

40967

T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**CANDIDA ALBICANS'A KARŞI FLUKONAZOL'ÜN
İNSAN POLİMORF NÜVELİ LÖKOSİT FONKSİYONLARI ÜZERİNE
İN VİVO ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

(DOKTORA TEZİ)

Bio. Ümran SOYOĞUL M.Sc.

DANIŞMAN
Prof. Dr. Adile ÇEVİKBAŞ
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı
Başkanı

İstanbul - 1994

ÖNSÖZ

Candida albicans'a karşı, bir antifungal ilaç olan flukonazol'un insan polimorf nüveli lökosit fonksiyonları üzerine in vivo etkisinin araştırıldığı bu çalışma M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür.

Doktora öğrenimim süresince ve tezin hazırlanmasında çok kıymetli bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Adile ÇEVİKBAŞ'a, yakın ilgisi, teşvik ve cesaretlendirmesi ile bana moral veren ve her zaman yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Candan Bozok JOHANSSON'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmaya gönüllü katılan deneklere teşekkür etmeyi borç bilirim.

Tezin yazılışında yakın arkadaşlıkları ve bilgisayar deneyimlerinden yararlandığım Dr. Dumrul GÜLEN, Dr. Oğuz ÖZYARAL'a ve tezin istatistik olarak değerlendirilmesini yapan Öğr.Gör. Nural BEKİROĞLU'na ayrıca çalışmalarımnda her konuda yardım ve ilgiyi esirgemeyen arkadaşlarım Uzm.Bio. Necdet DUMAN ve Bio. Koray DERİCİ'ye ve her zaman yakın desteklerini eksik etmeyen annem ve babama en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
Candida albicans Hakkında Genel Bilgiler	3
Flukonazol Hakkında Genel Bilgiler	6
Fagositoz Hakkında Genel Bilgiler	9
I. Fagositik Hücreler	9
I.a. Polimorf Nüveli Lökositler (PNL)	9
I.a.1. Nötrofiller	10
I.a.2. Eozinofiller	11
I.a.3. Bazofiller	11
II. Fagositoz	12
II.a. Kemotaksi	12
II.b. Aderens (Yapışma)	13
II.c. Mikroorganizmaların Yutulması ve Sindirimi	14
II.d. Mikroorganizmaların Öldürülmesi	15
II.d.1. Oksijene Bağımlı Öldürme Mekanizması	15
II.d.2. Oksijene Bağımlı Olmayan Öldürme Mekanizması	16
III. Fagositozdan Kaçış Mekanizmaları	17
IV. Antimikrobik İlaçların Fagosit-Mikroorganizma Etkileşimi	
Üzerine Etkileri	17
GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
1. GEREÇLER	19
1.1. Mikroorganizma	19
1.2. Besiyerleri	19
1.3. Tamponlar	19
1.4. Çözeltiler	20
1.5. Boyalar	20
1.6. Antifungal İlaç	21
1.7. Mc Farland Tüpleri	21

1.8. Kimyasal Maddeler	21
1.9. Kullanılan Araç ve Aygıtlar	22
2. YÖNTEMLER	23
2.1. Antifungal Duyarlılık Deneyi	23
2.1.1. 0.165 M pH 7 MOPS Tamponu Hazırlanması	23
2.1.2. Flukonazol Çözeltisinin Hazırlanması	23
2.1.3. İnokulum Hazırlanması	24
2.1.4. Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Tayini	24
2.2. Flukonazol'un Plazma Konsantrasyonunun Saptanması	25
2.3. Polimorf Nüveli Lökositlerin (PNL) Elde Edilmesi	25
2.4. Polimorf Nüveli Lökosit (PNL) Canlılık Deneyi	26
2.5. Flukonazol'un Aderens Üzerine Etkisi	26
2.5.1. Lowry Yöntemi İle Protein Ölçümü	27
2.5.1.a. A Çözeltisi	27
2.5.1.b. B Çözeltisi	27
2.5.1.c. C Çözeltisi	27
2.5.1.d. Stok Bovin Serum Albumini (BSA)	27
2.5.1.e. Standart Protein Eğrisi	27
2.5.2. Aderens Deneyinin Yapılışı	28
2.6. Flukonazol'un Kemotaksi Üzerine Etkisi	28
2.6.1. İnaktif Serum Hazırlanması	28
2.6.2. Zimozan Oponizasyonu	29
2.6.3. Agaroz Jelin Hazırlanması	29
2.6.4. Kemotaksi Deneyinin Yapılışı	30
2.7. Flukonazol'un Süperoksit Anyonu Oluşumu Üzerine Etkisi	30
2.8. Flukonazol'un Candida albicans Blastokonidyasının	
PNL'ler İçinde Ölümüne Etkisi	31
2.8.1. Candida albicans Suşunun Hazırlanması	31
2.8.2. Candida albicans'ın Oponizasyonu	31
2.8.3. Candida albicans Blastokonidyasının PNL'ler İçinde	
Ölümünün ölçülmesi	32

BULGULAR	33
TARTIŞMA	47
ÖZET	57
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	61



GİRİŞ

Antimikrobik ilaçlarla fagositler arasındaki etkileşimi inceleyen klinik ve deneysel çalışmalar, antimikrobik ilaçların 1940'lı yılların başında tedavide kullanılmalarıyla başlamıştır (84).

Mikroorganizmalara karşı vücut savunmasında en önemli olay fagositozdur. Metchnikoff 1905'te infeksiyon etkenlerine karşı savunmada fagositlerin önemini ilk kez göstermiştir (19).

Antimikrobik maddeler patojen mikroorganizmaların üremelerini engelleyerek ya da onları öldürerek etki gösterirler. Bunların kullanımına başlandıktan kısa bir süre sonra zararlı yan etkileri de olduğu anlaşılmıştır. 1950'li yıllarda ise antimikrobik maddelerin toksik ya da allerjik reaksiyonlar gibi istenmeyen etkilerinin yanısıra, organizmanın kendi savunma mekanizması olan bağışıklık sistemini de etkiledikleri fark edilmiştir (6,35,41).

Yüksek dozlarda antimikrobik madde kullanımı immün sistemin uyarılması için gerekli sürenin oluşumuna engel olmaktadır. Düşük dozda kullanımları ise dirençli suşlar oluşturarak ve mikroorganizmanın yapısında değişimler meydana getirerek immün sistemi yanıltmaktadır. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda güçsüz immün sistemin antifungal ilaç tarafından da etkilenmesi hastanın sağlığı açısından tehlikeli sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle yeni antifungallerin tedavide uygulanmadan önce immün sistem üzerindeki etkilerinin araştırılması gündeme gelmiştir (6,41).

Son yıllarda immün sistemi baskılanmış hastalarda meydana gelen mantar infeksiyonlarının tedavisinde önemli gelişmeler kaydedilmiş ve yeni antifungaller kullanıma girmiştir (38).

Böyle hastalarda oluşan çeşitli mantar infeksiyonlarının tedavisinde poliyenlerin ve Siklosporin A almayan hastalarda ketokonazol'un, özellikle son yıllarda sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde flukonazol'un sıklıkla kullanıldığı görülmektedir (38).

Fagositoz olayına antimikrobiklerin etkisini inceleyen çok sayıda çalışma yapılmış ise de sonuçlar oldukça çelişkilidir. Antimikrobikler ile konağın savunma mekanizmasının ilişkisini konu alan araştırmaların genel olarak in vitro koşullarda yapıldığı görülmektedir. İn vivo insan deneylerine ise az rastlanmaktadır (48).

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda görülen en önemli komplikasyon kandida infeksiyonudur. Bu durum göz önüne alınarak çalışmamızda, klinikten izole edilen flukonazol'e duyarlı *Candida albicans* suşuna karşı, sağlıklı gönüllülerde flukanazol'un terapötik plazma konsantrasyonunda polimorf nüveli lökosit (PNL) fonksiyonları üzerine etkisi, fagositozun gerçekleşmesindeki ara kademeler olan aderens, kemotaksi; fagositozu izleyen süperoksit anyonu oluşumu ve *Candida albicans* blastokonidiasının PNL'ler içinde ölümü üzerine etkisi in vivo araştırılmış ve deney sonuçları in vitro bulgularla karşılaştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

CANDIDA ALBICANS HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Hipokrat ve Galen döneminde oral lezyonlar *pamukçuk* olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 1839'da Langenbeck, 1841'de Berg pamukçuk etyolojisini ilk kez ortaya koymuşlardır. Bu dönemlerde *Candida albicans* için 100'den fazla eş anlamlı ad kullanılmıştır. Robin 1843'te organizmaya *Oidium albicans*, 1890'da Zopf *Monilia albicans*, 1923'te Berghout ise *Candida albicans* adını vermiştir (26,27).

Candida albicans Deuteromycetes sınıfı Blastomycetes alt sınıfından tek hücreli ve blastosporların tomurcuklanması ile çoğalan bir mayadır (23,24).

Hastalıklı yerden alınan materyalde uçları az çok toparlak, tek tek duran ya da bir kaç birbiri ardısıra dizilerek oldukça uzun bir hif yapabilen, boyu 5-7 μm eni 2-5 μm olan söbemsi hücreler şeklindedir. Bunlar iki üç hücreli kısa zincirler ya da salkımlar yapabilir. bazılarında tomurcuk belirlidir. Bazen yalnız hifler ya da blastosporlar bulunur. Bu hücreler Gram pozitifdir. Bazen aside dirençli olarak da görülürler (26,81).

Candida albicans Sabouraud'nın dekstrozu agarında iki üç günde stafilokok kolonisine benzeyen S biçimi, beyaz ya da krem renginde, tereyağı kıvamında üstü düz, parlak maya kokan koloniler oluşturur. Bunlardan hazırlanan preparasyonda çoğunlukla yalnız blastospor şekilleri görülür (26,81).

Mısır unlu-Tween 80'li agarda 26°C'de 72 saat içinde yalancı hifler, yalancı hiflerin boğumları çevresinde kümeler yapan yuvarlak blastosporlar ve yalancı hif uçlarında kalın duvarlı, tek ya da bir kaç tane ve bu tür için tanı koydurucu olan klamidiosporları oluştururlar (80).

Elektron mikroskobu çalışmaları ile *Candida albicans* hücre duvarının çok tabakalı olduğu saptanmıştır. Çeşitli teknikler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda *Candida albicans*'ın hücre duvarının esas olarak mannoprotein, β -glukan ve az miktarda kitinden oluştuğu anlaşılmıştır (β -glukan % 48-60, mannoprotein % 20-23, protein % 3-6, lipid % 2, kitin % 0.6-2.7) (15,16,23,27).

Candida albicans dünyanın her yerinde bulunan bir maya mantarıdır. Normal populasyonun (% 20-40) ağız, deri ve mukozalarında, kadınların (% 5) vajinasında komensal organizmalar şeklinde bulunur (23,24).

Candida albicans çimlenme borusu ve klamidiospor oluşturan, glikoz, galaktoz ve maltozu asimile eden bir türdür. Serum içinde asıntı yapıldıktan sonra 37°C'de üç saat tutulursa blastokonidilerden çimlenme borusu oluşturur. Bu özellikler *Candida albicans*'ın ayırımında önemlidir (66).

Candida albicans her zaman hastalığa yol açmayıp genellikle kişi direnci düştüğü zaman infeksiyon oluşturur. *Candida albicans*'ın neden olduğu her türlü infeksiyona *kandidamikoz* denir. Vücuttaki bütün dokularda infeksiyona neden olabilir. *Candida albicans* yüzeysel infeksiyonlara neden olduğu gibi ağır derin doku infeksiyonları da oluşturabilir. Yüzeysel kandida infeksiyonları özellikle ağız ve vajinada siktir ve bazı durumlarda tedaviye direnç gösterirler. Sistemik kandidiyaza ise daha az rastlanmakla beraber modern tıbbi girişimlerin (transplantasyon cerrahisi, damariçi hiperalimentasyon, immün sistemi baskılayıcı tedavi gibi) artması ile sıklığı ve önemi artmıştır (6,23,24,66).

Yapılan bir çalışmada *Candida albicans*'ın tek başına ya da diğer patojenlerle birlikte, karsinoma olgularındaki oral infeksiyonların yaklaşık dörtte

üçünden, sarkoma ya da lenfoma olgularındaki oral hastalıkların yaklaşık yarısından sorumlu olduğu görülmüştür (6).

Candida albicans'ın patogeneğinde rol oynayan patojenik faktörler arasında epitel hücrelerine bağlanmayı, fagositoza direnci, hif oluşumunu, proteinaz ve fosfolipaz gibi hücre dışı enzimlerin salgılanmasını sayabiliriz (8,25). Proteinaz enziminin *Candida* hücrelerini, konak savunma sistemine karşı koruduğu kadar, konak dokusunda zarar verici bir rol oynadığı sanılmaktadır. Proteinaz enzimi insan PNL'leri tarafından hücre içi öldürme ve fagositoza karşı *Candida albicans*'ın direncini artırmaktadır. Buna karşın *Candida albicans*'ın hücre içi öldürülmesinden sorumlu en büyük mekanizma miyeloperoksidaz, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyon (O_2^-) sistemidir. *Candida albicans*'a karşı savunmada humoral faktörlerin önemi de çok sayıda gözlemlerle kanıtlanmıştır (43).

Candida albicans'ın nötrofiller tarafından alınıp hız oranı ısıya duyarlı ve ısıya dirençli serum opsoninleriyle artırılır. IgG ve diğer serum bileşikleri *Candida albicans*'ı etkili bir şekilde opsonize ederler ve yaygın kandidiyazlı hastalar ekseriya yüksek titrede antikor yanıtı verirler (26).

Nötrofiller, yalancı hiflere zarar vermek, fagosite etmek ve blastosporları öldürme kapasiteleri nedeni ile kandida infeksiyonuna karşı dirençte rol oynarlar. Nötrofillerden başka monositler ve eozinofiller de bu savunmada rol alırlar. Monositlerin in vitro öldürücülüğü PNL'lerden daha etkilidir (26).

Son yıllarda kandidanın oral ve vajinal epitel hücrelerine, fibronektin, trombosit fibrin pıhtılarına, akrilik, endotelyum, ve plastiklere aderens (yapışma) yeteneğinin olduğu gösterilmiştir (26).

Candida albicans infeksiyonlarının tedavisinde vücudun direncini kıran faktörlere göre önlemler alınmaktadır. Bunun yanısıra kullanılması düşünülen ilaçların etki ve direnç mekanizmalarının in vitro ve in vivo sonuçları da değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle profilaksi ve ampirik tedavide dikkatle kullanılmalrı

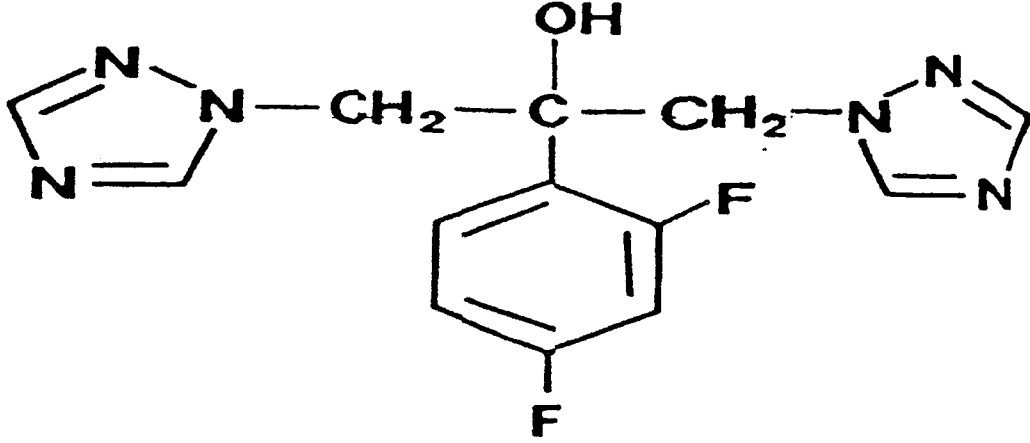
önemlidir. Profilaksi, immün sistemi baskılanmış hastalarda özellikle kandidaların endojen kaynaklı infeksiyonlara yol açmalarını önlemek ve infeksiyondan korumak için gereklidir. Bugün klinik çalışmalarda özellikle kemik iliği transplantasyonunda profilaksi için pek çok antifungal ilaç önerilmekte ve kullanılmaktadır. Antifungal ilaçlar tedavide çeşitli yönleri ile değerlendirildiğinde triazol türevlerinin deneysel ve klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmakta olduğu görülmektedir (51,81).

