

37941

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLORAMFENİKOL'ÜN SIĞIR POLİMORFNÜKLEER
LÖKOSİT (PMNL) FONKSİYONLARI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İN VİTRO VE İN VİVO ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Veteriner Hekim

Ahmet Levent BAŞ

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Danışman

Doç. Dr. Ömer DEMET

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

KONYA - 1994

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi.....	IV
GrafikListesi.....	V
Şekil ve Resim Listesi.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	3
2.1. Fagositoz.....	4
2.1.1. Fagositoz Öncesi Olaylar.....	4
2.1.1.1. Kemotaksis.....	4
2.1.1.2. Opsonizasyon.....	5
2.1.2. Fagositoz Anı ve Sonrası Olaylar.....	6
2.1.2.1. Yutma.....	6
2.1.2.2. Hücre İçi Öldürme Sistemleri	6
2.1.2.2.1. Solunumsal Patlama (Respiratory Burst).....	6
2.1.2.2.2. Antimikrobiyel Sistemler.....	7
2.1.2.2.2.1.Oksijene Bağlı Sistemler (Oxygen-Dependent Systems).....	7
2.1.2.2.2.2.Oksijene Bağlı Olmayan Sistemler (Oxygen -Independent Systems).....	9
2.2. Nötrofil Fizyolojisi.....	9
2.2.1. PMNL Yapımı ve Farklılaşması.....	9
2.2.2. Nötrofillerin Yapısal Özellikleri.....	11
2.3. Mikroorganizmaların Savunma Sistemleri.....	11
2.3.1. Bakteri Kapsülleri.....	12
2.3.2. Bakteri HücreDuvarı.....	12
2.3.3. Bakteri Sitotoksinleri ve Enzimleri.....	12
2.4. Fagositik Fonksiyon Bozukluğu ile Karakterize Hastalıklar.....	13

2.4.1.	Kronik Granüloamatöz Hastalıklar.....	13
2.4.2.	Cheidak-Higashi Sendromu.....	13
2.5.	Kloramfenikol.....	13
2.5.1.	Farmakokinetik.....	14
2.5.2.	Toksik Etkileri.....	16
2.5.3.	Kloramfenikol'ün Nitro-Redüksiyon Metabolitlerinin Myelotoksik Özellikleri.....	17
2.5.4.	Kloramfenikol'ün Barsak Bakterileri Tarafından Oluşturulan Metabolitlerinin Myelotoksik Özellikleri.....	19
2.6.	Antibiyotiklerin Fagositik Hücre Fonksiyonları Üzerindeki Etkileri.....	21
3.	MATERYAL ve METOT	24
3.1.	Materyal.....	24
3.1.1.	Hayvan Materyali.....	24
3.1.2.	İlaç Materyali.....	24
3.1.3.	Araç Materyali.....	24
3.1.4.	Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler.....	25
3.1.4.1.	Çözeltiler.....	25
3.1.4.2.	Kimyasal Maddeler.....	25
3.1.5.	Mikroorganizma.....	25
3.2.	Metotlar.....	25
3.2.1.	İlaç Uygulaması.....	25
3.2.2.	Kan Örneklerinin Alınması.....	25
3.2.3.	PMNL İzolasyonu.....	26
3.2.4.	Candida albicans Kültürünün Hazırlanması	26
3.2.5.	PMNL ile C. albicans'ın Birlikte İnkübasyonu.....	27
3.2.6.	PMNL'lerin Fagositoz ve Mikrobisidal Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	27

3.2.7.	Plazma Kloramfenikol Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	28
3.2.7.1.	Kromatografi (HPLC) Şartları.....	28
3.2.7.2.	Plazma Örneklerinin Ekstraksiyonu.....	28
3.2.8.	İstatistiksel Analiz.....	29
4.	BULGULAR	30
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	40
6.	ÖZET	46
7.	SUMMARY	47
8.	LİTERATÜR	48
9.	ÖZGEÇMİŞ	56
10.	TEŞEKKÜR	57



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İn vitro, Değişik Düzeylerde Kloramfenikol'ün PMNL Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	32
Tablo 2. İn vivo, Tedavi Dozunda (10 mg/kg CA.) Kas İçi Uygulanan Kloramfenikol'ün PMNL Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	33
Tablo 3. Plazma Kloramfenikol Konsantrasyonu ile PMNL Aktivitesi Arasındaki İlişki (r).....	34



GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. İn vitro, PMNL'lerin Fagositoz ve Mikrobisidal Aktivite Oranları.....	35
Grafik 2. İn vivo, PMNL'lerin Fagositoz ve Mikrobisidal Aktivite Oranları.....	35
Grafik 3. İn vitro, Herbir PMNL'ye Düşen Fagosite Edilmiş Total, Ölü ve Canlı <i>C. albicans</i> sayıları.....	36
Grafik 4. İn vivo, Herbir PMNL'ye Düşen Fagosite Edilmiş Total, Ölü ve Canlı <i>C. albicans</i> Sayıları.....	36
Grafik 5. İn vitro, Değişik Sayıda <i>C. albicans</i> Fagosite Eden PMNL Oranları.....	37
Grafik 6. İn vivo, Değişik Sayıda <i>C. albicans</i> Fagosite Eden PMNL Oranları.....	37
Grafik 7. Plazma Kloramfenikol Konsantrasyonu Eğrisi.....	38

ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

Şekil 1.	Kloramfenikol ve Metabolitleri.....	20
Şekil 2, 3.	Plazma Kloramfenikol Kromatogramları.....	38
Resim 1a, b.	Sığır Kan Polimorf nükleer Lökositlerinin (PMNL) Floresans Mikroskopik Görünümleri.....	39



1. GİRİŞ

İmmün savunma sistemi, hastalık yapıcı etkenlerle devamlı karşı karşıya olduğundan, genellikle aktif durumdadır. Doğal savunma olarak bilinen bu durumun, çeşitli faktörlerden etkilenerek fonksiyonlarını azaltması veya kaybetmesi hastalık hallerinde prognozu iyice kötüleştirebilir. Bu nedenle, sağlıklı olmak immün sistemin yeterliliği ile doğrudan ilgilidir.

İmmün sistem, hücresel ve humoral bölümlerden oluşur. Vücut savunması ve bağışıklığın sağlanmasında, her iki bölüm de etkin rol oynar. Özellikle enfeksiyon hastalıkların başlangıcında, hücresel savunmada önemli fonksiyonlara sahip olan nötrofillerin (Polimorfnükleer Lökosit/PMNL) rolleri büyüktür. Bu hücrelerin yapımlarında veya fonksiyonlarında oluşabilecek bir aksama, humoral sistemin de yeterince aktivite gösterememesi ile sonuçlanabileceğinden immün sistemde bütünlük sağlanamaz.

İmmün sistemin olumsuz etkilenmesinde, enfeksiyon hastalıkların gerek profilaksisinde gerekse sağıtılmasında yaygın bir şekilde kullanılan kemoterapötiklerin ayrı bir önemi vardır. Kemoterapide önemli bir grubu oluşturan antibiyotiklerin hemen çoğunun immün sistem üzerindeki olumsuz etkileri bilinmektedir. Oysa ki, kemoterapide ana ilke, konakçıya hiç zarar vermemek veya en az zararla sağıtımı gerçekleştirmektir. Ancak, böylesine ideal bir antibiyotikten bugün için söz etmek mümkün değildir.

Ülkemizde, ilaç kullanımının Veteriner ve beşeri hekimlikte ne denli yaygın ve düzensiz olduğu herkes tarafından bilinen bir tespittir.

Bu çalışmada, PMNL fonksiyonları üzerindeki etkileri incelenen kloramfenikol, yakın zamana kadar ülkemizde Veteriner hekimliğinde en yaygın kullanılan ilaçlar arasındaydı. Özellikle; insanlarda aplastik anemi, granülositopeni, optik nöyritis ve yeni doğan bebeklerde görülen gri sendromu gibi etkileri göz önünde bulundurularak, ürünleri gıda olarak tüketilen hayvanlara uygulanmasından

vazgeçilmiştir. Ancak, kloramfenikol ve tiamfenikol beşeri hekimlikte halen yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bilindiği üzere, kloramfenikol'ün p-nitro grubu taşıması ve toksik metabolitlerine ayrışması gibi özellikleri yan etkilerini arttırmaktadır. Daha önceden bilinen bu yan etkilerinden başka, immün sistem üzerindeki olumsuz etkilerinden de bahsedilmektedir. Bu durum, aynı grupta bulunan ve daha az yan etkileri olan tiamfenikol ve florfenikol'ün, kloramfenikol'e tercih edilmesine sebep olmaktadır.

İmmün sistemdeki yetersizlik, gerek proflakside gerekse sağıtımda başarısızlıklara neden olur. Özellikle, savunma sistemi tarafından baskılanan ve ilaçla sağıtılamayan veya ilaçlara direnç kazanmış patojenlerin giderilebilmesi, bütünüyle mümkün olmayabilir. O nedenle, rasyonel bir sağıtım için kullanılacak ilaçların, immün sistem üzerindeki etkilerinin bilinmesi önem taşır.

Bu çalışma ile, kloramfenikol'ün; doğal bağışıklığın hücrel savunmasında önemli rolü olan PMNL'lerin fagositoz yeteneği ve mikrobisidal aktivitesi (*Candida albicans* 'ın hücre içi öldürülebilme yeteneği) üzerindeki in vivo ve in vitro etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİ

Organizmayı hastalık etkenlerine karşı savunan mekanizmalar, antijene bağımlı (antijen-spesifik) ve antijene bağımlı olmayan (antijen-nonspesifik) olmak üzere iki gruba ayrılır. Herhangi bir antijenle karşılaşıldığında antijen-spesifik mekanizmalar uyarılarak genellikle, o antijene karşı "immünite" olarak da isimlendirilen spesifik bir korunma sağlanır. Antijenle bu karşılaşma esnasında antijen-nonspesifik savunma faktörleri de aktive olur. Son yıllarda "paramünite" olarak da isimlendirilen bu nonspesifik savunma faktörleri arasında; interlökinler (IL-1, IL-2, IL-3, ..., IL-8), tümör nekrozis faktör (TNF) gibi mediyatörlerin yanında komplement-opsonin-properdin sistemi ve lizozim gibi sıvısal faktörlerle mikrofajlar (PMNL), makrofajlar, doğal katil hücreler ve T/B-lenfositler gibi hücresel faktörler de yer almaktadır. Bu faktörlerden bazılarının aynı zamanda antijen-spesifik bağışıklığın oluşumunda da rol oynaması, antijen-spesifik ve antijen-nonspesifik savunma sistemleri arasında kompleks etkileşimlerin bulunduğunu göstermektedir (67).

Özellikle mikrofajlar ve makrofajlar, fagositoz ve hücre içi bakteri öldürebilme kapasiteleri ile antijen-nonspesifik savunma sisteminde çok önemli bir yer tutmaktadır. PMNL'ler daha çok, yangının başlangıcında etkinlik göstermektedirler. Mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesinde rol oynayan bu hücrelerin, antibakteriyel ilaçların çoğu tarafından baskılandığı çeşitli araştırmalarla ortaya çıkarılmıştır (5, 15, 20, 23, 24, 25, 43, 71). Özellikle kloramfenikol ve tetrasiklin gibi geniş etki spektrumuna sahip antibiyotiklerin PMNL fonksiyonları (fagositoz, bakterisidal aktivite vd.) üzerinde engelleyici etkilerinin olduğu öne sürülmektedir (15, 54, 55, 73).

2.1. Fagositoz

Fagositoz, partiküler yapıdaki maddelerin ekstrasellüler ortamdan intrasellüler vakuollere taşınmasıdır (69, 80). Tek hücreli canlıların beslenmelerine aracılık eden bu olay, kompleks yapıları canlılarda önemli bir savunma mekanizmasıdır (7). Sadece bu fonksiyon için özelleşmiş hücreler tarafından gerçekleştirilen fagositoz olayı, ilk kez 1882 yılında Metchnikov (13) tarafından gözlemlenmiştir. Özellikle akut safhada, enfeksiyonun ilerlemesinin önlenmesi açısından önemli fonksiyonlardan biridir.

Mikroorganizmalara karşı yürütülen mücadelede, fagositoz yapma yeteneğine sahip hücrelerden bazıları hareketlidir. Bunlar, kemotaktik maddelerin etkisi ile enfeksiyon bölgesine göç edebilme özelliğindedirler. Bu grupta, polimorfnükleer lökosit (PMNL)'ler ve kan monositleri bulunur. Diğer grupta yer alan hücreler ise spesifik doku makrofajlarıdır. Sadece, dokularda bulunan ve özel adlarla anılan bu hücreler buldukları bölgeye göre isim (karaciğerde kupfferin yıldız hücreleri, peritonda peritoneal makrofajlar, beyinde mikroglialar vd.) alırlar. Bu tip hücreler, bağ doku iplikçiklerine tutunarak sınırlı derecede hareket ederler (37, 66). Bir adet PMNL hücresi 5-25 adet mikroorganizmayı fagosite edebilirken, makrofajlar; 100 kadar bakteriyi fagosite edebildikleri gibi eritrosit, lökosit, protozoa ve daha büyük çaptaki partiküler yapıları da fagosite edebilirler (28, 69).

Fagositoz, birtakım hücrel ve dokusal reaksiyonlarla bütünlük arz eden kompleks bir olaydır. Mikroorganizmaların değişik hücreler tarafından fagositozu, farklı biçimlerde oluşmakla birlikte, şekillenen olaylar temelde büyük bir benzerlik gösterir.

2.1.1. Fagositoz Öncesi Olaylar

2.1.1.1. Kemotaksis

Akut yangısal cevap esnasında, erken dönemde şekillenen olayların başında, dolaşımdaki PMNL'lerin yangılı bölgeye ulaşmaları gelir. Lökositlerin yangılı bölgeye toplanmaları üç aşamada gerçekleşir; *marjinasyon*, *pavementasyon* ve *diapedez*. Lökositlerin hareket halindeki kandan, damar çeperine translokasyonuna *marjinasyon* denir. *Pavementasyon*, lökositlerin damar çeperine dayandığı veya yapıştığı zaman meydana gelir. Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte bu olayda Ca^{+2} iyonlarının önemli oranda etkili olduğu bilinmektedir. *Pavementasyon'* a uğrayan lökositler, yangı bölgesine geçene kadar damar çeperinin iç yüzünde birikir ve tutunurlar. Daha sonraki aşamada ise, iki endotel hücresinin arasındaki boşluktan (*interendotelial junction*) geçerek ekstravasküler doku alanına girmiş olurlar. Lökositlerin kan damarı çeperinden bu geçiş eylemine *diapedez* denir. Bütün bu olaylar, genel anlamda kemotaksis olarak ifade edilmektedir (7, 13). Lökositlerin, dolaşımdan ekstravasküler dokuya geçmelerini uyaran maddelere ise, kemoatraktant denmektedir. Kemoatraktant maddeler, mikroorganizmalardan salgılanan maddeler (bakteriyel ürünler) olabileceği gibi, mikroorganizma ile konakçı arasındaki etkileşim sonucunda da (hasarlı doku ürünleri, damarlardan salınan maddeler) oluşabilirler. Bazı *Streptokok*, *Pneumokok*, *Stafilokok* türleri ve gram (-) mikroorganizmalar kemotaktik faktör üretebilirler. Mikroorganizmaların fagositik hücrelere yönelik olarak kemotaktik uyarım meydana getirebildiklerinin en belirgin özelliği, klasik veya alternatif yolla komplement sistemi aktive edebilmeleridir. Kemotaktik faktörler, aktive olmuş lökositlerden de köken alabilirler. Bunların başlıcaları lökotrien B4 ve hidroksieicosatetraenoik asitlerdir (28, 66).

Lökositlerin *migrasyon*'unun hangi yöne doğru olacağını nasıl tespit ettikleri açık bir şekilde bilinmemekle beraber, buldukları ortam içerisindeki yoğunluk farklılıklarını çok hassas bir şekilde tespit edebildikleri bilinmektedir.

Nötrofiller, içerisinden geçtikleri moleküllerin sayılarındaki farklılıkları tespit edebilme yeteneğindedirler ve bu yöne doğru hareket ederler (13).

2.1.1.2. Opsonizasyon

Fagositozun gerçekleşmesi için, fagosite edilecek partikülün işaretlenmesi (*opsonizasyon*), diğer bir anlamda fagositoza uygun hale getirilmesi gerekir. *Opsonizasyon*'da IgG'nin Fc kısmı, komplementin C3 komponenti ve bazı serum proteinleri rol oynar. Bu gibi maddelere *opsonin* denir (7).

