

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

Ahmet Levent Baş<sup>@1</sup>

Ömer Demet<sup>2</sup>

### Investigation of Effects Chloramphenicol on Bovine Polymorphonuclear Leucocytes (PMNL) Functions In vitro and In vivo

**Özet:** Bu çalışmada kloramfenikolün polimorfnükleer lökosit (PMNL)'lerin fagositoz ve hücre içi öldürme aktiviteleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Çalışma, in vitro ve in vivo koşullarda gerçekleştirildi. İn vivo aşamada, 08-13 aylık 9 adet Holstein-Fresian sığır kullanıldı. İn vitro bölümde ise kloramfenikol uygulanmamış hayvanlardan alınan kan örneklerinden izole edilen nötrofiller'in 10, 1000 ve 4000 µg/ml kloramfenikol ihtiva eden inkübasyon ortamlarında fagositoz ve hücre içi öldürme aktiviteleri belirlendi. Buna göre; 10 ve 1000 µg/ml'de PMNL fonksiyonlarında bir değişiklik görülmezken, 1000 µg/ml'de nötrofil başına düşen fagositik canlı *C. albicans* sayısında artma, 4000 µg/ml'de ise fonksiyonlarda önemli derecede azalma saptandı. İn vivo çalışmada, 10 mg/kg 12 saat ara ile günde iki kez, beş gün süre ile kloramfenikol uygulandı. Kan örnekleri, sabah uygulamasından 2.5 saat sonra alınarak, plazma kloramfenikol ölçümü ve PMNL izolasyonu yapıldı. PMNL fonksiyonlarında, ilk günden itibaren önemli derecede azalma kaydedildi.

**Anahtar kelimeler:** Kloramfenikol, Polimorfnükleer Lökosit, Fagositoz, Hücre İçi Öldürme Aktivitesi

**Summary:** In this study, effects of chloramphenicol on phagocytosis and intracellular killing activity of polymorphonuclear leucocytes (PMNLs) were investigated. This study was performed in vitro and in vivo conditions. Nine Holstein-Fresians cows (8-13 months' ages) were used. Chloramphenicol were tested at 4000, 1000 and 10 µg/ml of incubation mixtures. Chloramphenicol had no effect on PMNL functions at 1000 and 10 µg/ml concentrations. However, chloramphenicol caused significant increase in intracellular number of live *C. albicans* on per PMNL at the intermediate dose. The activities of PMNLs were also depressed by chloramphenicol at the highest dose. In vivo studies, at 12 hours intervals, each cow were treated by intramuscularly administration with chloramphenicol at recommended dose (10mg/kg bw) for 5 days. Blood samples were collected at 2.5hr after first injection. A significant reduction in the percentage of phagocytosis and intracellular killing activity was observed beginning of the first day.

**Key words:** Chloramphenicol, Polymorphonuclear Leucocytes, Phagocytosis, Intracellular Killing Activity

### Giriş

İmmün sistemi olumsuz etkileyen faktörlerden başlıcası infeksiyöz hastalıkların sağaltımında, yaygın uygulama alanı bulan kemoterapötiklerdir. Antibiyotiklerin hemen çoğunun immün sistem üzerindeki olumsuz etkilerinden söz edilmektedir. Özellikle mikrofajlar (PMNL) ve makrofajlar, fagositoz ve hücre içi bakteri öldürebilme kapasiteleri ile antijen-nonspesifik savunma sisteminde çok önemli bir yer tutmaktadır. PMNL'ler daha çok yanğının başlangıcında etkinlik göstermektedirler. Mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesinde rol oynayan bu hücrelerin, antibakteriyel ilaçların çoğu tarafından baskılandığı, çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (Goodhart, 1977; Ferrari ve ark., 1980;

Gillisen, 1985; Nickerson ve ark., 1985; Veneziro ve ark., 1985; Vander Auwera ve ark., 1987; Gillisen, 1988; Linther ve Eberhart 1990a; 1990b; Badur, 1991; Paape ve ark., 1991).

Kloramfenikol, 1947'de *Streptomyces venezuelae* kültürlerinden elde edilmiş amino asit yapılı bir maddedir. *H. influenza*, *N. meningitis*, *Strep. pneumonia* gibi bakterilere karşı bakterisit etki gösterir. *H. influenza*'dan ileri gelen pediatrik enfeksiyonların, aneorob enfeksiyonların, meningitisin, beyin apseleri ve riketsiyal enfeksiyonların ayrıca salmonellozisin sağaltımında başarıyla kullanılır (Huber, 1982; Sande ve Mandell, 1985; Kayaalp, 1989). Kloramfenikolün seröz boşluklara ve vücut sıvılarına önemli oranda geçtiği bilinmektedir. Ör-

neğin beyine plazma düzeyinin yaklaşık 9 katı, se-rebrospinal sıvıya ise yarıya yakını geçmektedir (Feder, 1989; Kayaalp, 1989).