FLUKONAZOL HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Mantarlar hastalık etkeni olarak bakterilerden önce tanımlanmıştır. Özellikle fırsatçı infeksiyonlarda mantarların birer infeksiyon etkeni olarak taşıdıkları önem, son yıllarda büyük ölçüde artmıştır. Farmasötik endüstrinin yoğun çalışmaları sonucunda birçok antifungal etkili madde mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere formüle edilmiş ve antifungal kemoterapiye başlanmıştır. Ancak antibakteriyel ilaçlarla karşılaştırıldığında, antifungal kemoterapi çok yavaş gelişmiştir (38).

Antifungaller arasında Azol grubu ilaçlar 1969'a kadar klinik kullanıma girememişlerdir. Wolley (1944), bir azol bileşiği olan benzimidazol'un antifungal aktivitesini göstermiştir (38). O yıllarda bu çalışma mikotik hastalıklar çok az ilgi gördüğünden önemli bulunmamıştır. Otuz yıl sonra Vanden Bossche'un feniletıl imidazol'un antifungal etkisini kandidalarda saptamasıyla azol bileşiklerinin antifungal aktivitelerine ilgi artmaya başlamıştır (38).

Son otuz yıl içinde sentez edilen üç imidazol'den klotrimazol, mikonazol ve ekonazol mantar infeksiyonlarında kullanılmaktadır. Daha sonra ketokonazol ile antifungal kemoterapide büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bugün ise yeni triazol türevlerinden flukonazol ve itrakonazol'un klinikte daha az toksik ve daha etkili olmaları nedeni ile tedavide başarılı sonuçlar alınmıştır (36,38).



Şekil 1: Flukonazol'un kimyasal formülü

Flukonazol var olan bileşiklerin moleküllerinde değişiklik yaparak daha iyi bir sistemik antifungal ilaç elde etmeyi hedef alan araştırmaların sonucunda bulunmuştur.

Açık formülü [2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl) propan-2-ol] olan flukonazol'un molekül ağırlığı 306.3'tür.

Flukonazol molekülü planlanırken imidazol grubunun yerine bir triazol grubu kullanılması ilacın mantarlardaki demetilaz enzimine karşı olan özgüllüğünü artırmıştır. İkinci bir triazol grubunun eklenmesi ise antifungal aktivitenin daha fazla artmasını sağlamıştır (7,63).

Flukonazol antifungal aktivitesini, sitokrom p-450 aracılığı ile iş gören bir enzim olan lanosterol C-14 demetilaz'ın selektif inhibisyonu ile gösterir. Bu inhibisyon mantar hücre duvarının önemli bir yapıtaşı olan ergosterol'ün sentez edilememesine neden olur. Sitoplazma zarında ergosterol biyosentezinin inhibisyonu ve lanosterol ya da diğer sterol ara maddelerinin birikmesi sonucunda, mantar plazma zarının geçirgenlik ve transport işlevi değişmektedir. Metabolik dengenin

bozulması hücre çoğalmasının inhibisyonuna neden olmakta ve sonuçta hücreyi ölüme götürmektedir (34,38,55,70).

Flukonazol'un antifungal aktivitesi fungostatiktir. Bu aktivite ilacın düşük konsantrasyonları ile meydana gelir. Daha ağır seyreden sistemik infeksiyonlarda uzun süreli tedavi gerektirir. Mantar infeksiyonunu ortadan kaldırmak için konakçının immün yanıtının da yardımı gereklidir (38).

Flukonazol çok iyi farmakokinetik yapıya sahiptir. Oral yoldan alındığında hızla, değişime uğramadan emilerek tüm vücuda dağılır. İlacın aç ya da tok karına alınması emilimini etkilemez (79). Tek doz verilışinden sonra Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)'na ve seruma geçişinin yüksek düzeyde olduğu farmakokinetik çalışmalarla gösterilmiştir (38).

Flukonazol plazma proteinlerine fazla miktarda bağlanmaz ve bu nedenle dokulara daha yüksek oranda geçer (36,79).

Flukonazol'un yarılanma ömrü yaklaşık 30 saattir. Bu özelliğinden dolayı ilaç günde bir tek doz ile profilaksi ve fırsatçı mantar infeksiyonlarının tedavisinde başarı sağlamaktadır (76,79).

Molekül ağırlığının küçük oluşu ve plazma proteinlerine az bağlanması suda çözünürlüğü, oral ve intravenöz yol ile verilşini kolaylaştırmaktadır (38,76).

Oral yoldan etkili olan flukonazol'un sistemik biyoyararlılığı yüksektir (38).

Kanserli hastalarda, yoğun bakım ünitelerinde yatan, sitotoksik ya da immün sistemi baskılayıcı tedavi gören, organ nakli yapılmış ya da fırsatçı mantar infeksiyonlarına zemin hazırlayan diğerk faktörlerin bulunduğu hastalarda tedavi ve profilaksi de kullanılmaktadır (42).

İmmün sistemi baskı altında olan hastalarda oluşan orofarenks, özofagus kandidiyazında, mükokütan ve kronik atrofik oral kandidiyazda, ayrıca yaygın kandida infeksiyonlarının neden olduğu sistemik kandidiyazda etkilidir (42,52).

Flukonazol ile AIDS'li ve Hodgkin lenfomalı hastalarda oluşan kriptokok menenjitinde de çok başarılı klinik sonuçlar alınmıştır (13,14,31,38,44,75).

Deneysel ve klinik çalışmalar flukonazol'un çok iyi tolere edildiğini ve toksik etkisinin olmadığını göstermektedir. Merkezi sinir sistemi üzerine yan etkileri ya da başka olumsuz etkileri bildirilmemiştir (38).

FAGOSİTOZ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

I. FAGOSİTİK HÜCRELER

Fagositik hücreler temel olarak; nötrofiller, monosit-makrofaj sistemi hücreleri ve eozinofillerdir (91). Miyeloid hücre yönünde gelişme gösteren bu hücreler kemik iliğinin *kök* (stem) *hücre* adı verilen ve farklı yönde gelişme yeteneği gösteren hücrelerinden oluşur (33,69). Granülosit adı altında nötrofiller (polimorf nüveli lökositler), eozinofiller ve bazofiller tanımlanmaktadır (91).

I.a. Polimorf Nüveli lökositler (PNL) :

Kan dolaşımındaki lökositlerin % 60-70'ini PNL'ler oluşturur. Kemik iliğinde oluşan bu hücreler, çekirdeklerinin çok loblu olmaları nedeniyle bu adı almışlardır. Ayrıca sitoplazmalarındaki bol granüller nedeni ile de *granülosit* adı verilmiştir. Sitoplazmadaki granüllerin histolojik boyalarla farklı boyanmaları nedeni ile nötrofil, eozinofil ve bazofil adını alırlar (33,69). Dolaşımdaki yaşam süreleri çok kısa olup 2-3 gündür (91). Kemik iliğinde çok hızlı oluşurlar (Dakikada 80 milyon) (69).

I.a.1. Nötrofiller :

Dolaşımdaki PNL'lerin % 90'ını oluşturur ve 10-20 µm çapında büyük hücrelerdir. Nukleusları dar kromatin iplikçikleri ile bağlanmış olup 3-5 loba sahiptir. Periferik kanda yarı ömrü yaklaşık 6-20 saattir. Dokularda hayatta kalması uygun şartlarda 4-5 gündür (1).

Morfolojik olarak tanınabilen ilk nötrofil öncü hücresi miyeloblasttır. Bu hücrenin bölünme ve farklılaşması sonucu promiyelositler gelişir. Azurofilik granüllerin sentezi bu aşamada başlar. Promiyelositten miyelositler gelişir. Bu hücrelerde spesifik granüllerin sentezi başlar. Bu aşamaya kadar olan devre çoğalma evresini oluşturur ve 5-7 gün sürer. Bu evreyi izleyerek olgunlaşma evresi başlar ve miyelositten metamiyelosit-bant ve olgun nötrofil gelişir (91).

Nötrofiller iki türlü granüle sahiptir. Primer granüller, azurofilik boyanır ve lizozimler (asit hidrolaz, miyeloperoksidaz ve muramidaz), kuvvetli antibakteriyel ve antifungal etkileri olan katyonik proteinler içerirler (91). Sekonder granüller ise; lizozime ek olarak laktoferrin içerirler. Mikroorganizmayı içeren vakuole *fagozom*, granüllerin boşaldığı fagozomlara da *fagolizozom* adı verilir (33,69).

Nötrofillerin yüzeyinde komplemanın C3 komponenti ve IgG'nin Fc parçası ile birleşebilen reseptörler bulunmaktadır (1).

Nötrofillerin vücuttaki asıl görevleri organizmaya giren mikroorganizmaları fagosite etmek, öldürmek ve ortadan kaldırmaktır (1). Nötrofiller kendini çeken, kemotaksi yapan maddelere karşı hareketlerini o yöne doğru yönlendirirler (33,69). İltihap sahasında lokalize olan nötrofiller uygun şekilde opsonize edilmiş maddelere bağlanıp onları sindirir. Fagositozu takiben morfolojik ve biyokimyasal olaylarda birbirini takip eder. Fosfolipid metabolizmasında artma, heksoz monofosfat yolunun belirgin stimülasyonu ve hidrojen peroksit oluşumu fagositozun en önemli biyokimyasal sonuçlarını içerir (1).

I.a.2. Eozinofiller :

Periferik kan lökositlerinin % 2-5'ini oluşturan eozinofiller yaklaşık 12 µm çapında yuvarlak hücrelerdir. Allerjik kişilerde bu oran çoğalır (1).

Eozinofiller kana geçmeden 3 ile 6 saat kadar önce kemik iliğinde olgunlaşır. Yarı ömrü kanda 30-60 dakika, dokuda ise 10-12 gün kadardır (1).

Granüllerin ortası kristalimsi görünümündedir. Granüllerin içerisinde fazla miktarda hidrolitik enzimler bulunduğu halde mikrobisidal özellikteki yapılar daha az görülür. Bu nedenle eozinofillerin fagositoz yetenekleri nötrofillere nazaran daha azdır (33).

Eozinofiller lezyon alanına T hücresi, mast hücresi ve bazofillerden salgılanan maddelerle yönlendirilir. Eozinofil kemotaktik faktör (ECF-A), anafilakside bazofillerden salgılanır. Eozinofillerin degranülasyonunda açığa çıkan histaminaz ve aril sülfataz, anafilaksi olayında mast hücrelerinden açığa çıkan histamin ve anafilakside yavaş etkileyen madde (SRS-A)'yı parçalarlar ve iltihap reaksiyonunun baskılanmasına yol açarlar (1,33,69).

Eozinofiller antijen-antikor komplekslerini de fagosite etme özelliğine sahiptir (1).

I.a.3. Bazofiller :

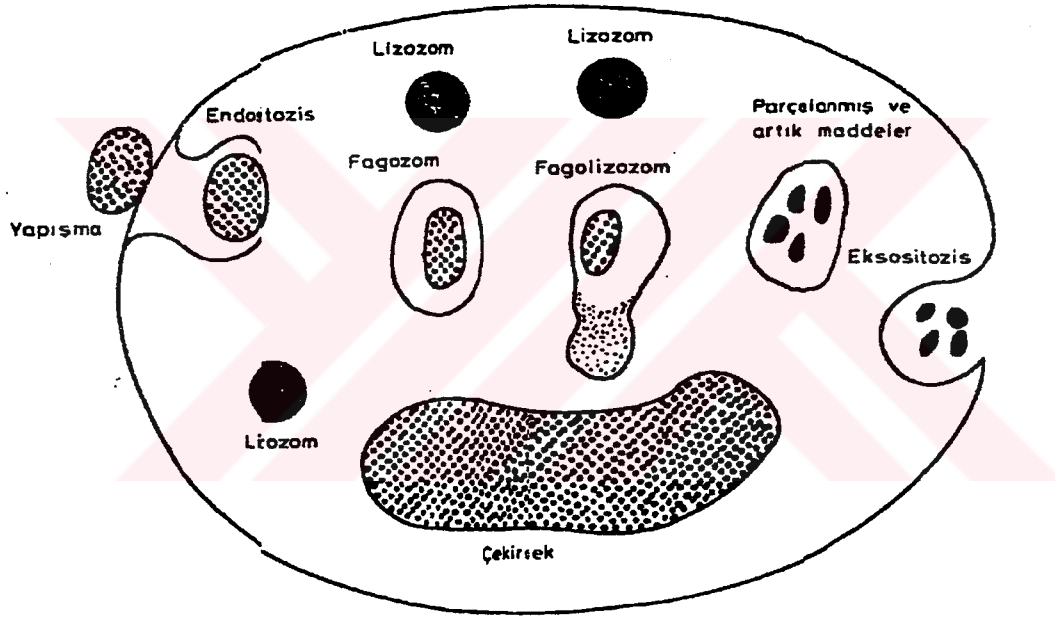
Periferik kanda bulunan lökositlerin % 0.2'den azını oluşturan oval ve elektron yoğun büyük granüllere sahip hücrelerdir. Bu granüller koyu menekşe renginde boyanırlar. 8-12 µm büyüklüğündedirler. Nukleusları iki loblu olup kromatince fakirdirler (1,91).

Bazofiller kemik iliği kökenlidir. Granüllerinde heparin, SRS-A, ECF-A, bulunmaktadır. Bu maddeler degranüle olduklarında hücre dışına dökülürler. Bu maddeler allerjik reaksiyonları oluşturmalarının yanısıra, eozinofillerde olduğu gibi parazitlere karşı bağışıklıkta rol oynarlar (33,69).

II. FAGOSİTOZ

Fagositoz, mikroorganizmalar dahil olmak üzere yabancı maddelerin, bu işle görevli fagositler tarafından hücre içine alınarak parçalanması ve sindirilmesi olayıdır. Bu olay, infeksiyonlara karşı konağın savunmasında önemli yer tutar (40).

Fagositoz olayı kemotaksi, aderens (yapışma), mikroorganizmaların yutulması ve sindirimi, mikroorganizmaların ölmesi evrelerini içerir (33,69) (Şekil 2).



Şekil 2: Fagositoz olayının evreleri.

II.a. Kemotaksi :

Fagositik hücrelerin mikroorganizmaya doğru hareket etmesine *kemotaksi* denir. Fagositik hücrelerin infeksiyon yerine doğru çekimi farklı birçok mekanizma ile olmaktadır (33,40).

Kemotaksi enerjiye bağımlı bir olaydır. Nötrofillerin kemotaksisinde en büyük enerji kaynağı anaerobik glikolizdir (40).

Mikroorganizmaların dokulara girdikleri yerlerde üremeleri ve salgılarıyla doku zararları meydana gelir. Gerek oluşan doku zararları, gerekse mikroorganizma hücre duvarları, komplemanı alternatif yoldan aktive ederler. Kompleman aktivasyonunda açığa çıkan C3a ve C5a moleküllerinin kuvvetli kemotaktik etkileri vardır. Bu moleküllerin etkisiyle damar içi nötrofilleri kapiller endotelyuma yapışır ve diyapedez ile kapiller duvarını geçerek, C3a ve C5a moleküllerinin en yoğun olduğu yere doğru göç ederler. Lökositler, uyarılmadan 30 saniye sonra kasılma ve gevşeme hareketleriyle göçe başlarlar. Lökositlerin kapiller endotellerine yapışmasında adezyon molekülleri rol oynar. Lökosit yüzeyinde var olan adezyon moleküllerinden bazıları şunlardır: Lökosit fonksiyon antijeni-1 (LFA-1), kompleman reseptör-3 (CD11b) ve p150, 95 (CD11c) dir (33,69).

Divalan katyonların varlığı fagositik aktiviteyi değiştirir (1). Fagositik hücre zarı üzerinde bulunan ve zar üzerindeki hareketliliğini sağlayan Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının bazı ilaçlar tarafından bağlanması sonucunda bu iyonların serbest hareketi önlenmiş olur (84).

II.b. Aderens (Yapışma) :

İki hücre arasında yakın temasın kurulması; hücre yüzeylerinin gerilimi, yüzeyler arası serbest enerji, hücrelerin şekli ve yüzey viskozitesi gibi iki hücrenin yüzey özelliklerine bağlıdır (1). Bu temas ve yapışma daha sıkı ve güçlü olarak, antikorlar aracılığı ile sağlanabilir. Mikroorganizmaların fagositlere bağlanmasını sağlayarak fagositozu kolaylaştıran fibronektin, kompleman gibi doğal maddeler ile, spesifik antikorlara *opsonin* ve bu olaya da *opsonizasyon* denir. Opsonizasyon fagositoza hazırlama olayını ifade etmektedir (40).

Opsonize edilen mikroorganizmalar fagositlere daha kolay bağlanmakla kalmaz, ayrıca daha etkili olarak öldürülür ve sindirilirler. Fagositik hücre ile bir

antijen-antikor kompleksinin Fc parçasının, hatta C3b molekülünün ilişkisi, lökositlerin yüzeyinde bulunan Fc ve C3b reseptörleri aracılığı ile olmaktadır (40).