Normalde, fagositik hücre membranı ve bakteri yüzeyi negatif yük taşır. Bu durum hücre ile bakterinin birbirlerini elektriksel olarak itmesine sebep olur. *Opsonin*'ler bakteriyi sararak, antifagositik yüzey özelliklerini değiştirirler veya fagosit ile bakteri arasında köprü görevi görürler (66, 80).

2.1.2. Fagositoz Anı ve Sonrası Olaylar

2.1.2.1. Yutma

Uyarılmış fagositte önce yutma eylemi gerçekleşir (42). Yutma eylemi, partikül veya mikroorganizmanın fagositik hücre membranına yapışması ile başlar. Temas noktasında hücre zarı çukurlaşır, kenarlarda oluşan psödopodların yardımı ile membranöz bir vezikül ile sarılarak hücre içine alınır. Bu oluşum fagozom olarak isimlendirilir (69, 80). Oluşan vezikül, bu andan itibaren hücre içi bir organeldir. Fagozom, periferde teşekkül eder ancak, mikrotübüller aracılığı ile merkeze çekilir. Fagozom teşekkül ederken, sitoplazmik granüller hızla fagozoma doğru hareket ederler. Lizozomal granüllerin fagozoma yönelik bu eylemlerinin mikrotübül sistemi ve kontraktil proteinler aracılığı ile gerçekleştiğine inanılmaktadır (13). Fagozom, lizozom ile birleşerek fagolizozomu şekillendirir. Bu aşamada, lizozomların içerisinde bulunan güçlü hidrolitik enzimler vezikül içerisine aktarılır. Bu olay *degranülasyon* olarak isimlendirilir. Eğer, fagozom sadece kalıntı veya artık maddeleri içeriyorsa bariz bir öldürme (*killing*) eylemi gereksizdir. Diğer taraftan, fagozomda yutulmuş bir mikroorganizma bulunuyor ise

sindirilme (*digestion*) aşamasından önce fagozomal içeriğin öldürülerek inaktive edilmesi gerekir (13, 66).

2.1.2.2. Hücre İçi Öldürme Sistemleri

2.1.2.2.1. Solunumsal Patlama (*Respiratory Burst*)

Uygun bir uyarım ile karşılaştıklarında fagositik hücrelerin metabolik aktivitelerinde meydana gelen belirgin artış, *Respiratory Burst* (RB) terimi ile ifade edilir (80). RB, kemotaktik hareketin başlangıcından itibaren uyarılır, ve fagositoz sonuna kadar devam eder. Olay, oksijen tüketiminde belirgin bir artış, süperoksit (O_2^-) ve H_2O_2 oluşumu, ayrıca hekzoz-monofosfat yolunun aktivasyonu ile karakterizedir. Hücrenin plazma membranındaki uyarımın ardından, NADPH oksidaz aktive edilir. Bu sistem oksijenin bir elektronunun indirgenmesini katalize eder. Reaksiyonda, NADPH elektron verici olarak etkinlik gösterirken, O_2^- elektron alır veya kaybeder. İki O_2^- molekülünün etkileşimi sonucunda biri okside edilir, diğeri ise indirgenir (7, 28).

Bu reaksiyon, pH 4.8'de hızlı bir şekilde gelişirken, nötr veya alkali pH'da oransal olarak daha yavaş olur. Reaksiyonda süperoksit dismutaz katalizör olarak görev yapar (80). H_2O_2 'nin reaksiyonu sonucunda ise yüksek reaktiviteye sahip hidroksil grupları (OH^\bullet) oluşur; NADP ise hekzoz-monofosfat yolu ile yeniden NADPH'a dönüştürülür. Reaksiyon ürünleri, ekstrasellüler sıvıya veya fagositik vakuole bırakılır. Sitoplazmaya geçen O_2^- , süperoksit dismutaz aracılığı ile H_2O_2 'ye indirgenirken sitoplazmik H_2O_2 'de katalaz, glutasyon peroksidaz-glutasyon redüktaz enzimleri ile detoksifiye edilir (7, 66).

2.1.2.2.2. Antimikrobiyel Sistemler

Fagositik hücrelerde mikroorganizmaların öldürülmesinde rol alan sistemler iki grupta değerlendirilir (80).

2.1.2.2.1. Oksijene Bağlı Sistemler (*Oxygen-Dependent Systems*)

Oksijene bağlı sistem, myeloperoksidaza bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki kısımdan oluşur. Bunlardan myeloperoksidaz aracılığı ile gerçekleşenler nötrofillerde, diğeri ise makrofajlarda (MN) meydana gelir (52). Myeloperoksidaz, molekül ağırlığı 150.000 dalton olan bir hemoproteindir (28). PMNL ve MN'lerin azurofilik granüllerinde bulunur (37). Bu enzim *degranülasyon* ile fagositik granüllere girer. Vakuollerde halid (halojen madde ihtiva eden bir bileşim) iyonlarının ve H_2O_2 'nin mevcut olduğu durumlarda, halid iyonlarının H_2O_2 aracılığı ile hipoklorid iyonlarına oksidasyonunu katalize eder. Halid oluşumunda halojen olarak I^{-1} , Br^{-1} ve Cl^{-1} kullanılabilir. En etkin bakterisid madde I^{-1} olmasına rağmen, organizmada en çok bulunan Cl^{-1} 'dir. Fagositik hücrelerde, RB esnasında önemli miktarlarda oluşan H_2O_2 ve Cl^{-1} bulunur. Bu maddeler, myeloperoksidaz aktivitesi için gereklidirler. Myeloperoksidaz, fagositik vakuollerde mevcut olan asit pH'da maksimum aktivite gösterir (13, 52).

Fagositik hücreler tarafından hücre içi öldürme (bakterisidal aktivite) olayının gerçekleştirilmesi çok önemlidir. Bakteri, halid iyonlarının bulunduğu ortamda düşük konsantrasyonda myeloperoksidaz ve H_2O_2 ile inkübe edildiğinde bakterisidal aktivitede belirgin bir artış gözlenir. Halbuki bahsedilen faktörler tek başlarına dikkate değer bir bakterisid etkinlik sergileyemezler. Bu sistemde pek çok potansiyel mekanizma vardır. Bunların başlıcaları; halid iyonlarının mikroorganizmada hasar meydana getirmesi, bakteri hücre duvarının halojenasyona maruz kalması ve toksik aldehydlerin meydana gelmesi ile amino asitlerin dekarboksilasyonu şeklindedir (28).

Fagositlerdeki myeloperoksidaz yetersizliği, bakterisidal aktivitenin yavaş şekillenmesi ile karakterizedir. Fakat fagositoza maruz kalan mikroorganizma, geçte olsa nihai olarak öldürülür. Oksijene bağlı sistemlerde, myeloperoksidaz yokluğunda fagositlerin fonksiyonları devam eder. Bu durumda, Fe^{+3} ve halid iyonları non-enzimatik yolla bakterilerin öldürülmesinde rol oynayabilirler. O_2^- tek başına çok zayıf bir bakterisidal etki gösterir, O_2^-

anyonundan şekillenen H_2O_2 ise daha büyük bir bakterisidal potansiyele sahiptir. H_2O_2 ile O_2^- 'nin etkileşimi sonrasında teşekkül eden OH^* ise yüksek kararsızlıkta okside edici bir ürün olup, daha ziyade organik moleküllerle ani reaksiyonlara girer (13, 52, 66).

2.1.2.2.2. Oksijene Bağlı Olmayan Sistemler (*Oxygen-Independent Systems*)

Mikroorganizmaların hücre içi öldürülmesinde, oksijene bağlı olmayan sistemler de önem taşır. Burada, lizozomal katyonik proteinler, laktoferrin ve lizozim rol oynar. İntrafagositik vakuollerin kendilerine ait bünyesel asiditeleri de çoğu mikroorganizma türü için bakterisid etki yapar. Lizozim, düşük molekül ağırlıklı katyonik bir enzim olup bazı bakteri türlerinin hücre duvarındaki mukopeptidlere karşı etkinlik göstererek onların lizisini sağlar. Laktoferrin ise, bakteri yaşamı için esansiyel olan Fe^{+3} 'i bağlaması sonucu mikroorganizmanın gelişimini inhibe eder. Fe^{+3} 'in, laktoferrin tarafından bağlanması hem asit hem de alkali ortamda meydana gelebilir. Katyonik proteinlerin bakteri gelişimine etkileri, temel bakteri yapısını etkilemeksizin çok ani olarak gelişir (7, 80).

PMNL'ler, çeşitli proteaz ve hidrolazları da içerirler. Bu enzimler bakterisidal etkinlikten ziyade, *digestion*'da görev alırlar. MN'ler, PMNL'lerde bulunan katyonik proteinlerden yoksun olup laktoferrin de ihtiva etmezler (52).

Digestion'un tamamlanmasından sonra *rezidüal body* olarak da adlandırılan büzülmüş vezikül ya sitoplazmada kalır ya da ekzositoz ile hücre dışına atılır (37).

2.2. Nötrofil Fizyolojisi

2.2.1. PMNL Yapımı ve Farklılaşması

Kan hücrelerinin yaşam süreleri çok kısa olduğundan; sayılarının sabit tutulması için devamlı olarak üretilmeleri gerekir (37). Kan hücreleri hematopoietik organlarda, kök hücrelerinden gelişirler. Kök hücreleri (*stem cells*), farklılaşmamış

hücreler olarak tanımlanır, ve devamlı bölünme yeteneğindedirler. Ürettikleri hücreler irreversibl şekilde farklılaşmış spesifik hücrelere dönüşürler. Bütün kan hücrelerinin kemik iliğindeki tek bir kök hücrelerinden geliştiğine inanılmaktadır. Bu yüzden kök hücreleri, pluripotent kök hücresi olarak da isimlendirilir (6, 66).

Kök hücrelerinden belirli bir hücre türünü veren kolonileri oluşturan hücrelere de koloni yapan hücreler (*Colony-Forming Cells /CFC*) veya koloni yapan birim (*Colony-Forming Units /CFU*) denir. Buna göre makrofaj ve granülositleri üreten koloni hücrelerine de *Granulocyte-Macrophage Colony Forming Cells /GM-CFC* denmektedir (37).

Hematopoiez'in olabilmesi için uygun mikro çevre şartları ve büyüme faktörlerinin bulunması gerekir. Uygun çevre şartları sağlansa da kan hücrelerinin gelişmesi için, hücre çoğalması ve farklılaşmasını etkileyen faktörlere ihtiyaç duyulur. Bu maddeler büyüme faktörleri (*Growth Factors*) veya koloni oluşmasını sağlayan faktör (*Colony Stimulating Factor /CSF*) olarak isimlendirilirler (3, 6, 18). CSF'ler, glikoprotein grubu maddelerdir. GM-CSF, CSF'ler içerisinde en çok tanınanlardandır. Bazı çalışmalarda (6, 40, 58, 64, 65), GM-CSF'nin sadece myeloid progenitörlerinin nötrofillere farklılaşmasında etkili olmayıp, aynı zamanda olgun nötrofillerin bir takım fonksiyonlarının etkileşmesinde de rol oynadığı belirtilmektedir. Reddy ve ark. (58), dexametazon ile immün sistemi baskılanmış danalardan elde edilen PMNL'lerin fagositik ve bakterisidal aktivitelerinde meydana gelen inhibisyonun, aynı hücrelerin in vitro ortamda rekombinant GM-CSF ile inkübe edilmeleri sonucunda ortadan kalktığını bildirmektedirler. Diğer taraftan, eksojen rbGM-CSF uygulamalarının meme bezinden ve kandan izole edilen PMNL'lerin kemotaksis, *degranülasyon* ve süperoksit anyon üretimi gibi fonksiyonlarında önemli artışa neden olduğu, bu nedenle proflaktik ve terapötik amaçla kullanılabilceği öne sürülmektedir (45, 65).

Nötrofilik granülositlerin kök hücrelerinden farklılaşmaları esnasında myelosit seride ilk belirlenebilen olgunlaşmış hücre, myeloblasttır. Sonraki aşamalarda premyelositler, myelositler ve sonuç olarak spesifik granülleri

bünyesinde bulunduran nötrofilik granülositler şekillenir (37). Nötrofillerin bu farklılaşma basamaklarında, makrofajlar ve endotel hücreleri tarafından üretilen G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), T lenfositler tarafından üretilen GM-CSF ve IL-3 (*Interlökin-3*) gibi büyüme faktörleri etkin bir rol oynar (6, 18).

2.2.2. Nötrofillerin Yapısal Özellikleri

Nötrofiller, kandaki lökositlerin % 60-70'ini oluştururlar. Çapları 12-15 µm olup, nükleusları ince kromatin iplikçikleri ile bağlanan 3-5 lop içerirler. Tam olgunlaşmamış nötrofiller, loplanma göstermeyip at nalı biçiminde nükleusa sahiptirler (37).

Nötrofiller, iki tür granül grubu içerirler. Bunlar azurofil (primer) ve spesifik (sekonder) granüller olup; morfolojileri, içerikleri ve orijin zamanları bakımından farklılık gösterirler (28, 66).

Azurofil granüller daha büyüktür. Premyelosit safhasında yapırlar ve hidrolitik enzimler, myeloperoksidaz, elastaz ve katyonik proteinleri içerirler. Sekonder granüller ise daha küçük yapıli olup myelosit safhada oluşurlar, lizozim ve laktoferrin içerirler. Özellikle azurofil granüller, morfolojik açıdan belirli türler için karakteristik yapı sergilerler (28). Hücrelerin metamorfozları esnasında mitokondriler, sayı ve hacim bakımından azalır. Glikojen partikülleri sitoplazmada yaygın bir şekilde birikir. Ribozomlarda ve endoplazmik retikulumda sayısal bir azalma görülür. Enerji üretimi için glikolizis ön planda yer alır (37, 80).

2.3. Mikroorganizmaların Savunma Sistemleri

Fagositik hücrelerin fonksiyonları çeşitli maddeler tarafından etkilenir. Biyolojik, bakteriyel ve viral komponentler, yangısal reaksiyon süresince fagositlerin fonksiyonlarında etkili olabilirler. Bakteriler, fagositik hücreler tarafından tanınmamak ve bakterisidal aktiviteden korunmak için kapsül, endotoksin, sitotoksin ve enzim gibi fagositozu önleyici elemanlara sahiptirler. Bazı viruslar bakteriyel enfeksiyonlar için predispozisyon yaratırken, bir kısım

viruslar ise immün sistem hücrelerini uyararak sentezlettirdikleri interferonlar ve lenfokinler yardımı ile bakteriyel enfeksiyonların seyrini olumlu yönde etkilerler. Bütün bu unsurlar, yangısal reaksiyonlar sırasında fagositik hücrelerin aktivitesinde artma veya azalma nedenidir (28).

2.3.1. Bakteri Kapsülleri

Kapsüler yapı, muhtemelen hidrofilik özelliğine bağlı olarak, bakterinin fagositler tarafından tanınmasında oldukça önemli olan yüzey yapılarını maskeler. Böylece bakterinin intrasellüler vakuollere alınması olayı (*ingestion*) şekillenemez (30). Ayrıca kapsüler materyal, fagositik hücre aktivitesini engelleyebilir. Mesela, *Pasteurella multocida* Tip A' nın kapsülünde bulunan bir faktör, sığır PMNL'lerinin *Staph. aureus*'u fagosite etmesini engeller (60, 70). Kapsül, ayrıca komplement sistemi tarafından bakterinin *opsonizasyon* 'una müdahale eder. Kapsüllü *E. coli* türlerinin belirli tipleri spesifik antikorların bulunmadığı durumlarda komplementi bağlamazlar. Böylece *opsonizasyon* gerçekleşemez. Bakteri kapsülünün antifagositik aktivitesi ancak spesifik antikorlar tarafından önlenir (30).

2.3.2. Bakteri Hücre Duvarı

Bakteri hücre duvarı komponentlerinin bazıları fagositik hücre fonksiyonlarını etkiler. Bir hücre duvarı komponenti olan peptidoglikan, komplement sistemi aktive eder. Ancak PMNL ve MN'lerin peptidoglikan ile inkübasyonları sonucunda fagositik ve kemotaktik aktivitenin baskılandığı görülmüştür (57). *Staph. aureus* türleri tarafından üretilen protein A, Ig'lerin Fc kısımlarını bağlayarak *opsonizasyon*'a engel teşkil eder (21).

2.3.3. Bakteri Sitotoksinleri ve Enzimleri

Belirli bakteri tipleri, konakçı savunma sistemlerini etkileme özelliğine sahip bazı maddeler salgırlar. Bu tip ajanlar duyarlı hücrelerin membranlarına ve subsellüler organellerine etkiyerek hasara ve permeabilite bozukluklarına yol açarlar

(31). *Streptolisin S*, *streptolisin O*, *streptokokal α-toksin* bu tür etki yapan maddelerin başında yer alır (4).