Kloramfenikolün en iyi bilinen üç toksik özelliği aplastik anemi, gri sendrom ve kemik iliği sup-resyonudur. Oral kloramfenikol kullanımı ile ilgili fatal aplastik anemi insidensi 1/24.500-1/40.800'dür. Aplastik anemi, ilacın lokal kullanımı sonrasında da oluşabilir (Lubran, 1989). Gri sendrom; abdominal şişkinlik, deride solgunlaşma-siyanozis ve dolaşım kollapsı ile karakterizedir. Geri dönüşümlü kemik iliği supresyonu ise retikülositopeni, trombositopeni, kemik iliği myeloid/eritroid oranında ve hemoglobin oranında artış ile seyredir. Kemik iliği supresyonunun, mitokondriyal tahribatın bir sonucu olabileceği bildirilmiştir (Yunis ve ark., 1980a; 1980b; Yunis, 1981a). Zira tedavi dozunda kullanılan kloramfenikolün, insan ve tavşan kemik iliği hücrelerinden izole edilen mitokondrilerde protein sentezini tamamen durdurduğu ve mikroskobik lezyonlara sebep olduğu belirlenmiştir (Feder, 1989). Bununla beraber kloramfenikolün yapısal analogu olan tiamfenikolün de mitokondrilerde protein sentezini engellemesi ancak aplastik anemiye yol açmaması, dikkatlerin kloramfenikolün yapısında bulunan p-nitro grubu üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur (Yunis, 1976; Yunis, 1981b).

Kloramfenikol, yakın zamana kadar ülkemizde Veteriner hekimliğinde yaygın kullanılan ilaçlar arasındaydı. Özellikle aplastik anemi ve granülositopeni gibi yan etkileri göz önünde bulundurularak, ürünleri gıda olarak tüketilen hayvanlara uygulamasından vazgeçilmiştir. Ancak kloramfenikol ve tiamfenikol beşeri hekimlikte halen kullanılmaktadır.

Bu çalışma ile, kloramfenikolün hücre sel savunmada önemli rolü olan PMNL'lerin fagositoz ve hücre içi öldürme aktiviteleri üzerindeki etkisinin in vitro ve in vivo koşullarda belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

Araştırmada, S.Ü.Veteriner Fakültesi deneme ünitesinde bulunan 9 adet (8-13 aylık; yedi dişi, iki erkek) Holstein-Fresian ırkı sığır kullanıldı. Özel bir besleme programı uygulanmadı. In vitro çalışmada, aynı hayvanlara ilaç verilmeden önce alınan kan örneklerinden elde edilen PMNL'ler kullanıldı. In vivo aşamada, 12 saat ara ile günde iki kez 10 mg/kg dozunda kloramfenikol (Leukomycin, Bayer) kas içi yolla, beş gün süre ile uygulandı. Sabah enjeksiyonundan 2.5 saat sonra V.jugularisten vakumlu tüp ile 10 ml kan alındı. Alınan bu örnekler,

plazma kloramfenikol düzeyinin belirlenmesi ve PMNL izolasyonunda kullanıldı. Örnekler, kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı. Kontrol amacıyla ve in vitro çalışmada kullanılacak olan kan örnekleri, hayvanlara ilaç uygulamasından önce alındı.

PMNL izolasyonu, Kabbur ve ark. (1991)'nin önerdikleri yöntem esas alınarak yapıldı. Kan örnekleri 2000 g'de 4 °C'de 15 dk. süre ile santrifüj edildi. Üst kısımda oluşan plazma alınarak; kloramfenikol düzeyinin tespiti için, - 25 °C'de saklandı. Elde edilen hücrelerin canlılık kontrolleri Tripan mavisi boyama yöntemi ile, saflık derecesi ise Giemsa boyaması ile belirlendi. Böylece, hücre süspansiyonlarında % 94 canlılık sağlanırken, bu hücrelerin % 92'sinin PMNL olduğu belirlendi. Hemositometre ile sayım yapıldıktan sonra sulandırılarak, 1 ml'lik inkübasyon ortamında  $7.5 \times 10^6$  PMNL olacak şekilde ayarlandı.

PMNL fonksiyonlarının belirlenmesinde S.Ü.Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'dan sağlanan *C. albicans* kültürü kullanıldı. Katı besi yerinde üretilen *C. albicans*, 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.  $2 \times 10^{-1}$  mmol/L metilen mavisi ile yapılan testte (Olkowski ve ark., 1990), canlılık oranları % 99 olarak bulundu. Hemositometre ile sayım yapılarak inkübasyon ortamında, her nötrofile iki adet *C. albicans* ( $1.5 \times 10^7$  hücre/ml) düşecek şekilde sulandırıldı.

Hacmi 2 ml olan inkübasyon ortamının içeriği:  $7.5 \times 10^6$  PMNL/ml,  $1.5 \times 10^7$  *C. albicans* /ml ve 200 ml inaktif serum şeklinde oluşturuldu. Serum kaynağı olarak bir sığır kullanıldı, elde edilen serum 56 °C'de 30 dk. süre ile inaktive edildi. In vitro çalışmada, inkübasyon tüplerine 4000, 1000 ve 10 µg/ml düzeyinde kloramfenikol (Bayer) eklendi. Kontrol tüplerine antibiyotik katılmadı. In 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.

PMNL'lerin fagositoz ve hücre içi öldürme yetenekleri florokrom boyama yöntemi ile belirlendi (Bertalanffy ve Nagy, 1962; Linther ve Eberhart, 1990b). Buna göre, inkübasyondan sonra 500 µl inkübasyon içeriği üzerine 125 µl Acridin orange çözeltilisi (14 mg Acridin orange, 100 ml Medium 199 içerisinde çözdürüldü) ilave edilerek 60 sn. bekletildikten sonra floresans mikroskopta incelendi. Floresans mikroskobunda yapılan incelemelerde,

polimorfik çekirdekleri yeşil-sarı floresans veren PMNL'ler ile yine yeşil-sarı floresans veren *C. albicans*'lar canlı kabul edilirken, kırmızı floresans verenler ise ölü olarak değerlendirildi (Linther ve Eberhart, 1990a). Her numuneden 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 aktiviteleri (FA), sayılan 200 nötrofilden fagositoz yapanlarının yüzdesi olarak ifade edildi (Hogan ve ark., 1990) ve aşağıdaki formül ile hesaplandı.