Yapışmada fagositik hücrelerin şekli de çok önemlidir. Hücrenin 500 °A'dan daha küçük çapta çıkıntılar oluşturma yeteneği, negatif yüzey potansiyelinin uzaklaştırıcı kuvvetlerini ortadan kaldırmasını olanak kılar. İnce, parmak gibi çıkıntılar oluşturamayan hücrelerin fagosite etme yetenekleride belirgin şekilde düşüktür. Hücrenin şekli çevreye ve hücre zarının viskozitesi gibi intrinsik faktörlere de bağlıdır (1).

II.c. Mikroorganizmaların Yutulması ve Sindirimi :

Nötrofil ve makrofajlar mikroorganizmalar ile uygun şekilde temas geldiklerinde fagositoz başlar. Fagositik hücreler partikülün çevresinde yalancı ayak çıkararak partikülü sarar. Partikülün kuşatılması için muhtemelen kontraktıl proteinlerin (aktin ve miyozin) ve adenzin trifosfat (ATP)'dan enerjinin sağlanması, hatta mikroorganizma ve hücre zarının yakın birleşmesi ve yapışkan bir yüzey gereklidir (1,69).

Yalancı ayaklar tarafından kuşatılan mikroorganizma fagositik bir kese ya da vakuol içine alınır. Bu vakuol hücre zarından ayrılarak içeri doğru hareket eder. Hücre zarından ayrılmış olan sitoplazma içerisindeki bu vakuole *fagozom* adı verilir. Böylece fagozom içerisindeki mikroorganizmanın sitoplazma ile direkt olarak teması önlenmiş olur. Daha sonra bu fagozom oluşumundan hemen bir dakika içinde sitoplazmada bulunan lizozom bir fagozom ile temas gelerek fagozomun zarı ile birleşir ve lizozomun içerisinde bulunan çeşitli hidrolitik enzimler fagozomun içerisine boşalır (1,69).

Lizozomun pH (3.5-4)'ı düşüktür. Bu düşük pH fagozomlar tarafından yutulan mikroorganizma ve partiküller için uygun değildir ve onları öldürebilir (1).

II.d. Mikroorganizmaların Öldürülmesi :

Fagolizozom içinde mikroorganizmaların öldürülme olayında iki türlü mekanizma rol oynar (1).

1-Oksijene bağımlı öldürme mekanizması

2-Oksijene bağımlı olmayan öldürme mekanizması

II.d.1. Oksijene Bağımlı Öldürme Mekanizması :

Bu mekanizma için lizozom granüllerinin füzyonuna gereksinim yoktur. Fagozomun oluşmasıyla nötrofil zarındaki oksidaz enzimleri; indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH-NADH) ya da sitokrom b 558 aktive olur ve plazma zarına bağlı oksijen molekülü indirgenerek süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli oksijen (1O_2) ve hidroksil (OH) kökleri oluşur. Bütün bunlar kuvvetli mikrop öldürücü maddelerdir. Daha sonra lizozom granüllerinin fagozoma açılmasıyla içeriye miyeloperoksidaz girer. Halojen moleküllerin varlığı ile hipoklor (OCl^-) denen toksik maddeler oluşur (33,69).

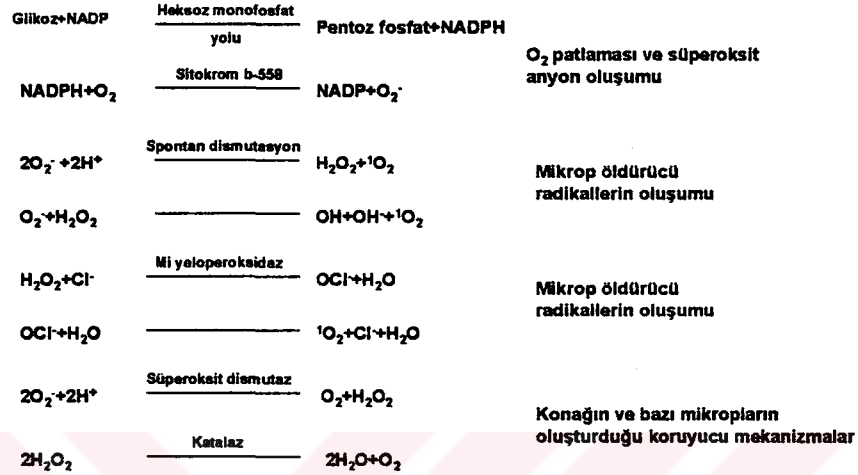
Fagosite edilmiş mikroorganizmaların fagozomlar içinde öldürülme işi esas olarak, süperoksit-miyeloperoksidaz sisteminin birlikte çalışması ile başarılı (40).

Fagositoz olayının başlamasıyla heksoz monofosfat yolu aktivitesi, oksijen kullanımı, süperoksit anyon (O_2^-) ve H_2O_2 yapımı artar. Bu oksijen kullanımının artması olayına *solumum patlaması* (respiratory burst) denir. Bu zorlu ve adeta patlayıcı özellikteki metabolik değişme NADPH oksidaz denen ve fagositlerde uyur durumda bulunan bir enzimin aktivasyonu ile başlar (33,40,69).

Granülositlerde süperoksit anyon (O_2^-) oluşumu birçok mikroorganizma için öldürücüdür. Oksijene bağımlı H_2O_2 oluşumu ve oksitlenebilen iyot, brom ve klor gibi halojenlerin bulunması ile toksik maddeler oluşur. Bunlara ek olarak asit pH' da mikrop öldürücü etki yapar.

Özetle; miyeloperoksidaz, H_2O_2 , halojenler ve asit pH antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antimikoplazmal etki gösterirler (33,69).

Oksijene bağımlı öldürme mekanizması kimyasal denklemler ile aşağıda görüldüğü gibidir (33,91).



Toksik Moleküller: O_2^- Süperoksit anyon, 1O_2 teklil oksijen, OH^- ve OH hidroksil serbest kök, H_2O_2 hidrojen peroksit, OCl^- hipoklor.

II.d.2. Oksijene Bağımlı Olmayan Öldürme Mekanizması:

Oksijene bağımlı olmayan öldürme mekanizması aşağıda açıklandığı gibidir.

1-Katyonic proteinler (fagositin,lökin); PNL'lerin azurofil granüllerinde bulunur. Nötral pH'da etkilidir.

2-Laktoferrin; PNL tarafından hücre dışına atılır.

3-Lizozim, askorbik asit ve H_2O_2

4-Asit pH oluşumu

5-Nükleer histonlar, proteazlar, katepsin, serum esteraz, elastaz gibi enzimler oksijene bağımlı olmayan mekanizma ile etki yaparlar.

Öldürülen mikroorganizmalar, lizozomal granüllerdeki litik enzimler ile (asit hidrolazlar) parçalanıp dağıtılırlar. Geriye kalan artıklar *ekzositoz* denen bir olayla hücre dışına atılabilirler (33,40,69).

III. FAGOSİTOZDAN KAÇIŞ MEKANİZMALARI

Fagositoz birçok mikroorganizmanın öldürülmesinde etkili bir mekanizmadır. Fakat bazı mikroorganizmalarda fagositozun bu öldürücü etkisinden kaçış mekanizmaları gelişmiştir (33,69).

Mikroorganizmalar fagositlerin kemik iliğinde yapımlarını baskılayarak, inflamasyonu, kemotaksiyi, endositozu zayıflatarak, lizozomal füzyonu engelleyerek ve fagositler içinde üremeyi başararak fagositoza karşı kendilerini değişik yollardan koruyabilirler (40).

IV. ANTİMİKROBİK İLAÇLARIN FAGOSİT-MİKROORGANİZMA ETKİLEŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Antimikrobik ilaçlar immün sistem üzerine bir dizi etkiye sahiptirler. Bu etki, ya direkt olarak immün sistemi oluşturan hücrelerin antimikrobiklerden etkilenmesi şeklinde ya da antimikrobik ilaçların mikroorganizmada yapısal ya da işlevsel değişimlere yol açarak indirekt yoldan immün sistem fonksiyonlarını etkilemesi sonucu ortaya çıkmaktadır (6).

Fagosit-Mikroorganizma etkileşimi, antimikrobik ilaçların fagositler üzerine olan etkisinden dolayıdır. Burada esas, antimikrobik ilacın mikroorganizmalar üzerine olan herhangi bir etkisini fagositler üzerine olan etkisinden ayırdetmektir (84).

Antimikrobik ilaçlar, fagositler ya da mikroorganizmalar üzerine bir etki gösterirler. Bu etki kemotaksi ile karıştırılabilir. Mikroorganizmaların bazı salgıları (endotoksin, protein A, glikolipidler) kemotaktik özellikte olup kemotaksiyi etkilerler .Fagosit ve mikroorganizma, kemotaksi ile bir araya geldikten sonra bu

birleşme nedeniyle antimikrobik ilaçların aktiviteleri üzerinde fagositoz gerçekleşmese bile farklılaşmaya neden olabilir (84).

Fagositik hücrelerde bulunan bazı enzimlerde (lizozim, katyonik proteinler, laktoferrin ve küçük peptidler) fagositoz esnasında mikroorganizma üzerine etki gösterirler (84).



GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. GEREÇLER :

1.1. Mikroorganizma :

Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen, çocuk servisinde yatan ve beslenme sıvısı alan bir bebekte gelişen sepsis sonrası alınan kan kültürü örneğinden izole edilen *Candida albicans* (4826) suşu kullanılmıştır.

1. 2. Besiyerleri :

Katı besiyeri : Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Difco)

Sıvı besiyeri : Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) (Difco)

Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco)

Buffered Yeast Nitrogen Base (BYNB)

1.3. Tamponlar :

0.1 M PBS (Fosfat tamponlu tuzlu su) (pH: 7.2)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
Distile Su	1000 ml

HBSS (Hanks'ın dengeli tuz çözeltisi) (pH:7.4)

NaCl	8	g
KCl	0.4	g
Na ₂ HPO ₄	0.048	g
KH ₂ PO ₄	0.06	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	g
Glikoz	1	g
NaHCO ₃	0.35	g
Fenol Kırmızısı	17	mg
Distile Su	1000	ml

Ca⁺² içeren HBSS tamponu hazırlamak için HBSS stok tamponuna 0.14 g/l CaCl₂ eklenmiştir (4).

0.165 M MOPS (Morfolinpropan sülfonik asit) Tamponu (pH :7).

MOPS	3.453	g
Distile su	1000	ml

1. 4. Çözeltiler :

- 2 N NaOH
- 10 N NaOH
- 1.5 mg/ml EDTA
- % 0.9 NaCl
- % 1 BaCl₂·2H₂O
- % 1 H₂SO₄
- %2 Na₂CO₃
- % 1 CuSO₄·5H₂O
- % 2 NaKC₄H₄O₆

1. 5. Boyalar :

Giemsa boyası

Tripan mavisi boyası

1. 6. Antifungal İlaç :

Potensi 1000 µg/ mg olan Flukonazol saf ilaç ham maddesi Pfizer İlaçları A.Ş. tarafından sağlanmıştır.

1. 7. Mc Farland Tüpleri :

Standart bulanıklık elde etmek için laboratuvarında hazırladığımız Mc Farland 0.5 standart tüpü esas alınmıştır. 0.5 ml %1 BaCl₂'e 99.5 ml %1 H₂SO₄ ilave edilerek hazırlanmıştır (56).

1.8. Kimyasal Maddeler :

EDTA (Sigma)

BaCl₂·2H₂O (Merck)

CaCl₂·2H₂O (Merck)

MgCl₂ (Merck)

NaCl₂ (Merck)

KCl (Merck)

Na₂HPO₄ (Merck)

KH₂PO₄ (Merck)

K₂HPO₄ (Merck)

MgSO₄·7H₂O (Merck)

CuSO₄·5H₂O (Merck)

Na₂CO₃ (Merck)

NaHCO₃ (Merck)

NaKC₄H₄O₆ (Merck)

NaOH (Merck)

H₂SO₄ (Merck)

Glikoz (Merck)

Folin ciocalteu's fenol reaktifi (Merck)

Zymosan A (Sigma)
Süperoksit dismutaz (Sigma)
Ferrisitokrom C (Sigma)
Agaroz (Merck)
Asparagin (Difco)
MOPS (Sigma)
DMSO (Merck)
Metanol (Merck)
Giemsa (Merck)
Tripan mavisi (Merck)
Fenol kırmızısı (sigma)
Sıvı silikon (Sigma)
BSA (Sigma)
Ficoll-Hypaque (Sebak)
Polymorphoprep (Nycomed)

1.9. Kullanılan Araç ve Aygıtlar :

Hassas Terazı (0.0001 g Bosch)
Kaba Terazı (0.1 g Mettler)
Etüv (B 5042 Heraeus)
Etüv (EN 500 Nüve)
Pastör Fırını (Elektro-mag)
Otoklav (Kermanlar)
Santrifüj (NF 815 Nüve)
Vorteks (Kermanlar)
Su Banyosu (SB 100 Nüve)
Spektrofotometre (Shimadzu UV-120-02)
Mikroskop (Olympus BH)
Buzdolabı (Arçelik 475 T)
Derin Dondurucu (Bosch)
Otomatik Pipetler 5-50 µl, 50-200 µl (Scorex)
Cam Pipetler 0.5, 1, 2, 5, 10 ml (Prescicolor)

Pastör Pipeti
Thoma Lamı
Enjektör 2.5, 10, 20 ml (Becton Dickinson)
Steril Membran Filtre 0.22- 0.45 µm (Milipore)
pH İndikatörü (0-14) (Merck)
Silikon Kaplı Deney Tüpleri (Becton Dickinson)
Petri Kutuları (Anumbra)
U Tabanlı Mikrotitrasyon Plakları (Nunc)
Spektrofotometre Küvetleri

2.YÖNTEMLER

2.1. Antifungal Duyarlılık Deneyi :

Candida albicans suşunun duyarlılık deneyinde, minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) tayini için tüpte sulandırma yöntemi kullanılmıştır. Muayene materyalinden ayırımı ve tanımlanması için yapılan *Candida albicans* suşunun flukonazol'e karşı duyarlılığı, Yeast Nitrogen Base (YNB) içerisine % 1 glikoz, % 0.15 asparagin ilavesi ile hazırlanmış Buffered Yeast Nitrogen Base (BYNB) besiyerinde yapılmıştır. BYNB'nin pH' ı 0.165 molar Morfolinpropan sülfonik asit (MOPS) tamponu ile 7'ye ayarlanmıştır (3,53,67,73,77).

2.1.1. 0.165 M pH 7 MOPS Tamponu Hazırlanması :

3.453 g MOPS tartılmış 100 ml distile suda çözülmüş ve 10 N NaOH ile pH 7'ye ayarlanmıştır. 0.22 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir (3,73).

2.1.2. Flukonazol Stok Çözeltisinin Hazırlanması :

Aktivitesi % 100 olan flukonazol ham maddesi kullanılmıştır. 10.000 µg/ml lik stok çözelti aşağıdaki formüle göre miktarı tartularak 5 ml dimetil sülfoksit

(DMSO) içinde çözülerek hazırlanmıştır. Stok filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir (3,53).

$$\text{İlaç ağırlığı (mg)} = \frac{\text{İstenen konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) \times \text{çözücü hacmi (ml)}}{\text{İlacın potensi } (\mu\text{g/mg)}}$$

2.1.3. İnokulum Hazırlanması :

Candida albicans suşu üst üste iki kez SDA'a pasaj yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik son pasajdan çapı ≥ 1 mm olan 5 maya kolonisi toplanarak 5 ml steril fizyolojik tuzlu suda süspansiyonu hazırlanmıştır. Süspansiyon 15 saniye vortekste karıştırıldıktan sonra 530 nm'de Mc Farland 0.5 standart tüpünün verdiği absorbans değerine (0.5×10^8 kob/ml) ayarlanmıştır. Maya süspansiyonu BYNB besiyerinde 1/100 ve 1/20 sulandılarak $0.5-2.5 \times 10^3$ koloni oluşturan birim/ml (kob/ml) olacak şekilde hazırlanmıştır (3,53,73).

