®], Nextar) piyasadan sağlandı. Önce damıtık su içinde 4 mg/ml içeren stok solüsyonu takiben %5 glikoz çözeltisiyle 200 µg/ml'ye ayarlanan çözelti, membran filtre ile HBSS içine aktarıldı. Sonuç sulandırım (0.1-10 µg/ml) HBSS yardımıyla hazırlandı. Sitokin olarak ml'sinde 30 milyon U (300 µg) filgrastim içeren ve *Escherichia coli*'den elde edilmiş olan rhG-CSF (Neupogen[®], Roche) piyasadan sağlandı. Sadece sitokin ile çalışılan grupta, ilacın hastalara parenteral 1.5-3 µg/kg G-CSF verilmesinden sonra ulaşılabilen serum sitokin konsantrasyonları olan 1 500-6 000 U/ml konsantrasyonları kullanıldı (12,13). G-CSF'nin antifungal ilaçlarla kombine edildiği gruplarda ise PMN'ler önceden - hem hastalarda serumda ulaşılabilen konsantrasyonu, hem de sadece sitokin ile çalışılan grupta ortalama sitokin konsantrasyon değerini temsil eden- 3000 U/ml sitokin ile muamele edildi. AmB'nin klinikte güvenle ulaşılabilecek serum konsantrasyonu 4 µg/ml'dir (4). Lip amB, kemelere ve farelere 5 mg/kg uygulandığında dahi hayvanlarda toksisite gözlenmemiş, amB'ye göre daha güvenli ve yüksek plazma konsantrasyonları elde edilmiştir (17). Çalışmamızda amB ve lip amB'nin terapötik konsantrasyonlarıyla bu konsantrasyonların alt ve üst değerleri kullanılarak PMN fonksiyonları üzerine olan etkisi araştırıldı.

PMN'lerin Önceden Sitokinle Muamelesi: Sadece sitokin ile çalışılan grupta, 5 adet steril 12x75 mm kapaklı plastik tüp alındı. Daha önceden hazırlanan (5x10⁶/ml PMN) solüsyondan her bir tüpe 0.2 ml (1x10⁶ PMN) mikropipet yardımıyla yavaşça aktarıldı. İlk tüp, kontrol tüpü kabul edildi ve 0.2 ml HBSS (tampon) kondu. İkinci tüpte 1 500 U/ml, 3. tüpte 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



Resim 2. *Candida* blastosporlarının PMN tarafından fagosite edilmesi. Giemsa boyası (x1000).

Tablo 2. Amfoterisin B ve Lipozomal Amfoterisin B ile Gözlenen PMN Fonksiyonları*

İlaç Konsan-trasyonu (µg/ml)	Amfoterisin B				Lipozomal Amfoterisin B			
	Fag (%)	HÖ (%)	Fİ	CHİA (%)	Fag (%)	HÖ (%)	Fİ	CHİA (%)
0	46.0±1.2	21.2±1.7	1.9±0.1	86.7±1.8	44.6±1.3	18.6±0.6	1.9±0.1	84.0±2.3
0.1	39.3±3.3	22.2±0.4	2.1±0.2	82.0±5.0	37.3±4.6	23.9±2.3	1.9±0.1	70.0±8.7
1	32.7±1.8 ^a	30.9±2.5 ^a	2.1±0.1	69.3±5.7	36.0±3.0	26.5±0.4	2.1±0.1	74.0±5.2
5	32.0±1.2 ^a	23.9±1.9	1.9±0.2	62.0±7.2 ^b	33.3±0.6	24.9±4.3	1.8±0.1	59.3±1.3 ^b
10	3.27±0.7 ^a	30.5±0.9 ^a	1.9±0.2	61.3±6.3 ^b	32.0±1.2 ^b	18.6±1.0	1.6±0.1 ^a	50.0±2.0 ^b

* Bütün değerler, üç ölçümün ortalaması ± SE olarak verilmiştir.
^aKontrolde önemli derecede farklı p<0.01.
^bKontrolde önemli derecede farklı p<0.05.
Fag: fagositoz oranı, HÖ: hücre içi öldürme oranı, Fİ: fagositik indeks, CHİA: *Candida*'ların hücre içine alınım oranı