FA (%) = Fagositoz Yapan Nötrofil Sayısı / Sayılan Toplam Nötrofil Sayısı x 100

Hücre içi öldürme aktivitesi (ÖA) ise, sayılan fagosite edilmiş toplam *C. albicans* içindeki ölü *C. albicans*'ların yüzdesi olarak ifade edildi (Hogan ve ark., 1990) ve aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

ÖA (%) = Ölü *C. albicans* Sayısı / Toplam Fagosite Edilen *C. albicans* Sayısı x 100

Plazma kloramfenikol ekstraksiyonunda Sandres ve ark. (1988)'nin önerdiği yöntem esas alındı. Buna göre, 1 ml plazma üzerine 5 ml etilasetat eklenerek 15 dk çalkalandı. Karışım 5000 rpm'de 5 dk santrifuj edildikten sonra etil asetat fazı uçuruldu. Kalıntı, 2.4 ml su:heksan:kloroform (1:1:1) karışımı ile çözündürülerek yeniden santrifuj edildi. Üstte oluşan fazdan (1 ml), 20 µl HPLC'ye enjekte edildi.

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), dalga boyu :278 nm , akış hızı :1 ml/dk, yazıcı kağıt hızı 5 mm/dk.

Özellikler arası farklılıklar,"eşler arası farkın önem kontrolü" metodu ile incelendi. Antibiyotik düzeyi ile ele alınan diğer özellikler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amacı ile korelasyon katsayıları hesaplandı ve önem kontrolü yapıldı (Kutsal ve ark., 1990).

### Bulgular

İn vitro, 10 ve 1000 µg/ml kloramfenikol düzeylerinde PMNL'lerin FA ve ÖA'sinde bir değişiklik görülmezken, sadece 1000 µg/ml'de, nötrofil başına düşen canlı *C. albicans* sayısının arttığı tespit edildi (Tablo1). 4000 µg/ml'de ise, PMNL'lerin her iki fonksiyonunda da önemli oranda azalma belirlendi. Değişik sayılarda *C. albicans* ihtiva eden PMNL yüzdelерinde, 10 ve 1000 µg/

ml'de değişiklik görülmezken, 4000 µg/ml 'de azalma kaydedildi (Tablo 1).

İn vivo, 10 mg/kg kloramfenikol'ün kas içi uygulamasından sonra 1. gün kan örneğinde ortalama plazma kloramfenikol düzeyi 1.59 µg/ml, 5. günde ise 2.59 µg/ml olarak belirlendi (Tablo 2). PMNL'lerin FA'leri ilk günden itibaren önemli derecede azaldı. PMNL fagositoz yeteneğinde meydana gelen azalma 4. ve 5. günlerde birbirine yakın bulundu (Tablo 2). ÖA'de ise, ilk günde oluşan inhibisyon 2., 3., 4. ve 5. günlerde benzer oranlarda seyretti (Tablo 2).

Değişik sayılarda *C. albicans* ihtiva eden PMNL yüzdeleri ve herbir PMNL'ye düşen *C. albicans* sayıları ilk günden itibaren azaldı (Tablo 2).

Floresans mikroskopik incelemelerde nötrofiller tipik parçalı çekirdekli görünüşleri ile, *C. albicans* 'lar ise yuvarlak şekilli mikroorganizmalar halinde kolayca tanındılar. PMNL'lerin canlı olanlarının çekirdekleri yeşil-sarı, ölü olanların ise kırmızı-kahverengi floresans vermekteydi. Aynı mikroskop sahasında fagositoz yapmamış nötrofillere rastlandığı gibi, bir ve daha fazla sayıda *C. albicans* fagosite etmiş PMNL'lere de rastlandı.

### Tartışma ve Sonuç

İn vitro aşamada, 10 ve 1000 µg/ml düzeyindeki kloramfenikolün PMNL'lerin FA ve ÖA'leri üzerinde bir etkisi görülmezken, 1000 µg/ml'de her bir PMNL tarafından fagosite edilen ancak canlılığını koruyan mikroorganizma sayısında önemli bir artış (p<0.01), 4000 µg/ml'de ise FA ve ÖA'de önemli oranda düşüşler görüldü. Kontrol grubunda fagositoz % 95.50 iken, 4000 µg/ml'de bu oranın % 59.39 ve oluşan depresyonun ise (% 37.81) istatistiksel olarak önemli (p<0.001) olduğu belirlendi. ÖA'nın kontrol de % 99.05, 4000 µg/ml'de % 95.94, ve şekillenen depresyonun (% 3.13) ise istatistiksel olarak önemli (p<0.05) olduğu belirlendi. Her bir PMNL'ye düşen mikroorganizma sayıları ve fagosite edilen mikroorganizmaların öldürülmelerinde doz grupları arasında önemli (p<0.001) farklılıkların olduğu görüldü (Tabo 1).