2.1.4. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tayini :

Flukonazol'un stok çözeltisinin (10.000 $\mu\text{g/ml}$) BYNB besiyerinde 1000 - 0.2 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde 13 tüpte seri sulandırılmaları hazırlanmıştır. Her bir sulandırmadan 0.1 ml tüplere konulmuştur. 14. tüpe % 10'luk DMSO içeren BYNB besiyerinden 0.1 ml, 15. tüpe ise sadece 0.1 ml BYNB besiyeri konularak kontrol tüpleri hazırlanmıştır. Böylece hazırlanan 15 tüpün hepsine 0.9 ml $0.5-2.5 \times 10^3$ kob/ml'ye ayarlanmış maya süspansiyonu eklenmiştir. Tüm tüpler 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, inokulum kontrol tüpü 1/5 oranında sulandırılmış ve bunun spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda verdiği absorbans değerinden daha düşük absorbans veren deney tüpündeki flukonazol konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilmiştir (61,73).

2.2. Flukonazol'un Plazma Konsantrasyonunun Saptanması :

Doz öncesi ve flukonazol (300 mg/oral) verilen gönüllülerden iki saat sonra alınan kandan steril koşullarda ayrılan plazma örneklerinin BYNB besiyeri içinde bir seri sulandırmaları yapılmıştır.

Kontrol serisi olarak, önce her gönüllünün doz öncesi alınan kanından ayrılmış plazması içinde flukonazol'un 500 µg/ml'den 0.09 µg/ml'ye kadar sulandırmaları hazırlanmış ve her bir sulandırımın konsantrasyonu BYNB besiyeri içinde 1/10 seyreltilmiştir.

Ayrıca yalnız BYNB besiyeri içeren bir kontrol tüp deneye alınmıştır.

Bütün serilere *Candida albicans* suşu ($0.5-2.5 \times 10^3$ kob/ml) ilave edilmiş ve seriler 48 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda önce bulanıklık görülmeyen en yüksek sulandırmalardaki tüpler saptanarak kaydedilmiştir. Bilinmeyen plazma örneklerinin üremeyi inhibe eden sulandırım katlarının, bilinen konsantrasyondaki flukonazol içeren plazma örneklerinin üremeyi inhibe eden sulandırım katlarına oranının, bilinen konsantrasyon miktarına çarpımı ile bilinmeyen plazma örneklerindeki flukonazol konsantrasyonu µg/ml olarak hesaplanmıştır (11,46,86).

2.3. Polimorf Nüveli Lökositlerin (PNL) Elde Edilmesi :

21-30 yaş grubu sağlıklı gönüllülere 300 mg flukonazol oral olarak verilmiştir. Doruk plazma seviyesi ilaç alındıktan 1.5-2.5 saat sonra oluşmaktadır. Plazma yarılanma ömrü ise yaklaşık 30 saat sonra meydana gelmektedir (65,76,79). Buna dayanılarak ilaç verildikten iki saat sonra gönüllülerden 20 ml venöz kan, içinde 1.5 mg/ml etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) bulunan silikon kaplı tüplere alınmıştır. Alınan kan 2500 rpm'de 30 dakika çevrilmiştir. İşlem sonrasında tüpün dibine çöken eritrositler ile tüpün üst kısmında bulunan plazma arasında sarımsı beyaz renkte bir tabaka (buffy coat) oluşmaktadır. Bu tabaka pastör pipeti ile alınmıştır. Daha sonra alınan bu tabaka, içinde 2.5 ml Ficoll-Hypaque ve 2.5 ml

polymorphoprep bulunan tüpe konulmuş ve 3000 rpm'de 30 dakika çevrilmiştir (72,87). İşlem sonunda tüpün dibine çöken eritrositler ile en üstteki monosit tabakasının arasında kalan PNL'ler yine pastör pipeti ile alınmıştır. PNL'ler daha sonra 3 kez 2000 rpm'de 3 ml buz soğukluğunda PBS ile yıkanmıştır (45). Son aşamada PNL'ler Ca^{+2} ya da Mg^{+2} içermeyen HBSS ile 5×10^6 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir (4,68).

PNL sayımı Thoma lamında yapılmıştır (9). Bu yöntemle elde edilen lökositlerin % 98-99'u PNL'dir (4,10,60,88).

Aynı işlemler gönüllülerden doz öncesi alınan venöz kan ile tekrarlanmış ve doz sonrası kan ile aynı koşullarda çalışılmıştır.

2.4. Polimorf Nüveli Lökosit (PNL) Canlılık Deneyi :

Bir hacim PNL süspansiyonu, bir hacim % 0.9 serum fizyolojik içinde hazırlanmış % 0.5 tripan mavisi ile eşit oranda karıştırılmıştır. Oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra mikroskop altında boya almayan canlı hücreler sayılmıştır (4).

2.5. Flukonazol'ün Aderens Üzerine Etkisi:

Aderens deneyinde plastik mikrotitrasyon plağı kullanılmıştır. Doz öncesi ve doz sonrası gönüllülerden alınan venöz kandan elde edilen PNL'den 100 µl (5×10^6 /ml) U dipli kuyulara konulmuştur. Daha sonra plak % 5 CO_2 içeren nemli ortamda 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyular HBSS ile yıkanarak yapışmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminden sonra PNL'lerin parçalanması için kuyulara 100 µl soğuk distile su konulmuş ve -20°C'de dondurulup oda ısısında çözündürülmüştür. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Daha sonra PNL'deki protein miktarı Lowry yöntemi ile spektrofotometrede 500 nm'de ölçülmüştür. Alınan absorbans değerleri standart eğriden okunarak protein miktarları µg/ml olarak saptanmıştır (47,74,82).

2.5.1. Lowry Yöntemi ile Protein Ölçümü :

Standart protein eğrisini çizmek için aşağıdaki çözeltiler hazırlanmıştır (47).

2.5.1.a. A Çözeltisi :

2 N NaOH distile suda çözündürülmüştür.

2.5.1.b. B çözeltisi :

% 2 Na₂CO₃

% 1 CuSO₄·5H₂O

% 2 NaKC₄H₄O₆

Distile suda çözündürülmüştür.

2.5.1.c. C çözeltisi :

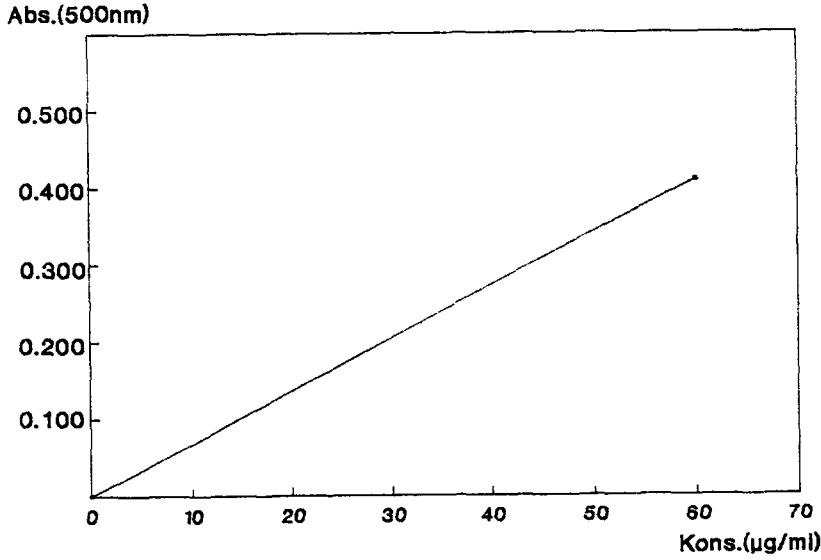
Folin reaktifi eşit oranda distile su ile sulandırılarak taze hazırlanıp kullanılmıştır.

2.5.1.d. Stok Bovin Serum Albumini (BSA) :

Standart protein olarak, konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde distile suda hazırlanmıştır.

2.5.1.e. Standart Protein Eğrisi :

BSA stok çözeltisinden 60,50,40,30,20,10,0 µg/ml olacak şekilde protein konsantrasyonları hazırlanmıştır. Üzerlerine 50 µl A çözeltisi konulmuş ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 1 ml B çözeltisi ilave edilmiş ve karanlıkta 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra 100 µl C çözeltisi hızlı bir şekilde konulmuş ve hemen vortekste karıştırılmış, 37°C'de 30 dakika tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, kör tüpü ile protein konsantrasyonu en düşük olan tüpten başlayarak absorbans değerleri okunmuştur. Standartın sulandırımalarının 500 nm'de spektrofotometrede okunan absorbans ve protein konsantrasyonu değerleri arasında standart protein eğrisi çizilmiştir (47,74) (Şekil 3).



Şekil 3 : Lowry Standart Protein Eğrisi.

2.5.2. Aderens Deneyinin Yapılışı :

Aderensin ne oranda gerçekleştiğini saptamak için, mikrotitrasyon plağında üç kez dondurulup çözündürülen PNL'ler tüplere aktarılmıştır. Doz öncesi ve doz sonrası PNL'lerdeki protein miktarlarına Lowry protein yöntemi uygulanmıştır. Spektrofotometrede 500 nm'de okunduktan sonra alınan absorbans değerleri, standart protein eğrisi ile karşılaştırılarak protein miktarları $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır (47). Her deney iki kez tekrarlanmıştır.

2.6. Flukonazol'ün Kemotaksi Üzerine Etkisi :

PNL'lerin kemotaktik faktöre doğru göçü Nelson ve ark.'nın (57) önerdiği, serum ile opsonize edilmiş zimosan'ın kullanıldığı agaroz altı yöntemi ile ölçülmüştür.

2.6.1. İnaktif Serum Hazırlanması :

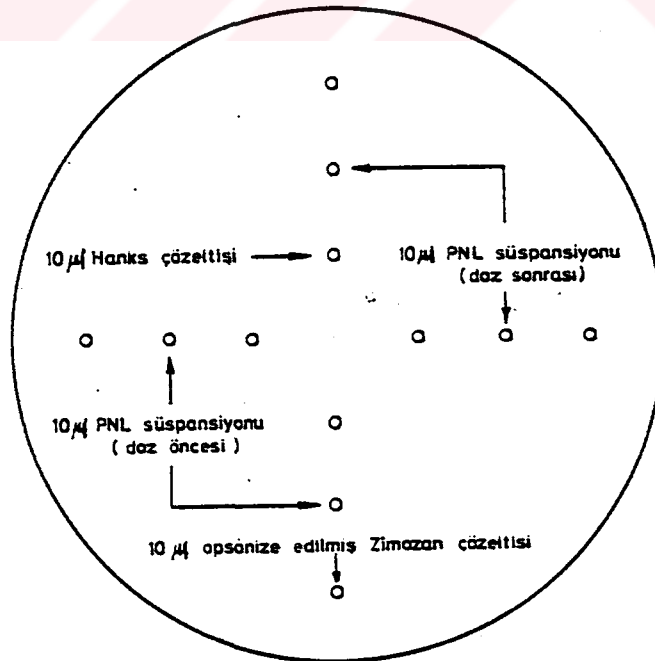
Sağlıklı gönüllülerden 10 ml antikoagülsüz kan alınmıştır. 3000 rpm'de 15 dakika çevrilen kandan ayrılan serum 56 °C'de su banyosunda 30 dakika inaktive edilmiştir (78).

2.6.2. Zimozan Oponizasyonu :

7.5 mg zimozan HBSS ile 2000 rpm'de 10 dakika çevrilerek iki kez yıkanmıştır. Dipte kalan çökeltiyeye 0.5 ml taze insan serumu eklenmiş ve 37 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda opsonize olan zimozan, 2000 rpm'de 10 dakika çevrilerek serumdan uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan çökelti HBSS ile bir kez yıkanmıştır. Daha sonra üzerine 0.5 ml HBSS ilave edilerek homojen bir zimozan süspansiyonu hazırlanmıştır (78).

2.6.3. Agaroz Jelin Hazırlanması :

150 mg agaroz 9 ml distile suda 100 °C'de 10-15 dakika kaynatılarak eritilmiştir. Diğer tarafta 9 ml HBSS, 2 ml % 10 inaktif serum ve 7.5 mg NaHCO₃ karışımı hazırlanmış ve 48 °C'ye getirilmiş agaroz jeli içine karıştırılmıştır. Bu karışım bekletilmeden çapı 60 x 15 mm olan petri kutularına 5 ml konulmuştur. Jel katılaştıktan sonra petri kutuları 4 °C'de 30-60 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda agaroz jelinin üzerinde oluk açıcı kullanılarak dört seri, birbirleri ile 2.4 mm aralık olacak şekilde, 2.4 mm çapında üçlü oluklar açılmıştır (18,57,78)(Şekil 4.).



Şekil 4 : Kemotaksi Deneyinin Şeması.

2.6.4. Kemotaksi Deneyinin Yapılışı :

Petri kutusundaki agaroz üzerine açılan iki seri 2.4 mm çapındaki üç oluğun ortasındaki oluğa, flukonazol ile in vivo karşılaşmış HBSS içindeki PNL süspansiyonundan 10 µl, dıştaki oluğa kemotaktik faktör olarak opsonize edilmiş zimozan çözeltisinden 10 µl, içteki oluğa da kontrol olarak HBSS tamponundan 10µl konulmuştur. Aynı petri kutusunda açılmış olan diğer iki seri 2.4 mm çapındaki üç oluğun ortasındaki oluğa ise 10 µl doz öncesi PNL süspansiyonu (5×10^6 /ml) konulmuştur. Diğer oluklara bir önceki işlemlerin aynısı uygulanmıştır. Daha sonra petri kutuları % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda petri kutularındaki PNL'ler 3 ml metanol ile 30 dakika tespit edilmiştir. Daha sonra 1/10 sulandırılmış Giemsa boyası ile 30 dakika bekletilmiş, distile su ile bir kez yıkanmış ve havada kurutulmuştur (57,78).

Agaroz altında PNL'lerin kemotaktik faktöre göçü 10x büyütme ile mikroskopta incelenmiştir. PNL'lerin kemotaktik faktöre göçü oküler mikrometresi kullanılarak mikroskopta ölçülmüştür (18). Her deney dört kez tekrarlanmıştır.

2.7. Flukonazol'ün Süperoksit Anyonu Oluşumu Üzerine Etkisi :

PNL'ler tarafından oluşturulan süperoksit miktarı Babior ve ark'nın (4) önerdiği, süperoksit dismutaz enzimi inhibisyonu ile sitokrom c'nin indirgenmesi yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (17).

Deney süperoksit dismutaz varlığında ve yokluğunda olmak üzere doz öncesi ve doz sonrası PNL'ler (5×10^6 hücre/ml) ile iki seri çalışılmıştır. Birinci seriye 1.4 ml doz öncesi PNL, ikinci seriye 1.4 ml doz öncesi PNL ve 10 µl süperoksit dismutaz enzimi (3 mg/ml), üçüncü seriye 1.4 ml doz sonrası PNL, dördüncü seriye ise yine 1.4 ml doz sonrası PNL ve 10 µl süperoksit dismutaz enzimi konulmuştur. Seriler 37 °C'de 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda serilere 0.1 ml sitokrom c (30 mg/ml) ve daha önceki deneylerde açıklandığı şekilde hazırlanmış 1.5 ml opsonize zimozan (12 mg) ilave edilmiş ve hızlı bir şekilde karıştırılmıştır. Her karışımdan 1.5 ml kör tüplerine aktarılmış ve

bu tüpler buz içinde saklanmıştır. Diğerleri 37 °C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra tüm seri 3000 rpm' de 20 dakika çevrilerek PNL'ler ve zimozan ortadan kaldırılmıştır. Üst sıvı alınmış ve indirgenen sitokrom c spektrofotometrede 550 nm'de ölçülmüştür. Reaksiyon sonunda oluşan süperoksit miktarı aşağıdaki formül ile hesaplanmış ve sonuçlar nmol süperoksit/10⁶ PNL/30 dakika olarak ifade edilmiştir (4,5,17,20,29,62). Her deney iki kez tekrarlanmıştır.

$$O_2^- \text{ (nmol)} = \text{Absorbans} \times \text{İnkübasyon karışım hacmi (ml.)} \times 47.4$$

2.8. Flukonazol'ün Candida albicans Blastokonidyasının PNL'ler İçinde Ölümüne Etkisi :

Çalışmamızda Alexander ve ark.'nın (2) yöntemi aşağıdaki şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır.

2.8.1. Candida albicans Suşunun Hazırlanması :

Candida albicans'ın sıvı Sabouraud dekstrozu besiyerine (SDB) pasajı yapılmış ve 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bir gün sonra birinci pasajdan yine sıvı Sabouraud besiyerine ikinci bir pasaj yapılmış ve 4 saat 37 °C' de inkübe edilmiştir (85). İnkübasyondan sonra taze hazırlanmış maya süspansiyonu 2000 rpm'de 10 dakika çevrilerek iki kez fizyolojik tuzlu su ile yıkanmıştır. Daha sonra Mc Farland 0.5'e ayarlanmıştır (4,59,64).

