

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK HEPATİT B'Lİ HASTALARDA İNTERFERON ALFA - 2A'NIN
POLİMORF NÜVELİ LÖKOSİT FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN
İN VİTRO VE EX VİVO ARAŞTIRILMASI

BURÇAK GÜRBÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T 91413

DANIŞMAN

Yard.Doç.Dr.ÜMRAN SOYOĞUL GÜRER

İSTANBUL – 1999

TEC. KÜLTÜR VE TURİZM BAKANLIĞI
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, sevgi ve ilgisini daima hissettiğim çok değerli hocam, danışmanım Yard.Doç.Dr. Sayın Ümran Soyoğul Gürer'e göstermiş olduğu sabır, moral ve destek için ne kadar teşekkür etsem azdır.

Yüksek Lisans yaptığım 3 yıl süresince çok değerli bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren ve hiç bir zaman destek ve ilgilerini benden esirgemeyen çok değerli hocalarım Prof.Dr. Sayın Adile Çevikbaş'a ve Prof.Dr. Sayın Candan Johansson'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin tamamlanmasında çok yakın ilgisini gördüğüm çok değerli hocam, Tıp Fakültesi Dekanımız Prof.Dr. Sayın Nurdan Tözün'e, hasta temininde ilgi ve yardımlarını esirgemeyen GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi'nde görevli değerli hocam Yard.Doç.Dr. Sayın Hüsnü Altunay'a, Marmara Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda görevli değerli hocam Doç.Dr. Sayın Erol Avşar'a ve çalışma arkadaşlarına teşekkürü bir borç bilirim.

SA-51 nolu projemizin bir bölümü olan bu çalışmamı maddi yönden destekleyen Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu'na, Roferon A (İnterferon Alfa-2a) 3MiO flakonunun temininde yakın ilgilerini gördüğüm Roche Müstahzarları Sanayii A.Ş.'e teşekkür ederim.

Deneylerim sırasında bana yardımcı olan Anabilim Dalımız Araştırma Görevlisi Uzm.Bio.Çiğdem İmamoğlu'na ve bölümümüzdeki çalışma arkadaşlarıma, çalışmamım istatistiksel değerlendirmesini yapan Öğr.Gör.Dr. Nural Bekiroğlu'na, çalışmama katılan gönüllü deneklere teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım süresince her zaman maddi ve manevi desteklerini gördüğüm biricik aileme, sevgili nişanlım ve çalışma arkadaşım Biyolog Serkan Akarsu'ya, gösterdikleri sevgi, anlayış, sabır, moral ve destek için ne kadar teşekkür etsem azdır.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| ÖZET | 1 |
| SUMMARY | 3 |
| GİRİŞ VE AMAÇ | 5 |
| GENEL BİLGİLER | 7 |
| Hepatit B Virüsü Hakkında Genel Bilgiler | 7 |
| İnterferonlar Hakkında Genel Bilgiler | 9 |
| Candida albicans Hakkında Genel Bilgiler | 11 |
| Fagositoz Hakkında Genel Bilgiler | 13 |
| 1. Fagositik Hücreler | 13 |
| 1.a. Polimorf Nüveli Lökositler (PNL) | 13 |
| 1.a.1. Nötrofiller | 13 |
| 1.a.2. Eozinofiller | 14 |
| 1.a.3. Bazofiller | 15 |
| 2. Fagositoz | 15 |
| 3. Mikroorganizmaların Hücre İçinde Öldürülmesi | 17 |
| 3.a. Oksijene Bağımlı Öldürme Mekanizması | 17 |
| 3.b. Oksijene Bağımlı Olmayan Öldürme Mekanizması | 18 |
| GEREÇ VE YÖNTEM | |
| 1.GEREÇLER | 19 |
| 1.1. Hasta Grubu | 19 |
| 1.2. Mikroorganizma | 19 |
| 1.3. Besiyerleri | 19 |
| 1.4. Tamponlar | 19 |
| 1.5. Çözeltiler | 20 |
| 1.6. Boyalar | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 1.7. İnterferon | 20 |
| 1.8. Mc Farland Tüpleri | 21 |
| 1.9. Kimyasal Maddeler | 21 |
| 1.10.Kullanılan Araç ve Aygıtlar | 21 |
| 2. YÖNTEMLER | 23 |
| 2.1. İnterferon Alfa -2a' (IFN α -2a)'nın Hazırlanması | 23 |
| 2.2. Polimorf Nüveli Lökositlerin Elde Edilmesi | 23 |
| 2.3. Polimorf Nüveli Lökositlerin Canlılık Deneyi | 23 |
| 2.4. IFN α -2a'nın Polimorf Nüveli Lökositlerin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine Etkisi | 24 |
| 2.4.1. Candida albicans Kökeninin Hazırlanması | 24 |
| 2.4.2. Candida albicans'ın Opsonizasyonu | 24 |
| 2.4.3. IFN α -2a'nın Sağlıklı PNL'lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi | 25 |
| 2.4.4. IFN α -2a'nın IFN α -2a Tedavisi Uygulanmayan Kronik HepatitB'li Hasta PNL'lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi | 25 |
| 2.4.5. IFN α -2a'nın Sağlıklı ve IFN α -2a Tedavisi Uygulanmayan Kronik HepatitB'li hasta PNL'lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi | 26 |
| 2.4.6. IFN α -2a'nın Sağlıklı ve IFN α -2a Tedavisi Uygulanan Kronik Hepatit B'li hasta PNL'lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine Ex Vivo Etkisi | 27 |
| 2.4.7. IFN α -2a Tedavisi Uygulanan Kronik Hepatit B'li Hastaların Tedavi Öncesi ve Tedavilerinin 3. Ayında Biyokimyasal, Histolojik ve Virolojik Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi | 28 |

| | |
|--------------------------|----|
| BULGULAR | 29 |
| TARTIŞMA ve SONUÇ | 36 |
| KAYNAKLAR | 42 |
| ÖZGEÇMİŞ | 47 |



KISALTMALAR VE SİMGELER

| | | |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|
| ALT | : | Alaninamino Transferaz |
| AST | : | Aspartatamino Transferaz |
| EDTA | : | Etilen Diamin Tetra Asetik Asit |
| FTS | : | Fizyolojik Tuzlu Su |
| HBSS | : | Hank's Balanced Salt Solution |
| HBV | : | Hepatit B Virüsü |
| HCC | : | Hepatocellular Carcinoma |
| IFNα-2a | : | Interferon alfa-2a |
| IU | : | International Unit |
| KHB | : | Kronik Hepatit B |
| MU | : | Million Unit |
| PBS | : | Phosphate Buffered Salin Solution |
| PNL | : | Polimorf Nüveli Lökosit |

i.ŞEKİLLERİN LİSTESİ

i.1. Fagositoz Mekanizması

i.i. RESİMLERİN LİSTESİ

i.i.1. PNL'ler

i.i.2. IFN α -2a'nın PNL'lerin Fagositik Aktivitesi Üzerine Etkisi

i.i.3. IFN α -2a'nın PNL'lerin Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine Etkisi

i.i.i TABLOLARIN LİSTESİ

i.i.i.1. IFN α -2a'nın Sağlıklı PNL'lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi.

i.i.i.2. IFN α -2a (10 IU/ml)'nin IFN α -2a Tedavisi Uygulanmayan KHB'li Hasta PNL'lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi.

i.i.i.3. IFN α -2a (10 IU/ml)'nin Sağlıklı ve IFN α -2a Tedavisi Uygulanmayan KHB'li Hasta PNL'lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi.

i.i.i.4. IFN α -2a (10 IU/ml)'nin, IFN α -2a (9-10 MU/haftada 3 kez) Tedavisi Uygulanan KHB'li Hasta PNL'lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine Ex Vivo Etkisi.

i.i.i.5. IFN α -2a Tedavisi Uygulanan KHB'li Hastaların Tedavi Öncesi ve Tedavilerininin 3. Ayında Biyokimyasal, Histolojik ve Virolojik Laboratuvar Bulgularınının Değerlendirilmesi.

ÖZET

İnterferonlar antiviral, immünomodülatör ve anti-tümoral etkili güçlü sitokinlerdir. Son yıllarda sitokinlerin biyolojisindeki gelişmeler ve tedavideki olumlu etkileri gözönüne alındığında immünomodülatör etkilerinin de değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla çalışmamızda; İnterferon alfa - 2a (IFN α -2a) tedavisi uygulanmayan ve yaş ortalaması 35 olan Kronik Hepatit B (KHB)'li 9 hastada, IFN α -2a tedavisi uygulanan ve yaş ortalaması 35 olan KHB'li 10 hastada ve yaş ortalaması 22 olan 15 sağlıklıda, 9-10 MU/ haftada 3 kez intravenöz uygulanan IFN α -2a'nın serumda erişilen dozunun (10 IU/ml) polimorf nüveli lökosit (PNL) fonksiyonları (fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi) üzerine etkisi in vitro ve ex vivo koşullarda araştırılmıştır.

PNL'ler (1×10^7 hücre/ml) sağlıklı ve KHB'li hastalardan Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) içine alınan venöz kandan Ficoll-hypaque gradient santrifüj yöntemi ile ayrılmış, canlılık %98 olarak tespit edilmiştir. IFN α -2a'nın, PNL'lerin fagositik aktivitesi üzerine etkisi; 100 PNL içinde, canlı ve ölü *Candida albicans* hücrelerini fagosit eden PNL'ler sayılarak; hücre içi öldürme aktivitesi üzerine etkisi ise 100 PNL içinde, PNL tarafından öldürülen *C. albicans* hücreleri (mavi boyanmış) bulunan PNL'ler sayılarak % cinsinden ifade edilmiştir.

İn vitro koşullarda IFN α -2a (10 IU/ml), sağlıklı insan PNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesini etkilememiştir ($p > 0.05$).

İn vitro koşullarda IFN α -2a (10 IU/ml), KHB'li hasta PNL'lerinin fagositik aktivitesini anlamlı olarak artırmış ($p < 0.001$), hücre içi öldürme aktivitesini ise etkilememiştir ($p > 0.05$).