Paape ve ark. (1991) in vitro çalışmalarında, 4000 µg/ml kloramfenikolün meme bezinden izole edilen PMNL'lerin fagositozunu % 16.6, 2000 µg/ml'de % 18.6 deprese ettiğini, 2000 µg/ml'den daha düşük kloramfenikol yoğunluklarında ise depresyonun görülmediğini bildirmektedirler. Ziv ve ark. (1983) aynı koşullarda bu oranları 4000 µg/ml'de % 38, 2000 µg/ml'de % 23 olarak tespit ederken, 10 µg/ml'de ise istatistiksel açıdan değerlendirilebilecek bir etkinlik saptayamamışlardır. Bretzlaff

Tablo 1. İn vitro değişik konsantrasyonlarda kloramfenikolün PMNL aktivitesi üzerine etkisi\*

| Kloramfenikol (mg/ml) | PMNL Fonksiyonları (%) |                   | Fagositöz yapan PMNL lerin içerdikleri <i>C.albicans</i> sayılarına göre % oranları |                       |                      | Her bir PMNL ye düşen <i>C.albicans</i> sayısı |            |            |
|-----------------------|------------------------|-------------------|---|-----------------------|----------------------|--|------------|------------|
|                       | Fagositöz              | Hücre İçi Öldürme | 1-2 <i>C.albicans</i>   | 3-4 <i>C.albicans</i> | 5≥ <i>C.albicans</i> | Total  | Ölü        | Canlı      |
| Kontrol               | 95.50±0.56a            | 99.05±0.85ab      | 62.39±2.50a   | 27.00±2.30a           | 2.28±0.67ab          | 1.97±0.08a                                     | 1.97±0.08a | 0c         |
| 10                    | 92.61±0.57a            | 99.65±0.23a       | 60.72±1.84a   | 28.28±1.40a           | 2.00±0.57b           | 1.91±0.13a                                     | 1.91±0.13a | 0.01±0.0c  |
| 1000                  | 91.72±0.60a            | 98.79±0.29b       | 61.17±1.99a   | 26.33±1.63a           | 3.72±0.80a           | 1.88±0.13a                                     | 1.86±0.13a | 0.02±0.01b |
| 4000                  | 59.39±2.56b            | 95.94±1.19c       | 39.17±2.97b   | 13.61±1.91b           | 2.33±1.13ab          | 0.98±0.11b                                     | 0.92±0.10b | 0.06±0.01b |

\*Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir (P<0.005).

Tablo 2. İn vivo, tedavi dozunda (10mg/kg) kas içi yolla uygulanan kloramfenikolün PMNL aktivitesi üzerine etkisi\*

| Örnekleme zamanı | Plazma Kloramfenikol konsantrasyonu (µg/ml) | PMNL Fonksiyonları (%) |                   | Fagositöz yapan PMNL lerin içerdikleri <i>C.albicans</i> sayılarına göre % oranları |                       |                      | Her bir PMNL ye düşen <i>C.albicans</i> sayısı |             |            |
|------------------|---|------------------------|-------------------|---|-----------------------|----------------------|--|-------------|------------|
|                  |   | Fagositöz              | Hücre İçi Öldürme | 1-2 <i>C.albicans</i>   | 3-4 <i>C.albicans</i> | 5≥ <i>C.albicans</i> | Total  | Ölü         | Canlı      |
| Kontrol          | 0.00±0.00a                                  | 95.05±0.22a            | 98.62±0.43a       | 65.59±2.54a   | 26.28±1.62a           | 3.33±1.12            | 1.99±0.08a                                     | 1.97±0.08a  | 0.02±0.00a |
| 1. Gün           | 1.59±0.26b                                  | 63.68±3.44b            | 77.94±3.68b       | 47.07±2.59b   | 15.14±1.43b           | 1.54±0.21            | 1.24±0.08b                                     | 0.96±0.09b  | 0.28±0.05b |
| 2. Gün           | 2.42±0.21b                                  | 63.42±3.95bc           | 74.95±4.18b       | 47.03±3.65bc  | 14.92±1.06b           | 1.47±0.24            | 1.29±0.06b                                     | 0.98±0.09b  | 0.30±0.06b |
| 3. Gün           | 2.47±0.37b                                  | 58.19±5.63cd           | 78.36±2.73b       | 41.25±5.03cd  | 15.06±1.15b           | 1.53±0.29            | 1.19±0.10bc                                    | 0.94±0.11bc | 0.25±0.03b |
| 4. Gün           | 2.53±0.28b                                  | 53.44±1.35d            | 74.17±3.81b       | 38.44±1.04d   | 13.72±0.76b           | 1.67±0.18            | 1.13±0.03c                                     | 0.85±0.06c  | 0.31±0.04b |
| 5. Gün           | 2.59±0.29b                                  | 53.69±1.81d            | 76.17±3.07b       | 37.99±1.42d   | 14.10±1.42b           | 1.68±0.54            | 1.10±0.07c                                     | 0.79±0.10c  | 0.31±0.07b |

\*Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir (P<0.005).

ve ark. (1987), in vitro çalışmalarında 1000, 125 ve 5 µg/ml kloramfenikolün, kandan izole edilen PMNL fagositozu üzerine bir etkinliğinin olmadığını, Nickerson ve ark. (1985) ise 4000 µg/ml kloramfenikolün, süttten izole edilen PMNL'lerin fagositözünde % 47 gibi yüksek düzeyde bir bas-kılamanın olduğunu belirtmektedirler.

Kloramfenikolün PMNL hücre içi öldürme aktivitesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Paape ve Miller (1990), 4000 µg/ml kloramfenikol düzeyinde PMNL ÖA'sinin kısmen inhibe edildiğini bildirmektedirler. Yine aynı araştırmacılar (Paape ve ark., 1990) in vivo çalışmalarında kloramfenikolün meme içi verilmesinden sonra süttten elde edilen PMNL'lerin ÖA'lerinde kontrole göre değişikliğin görülmeyişini belirtmektedirler.