Bakteri sitotoksinleri, nötrofillerin yapışabilme özelliklerini de arttırarak agregasyonlarına sebep olurlar, ve kemotaksis'i inhibe ederler (8). Bakteriyel sitotoksinlerin başlıcaları; *Strep. pneumonia*'dan sentezlenen *pneumolisin*; *Pseudomonas aeruginosa*'dan sentezlenen *leukosidin*, *Clostridium tetani*'den sentezlenen *tetanolin*'dir.

Çeşitli bakteriler tarafından üretilen enzimler, fagositoz esnasında fagositler tarafından sentezlenen toksik oksijen ürünlerini nötralize ederler. Mesela, *streptokoklar* tarafından üretilen katalaz, intrasellüler olarak sentezlenen H_2O_2 'nin etkisini ortadan kaldırır (47). *E. coli* türleri süperoksit dismutaz aktivitesi ile O_2^- 'nin etkisine direnç gösterirler (26).

2.4. Fagositik Fonksiyon Bozukluğu ile Karakterize Hastalıklar

2.4.1. Kronik Granülomatöz Hastalıklar

Bu tip hastalıklardaki disfonksiyon durumu, bakterisidal aktivitenin gerçekleşmesinde rol oynayan bazı enzimlere bağlı olarak şekillenir. Bu açıdan en önemli enzim NADPH oksidaz'dır. Bu enzimin yetersizliği sonucunda, nötrofil ve makrofaj metabolizmasında aksamalar olur. Sonuçta intrasellüler öldürebilme yeteneği azalır (13).

2.4.2. Cheidak-Higashi Sendromu

Fagositik fonksiyonların bozulması ile beliren kalıtsal bir hastalıktır. Fagositik aktivite yetersizliği, lizozomal membranların fragilitesine bağlı olarak oluşur. *Degranülasyon* uygun şekilde gerçekleşemez ve intrasellüler öldürme süresi uzar. Bu esnada, lizozomların parçalanması ile enfeksiyon sahasında doku hasarı şekillenir. Bu sendromu taşıyan bireylerin çok azı ancak puberteye kadar yaşayabilmektedirler (69).

2.5. Kloramfenikol

Kloramfenikol, 1947'de *Streptomyces venezuelae* kültürlerinden elde edilmiş amino asit yapılı bir maddedir. İlaç, kloromisetin olarak da bilinir. Kloramfenikol molekülü aromatik halkaya bağlanmış (para-durumunda) bir nitro grubu ve dikloroasetamid grubu taşır. Ekonomik olması sebebiyle, kloramfenikol bugün hemen tümüyle sentetik olarak hazırlanmaktadır. Kloramfenikol'ün sadece D-threo şeklinin bakteriler üzerinde etkinliği olan, 4-stereo izomeri vardır. Para-durumundaki nitro grubunun, -orto- veya -meta- durumuna kayması veya bunun yerine halojenlerin geçmesi, ilacın etki gücünde biraz azalmaya sebep olur. Bakteriler üzerindeki etkinliği için propandiol D-threo stereo-izomerinin bütünlüğünü koruması zorunludur. İster sentetik ister doğal elde edilmiş olsun, kloramfenikol beyaz veya gri-sarı renkte, acı lezzetli, suda az, organik çözücülerde iyi çözünen, kristalize bir tozdur. Kloramfenikol molekülünün birincil alkol grubunun esterleştirilmesi ile elde edilen kloramfenikol palmitat kokusuz, tatsız, suda çözünmeyen ve alkolde çözünebilen, kristalize bir tozdur (68).

Özellikle beşeri hekimlikte yaygın bir kullanım alanı olan kloramfenikol, Veteriner hekimliğinde ise sadece eti ve sütü insan gıdası olarak değerlendirilmeyen hayvanlarda kullanılmaktadır. *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitis*, *Strep. pneumonia* gibi bakterilere karşı bakterisid aktivite gösterir. *H. influenza*'dan ileri gelen pediatrik enfeksiyonların, aneorob enfeksiyonların, meningitisin, beyin apseleri ve riketsiyal enfeksiyonların ayrıca salmonellozisin sağıtımında başarıyla kullanılır (19, 32, 39, 61).

Kloramfenikol'ün etki mekanizması, duyarlı bakteride 50S'lik ribozomal alt üniteye bağlanarak, protein sentezininin inhibe edilmesi esasına dayanır (19, 32, 61).

2.5.1. Farmakokinetik

Kloramfenikol ağızdan, parenteral ve haricen uygulanır. Ağızdan verilmesini takiben sindirim kanalından hızlı ve hemen hemen tama yakın oranda emilir; esterleri halinde uygulandığında, sindirim kanalında önce hidrolize uğrar ve kloramfenikol serbest kalır. Bu yolla verilmesini takiben 1-2 saat içerisinde pik plazma yoğunluğuna ulaşır ve plazmadaki yarı ömrü saat olarak koyunda 1.7, domuzda 1.3, keçide 2'dir. Sığırdada ise 2.50-5.33 arasında değişmektedir (14, 17). Fakat yeni doğanlarda, karaciğer hastalıklarında, portal hipertansiyonlu hastalarda ve septik şok olgularında ilacın yarılanma ömrü uzar (19).

Kloramfenikol sodyum süksinat halinde kas içi ve damar içi olarak kullanılır. Köpek, kedi, keçi ve taylarda damar içi yolla 22 mg/kg dozda uygulandığında, ilacın plazma yarılanma ömrü taylarda 55 dk., kedilerde yaklaşık 5 saat ve diğerlerinde bu iki değer arasındadır. İlacın kas içi yolla verilmesini takiben, uygulama yerinden emilmesi düzensiz olduğundan plazma ilaç yoğunlukları önceden kestirilemez (68). Dagorn ve ark. (14), bir çalışmalarında 30 mg/kg dozunda kloramfenikol'ün damar içi yolla uygulanışından iki dakika sonraki konsantrasyonunu 90.24 mcg/ml olarak bildirmektedirler. Bu düzeyin 6 saat içerisinde duyarlılık limitinin altına düştüğü kaydedilmektedir. Aynı çalışmada 30 mg/kg dozunda kloramfenikol'ün kas içi uygulamasından sonra en yüksek ilaç konsantrasyonunun 13.90 mcg/ml olarak tespit edilmiş olduğu, 7 saat içerisinde de 4.16 mcg/ml'ye düştüğü görülmektedir. Kloramfenikol'ün taylarda 50 mg/kg düzeyinde oral kullanımı sonucunda, 6.1 mcg/ml'lik maksimum serum konsantrasyonuna birinci saatte ulaşıldığı, serum kloramfenikol düzeyinde oluşan azalmanın sekizinci saatte 0.4 mcg/ml seviyesine düştüğü bildirilmiştir (50). Dotter ve ark. (17), tarafından gerçekleştirilen diğer bir araştırmada ise, 17.4-23.6 mg/kg dozunda kloramfenikol'ün deri altı yolla uygulanmasından sonra maksimum plazma konsantrasyonlarının 2.7-4.6 mcg/ml seviyelerinde olduğu belirtilmiştir. Kloramfenikol'ün damar içi ve deri altı uygulamalarından sonra elde edilen plazma-konsantrasyon zaman grafiklerinde karakteristik çift kompartmanlı model, kas içi uygulamalarında ise tek kompartmanlı model izlenmektedir (14).

Kloramfenikol vücudun tüm doku ve sıvılarına dağılır; hücrelere kolay girer, karaciğer, böbrek ve safrada yüksek yoğunluklarda bulunur. Kan-beyin engelini kolay geçer. İlaç, plasentayı da kolay aşar ve yavru kanında, annedekinin % 75 yoğunluğuna ulaşır. Göğüs ve karın zarı boşlukları ile göz sıvısına kolay ve etkili yoğunluklarda geçer (68).

Kloramfenikol vücutta başlıca karaciğerde glukuronik asit ile birleşerek metabolize edilir. Kendisi ve metabolitleri böbreklerden hızla atılır. Köpeklerde uygulanan bir dozun % 55 kadarı ilk 24 saat içerisinde idrarla atılır ve bunun sadece % 6 kadarı etkin haldedir. Diğer yandan köpekte, etkisiz ilaç metabolitlerinin önemli bir kısmı nitro grubunun indirgenmesi ile oluşan aromatik aminler halinde safra ile çıkarılır. Kloramfenikol az miktarda süte de geçer (16, 68).

Kloramfenikol'ün etkili plazma yoğunluğu 5-10 mcg/ml arasındadır. Kloramfenikol toz, süspansiyon, tablet ve kapsül şeklinde ağızdan; sulu, yağlı ve polietilen glikolle hazırlanmış çözeltileri şeklinde kas içi ve damar içi (yağlı çözeltileri kullanılmaz) yolla; merhem ve sübye şeklinde haricen uygulanır. İlaç palmitat esteri halinde küçük hayvanlara ağızdan 11-55 mg/kg dozlarda, günde dört sefer verilir. Kloramfenikol'ün sodyum süksinat tuzu da sığırdan paranteral olarak günde 10-50 mg/kg CA düzeyinde kullanılır. Bu doz genellikle sabah-akşam olmak üzere 12 saat ara ile uygulanır (10, 17, 27, 48, 59, 68).

2.5.2.Toksik Etkileri

Kloramfenikol'ün en iyi bilinen üç toksik özelliği aplastik anemi, gri sendromu ve kemik iliği supresyonudur. Ağız yolundan kullanımı sonucu oluşan fatal aplastik anemi insidensi 1/24.500-1/40.800'dür. Damar içi uygulama ile meydana gelen aplastik anemi insidensi ise bilinmemektedir. Aplastik anemi, ilacın lokal kullanımı sonrasında da oluşabilir (19, 46). Kloramfenikol'ün oftalmik kullanımına bağlı olarak şekillenen aplastik anemi olguları da bildirilmiştir (19). Bu nedenle oftalmik preparatlarının, daha çok diğer antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlarda kullanılması öğütlenmektedir.

Gri sendromu; abdominal şişkinlik, deride solgunlaşma-siyanozis ve dolaşım kollapsı ile karakterizedir. Genellikle yeni doğanlarda kloramfenikol'ün yüksek dozda ve uzun süre kullanımına bağlı olarak şekillenir. Karaciğer fonksiyonu normal olanlarda, tedavi dozlarında gri sendromunun oluşmadığı kaydedilmektedir. Sendrom oluşumunun, hücreye geçen yüksek düzeydeki kloramfenikol'ün mitokondriyal elektron taşınmasını engellemesi sonucu geliştiği ileri sürülmektedir (19, 46). Reversibl kemik iliği supresyonu ise retikülositopeni, trombositopeni, kemik iliği myeloid/eritroid oranında ve hemoglobin düzeyinde artış ile seyreder (19).

Kloramfenikol'ün bu hematotoksik etkilerinden başka gastrointestinal disfonksiyon, dolaşım kollapsı ve kardiyomiyopati gibi yan etkileri de mevcuttur. Burrows ve ark. (12), kloramfenikol uygulanması ile hayvanlarda şekillenen perakut kardiyovasküler bozuklukların, taşıt madde olarak kullanılan propilen glikolden ileri gelebileceğini bildirmektedirler. Diğer taraftan uzun süreli kloramfenikol alımının kan ve kemik iliği üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada (48), altı hafta boyunca günlük 20 mg/kg ve 60 mg/kg dozunda ilaç uygulanan ineklerde, hematolojik değerlerin kontrol grubuna göre farklı olmadığı belirtilmektedir.

2.5.3. Kloramfenikol'ün Nitro-Redüksiyon Metabolitlerinin

Myelotoksik Özellikleri

Yaygın görülen ve doza bağlı olarak gelişen reversibl kemik iliği supresyonu ile, nadiren meydana gelen ancak bireyin ölümü ile sonuçlanan aplastik anemi, kloramfenikol'ün iki önemli toksik etkisidir. Reversibl kemik iliği supresyonunun, mitokondriyal tahribatın bir sonucu olabileceği pek çok araştırmacının ortak görüşüdür (73, 74, 75, 76). Zira tedavi dozunda kullanılan kloramfenikol'ün, insan ve tavşan kemik iliği hücrelerinden izole edilen mitokondrilerde protein sentezini tamamen durdurduğu ve mikroskopik lezyonlara sebep olduğu belirlenmiştir (19, 46, 73, 75, 76). Bununla beraber kloramfenikol'ün

yapısal analogu tiamfenikol'ün de mitokondrilerde protein sentezini engellemesi ancak aplastik anemiye yol açmaması, dikkatlerin kloramfenikol'ün yapısında bulunan p-nitro grubu üzerinde yoğunlaşmasına sebep olmuştur (73, 77). Bir araştırmada (78), p-nitro kökünün memeli dokusunda metabolik transformasyona uğradığı görülmüş ve insan taze karaciğer dokusunun p-nitro grubunu, redüksiyona uğratabilme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarda (1, 73), 50 mcg/ml (1.6×10^{-4} M) düzeyindeki kloramfenikol'ün in vitro ortamda myeloid koloni yapan hücrelerin (CFU-C) gelişimini reversibl olarak % 62 düzeyinde inhibe ettiği, kemik iliği hücrelerinin canlılık aktivitelerine herhangi bir etkisinin bulunmadığı bildirilmektedir. Bunun aksine, nitrosokloramfenikol (NO-CAP)'ün 5×10^{-5} M (15 mcg/ml) gibi düşük seviyelerde, CFU-C gelişimini tamamen durdurduğu ve inhibisyonun irreversibl olduğu belirtilmektedir (74). Diğer taraftan, insan kemik iliği hücrelerinin 5×10^{-5} M NO-CAP ile 48 saat inkübasyonu ile hücrelerin % 50'sinin öldüğü bildirilmektedir (74, 78). Bu oranın, 3×10^{-4} M (97 mcg/ml) NO-CAP ile yapılan denemelerde 24. saatte % 85'e, 48. saatte ise % 90'a ulaştığı ayrıca kemik iliğindeki lenfoblastoid serisi hücrelerin (Raji hücresi) 3×10^{-5} M (9 mcg/ml) NO-CAP ile 24 saat inkübasyonu neticesinde hücre sikluslarının G_2M fazında durduğu ve hücre ölümlerinin arttığı ileri sürülmektedir (74).

Kloramfenikol'ün 1×10^{-3} M (323 mcg/ml) gibi çok yüksek düzeylerde, insan kemik iliği hücrelerinde DNA sentezini reversibl olarak inhibe ettiği, NO-CAP'ın ise $1.5-2 \times 10^{-4}$ M (45-60 mcg/ml) konsantrasyonlarda % 40-50, $3-4 \times 10^{-4}$ M' de (97-130 mcg/ml) ise % 80-90 oranlarında inhibisyona yol açtığı belirtilmektedir (73, 76, 77). Bu yönde gerçekleştirilen diğer çalışmalarda (49, 78) ise, NO-CAP'ın in vitro ortamda izole *E. coli* DNA'sının çift sarmal yapısında kopma ve kırılmalara yol açtığı, 5 mM' den yüksek konsantrasyonlardaki NO-CAP'ın 30 dk. içerisinde DNA'nın asitte çözünen fragmentlerinde tespit edilebilir düzeyde tahribat yaptığı, 100 mM konsantrasyonda ise DNA'da tamamen hidroliz meydana getirdiği bildirilmektedir. Yunis ve ark. (79), NO-CAP'ın düşük konsantrasyonlarda (0.05-0.1 mM) Raji hücrelerinde ve fitohemaglutinin ile uyarılmış normal insan

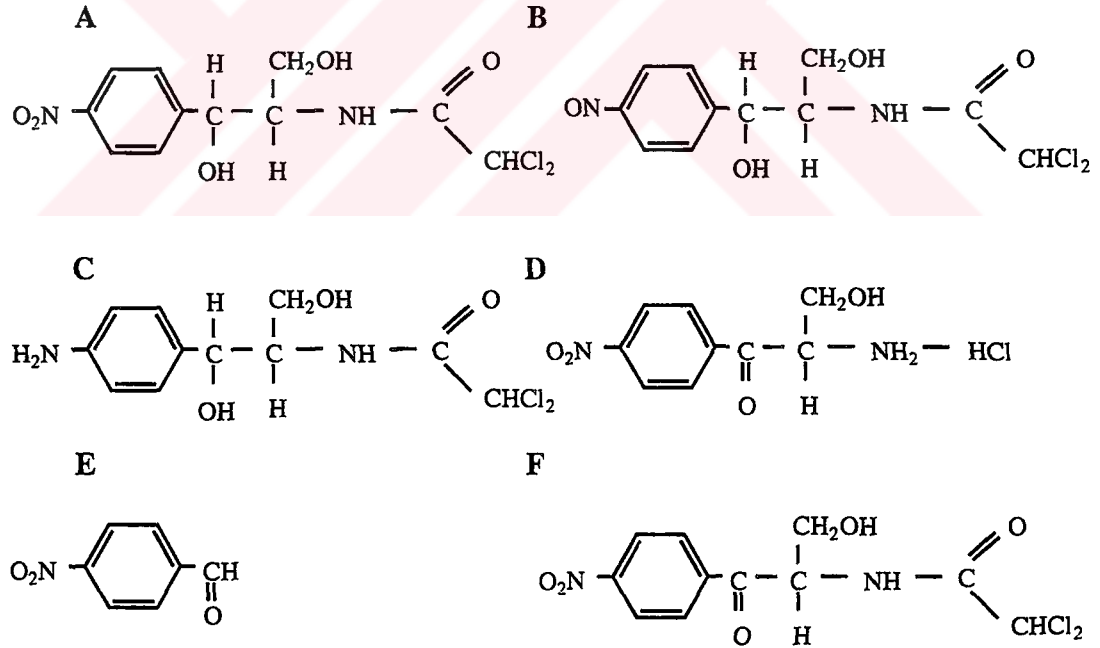
lenfositlerinde DNA hasarı (çift sarmal yapıda bozulma) yaptığı, kloramfenikol'ün ise benzer etkileri ancak 2 mM (646 mcg/ml) düzeyinde yapabildiğini belirtmektedirler.