İn vitro koşullarda IFN α -2a (10 IU/ml) KHB'li hasta PNL'lerinin fagositik aktivitesini sağlıklı kontrol PNL'lerine göre anlamlı olarak artırmasına ($p < 0.0005$) karşın hücre içi öldürme aktivitesini etkilememiştir ($p > 0.05$).

IFN α -2a (9-10 MU/haftada 3 kez) tedavisi uygulanan KHB'li hastaların tedavilerinin 3. ayında, ex vivo koşullarda IFN α -2a, hasta PNL'lerinin fagositik aktivitesini sağlıklı kontrol PNL'lerine göre anlamlı olarak artırmış ($p < 0.005$), hücre içi öldürme aktivitesini ise etkilememiştir ($p > 0.05$).

Çalışmamızda; Faz II döneminde bulunan KHB'li hastaların tedavisinde kullanılan IFN α -2a 'nın in vitro koşullarda, serumda erişilen dozu olan 10 IU/ml konsantrasyonu ve 9-10 MU haftada 3 kez uygulanan tedavi dozu ex vivo koşullarda KHB'li hasta PNL'lerinin hücre içi öldürme aktivitesini etkilememiştir ($p > 0.05$). Buna karşın IFN, her iki deney koşulunda hasta PNL'lerinin fagositik aktivitesini anlamlı olarak ($p < 0.0005$, $p < 0.005$) artırmıştır.



SUMMARY

IN VITRO AND EX VIVO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF IFN α -2a ON PMN FUNCTIONS OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B.

Interferons are strong cytokines which have antiviral, immunomodulator and antitumoral effects. In recent years, when the biological growths and positive effects on treatment of cytokines were considered, their immunomodulator effects had to be evaluated. Therefore in our study, in vitro and ex vivo effects of IFN α -2a in serum achieved 10 IU/ml concentration, 9-10 MU/thrice weekly/intravenous on PMN functions were investigated in 9 patients with chronic hepatitis B (CHB) who were not treated with IFN α -2a in 10 patients with CHB who were treated with IFN α -2a and in 15 healthy volunteers.

PMNs (1×10^7 cells/ml) were isolated by Ficoll-hypaque gradient centrifuge method from venous blood with EDTA of patients with CHB and healthy volunteers. Viability of PMNs was determined as 98%. The effects of IFN α -2a on phagocytosis and intracellular killing activity of PMNs were determined as the percentage of viable and dead *C. albicans* ingested per 100 PMNs.

IFN α -2a (10 IU/ml) did not affect phagocytic and intracellular killing activity of healthy volunteers' PMN in vitro ($p > 0.05$).

IFN α -2a (10 IU/ml) increased phagocytic activity of patients' PMN in vitro ($p < 0.001$) but, did not affect intracellular killing activity ($p > 0.05$).

IFN α -2a (10 IU/ml) increased phagocytic activity of patients' PMN compared with healthy volunteers' PMN ($p < 0.0005$) in vitro, did not affect intracellular killing activity ($p > 0.05$).

At the 3th month of patients with CHB who were treated with IFN α -2a, IFN α -2a increased significantly phagocytic activity of PMN of patients ex vivo compared with healthy volunteers ($p < 0.005$), did not affect intracellular killing activity ($p > 0.05$).

In our study, therapeutic dose (10 IU/ml) and treatment dose (9-10 MU/ thrice weekly / intravenous) of IFN α -2a which is used for treatment of patients with CHB at II. phase, did not affect intracellular killing activity of patients PMN ex vivo ($p > 0.05$). But it increased significantly phagocytic activity of patients' PMN in both conditions ($p < 0.0005$, $p < 0.005$).



GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatit B Virüsü (HBV) Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirüs cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı, kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. İnsanda akut hepatit, kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinom (HCC)'un en önemli etkenidir (18,41).

HBV başlıca parenteral (perkütan), seksüel, perinatal-vertikal ve horizontal yollardan kana geçerek karaciğere ulaşır. Hepatositlerde çoğalarak, komşu hücreleri infekte eder. Bağışıklık sistemi, infekte hücreleri öldürerek HBV'yi vücuttan temizlemeye çalışır. HBV enfeksiyonu meydana geldiğinde olguların % 90 kadarında hiç belirti vermez. Geri kalan % 10 olguda akut hepatit gelişir. Erişkinin akut hepatit B olgularının yaklaşık % 1'inde fulminan hepatit ve yine pek azında taşıyıcılık gelişebilir. Kronikleşme olasılığı yeni doğanlarda % 95, erişkinlerde % 5 civarındadır. Kronikleşen olguların önemli bir bölümünün siroza, siroz gelişen olguların bir bölümünün de HCC'ye dönüştüğü bilinen bir gerçektir (19,27,41).

Kronik hepatit, virüsün yeni hepatositleri infekte etme hızının, bağışıklık sisteminin infekte hepatositleri öldürme hızından yüksek olmasına bağlı olarak karaciğerde meydana gelen, düşük şiddetli hücre kaybı ve iltihap ile karakterize edilir. Kronik olgularda virüs antijenleri karaciğerden başka periferik kan hücrelerinden monositler, B ve T lenfositleri ve polimorf nüveli lökositlerde (PNL) de bulunabilmektedir (27,28,33).

Kronik Hepatit B (KHB) tedavisinde yegane ümit ışığı olarak interferonlar (IFN) üzerinde durulmaktadır. IFN' ler organizmada virüsler, bakteriler, yabancı hücreler, yabancı makromoleküller ve diğer bileşikler tarafından uyarılan bazı hücrelerde yapılan ve salgılanan proteinlerdir (19,40).

Organizmada köken aldıkları hücrelere ve üretilmelerine neden olan uyarıcılara göre alfa (α), beta (β) ve gama (γ) olmak üzere üç ayrı IFN türü vardır. Alfa IFN' ler

GENEL BİLGİLER

HEPATİT B VİRÜSÜ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

HBV; serum hepatiti olarak bilinen infeksiyon hastalığının etkenidir (18, 33). İlk kez 1963 yılında Blumberg ve arkadaşları tarafından Avusturalya'lı bir hastanın kanında Hepatit B Virüs yüzey antijeni (HBsAg) tanımlanmış ve bu antijene "Avusturalya Antijeni" adı verilmiştir (33) .

HBV, Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirüs cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı, kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Sadece 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı nedeniyle bilinen tüm hayvan virüsleri içinde en küçük olanıdır. (18,41)

Tam bir HBV partikülüne "Dane partikülü" adı verilir ve 42 nm çapında olup küresel görünümündedir. Virüsün en dış kısmında bağışıklamada önem taşıyan Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) bulunur. HBsAg' nin alt kısmında Hepatit B kor antijeni (HBcAg) yer alır. En iç kısımda ise çift iplikli DNA'dan oluşan yuvarlak bir genom bulunur. HBV' nin kor kısmında internal ve örtülü bir antijen olarak Hepatit B e Antijeni (HBeAg) yer alır. HBeAg bulaştırıcılığın ciddi bir göstergesidir. Nükleokapsid içinde ayrıca DNA'ya bağımlı DNA polimeraz bulunur (21,33).

HBV' nin replikasyonu başlıca karaciğerde gerçekleşir (43). Virüs hepatosite girip kapsidinden ayrıldıktan sonra virüsün DNA polimerazı DNA' nın kayıp parçasını sentezler ve çekirdekte çift iplikli kapalı çember şeklinde bir DNA oluşur. Bu DNA' nın bir kısmı hepatosit DNA' sı ile bütünleşirken bir kısmı da hücre RNA polimerazı tarafından mRNA sentezi için bir kalıp olarak kullanılır. mRNA sadece protein sentezinde işlev görmekle kalmaz, aynı zamanda projeni DNA' sının negatif ipliği için bir kalıp görevi de yapar. Bu negatif iplik daha sonra genom DNA' sının pozitif ipliği için bir kalıp görevi yüklenir. Bu RNA' ya bağımlı DNA sentezi sitoplazmada yeni derlenmiş virion

özü içinde gerçekleşir. HBV projeni HBsAg içeren zarfiyla beraber hücre zarından tomurcuklanarak hücreden salınır (21).

HBV' nin serum içerisinde 30-32° C' de saklandığında 6 ay süre ile ve -20° C' de dondurulduğunda ise yıllarca insanlar için infekte edici özelliğini koruduğu gösterilmiştir. Albümin içerisinde 60° C' de 10 saat sonra infeksiyözitesini kaybeder. Kuru sıcak hava ile 160° C' de 1 saatte ve serum içerisinde 90° C' de 1-20 dak. içinde inaktive olur (43).

Tüm dünyada yaygın olarak görülen HBV' ye bağlı akut hepatitin ortalama % 5' inin kronikleştiği, ve bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü, sirozlu olgularda da HCC gelişme riskinin oldukça yüksek olduğu bilinen bir gerçektir (41).

HBV' nin 4 ana bulaşma şekli vardır: İnfekte kan ya da vücut salgıları ile parenteral temas (perkütan), cinsel temas, infekte anneden yeni doğana bulaşma (perinatal-vertikal), infekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas (horizontal) (41).

HBV hangi yolla vücuda girerse girsin virüs direkt olarak kan dolaşımına karışıp, serum albüminlerine bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu kompleks virüsü hedef organ olan karaciğere nakleder. Virüs karaciğerde hepatositlerin virüse uygun algaçlarına bağlanarak bu hücreleri infekte eder. Virüsler hepatositler içerisinde hızla replike olmaya başlarlar. Hepatositler içerisinde bir taraftan bol miktarda HBsAg' ler yapılırken, diğer taraftan nükleokapsid içeren tam virüs partikülleri oluşarak kana verilirler (33).

Virüs alınından 3 gün sonra karaciğerde viral replikasyon başlayabilmektedir. Bununla birlikte semptomların ortaya çıkması 45 gün veya daha fazla sürede olmaktadır. Semptomların ortaya çıkış süresi kişinin direncine, infeksiyon yoluna, virüsün dozuna bağlı olarak değişir (33).