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 1x10⁷/ml sayıda blastospor içeren solüsyondan temiz ve steril bir tüpe 0.5 ml kondu. Üzerine %40'luk AB serumundan 0.5 ml konup, toplam 1 ml %20 AB serum ve 5x10⁶/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: rhG-CSF ve tampon ile önceden muamele edilen ve 1x10⁶ PMN ile opsonize edilmiş 1x10⁶blastospor, 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 kullanıldı. Sadece antifungal ilaçlarla çalışılan gruplarda ise sitokin yerine eşdeğer hacimde tampon kullanılıp, ilaçların değişik konsantrasyonları tüpe

eklendiler. rhG-CSF ve ilaçların kombine edildiği grupta önceden 3 000 U/ml sitokinle muamele edilen PMN'ler, ilaçların değişik konsantrasyonlarıyla ve eşdeğer sayıda (1x10⁶) 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 40 xg devirde 10 dakika süreyle santrifüje edildiler. Süpernatant kısım atılarak altta kalan PMN ve *Candida* karışımından temiz lam üzerinde yayma hazırlandı. Lamalara ayrı ayrı 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 boyandı. Hücre içi öldürme, Schmid ve Brune metoduyla ölçüldü (18). 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 yöntemi ile boyanan preparatlarda her preparat için *Candida*'ları 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]

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]

Tablo 3. PMN'lerin Önceden G-CSF ile Muamelesinden Sonra Amfoterisin B ve Lipozomal Amfoterisin B ile İnkübe Edilmesiyle Gözlenen PMN Fonksiyonları*

İlaç Konsan-trasyonu (µg/ml)	Amfoterisin B				Lipozomal Amfoterisin B			
	Fag (%)	HÖ (%)	Fİ	CHİA (%)	Fag (%)	HÖ (%)	Fİ	CHİA (%)
0	45.3±1.3	20.5±3.4	1.8±0.1	84.7±2.4	43.3±1.8	19.2±1.4	2.0±0.1	89.3±3.7
0.1	43.3±4.0	22.4±2.6	1.8±0.1	76.7±5.3	36.6±3.5	26.4±1.9	2.1±0.3	76.0±3.0
1	36.0±1.2	22.9±1.4	1.7±0.1	62.0±2.0 ^b	36.0±1.2	26.7±1.5	1.9±0.2	68.0±9.0
5	36.7±2.4	27.6±0.7	1.9±0.1	71.3±6.6	39.3±1.3	35.0±4.9 ^b	1.6±0.2 ^b	60.6±5.4 ^a
10	39.3±4.4	33.0±1.0 ^a	1.6±0.1	63.3±4.4 ^b	35.3±1.3	30.7±0.9	1.8±0.1	62.0±3.0 ^a

* Bütün değerler, üç ölçümün ortalaması ± SE olarak verilmiştir.
^aKontrolde önemli derecede farklı p<0.01.
^bKontrolde önemli derecede farklı p<0.05.
Fag: fagositoz oranı, HÖ: hücre içi öldürme oranı, Fİ: fagositik indeks, CHİA: *Candida*'ların hücre içine alınım oranı.

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).

AmB'nin önceden tampon ile muamele edilen PMN ve *Candida*'lar ile birlikte inkübe edildiği grupta ilaç, 1.5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda fagositoz oranını önemli oranda azalttı ($p<0.01$). Ayrıca yine *Candida*'ların hücre içine alınım oranını 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda önemli oranda azalttı ($p<0.05$). İlaç, artan konsantrasyonlarda fagositik indeks üzerinde etkide bulunmadı ($p>0.05$). Hücre içi öldürme oranında 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda istatistiksel olarak artma gözlemlendi ($p<0.01$) (Tablo 2).

PMN'lerin önceden sitokinle muamele edildikten sonra amB ve *Candida*'larla birlikte inkübe edildiği grupta PMN'lerin fagositoz yeteneği kontrol grubuna göre azalma gösterdi. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.01$). *Candida*'ların hücre içine alınım oranı 1 ve 10 µg/ml'de azalma gösterdi ($p<0.01$) Fagositik indekste istatistiksel olarak önemli bir değişim elde edilmedi. Hücre içi öldürme oranında gözlenen artma sadece 10 µg/ml'de istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$) (Tablo 3).