2.5.4. Kloramfenikol'ün Barsak Bakterileri Tarafından Oluşturulan Metabolitlerinin Myelotoksik Özellikleri

İn vitro denemelerde NO-CAP'ın, ana bileşiğinden daha toksik olduğu görülmektedir (74, 77, 79). Ancak bu maddenin toksik etkilerinin oluşabilmesi için kemik iliği gibi hedef organlarda birikmesi gerekir. Abou-Khalil ve ark. (2), kloramfenikol ve metabolitlerinin kan ve karaciğer dokuları ile 37 °C' de 30 dk. inkübe edilmesi sonucunda kloramfenikol'ün her iki dokuda da dayanıklılığını koruduğunu belirtmişlerdir. Araştırmada ayrıca, barsak bakterileri tarafından oluşturulan metabolitlerden dehidrokloramfenikol (DH-CAP)'ün 5 dk.'ya kadar yapısını koruduğu, inkübasyon sonunda ise kanda % 50, karaciğer homojenatında da % 70 oranında mevcudiyetini devam ettirdiği bildirilmiştir. Nitrofenilaminopropanedion (NPAP)'un DH-CAP'tan daha hızlı parçalandığı, NO-CAP'ın ise tamamen tahrip olduğu ifade edilmiştir. Sonuç olarak, NPAP ve DH-CAP'ın kemik iliği ve diğer hücresele komponentlerle etkileşmeye yetecek bir zaman dilimi süresince dolaşımında kalabilecekleri vurgulanmıştır.

Kloramfenikol'ün, barsak bakterileri tarafından oluşturulduğu bilinen (34, 35) üç grup metaboliti vardır: Bunlar, aminokloramfenikol (N₂H-CAP), p-nitrobenzaldehid (PNBA) ve p-nitro-fenil-2-amino-3-hidroksi-propan-HCL (NPAP) ile dehidro-kloramfenikol (DH-CAP)'dür. Isildar ve ark. (34) bir çalışmada, kloramfenikol, DH-CAP, NPAP ve NO-CAP'ın myelotoksik özelliklerini incelemişler; DH-CAP ve NPAP'ın kloramfenikol'den daha toksik olduğunu, DH-CAP'ın toksisitesinin ise NO-CAP ile eşdeğerde olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca 1x10⁻⁴ M'den daha düşük konsantrasyonlardaki DH-CAP'ın granülosit-makrofaj kolonilerinin (GM-CFU) gelişimini total olarak inhibe ettiği, insan kemik iliği hücrelerinde DNA sentezini % 80 oranında önlediğini belirtmişlerdir. İnsan kemik iliği hücrelerinin 1x10⁻⁴ M'den daha düşük düzeyde NO-CAP veya DH-CAP ile 24

saat inkübe edilmesi sonucunda ise, % 65-75 oranlarında ölü hücre tespit edildiği belirtilmektedir. Buna göre de, DH-CAP'ın kloramfenikol'den 10-20 kat daha sitotoksik özelliğe sahip olduğu ifade edilmektedir. Bir diğer çalışmada (35) da, hematopietik sistem hücrelerinin gelişmeleri üzerinde belirleyici bir unsur olan koloni stimüle edici faktörlerin (GM-CSF, G-CSF) yapımının, hücrelerin canlılığı etkilenmeksizin DH-CAP tarafından engellendiği belirtilmektedir. Kloramfenikol ve NPAP'nin bu yönde bir etkisi görülmezken, kloramfenikol'ün insanda GM-CFU üzerindeki inhibitör etkisinin, inkübasyon ortamına eklenen rhGM-CSF ve rhG-CSF tarafından tamamen ortadan kaldırıldığı, DH-CAP'ın aracılık ettiği GM-CFU inhibisyonu üzerinde ortama eklenen CSF'nin ise hiçbir etkisinin görülmediği bildirilmektedir. Çalışmada ayrıca, DH-CAP gibi bazı kloramfenikol metabolitlerinin, bir taraftan hematopietik sistem hücrelerinin gelişimini, diğer taraftan da CSF üretimini engelleyerek çift yönlü toksik etki yaptıkları ileri sürülmektedir.



Şekil 1. Kloramfenikol ve Metabolitleri.(A) Kloramfenikol (B) NO-CAP (C) H₂N-CAP (D) NPAP (E) PNBA. (F) DH-CAP

Isildar ve ark. (32) diğerk bir çalışmada ise, DH-CAP'nın normal hücre DNA'sında hasar oluşturabilme etkinliğinde olduğu; 1×10^{-4} M konsantrasyonda Raji hücrelerinde, aktive edilmiş insan lenfositlerinde ve insan kemik iliği hücrelerinde DNA'nın çift sarmal yapısının bozulmasına yol açtığını bildirmektedirler.

Bu güne kadar yapılan pek çok çalışmada (73, 74, 77, 79) NO-CAP'ın genotoksik ve sitotoksik etkilerinin varlığı ortaya konulmuştur. Herne kadar kloramfenikol insan karaciğer dokusunda aerobik şartlarda redüksiyona uğrayabilirse de, NO-CAP'ın, oluşumundan hemen sonra karaciğer ve kanda parçalandığından kemik iliğinde birikimi söz konusu olmamaktadır (33). Ayrıca, kloramfenikol'n aerobik şartlarda insan kemik iliğinde de nitroredksiyona uğramadığı bilinmektedir (34).

Diğer taraftan DH-CAP'ın p-nitro kökünün insan kemik iliği homojenatında aerobik şartlarda hızla indirgendiği, aynı olayın insandan elde edilen Raji hücrelerinde ve tavşan kemik iliği hücrelerinde de gerçekleşebildiği belirtilmektedir (33, 34). Buna göre, DH-CAP tarafından değişik hücre sistemlerinde oluşturulan sitotoksik özelliklerin şekillenmesinde DH-CAP'ın direkt toksik etkisi kadar hedef hücre tarafından gerçekleştirilen nitroredksiyonun da önemli bir rol üstlenebileceği ifade edilmektedir (2, 3, 35, 49).

2.6. Antibiyotiklerin Fagositik Hücre Fonksiyonları zerindeki Etkileri

Paape ve ark.(56), in vitro olarak β -laktam grubu antibiyotiklerin PMNL fonksiyonları üzerindeki etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarında 1000 mcg/ml düzeyinde karfesilin'in % 11.2, sefapirin'in % 12.8 ve sefasetril'in ise % 23.8 düzeylerinde fagositik depresyona neden olduklarını belirlemişlerdir. Linther ve ark. (44) ise, aynı koşullardaki benzeri çalışmalarında, 1000 mcg/ml düzeyinde sefapirin'in PMNL'lerin fagositoz ve bakterisidal fonksiyonlarında depresyona, hücrelerin morfolojik yapılarında da bozulmalara neden olduğunu belirtmektedirler.

Aminoglikozid antibiyotiklerden amikasin, tobramisin ve gentamisin'in PMNL fonksiyonları üzerinde önemli derecede baskılayıcı etki gösterdiği öne sürülmektedir (20, 25, 63). İn vitro bir çalışmada (56), 1000 mcg/ml konsantrasyonda tobramisin'in % 21.1, amikasin'in % 15.4, gentamisin'in % 19.2; 500 mcg/ml'de tobramisin'in % 15.9, gentamisin'in % 13.2 oranında depresyon yaptığı; 10 mcg/ml ve aşağı konsantrasyonlarda ise herhangi bir etkisinin görülmediği vurgulanmaktadır. Veneziro ve ark. (72) ise tobramisin, amikasin ve gentamisin'in tedavi dozunda damar içi uygulanması sonucunda PMNL fonksiyonlarında herhangi bir değişikliğin olmadığını ileri sürmektedirler. Paape ve ark. (55), tedavi dozunda meme içi uygulanan gentamisin'in PMNL'lerde % 33 oranında morfolojik bozukluğa neden olduğunu, fagositozu deprese ettiğini, kemotaksise ise etkili olmadığını bildirmektedirler. Nickerson ve ark. (51), 1000 mcg/ml düzeyindeki amikasin'in süttten izole edilen PMNL'lerde % 22.3 fagositik depresyon yaptığını, tobramisin'in ise önemli bir etkisinin bulunmadığını bildirmektedirler.

Paape ve ark. (56), tetrasiklin grubundan minosiklin ve doksisisiklin'in sitotoksik özelliklerinin daha fazla olduğu kanısındadırlar: İn vitro çalışmalarında, 1000 mcg/ml düzeyinde minosiklin'in % 39.8, doksisisiklin'in % 54.2; 500 mcg/ml'de ise minosiklin'in % 20.8, doksisisiklin'in de % 42.8 oranında fagositik depresyon yaptığını tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmalarında da (55), meme içi tetrasiklin uygulanmasından sonra süttten izole edilen PMNL'lerin % 62.9'unda morfolojik yapı bozukluğu belirlemişlerdir.

Peptolit grubu antibiyotiklerin PMNL fonksiyonları üzerindeki etkilerinin incelendiği in vitro bir çalışmada (56), 1000 mcg/ml'de novobiosin'in % 24.5, pristinamisin'in % 22; 500 mcg/ml'de ise pristinamisin'in % 17 oranında fagositik depresyon yaptığı tespit edilmiştir. Benzer şartlarda gerçekleştirilen diğer bir çalışmada (51) ise, novobiosin-penisilin kombinasyonunun 1000 mcg/ml'de PMNL'lerin fagositoz yeteneğini % 20.6 düzeyinde baskılamak, canlılık aktivitelerini ve morfolojik yapılarını da bozduğu öne sürülmektedir

Makrolid antibiyotiklerden eritromisin'in in vitro şartlarda kemotaksisi inhibe ettiği, askorbat ve tiamin ile birlikte kullanıldığında ise nötrofil hareketlerini arttırdığı bildirilmiştir (5). Nickerson ve ark. (51) ise, eritromisin'in 1000 mcg/ml'de PMNL'lerin fagositoz ve yaşama güçleri üzerinde herhangi bir etkisinin görülmediğini ifade etmişlerdir. Polipeptit ve kinolon grubu ilaçların PMNL fonksiyonları üzerinde bir etkilerinin bulunmadığı kaydedilmektedir (56, 71).

Amfenikol grubu antibiyotiklerden tiamfenikol ve florfenikol'ün PMNL fonksiyonları üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar henüz oldukça azdır.

Paape ve Miller (62), in vitro çalışmalarında 4000 mcg/ml'de; kloramfenikol ve tiamfenikol'ün % 99, florfenikol'ün ise % 76 oranında PMNL'de morfolojik bozukluğa yol açtığını, bunların da önemli bir bölümünün psödopodsuz olduğunu ve sitoplazmik granüllerinin yuvarlaklaştığını rapor etmektedirler. Yine aynı çalışmada, kloramfenikol'ün 2000 ve 4000 mcg/ml'de sırasıyla % 18.6 ve % 16.6 oranlarında fagositik depresyon yaparken; tiamfenikol ve florfenikol'ün aynı dozlarda bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir. Diğer bir araştırmada (55) ise, 5 gr kloramfenikol'ün meme içi uygulanması sonucunda, PMNL'lerin fagositoz yeteneği üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmektedir. Bretzlaf ve ark. (11) da, kloramfenikol'ün 1000 mcg/ml ve daha aşağı düzeylerde, fagositoz üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını ifade etmektedirler.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan Materyali

İn vivo çalışmada, S.Ü.Veteriner Fakültesi deneme ünitesinde bulunan 8-13 aylık ; yedisi dişi, ikisi erkek dokuz adet Holstein-Fresian ırkı sığır kullanıldı.

İn vitro çalışmada, aynı hayvanlara ilaç verilmeden önce alınan kan örneklerinden elde edilen, izole PMNL'ler kullanıldı.

3.1.2. İlaç Materyali

1. Kloramfenikol Sodyum Süksinat (Leukomycin flk., 50 ml'de 4 gr. kloramfenikol'e eşdeğer kloramfenikol süksinat sodyum tuzu, BAYER).
2. Kloramfenikol Sodyum Süksinat (Kemicetine Süksinat flk., her flakonda 1 gr sentetik kloramfenikol levojir'e eşdeğer kloramfenikol süksinat sodyum tuzu, DEVA).

3.1.3. Araç Materyali

1. Vakumlu tüp (10 ml, EDTA'lı).
2. Santrifüj (Heraeus Megafuge 1.0 R)
3. Işık mikroskobu (Leitz Laborlux 12)
4. Floresans Mikroskop (Leitz Ortho Lux-II model, aydınlatma kaynağı olarak HBO 50 ultra basınçlı civa buharı lambası, 520 nm eksitasyon filtresi).
5. Yüksek Basınçlı Likit Kromatografisi (HPLC) Ekipmanı (Schimadzu).
6. Rutin laboratuvar malzemeleri ve cam malzemeler.

3.1.4. Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler

3.1.4.1.Çözeltiler

Stok Kloramfenikol Çözeltisi: 10 mg standart kloramfenikol tartılarak, 100 ml metanolde çözdürüldü.

Standart Çalışma Çözeltisi: Stok çözeltilerden distile su ile 0.5, 1, 2.5 mcg/ml 'lik çözeltiler günlük hazırlandı.

Acridin Orange Çözeltisi: 14 mg Acridin orange, 100 ml Medium 199 içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

3.1.4.2. Kimyasal Maddeler

Sodyum Klorür (Merck), Giemsa (Merck), Metilen Mavisi (Merck), Metanol (Merck), Amonyum Hidrojen Fosfat (Merck), Asetonitril (Merck), Etil Asetat (Merck), Medium 199 (M 4530, Sıgma), Tripan Mavisi (T 8154, Sıgma), Acridin Orange (A 6529, Sıgma), Kloramfenikol (Sıgma), Sabouraud Agar (Oxoid).

3.1.5. Mikroorganizma

PMNL fonksiyonlarının belirlenmesinde S.Ü.Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'dan sağlanan *C. albicans* M 51 suşu kullanıldı.

3.2. Metotlar

3.2.1. İlaç Uygulaması

Sabah-akşam olmak üzere, 12 saat ara ile günde iki kez 10 mg/kg CA dozunda kloramfenikol (Leukomycin) kas içi yolla, beş gün süre ile uygulandı.

3.2.2. Kan Örneklerinin Alınması

Sabah enjeksiyonundan 2.5 saat sonra V.jugularisten vakumlu tüp ile 10 ml kan alındı. Alınan bu örnekler, plazma kloramfenikol konsantrasyonunun

belirlenmesi ve PMNL izolasyonunda kullanıldı. Örnekler, kullanılıncaya kadar, 4 °C'de saklandı.

Kontrol amacıyla ve in vitro çalışmada kullanılacak kan örnekleri, hayvanlara ilaç uygulamasından önce alındı.