Virüsün özgül serolojik tanısında genel olarak HBV' nin 2 antijeni (HBsAg, HBeAg) ve 3 antijenine karşı gelişmiş antikolar (Anti-HBs, Anti-HBc, Anti-HBe) kullanılır. HBcAg ise viriyonu parçalayan ve HBsAg' yi uzaklaştıran özel teknikler

kullanılarak serumda gösterilebilir. Bununla beraber karaciğerde özellikle kronik infeksiyonlarda kolayca gösterilebilmektedir. Öte yandan serumda HBeAg varlığı genellikle karaciğerdeki HBcAg varlığı ile korelasyon halindedir (43).

HBeAg pozitifliğinin 6 ay ve daha uzun bir süre devam etmesi kronikleşmenin olduğunu gösterir. KHB tablosu belirgin klinik bulgular göstermez. Bu olgularda yorgunluk ve karaciğer enzimlerinde yükselme gözlenir. Zaman içerisinde siroz ve HCC gelişimi gözlenmektedir (33).

KHB tedavisinde şu an klinik kullanımı yaygın olan ve iyi tolere edilebilen tek ajan IFN' lerdir (43). 6 aydan uzun süre Alaninamino Transferaz (ALT) düzeyleri normalin iki katından daha yüksek seyreden ve serumda HBeAg veya HBV DNA pozitif olan KHB'li olgular IFN tedavisine alınabilir (4, 25).

IFN tedavisine yanıtta önemli bir nokta HBV' nin karaciğer dışında perifer kanı mononükleer hücrelerinde de yerleşebildiğidir. Bu nedenle tedaviden başarılı bir yanıt alınabilmesi virüsün serum, karaciğer ve dolaşımdaki mononükleer hücrelerden tümüyle temizlenmesi sonucunda gelişecektir (43).

İNTERFERONLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

IFN' ler, geniş bir biyolojik aktiviteye sahip doğal proteinlerdir (4). İlk kez 1957 yılında Isaacs ve Lindenman, ultraviyole ile inaktive edilen *Influenza* virüsünün, civciv korio-allantoik zarında IFN oluşturduğunu göstermişlerdir (46).

IFN' ler, başta viral infeksiyonlar olmak üzere, kimyasal IFN uyarıcıları (poliriboinisik asid, fitohemaglutinin), *Corynebacterium parvum*, bakteri endotoksinleri gibi bazı etkenlere karşı hücrenin yanıtı olarak sentezlenen, antiviral, antiinflamatuvar, immünomodulatör ve antiproliferatif (antitümör) etkili güçlü sitokinlerdir (3, 4, 13, 33).

IFN oluşumuna yol açan en iyi etken çift zincirli RNA (ds RNA)' dır. IFN' ler türe özgü (sadece oluştukları canlıya etkili) bir çok etkisi olan sitokinlerdir (4).

IFN' ler organizmada köken aldıkları hücelere ve üretilmelerine neden olan uyarıcılara göre 3 ana tipe ayrılırlar (3, 4, 10).

1- **IFN-alfa (IFN- α)** : Çoğunlukla monositler ve transforme B lenfositleri tarafından bazı antijenler ve virüslerin uyarısıyla üretilir.

2- **IFN-beta (IFN- β)** : Virüsler ve poliribonükleotidlerin uyarısı ile fibroblastlardan salgılanır.

3- **IFN-gama (IFN- γ)** : Antijen veya fitohemaglutinin gibi mitojenlerin uyarısıyla T lenfositlerince salgılanır (4).

IFN' ler infeksiyonun çok erken döneminde oluşur ve pek çok virüse karşı ilk direnç mekanizmasını oluşturur. Hücreler bir virüsle infekte olduklarında IFN sentezler ve salgılar. Salgılanan IFN yayılarak diğer hücrelerin yüzeyindeki özgül algaçlara bağlanır. Bağlı IFN antiviral etkisini iki yeni enzimin sentezlenmesini kolaylaştırarak gösterir. Yeni sentezlenen bu iki enzim (protein kinaz ve 2'-5 ' oligoadenilat sentetaz) virüsün replikasyonu için gerekli işlemlerle çatışır, viral RNA (mRNA) translasyonunu inhibe eder ve bunun sonucunda protein sentezi engellenir. Ayrıca infekte olmayan hücreler de infeksiyondan korunur (4, 43).

IFN' lerin immün sistem üzerine çeşitli etkileri vardır. Bunlar; hücrel immünite ve antikor sentezini düzenleme, antijenlerin ekspresyonunu ve tanınmasını artırma, doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini artırma, hücre yüzeyindeki major histokompatibilite kompleksi (MHC) antijenlerinin ekspresyonunu artırmadır. Sonuncu etki HBV infeksiyonu için şöyle açıklanabilir: IFN' ler, hepatosit yüzeyinde MHC sınıf I antijenlerini artırarak infekte hepatositin yüzeyindeki virüs antijenlerinin sitotoksik T hücreleri tarafından tanınmasını ve infekte hepatositin yok edilmesini sağlarlar (4, 8, 10).

Antiproliferatif etki yönünden IFN' ler normal hücrede geri dönüşümlü (reversibl), neoplazik hücrede geri dönüşümsüz (irreversibl) sitostaz yaparlar. Onkojen virüslerin transforme edici etkisini inhibe ederler (4).

IFN α günümüzde KHB infeksiyonunda en etkili ve güvenilir bir ajan olarak kabul edilmektedir. Virüs replikasyonunu baskılayarak remisyon sağlayabilen IFN α , genellikle iyi tolere edilir ve yan etkileri basit tedbirlerle giderilebilir (3, 4).

Şu an klinik kullanımı yaygın olan IFN α ' nın tedavi şeması 4-6 ay süre ile 4.5 - 5 MU/gün veya 9-10 MU/ haftada 3 kez yapılan uygulamadır (4, 8, 13, 25).

CANDIDA ALBICANS HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Candida albicans, tek hücreli ve tomurcuklanma ile çoğalan, oval bir mayadır. Deuteromycetes sınıfının Blastomycetes alt sınıfından olup; üst solunum yolu, sindirim ve genital kanal mukozalarının ve derinin normal flora üyesidir (21, 45).

C. albicans ve diğer *Candida* türleri anatomik, hormonal, mikrobiyal veya immünolojik çevre şartları değiştiğinde konakta infeksiyon yapabilirler. Bu yüzden fırsatçı patojen olarak tanımlanırlar (14, 38, 39, 43).

Kandidalar epitel hücrelerine tutunarak mukoza yüzeylerinde kolonize olurlar. *C. albicans* invaziv kandida enfeksiyonlarında en sık rastlanan etiyolojik etkindir. *C. albicans* mukoza yüzeyinde kolonize olduktan sonra tomurcuklanma ile ürer. "Blastospor" adı verilen tek bir yavru hücre meydana getirir. Tomurcuklanan hücreler birbirlerinden ayrılmayıp ardışık dizilerek hiflere benzer yapılar (yalancı hifler) oluştururlar (6, 14, 20, 39, 43).

Gram olumlu özellik gösteren *C. albicans* hücreleri, Sabouraud' un agarında oda ısısında inkübe edildiğinde, bakteri kolonilerine benzeyen yuvarlak, yumuşak, krem rengi

ve parlak görümlü koloniler meydana getirirler. *C. albicans*' in 24 saatlik kültürlerinde tomurcuklanan hücreler, serum içinde 37° C' de, 2-3 saat bekletildiğinde çimlenme borusu meydana getirirler (6, 14, 16, 20, 21). Mısır unlu, Twen 80'li agarda 24° Cde 72 saat içinde yalancı hiflerin uçlarında kalın duvarlı tek yada bir kaç tane klamidospore oluştururlar. Ayrıca glikoz ve maltozu fermente ederek asit ve gaz oluştururlar. Fakat laktozu etkilemezler. Bütün bu özellikler *C. albicans*' in ayırımında önemlidir (14, 20, 23, 44).

C. albicans' in neden olduğu her türlü infeksiyon "Kandidamikoz" olarak tanımlanır. Çok terleme, aşırı nem, şişmanlık, diabetes mellitus, geniş spektrumlu antimikrobiklerin, kortikosteroidlerin veya başka immünosupresif ilaçların ve sitotoksiklerin kullanımı, vücut direncini kıran kronik hastalıklar, immün yetmezlik, uyuşturucu bağımlılığı, sürekli ven kateteri ve sonda kullanımı gibi kandidamikoz oluşumunu kolaylaştırıcı faktörlerin varlığında yüzeysel (deri ve mukozal) ve derin kandidamikozlar oluşmaktadır. Candida' ların normal florada bulunması nedeniyle infeksiyonların çoğu iç kaynaklıdır (Endojen infeksiyon) (23, 37, 43).

Nötrofiller, monositler ve eozinofiller *C. albicans* infeksiyonlarına karşı savunmada rol oynarlar. PNL' lerin savunmadaki rolü yalancı hiflere zarar vermek, blastosporları fagosite etmek ve öldürmektir. Monositlerin in vitro öldürme kapasitesi PNL' lerden daha etkilidir (38, 39).

C. albicans' in PNL' ler tarafından alınımı ısıya duyarlı ve ısıya dirençli serum opsoninleri ile artırılır. IgG ve diğer serum bileşikleri *C. albicans*' ı opsonize ederler. *C. albicans*' in hücre içinde öldürülmesinden sorumlu en büyük mekanizma miyeloperoksidaz, hidrojen peroksid (H₂O₂) ve süperoksid anyon (O₂⁻) sistemidir (24, 38, 39).

FAGOSİTOZ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

1. FAGOSİTİK HÜCRELER

İmmünolojide önemli rol oynayan fagositik hücreler PNL' ler (nötrofiller, bazofiller, eozinofiller) ve mononükleer fagositler (monositler ve makrofajlar)' dir (17).

1.a. Polimorf Nüveli Lökositler (PNL)

Kan dolaşımındaki lökositlerin % 60-70' ini PNL'ler oluşturur. Çekirdeklerinin çok loblu olması nedeni ile bu adı, sitoplazmalarındaki bol granüller nedeni ile de "granülosit" adını almışlardır (38).