Lip amB'nin önceden tampon ile muamele edilen PMN ve *Candida*'larla birlikte inkübe edildiği grupta fagositoz oranı doza bağımlı olarak azaldı. Bu azalma sadece 10 µg/ml konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). İlaç, ölçülen bütün konsantrasyonlarda *Candida*'ların hücre içine alınımını azaltmasına rağmen sadece 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlardaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). Fagositik indeks, 10 µg/ml konsantrasyonlardaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). Fagositik indeks, 10 µg/ml konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p<0.05$). Hücre içi öldürme oranında gözlenen sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Tablo 2).

PMN'lerin önceden sitokin ile muamele edildikten sonra lip amB ve *Candida*'larla birlikte inkübe edildiği grupta fagositoz oranında artan konsantrasyonlarda gözlenen azalma, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). *Candida*'ların hücre içine alınma oranındaki azalmalar, 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). Aynı şekilde fagositik indeks, 5 µg/ml konsantrasyonda önemli derecede azalma gösterdi ($p<0.05$). Hücre içi öldürme oranında artan konsantrasyonlarda artma gözlemlendi. Sadece 5 µg/ml konsantrasyonda aradaki fark istatistiksel olarak önemliydi ($p<0.05$) (Tablo 3).

İrdeleme

rhG-CSF'nin artan konsantrasyonlarının PMN fonksiyonları üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkide bulunmaması, Vecchiarelli ve arkadaşları (14) ile Roilidies ve arkadaşları (12)'nin bulgularıyla uyumludur. Bu araştırmacılar da bizim çalışmamızdaki gibi sağlıklı gönüllülerden elde ettikleri PMN'leri önceden G-CSF ile muamele ettikten sonra *Candida* blastosporlarıyla birlikte inkübe

etmişler; gerek fagositoz oranında, gerekse hücre içi öldürme oranında istatistiksel olarak artma ya da azalma gözlememişlerdir. Yamamoto ve arkadaşları (19) ise, PMN'leri G-CSF ve *Candida*'larla birlikte kültür ortamında 15 saat süreyle inkübe etmişler; bu sürenin sonunda *Candida*'ların hücre içi öldürülmesinin arttığı bildirilmişlerdir. Bu bulgular bizim ve önceki araştırmacıların bulgularıyla uyumsuzdur. Bu uyumsuzluğun, PMN'lerin G-CSF ile muamele sürelerindeki farklılıktan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Nitekim GM-CSF ile PMN'lerin artan sürelerle muamele edilmesi, biyolojik fonksiyonlarında artış sağlamıştır (20). Roilidies ve arkadaşları (12)'na göre ise PMN'lerin G-CSF ile 10 dakika süreyle muamele edilmesi oksidatif metabolizmanın optimal artırılması için yeterlidir. PMN'lerin majör fungusid aktivitesini myeloperoksidaz enzimi ve onun oksidan substratı olan hidrojen peroksidin oluşturduğu bilinmektedir (21). G-CSF, PMN'lerin süperoksid üreten bu enzim komplekslerinin komponentlerinde artış sağlayarak PMN'ler içinde serbest oksijen üretimini indüklemektedir (15).

Daha önceki çalışmalar, genelde amB'nin PMN'lerin fagositoz yeteneğini azalttığı yönündedir. Bu konuda Chan ve Ballish (7), 1977 yılında ilk kez amB'nin 1µg/ml konsantrasyonda PMN'lerin fagositoz yeteneğinde azalma oluşturduğunu göstermiş, bu olayın ilacın memeli hücrelerindeki sterollerini etkilemesiyle oluşabileceğini düşünmüştür. Nitekim Yasui ve arkadaşları (22), amB'nin nötrofil membran yapısını değiştirip membran akışkanlığını azalttığını göstermişlerdir. Nötropenik hastalara aynı anda amB ve granülosit transfüzyonu yapılması, hastalarda klinik olarak letal pulmoner reaksiyonlar oluşturmaktadır. Aynı araştırmacılar bu durumu ilacın PMN membranlarını değiştirerek onların pulmoner yatakta birikmesi ve doku zararı oluşturmaya ile açıklamışlardır. Pallister ve Warnock (6), hem vizüel hem de radyometrik yöntemle amB'nin 2 µg/ml'de PMN'lerin *Candida*'ları fagosite etmesini azalttığını göstermişlerdir. Roilidies ve arkadaşları (4) da, çalıştığımız yöntemle 5 µg/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarda aynı etkiyi gözlemişlerdir. Bir başka araştırmacının sonuçları ise amB ve PMN'ler simültane eklendiğinde fagositoz oranının azaldığı, ancak hücre içi öldürme oranı ve fagositik indeksin değişmediği yönündedir (23).