Bu çalışmada, in vitro 4000 µg/ml'de tespit edilen fagositöz depresyon oranı (% 37.81) ile Ziv ark. (1983)'nin 4000 µg/ml'de belirledikleri depresyon oranı (% 38) ile benzerlik gösterirken, Paape ve Miller (1990)'in 4000 µg/ml'de tespit ettikleri oran (% 16.6) ve Nickerson ve ark. (1985)'nin 4000 µg/ml'de elde ettikleri oran (% 47) arasında farklılık görülmektedir. Öte yandan Ziv ve ark. (1983) 2000 µg/ml'de depresyon oranını % 23 olarak belirlerken, Paape ve Miller (1990) bu düzeyi % 18.6 olarak bildirmektedirler.

Gerek tartışılan çalışmalarda (Ziv ve ark., 1983; Nickerson ve ark., 1985; Bretzlaff ve ark., 1987; Paape ve Miller, 1990), gerekse bu çalışmada 2000 µg/ml'den daha düşük kloramfenikol yoğunluklarında istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilebilecek bir fagositöz depresyon oranı tespit edilmemiştir.

Paape ve Miller (1990) kloramfenikolün, 4000 µg/ml'de PMNL ÖA'sini, *Chemiluminesence* düzeyinde baskıladığını bildirmektedirler. *Chemiluminesence*, ÖA'nın gerçekleşmesinde bir basamak teşkil edip; PMNL'lerde şekillenen solunumsal patlama sonucunda meydana gelen süper oksik radikallerinin (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ölçülmesi ile belirlenmektedir (Hogan ve ark. ve ark 1990; Paape ve Miller, 1990; Paape ve ark., 1990), ÖA'nın belirlenmesinde, PMNL içerisindeki canlı ve ölü mikroorganizmaların değerlendirilmesi esasına dayanan Florokrom boyama yöntemi kullanılmışlardır. Çalışmamızda da, kloramfenikolün PMNL fonksiyonları üzerindeki etkinliğinin belirlenmesinde söz konusu yöntemden yararlanılmıştır.

Tablo 2'de görüldüğü gibi in vivo çalışmada, 1. gün 1.59 µg/ml olan plazma kloramfenikol seviyesi daha sonraki günlerde tedrici olarak artarak 5. gün 2.59 µg/ml'ye ulaşmıştır. Ancak günlere göre konsantrasyonlar arasında istatistiksel bir fark görülmemektedir (p>0.05). FA, kontrolde % 95.05 iken, 1. gün % 63.68, 5. gün ise % 53.69 tespit edil-

miştir. FA'da kontrole göre bütün günlerde istatistiksel farklılık ( $p < 0.001$ ) görülmektedir. ÖA'de izlenen sayısal değişimler ise kontrole göre önemli ( $p < 0.001$ ), ancak günler arasında önemsizdir ( $p > 0.05$ ).

FA ve ÖA oranları ile plazma kloramfenikol konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki ( $r$ ) saptanamamıştır.

Paape ve ark. (1990), laktasyondaki bir ineğin her bir meme lobuna 5 gr. kloramfenikolün verilmesinden sonra alınan süt örneklerinde, 2. saatte 115.9  $\mu\text{g/ml}$ , 26. saatte ise 414  $\mu\text{g/ml}$  kloramfenikol düzeyi tespit etmişler, ancak kontrole göre PMNL'lerin FA ve ÖA'lerinde herhangi bir değişiklik gözleyememişlerdir.

Tablo 2'de in vivo fagositoz yapan nötrofillerin *C. albicans* sayısına göre % oranları değerlendirildiğinde, ilk gün % 63.68 düzeyinde fagositoz yapan hücrelerin % 47.07'sinin 1-2 *C. albicans*, % 15.14'ünün 3-4 *C. albicans*, % 1.54'ünün ise  $5 \geq$  *C. albicans* içerdikleri görülmektedir. Sonraki günlerde de 1-2 *C. albicans*'li grupta istatistiksel açıdan hem kontrole göre hemde günler arasında önemli farklar ( $p < 0.001$ ) görülmektedir. Günlere göre fagositoz oranları ile 1-2 *C. albicans* fagosite eden PMNL oranları arasında bütünüyle bir istatistiksel benzerlik sözkonusudur. Her bir PMNL'ye düşen *C. albicans* sayıları incelendiğinde, total *C. albicans* açısından kontrolde her bir PMNL'ye 1.99 *C. albicans* düştüğü, bunun 1.97'sinin ölü, 0.02'sinin ise canlı olduğu görülmektedir. Burada dikkati çeken bir nokta da hücre içi öldürme aktivitesi oranları ile her bir PMNL'ye düşen canlı *C. albicans* sayıları arasında ki istatistiksel benzerliktir.

İn vivo'da olduğu gibi in vitro çalışmada da, dozlara göre fagositoz oranları ile 1-2 ve 3-4 *C. albicans* fagosite eden hücre oranları arasında istatistiksel ilişki de benzerlik görülmektedir. Her bir PMNL'ye düşen *C. albicans* sayıları incelendiğinde, total *C. albicans* açısından kontrolde her bir PMNL'ye 1.97 *C. albicans* düştüğü ve bunun tamamının öldüğü görülmektedir. Burada total *C. albicans* açısından bakıldığında 10 ve 1000  $\mu\text{g/ml}$ 'de kontrole göre bir değişiklik görülmezken, 4000  $\mu\text{g/ml}$ 'de bir PMNL'ye düşen *C. albicans* sayısının 0.98 olduğu ve istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0.001$ ) bulunduğu dikkati çekmektedir. Ölü *C. albicans* sütununda da kontrole göre, 4000  $\mu\text{g/ml}$ 'de fark görülmektedir.