PNL' ler kemik iliğinde çok hızlı oluşurlar (dakikada 80 milyon). Kan dolaşımındaki yaşam süreleri 2-3 gündür (29). Sitoplazmalarındaki granüllerin histolojik boyalarla farklı boyanmaları nedeni ile nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller olarak 3 gruba ayrılırlar (29, 38).

Bu hücreler antijenler için özgüllük göstermezler ancak antikor ve kompleman ile birlikte akut inflamasyonda mikroorganizmalara karşı korunmada önemli rol oynamaktadırlar. İnfeksiyonlarda sayıları artan bu hücrelerin asıl görevi mikroorganizmaları fagosite etmektir (29, 38, 39).

1.a.1. Nötrofiller

İnsan kan dolaşımında bulunan beyaz kan hücrelerinin % 60' ını, PNL' lerin ise % 90' ını oluştururlar. Nötrofiller, 10-20 µm çapında ve bağlantılı 3-4 loblu çekirdeği olan hücrelerdir. Periferik kanda yarı ömürleri 6-20 saattir, dokularda 4-5 gün kadar yaşayabilirler (1, 29).

Bu hücreler içerdikleri granülleri yönünden iki tipe ayrılır : Birinci tip hidrolaz, miyeloperoksidaz ve lizozim içeren azurofilik granüllü, ikinci tip laktoferrin ve bazı lizozim moleküllerini içeren özgül granüllü hücrelerdir. Olgun nötrofillerin % 80-90' ı özgül granüller, % 10-20' si azurofilik granüllerdir (29, 38, 39).

Bu hücreler içerdikleri lizozim gibi antibakteriyel etkili maddelerle organizmayı yabancı antijenlere karşı savunmada görevli hücrelerdir. Nötrofillerin asıl görevleri organizmaya giren mikroorganizmaları fagosite etmek, öldürmek ve ortadan kaldırmaktır. Nötrofillerin zarında (yüzeyinde) komplemanın C₃ komponenti ve Ig G'nin Fc parçası ile birleşebilen algaçlar bulunmaktadır (1).

İltihap bölgesinde lokalize olan nötrofiller, uygun şekilde opsonize edilmiş maddelere bağlanıp onları sindirir. Fagositozu takiben morfolojik ve biyokimyasal olaylar da birbiri ardına eklenir. Fosfolipid metabolizmasında artma, heksoz monofosfat yolunun belirgin stimülasyonu ve hidrojen peroksit oluşumu fagositozun en önemli biyokimyasal sonuçlarını içerir (1, 39).

1.a.2. Eozinofiller

Periferik kan lökositlerinin % 2-5' ini oluştururlar. Eozinofiller, asidik eozin boyası ile kırmızı, Romanovsky boyası ile sarıya boyanan granülleri ile karakterizedir (29, 32).

Eozinofiller kemik iliğinde olgunlaşır. Yarı ömürleri kanda çok kısa (1 saat), dokuda biraz daha uzundur (1 hafta). Bu hücreler yaklaşık 12 µm çapında, yuvarlak, nötrofillere nazaran daha az fagositoz yeteneği olan hücrelerdir ve antijen-antikor komplekslerini fagosite etme özelliğine sahiptirler (1, 29, 32).

Eozinofiller atopik alerjide, helmint infeksiyonlarında önemli rol oynarlar ve bu infeksiyonlarda sayıları artar (29).

1.a.3. Bazofiller

Periferik kanda bulunan lökositlerin % 0.2' sini oluşturan, oval ve elektrondan yoğun büyük granüllere sahip hücrelerdir. Bu granüller bazik metilen mavisi boyası ile koyu mavi renkte boyanırlar (32).

Bazofiller kemik iliği kökenlidir ve 8-12 µm çapındadırlar (1, 38). Granüllerinde heparin, histamin, anafilakside yavaş etkiyen madde (SRS-A) ve anafilakside eozinofil kemotaktik faktör (ECF-A) gibi maddeler bulunur (29, 38).

Bazofiller fagositik hücreler değildir (32). Bu hücreler parazitlere karşı bağışıklıkta rol oynarlar (38).

2. FAGOSİTOZ

Fagositoz, mikroorganizmalar da dahil olmak üzere yabancı maddelerin, fagositik hücreler tarafından hücre içine alınarak parçalanması ve sindirilmesidir (17).

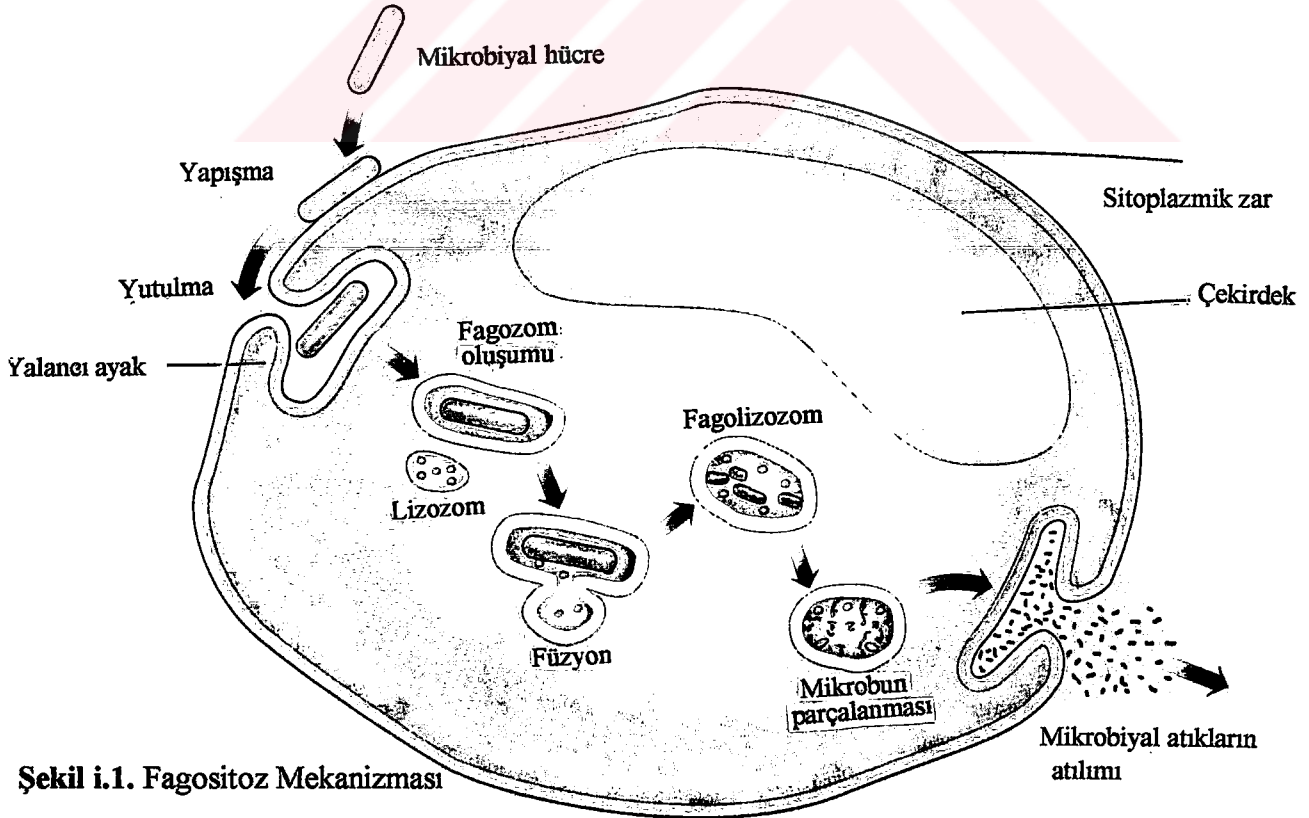
İnvazyonla derin dokulara ya da doğrudan kan veya lenfatik sisteme giren mikroorganizmaları ortadan kaldırmada en etkili yol fagositozdur (43).

Dokularda sabit bulunan makrofajlar ve kandaki monositler ile nötrofiller daha çok, eozinofiller ise daha az oranda fagositoz yapmaktadır. Fagositoz olayında; antikorlar, aktif kompleman ve duyarlı T lenfositleri de rol oynamaktadır (29).

Mikroorganizmalar, fagositik hücelere zayıf da olsa direkt olarak bağlanabilmektedir. Ancak kuvvetli bağlanabilmeleri için genellikle aracı moleküllere ihtiyaç duymaktadırlar. Oponize olan mikroorganizmalar fagositik hücelere kolayca bağlanmaktadır. Oponizasyon, komplemanın C3b parçası veya mikroorganizmaya özgül oluşan antikorlar ile ya da hem komplemanın C3b parçası hem de antikorlar ile olmaktadır (29).

Sitokinlerin özellikle interlökin -1 (IL -1), interlökin -3 (IL - 3) ve tümör nekroz faktörü - alfa (TNF - α)'nın salınımı, fagositik hücrelerin kemik iliği ana hücrelerinden hem daha fazla sayıda olgun şekle dönüşmelerine hem de bu hücrelerin fagositik fonksiyonlarının artmasına neden olur. Bu sitokinler, aynı zamanda C3b (CR1) ve İC3b (CR3) algaçlarının fagositik hücre yüzeyinde daha fazla miktarda belirmesine ve böylece komplemanla opsonize olmuş mikroorganizmaların daha kolay fagosite edilmesine olanak sağlar (43).

İnflamasyon bölgesine kemotaksi ile gelen nötrofiller fagosite edilecek olan yabancı parçacığı uygun algaçlar aracılığı ile tanır. Nötrofiller doğrudan ya da opsoninlerin yardımı ile yabancı parçacığa tutunur, çıkardıkları yalancı ayaklarla hücre içine aldıkları parçacığı "fagozom" adı verilen bir kesecik içine hapsederler. Kısa bir süre sonra nötrofil sitoplazmasında bulunan lizozom granülleri, plazma zarı yapısındaki fagozom içine girerler. Granüller, içlerinde bulunan lizozom enzimlerini fagozom içine boşaltırlar. Lizozom adlı sitoplazmik granüllerin fagozom zarı ile birleşmesi (füzyon) fagolizozom yapısını oluşturur. İki zarın birleşmesi sırasındaki enzimatik aktivite süperoksit (O_2^-) oluşumu ile sonlanır (29, 43) (Şekil i.1.).