Çalışmamızda amB tek başına uygulandığında PMN'lerin *Candida* blastosporlarını fagosite etme yeteneğini azalttı (Tablo 2). Bu bulgu genelde önceki çalışmalarla uyumludur. AmB'nin bu etkisi, bize göre ilacın dezavantajıdır. Özellikle yüksek dozlarla ulaştığı organlarda fagositik hücrelerin fagositoz yeteneğinin bozulması, sistemik kandidiyaz tedavisinde başarı oranını düşürebilir. PMN'lerin önceden rhG-CSF ile muamelesinden sonra amB ile birlikte inkübasyonu fagositoz oranını grup içinde kontrol grubuna göre artırmaya da istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecek bir azalma göstermemiştir (Tablo 3). Bize göre bu, sitokinin yararlı bir etkisidir ve özellikle PMN fonksiyonları bozulmuş hastaların tedavisinde önemli olabilir. Bu etki, PMN'lerin rhG-CSF ile muamele edilmesiyle C3bi yüzey reseptör sayısının artmasına bağlanabilir (15).

AmB'nin PMN'lerin kemotaksisi ve kemilüminesans (CL) cevabı üzerine etkileri de daha önce yapılan çalışmalarla araştırılmıştır. Luminol ile artırılmış CL, stimüle olmuş fagositik hücrelerin respiratuar patlama sırasında aktif oksijen bileşiklerinin oluşması ve ışık üretmesi olarak tanımlanır. Fagositik hücrelerin fagositoz işlemi ve oksidatif metabolizmalarıyla bağlantılıdır. Ayrıca immün hücrelerin, antijenik stimülasyona yanıtının da bir göstergesidir. AmB, terapötik konsantrasyonlarda PMN'lerin kemotaksi ve CL cevabını, daha üst değerlerde ise fagositoz oranını azaltmaktadır. İlacın PMN'lerin kemotaksi yeteneğini azaltması membran sterol-

lerine bağlanmasıyla oluşmaktadır (24). Abruzzo ve arkadaşları (25) fare dalak hücreleri üzerine ilacın terapötik konsantrasyonlarda aynı etkilerde bulunduğunu ve immün hücrelerin antimikrobiyal aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalar, amB'nin PMN fonksiyonlarını bozduğunu göstermektedir. Bununla birlikte ilacın fagositler hücrelerin aktivitesini artırdığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Sullivan ve arkadaşları (26), amB dezoksikolatın 5 µg/ml konsantrasyonda PMN'lerin CL cevabını hem mononükleer hücrelerle birlikte olduğunda, hem de tek başına uygulandığında artırdığını göstermiştir. Bu çalışmada PMN'lerin monositlerle birlikte olduğu mikst preparasyonlarda amB desoksikolat ile PMN yüzey Mac-1 (CD11b/CD18 integrin) reseptör sayısı ve ortamdaki IL-1β düzeyinin yükseldiği de gösterilmiştir. Aynı çalışmada ilacın PMN'lerin oksidatif aktivitelerini artırdığı, dezoksikolatın ise tek başına artıramadığı da gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise amB'nin, immünostimulan etkisinin olduğu ve PMN'lerin fonksiyonlarını aktive ettiği bildirilmiştir (27).

AmB'nin *C. albicans* blastosporlarının hücre içi öldürülmesini artırdığı şeklindeki bulgularımız, Van der Auwera ve arkadaşları (9)'nın hedef hücrenin *Candida* olduğu ve amB ile PMN'lerin aynı anda inkübe edildiği çalışmasını desteklemektedir. Bu çalışmada da hücre içi öldürme, bizim çalışmamızda olduğu gibi süspansiyon içinde ölçülmüştür. Bulgularımız, Roilides ve arkadaşları (4)'nin önceden amB ile PMN'leri muamele ettiği çalışmasıyla da uyumludur. Bu çalışmada PMN'ler orta derecede artmış hücre içi öldürme aktivitesi göstermiştir. Araştırmacılar, bu artışı ilacın immünoajuvan etkisine bağlamıştır. Bulgularımız, Pallister ve arkadaşları (8)'nin hücre içi öldürmeyi ilaç ile PMN'lerin simültane inkübasyonu sonucunda artırmadığı şeklindeki bulgularıyla uyusmamaktadır.