İn vitro ve in vivo çalışma sonuçlarına göre; FA ve ÖA, Tablo 1 ve 2'de değerlendirilmeye ali-

nan PMNL'lerin diğer aktiviteleri arasında önemli farkların olduğu görülmektedir. Her ne kadar in vivo çalışmada PMNL aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler ile plazma kloramfenikol düzeyleri arasında bir ilişki belirlenememiş ise de, in vitro çalışmada belirlenen değişiklikler, 4000  $\mu\text{g/ml}$ 'de ortaya çıkmıştır. Bu düzey oldukça yüksek olup, bazı araştırmalarda (Ziv ve ark., 1983; Nickerson ve ark., 1985; Paape ve Miller, 1990) da teyid edilmektedir. Oysa, in vivo analizlerde elde edilen en yüksek plazma kloramfenikol yoğunluğu 2.59  $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Burada dikkate alınması gereken husus, in vivo çalışmada PMNL'lerin kloramfenikole sadece kan doluşımında maruz kaldığıdır.

İn vitro çalışmalarda (Nickerson ve ark., 1985; Paape ve Miller, 1990) yüksek düzeyde kloramfenikolün PMNL aktivitelerinde meydana getirmiş olduğu depresyonun nedeni olarak, PMNL'lerde sebep oldukları morfolojik değişiklikler gösterilmektedir. Paape ve Miller (1990), 4000  $\mu\text{g/ml}$  kloramfenikolün, PMNL'lerin % 99'unda yuvarlaklaşma, % 94'ünde psödopod oluşumunun engellenmesi gibi morfolojik bozukluklar tespit etmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar (Paape ve Miller, 1990), fagositozun gerçekleşmesinde bir basamak olan filamentlerdeki aktin monomerlerinin bir araya gelmelerinin kloramfenikol tarafından önlenilebileceğini öne sürmektedirler.

Gerek in vitro gerekse in vivo koşullarda deneysel doz uygulamaları ile elde edilen kloramfenikol yoğunluklarında, nötrofillerin morfolojik bozulmaları nedeniyle fonksiyonlarında görülen aksaklıkların, ilacın tedavi dozundaki uygulamaları ile oluşan kan düzeylerinde oluşması muhtemel görünmemektedir. Bu çalışmada in vitro ile in vivo uygulamalar arasında PMNL fonksiyonlarında izlenen önemli farkın, kloramfenikolün metabolitlerinden kaynaklandığı kanısındayız.

Kloramfenikolün barsak bakterileri tarafından oluşturulduğu bilinen (Isildar ve ark., 1988b; Jimenez ve ark., 1987) üç grup metaboliti vardır: Bunlar, aminokloramfenikol ( $\text{N}_2\text{H-CAP}$ ), p-nitrobenzaldehit (PNBA) ve p-nitro-fenil-2-amino-3-hidroksi-propan-HCL (NPAP), dehidro-kloramfenikol (DH-CAP)'dür. Yunis (1984), p-nitro kökünün memeli dokusunda metabolik transformasyona uğradığını ve insan taze karaciğer dokusunun p-nitro grubunu, redüksiyona uğratabilme yeteneğinde olduğu bildirmiştir.

Isildar ve ark. (1988b), kloramfenikol, DH-CAP, NPAP ve NO-CAP'ın myelotoksik özellikleri incelemişler, DH-CAP ve NPAP'ın kloramfenikolden

daha toksik olduğunu, DH-CAP'ın toksisitesinin ise NO-CAP ile eşdeğer olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca  $1 \times 10^{-4}$  M/L'den daha düşük konsantrasyonlardaki DH-CAP'ın granülosit-makrofaj kolonilerinin (GM-CFU) gelişimini total olarak inhibe ettiğini, insan kemik iliği hücrelerinde DNA sentezini % 80 oranında önlediğini belirtmişlerdir. İnsan kemik iliği hücrelerinin  $1 \times 10^{-4}$  M/L'den daha düşük düzeyde NO-CAP veya DH-CAP ile 24 saat inkübe edilmesi sonucunda ise % 65-75 düzeyinde ölü hücre tespit edildiği ve buna göre DH-CAP'ın kloramfenikolden 10-20 kat daha sitotoksik özelliğe sahip olduğu ifade edilmiştir. Bir diğer çalışmada (Jimenez ve ark.,1987) hemapoiyetik sistem hücrelerinin gelişmeleri üzerinde belirleyici bir unsur olan koloni stümüle edici faktörlerin (GM-CSF, G-CSF) yapımının, hücrelerin canlılığını etkilenmeksizin DH-CAP tarafından engellendiği belirtilmektedir. Kloramfenikol ve NPAP'nin bu yönde bir etkisi görülmezken, kloramfenikolün 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 in ise hiçbir etkisinin görülmediği bildirilmektedir. Çalışmada ayrıca DH-CAP gibi bazı kloramfenikol metabolitlerinin, bir taraftan hemapoiyetik sistem hücrelerinin gelişimini diğer taraftan da CSF üretimini engelleyerek çift yönlü toksik etki yaptıkları ileri sürülmektedir.