2.8.2. Candida albicans'ın Opsonizasyonu :

Mc Farland 0.5'e göre ayarlanan maya süspansiyonu 1/10 insan inaktif serumu ile 37 °C'de 20 dakika opsonize edilmiştir. Daha sonra 3500 rpm'de çevrildikten sonra PBS ile yıkanıp serumdan uzaklaştırılmıştır. Bunu takiben maya süspansiyonu HBSS ile 1 x 10⁷ kob/ml'ye ayarlanmıştır (4,60,68).

2.8.3. *Candida albicans* Blastokonidyasının PNL'ler İçinde Ölümünün Ölçülmesi :

Deney; doz öncesi ve doz sonrası olmak üzere 5 ayrı tüpte (A,B,C,D,E) yapılmıştır.

A Serisi (İn vitro)	PNL' ler (5×10^6 hücre/ml)	+ Flukonazol (12.5µg/ml.)	+ <i>Candida albicans</i> (1×10^7 kob/ ml.)
B Serisi (Doz öncesi)	PNL' ler (5×10^6 hücre/ml)	+ HBSS	+ <i>Candida albicans</i> (1×10^7 kob/ ml.)
C Serisi (İn Vivo) (Doz sonrası)	PNL' ler (5×10^6 hücre/ml)	+ HBSS	+ <i>Candida albicans</i> (1×10^7 kob/ ml)
D Serisi (Kontrol)	Flukonazol (12.5 µg/ml)	+ HBSS	+ <i>Candida albicans</i> (1×10^7 kob/ ml)
E Serisi (Kontrol)	HBSS		+ <i>Candida albicans</i> (1×10^7 kob/ ml)

PNL'ler ve opsonize maya (9:1 oranında) ile plazma konsantrasyonundaki flukonazol'den oluşan fagositoz karışımı 37 °C'de inkübe edilmiştir. Deney sıfır zaman, otuz ve doksan dakikalık süreler içinde yapılmıştır. Sıfır zamanda A, B ve C serilerinin distile suda, D ve E serilerinin ise fizyolojik tuzlu suda 10^{-1} sulandırılmaları yapılmıştır. Bu sulandırılardan 0.1 ml alınıp SDA'a çift ekim yapılmış ve 37 °C' de 48 saat inkübe edildikten sonra maya kolonileri sayılmış ve ortalamaları alınmıştır.

A, B, C serileri otuz ve doksan dakika sonunda santrifüjde 3500 rpm'de 7 dakika çevrilmiş ve buz soğukluğundaki PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama sonrasında üzerlerine 3 ml buz soğukluğunda distile su ilave edilmiş ve vortekste karıştırılmıştır. Daha sonra fizyolojik tuzlu suda 10^{-1} dilüsyonları hazırlanmış ve 0.1 ml alınıp SDA'a çift ekim yapılmıştır. 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra üreyen maya kolonileri sayılmış ve ortalamaları alınmıştır (4,60).

D ve E serilerine ise sıfır zamandaki işlemlerin aynısı uygulanmıştır.

BULGULAR

2.1. Antifungal Duyarlılık Deneyi:

Flukonazol'ün *Candida albicans* (4826) suşuna karşı MİK değeri 0.4 µg/ml olarak bulunmuştur.

2.2. Flukonazol'ün Plazma Konsantrasyonunun Saptanması:

Sağlıklı gönüllüler (n=10) tarafından oral olarak alınan 300 mg flukonazol'ün iki saat sonra ulaştığı plazma konsantrasyonu 12.5 µg/ml olarak saptanmıştır.

2.3,4. PNL'lerin Elde Edilmesi ve Canlılık Deneyi:

Her bir sağlıklı gönüllüden alınan kandan 5×10^6 PNL/ml elde edilmiş ve PNL'lerin canlılık deneyinde canlı PNL sayısı %98'den büyük bulunmuştur.

2.5. Flukonazol'ün Aderens Üzerine Etkisi:

Flukonazol alınmadan (doz öncesi) ve 300 mg flukonazol alındıktan (doz sonrası) iki saat sonra alınan sağlıklı gönüllülerin kanlarından ayrılan PNL'lerin

mikrotitrasyon plağı kuyucuklarındaki protein miktarları Tablo 1' de görülmektedir.

Tablo 1: 300 mg Flukonazol'un insan PNL'lerinin aderensi üzerine etkisi:

Denek No	PNL'lerde Total Protein Miktarları	
	Doz Öncesi	Doz Sonrası
1	37.5	38.2
2	41.5	42.3
3	38.0	38.5
4	49.5	50.2
5	52.1	52.5
6	40.5	41.5
7	51.5	52.0
8	47.5	49.0
9	38.5	40.5
10	46.2	47.1
Aritmetik Ortalama	44.28	45.18
Standart Sapma	± 5.73	± 5.58

t:5.71

P<0.001 (Paired T-Test)

Ortalama protein miktarları doz öncesinde 44.28 ± 5.73 µg/ml, doz sonrasında ise 45.18 ± 5.58 µg/ml olarak bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre 12.5 µg/ml plazma konsantrasyonuna ulaşan 300 mg flukonazol, insan PNL' lerinin aderensini doz öncesine göre anlamlı olarak artırmıştır.(t:5.71, p<0.001 Paired t testi).

2.6. Flukonazol'un Kemotaksi Üzerine Etkisi:

Flukonazol alınmadan (doz öncesi) ve 300 mg flukonazol alındıktan iki saat sonra (doz sonrası) sağlıklı gönüllülerin kanlarından ayrılan PNL'lerin kemotaktik faktöre (zimozan) doğru göçü Tablo 2 ve 3, Resim 1 ve 2'de görülmektedir.

Tablo2: 300 mg Flukonazol'un agaroz altında insan PNL'lerinin kemotaksisi üzerine etkisi.

Denek No:	Agarda Açılan Kuyuların İçeriği (10µl)	A ^a	B ^b	A/B	A-B
1	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	3.5*	1.7*	2.1	1.8
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	3.6	1.6	2.3	2.0
2	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	2.9	1.1	2.6	1.8
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	3.0	1.1	2.7	1.9
3	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	3.3	1.5	2.2	1.8
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	2.8	0.9	3.1	1.9
4	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	3.5	1.7	2.1	1.8
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	3.5	1.7	2.1	1.8
5	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	2.8	1.0	2.8	1.8
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	2.9	1.0	2.9	1.9
6	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	3.4	1.7	2.0	1.7
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	3.5	1.6	2.2	1.9
7	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	2.9	1.1	2.6	1.8
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	2.9	1.0	2.9	1.9
8	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	3.3	1.3	2.5	2.0
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	3.5	1.6	2.2	1.9
9	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	2.9	1.2	2.4	1.7
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	2.8	1.1	2.5	1.7
10	PNL/Zimozan/HBSS Doz Öncesi	3.1	1.3	2.4	1.8
	PNL (300mg Flukonazol)/Zimozan/HBSS Doz Sonrası	3.1	1.2	2.6	1.9

a: Kemotaksi.

b: Spontan göç.

*: 4x Büyütme ile PNL'lerin göç uzaklığının (mm olarak) ölçümü.

A/B: Kemotaktik indeks.

A-B: Kemotaktik fark.

Tablo 3: Kemotaktik İndeks ve Kemotaktik fark aritmetik ortalamaları:

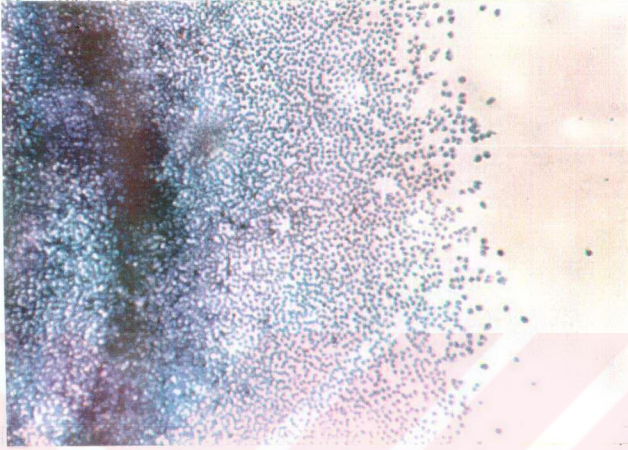
Paired t-Test		Aritmetik Ortalama	Standart Sapma
A/B	Doz Öncesi	2.37	± 0.26
	Doz Sonrası	2.55	± 0.34
t:1.89 p>0.05			
A-B	Doz Öncesi	1.80	± 0.08
	Doz Sonrası	1.88	± 0.07
t:2.75 p<0.05			

Kemotaktik indeks ortalaması doz öncesinde 2.37 ± 0.26 mm, doz sonrasında 2.55 ± 0.34 mm olarak ölçülmüştür (t :1.89, $p>0.05$ Paired t testi).

Kemotaktik fark ortalaması doz öncesinde 1.80 ± 0.08 mm, doz sonrasında 1.88 ± 0.07 mm olarak ölçülmüştür (t:2.75, $p<0.05$ Paired t testi).



Resim 1: Doz öncesi PNL'lerin kemotaktik faktöre (Zimozan) doğru göçü (İki saat içinde).



Resim 2: Doz sonrası (Flukonazol 300 mg/oral) PNL'lerin kemotaktik faktöre (Zimozan) doğru göçü (İki saat içinde).

Deney sonuçları, 12.5 µg/ml plazma konsantrasyonuna ulaşan 300 mg flukonazol ile in vivo koşullarda etkilenen insan PNL'lerinin kemotaktik faktöre (Zimozan) doğru göçü ile doz öncesi insan PNL'lerinin kemotaktik faktöre (Zimozan) doğru göçü arasında anlamlı bir fark bulunmadığını göstermektedir.

2.7. Flukonazol'ün Süperoksit Anyonu Oluşumu Üzerine Etkisi:

Flukonazol alınmadan (doz öncesi), 300 mg flukonazol alındıktan iki saat sonra (doz sonrası) sağlıklı gönüllülerin kanlarından ayrılan PNL'lerin, süperoksit dismutaz enzimi ve opsonize zimozan varlığında oluşturduğu süperoksit anyonu miktarları Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4: 300 mg Flukonazol'ün insan PNL'lerinin süperoksit anyonu oluşturmaya üzerine etkisi:

Denek No	Süperoksit anyonu (nmol/10 ⁶ PNL/30dakika)	
	Doz Öncesi	Doz Sonrası
1	10.1265	11.2405
2	14.1530	14.2165
3	13.4800	14.0120
4	12.1315	12.4108
5	11.1218	12.0001
6	12.3560	12.4128
7	13.9182	13.9888
8	11.4358	11.8570
9	12.6870	12.6135
10	13.8252	13.5210
Aritmetik Ortalama	12.5235	12.8273
Standart Sapma	± 1.346	± 1.038

t:2.186

p>0.05 (Paired T-Test)

Doz öncesi süperoksit anyonu ortalaması 12.5235 ± 1.346 nmol/10⁶ PNL/30 dakika, doz sonrası süperoksit anyonu ortalaması 12.8273 ± 1.038 nmol/10⁶ PNL/30 dakika olarak saptanmıştır (t:2.186, p> 0.05 Paired t testi).

Deney sonuçları, oral alındıktan iki saat sonra 12.5 µg/ml plazma konsantrasyonuna ulaşan 300 mg flukonazol'ün insan PNL'lerinin süperoksit anyonu oluşturmalarını etkilemediğini göstermektedir.

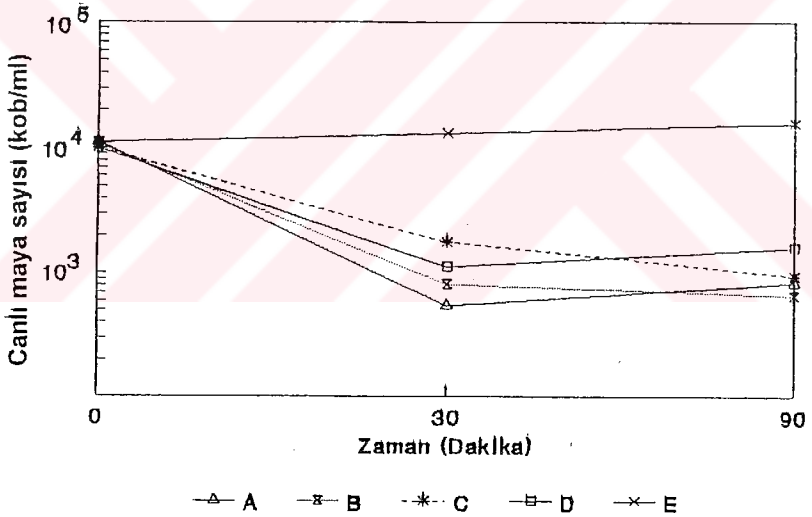
2.8. Flukonazol'ün *Candida albicans* Blastokonidiasının PNL'ler İçinde Ölümüne Etkisi:

Oral alındıktan iki saat sonra 12.5 µg/ml plazma konsantrasyonuna ulaşan flukonazol'ün sıfır zaman, otuz ve doksan dakikalık temas süreleri sonunda *Candida albicans* blastokonidiasının PNL'ler tarafından öldürülmesinin, in vitro (A), in vivo (C) ve doz öncesi (B) aynı koşullarda yapılan deneylerde istatistiksel bakımdan anlamlı sonuç verdiği gözlemlenmiştir (Tablo 5, Şekil 5, Resim 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Tablo 5: *Candida albicans* blastokonidyasının PNL'ler içinde ölümü üzerine 300 mg flukonazol'ün etkisi.

Zaman (dakika)		A	B	C	D	E
0	Aritmetik Ortalama Standart Sapma	11.27×10^4 ± 0.85	10.08×10^4 ± 0.73	9.95×10^4 ± 0.78	10.01×10^4 ± 0.97	11.01×10^4 ± 0.36
		* F: 341.25 p>0.05				
30	Aritmetik Ortalama Standart Sapma	5.52×10^3 ± 1.28	8.1×10^3 ± 1.93	17.58×10^3 ± 1.51	11.22×10^3 ± 1.96	131.46×10^3 ± 4.16
		F: 260.78 p<0.0001				
90	Aritmetik Ortalama Standart Sapma	8.31×10^3 ± 1.59	6.57×10^3 ± 1.45	9.51×10^3 ± 1.53	15.9×10^3 ± 2.69	157.53×10^3 ± 2.14
		F: 2736.8 p<0.0001				

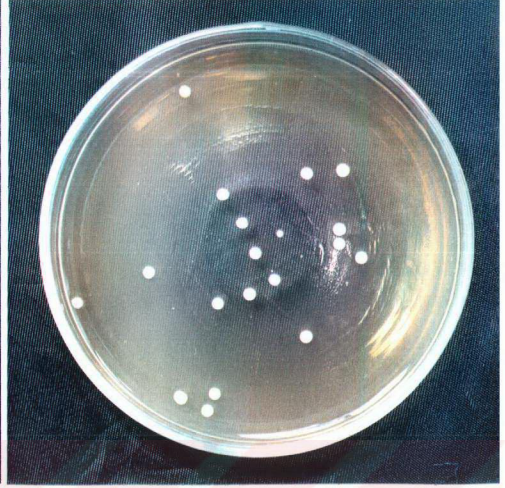
* Eşlendirilmiş veriler için ANOVA testi.



Şekil 5: *Candida albicans* blastokonidyasının PNL'ler içinde ölümü üzerine 300 mg flukonazol'ün etkisi.



Resim 3: A serisi 0 zaman.



Resim 4: A serisi 30 dakika.



Resim 5: A serisi 90 dakika.

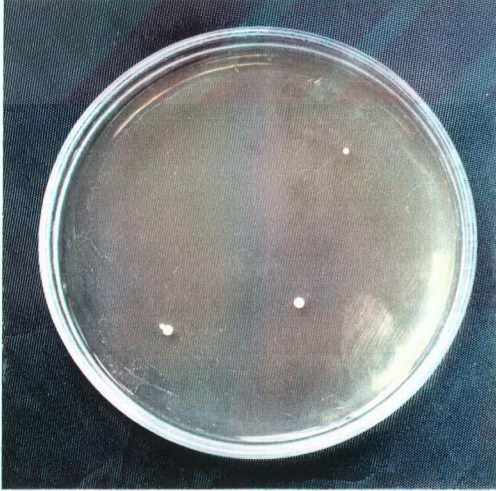
Resim 3,4,5: PNL'ler tarafından *Candida albicans*'ın hücre içi ölümü üzerine flukonazol'ün in vitro etkisi



Resim 6: B serisi 0 zaman.



Resim 7: B serisi 30 dakika.



Resim 8: B serisi 90 dakika.

Resim 6,7,8: PNL'ler tarafından *Candida albicans*'ın hücre içi ölümü üzerine flukonazol'ün doz öncesi etkisi



Resim 9: C serisi 0 zaman.