Bizim bulgularımız, PMN'lerin majör kandidasid determinantının myeloperoksidaz enzimi ve oksidatif proseslerin olduğu kabul edildiğinde, bu prosesleri aktive ettiği şeklindeki araştırmaları destekler yöndedir. Nitekim Pallister ve arkadaşları (8), PMN'lerin amB ile önceden muamele edilmesinden sonra hücre içi öldürme aktivitelerinin arttığını gösterip, bunun ilacın PMN'lerin oksidatif etkisini artırmasıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Martin ve arkadaşları (28) ise, 0,2 µg/ml konsantrasyonda amB ile monositleri inkübe ettiğinde, *C. albicans*'ların öldürülmesinin %80 oranında arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada monositler aktive olmamış, respiratuar patlamalarında değişme olmadan öldürme yeteneği artmıştır. Araştırmacılara göre amB, hücreler içinde birikip öldürme yeteneğini artırmaktadır. Yine Pascual ve arkadaşları (29), amB'nin 2 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda PMN'ler içinde *C. albicans* hücrelerine karşı iyi derecede aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da amB, PMN'ler içine penetre olup, öldürme oranını artırmış olabilir. AmB'ye G-CSF'nin eklenmesi, genel olarak PMN'lerin öldürme fonksiyonlarında fazlaca bir değişiklik oluşturmamıştır (Tablo 3).

Lip amB'nin tek başına uygulandığı grupta ilaç, genelde PMN fonksiyonları üzerine özellikle serumda bulunduğu konsantrasyonlarda, 5 ve 10 µg/ml'deki *Candida*'ların hücre içine alınma oranındaki azalma hariç tutulursa olumsuz etkide bulunmadı. Halbuki amB, PMN'lerin fagositoz yeteneğinde önemli derecede bozulma göstermişti. Bu farklılığın lipozomal formülasyonlu ilacın PMN membranlarına olan toksisitesinin az olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Pallister ve arkadaşları (8), *Candida*, lip amB ve PMN'leri simültane inkübe ettikten sonra 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarda bile fagositoz oranında azalma gözlemlenmiş-

lerdir. Bulgularımız, 10 µg/ml'deki azalma hariç tutulursa araştırmacıların bulgularıyla uyumludur. Bu konsantrasyon, ilaç için yüksek bir serum değeridir. Ayrıca araştırmacılar, bizim yöntemimizden farklı olarak ilacı, venöz kana uygulamışlardır. Halbuki biz, lip amB'yi venöz kandan elde ettiğimiz PMN'lere uyguladık.

Daha önce amB ile gözlemlediğimiz hücre içi öldürülmedeki artmayı, lipozomal formülasyonlu ilaçta gözlemlenemedik. Bulgularımız Pallister ve arkadaşları (8)'nin bulgularıyla uyumludur. Araştırmacılara göre lipozomal formdaki ilaç, konvansiyonel forma göre daha az toksisite göstermektedir. İlacın PMN oksidatif proseslerini stimüle etmediği, CL ve kemotaksi aktiviteleri üstünde etkisi olmadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (26). Lip amB ile elde ettiğimiz bulgular, ilacın PMN fonksiyonlarında, özellikle de serumda ulaşılabilen konsantrasyonlarda, deney hayvanlarında (17) ve klinik olarak hastalarda (24) daha az toksik etki gösterdiğini destekler niteliktedir.

Sitokin ve lip amB'nin kombine edildiği grupta ilacın tek başına uygulandığı grupta olduğu gibi fagositoz oranında azalma gözlemlendi (Tablo 3). Ama önceki grupta gözlenen istatistik olarak anlamlı fark, bu grupta gözlenmedi. Bu etki konvansiyonel amB ve sitokinin kombine edildiği gruptaki gibi PMN'lerin aktive edilmesiyle açıklanabilir. Bu gruptaki hücre içi öldürme oranının artması da bu etkiyle açıklanabilir. Genel olarak lipozomal form amB ile rhG-CSF'nin kombine edilmesinin PMN fonksiyonlarına olumlu etki ettiğini düşünmekteyiz.