3.2.3. PMNL İzolasyonu

İzolasyon, Kabbur ve ark. (38)'nin önerdikleri yöntem esas alınarak yapıldı. Steril koşullar sağlanarak alınan kan örneği 2000 g'de 4 °C'de 15 dk. süre ile santrifüj edildi. Santrifüj tüpünün üst kısmında oluşan plazma alınarak (plazma kloramfenikol konsantrasyonunun tespiti için) - 25 °C'de dipfrizde saklandı. Tüpte kalan plazma kalıntısı iyice uzaklaştırıldıktan sonra, dipteki eritrosit kümesinin üzerine 20 ml steril distile su eklenerek, 40 sn. süre ile hafifçe sallandı ve hemoliz oluşumu sağlandı. Ortamın ozmotik basıncının dengelenmesi için % 2.8'lik NaCl çözeltisinden 10 ml ilave edildi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 200 g'de 4 °C 'de 10 dk. süre ile santrifüj edildi. Santrifüj tüpünün üst kısmında oluşan sıvı faz atıldıktan sonra hücre kümesi, 0.0132 M fosfat tamponlu (pH 6.8) % 0.9'luk NaCl çözeltisinden (PBSS) 35 ml konularak oluşturulan süspansiyon santrifüj edildi. Hücreler iki kez PBSS ile yıkandıktan sonra Medium 199 içerisinde homojenizasyonu sağlandı. Elde edilen hücrelerin canlılık kontrolleri Tripan mavisi boyaması ile, saflık derecesi ise Giemsa boyaması ile belirlendi. Böylece, hücre süspansiyonlarında % 94 canlılık sağlanırken, bu hücrelerin % 92'sinin PMNL, geri kalanlarının ise eozinofil, lenfosit ve monosit olduğu belirlendi. Hemositometre ile sayım yapıldıktan sonra sulandırılarak, 1 ml'lik inkübasyon ortamında 7.5×10^6 PMNL olacak şekilde ayarlandı.

3.2.4. *Candida albicans* Kültürünün Hazırlanması

Katı besi yerinde üretilen *C. albicans* M 51, günlük olarak ihtiyaç oranında sıvı besi yerlerine ekilip 37 °C'de 18 saat süre ile inkübe edildikten sonra; PBSS içerisinde süspansiyon oluşturularak 200 g'de 5 dk. santrifüj edildi.

2×10^{-1} mmol/L oranında metilen mavisi ile yapılan testte (53), canlılık oranları % 99 olarak bulundu. Hemositometre ile sayım yapılarak inkübasyon ortamında, her nötrofile iki adet *C. albicans* M 51 (1.5×10^7 hücre/ml) hücresi düşecek şekilde ayarlandı.

3.2.5. PMNL ile *C. albicans*'ın Birlikte İnkübasyonu

Bu amaç ile Medium 199 içerisinde süspansiyon edilen PMNL'ler (7.5×10^6 nötrofil/ml) ile PBSS'de süspansiyon edilen *C. albicans* M 51 (1.5×10^7 hücre/ml) hücreleri, 1 PMNL'ye 2 *C. albicans* hücresi düşecek şekilde bir tüp içerisinde karıştırıldı. Ortama 200 µl inaktif sıgır serumu (56 °C'de 30 dk.) ilave edilerek toplam hacim 2 ml'ye tamamlandı.

İn vitro çalışmada, inkübasyon tüplerine 4000 mcg/ml, 1000 mcg/ml ve 10 mcg/ml düzeyinde kloramfenikol eklendi. Kontrol tüplerine antibiyotik katılmadı.

İn vivo çalışmada, inkübasyon tüpleri 37 °C'de 1 saat süre ile 4 rpm'de hafifçe çalkalanarak, in vitro çalışmada ise 37 °C'de 1 saat çalkalamaksızın, 1 saat de çalkalanarak su banyosunda tutuldu.

3.2.6. PMNL'lerin Fagositoz ve Mikrobisidal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

PMNL'lerin fagositoz ve mikrobisidal aktivitesi florokrom boyama yöntemi ile belirlendi (9, 43, 44). Buna göre, inkübasyondan sonra 125 µl inkübasyon içeriği üzerine 500 µl Acridin orange çözeltisi ilave edilerek 60 sn. bekletildi. Floresans mikroskopunda; polimorfik çekirdekleri yeşil-sarı floresans veren PMNL'ler ile sitoplazmaları yine yeşil-sarı floresans veren *C. albicans* 'lar canlı kabul edilirken, kırmızı floresans verenler ise ölü olarak değerlendirildi (43, 44).

Her numunedен hazırlanan ikişer preparattan rastgele seçilen bölgelerdeki 200 nötrofilin fagosite ettiği toplam *C. albicans* ile bunların canlı ve

ölü sayıları ayrı ayrı belirlendi. PMNL'lerin fagositik aktivitesi (FA), sayılan 200 nötrofilden fagositoz yapanlarının yüzdesi olarak ifade edildi ve aşağıdaki formül ile hesaplandı (29).

$$FA (\%) = \frac{\text{Fagositoz Yapan Nötrofil Sayısı}}{\text{Sayılan Toplam Nötrofil Sayısı}} \times 100$$

Mikrobisidal aktivite (MA) ise, fagosite edilmiş tüm *C. albicans* miktarının ölü *C. albicans* 'lara oranı dikkate alınarak belirlendi (29).

$$MA (\%) = \frac{\text{Ölü } C. \text{ albicans Sayısı}}{\text{Toplam Fagosite Edilen } C. \text{ albicans Sayısı}} \times 100$$

3.2.7. Plazma Kloramfenikol Konsantrasyonunun Belirlenmesi

3.2.7.1. Kromatografi (HPLC) Şartları

Likit kromatografi (LC-6A Shimadzu), kolon (C18 Shim-pack CLC-ODS), UV-VIS spektrofotometrik dedektör (Shimadzu), yazıcı (CR6A-Chromotopac, Shimadzu), mobil faz: 0.005 M Amonyum hidrojen fosfat-asetonitril (78:22, v/v), dedektör dalga boyu: 278 nm , absorbans: 0.01, kolon akış hızı: 1 ml/dk, yazıcı kağıt hızı: 5 mm/dk.

3.2.7.2. Plazma Örneklerinin Ekstraksiyonu

Plazma ekstraksiyonu, Sanders ve ark. (62) tarafından uygulanan yöntem kullanılarak yapıldı. 1 ml plazma üzerine 5 ml etilasetat ilave edilerek 15 dk süre ile yavaşça çalkalandı. Karışım 5000 rpm'de 5 dk santrifuj edildikten sonra etilasetat fazı alınarak evaporatörde uçuruldu. Kalıntı, 2.4 ml (su:hekzan:kloroform, 1:1:1) karışımı ile çözdürülerek yeniden santrifuj edildi. Üstte oluşan (1 ml) fazdan , 20 µl HPLC'ye enjekte edildi.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Özellikler arası farklılıklar, "eşler arası farkın önem kontrolü (t testi) " metodu ile incelendi. Antibiyotik düzeyi ile ele alınan diğer özellikler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amacı ile korelasyon katsayıları hesaplandı ve önem kontrolü yapıldı (41).



4. BULGULAR

İn vitro, 10 mcg/ml ve 1000 mcg/ml kloramfenikol düzeylerinde PMNL'lerin fagositoz ve mikrobisidal aktivitelerinde bir değişiklik görülmezken, sadece 1000 mcg/ml düzeyinde, nötrofil başına düşen canlı *C. albicans* sayısının arttığı tespit edildi (Tablo 1 ve Grafik 3). 4000 mcg/ml düzeyinde ise, PMNL'lerin bu her iki fonksiyonunda da önemli oranda azalmanın olduğu belirlendi (Grafik 1). Fagosite edilen *C. albicans* sayısı ve kloramfenikol düzeyi yönünden bakıldığında; 10 mcg/ml ve 1000 mcg/ml düzeylerinde kloramfenikol'ün fagositoz yeteneği üzerinde bir etkisi görülmezken, 4000 mcg/ml'de önemli oranda azalma tespit edildi (Tablo 1, Grafik 5).

İn vivo, 10 mg/kg CA dozunda kloramfenikol'ün kas içi uygulamasından 1 gün sonra alınan kan örneğinde ortalama plazma kloramfenikol konsantrasyonu 1.59 ± 0.26 mcg/ml, 5. günde ise 2.59 ± 0.29 mcg/ml olarak belirlendi (Tablo 2 ve Grafik 7). PMNL'lerin fagositik aktiviteleri ilk günden itibaren önemli derecede azaldı (Grafik 2). PMNL'lerin fagositoz yeteneğinde meydana gelen azalma 4. ve 5. günde birbirine yakın bulundu (Tablo 2). Mikrobisidal aktivite de ise, ilk günde oluşan inhibisyon 2., 3., 4. ve 5. günlerde benzer oranlarda seyretti (Tablo 2 ve Grafik 2).

Değişik sayılarda *C. albicans* ihtiva eden PMNL yüzdelerinde (%) ve herbir PMNL'ye düşen *C. albicans* sayılarında ilk günden itibaren azalmanın görüldüğü kaydedildi (Tablo 2, Grafik 4 ve 6).

Plazma kloramfenikol konsantrasyonu ile, PMNL aktiviteleri arasındaki ilişkiler (r) Tablo 3'de, plazma kloramfenikol kromatogramları Şekil 2 ve 3'de, inkübasyon sonrasında PMNL ve *C. albicans*'a ait floresans mikroskopik görüntüler ise Resim 1a ve 1b'de görülmektedir.

Floresans mikroskopik incelemelerde nötrofiller tipik parçalı çekirdekli görünümüleri ile, *C. albicans* 'lar ise yuvarlak şekilli mikroorganizmalar halinde

kolayca tanındılar. PMNL'lerin canlı olanlarının çekirdekleri **yeşil-sarı**, ölü olanların ise **kırmızı** floresans vermekteydi (Resim 1a). Aynı mikroskop sahasında fagositoz yapmamış nötrofillere rastlandığı gibi, bir ve daha fazla sayıda *C. albicans* fagosome etmiş PMNL'lere de rastlandı (Resim 1b).



TABLO 1 : İn Vitro Değişik Düzeylerde Kloramfenikol'ün PMNL Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kloramfenikol (mcg/ml)	PMNL Fonksiyonları (%)		Fagositoz Yapan PMNL'lerin İçerdikleri C. albicans sayılarına göre % oranları				Herbir PMNL'ye düşen C. albicans sayısı		
	Fagositoz	Mikrob. Akt.	1-2 C. albicans	3-4 C. albicans	5- C. albicans	Total	Ölü	Canlı	
Kontrol	95.50±0.56 a	99.05±0.85 ab	62.39±2.50 a	27.00±2.30 a	2.28±0.67 ab	1.97±0.08 a	1.97±0.08 a	0.00±0.00 c	
10	92.61±0.57 a	99.65±0.23 a	60.72±1.84 a	28.28±1.40 a	2.00±0.57 b	1.91±0.13 a	1.91±0.13 a	0.01±0.00 c	
1000	91.72±0.60 a	98.79±0.29 b	61.17±1.99 a	26.33±1.63 a	3.72±0.80 a	1.88±0.13 a	1.86±0.13 a	0.02±0.01 b	
4000	59.39±2.56 b	95.94±1.19 c	39.17±2.97 b	13.61±1.91 b	2.33±1.13 ab	0.98±0.11 b	0.92±0.10 b	0.06±0.01 a	

(Aynı sütünda farklı harf taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir. (P<0.05))

TABLO 2 : İn vivo, Tedavi Dozunda (10 mg/kg CA.) Kas İçi Uygulanan Kloramfenikol'ün PMNL Aktivitesi Üzerine Etkisi

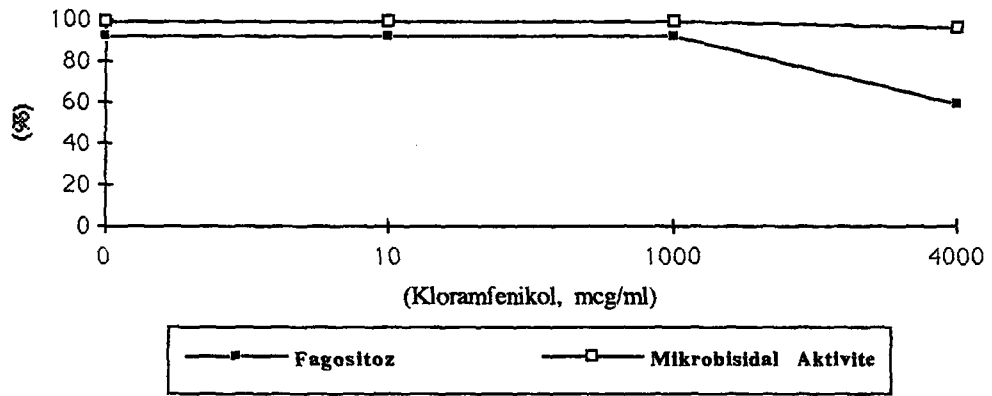
	PMNL Fonksiyonları (%)		Fagositoz Yapan PMNL'lerin İçerdikleri C. albicans sayılarına göre % oranları					Herbir PMNL'ye düşen C. albicans sayısı			Kloramfenikol (mcg/ml)
	Fagositoz	Mikrob.Akt.	1-2 C. albicans	3-4 C. albicans	5- C. albicans	Total	Ölü	Canlı			
Kontrol	95.05±0.22 a	98.62±0.43 a	65.59±2.54 a	26.28±1.62 a	3.33±1.12	1.99±0.08 a	1.97±0.08 a	0.02±0.00 a	0.00±0.00 a		
1. Gün	63.68±3.44 b	77.94±3.68 b	47.07±2.59 b	15.14±1.43 b	1.54±0.21	1.24±0.08 b	0.96±0.09 b	0.28±0.05 b	1.59±0.26 b		
2. Gün	63.42±3.95 bc	75.95±4.18 b	47.03±3.65 bc	14.92±1.06 b	1.47±0.24	1.29±0.06 b	0.98±0.09 b	0.30±0.06 b	2.42±0.21 b		
3. Gün	58.19±5.63 cd	78.36±2.73 b	41.25±5.03 cd	15.06±1.15 b	1.53±0.29	1.19±0.10 bc	0.94±0.11 bc	0.25±0.03 b	2.47±0.37 b		
4. Gün	53.44±1.35 d	74.17±3.81 b	38.44±1.04 d	13.72±0.76 b	1.67±0.18	1.13±0.03 c	0.85 ± 0.06 c	0.31±0.04 b	2.53±0.28 b		
5. Gün	53.69± 1.81 d	76.17±3.07 b	37.99±1.42 d	14.10±1.41 b	1.68±0.54	1.10±0.07 c	0.79±0.10 c	0.31±0.07 b	2.59±0.29 b		

(Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası farklılık önemlidir (P<0.05)).

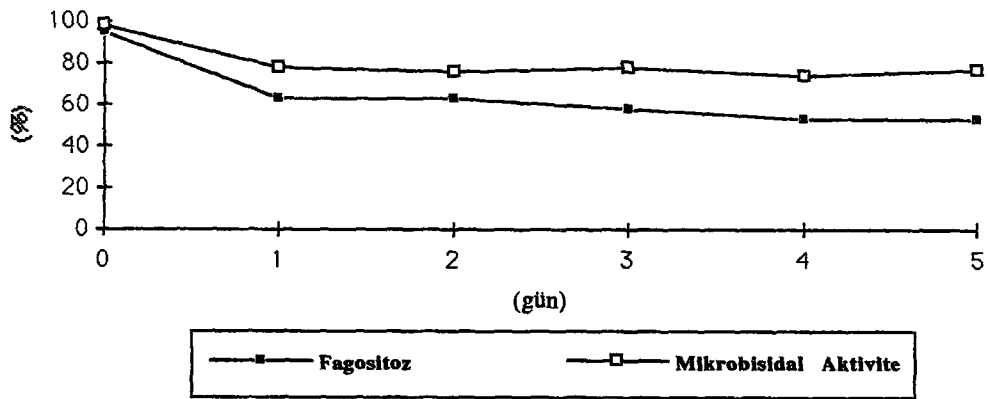
TABLO 3: Plazma Kloramfenikol Konsantrasyonu İle PMNL Aktivitesi Arasındaki İlişkiler (r)

	PMNL Fonksiyonları (%)		Fagositoz Yapan PMNL'lerin İçerdikleri C. albicans sayılarına göre % oranları				Herbir PMNL'ye düşen C. albicans sayısı		
	Fagositoz	Mikrob. Akt.	1-2 C. albicans	3-4 C. albicans	5- C. albicans	Total	Ölü	Canlı	
	1. Gün	0.38	0.61	0.12	0.68	-0.18	0.56	0.62	-0.24
2. Gün	0.25	0.28	0.27	-0.05	-0.07	0.16	0.30	-0.27	
3. Gün	0.37	0.25	0.59	0.49	0.07	0.43	0.41	-0.02	
4. Gün	0.48	0.46	0.35	0.29	-0.47	0.47	0.53	-0.65	
5. Gün	-0.33	-0.33	0.24	-0.53	-0.34	-0.52	-0.47	0.17	

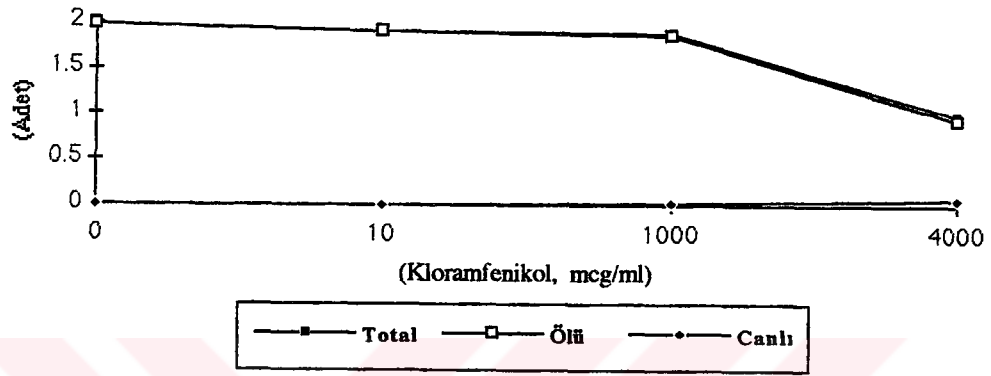
Grafik 1. İn vitro, PMNL'lerin fagositoz ve mikrobisidal aktivite oranları.