İn vitro denemelerde NO-CAP'ın ana bileşiğinden daha toksik olduğu görülmektedir (Yunis ve ark.,1980a; Yunis, 1981b; Yunis ve ark.,1987). Ancak bu maddenin toksik etkilerinin oluşabilmesi için kemik iliği gibi hedef organlarda birikmesi gerekir. Abou-Khalil ve ark. (1988), kloramfenikol ve metabolitlerinin kan ve karaciğer dokuları ile  $37^{\circ}\text{C}$ ' de 30 dk. inkübe edilmesi sonucunda kloramfenikolün 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 sürdürdüğü 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 dolaşımda kalabilecekleri vurgulanmıştır. Isildar ve ark. (1988b) diğer bir çalışmada, DH-CAP'nın normal hücre

DNA'sında hasar oluşturabilme etkinliğinde olduğunu;  $1 \times 10^{-4}$  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 (Yunis, 1976; Yunis ve ark.,1980a; Yunis, 1981b; Yunis ve ark.,1987) 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, parçalanması nedeni ile kemik iliğinde birikimi söz konusu değildir (Isildar ve ark.,1988a). Ayrıca, kloramfenikolün aerobik şartlarda insan kemik iliğinde de nitroredüksiyona uğramadığı bilinmektedir (Isildar ve ark.,1988b).

Diğer taraftan DH-CAP'ın p-nitro kökünün insan kemik iliği homojenatında aerobik şartlarda hızla indirildiği, aynı olayın insandan elde edilen Raji hücrelerinde ve tavşan kemik iliği hücrelerinde de gerçekleştiği belirtilmektedir (Isildar ve ark.,1988a; 1988b). Buna göre, DH-CAP tarafından değişik hücre sistemlerinde oluşturulan sitotoksik özelliklerin şekillenmesinde DH-CAP'ın direkt toksik etkisi kadar hedef hücre tarafından gerçekleştirilen nitroredüksiyonun da önemli bir rol üstlenebileceği ifade edilmektedir (Murray ve ark.,1982; Abou-Khalil ve ark.,1988; Jimenez ve ark.,1987).

Paape ve Miller (1990) florfenikol, tiamfenikol ve kloramfenikolün, meme bezinden izole edilen nötrofiller üzerine etkilerinin karşılaştırılmalı olarak inceledikleri çalışmalarında, kloramfenikolün fagositoz ve hücre içi öldürme aktiviteleri önlediğini ancak florfenikol ve tiamfenikolün aynı yönde bir etkinliğinin görülmediğini kaydetmektedirler. Yine kloramfenikolün vücutta metabolize olduğu ancak tiamfenikolün metabolize olmadığı da (Gamez ve ark.,1992) bilinmektedir.

Sonuç olarak, vücut savunmasında önemli role sahip olan PMNL'ler kloramfenikol tarafından önemli derecede etkilenerek fonksiyonlarını tam olarak yerine getirememektedirler. Bu durum özellikle vücut savunması tarafından baskı altında tutulan bir çok patojen mikroorganizmanın aktivite kazanmaları ve anormal hücre oluşumuna ortam hazırlanması ile sonuçlanabilir. Bu nedenle antibakteriyel ilaçların immün sistem üzerindeki etkilerinin bilinmesi ayrı bir önem taşımaktadır.

#### Kaynaklar

Abou-Khalil, W.H., Yunis, A.A. Abou-Khalil, S. (1988). Stability of chloramphenicol metabolites in human blood