Resim 10: C serisi 30 dakika.



Resim 11: C serisi 90 dakika.

Resim 9,10,11: PNL'ler tarafından *Candida albicans*'in hücre içi ölümü üzerine flukonazol'un in vivo etkisi

Sfır zamanda ve otuz dakika etkileşim sonunda, in vitro (A) deney koşullarında canlı maya sayısı ortalamaları $112.7 \times 10^3 \pm 0.85$ kob/ml ve $5.52 \times 10^3 \pm 1.28$ kob/ml olarak, in vivo (C) deney koşullarında canlı maya sayısı ortalamaları 99.5×10^3 kob/ml ve $17.58 \times 10^3 \pm 1.51$ kob/ml ve doz öncesi (B) deney koşullarında canlı maya sayısı ortalamaları $100.8 \times 10^3 \pm 0.73$ kob/ml ve $8.1 \times 10^3 \pm 1.93$ kob/ml olarak sayılmıştır (F: 260.78, $p < 0.0001$ Eşlendirilmiş veriler için ANOVA testi).

Sfır zamanda ve doksan dakika etkileşim sonunda ise; in vitro (A) deney koşullarında canlı maya sayısı ortalamaları $112.7 \times 10^3 \pm 0.85$ kob/ml ve $8.31 \times 10^3 \pm 1.59$ kob/ml olarak, in vivo (C) deney koşullarında canlı maya sayısı ortalamaları $99.5 \times 10^3 \pm 0.78$ kob/ml ve $9.51 \times 10^3 \pm 1.53$ kob/ml ve doz öncesi (B) deney koşullarında canlı maya sayısı $100.8 \times 10^3 \pm 0.73$ kob/ml ve $6.57 \times 10^3 \pm 1.45$ kob/ml olarak sayılmıştır (F: 2736.8, $p < 0.0001$ Eşlendirilmiş veriler için ANOVA testi).

Deney sonuçlarına göre; otuz dakika etkileşim sonunda in vitro (A) deney koşullarında PNL'lerin hücre içi öldürme oranı % 95 bulunurken, doz sonrası in vivo (C) deney koşullarında % 82, doz öncesi (B) deney koşullarında ise % 92 olarak bulunmuştur.

Doksan dakika etkileşim sonunda ise in vitro (A) deney koşullarında PNL'lerin hücre içi öldürme oranı % 93, in vivo (C) deney koşullarında % 90.5 ve doz öncesi (B) deney koşullarında ise % 93.5 olarak bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre, doksan dakika etkileşim sonunda in vitro (A) deney koşullarında hücre içi öldürme yüzdesi, in vivo (C) deney koşullarına oranla az bir farkla in vitro (A) lehine aykırılık göstermesine karşın, doz öncesi (B) PNL'lerin hücre içi ölüm yüzdesi ile birbirine yakın bulunmuştur.

Ayrıca kontrol olarak, PNL yokluğunda flukonazol'un *Candida albicans* üzerine etkisi (D) ve flukonazol yokluğunda *Candida albicans* üremesi (E) sfır zamanda, otuzuncu ve doksanncı dakikalarda anlamlı sonuçlar göstermiştir (Tablo 5, Resim 12,13,14,15,16,17).



Resim 12: D serisi 0 zaman.



Resim 13: D serisi 30 dakika.



Resim 14: D serisi 90 dakika.

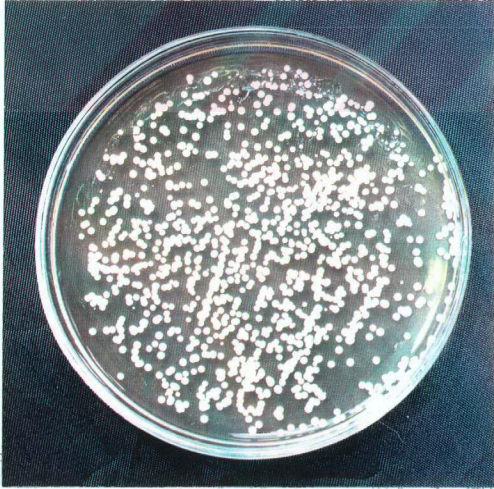
Resim 12,13,14: PNL yokluğunda flukonazol'un Candida albicans üzerine etkisi.



Resim 15: E serisi 0 zaman.



Resim 16: E serisi 30 dakika.



Resim 17: E serisi 90 dakika.

Resim 15,16,17: Flukonazol yokluğunda *Candida albicans* üremesi.

Flukonazol'un 300 mg'lık dozu, otuz dakika etkileşimden sonra, insan PNL'leri tarafından *Candida albicans* 'ın hücre içi ölümünü in vitro (A) koşullarda, doz öncesi (B) ve PNL yokluğunda flukonazol'un *Candida albicans* üzerine etkisine (D) göre daha fazla artırmıştır. Doksanıncı dakikada ise in vitro (A) etki ile doz öncesi (B) etki arasında belirgin bir fark bulunmamasına karşın, PNL yokluğunda flukonazol'un *Candida albicans* üzerine etkisine (D) göre in vitro (A) ilaç etkisinin PNL'ler ile beraber olduğunda *Candida albicans* 'ın hücre içi ölümü üzerine daha etkili olduğu görülmektedir.

İn vivo (C) koşullarda ise otuzuncu ve doksanıncı dakikada PNL'ler tarafından *Candida albicans* 'ın hücre içi ölümü arttığı halde, flukonazol'un in vitro (A) ve doz öncesi (B) koşullarda PNL'lerin *Candida albicans* 'ın hücre içi ölümünü daha fazla artırdığı görülmüştür.

Bu sonuçlara göre; flukonazol'un 300 mg'lık oral dozu, in vitro koşullarda insan PNL'leri tarafından *Candida albicans* 'ın hücre içi ölümünü in vivo koşullara göre daha fazla artırmıştır.

TARTIŞMA

İnfeksiyon etkeni olan bir mikroorganizma vücuda girdiğinde konağın immün sistemi harekete geçer. Bu amaçla vücudun immün sistem hücreleri; nötrofiller, mononükleer fagositik hücreler, antikor oluşturan B lenfositleri hücrel bağışıklığın yapı taşları olan T lenfositleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve antikora bağımlı hücrel sitotoksiste de rol oynayan hücreler, birbiri arasında meydana gelen karmaşık bir etkileşim mekanizması ile yabancı etkeni yıkıma uğrattırır (35,41).

Canlının mikroorganizmaya karşı verdiği bu savaşta mikroorganizmanın üstesinden bir an önce gelebilmek için kemoterapötik maddelerin hastaya verilmeleri 19 cu yüzyılın sonuna dek uzanan bir uygulamadır (35,41).

Patojen mikroorganizmaların üremelerini engelleyerek ya da onları direkt öldürerek etki eden kemoterapötik maddelerin yararlarının yanında, bunların konak üzerinde toksik ve allerjik reaksiyonlar gibi yan etkilerinin de olduğu anlaşılmıştır (35,41).

Daha sonra 1950'li yıllara gelindiğinde, bu kemoterapötik maddelerin kemik iliğine toksiste gibi direkt etkilerinin yanında, hastanın kendi immün sistemini de olumlu ya da olumsuz yönde etkilediği fark edilmiştir (35,41).

Bazı bilim adamları kemoterapi uygulanan hastalarda immün yanıtın zayıflamasını, erken kemoterapi uygulaması sonucu, immün sistemin yeterli derecede uyarılmamasına bağlamışlardır (35,41).

Diğer bir grup araştırmacı ise; in vitro koşullarda mikroorganizmaya etkili ve serumda yeterli düzeye ulaşan antimikrobiklerin profilaksi ve tedavi amacı ile kullanılmaları sonucu hastada enfeksiyon tablosunun devam etmesini, kemoterapinin hastanın immün sistemi üzerine olumsuz etkisinden kaynaklanabileceğini savunmuşlardır. Bu grup araştırmacılar optimal kemoterapi etkilerinin sağlıklı immün sistemi olan hastalarda ortaya çıkabildiğini; bu olumsuz etkinin yalnız immün yetmezlik tablosu gösteren hastalarda görülmediğini klinik çalışmalarla göstermişlerdir (6).

Candida ve aspergillus türleri nötrojenik kanser hastalarında yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan baskın mantar patojenleridir. Polimorf nüveli lökositler fırsatçı mantarlara karşı konak savunmasının önemli bileşenlerinden olduğu için işlevlerinin üzerinde herhangi bir baskılama bu tip enfeksiyonlara karşı konağın denetleme yeteneğini kötüleştirebilir. Sıklıkla kullanılan bir dizi ilaç; antineoplastikler, analjezikler ve antibiyotikler dahil PNL işlevlerini etkilerler. Bir dizi ilacın etkisi araştırıldığı halde antifungal ilaçlarla ilgili veriler kısıtlıdır (30,68).

Amfoterisin B poliyen grubu bir antibiyotiktir. Yaklaşık otuz yıldır antifungal tedavide köşe taşıdır. Daha sonra geliştirilen diğer antifungal ilaçlardan bazıları immün sistemi baskılanmış hastalarda kullanılabilir. Bunlar arasında 5-flusitosin, mikonazol, flukonazol, ketokonazol, itraconazol, silofungin (LY 121019) ve Sch-39304 gelmektedir (68).

Antifungal azoller terapötik dozlarda fungisidal olmaktan çok fungostatiktir. Bu nedenle antifungal ilaçların tek başına konak savunma sisteminde negatif etki oluşturmadığına güvenilebilir ise de bu konuda ileri çalışmalar gerekmektedir (68).

Genel olarak baskılayıcı özellikleri ağır basan antifungallerin ne oranda patolojik bozukluklara neden oldukları son yıllarda in vitro araştırmalarla aydın-

latılmaya çalışılmaktadır. Bu konuda araştırmalar yoğunlaştırılmalı, antifungal ilaçların in vivo da etkisi hiç olmazsa deneysel çalışmalarla da aydınlatılmalıdır (6).

Bu çalışmada, sağlıklı gönüllülere oral verilen 300 mg flukonazol'un 2 saat sonra ulaştığı doruk plazma konsantrasyonu olan 12.5 g/ml ilaç konsantrasyonunun, insan PNL fonksiyonları (aderens, kemotaksi, süperoksit anyonu oluşumu ve *Candida albicans*'ın hücre içi ölümü) zerine olumsuz bir etki göstermediği saptanmıştır.

Mayaların in vitro duyarlılık testlerinde seçilecek besiyerinin mayaların iyi üremesine elverişli olması ve denenecek antifungal ile etkileşmemesi ve ayrıca tekrarlanabilir sonuçlara olanak sağlaması gerekmektedir (32). Odds (58), imidazol grubu antifungaller ile yapılan duyarlılık çalışmalarında YNB besiyerinde çok fazla değişkenlik görülmediğini savunmuştur. Bu bilgilerin işığında tamponlanmış YNB besiyeri kullanılarak flukonazol'un *Candida albicans*'a karşı MİK değeri 0.4 g/ml olarak bulunmuştur. Kaynaklarda kandida türlerinin flukonazol için duyarlılık/dirençlilik sınırlarını kesin olarak veren bir bildiriye rastlanmamıştır (90). Rogers ve ark.'ı (67) *Candida albicans* suşları için flukonazol'un MİK "etki aralığı"nı 0.125-0.5 g/ml, Dermoumi (22), 0.125->128 g/ml, Morace ve ark.'ı (54), 0.04-12.5 g/ml, Martin ve ark.'ı (50) ise bu değeri 0.05-25 g/ml olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda incelediğimiz *Candida albicans* suşu flukonazol'e duyarlı kabul edilmiştir.

Çalışmamızda 300 mg flukonazol'un insanda iki saat sonunda ulaştığı plazma konsantrasyonu 12.5 g/ml olarak bulunmuştur. Bu amaç için kullanılan yöntemler genelde antibiyotik duyarlılık testlerinin temel ilke ve işlemlerine benzer olduğundan kullanılan mikroorganizmanın üremesini inhibe eden sulandırıcıları karşılaştırmakla aranan plazmanın fungostatik etkisini de hesaba katarak bu sonuca varılmıştır. Ripa ve ark.'ı (65), 150 mg flukonazol'un oral alındıktan 2.5 saat sonra High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ile saptadıkları plazma konsantrasyonunu uygulanan yöntemler farklı olmasına karşın bizim bulgularımıza yakın değerlerde bulmuşlardır.

Tucker ve ark.'ı (79), kalın tabakalı agarda diffüzyon yöntemi ile, 100 mg flukonazol'ün 2 saat sonra ulaştığı plazma konsantrasyonunu, bizim çalışmamızdaki 300 mg flukonazol'ün plazma konsantrasyonundan aşağı yukarı üç katı daha az değerde bulmuşlardır. Kaynaklarda verilen bu bilgiler bizim çalışmamızda kullandığımız yöntem ve verileri destekler görünmektedir.

Çalışmamızda saptadığımız 12.5 µg/ml plazma konsantrasyonu, daha önce saptadığımız MİK değerinin yaklaşık olarak otuz katına eşdeğer bir konsantrasyondur. Bazı araştırmacılar PNL'ler üzerinde yaptıkları çalışmalarda, 5-20 µg/ml konsantrasyonda flukonazol'ün, *Candida albicans* suşuna karşı MİK değerinden 10 - 40 kez daha yüksek konsantrasyonlar olduğunu ve flukonazol ile tedavi gören hastaların serum düzeyleri ile uygunluk gösterdiğini saptamışlardır (89). Bizim çalışmamızda plazma konsantrasyonunun MİK değerinin 30 katı olması olumlu bir bulgudur.

Çalışmamızda 12.5 µg/ml plazma konsantrasyonu sağlayan 300 mg flukonazol, insan PNL'lerinin aderensini doz öncesine göre anlamlı olarak artırmıştır. Flukonazol'ün PNL'lerin plastik yüzeye aderensine etkisi ile ilgili herhangi bir kaynağa rastlanmamıştır. Sonuçlar flukonazol'ün PNL aderensini artırmada olumlu bir rol aldığını göstermektedir. Antifungal ilaçların çoğu, normal tedavi edici dozda, fagositik hücre fonksiyonları yönünden genelde etkili tedavi sağlar. Böylece PNL'lerin aderensinin artmasında ilaçla uyarılan PNL fonksiyonlarının modifikasyonunun belirli bir etkisi olabilir (39,82).

Van der Auwera ve ark.'ı (82), in vitro çalışmalarında silofungin'in ≥ 20 µg/ml konsantrasyonlarında, PNL'lerin plastik yüzeye aderensini artırdığını, amfoterisin B-deoksikolat ve amfoterisin B'nin ise 6 ve >20 µg/ml konsantrasyonlarda PNL'lerin plastik yüzeye aderensini azalttığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda 12.5 µg/ml plazma konsantrasyonuna ulaşan 300 mg flukonazol'den in vivo koşullarda etkilenen PNL'lerin kemotaktik faktöre (zimozan) doğru göçü ile doz öncesi PNL'lerin kemotaktik faktöre doğru göçü arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Roilides ve ark.'ı (68), terapötik dozlarda flukonazol'un kemotaksi üzerine tutarlı bir etki yapmadığını in vitro deneylerle göstermişlerdir. Bu sonuçlar bizim in vivo çalışmamızı desteklemektedir. Aynı araştırmacılar bir azol türeviden olan ketokonazol'un insan fagositik hücrelerinin kemotaksisi üzerine ya baskılayıcı etki gösterdiğini ya da etkisiz kaldığını, ketokonazol'un $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ dozlarının ise kemotaksisi anlamlı olarak artırdığını bildirmişlerdir. Marmar ve ark.'ıda (49), yaptıkları çalışmada aynı verileri bulmuşlardır.

Azoller dışındaki diğer antifungal ilaçlardan; Amfoterisin B'nin $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kemotaksi üzerine olumsuz etki yaparak kemotaksisi anlamlı biçimde azalttığı, 5-flusitosin'in ve silofungin'in ise terapötik dozlarda kemotaksi üzerine bir etki yapmadığı gösterilmiştir (68).

Bu etraflı çalışmalar, Amfoterisin B, 5-flusitosin, silofungin ve azol grubu antifungal ilaçların (ketokonazol, flukonazol gibi) güvenle erişilebilen serum konsantrasyonunda, in vitro PNL fonksiyonlarını baskılamadığını, hatta PNL fonksiyonlarını seçici olarak artırabileceğini göstermektedir (68).