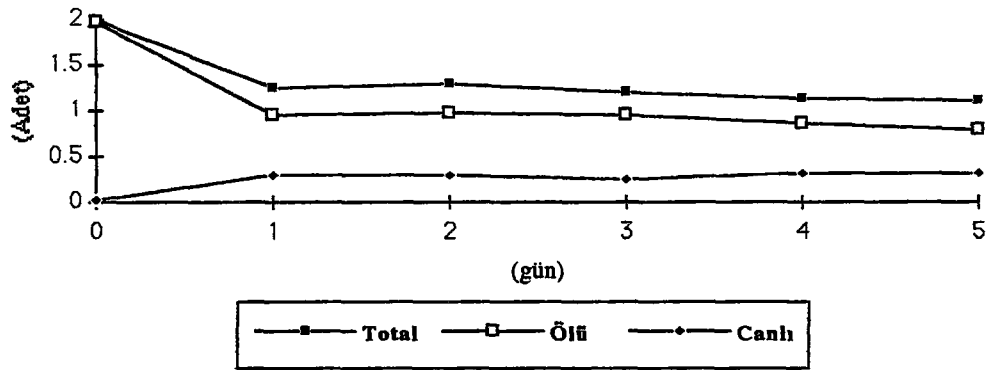
Grafik 2. İn vivo, PMNL'lerin fagositoz ve mikrobisidal aktivite oranları.



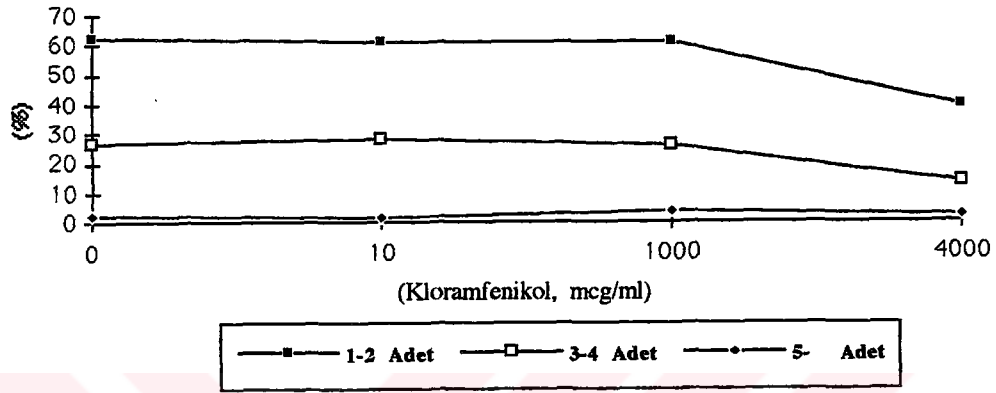
Grafik 3. İn vitro, her bir PMNL'ye düşen fagosite edilmiş total, ölü ve canlı *C. albicans* sayıları.



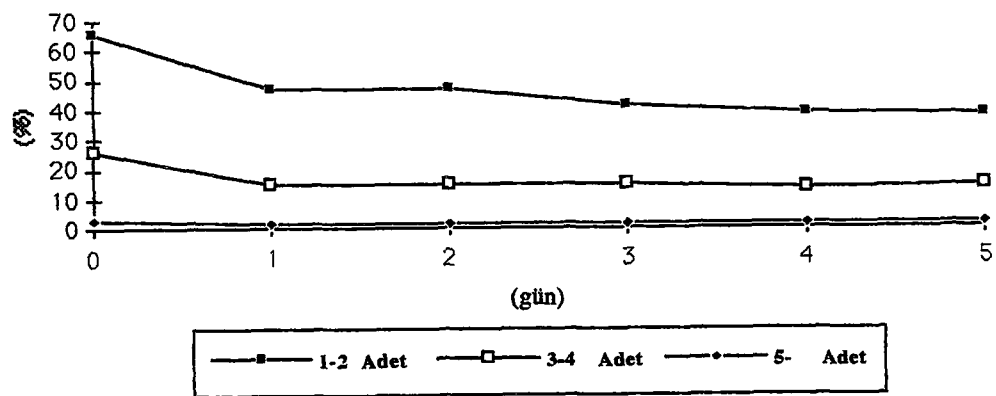
Grafik 4. İn vivo, her bir PMNL'ye düşen fagosite edilmiş total, ölü ve canlı *C. albicans* sayıları.



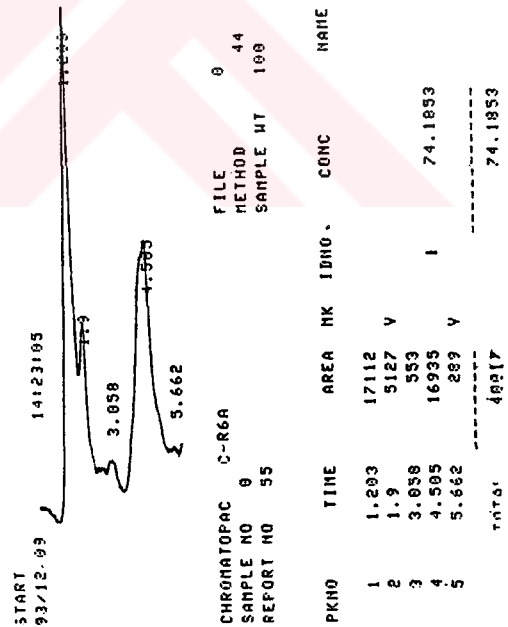
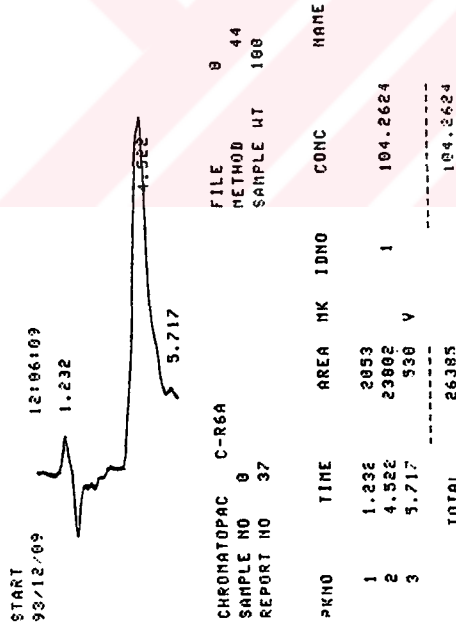
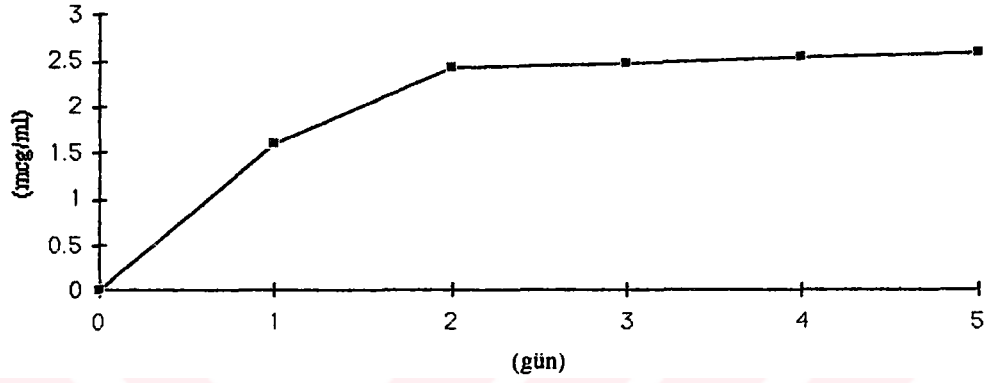
Grafik 5. İ n vitro, değişik sayıda C. albicans fagosite eden PMNL oranları.



Grafik 6. İn vivo, değişik sayıda C. albicans fagosite eden PMNL oranları.

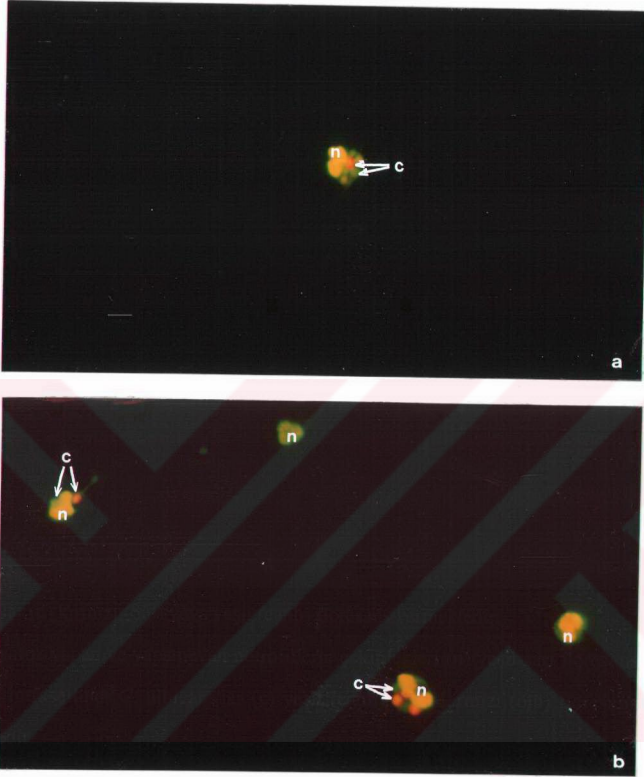


Grafik 7 . Plazma kloramfenikol konsantrasyon eğrisi



Şekil 2. 20 mcl (100 ng) enjeksiyon ile alınan standart kloramfenikol piki.

Şekil 3. 20 mcl numune ekstraktı enjeksiyonu ile plazmada bulunan kloramfenikol piki (74.18 ng).



Resim 1a, b: Sığır Kan Polimorfnükleer Lökositlerinin (PMNL) Floresans Mikroskopik Görünümleri (Acridin orange., x600).

1a: Nötrofilin polimorfik çekirdeği (n) yeşil-sarı floresans verirken; intrasellüler *C. albicans*'lar (c) kırmızı (ölü) veya yeşil (canlı) floresans vermektedir.

1b: Fagositoz yapan ve yapamayan nötrofillerin çekirdekleri (n) yeşil-sarı floresans verirken intrasellüler *C. albicans*'lar (c) yeşil (canlı) veya kırmızı (ölü) floresans vermektedir.

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Tablo 1'de görüldüğü gibi in vitro çalışmada, 10 mcg/ml ve 1000 mcg/ml kloramfenikol'ün PMNL'lerin fagositoz ve mikrobisidal aktivitesi üzerinde bir etkisi görülmezken, 1000 mcg/ml'de her bir PMNL tarafından fagosite edilen ancak canlılığını koruyan mikroorganizma sayısında önemli bir artışın ($P<0.01$), 4000 mcg/ml'de ise hem fagositozda hem de mikrobisidal aktivitede önemli oranda düşüşlerin olduğu görülmektedir. Kontrol grubunda fagositoz % 95.50 ± 0.56 ' iken, 4000 mcg/ml'de bu oran % 59.39 ± 2.56 'dır. Yani normalde 100 PMNL'den 95'i fagositoz yaparken kloramfenikol ilave edildiğinde, fagositoz yapan PMNL sayısı 59'a düşmektedir. Meydana getirilen depresyon (% 37.81) oldukça önemli ($P<0.001$) bulunmuştur. Yine aynı tabloda, mikrobisidal aktivite için değerler; kontrolde % 99.05 ± 0.85 , 4000 mcg/ml'de ise % 95.94 ± 1.19 'dur: Meydana getirilen depresyon (% 3.13) önemli ($P<0.05$) görülmektedir (Grafik 1). Her bir PMNL'ye düşen mikroorganizma sayıları (Grafik 5) ve fagosite edilen mikroorganizmaların öldürülmelerinde (Grafik 3), doz grupları arasında önemli ($P<0.001$) farklılıkların olduğu görülmektedir.

Paape ve ark. (54) in vitro çalışmalarında, 4000 mcg/ml kloramfenikol'ün meme bezinden izole edilen PMNL'lerin fagositozunu % 16.6, 2000 mcg/ml'de % 18.6 deprese ettiğini, 2000 mcg/ml'den daha düşük kloramfenikol yoğunluklarında ise depresyonun görülmediğini bildirmektedirler. Ziv ve ark. (81) aynı koşullarda yaptıkları çalışmalarında bu oranları 4000 mcg/ml'de % 38, 2000 mcg/ml'de % 23 olarak tespit ederken, 10 mcg/ml'de ise istatistiksel açıdan önemli bir etkinlik bulamadıklarını rapor etmişlerdir. Bretzlaff ve ark. (11), in vitro çalışmalarında 5 mcg/ml, 125 mcg/ml ve 1000 mcg/ml kloramfenikol'ün, kandan izole edilen PMNL'lerin fagositoz yeteneği üzerinde bir etkinliğinin olmadığını bildirmektedirler. Nickerson ve ark. (51) ise, in vitro çalışmalarında

4000 mcg/ml kloramfenikol'ün, süttten izole edilen PMNL'lerin fagositozunda % 47 gibi yüksek düzeyde bir baskılamanın olduğunu belirtmektedirler.

Kloramfenikol'ün PMNL bakterisidal aktivitesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Paape ve ark. (54), yukarıda bahsedilen çalışmalarında, 4000 mcg/ml kloramfenikol düzeyinde PMNL bakterisidal aktivitesinin kısmen inhibe edildiğini bildirmektedirler. Yine aynı araştırmacılar (55), in vivo çalışmalarında kloramfenikol'ün meme içi verilmesinden sonra süttten elde edilen PMNL'lerin bakterisidal aktivitelerinde kontrole göre herhangi bir değişikliğin görülmediğini belirtmektedirler.

Bu çalışmada, in vitro 4000 mcg/ml'de tespit edilen fagositoz depresyon oranı (% 37.81) ile Ziv ark. (81)'nin 4000 mcg/ml'de aynı koşullardaki çalışmalarından elde ettikleri depresyon oranı (% 38) benzerlik gösterirken, Paape ve ark. (54)'nin 4000 mcg/ml'de tespit ettikleri oran (% 16.6) ve Nickerson ve ark. (51)'nin yine in vitro 4000 mcg/ml'de elde ettikleri oran (% 47) arasında farklılık görülmektedir. Öte yandan Ziv ve ark. (81) 2000 mcg/ml'de depresyon oranını % 23 olarak belirlerken, Paape ve ark. (54)'da bu düzeyi % 18.6 olarak bildirmektedirler.

Gerek tartışılan çalışmalarda (11, 51, 54, 81), gerekse bu çalışmada 2000 mcg/ml'den daha düşük kloramfenikol yoğunluklarında istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilebilecek bir fagositoz depresyon oranının tespit edilemediği görülmektedir.