- and liver as determined by high-performance liquid chromatography. *Pharmacology*, 36, 272-278.
- Badur, S. (1991). Antimikrobiklerin immün sistem istenmeyen etkileri. *Klimik Dergisi*, 4, 3, 105-108.
- Bertalanffy, F.D., Nagy, K.P. (1962). Florecence microscopy and photography with acridin orange. *Medical Radiography and Photography*. 38, 3, 82-91.
- Bretzlaff, K.N., Neff,-Davis, C.A., Ott, R.S., Koritz, G.D., Gustafson, B.K., 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.
- Feder, H.M. (1989). Chloramphenicol: What we have learned in the last decade. *South Med.Journal*.79, 9, 1129-1134.
- Ferrari, F.A., Pagani, A.A., marconi, M., Stefanoni, R., Siccardi, A.G (1980). Inhibition of candidacidal activity of human neutrophil leucocytes by aminoglycosides antibiotics. *Antimicrob.Agents Chemother*.17, 87-88.
- Gamez, A., Perez, Y., Marti, G., Cristofold, C., Arbiox, M. (1992). Pharmacokinetics of thiamphenicol in veal calves. *British Veterinary Journal*. 148, 6, 535-539.
- Gillisen, G. (1985). Possible mechanisms of immunological side-effects of antibiotics. *Zentrabl Bakteriol. Supple*, 13, 91-103.
- 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.
- Goodhart, G.L.(1977). Effects of aminoglycosides on the chemotactic response of human polymorphnuclear leucocytes. *Antimicrob.Agents Chemother*.12, 540-542.
- Hogan, J.S., Smith, K.L., Weiss, W.P., Tudhanter, D.A., Schockey, W.L. (1990). Relationsheep among vitamin E, selenium and bovine blood neutrophils. *J.Dairy Sci.*, 73, 2372-2378.
- Huber, W.G. (1982). Aminoglycosides, macrolides, lincosamides, polymixins, chloramphenicol and other antimicrobial drugs. In "Veterinary Pharmacology and Therapeutics", Ed. Booth, N.H., McDonald, L.E., 5th Ed., 748-771, The Iowa State University Press, Ames.
- Isildar, M., Abou-Khalil, W.H., Jimenez, J.J., Abou-Khalil, S., Yunis, A.A. (1988a). Aerobic nitroreduction of dehydrochloramphenicol by bone marrow. *Toxicol. and Applied Pharmacol*. 94, 305-310.
- Isildar, M., Jimenez, J.J., Arimura, G.K., Yunis, A.A. (1988b). DNA damage in intact cell induced by bacterial metabolites of chloramphenicol. *Am.J.Haematolgy*, 28, 40-46.
- Jimenez, J.J., Arimura, G.K., Abou-Khalil, W.H., Isildar, M., Yunis, A.A. (1987). Chloramphenicol-induced bone marrow injury: possible role of bacterial metabolites of chloramphenicol. *Blood*, 70, 4, 1180-1185.
- Kabbur, M.B., Jain, C.J., Zinkl, J.G., Farver, T.B. (1991). Heterogeneity in phagocytic and nitroblue tetrazolium reductive properties of neutrophils from cows. *Am.J.Vet.Res.*, 52, 12, 2023-2028.
- Kayaalp, S.O. (1989). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 1, 5. Baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara.
- Kutsal, A., Alpan, O., Arpacık, R. (1990). İstatistik Uygulamalar. Bizim Büro Basımevi, Ankara.
- Linther, T.J., Eberhart, R.J. (1990a). Effect of bovine mammary secretion during early nonlactating period and antibiotics on polymorphnuclear neutrophil function and morphology. *Am.J.Vet.Res.*, 51, 4, 524-532.
- Linther, T.J., Eberhart, R.J. (1990b). 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.
- Lubran, M.M. (1989). Hematologic side effects of drugs. *Ann.Clin.Lab.Sci*. 19, 2, 114-121.
- Murray, T., Downey, K.M., Yunis., A.A. (1982). Degredation of isolated deoxyribonucleic acid mediated by nitroso-chloramphenicol. *Biochemical Pharmacology*, 31, 13, 2291-2296.
- Nickerson, S.C., Paape, M.J., Dulin, A.M. (1985). Effect of antibiotics and vehicles on bovine mammary polymorphnuclear leucocyte morphologic features, viability and phagocytic activity in vitro. *Am.J.Vet.Res.* 46, 11, 2259-2265.
- Olkowski, A.A., Gooneratne, S.R., 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.
- Paape, M.J., Miller, R.H. (1990). Effects of florfenicol, chloramphenicol and thiamphenicol on phagocytosis, chemiluminesence and morphology of bovine polymorphonuclear neutrophil leucocyte. *J. Dairy Sci.*, 73, 1734-1744.
- Paape, M.J., Nickerson, S.C., 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.
- Paape, M.J., Miller, R.H., Ziv, G. (1991).Pharmacological enhancement or supression o phagocytosis by bovine neutrophils. *Am.J.Vet.Res.*, 52, 2, 363-366.
- Sande, M.A., 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.
- Sanders, P., Guillot, P., Mourat, M. (1988). Pharmacokinetics of long-action chloramphenicol formulation administered by intramuscular and subcutaneous routes in cattle. *J.Vet.Pharmacol.Therap.*, 11, 183-190.
- Sordillo, L.M., Afseth, G., Davies, G., 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.

Vander Auwera, P., Husson, M., Fruhling, J. (1987). Influence of various antibiotics on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leucocytes. *J.Antimicrob.Chemother.*, 20, 399-404.

Veneziro, F.R., Divincenzo, C.A. (1985). Effects of aminoglycoside antibiotics on polymorphonuclear leucocyte function in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 5, 712-714.

Yunis, A.A. (1976). Pathogenic mechanisms in bonemarrow suppression from chloramphenicol and thiamphenicol. Proceeding of the first international symposium on aplastik anemia. Kyoto, 321-335.

Yunis, A.A., Miller, A.M., Salem, S., Arimura, G.K. (1980a). Nitroso-chloramphenicol: Possible mediator in chloramphenicol-induced aplastik anemia. *J.Lab. and Clin.Med.*, 96, 1, 36-46.

Yunis, A.A., Miller, A.M., Salem, S., Arimura, G.K. (1980b). Chloramphenicol toxicity: Pathogenic mechanisms

and the role of the p-NO<sub>2</sub> in aplastik anemia. *Clinical Toxicology*, 17, 3, 359-373.

Yunis, A.A. (1981a). Chloramphenicol toxicity and the role of the p-NO<sub>2</sub> in aplastic anemia. In "Safety Problems related to chloramphenicol and thiamphenicol therapy", Ed. Najean, Y., 17-29, Raven Press, New York.

Yunis, A.A. (1981b). Comparative toxicity of chloramphenicol and thiamphenicol with particular reference to aplastik anemia. *Chemother.Antimicrob.*, 4, 1, 52-58.

Yunis, A.A. (1984). Differential in vitro toxicity of chloramphenicol, nitroso-chloramphenicol and thiamphenicol. *Sex.Transm.Dis.*, 11, 340-342.

Yunis, A.A., Arimura, G.K., Isildar, M. (1987). DNA Damage induced by chloramphenicol and its nitroso derivative. *Am.J.Haematol.*, 24, 77-84.

Ziv, G., Paape, M.J., 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.