3. MİKROORGANİZMALARIN HÜCRE İÇİNDE ÖLDÜRÜLMESİ

Fagositler mikroorganizmaları 2 yolla öldürür. Birinci yol oksidatif metabolizma patlamasıdır. Oksijene bağımlı öldürme mekanizması adı verilen bu yolla hidrojen peroksit ve mikroorganizmaları öldürücü diğer maddeler üretilir. İkinci yol ise oksijene bağımlı olmayan öldürme mekanizması adını alır. Bu mekanizmada fagositoz, diğer mekanizmadan farklı olarak toksik maddelerin granüllerden fagozom içine boşaltılmasıyla da sonuçlanır (29).

3.a. Oksijene Bağımlı Öldürme Mekanizması:

Bu mekanizma için lizozom granüllerinin füzyonuna gereksinim yoktur (29). Fagosite edilmiş mikroorganizmaların, fagozomlar içinde öldürülmesi esas olarak, süperoksit-miyeloperoksidaz sisteminin kombine çalışması ile başlanır (16). Metabolik solunum patlaması, oksijeni hücre içi öldürme aktivitesi için gerekli olan aktif metabolitlere çevirmek için, stimüle fagositler tarafından kullanılan bir seri enzimatik reaksiyondur (23). Bu zorlu ve adeta patlayıcı nitelikteki metabolik değişme, NADPH oksidaz denen ve istirahatteki fagositlerde uyur durumda bulunan bir enzimin aktivasyonu ile başlar (16).

Fagozomun oluşmasıyla nötrofil zarındaki oksidaz enzimleri; indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH- NADH) ya da sitokrom b558 aktive olur ve plazma zarına bağlı oksijen molekülü indirgenerek süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli oksijen (1O_2) ve hidroksil (OH) kökleri oluşur. Bütün bunlar kuvvetli mikrop öldürücü maddelerdir. Daha sonra lizozom granüllerinin fagozoma açılmasıyla içeriye miyeloperoksidaz girer. Halojen moleküllerinin varlığı ile hipoklor (OCl) denilen toksik maddeler oluşur (38).

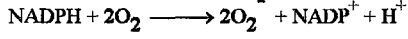
Oksijene bağımlı öldürme mekanizması kimyasal denklemlerle aşağıda görüldüğü gibi olmaktadır (16, 38).

heksoz monofosfat yolu

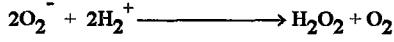


O₂ patlaması ve süperoksit
radikal oluşumu

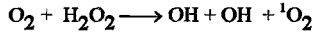
oksidaz



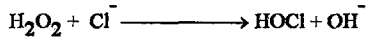
süperoksit dismutaz



Hidrojen peroksit oluşumu

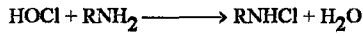


miyeloperoksidaz



Potent halid oluşumu

dokularda



Potent kloraminlerin oluşumu

Toksik Moleküller: O₂⁻ Süperoksit anyonu, ¹O₂ tekli oksijen, OH⁻ ve OH hidroksil serbest kök,

H₂O₂ hidrojen peroksit, OCl⁻ hipoklor.

Özetle miyeloperoksidaz, H₂O₂, halojenler ve asit pH; antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antimikoplazmal etki gösterir (38). Oksijene bağımlı olan bu fagositik öldürme, özellikle Gram olumlu mikroorganizmalar için geçerlidir (29, 43).

3.b. Oksijene Bağımlı Olmayan Öldürme Mekanizması

Bu mekanizmada; lizozom içindeki lizozim, laktoferrin, katyonik proteinler gibi çeşitli maddeler bakterilerin dış zar proteinlerini parçalar, bu tür öldürme daha çok Gram olumsuz mikroorganizmalar ve anaeroplara için geçerlidir. Mikroorganizmaların sindirimi fagolizozom içinde tamamlanır (29, 43).

GEREÇ VE YÖNTEM

1. GEREÇLER

1.1. Hasta Grubu

GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'nde takip ve tedavi edilen IFN α -2a tedavisi uygulanmayan ve yaş ortalaması 35 olan 9, IFN α -2a tedavisi uygulanan ve yaş ortalaması 35 olan 10 KHB'li hasta çalışmamıza alınmıştır.

1.2. Mikroorganizma:

Bu çalışmada, *C. albicans* ATCC 10231 standart suşu kullanılmıştır.

1.3. Besiyerleri:

Katı besiyeri: Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Difco

Sıvı besiyeri: Sabouraud Dextrose Broth (SDB) Difco

1.4. Tamponlar:

0.1M PBS (Phosphate Buffered Saline Solution) (pH:7.2)

| | |
|----------------------------------|----------|
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.15 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.4 g |
| Distile su | 1000 ml. |

HBSS (Hanks's Balanced Salt Solution) (pH:7.4)

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

1.5. Çözeltiler

| | |
|----------|--------------------------------------|
| 0.1 g/ml | EDTA |
| % 0.9 | NaCl |
| % 1 | BaCl ₂ .2H ₂ O |
| % 1 | H ₂ SO ₄ |

1.6. Boyalar

| | |
|----------------|---------|
| Tripan Mavisi | (% 0.5) |
| Metilen Mavisi | (%0.01) |

1.7. İnterferon

Aktif maddesi IFN α -2a olan Roferon-A (3Mio IU/1ml) Roche Müstahzarları Sanayii A.Ş. tarafından sağlanmıştır.

1.8. Mc. Farland Tüpleri

Standart bulanıklık elde etmek için laboratuvarımızda hazırladığımız Mc Farland 1 standart tüpü esas alınmış olup; 0.1 ml %1 BaCl₂'e, 9.9 ml %1 H₂SO₄ ilave edilerek hazırlanmıştır (38).

1.9. Kimyasal Maddeler

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| EDTA | (Sigma) |
| NaCl | (Merck) |
| KCl | (Merck) |
| Na ₂ HPO ₄ | (Merck) |
| KH ₂ PO ₄ | (Merck) |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | (Merck) |
| NaHCO ₃ | (Merck) |
| Glikoz | (Merck) |
| Tripan Mavisi | (Merck) |
| Metilen Mavisi | (Merck) |
| Fenol Kırmızısı | (Merck) |
| Ficoll -Hypaque | (Sigma) |
| Polymorphprep | (Nycomed) |
| BaCl ₂ | (Merck) |
| H ₂ SO ₄ | (Merck) |

1.10. Kullanılan Araç ve Aygıtlar

| | |
|---------------|------------------|
| Hassas Terazı | (0.0001 g Bosch) |
| Kaba Terazı | (0.1 g Mettler) |
| Etüv | (EN 500 Nüve) |
| Pastör Fırını | (Electro-mag) |

| | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Otoklav | (Kermanlar) |
| Santrifüj | (NF-815 Nüve) |
| Vorteks | (Kermanlar) |
| Mikroskop | (Olympus BH) |
| Buzdolabı | (Arçelik 475T) |
| Derin Dondurucu | (Bosch) |
| Otomatik Pipetler | 5-50µl,50-200µl,200-1000µl (Scorex) |
| Cam Pipetler | 0.5,1,2,5,10 ml.(Prescicolor) |
| Pastör Pipeti | Marienfeld |
| Thoma Lamı | Labart |
| Enjektörler | 2.5,5,10,20 ml.(Becton Dickinson) |
| Steril Membran Filtre | 0.22-0.45 µm (Milipore) |
| pH İndikatörü | 0-14 (Merck) |
| Silikon kaplı deney tüpleri | (Becton Dickinson) |
| Petri Kutuları | (Anubra) |

2.YÖNTEMLER

2.1. IFN α -2a (Roferon-A) 'nın Hazırlanması

Deneyde kullanılan IFN α -2a (Roferon-A) Roche Müstahzarları Sanayii A.Ş tarafından sağlanmıştır. IFN α -2a flakonu (3Mio IU/1ml), HBSS içinde seri sulandırılmalar yapılarak deneyde kullanılan doz olan 10 IU/ml' ye ayarlanmıştır.

2.2. PNL Elde Edilmesi

20-25 yaş grubu sağlıklılarından ve KHB' li hastalardan alınan 10 ml venöz kan, içinde 0.1 g/ml EDTA bulunan silikon kaplı tüplere aktarılmıştır. Alınan kan 2500 rpm'de 30 dak. çevrilmiştir. Sürenin bitiminde tüpün dibine çöken eritrositler ile tüpün üst kısmında bulunan plazma arasında, sarımsı beyaz renkte görülen tabaka (buffy coat) pastör pipeti ile alınıp, içinde 2.5 ml Ficoll-hypaque ve 2.5 ml Polymorphprep bulunan bir tüpe konularak 3000 rpm'de 30 dak. çevrilmiştir (38, 47). İşlem sonunda tüpün dibine çöken eritrositler ile en üstteki monosit tabakasının arasında kalan PNL'ler yine pastör pipeti ile başka bir tüpe alınmıştır. PNL' ler daha sonra 3 kez 2000 rpm'de, 3 ml (buz soğukluğunda) PBS ile yıkanmıştır (22). Son aşamada PNL' ler Ca^{++} ya da Mg^{++} içermeyen HBSS ile 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir (7, 35, 38).

2.3. PNL Canlılık Deneyi

Lökositlerin canlılık tayini için, % 0.9 Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) içinde hazırlanmış % 0.5 tripan mavisi kullanılmıştır. Bir hacim PNL süspansiyonu, bir hacim tripan mavisi ile eşit oranda karıştırılmıştır. Oda ısısında 5 dakika bekletilip, mikroskop altında, boya almayan hücreler sayılmıştır (26, 38).