Daha önce de bahsedildiği gibi, kloramfenikol'ün PMNL bakterisidal aktivitesi ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Paape ve ark. (54) kloramfenikol'ün, 4000 mcg/ml'de PMNL bakterisidal aktivitesini, *chemiluminescence* düzeyinde baskıladığını bildirmektedirler. *Chemiluminescence*, bakterisidal aktivitenin gerçekleşmesinde bir basamak teşkil edip; PMNL tarafından oluşturulan solunumsal patlama sonucunda meydana gelen süper oksit radikallerinin (O_2^-) ölçülmesi ile belirlenmektedir (54, 55). Hogan ve ark. (29) ise bakterisidal aktivitenin belirlenmesinde, PMNL içerisindeki canlı ve ölü mikroorganizmaların

değerlendirilmesi esasına dayanan ve bu çalışmada da kullanılan Florokrom boyama yöntemi kullanmışlardır. Bu yöntem ile, Vit.E ve selenyumun nötrofil fonksiyonları üzerindeki etkinliklerini tespit etmişlerdir.

Tablo 2 ve Grafik 7' de de görüldüğü gibi in vivo çalışmada, birinci gün 1.59 ± 0.26 mcg/ml olan plazma kloramfenikol konsantrasyonu daha sonraki günlerde tedrici olarak artarak beşinci gün 2.59 ± 0.29 'a ulaşmıştır. Ancak tabloda da görüldüğü gibi, günlere göre konsantrasyonlar arasında istatistiksel bir fark görülmemektedir ($P > 0.05$). Fagositoz oranı, kontrolde $\% 95.05 \pm 0.22$ 'iken, denemede birinci gün $\% 63.68 \pm 3.44$, beşinci gün ise $\% 53.69 \pm 1.81$ tespit edilmiştir. Burada istatistiksel olarak, kontrole göre bütün günlerde önemli bir fark ($P < 0.001$) görülmektedir. Tabloda da görüldüğü gibi kontrole göre bu farklılık, günler arasında değişiklik arz etmektedir: Fagositoz oranı, birinci gün ile ikinci gün aynı, ikinciden itibaren dördüncü güne kadar düşmekte, dördüncü ve beşinci günlerde ise aynı düzeyde seyretmektedir. Mikrobisidal aktivite de ise kontrol ile, günler arasında farklar önemli ($P < 0.001$), ancak günler arasında fark önemsizdir ($P > 0.05$).

Fagositoz ve mikrobisidal aktivite oranları ile plazma kloramfenikol konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki (r) saptanamamıştır (Tablo 3).

Paape ve ark. (55) in vivo çalışmalarında, laktasyondaki bir ineğin her bir meme lobuna 5 gr. kloramfenikol'ün verilmesinden sonra alınan süt örneklerinde, 2. saatte 115.9 mcg/ml, 26. saatte ise 414 mcg/ml kloramfenikol düzeyi tespit etmişler, ancak kontrole göre nötrofillerin fagositoz ve bakterisidal aktivitelerinde herhangi bir değişiklik gözleyememişlerdir.

Tablo 2'de in vivo fagositoz yapan nötrofillerin *C. albicans* sayısına göre $\%$ oranlarına bakıldığında, ilk gün $\% 63.68 \pm 3.44$ oranında fagositoz yapan hücrelerin $\% 47.07 \pm 2.59$ 'unun 1-2 *C. albicans*, $\% 15.14 \pm 1.43$ 'ünün 3-4 *C. albicans*, $\% 1.54 \pm 0.21$ 'inin ise 5 ve fazla *C. albicans* içerdikleri görülmektedir. İkinci günden itibaren 1-2 *C. albicans* 'lı grupta istatistiksel açıdan hem kontrole göre hem de günler arasında önemli farklar ($P < 0.001$) görülmektedir. 3-4 *C. albicans*'lı grupta

kontrole göre fark önemli iken; günler arasında fark görülmemektedir. Beş ve fazla *C. albicans* fagosite eden grupta ise varyasyonun yüksek olması nedeniyle, istatistiksel açıdan fark görülmemiştir. Yine tabloda görülebileceği gibi, günlere göre fagositoz oranları ile 1-2 *C. albicans* fagosite eden PMNL oranları arasında bütünüyle istatistiksel bir benzerlik sözkonusudur. Her bir PMNL'ye düşen *C. albicans* sayıları incelendiğinde, total *C. albicans* açısından kontrolde her bir PMNL'ye 1.99 ± 0.08 *C. albicans* düştüğü, bunun 1.97 ± 0.08 'inin ölü, 0.02 ± 0.0 'ının ise canlı olduğu görülmektedir. Burada dikkati çeken bir nokta da mikrobisidal aktivite oranları ile her bir PMNL'ye düşen canlı *C. albicans* sayıları arasındaki istatistiksel benzerliktir.

İn vitro çalışmada da, in vivo'da olduğu gibi dozlara göre fagositoz oranları ile 1-2 *C. albicans* ve 3-4 *C. albicans* fagosite eden hücre oranları arasındaki istatistiksel ilişkiler, benzerlik göstermektedir (Tablo 1). Her bir PMNL'ye düşen *C. albicans* sayıları incelendiğinde, total *C. albicans* açısından kontrolde her bir PMNL'ye 1.97 ± 0.08 *C. albicans* düştüğü, bunun 1.97 ± 0.08 'inin diğer bir deyişle tamamının öldüğü görülmektedir. Burada total *C. albicans* açısından bakıldığında 10 mcg/ml ve 1000 mcg/ml kloramfenikol yoğunluklarında kontrole göre bir değişiklik görülmezken, 4000 mcg/ml'de bir PMNL'ye düşen *C. albicans* sayısının 0.98 ± 0.11 olduğu ve istatistiksel açıdan önemli ($P < 0.001$) bulunduğu dikkati çekmektedir. Ölü *C. albicans* sütununda da kontrole göre, 4000 mcg/ml'de fark görülmektedir.

İn vitro ve in vivo çalışma sonuçları arasında; fagositoz ve mikrobisidal aktivite yönünden, Tablo 1 ve 2'de değerlendirilmeye alınan PMNL aktiviteleri bakımından önemli farkların olduğu kolayca görülmektedir. Her ne kadar in vivo çalışmada PMNL aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler ile plazma kloramfenikol konsantrasyonu arasında bir ilişki belirlenememiş ise de, in vitro denemelerde bu değişikliklerin, 4000 mcg/ml kloramfenikol yoğunluğunda daha belirgin ortaya çıktığı görülüyor. Oysa, in vivo analizlerde elde edilen en yüksek plazma kloramfenikol yoğunluğu 2.59 mcg/ml düzeyindedir. Burada dikkate

alınması gereken husus, *in vivo* çalışmada PMNL'lerin kloramfenikole sadece kan dolaşımında maruz kaldığıdır.

In vitro çalışmalarda (51, 54) yüksek düzeyde kloramfenikol'ün PMNL fonksiyon ve diğer aktivitelerinde meydana getirmiş olduğu depresyonun nedeni olarak, PMNL'de sebep oldukları morfolojik değişiklikler gösterilmektedir. Elektron mikroskopik inceleme gerektiren bu morfolojik yapı değişiklikleri bu çalışma kapsamına alınamamıştır. Paape ve ark. (54), 4000 mcg/ml kloramfenikol düzeyinde, PMNL'lerin % 99'unda yuvarlaklaşma, % 94'ünde psödopod oluşumunun engellenmesi gibi morfolojik bozukluklar tespit etmişlerdir. Söz konusu bu bozukluklar, kloramfenikol miktarına bağlı olarak değişmektedir. Yine aynı araştırmacılar fagositozun gerçekleşmesinde bir basamak olan filamentlerdeki aktin monomerlerinin bir araya gelmelerinin, kloramfenikol tarafından önlenebileceğini öne sürmektedirler.

Kloramfenikol'ün *in vivo*, kan nötrofilleri üzerindeki etkinliği ile ilgili çalışmaya rastlanılmadı. *In vivo* çalışmalar daha ziyade memeye uygulama şeklinde yapılmıştır (55). Bununla beraber, diğer antibiyotiklerle kan nötrofilleri üzerinde çalışmalar da mevcuttur (72).

Burada tartışılan gerek *in vitro*, gerekse *in vivo* (meme içi) çalışmalarda da belirtildiği gibi, sadece yüksek düzeydeki kloramfenikol'ün etkisi ile nötrofillerin morfolojik bozulmaları neticesinde görülebilen fonksiyon bozukluklarının; bu çalışmada, kloramfenikol'ün tedavi dozunda kas içi uygulanması ile elde edilen kan konsantrasyonlarında meydana geldiği görülmüyor. Bu önemli farkın kloramfenikol'ün metabolizması sonucunda oluşan metabolitlerinden kaynaklanabileceği ileri sürülebilir. Jimenez ve ark. (36), kloramfenikol metabolitlerinden DH-CAP'ın, nötrofillerin fonksiyonellik kazanmasında da rol oynayan GM-CSF'nin yapımını engellediğini belirtmektedir. Kowanko ve ark. (40), Lopez ve ark. (45) ile Sordillo ve ark. (65)'da çalışmalarında, GM-CSF'nin deri altı uygulamalarının, nötrofillerin fagositoz ve bakterisidal aktivitelerini arttırdığını kaydetmektedirler.

Paape ve ark. (54) florfenikol, tiamfenikol ve kloramfenikol'ün, meme bezinden izole edilen nötrofiller üzerine etkilerini karşılaştırılmalı olarak inceledikleri çalışmalarında kloramfenikol'ün, nötrofillerin fagositoz ve bakterisidal aktivitelerini önlediğini, ancak florfenikol ve tiamfenikol'ün aynı yönde bir etkinliğinin görülmediğini bildirmektedirler. Yine, kloramfenikol'ün vücutta metabolize olduğu ancak tiamfenikol'ün metabolize olmadığı da (22) bilinmektedir.

Kloramfenikol dışında aynı grupta yer alan florfenikol ve özellikle beşeri hekimlikte kullanıma giren tiamfenikol'ün benzer etkilere sahip olmadığı sanılmakla birlikte, immün sistem üzerindeki etkilerinin araştırılması yararlı olacaktır.

ABD ve Avrupanın çoğu ülkesinde olduğu gibi, ülkemizde de ürünleri tüketime sunulan hayvanlarda kloramfenikol kullanılmasından vazgeçilmiştir. Ancak diğer hayvanlarda ve insanlarda kullanımı devam etmektedir.

İlaçların, immün sistem üzerine olan olumsuz etkileri dikkate alındığında; gerekli olmadan veya gelişigüzel kullanılmalarının sakıncaları hemen anlaşılabilir. Yukarıda kısmen değinilen bu durum, hayvancılık açısından değerlendirildiğinde, rastgele ilaç uygulanan hayvanları özellikle de inekleri hastalıklara predizpoze hale getirir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile kloramfenikol'ün sığırlarda kan nötrofilleri fonksiyonlarından fagositoz ve mikrobisidal aktiviteleri üzerindeki, in vitro ve in vivo etkileri belirlenerek, özellikle in vivo etkilerinin vücut savunması yönünden bir değerlendirilmesi yapılmıştır. Özellikle enfeksiyonun başlangıcında vücut savunmasında önemli role sahip olan PMNL'lerin, kloramfenikol'ün olumsuz etkilerinden dolayı fonksiyonlarını tam olarak yerine getiremedikleri görülmektedir. Bu durum, özellikle vücut savunması tarafından baskı altında tutulan bir çok patojenin aktif hale gelmesine ve anormal hücre oluşumuna ortam hazırlanması ile sonuçlanabilir.

6. ÖZET

Bu çalışmada, kloramfenikol'ün hücrel savunmada önemli role sahip olan PMNL'lerin fagositoz ve mikrobisidal aktiviteleri (*C. albicans*'ın hücre içi öldürülebilme yeteneği) üzerindeki etkisi araştırıldı.

Çalışma, in vitro ve in vivo yapıldı. İn vivo çalışmada, 8-13 aylık; yedisi dişi, ikisi erkek dokuz adet Holstein-Fresian sığır kullanıldı.

İN vitro çalışmada, kloramfenikol uygulanmamış hayvanlardan alınan kan örneklerinden izole edilen nötrofiller'in 10 mcg/ml, 1000 mcg/ml ve 4000 mcg/ml düzeylerinde kloramfenikol ihtiva eden inkübasyon ortamlarında fagositik ve mikrobisidal aktiviteleri belirlenerek, kloramfenikol'ün PMNL fonksiyonları üzerindeki etkisi tespit edildi. Buna göre; 10 mcg/ml, 1000 mcg/ml'de PMNL fonksiyonlarında (fagositoz, mikrobisidal aktivite) bir değişiklik görülmezken, 1000 mcg/ml'de nötrofil başına düşen fagositik canlı *C. albicans* sayısının arttığı, 4000 mcg/ml'de ise fonksiyonlarda önemli derecede ($P < 0.05$) azalmanın olduğu saptandı.

İN vivo çalışmada, 10 mg/kg CA dozunda 12 saat ara ile sabah-akşam günde iki kez, beş gün süre ile kloramfenikol uygulandı. Kan örneği, sabah uygulamasından 2.5 saat sonra alınarak, plazma kloramfenikol konsantrasyonu ölçümü ve PMNL izolasyonu yapıldı. PMNL fonksiyonlarında, ilk günden itibaren önemli derecede ($P < 0.05$) azalma kaydedildi. Bunun yanında, plazma kloramfenikol konsantrasyonu ile PMNL fonksiyonlarında görülen azalma arasındaki ilişkinin (r) önemli olmadığı belirlendi.

Bu çalışma ile, kloramfenikol'ün sığır PMNL fonksiyonları (fagositoz, mikrobisidal aktivite) üzerindeki etkisi in vitro ve in vivo belirlenmiş oldu.

7. SUMMARY

In this study, effects of chloramphenicol on phagocytosis and microbicidal (intracellular kill of *C. albicans*) activity by polymorphonuclear leucocytes (PMNLs) that has an important role in the host defence mechanisms to infectious diseases were investigated.

This study was performed in vitro and in vivo conditions. Nine Holstein-Fresian cows (8-13 months ages; 7 female, 2 male) were selected for in vitro study.

Chloramphenicol were tested at 4000, 1000, and 10 mcg/ml of incubation mixture. The percentage of phagocytosis and microbicidal activity were determined for PMNLs isolated from blood of nine cows that weren't treated with chloramphenicol, in vitro study. Chloramphenicol had no effect on PMNL functions (phagocytosis and microbicidal activity) at 1000 and 10 mcg/ml concentrations. However, chloramphenicol caused significant increases in intracellular number of live *C. albicans* on per neutrophil at the intermediate (1000 mcg/ml) concentration. The activity of PMNLs were also depressed ($P < 0.05$) by chloramphenicol at the high (4000 mcg/ml) concentration.

In vivo studies, at 12 hours intervals, each cow was treated by intramuscularly administration with chloramphenicol at recommended doses (10 mg/kg body weight) for 5 days . Blood samples were collected at 2.5 hours after first injections. A significant reduction ($P < 0.05$) in the percentage of phagocytosis and microbicidal activity was observed beginning from the first day. There was no correlation between activity of PMNL and plasma chloramphenicol concentration.

In this study, side effects of chloramphenicol on bovine neutrophil function were determined in vitro and in vivo conditions.

8. LİTERATÜR

- 1-Abou-Khalil, S., Salem, Z., Abou-Khalil, W.H. and Yunis, A.A. (1987). On the mechanism of erythroid cell sensitivity to chloramphenicol: Studies on mitochondria isolated from erythroid and myeloid tumors. *Arch. Biochem. Biophysics*, 206, 2, 242-248.
- 2-Abou-Khalil, W.H., Yunis, A.A. and Abou-Khalil, S. (1988). Stability of chloramphenicol metabolites in human blood and liver as determined by high-performance liquid chromatography. *Pharmacology*, 36, 272-278.
- 3-Aksoy, M. (1987). Hematolojik hastalıkların oluşumunda kimyasal maddelerin rolü. In "Hematoloji", Ed. Uyutun, O.N., Kılıçturgay, K., Tunalı, A., Günay, N., Manavoğlu, O., Özlük, K., 18-31. Uycan Yayınevi, İstanbul.
- 4-Arbuthnott, J.P. (1981). Membrane-damaging toxins in relation to interference with host defence mechanisms. In "Microbial perturbation of host defences", Ed. O'Grady, F., Smith, H., 97-120, Academic Press, London.
- 5-Badur, S. (1991). Antimikrobiklerin immün sisteme istenmeyen etkileri. *Klinik Dergisi*, 4, 3, 105-108.
- 6-Bass, B. and Beckner, S. (1990). Role of the lymphokines and cytokines in bone marrow stem cell differentiation. *Focus*, 12, 4, 90-95.
- 7-Bayram, A., Vural, Ö. ve Bakan, E. (1985). Nötrofil fagositozu. *Türkiye Klinikleri*, 5, 3, 276-279.
- 8-Bergren, K.A., Baluyut, C.S., Simonson, R.R., Bemrick, W.J. and Maheswaran, S.K. (1981). Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 42, 1383-1388.
- 9-Bertalanffy, F.D. and Nagy, K.P. (1962). Florence microscopy and photography with acridin orange. *Medical Radiography and Photography*. 38, 3, 82-91.
- 10-Bosquet, E. (1990). Pharmacokinetics in the calf of a long-action chloramphenicol formulation administered intravenously and intramuscularly. *Ann. Rech. Vet.*, 21, 1, 47-55.