Davies ve ark.'ı (21), birçok antifungal ilacın PNL kemotaksisi üzerine etkilerini incelemişler, griseofulvin, klotrimazol, ekonazol, ketokonazol, mikonazol'un $1 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda PNL'lerin göçünü anlamlı olarak azalttığını göstermişlerdir. Bir grup araştırmacı ise griseofulvin'in $0.1 \mu\text{g/ml}$ ve $1 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunun kemotaksisi inhibe ettiğini, $3.1 \mu\text{g/ml}$ ile $50 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda etkisiz olduğunu, 5-flusitosin'in $1-100 \mu\text{g/ml}$, mikonazol'un $0.4-50 \mu\text{g/ml}$, nistatin'in $0.8-100 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda kemotaksisi etkilemediğini göstermişlerdir.

İn vitro çalışmalara bakıldığında, normal serum düzeyinde birçok antimikrobiğin kemotaksi üzerine etkisinin bulunmadığı görülmektedir. Bir grup antimikrobik ilacın yüksek konsantrasyonları PNL'lerin göçünü inhibe ederken, bazı antimikrobiklerin tedavi dozunun PNL'lerin göçünü inhibe ettiği ve yüksek konsantrasyonda ise PNL'lerin göçünü artırdığı gösterilmiştir (41).

İn vivo çalışmalarda da; bazı antimikrobiklerin tedavi dozunun gönüllülerin lökosit kemotaksisini % 50 oranında inhibe ettiği ya da etkilemediği ve ayrıca kemotaksiyi de artırdığı gösterilmiştir (6).

PNL fonksiyonları bozuk olan bazı hastalarda antimikrobik ilaç uygulamasından sonra, hasta PNL'lerinin kemotaksi fonksiyonunun düzeldiği görülmüştür (41).

Bir çok antifungal ilacın kemotaksi üzerine etkisi incelenmiştir. Ancak incelenen antifungal ilaçların kemotaksi üzerine etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemektedir (41). Bazı ilaçların Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarına bağlanarak kemotaksiyi inhibe ettiği sanılmaktadır (84).

Daha önce söz edildiği gibi, antifungal ilaçlardan amfoterisin B'nin düşük konsantrasyonlarda (2µg/ml) bile kemotaksiyi inhibe ettiği, mikonazol, griseofulvin ve nistatin'in ise inhibisyon özelliğinin bulunmadığı gösterilmiştir (41).

Antifungal ilaçların PNL'lerin kemotaksisi üzerine bu tür etkileri, bunların hücre zarına afiniteleri ile açıklanabilir. Örneğin amfoterisin B, nistatin ve diğer poliyen antibiyotikler hücre zarındaki sterollere afinite gösterirler (58).

PNL'lerin kemotaksisi, kemotaktik faktörlerin PNL'lerin yüksek afiniteli özel reseptörlere bağlanması ile başladığından reseptör afinitesini azaltan antifungal ilaç konsantrasyonlarının kemotaksiyi engellediğini söyleyebiliriz. Ancak in vitro koşullarda kemotaksinin inhibe edilmesinin gösterilmesi, çoğu çalışmalarda in vivo koşullarda gösterilmemiş ya da çelişkili sonuçlar alınmıştır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi immün sistemi normal şekilde işleyen sağlıklı gönüllülerde ve ayrıca sağlıklı deney hayvanlarında in vivo koşullarda antimikrobik ilaçların immün sistem hücre fonksiyonları üzerine etkilerini araştıran ek çalışmalara gereksinim vardır.

Çalışmamızda 12.5 µg/ml plazma konsantrasyonuna ulaşan 300 mg flukonazol ile in vivo koşullarda etkileşime giren PNL'lerin süperoksit dismutaz

enzimi ve opsonize zimozan varlığında, süperoksit anyonu oluşturmaları üzerine flukonazol'un etkisiz olduğu görülmüştür.

Kemotaksiyi inhibe eden amfoterisin B konsantrasyonunun ($2\mu\text{g/ml}$) O_2^- salınımını azaltmadığı bildirilmiştir (68).

Roilides ve ark.'ı (68), $>5\ \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda amfoterisin B'nin O_2^- salınımını azalttığını yaptıkları çalışmalarla göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, yeni bir triazol olan Sch-39304'ün $0.5 - 1\ \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda O_2^- salınımını artırdığını bulmuşlardır. Bu konsantrasyon terapötik doz olmasına karşın bizim çalışmamızda terapötik dozda flukonazol O_2^- salınımını artırmamıştır. Daha ileri çalışmalarda Sch-39304'ün içinde çözündüğü maddenin kendisinin O_2^- salınımını artırdığı görülerek bu fikir çürütülmüştür. Bu bulgular triazol grubu antifungal ilaçların, terapötik dozlarda O_2^- salınımı üzerine etkisiz kaldığını bir kez daha vurgulamaktadır. Yine aynı araştırmacı grubu tarafından yapılan bir çalışmada, ketokonazol, 5-flusitosin ve silofünjin'in O_2^- salınımı üzerine belirli etkileri olmadığı gösterilmiştir.

Van der Auwera ve ark.'ı (83), silofünjin'in $25\ \mu\text{g/ml}$ gibi yüksek konsantrasyonda O_2^- salınımını anlamlı olarak inhibe ettiğini in vitro çalışmalarla göstermişlerdir. Bazı araştırmacılar tarafından O_2^- salınımı üzerine baskılayıcı etkinin, antifungal ilaçların PNL'lerdeki sterollere bağlanmasına bağlı hücre zarı harabiyesinin sonucu olduğu savunulmaktadır (54,68).

Çalışmamızda, $12.5\ \mu\text{g/ml}$ plazma konsantrasyonuna ulaşan $300\ \text{mg}$ flukonazol'un in vitro deney koşullarında insan PNL'leri tarafından *Candida albicans*'in hücre içi ölümünü, otuz ve doksan dakika sonra in vivo koşullara göre daha çok artırdığı görülmüştür.

Wildfeuer ve ark.'ı (89), yaptıkları çalışmada, flukonazol ile tedavi edilen hastaların serum düzeylerine karşılık gelen ve *Candida albicans* suşunun $10 - 40$ katı MİK değeri olan ($5-20\ \mu\text{g/ml}$) flukonazol'un PNL'ler üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu konsantrasyonlardaki flukonazol'un 2 ve 4 saat sonra insan PNL'leri tarafından *Candida albicans* blastosporlarının hücre içi ölümünü anlamlı

PNL'leri tarafından *Candida albicans* blastosporlarının hücre içi ölümünü anlamlı olarak artırmadığını, ancak flukonazol'un 5,10,20 µg/ml konsantrasyonlarının PNL'ler içindeki blastosporların yapısını bozarak blastosporlardan çimlenme borusu oluşumunu anlamlı olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada flukonazol'un ve konak fagositlerinin (PNL ve makrofajlar) hücre içindeki *Candida albicans* canlılığını azaltmada, sinerjistik rol oynadığı gösterilmektedir. Bizim çalışmamızda ise; flukonazol'un 300 mg oral dozu *Candida albicans* suşunun 0.4 µg/ml olan MİK değerinden yaklaşık 30 katı daha yüksek bulunan 12.5 µg/ml plazma konsantrasyonuna karşılık gelmiştir. Flukonazol'un bu dozu PNL ve *Candida albicans* ile otuz ve doksan dakika etkileşim sonunda, in vitro (A) koşullarda insan PNL'leri tarafından *Candida albicans* 'ın hücre içi ölümü, doz öncesine (B) oranla daha fazla olmuştur. Bu sonuçlar, 12.5 µg/ml flukonazol'un *Candida albicans* üzerine direkt etkisi (D) ile karşılaştırıldığında, insan PNL'lerinin flukonazol ile birlikte *Candida albicans* 'ın hücre içi ölümüne sinerjistik etki ettiği görülmektedir. Bulgularımız Wildfeuer ve ark.'ının (89), yaptıkları çalışmayla uygunluk göstermektedir.

İn vivo (C) koşullarda ise; flukonazol'un aynı dozu, PNL ve *Candida albicans* ile otuz ve doksan dakika etkileşim sonunda, in vitro (A) ve doz öncesi (B) etkiye oranla daha az etkili bulunmuştur. Ancak in vivo (C) etki, PNL yokluğunda flukonazol'un *Candida albicans* üzerine etkisi (D) ile karşılaştırıldığında ilk otuz dakika sonunda azalırken, doksan dakika sonunda artmaktadır. Bu artışın tedavi dozundaki ilacın immünoadjuvan kimyasal özellikleri yüzünden olabileceği ileri sürülmektedir (68). İn vitro ve in vivo deney sonuçları arasındaki çelişkili bulgularımız, birçok araştırmacı tarafından yapılmış aynı tarzdaki çalışmalar ile uygunluk göstermektedir. Bu bilgiler ışığı altında flukonazol'un tedavi dozunda kullanımının lokal ya da sistemik mantar infeksiyonlarının kontrolünde, konak savunma mekanizmasını destekleyici bir rolü olduğu söylenebilir.

Bir azol türevi olan ketokonazol ile bir triazol olan itrakonazol'un bu ilaçlarla tedavi olmuş hasta serumlarında bulunan konsantrasyonlara karşılık gelen dozlarının, PNL'ler tarafından *Candida albicans*'ın hücre içi ölümüne ya da fagositöz üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. (39).

Farkas ve ark'ı (28), ketokonazol (1-6 µg/ml) ve PNL arasındaki sinerjizmi in vitro koşullarda çalışmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında ketokonazol'un PNL fonksiyonlarını etkilemediği halde hücre içi ölümü doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde artırdığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar imidazol türevlerinin immüno-modülatör etkisinin olmadığını, ancak antifungal etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Senior ve ark'ı (71), flukonazol'un 5-20 µg/ml terapötik dozlarının PNL fonksiyonlarını etkilemediğini in vitro deneylerle göstermişlerdir.

Roilides ve ark.'ı (68), yaptıkları çalışmada ketokonazol'un 5 µg/ml konsantrasyonda, Sch-39304'ün 1-5 µg/ml gibi düşük tedavi konsantrasyonlarında PNL'ler tarafından *Candida albicans*'ın hücre içi ölümünü artırdığını, amfoterisin B'nin >5 µg/ml konsantrasyonda ise fagositozu anlamlı olarak azalttığını göstermişlerdir.

Aynı araştırmacılar Sch-39304 ve silofüging'in 25-100 µg/ml gibi çok yüksek konsantrasyonlarda, PNL'lerin *Candida albicans*'ın hücre içi ölümü üzerine olumsuz bir etki yaptığını göstermişlerdir. Buna karşın tedavi dozundaki silofüging ve 5-flusitosin'in PNL fonksiyonlarına karışmadığını bulmuşlardır.

Amfoterisin B'nin PNL'lerin *Candida albicans*'ın hücre içi ölümünü doza bağlı olarak artırdığı ve bu artışın tedavi dozundaki ilacın immünoadjuvant ve kimyasal özelliklerinden ileri gelebileceği bildirilmektedir (68).

Marmer ve ark.'ı (49) 1-2 µg/ml tedavi dozunda amfoterisin B'nin fagositozu inhibe ettiğini savunurken; Björkstén ve ark.'ı (12) ise 20 µg/ml gibi çok yüksek konsantrasyonda amfoterisin B'nin fagositozu inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Fagositoz olayına antimikrobiklerin etkisini inceleyen bir çok çalışma yapılmıştır ve alınan sonuçlar çelişkilidir. Çalışmalara bakıldığında aynı gruptaki bazı antimikrobiklerin fagositozu etkilemediği görülürken, aynı gruptan bazılarının fagositoz üzerine etkisinde çelişkili sonuçlar alınmıştır. Yüksek doz bazı

in vivo ve in vitro sonuçlarında fagositoza etki etmediği ya da inhibe ettiği gösterilmiştir (41).

Yukarıda bildirilen çalışmalardan da görüldüğü gibi antimikrobiklerin fagositoz olayına etkisinde heterojen bulgularla karşılaşmaktadır. Bu bulgular, antimikrobiklerin fagositoz olayına etkisinin antibiyotiklerin etki mekanizmasına ve kimyasal grubuna bağlı olmadığını göstermektedir. Aynı antimikrobik deney koşullarına bağlı olarak tamamen çelişkili sonuçlar da verebilmektedir.

PNL'ler *Candida albicans*'a karşı konak savunmasının ilk basamağını oluşturur. PNL sayısının azalması ya da fonksiyonlarındaki bozukluklar kandidiyaz oluşumu için en önemli faktörlerdir (39). Gelişmiş tedavi yöntemleri: örneğin; transplantasyon esnasında meydana gelen immün sistemin baskılanması yaygın mikoz riskini taşır (37).

Sonuç olarak; çalışmamızdaki in vitro ve in vivo deney bulguları tedavi konsantrasyonundaki flukonazol'un PNL fonksiyonlarından, kemotaksi, süperoksit anyonu oluşumu ve fagositoza etki etmediği, in vitro koşullarda hücre içi aktiviteyi in vivo koşullara göre daha çok etkilediği fakat bu etkide flukonazol alınımından önce ve sonraki zaman aralığında çok anlamlı bir fark görülmediği saptanmıştır. Flukonazol az da olsa hücre içi aktiviteyi destekler gözükmekte ve PNL'lerin plastik yüzeye aderensini artırmaktadır.

Kaynaklarda ve çalışmamızda da görüldüğü gibi antifungal tedavide ilaçların bazen immün sistem hücrelerini olumsuz yönde etkilediği ya da hiç etkilemediği, bazen de uyardığı görülmektedir. Bu nedenle; yeni antifungallerin tedavide uygulanmadan önce immün sistem hücreleri üzerine etkileri kesin araştırılmalıdır. Bu konuda araştırmalar ilerledikçe yeni antifungaller ve yeni yaklaşımlar ile mantar hastalıklarının tedavisinde şüphesiz daha başarılı sonuçlar alınacak ve tedavide büyük aşamalar kaydedilecektir.

ÖZET

Bu çalışmada, flukonazol'un insan PNL fonksiyonları (aderens, kemotaksi, süperoksit anyonu oluşumu ve *Candida albicans*'ın hücre içi ölümü) üzerine etkisi in vivo da araştırılmıştır.

Sağlıklı gönüllülere oral 300 mg flukonazol uygulandıktan iki saat sonra doruk plazma konsantrasyonu 12.5 µg/ml olarak bulunmuştur.

Flukonazol'un PNL'lerin aderensi üzerine etkisi Lowry protein yöntemi ile tayin edilmiştir. 300 mg flukonazol dozu öncesi ve sonrası protein konsantrasyonu sırası ile 44.28 ± 5.73 µg/ml ve 45.18 ± 5.58 µg/ml olarak bulunmuştur.

Flukonazol'un PNL'lerin kemotaksisi üzerine etkisi Nelson'un agaroz altı yöntemi ile ölçülmüştür. Flukonazol (300 mg/oral) doz öncesi ve sonrası, PNL'lerin kemotaktik faktöre doğru göç farkları sırası ile 1.80 ± 0.08 mm ve 1.88 ± 0.07 mm olarak bulunmuştur.

PNL'ler tarafından oluşturulan süperoksit anyonu, flukonazol (300 mg/oral) doz öncesi ve sonrası, sırası ile 12.52 ± 1.346 nmol/10⁶ PNL/30 dakika ve 12.83 ± 1.038 nmol/10⁶ PNL/30 dakika olarak bulunmuştur.

Flukonazol'un PNL'ler tarafından *Candida albicans*'ın hücre içi ölümü üzerine etkisi, patlatılan PNL'lerden maya hücrelerinin salınmasından sonra canlı koloni sayımı ile tayin edilmiştir.

Flukonazol (300 mg/oral) in vitro koşullarda, PNL'ler tarafından *Candida albicans*'in hücre içi ölümünü otuzuncu ve doksanıncı dakikalarda, in vivo koşullara göre daha çok artırmıştır. Doksanıncı dakikadaki in vitro etki ise doz öncesine göre anlamlı bulunmamıştır. Sonuç olarak in vitro ve in vivo deneyler arasında bir uyum görölmemiştir.

Flukonazol (300 mg/oral) uygulandıktan sonra, PNL'lerin aderensini anlamlı olarak artırmış, fakat kemotaksi ve PNL'ler tarafından oluşturulan süperoksit anyonu oluşumunu etkilememiştir.

SUMMARY

In this study, the effect of fluconazole on human PMN functions (adherence, chemotaxis, superoxide production and intracellular killing of *Candida albicans*) was investigated in vivo.

The peak plasma concentration of 12.5 µg/ml was reached in vivo in two hours after the administration of 300 mg fluconazole to healthy volunteers.

The effect of fluconazole on adherence of PMNs was determined by Lowry's protein method. The protein concentration before treatment and after 300 mg fluconazole dose were found to be 44.28 ± 5.73 µg/ml and 45.18 ± 5.58 µg/ml respectively.