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 birbiriyle karşılaştırılması, aynı testlerin ve yöntemlerin, aynı hedef hücrelerin kullanılması halinde bile sonuçların farklılığı nedeniyle zordur (8). Bulunan sonuçların bu çerçevede değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, bulgularımız özellikle nötrofenik ve nötrofil fonksiyonları bozuk olan hastalarda gelişen sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan amB ve lip amB ile birlikte rhG-CSF kombinasyonunun PMN fonksiyonları üzerine yararlı olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Kaynaklar

1. Mitchell TM. Opportunistic mycoses. In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilferd CM, eds. *Zinsser Microbiology*. 19th ed. Englewood Cliff, NJ: Prentice Hall, 1988: 930-56
2. Hawkins C, Armstrong D. Fungal infections in the immunocompromised host. *Clin Haematol* 1984; 13: 599-630
3. Wright WL, Wenzel RP. Nosocomial *Candida*: epidemiology, transmission, and prevention. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 411-25
4. 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
5. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1966; 64:328-40
6. Pallister CJ, Warnock DW. Effect of antimicrobial and antineoplastic drugs alone and in combination on the phagocytic and candidacidal function of human polymorphonuclear leucocytes. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23: 87-94
7. Chan CK, Balish E. Inhibition of granulocyte phagocytosis of *Candida albicans* by amphotericin B. *Can J Microbiol* 1978; 24: 363-4

8. 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
9. Van der Auwera P, Meunier F. In-vitro effects of cilofungin (LY121019), amphotericin B, and amphotericin B deoxycholate on human polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 747-63
10. Bodey GP. The potential role of granulocyte macrophage colony stimulating factor in therapy of fungal infections: a commentary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 363-6
11. Walsh TJ, Pizzo A. Treatment of systemic fungal infections: recent progress and current problems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 460-75
12. 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
13. Lejeune M, Sariban E, Cantinieaux B, et al. Defective polymorphonuclear leukocyte functions in children receiving chemotherapy for cancer are partially restored by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in vitro. *J Infect Dis* 1996; 174: 800-5
14. 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
15. Ohsaka A, Kitagawa S, Sakamoto S, et al. In vivo activation of human neutrophil functions by administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1989; 74: 2743-8
16. Verbrugh HA, Peters R, Peterson KK. Phagocytosis and killing of staphylococci by human polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. *J Clin Pathol* 1978; 31:539-43
17. Proffitt RT, Satorius A, Chiang SM, Sullivan L, Moore JPA. Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (amBisome) in rodents. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28 (Suppl B): 49-61
18. 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.
19. Yamamoto Y, Uchida K, Klein TW, Freidman H, Yamaguchi H. Immunomodulators and fungal infections: use of antifungal drugs in combination with G-CSF. In: Friedman H, et al. eds. *Microbial Infection*. New York: Plenum Press, 1992:231-41
20. Gasson JC, Golde DW. Colony-stimulating factors and host defence. *Ann Intern Med* 1989; 110: 297-303
21. Athens JW. Granulocyte neutrophils. In: Lee GR, Bithel TC, Foerster J, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lea&Febiger, 1993: 223-66
22. Yasui K, Masuda M, Matsuoka T, et al. Miconazole and amphotericin B alter polymorphonuclear leukocyte functions and membrane fluidity in similar fashion. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1864-8
23. 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
24. Björkstén B, Ray C, Quie PG. Inhibition of human neutrophil chemotaxis and chemiluminescence by amphotericin B. *Infect Immun* 1976; 14: 315-7
25. Abruzzo GK, Giltinan DM, Capizzi TP, et al. Influence of six antifungal agents on the chemiluminescence response of mouse spleen cells. *Antimicrob Agent Chemother* 1986; 29: 602-7
26. Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL. Lipid complexing decreases amphotericin B inflammatory activation of human neutrophils compared with that of a desoxycholate-suspended preparation of amphotericin B (Fungizone). *Antimicrob Agent Chemother* 1992; 36: 39-45
27. Yamaguchi H, Abe S, Tokuda Y. Immunomodulating activity of antifungal drugs. *Ann NY Acad Sci* 1993; 685: 447-57
28. Martin E, Stuben A, Garz A, Weller U, Bakhti S. Novel aspect of amphotericin B action: accumulation in human monocytes potentiates killing of phagocytosed *C. albicans*. *Antimicrob Agent Chemother* 1994; 38: 13-22
29. Pascual A, Garci I, Conejo C, Perea EW. Uptake and intracellular activity of fluconazole in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agent Chemother* 1993; 37: 187-90