- 11-Bretzlaff, K.N., Neff,-Davis, C.A., Ott, R.S., Koritz, G.D., Gustafson, B.K. and Davis, L.E. (1987). Florfenicol in non-lactating dairy cows: Pharmacokinetics, binding plasma proteins and effects on phagocytosis by blood neutrophils. *J.Vet.Pharmacol.Therap.*, 10, 233-240.
- 12-Burrows, G.E., Tyler, R.D., Sangiah, S. and Keeton, R.D. (1988). Experimental chloramphenicol intoxication in neonatal calves: Intravenous administration. *Res.Vet.Sci.*, 45, 1, 101-106.
- 13-Coleman, R.M., Lombard, M.F., Sicard, R.E. and Renricca, N.S. (1989). *Fundamental Immunology*, WBC Publishers, Iowa, USA.
- 14-Dagorn, M., Guillot, P. and Sanders, P.(1990). Pharmacokinetics of chloramphenicol in sheep after intravenous, intramuscular and subcutan administration. *Vet.Q.*, 12, 3, 166-174.
- 15-Demet, Ö. ve Baş, A.L. (1994). Antibiyotiklerin hücreyel savunma sistemi üzerindeki depressif etkileri. *Türk Vet. Hek. Dergisi*, 6, 1, 49-50.
- 16-Demet, Ö., Baş, A.L. ve Traş, B. (1992). Konya'da faaliyet gösteren çeşitli mandıralardan toplanan süt örneklerinde kloramfenikol ilaç kalıntılarının araştırılması. *S.Ü.Vet.Fak. Dergisi*, 8, 1, 35-37.
- 17-Dotter, A., Kroker, R. and Arnold, D. (1990). The pharmacokinetics of chloramphenicol in plasma and saliva of dairy cows. *J.Vet.Pharmacol.Therap.*, 13, 81-85.
- 18-Fabiani, O. (1992). Evoluzione dei granulociti nel midollo osseo rosso della pecora: III., studio ultrastrutturale dei granulociti neutrofili. *Annali*, 95, 69-85.
- 19-Feder, H.M. (1989). Chloramphenicol: What we have learned in the last decade. *South Med. Journal.*, 79, 9, 1129-1134.
- 20-Ferrari, F.A., Pagani, A.A., Marconi, M., Stefanoni, R. and Siccardi, A.G. (1980). Inhibition of candidacidal activity of human neutrophil leucocytes by aminoglycoides antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17, 87-88.
- 21-Forsgen, A. (1970). Significance of protein A production by staphylococci. *Infect. Immun.*, 2, 672-673.

- 22-Gamez, A., Perez, Y., Marti, G., Cristofold, C., and Arbiox, M. (1992). Pharmacokinetics of thiamphenicol in veal calves. *British Veterinary Journal.*, 148, 6, 535-539.
- 23-Gillisen, G. (1985). Possible mechanisms of immunological side-effects of antibiotics. *Zentrabl Bakteriol., Supple*, 13, 91-103.
- 24-Gillisen, G. (1988). Side effects of antibiotics on immun response parameters and their possible implications in antimicrobial chemotherapy. *Zentrabl. Bakteriol.Hyg.(A).*, 270, 171-199.
- 25-Goodhart, G.L. (1977). Effects of aminoglycocydes on the chemotactic response of human polymorphonuclear leucocytes. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 12, 540-542.
- 26-Gregory, E.M., Yost, F.J. and Fridavich, I. (1973). Superoxide dismutase of *Escherichia coli*: Intracelular localization and function. *J.Bacteriol.*, 115, 987-991.
- 27-Guillot, P. and Sanders, P. (1991). Pharmacokinetics of chloramphenicol and oxytetracycline in calves after intravenous and intramuscular administration. *Acta.Vet.Scan.*, 87, 136-138.
- 28-Henricks, P.A.J., Verhoef, J. and Nijkamp, F.P. (1986). Modulation of cell functions. *Vet.Res.Commun.*, 10, 165-188.
- 29-Hogan, J.S., Smith, K.L., Weiss, W.P., Tudhanter, D.A. and Schockey, W.L. (1990). Relationsheep among vitamin E, selenium and bovine blood neutrophils. *J.Dairy Sci.*, 73, 2372-2378.
- 30-Horwitz, M.A. and Silverstein, S.C. (1980). Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes.*J.Clin.Invest.*, 65, 82-94.
- 31-Horwitz, M.A. (1982). Phagocytosis of microorganisms. *Rev.Infect.Dis.*, 4, 104-123.
- 32-Huber, W.G. (1982). Aminoglycocides, macrolides, lincosamides, polymixins, chloramphenicol and other antimimicrobial drugs. In "Veterinary Pharmacology and Therapeutics", Ed. Booth, N.H., McDonald, L.E., 5th Ed., 748-771, The Iowa State University Press, Ames.

- 33-Isildar, M., Abou-Khalil, W.H., Jimenez, J.J., Abou-Khalil, S. and Yunis, A.A. (1988). Aerobic nitroreduction of dehydrochloramphenicol by bone marrow. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 94, 305-310.
- 34-Isildar, M., Jimenez, J.J., Arimura, G.K. and Yunis, A.A. (1988). DNA damage in intact cell induced by bacterial metabolites of chloramphenicol. *Am.J.Haematology*, 28, 40-46.
- 35-Jimenez, J.J., Arimura, G.K., Abou-Khalil, W.H., Isildar, M. and Yunis, A.A. (1987). Chloramphenicol-induced bone marrow injury: Possible role of bacterial metabolites of chloramphenicol. *Blood*, 70, 4, 1180-1185.
- 36-Jimenez, J.J., Jimenez, J.G., Daghistani, D. and Yunis, A.A. (1990). Interaction of chloramphenicol of metabolites with colony stimulating factors: Possible role in chloramphenicol-induced bone marrow injury. *Am.J.Med.Sci.*, 300, 6, 350-353.
- 37-Junqueira, L.C., Carneiro, J. and Kelley, R.O. (1989). *Basic Histology*, 6th Ed., Prentice-Hall International Inc., New Jersey.
- 38-Kabbur, M.B., Jain, C.J., Zinkl, J.G. and Farver, T.B. (1991). Heterogeneity in phagocytic and nitroblue tetrazolium reductive properties of neutrophils from cows. *Am.J.Vet.Res.*, 52, 12, 2023-2028.
- 39-Kayaalp, S.O. (1989). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Cilt 1, 5. Baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara.
- 40-Kowanko, I.C., Ferrante, A., Harvey, D.P. and Carman, K.L.(1991). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil killing of *Torulopsis glabrata* and stimulates neutrophil respiratory burst and degranulation. *Clinical and Experimental Immunology*, 83, 2, 225-230.
- 41-Kutsal, A., Alpan, O. ve Arpacık, R. (1990). *İstatistik Uygulamalar*. Bizim Büro Basımevi, Ankara.
- 42-Leijh, P.C.J., Van Furth, R. and Van Zwet, T.L. (1986). In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In "Handbook of Experimental Immunology", Ed. Weir, D.M., 4th Ed., Vol. 2, 46.1-46.21, Aldes Press, Oxford.

- 43-Linther, T.J. and Eberhart, R.J. (1990). Effect of bovine mammary secretion during early nonlactating period and antibiotics on polymorphonuclear neutrophil function and morphology. *Am.J.Vet.Res.*, 51, 4, 524-532.
- 44-Linther, T.J. and Eberhart, R.J. (1990). Effects of antibiotics on phagocyte recruitment, function and morphology in the bovine mammary gland during the early nonlactating period. *Am.J.Vet.Res.* , 51, 4, 533-542.
- 45-Lopez, A.F., Williamson, D.J. and Gamble, J.R. (1986). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression and survival. *J.Clin.Invest.*, 78, 1220-1228.
- 46-Lubran, M.M. (1989). Hematologic side effects of drugs. *Ann.Clin.Lab.Sci.*, 19, 2, 114-121.
- 47-Mandell, G.L. (1975). Catalase, superoxide dismutase and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leucocyte interaction. *J.Clin.Invest.*, 55, 561-566.
- 48-Mitema, E.S. (1982). Effect of chronic chloramphenicol administration on the bovine haematology and bone marrow. *Proc.of 2nd World Meeting of Clinical Toxicology*, 24, 162-166.
- 49-Murray, T., Downey, K.M. and Yunis., A.A. (1982). Degredation of isolated deoxyribonucleic acid mediatedby nitroso-chloramphenicol. *Biochemical Pharmacology*, 31, 13, 2291-2296.
- 50-Nancy, A., Bounpane, M., Brawn, P., Gronwall, H., Stone. W.H. and Miles, N. (1988). Serum concentrations and pharmacokinetics of chloramphenicol in foals after a single oral doses. *Equine Vet.J.*, 20, 1, 59-61.
- 51-Nickerson, S.C., Paape, M.J. and Dulin, A.M. (1985). Effect of antibiotics and vehicles on bovine mammary polymorphonuclear leucocyte morphologic features, viability and phagocytic activity in vitro. *Am.J.Vet.Res.*, 46, 11, 2259-2265.
- 52-Ohman, H.B., and Babiuk, L.A. (1984). In vitro generation of hydrogen peroxide and superoxide anion by bovine polymorphonuclear neutrophilic granulocytes, blood monocytes and alveolar macrophages. *Inflammation*, 8, 3, 251-275.

- 53-Olkowski, A.A., Gooneratne, S.R. and Christensen, D.A. (1990). Effects of diets of high sulphur content and varied concentrations of copper, molybdenum and thiamine on in vitro phagocytic and candidacidal activity of neutrophils in sheep. *Research in Veterinary Science*, 48, 82-86.
- 54-Paape, M.J. and Miller, R.H. (1990). Effects of florfenicol, chloramphenicol and thiamphenicol on phagocytosis, chemiluminescence and morphology of bovine polymorphonuclear neutrophil leucocyte. *J. Dairy Sci.*, 73, 1734-1744.
- 55-Paape, M.J., Nickerson, S.C., and Ziv, G. (1990). In vivo effects of chloramphenicol, tetracycline and gentamicin on bovine neutrophil function and morphology. *Am. J. Vet.Res.*, 51, 7, 1055-1061.
- 56-Paape, M.J., Miller, R.H. and Ziv, G. (1991). Pharmacological enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. *Am.J.Vet.Res.*, 52, 2, 363-366.
- 57-Peterson, P.K. and Quie, P.G. (1981). Bacterial surface components and pathogenesis of infectious disease. *Ann.Rev.Med.*, 32, 29-43.
- 58-Reddy, P.G., McVey, D.S., Chengappa, M.M., Blecha, F., Minocha, H.C. and Baker, P.E. (1990). Bovine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancement of bovine neutrophil function in vitro. *Am.J.Vet.Res.*, 51, 9, 1395-1399.
- 59-Rossof, I.S. (1974). *Handbook of Veterinary Drugs*, Springer Pub. Comp. Inc., New York.
- 60-Ryu, H., Kaeberle, M.L., Roth, J.A. and Griffith, R.W. (1984). Effect of tip A *Pasteurella multocida* on bovine polymorphonuclear leucocyte functions. *Infect. Immun.*, 43, 66-71.
- 61-Sande, M.A. and Mandell, G.L. (1985). Antimicrobial agents. In "The Pharmacological Basis of Therapeutics.", Ed. Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., Murad, F., 7th Ed., 1170-1198. Macmillan Pub.Comp., New York.

- 62-Sanders, P., Guillot, P. and Mourat, M. (1988). Pharmacokinetics of long-action chloramphenicol formulation administered by intramuscular and subcutaneous routes in cattle. *J.Vet.Pharmacol.Therap.*, 11, 183-190.
- 63-Seklecki, M.M., Quintiliani, R. and Maderazo, E.G. (1978). Aminoglycoside antibiotics moderately impair granulocytes function. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13, 552-554.
- 64-Sordillo, L.M., Campos, M., Gandy, J.C. and Babiuk, L.A. (1991). Effects of granulocyte/macrophage colony stimulating factor on caprine neutrophil activity during mammary gland involution. *J.Dairy Sci.*, 74, 1, 237-242.
- 65-Sordillo, L.M., Afseth, G., Davies, G. and Babiuk, L.A. (1992). Effects of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on bovine peripheral blood, mammary gland neutrophil function in vitro. *Canadian J.Vet.Res.*, 56, 1, 16-21.
- 66-Stites, D.P. and Terr, A.I. (1991). *Basic and Clinical Immunology*. 7th Ed., Appleton and Lange Press, California.
- 67-Strube, W., Thein, P., Kretzdorn, D. and Grunmach, J. (1989). Baypamun: New possibilities for the control of infectious disease in domestic animals. *Veterinary Medical Review*, 60, 1/2, 3-15.
- 68-Şanlı, Y. ve Kaya, S. (1991). *Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağlık Seçenekleri*. 1. Baskı, Medisan Yayınları No:4, Feryal Matbaacılık, Ankara.
- 69-Thompson, R.G. (1978). *General Veterinary Pathology*. WB. Saunders Company, Philadelphia.
- 70-Truscott, W.M., Cheung, A.T.W., and Hirs, D. (1990). Reduced microbicidal activity of peripheral mononuclear phagocytic cell infected with *Pasteurella multocida*. *Vet.Microb.*, 21, 283-290.
- 71-Vander Auwera, P., Husson, M. and Fruhling, J. (1987). Influence of various antibiotics on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leucocytes. *J.Antimicrob.Chemother.*, 20, 399-404.

- 72-Veneziro, F.R. and Divincenzo, C.A. (1985). Effects of aminoglycoside antibiotics on polymorphonuclear leucocyte function in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27, 5, 712-714.
- 73-Yunis, A.A. (1976). Pathogenic mechanisms in bone marrow suppression from chloramphenicol and thiamphenicol. *Proceeding of the first international symposium on aplastic anemia. Kyoto*, 321-335.
- 74-Yunis, A.A., Miller, A.M., Salem, S. and Arimura, G.K. (1980). Nitroso-chloramphenicol: Possible mediator in chloramphenicol-induced aplastic anemia. *J.Lab. and Clin.Med.*, 96, 1, 36-46.
- 75-Yunis, A.A., Miller, A.M., Salem, S. and Arimura, G.K. (1980). Chloramphenicol toxicity: Pathogenic mechanisms and the role of the p-NO₂ in aplastic anemia. *Clinical Toxicology*, 17, 3, 359-373.
- 76-Yunis, A.A. (1981). Chloramphenicol toxicity and the role of the p-NO₂ in aplastic anemia. In "Safety Problems related to chloramphenicol and thiamphenicol therapy", Ed. Najean, Y., 17-29, Raven Press, New York.
- 77-Yunis, A.A. (1981). Comparative toxicity of chloramphenicol and thiamphenicol with particular reference to aplastic anemia. *Chemother.Antimicrob.*, 4, 1, 52-58.
- 78-Yunis, A.A. (1984). Differential in vitro toxicity of chloramphenicol, nitroso-chloramphenicol and thiamphenicol. *Sex.Transm.Dis.*, 11, 340-342.
- 79-Yunis, A.A. , Arimura, G.K. and Isildar, M. (1987). DNA Damage induced by chloramphenicol and its nitroso derivative. *Am. J. Haematol.*, 24, 77-84.
- 80-Zinkl, J.G. (1989). Leucocyte function. In "Clinical Biochemistry of Domestic Animals", Ed. Kaneko, J.J., 4th Ed., 316-337, Academic Press Inc., New York.
- 81-Ziv, G., Paape, M.J. and Dulin, A.M. (1983). Influence of antibiotics and intramammary antibiotics products on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine leucocytes. *Am.J.Vet.Res.*, 44, 385-391.

9. ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Kayseri'de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Kayseri'de tamamladıktan sonra, 1984 yılında S.Ü. Veteriner Fakültesine girdim. 1989 yılında mezun oldum. 1990 yılında S.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlığı'nın açtığı sınavı kazanarak, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.



10. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Ömer DEMET'e, Anabilim Dalımız öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Bünyamin Traş'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. İlhami ÇELİK'e, Bakteriyoloji Bilim Dalından Doç. Dr. Osman ERGANİŞ'e, ve ayrıca Anabilim Dalımız Araştırma Görevlileri Halis OĞUZ ve Muammer ELMAS'a teşekkürü bir borç bilirim.