The effect of fluconazole on chemotaxis of PMNs was measured by Nelson's under agarose method. The migration distance of PMNs towards the chemotactic factor before treatment and after the administration of 300 mg fluconazole were found to be 1.80 ± 0.08 mm and 1.88 ± 0.07 mm respectively.

The superoxide production of PMNs before treatment and after the administration of 300 mg fluconazole were found as 12.52 ± 1.346 nmol/ 10^6 PMN/30 min. and 12.83 ± 1.038 nmol/ 10^6 PMN/30 min. respectively.

The effect of fluconazole on intracellular killing of *Candida albicans* by PMNs was determined by viable colony count, after release of yeast cells from disrupted neutrophils.

Fluconazole (300 mg/per os) increased the PMN's killing of *Candida albicans* 30th and 90th min. of exposure in vitro, compared to in vivo conditions. The in vitro effect at 90th min. of exposure was not found significant compared to that of pretreatment. Finally, between in vitro and in vivo tests no correlation was found.

The adherence of PMNs after the administration of 300 mg fluconazole was significantly enhanced, whereas, chemotaxis, as well as superoxide production of PMNs were not affected.

KAYNAKLAR

1. Akan E: Genel Mikrobiyoloji ve İmmunoloji. Ç Ü Tıp Fak Yayınları, No.16, s.251 (1992).
2. Alexander JW, Windhorst DB, Good RA: Improved tests for the evaluation of neutrophil function in human disease, *J Lab Clin Med* 72 (1):136 (1968).
3. Anaissie A, Paetznick V, Bodey GP: Fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*: Microtiter method that is independent of inoculum size, temperature, and time of reading, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(8):1641 (1991).
4. Babior BM, Cohen HJ: Measurement of Neutrophil Function: Phagocytosis, Degranulation, the Respiratory Burst and Bacterial Killing. "Cline, M. J. (ed.): *Methods in Hematology (Leukocyte Function)*", p1, 1st Ed, Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, (1981).
5. Babior BM, Kipnes RS, and Curnutte JT: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent . *The Journal of Clinical Investigation*, 52:741 (1973).
6. Badur S: Antimikrobiklerin immün sisteme istenmeyen etkileri. *Klinik Derg*, Cilt 4,sayı 3, s.105 (1991)
7. Bailey EM, Krakowsky DJ, Rybak MJ: The triazole antifungal agents: A review of itraconazole and fluconazole. *Pharmacotherapy*,10(2):146 (1990).
8. Barette-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryler JF: A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol.*, 131:1217 (1985)
9. Bauer JD: *Clinical Laboratory Methods*, p198, 9th Ed, The C V Mosby Company, St. Louis, Toronto, Princeton, (1982).
10. Bauer TM, Kronsteiner W, Bassler M, Daschner FD: Sensitivity testing with ketoconazole in an assay containing *Candida albicans*, human polymorphonuclear leukocytes and serum , *Eur.J.Clin.Microbiol.*5(6):665 (1986).
11. Beşe M: Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri, 1.Baskı, İstanbul, Kardeşler basımevi, s.99 (1989).
12. Björkstén B, Ray C and Quie PG: Inhibition of human neutrophil chemotaxis and chemiluminescence by amphotericin B, *Infection and Immunity* 14(1):315 (1976).
13. Bolignano G, Chindemi G and Criseo G: Cryptococcal meningoencephalitis in a patient with Hodgkins lymphoma: succesful treatment with fluconazole, *Mycoses* 34:63 (1991).

14. Buxton MJ, Dubois DJ, Turner RR et al: Cost implications of alternative treatments for AIDS patients with cryptococcal meningitis . Comparison of fluconazole and amphotericin B based therapies. *Journal of Infection* 23:17 (1991).
15. Casone A, Mattia E, Boldrini L: Agglutination of blastospores of *Candida albicans* by concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and the ultrastructure of the cell wall. *J Gen Microbiol* 105:263 (1978).
16. Cassone A , Simonetti N, Stripolli V: Ultrastructural changes in the wall during germ tube formation from blastospores of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 77:417 (1973).
17. Chapman-Kirkland ES, Wasvary JS, and Seligmann BE: Superoxide anion production from human neutrophils measured with an improved kinetic and endpoint microassay. *Journal of Immunological Methods* 142:95 (1991).
18. Cutler JE: A simple in vitro method for studies on chemotaxis. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine* 147: 471 (1974).
19. Çetin ET: Genel ve Pratik Mikrobiyoloji. 3.Baskı, İstanbul, Sermet Matbaası, s.183 (1973).
20. Dahinden CA, Fehr J and Hugli TE: Role of cell surface contact in the kinetics of superoxide production by granulocytes. *J Clin Invest.*;72:113 (1983).
21. Davies RR and Zaini F: Antifungal drugs affecting the chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology* 23:119 (1985).
22. Dermoumi H: In vitro susceptibility of yeasts isolates from the blood to fluconazole and amphotericin B. *Chemotherapy* 38(2):112 (1992).
23. Douglas JL: Adhesion of *Candida* species to epithelial surface, *CRC Critical Reviews in Microbiology* 15:24 (1987).
24. Douglas JL: Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surface, *Microbiological Science* 2:243 (1985).
25. Douglas JL: Adhesion to surfaces. "Rose AH and Harrison JS (eds.): *The Yeast.*" P.239, Academic Press, London, (1987).
26. Edvard JE: *Candida* species."Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds.): *Principles and Practice of Infectious Diseases.*" p. 1943. Churchill Livingstone, New York, Edinburg, London; Melbourne (1990).
27. Ener B: *Candida albicans* suşlarında epitel hücrelerine bağlanma ve bununla yüzey hidrofobik özellikleri arasındaki ilişkinin araştırılması, M Ü Tıp Fak Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, İstanbul (1991).
28. Farkas B and Dobozy A: The effect of ketocanazole on the phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by polymorphonuclear granulocytes. *Mycosen* 26(1):22 (1983).
29. Gabler WL, and Creamer HR: Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. *J Periodont Res* 26:52 (1991).
30. Garcia I, Paseural A, Conejo C, Salvador J, Perea EJ: Effect of antimicrobial and antineoplastic drugs on the uptake of fluconazole by human neutrophils and tissue culture cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:944 (1993).
31. Gil A, Lavilla P, Valencia E, Pintado V, Dupla ML, Khamashta MA, Garcia-Puig J and Ortiz-Vazquez J: Safety and efficacy of fluconazole treatment for *Candida oesophagitis* in AIDS. *Postgrad Med J* 67:548 (1992).

32. Gülen D: *Candida albicans* üzerinde çeşitli nitelikteki ilaçların etkilerinin karşılaştırılması. MÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, İstanbul (1992).
33. Gülmezoğlu E, Ergüven S: İmmünoloji. Ankara, Feryal Matbaası, s.107 (1994).
34. Hamilton CW, Romankiewicz JA: Susceptibility testing: A practical review. "Kobayashi GS, Odss FC(eds): Current perspectives on antifungal susceptibility testing: Focus on fluconazole". Scientific Therapeutics Information, Inc, 7 (1989).
35. Hauser J E, Remington JS: Effect of antibiotics on the immune response. *Am J Med* 72:711 (1982).
36. Hay RJ: The azole antifungal drugs, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 20:1 (1987).
37. Hussein RH, Hoadley ME, Hutchinson JJP, Penn CW and Smith H: Intracellular killing of *Candida albicans* by human polymorphonuclear leukocytes: Comparison of three methods of assessment, *Journal of Immunological Methods* 81: 215 (1985).
38. Johansson CB: Antibiyotikler 2.Baskı, İstanbul Eczacı Odası Yayınları, No.17 s.68 (1990).
39. Johnson EM, Warnock DW, Richardson MD, and Douglas CJ: In vitro effect of itraconazole, ketoconazole and amphotericin B on the phagocytic and candidacidal function of human neutrophils, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 18:83 (1986).
40. Kılıçturgay K: İmmünolojiye Giriş. 2.Baskı, Bursa, Karar Matbaası, s.113 (1991).
41. Korzeniowski OM: Effects on antibiotics on the mammalian immune system, *Infect Dis Clin Nort Am* 3:469 (1989).
42. Kreméry Jr. V, Koza I, Hornikova M, Fuchsberger P, Spanik S, Mardiak J, Sufliarsky J, Blahova M, Savko V, Migon Ch: Fluconazole in the treatment of mycotic oropharyngeal stomatitis and esophagitis in neutropenic cancer patient, *Chemotherapy* 37:343 (1991).
43. Kwan-Chung KJ, Bennett JE: *Medical Mycology*, p280, Lea and Febiger, Philadelphia London (1992).
44. Laine L, Dretler RH, Conteas CN, Tuazon C, Koster FM, Sattler F, Squires K and Islam MZ: Fluconazole compared with ketoconazole for the treatment of *Candida* esophagitis in AIDS, *Annals of Internal Medicine* 117(8):655 (1992).
45. Lohr KM, Snyderman R: Amphotericin B alters the affinity and functional activity of the oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Immunology* 129(4):1594 (1982).
46. Lorian V: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, p212, 2nd Ed, Williams and Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney (1986).
47. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem* 3:265 (1952).
48. Mandell LA: Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs on the phagocytic and microbicidal function of the polymorphonuclear leukocyte, *Rev Infect Dis* 4(3):683 (1982).
49. Marmor DJ, Fields BT, France GL and Steele RW: Ketoconazole, amphotericin B and amphotericin B methyl ester: Comparative in vitro and in vivo toxicological effects on neutrophil function, *Antimicrob Agents Chemother* 20:660 (1981).
50. Martin E, Parros P, Lozano M del C: In vitro susceptibility of 245 yeast isolates to amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, fluconazole and itraconazole, *Chemotherapy* 38:335 (1992).

51. Meço O, Willke A, Balık İ, Kurt H: Antimikrobiyal Kemoterapi, Klinik Uygulama ve Yenilikler. Ankara, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları, No.17, s.16, (1992).
52. Meunier F, Aoun M and Gerard M: Therapy for oropharyngeal Candidiasis in the immunocompromised host: A randomized double-blind study of fluconazole vs. Ketoconazole, *Rev Infect Dis* 12(3):364 (1990)
53. Mikami Y, Takahashi A, Yazawa K, Terao K and Ueno Y: Synergistic interaction of miconazole and fluconazole at sub-MIC level on *Candida albicans*, *Mycoses* 35:327 (1992).
54. Morace G, Manzara S, Dettori G: In vitro susceptibility of 119 yeast isolates to fluconazole, 5-fluorocytosine, amfotericin B and ketoconazole, *Chemotherapy* 37(1):23 (1991).
55. Morrow JD: Fluconazole: A new triazole antifungal agent, *Am J Med Sci* 302(2):129 (1991).
56. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard M7-A Villanova, Pa. (1985).
57. Nelson RD, Quie PG, Simmons RL: Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes, *The Journal of Immunology* 115(6):1650 (1975).
58. Odds FC: Laboratory evaluation of antifungal agents: A comparative study of clinical importance, *J Antimicrob Chemother* 22:749 (1980).
59. Pallister CJ and Warnock DW: Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs alone and in combination on the phagocytic and candidacidal function of human polymorphonuclear leukocytes, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 23:87 (1989).
60. Pascual A, Garcia I, Conejo C and Perea EJ: Uptake and intracellular activity of fluconazole in human polymorphonuclear leukocytes, *Antimicrob Agents Chemother* 37(2):187 (1993).
61. Pfaller MA, Dupont B, Kobayashi GS, Müller J, Rinaldi MG, Espinel-Ingroff A, Shadomy S, Troke PF, Walsh TJ and Warnock DW: Standardized susceptibility testing of fluconazole: An international collaborative study, *Antimicrob Agents Chemother* 36(9):1805 (1992).
62. Pick E and Mizel D: Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader, *Journal of Immunological Methods* 46:211 (1981).
63. Richardson K, Cooper K, Marriot MS, Tarbit MH, Troke PF and Whittle PJ: Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent, *Rev Infect Dis* 12(3):267 (1990).
64. Richardson MD and Shankland GS: Effects of cilofungin on phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by human neutrophils, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11(1):22 (1992).
65. Ripa S, Ferrante L, Prenna M: Pharmacokinetics of fluconazole in normal volunteers, *Chemotherapy* 39:6 (1993).
66. Roberts GD: Laboratory Methods in Basic Mycology. "Baron EJ, Finegold SM (eds): *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*", p747, The CV Mosby Company, St Louis, Baltimore, Philadelphia, Toronto (1990).
67. Rogers TE, Galgiani JN: Activity of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against *Candida albicans* in vitro and in vivo, *Antimicrob Agents Chemother* 30(3):418 (1986).
68. Roilides E, Walsh TJ, Rubin M, Venzon D and Pizzo PA: Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro, *Antimicrob Agents Chemother* 34(2):196 (1990).

69. Roit I, Brostoff J, Male D: Immunology, pp2.16, 15.14, 3rd Ed, Mosby, St Louis, Baltimore, London (1993).
70. Saag MS, Dismukes WE: Azole antifungal agents: Emphasis on new triazoles, *Antimicrob Agents Chemother* 32(1):1 (1988).
71. Senior DS and Show JTB: In vitro effects of fluconazole (UK-49,858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on *Candida albicans* blastospore destruction by human polymorphonuclear leukocytes, *Int J Immuno-pharmacol* 10:169 (1988).
72. Shapira R, Borinski R, Sela MM and Soskolne A: Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients, *J Clin Periodontol* 18:44 (1991).
73. Sheehan DJ, Espinel-Ingroff A, Moore LS, Webb CD: Antifungal susceptibility testing of yeast: A brief overview, *Clin Infect Dis* 17(Suppl 2):S494 (1993).
74. Silverman LM, Christenson RH, Grant GH: Aminoacids and proteins. "Tietz NW (ed):Textbook of clinical chemistry", p384 WB Saunder Company, Philadelphia, London, Toronto (1986).
75. Stern JJ, Hartman BJ, Sharkey P, Rowland Squires KE, Murray HW, Graybill RJ: Oral fluconazole therapy for the patients with acquired immunodeficiency syndrome and cryptococcosis: Experience with 22 patients, *The American Journal of Medicine* 85:477 (1988).
76. Stevens DA: The new generation of antifungal drugs, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7(6):732 (1988).
77. Tellier R, Krajden M, Grigoriev GA and Campbell I: Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts, *Antimicrob Agents Chemother* 36(8): 1619 (1992).
78. Territo MC: Chemotaxis. "Cline MJ (ed), Leukocyte Function", p39, 1st Ed, Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne (1981).
79. Tucker RM, Williams PL, Arathoon EG, Levine BE, Hartstein AI, Hanson LH and Stevens DA: Pharmacokinetics of fluconazole in cerebrospinal fluid and serum in human coccidioidal meningitis, *Antimicrob Agents Chemother* 32(3):369 (1988).
80. Tümbay E: Pratik Tıp Mikolojisi. 1. Baskı, İzmir, Bilgehan Basımevi s.45 (1983).
81. Unat EK: Temel Mikrobiyoloji. Kırklareli, Sermet Matbaası s.517 (1985).
82. Van der Auwera P, Husson M: Influence of rifampicin and ansamycin on motility and adherence of human neutrophils studied in vitro, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 24:347 (1989).
83. Van der Auwera P, Meunier F: In vitro effects of cilofungin (LY121019), amphotericin B and amphotericin B-deoxycholate on human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 24:747 (1989).
84. Van den Broek PJ: Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes, *Rev Infect Dis* 1(2):213 (1989).
85. Van Ethen Els WM, Van de Rhee NE, Van Kampen KM and Bakker-Woudenberg Irma AJM: Effects of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and intracellular growth of *Candida albicans*, *Antimicrob Agents Chemother* 35(11):2275 (1991).

86. Van't Wout JW, Mattie H and Van Furth R: Comparison of the efficacies of amphotericin B, fluconazole and itraconazole against a systemic *Candida albicans* infection in normal and neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 33(2): 147 (1989).
87. Veringa EM, Verhoef J: Clindamycin at subinhibitory concentrations enhances antibody and complement-dependent phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 33:243 (1987).
88. Wagner DK, Collins-lech C and Sohnle PG: Inhibition of neutrophil killing of *Candida albicans* pseudohyphae by substances which quench hypochlorous acid and chlonamines. *Infection and immunity* 51(3):731 (1986).
89. Wildfeuer A, Laufen H and Haferkamp O: Interaction of fluconazole and human phagocytic cells. *Arzneim-forsch/Drug Res* 40(11):1044 (1990).
90. Wilke A, Cerikçioğlu N, İnci R, Arslan H, Demirkazık A: Kanserli hastalardan izole edilen kandida türlerinin antifungallere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 23:119 (1993).
91. Yeğin O: Temel İmmünoloji ve İmmün Eksiklik Hastalıkları. Ankara, Palme Yayın. s.113 (1990).