2.4. IFN α -2a'nın Polimorf Nüveli Lökositlerin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır (2,26)

2.4.1. *Candida albicans* Kökeninin Hazırlanması

PNL'lerin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesinin değerlendirilmesinde, PNL'ler içinde boyalı ve boyasız görünüşleri mikroskopta iyi izlendiğinden *C. albicans* kökeni kullanılmıştır.

C. albicans kökeninin SDA besiyerine pasajı yapılarak 24 saat 37° C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda üreyen maya kolonilerinden, SDB besiyerine tekrar pasaj yapılmış ve 24 saat 37° C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde, deneylere başlamadan 1 saat önce bu pasajda üreyen maya kültüründen SDB besiyerine tekrar pasaj yapılmış ve 37° C'de 1 saat inkübe edilmiştir (30, 34). Sonraki aşamada 1 saatlik bu kültür, besiyeri bileşenlerinin maya hücrelerinden uzaklaştırılması için 2000 rpm'de 10 dakika çevrilerek 2 kez FTS ile yıkanmıştır. Son aşamada ise maya hücrelerinin canlılığı metilen mavisi (% 0.01) boyama yöntemi ile saptanmış ve maya hücrelerinin sayısı HBSS içinde 1×10^7 maya/ml (Mc Farland 1'e göre) olacak şekilde sulandırılarak maya süspansiyonu hazırlanmıştır (2,26, 31, 35).

2.4.2. *C.albicans*'ın Oponizasyonu

Mc Farland 1' e göre ayarlanan *C. albicans* süspansiyonu ayrı bir tüp içinde sağlıklı kişilerden elde edilen taze insan serumu ile (4/1) 37° C' de 30 dakika opsonize edilmiştir (2,26, 30).

2.4.3. IFN α -2a'nın Sağlıklı PNL'lerinin Fagositik ve Hücree İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi

IFN α -2a' nın sağlıklı PNL' lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine in vitro etkisi 2 ayrı seri tüpte araştırılmıştır.

C. albicans kökeninin hazırlanması ve opsonizasyonu 2.4.1. ve 2.4.2.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

1. Seri

(Kontrol) Sağlıklı PNL'ler (300 μ l) + HBSS (300 μ l) + *C.albicans* (400 μ l)
(1x10⁷ hücre/ml) (1x10⁷ maya/ml)

2.Seri

Sağlıklı PNL'ler (300 μ l) + IFN α -2a (300 μ l) + *C.albicans* (400 μ l)
(1x10⁷ hücre/ml) (10 IU/ml) (1x10⁷ maya/ml)

2.4.4. IFN α -2a' nın IFN α -2a Tedavisi Uygulanmayan Kronik HepatitB' li Hasta PNL' lerinin Fagositik ve Hücree İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi

IFN α -2a (10 IU/ml)'nın, IFN α -2a tedavisi uygulanmayan KHB'li hasta PNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine in vitro etkisi 2 ayrı seri tüpte araştırılmıştır.

C. albicans kökeninin hazırlanması ve opsonizasyonu 2.4.1. ve 2.4.2.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

1.Seri

(Kontrol) KHB'li PNL'ler (300µl) + HBSS (300µl) + C.albicans (400µl)
(1x10⁷ hücre/ml) (1x10⁷ maya/ml)

2.Seri

KHB'li PNL'ler (300µl) + IFNα-2a (300µl) + C.albicans (400µl)
(1x10⁷ hücre/ml) (10 IU/ml) (1x10⁷ maya/ml)

2.4.5. IFNα-2a' nın, Sağlıklı ve IFNα-2a Tedavisi Uygulanmayan Kronik HepatitB' li Hasta PNL' lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi

IFNα-2a (10 IU/ml)'nın, sağlıklı ve IFNα-2a tedavisi uygulanmayan KHB'li hasta PNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine in vitro etkisi 2 ayrı seri tüpte araştırılmıştır.

C. albicans kökeninin hazırlanması ve opsonizasyonu 2.4.1. ve 2.4.2.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

1.Seri

(Kontrol) Sağlıklı PNL'ler (300µl) + IFNα-2a (300µl) + C.albicans (400µl)
(1x10⁷ hücre/ml) (10 IU/ml) (1x10⁷ maya/ml)

2.Seri

KHB'li PNL'ler (300µl) + IFNα-2a (300µl) + C.albicans (400µl)
(1x10⁷ hücre/ml) (10 IU/ml) (1x10⁷ maya/ml)

2.4.6. IFN α -2a' nın Sağlıklı ve IFN α -2a Tedavisi Uygulanan Kronik Hepatit B' li Hasta PNL' lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine Ex Vivo Etkisi

IFN α -2a'nın, sağlıklı ve IFN α -2a (9-10 MU/haftada 3 kez) tedavisi uygulanan KHB'li hasta PNL'lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine ex vivo etkisi 2 ayrı seri tüpte araştırılmıştır.

C. albicans kökeninin hazırlanması ve opsonizasyonu 2.4.1. ve 2.4.2.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

1.Seri

| | | | |
|-----------|--|--|---|
| (Kontrol) | Sağlıklı PNL'ler (300 μ l) (1x10 ⁷ hücre/ml) | + IFN α -2a (300 μ l) (10 IU/ml) | + C.albicans (400 μ l) (1x10 ⁷ maya/ml) |
|-----------|--|--|---|

2.Seri

| | | | |
|---------|--|------------------------------------|---|
| Ex vivo | KHB'li PNL'ler (300 μ l) (1x10 ⁷ hücre/ml) | + IFN α -2a (9-10 MU/ml) | + C.albicans (400 μ l) (1x10 ⁷ maya/ml) |
|---------|--|------------------------------------|---|

Hazırlanan seri tüpler 37^oC'de opsonize maya ilave edilmeden çalkalayıcı etüvde 30 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda her bir deney tüpüne 400 μ l opsonize maya hücresi (1x10⁷ maya/ml) konulup, aynı ortamda tüpler tekrar 37^o C'de 30 dak. inkübe edilmiştir. Her bir tüpteki son hücre yoğunluğu 5x10⁶ PNL/ml ve 5x10⁶ maya/ml olmuştur. İnkübasyonun 25. dakikasında her bir tüpe fagosite olan ve PNL'ler tarafından öldürülen mayaların boyanması için 1 ml metilen mavisini (% 0.01) ilave edilmiştir. İnkübasyonun 30. dakikasının sonunda her bir tüpten lam-lamel arası preparat hazırlanmış, 100 adet PNL içinde fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesi gösteren PNL'ler mikroskop altında (x 40 büyütme) sayılmıştır.

Fagositik aktivite tayininde; 100 adet PNL içinde canlı (boya almayan) maya hücrelerini fagosite etmiş olan PNL' ler sayılmış, hücre içi öldürme aktivitesi tayininde ise 100 adet PNL içinde fagosite olan maya hücrelerinden PNL' ler tarafından öldürülen (mavi boyanmış) maya hücreleri sayılarak sonuçlar % cinsinden ifade edilmiştir (2,26, 30).

2.4.7. IFN α -2a Tedavisi Uygulanan Kronik Hepatit B'li Hastaların Tedavi Öncesi ve Tedavilerinin 3. Ayında Biyokimyasal, Histolojik ve Virolojik Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi

IFN α -2a (9-10 MU/ml) tedavisi uygulanan KHB'li 10 hastanın tedavi öncesi ve tedavilerinin 3. ayındaki biyokimyasal, histolojik ve virolojik laboratuvar bulguları, GATA İnfeksiyon hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği laboratuvarlarından temin edilmiştir.

BULGULAR

2.2.3. PNL' lerin Elde Edilmesi ve Canlılık Deneyi:

Her bir sağlıklı ve KHB'li hastadan alınan kandan 5×10^6 PNL/ml elde edilmiş ve canlı PNL sayısı % 98'den büyük bulunmuştur (Resim 1).



Resim 1. PNL'ler (x 40 büyütme)

2.4.3. IFN α -2a' nın Sağlıklı PNL' lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi:

IFN α -2a serumda erişilen konsantrasyonda (10 IU/ml), sağlıklı PNL' lerinin fagositik ve hücre içi öldürme aktivitesini etkilememiştir ($p>0.05$). (Tablo 1). (Resim 2, 3).

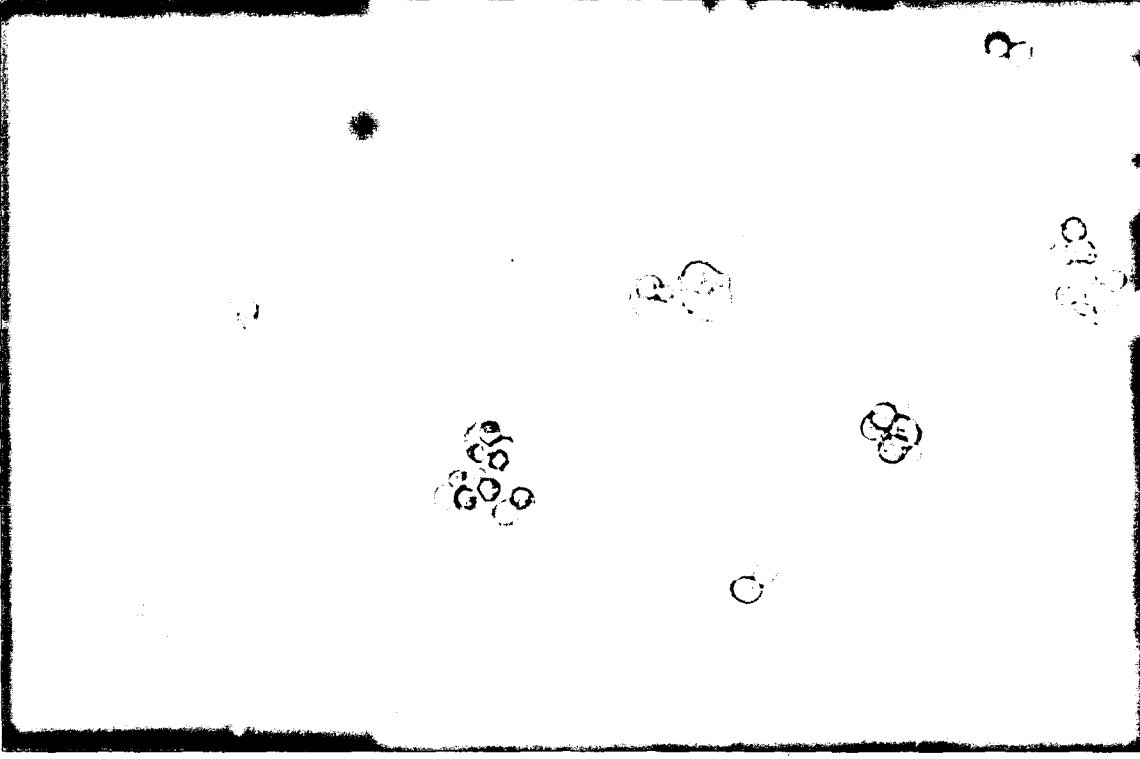
Tablo 1. IFN α -2a (10 IU/ml)'nın Sağlıklı PNL' lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi.

| Deney Grubu | PNL + İlaç | Fagositik aktivite (%) | Hücre içi öldürme aktivitesi (%) |
|-------------|--|------------------------|----------------------------------|
| n | Sağlıklı PNL (Kontrol) | 41.88 \pm 9.87 | 6.75 \pm 6.06 |
| n | Sağlıklı PNL + IFN α -2a (10 IU/ml) | 42.44 \pm 12.98* | 4.88 \pm 3.69 * |

Değerler yüzde oranı \pm standart sapma olarak sağlıklılarda 15 ayrı deney ortalamaları alınarak verilmiştir.

* $p > 0.05$ Paired t testi

n= 15 (Sağlıklı grup)



Resim 2: IFN α -2a'nın PNL'lerin Fagositik Aktivitesi Üzerine Etkisi. (x 40 büyütme).



Resim 3: IFN α -2a'nın PNL'lerin Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine Etkisi. (x 40 büyütme) (Ölü *C. albicans* hücreleri metilen mavisi ile mavi boyanmış).

2.4.4. IFN α -2a' nın IFN α -2a Tedavisi Uygulanmayan Kronik HepatitB' li Hasta PNL' lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi

IFN α -2a (10 IU/ml), serumda erişilen konsantrasyonda, IFN α -2a tedavisi uygulanmayan KHB'li hasta PNL' lerinin fagositik aktivitesini anlamlı olarak artırmış ($p < 0.001$), hücre içi öldürme aktivitesini ise etkilememiştir ($p > 0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2. IFN α -2a (10 IU/ml)'nın, IFN α -2a Tedavisi Uygulanmayan KHB'li Hasta PNL' lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi.

| Deney Grubu | PNL + İlaç | Fagositik aktivite (%) | Hücre içi öldürme aktivitesi (%) |
|-------------|--|------------------------|----------------------------------|
| n | KHB'li hasta PNL (Kontrol) | 59.33 \pm 17.31 | 4.44 \pm 2.83 |
| n | KHB'li hasta PNL + IFN α -2a (10 IU/ml) | 70.67 \pm 21.14** | 4.33 \pm 3.71 * |

Değerler yüzde oranı \pm standart sapma olarak ve KHB'li hastalarda 9 ayrı deney ortalamaları alınarak verilmiştir.

* $p > 0.05$, ** $p < 0.001$ Paired t testi

n= 9 (IFN α -2a tedavisi uygulanmayan KHB'li hasta grubu)

2.4.5. IFN α -2a' nın, Sağlıklı ve IFN α -2a Tedavisi Uygulanmayan Kronik HepatitB' li Hasta PNL' lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi.

IFN α -2a (10 IU/ml), KHB'li hasta PNL' lerinin fagositik aktivitesini sağlıklı PNL' lerinin fagositik aktivitesine göre anlamlı olarak artırmış ($p < 0.0005$), hücre içi öldürme aktivitesini etkilememiştir ($p > 0.05$) (Tablo 3).

Tablo 3. IFN α -2a (10 IU/ml)'nın, Sağlıklı ve IFN α -2a Tedavisi Uygulanmayan KHB'li Hasta PNL' lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi.

| Deney Grubu | PNL + İlaç | Fagositik aktivite (%) | Hücre içi öldürme aktivitesi (%) |
|----------------|--|------------------------|----------------------------------|
| n ¹ | Sağlıklı PNL + IFN α -2a (10 IU/ml) | 42.44 \pm 12.98 | 4.88 \pm 3.69 |
| n ² | KHB'li hasta PNL + IFN α -2a (10 IU/ml) | 70.67 \pm 21.14 ** | 4.33 \pm 3.71 * |

Değerler yüzde oranı \pm standart sapma olarak ve sağlıklılarda 15, KHB'li hastalarda 9 ayrı deney ortalamaları alınarak verilmiştir.

* $p > 0.05$, ** $p < 0.0005$, Unpaired t testi

n¹= 15 (Sağlıklı grup)

n²= 9 (IFN α -2a tedavisi uygulanmayan KHB'li hasta grubu)

2.4.6. IFN α -2a' nın Sağlıklı ve IFN α -2a Tedavisi Uygulanan Kronik Hepatit B' li Hasta PNL' lerinin Fagositik ve HÜcre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine ExVivo Etkisi

IFN α -2a, (9-10 MU/ml), ex vivo koşullarda KHB'li hasta PNL' lerinin fagositik aktivitesini, in vitro koşullarda IFN α -2a (10 IU/ml) ile muamele edilen sağlıklı PNL' lerinin fagositik aktivitesine göre anlamlı olarak artırırken (p<0.005), hücre içi öldürme aktivitesini etkilememiştir (p>0.05) (Tablo 4).

Tablo 4. IFN α -2a'nın, IFN α -2a Tedavisi Uygulanan KHB' li Hasta PNL' lerinin Fagositik ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesi Üzerine Ex Vivo Etkisi.

| Deney Grubu | PNL + İlaç | Fagositik aktivite (%) | Hücre içi öldürme aktivitesi (%) |
|----------------|--|------------------------|----------------------------------|
| n ¹ | Sağlıklı PNL + IFN α -2a (10 IU/ml) | 42.44 \pm 12.98 | 4.88 \pm 3.69 |
| n ² | KHB'li hasta PNL + IFN α -2a (9-10 MU/ml) | 61.9 \pm 12.97 ** | 3.9 \pm 2.89 * |

Değerler yüzde oranı \pm standart sapma olarak ve sağlıklılarda 15, KHB' li hastalarda 10 ayrı deney ortalamaları alınarak verilmiştir.

* p > 0.05, ** p < 0.005 Unpaired t testi

n¹= 15 (Sağlıklı grup)

n²= 10 (IFN α -2a tedavisi uygulanan KHB'li hasta grubu)

2.4.7. IFN α -2a Tedavisi Uygulanan Kronik Hepatit B' li Hasta'ların Tedavi Öncesi ve Tedavilerinin 3.Ayında Biyokimyasal, Histolojik ve Virolojik Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi.

IFN α -2a, (9-10 MU/ml), tedavisi uygulanan KHB'li hastaların tedavilerinin 3. ayında serum HBV DNA, ALT ve AST düzeyleri, tedavi öncesi değerlerle karşılaştırıldığında, serum HBV DNA düzeyinde azalma, ALT ve AST düzeylerinde normalleşme gözlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. IFN α -2a Tedavisi Uygulanan KHB' li Hastaların Tedavi Öncesi ve Tedavilerinin 3.Ayında Biyokimyasal, Histolojik ve Virolojik Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi (n=10).

| Laboratuvar Bulguları | Tedavi Öncesi | Tedavinin 3. Ayı |
|--------------------------------------|---|-----------------------------------|
| HBV DNA (pg/ml) hibridizasyon ile | 183.25 \pm 10.89 | 20 \pm 3.5 |
| HBeAg pozitif/negatif | 4/6 | 4/6 |
| HBsAg pozitif/negatif | 10/0 | 10/0 |
| Karaciğerde histolojik aktivite | Orta derecede fibrozis ve nekroinflamatuvar aktivite | Karaciğer biyopsisi yapılmıyor |
| ALT (U/L) | 100 \pm 8.04 | 42.33 \pm 22.05 |
| AST (U/L) | 92 \pm 7.11 | 35.25 \pm 1.78 |

TARTIŞMA

KHB infeksiyonu siroz, HCC ve ölüme yol açan önemli bir karaciğer hastalığıdır. Dünya nüfusunun % 5'i HBV taşıyıcısıdır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından KHB infeksiyonu, ölüm nedenleri arasında dokuzuncu sırada gösterilmektedir. Taşıyıcıların % 40-70'inde aktif viral replikasyona ait belirtiler vardır. Bu kişiler progresif karaciğer hastalığı riski en yüksek olan grubu oluştururlar. Çünkü bu taşıyıcıların % 15-20'sinde 5 yıl içinde siroz gelişmektedir. Kronik aktif hepatiti takiben siroz gelişen kişilerde ise 5 yıllık yaşam oranı % 55'dir (40).

KHB infeksiyonunun siroz ve ölüm gibi önemli sonuçlara yol açması, taşıyıcı olanlarda olmayanlara göre 200 kat daha fazla HCC gelişme riskinin olması ve tedavi edilmeyen hastaların infeksiyon kaynağı olması nedeni ile viral replikasyon göstergelerine sahip KHB infeksiyonlu hastaların tedavi edilmesi gerekmektedir. Bilindiği gibi tedaviden beklenen sonuç, virüs replikasyonunu baskılayarak virüsü elimine etmek ve histolojik progresyonu önlemektir. Diğer bir deyişle kronik karaciğer hastalığında remisyonu sağlamak ve infektiviteyi azaltmaktır (28, 40).

Bu amaçla kullanılan ajanlar arasında IFN α , immünoregülatör etkisi ve minimal toksisitesi nedeni ile KHB infeksiyonlarında etkinliği gösterilmiş tek ajandır. 10 yılı aşkın süredir çeşitli doz ve sürelerde KHB infeksiyonunun tedavisinde kullanılan IFN α 'nın yüksek dozda kullanılmasının daha etkili olduğu kabul edilmektedir. Ancak yüksek doz ile beraber yan etkilerinin sıklığı ve şiddetinin artması tedavinin etkin bir şekilde uygulanmasını engellemektedir. Bu nedenle optimal tedavi dozu konusunda halen görüş birliği sağlanamamıştır. Tedavide standartize edilmeyen bir diğer parametre ise tedavinin süresidir. On altı çalışmayı içeren bir araştırmada 3, 4 ve 6 ay süre ile uygulanan tedavilerin etkinliği arasında belirli bir fark saptanamamıştır. Bütün bu belirsizliklere rağmen bugün ideal tedavi için kabul edilen parametreler; tedavinin yüksek dozda verilmesi, yan etkilerinin minimal olması, tedavi süresinin de bunları sağlayacak biçimde düzenlenmesidir (40).

Tedavi ile HBV'nin tamamen yok edilmesi veya replikasyonunun durdurulmasının, KHB'li hastalarda, hastalığın siroza dönüşümünü engelleyebildiği, sirozlu hastalarda ise HCC gelişimini azalttığı bilinmektedir (8). Uzak Doğu'dan bildirilen iki ayrı çalışmada IFN α 'nın KHB'li hastalarda HCC gelişmesini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (15).

IFN'lerin hücre metabolizması üzerinde doğrudan; immün sistem üzerinde ise hücrel immünite ve antikor sentezini düzenleme, antijenlerin ekspresyonu ve tanınmasını artırma, doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini artırma gibi dolaylı etkileri vardır. Her iki etki de, interferon moleküllerinin hücre yüzeyi algaçlarına bağlanmalarından kaynaklanmaktadır; bunlar gen transkripsiyonunu, translasyonunu veya her ikisini de regüle eden intraselüler sinyallerde tetik işlevi görür (10).

IFN'ler geniş biyolojik aktiviteye sahip doğal proteinlerdir. Çeşitli indükleyicilerin varlığında salgılanırlar ve çeşitli hücrelerde bulunan algaçlarına bağlanarak antiviral ve immünomodülatör etkilerini başlatırlar. İmmün sistemi pek çok yabancı etkenle savaşmak üzere uyarırlar. İmmünoglobulin sentezini regüle ederler. Makrofajlar, doğal öldürücü hücreler ve sitotoksik T hücrelerinin aktivitesini artırarak virüsle infekte olmuş hücrelerin eliminasyonunu sağlarlar (5, 10).

IFN'lerin en iyi anlaşılmış olan doğrudan etkinliği, uyarılmış hücre tarafından 2'-5' A sentetaz enziminin üretilmesidir (uyarı bir virüs, antijen veya IFN'nin kendisi olabilir). Bu enzim bir endonükleaz enzimi ile viral RNA'yı bozarak viral replikasyonu inhibe eder. Bu sistemin, virüsle infekte olmamış hücreler üzerinde IFN'nin antiproliferatif etkisini etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. Ancak başka pek çok enzim sistemleri, hücre proliferasyonunu inhibe etmek veya farklılaşmasını hızlandırmak üzere uyarılabilmektedir. IFN'nin onkojen ekspresyonu üzerindeki doğrudan etkileri de tanımlanmıştır. Bu etkiler, tümör büyümesinin regülasyonuna ışık tutabilir (10).

HBV enfeksiyonunda akut viral hastalıktan iyileşme ya da hastalığın kronikleşmesinden, konağın immün yanıtı sorumlu olabilmektedir. HBV enfeksiyonlu

olgular da virüsün kendisi hepatositlere sitotoksik etkili değildir. Karaciğer hücre hasarı konakçının immünolojik reaksiyonlarına bağlı olmaktadır. İn vitro çalışmalarda; akut ve kronik HBV ile infekte karaciğer hücre hasarının nedeninde immün mekanizmaların rol oynadığı düşünülerek, HBsAg'ye maruz kalan kişilerde T lenfositlerinin proliferatif yanıtı incelenmiştir (36).

Konakçının immün yanıtı HBV infeksiyonundan hemen sonra oluşmakta ve HBV'ye karşı erken immün yanıtın oluşması virüsün intrahepatik yayılımını sınırlamaktadır. HBV'nin bir çok antijenik komponentine karşı immün yanıtlar araştırılmıştır (36).

Gyllenhammar ve ark. (12), sağlıklı insanlarda N-formyl methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) ya da Lökotrien B4 ile uyarılmış nötrofillerin fagositozu üzerine rekombinant IFN α -2a'nın (10-20.000 IU/ml) modülatör etkisini süperoksit anyon oluşumu, β -glukuronidaz ve lizozim salınımında artış ile göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar *S. aureus*'un fagositozu ile indüklenen chemiluminescence (CL)'in IFN α -2a (20.000 IU/ml) ile inhibe olduğunu, fMLP ve LTB4 ile uyarılan ve 1.000 IU/ml IFN α -2a ile muamele edilen nötrofillerin CL'sinde doza bağımlı bir artışın olduğunu gözlemişlerdir. Aynı araştırmacılar IFN α -2a'nın 10-20.000 IU/ml konsantrasyonlarının spontan olarak stimüle olmuş nötrofil kemotaksisini etkilemediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarında; IFN α -2a'nın in vitro koşullardaki nötrofil ortamına fMLP ve LTB4 eklendiğinde CL, süperoksit anyon üretimi ve lizozomal enzim salınımının artırdığını göstermişlerdir. Bu araştırmada *S. aureus* ile indüklenen ve spontan olarak stimüle olmuş nötrofillerde aynı IFN dozlarının PNL fonksiyonlarını azalttığı veya etkilemediği görülmüştür.

Ohmann ve ark. (27)'nin yaptıkları çalışmada bir cins sığırda virüse bağlı olarak oluşan solunum hastalığına karşı sağlıklı sığırlarda en yüksek serum seviyesindeki (10^6 U/kg) rekombinant bovin interferon alfa-1 (rBoIFN- α 1) ve rekombinant bovin interferon gama (rBoIFN- γ)'nin intravenöz (i.v.) ve intramüsküler (i.m.) enjeksiyonundan sonra profilaktik etkisini ve bazı lökosit fonksiyonlarındaki değişikliği in vitro ve in vivo

koşullarda değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarında her iki rBoIFN enjeksiyonundan 4, 8, 12 saat sonra PNL göçünün baskılandığını, buna karşın süperoksit anyon üretiminin ve PNL sayılarının anlamlı olarak arttığını saptamışlardır. Ayrıca aynı araştırmacılar in vivo koşullarda rBoIFN- α 1' in bir etki göstermediğini ya da sınırda bir etki gösterdiğini; daha düşük serum konsantrasyonundaki rBoIFN- γ (10^4 U/kg)' nin ise; PNL' lerin göçünü anlamlı olarak baskıladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar; rBoIFN- α 1' in PNL' lerin göçü üzerine olan in vitro ve in vivo etkilerindeki farklılıkları da saptamışlardır. Bu farklılıkların IFN'ler tarafından uyarılan diğer faktörlerin modülasyonu yüzünden meydana gelebileceğini düşünerek, rBoIFN'lerin antiviral aktivitelerine ek olarak PNL fonksiyonları üzerine olan etkilerinin de araştırılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

HBV, infekte ettiği hepatositin zarında major histokompatibilite (MHC) sınıf I antijenlerinin sunulmasını azaltarak hücreyi IFN'ye karşı duyarsız kılar. KHB'li hastalarda IFN α sentezinin azaldığının gösterilmesi nedeniyle antiviral ve immünomodülatör etkileri bilinen IFN α 'nın tedavide uygulanmasının hastadaki virüs replikasyonunu durdurulabileceği düşünülmüştür (42).

Bazı araştırmacılar, KHB'li hastaların periferik mononükleer hücreleri ve hepatositlerinde HBV genomunun, IFN α sentezinin yetersizliğine neden olduğunu, bu durumun HBV persistansında rol oynadığını bildirmişlerdir (9).

Bütün IFN'ler, hücre yüzeyinde MHC sınıf I antijenlerinin belirlenmesini stimüle ettikleri gibi, sayılarını artırarak infekte hepatositlerin yüzeyindeki virüs antijenlerinin sitotoksik T hücreleri ve fagositik hücreler tarafından tanınmasını ve infekte hücrenin yok edilmesini sağlarlar (4). Lökosit IFN'sinin HBV DNA'sını azalttığı ve buna bağlı olarak hastanın karaciğer hasarında düzelme gözlemlendiği bildirilmiştir (11).

KHB enfeksiyonunu erişkin yaşta edinen hastalarda serum ALT düzeyleri artmaktadır. Bu hastalarda viral replikasyonun kendiliğinden kaybolması (HBeAg negatifliği), enfeksiyonu erken yaşta edinen hastalara oranla daha yavaş olmaktadır (5).

IFN'nin KHB'de serokonversiyonu (HBeAg'nin kaybolup, anti-HBe'nin oluşması) sağlama oranı, çeşitli çalışmalara göre çok değişkendir (% 15-61). Bu oranlar tedavi edilmeyen olgulara göre yüksek bulunmuştur (% 5-7). Üç-dört ay süre ile 5 MU/gün veya 10 MU/haftada 3 kez IFN kullanılan tipik olgularda kalıcı yanıt % 30-40 bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da % 30-50 oranında yanıt alınmıştır. Beşyüz elli iki hastadan oluşan 9 randomize kontrollü çalışmanın analizinde, tedaviden sonraki ilk yılda HBeAg negatifleşme oranı % 45.6, kontrollerde % 9.1 bulunmuştur. Sekizyüz otuz yedi hastadan oluşan 15 randomize kontrollü diğer bir çalışmanın analizinde, HBV-DNA / HBeAg / HBsAg kaybı, tedavi grubunda % 37 / 33 / 7.8, kontrol grubunda ise % 17 / 12 / 1.8 oranında bulunmuştur ($p<0.001$) ve IFN'nin anti-HBe oluşumu ve serum ALT düzeylerinin normalleşmesi üzerine önemli etkisinin olduğu gösterilmiştir (4).

IFN α kronik HBV enfeksiyonunun kabul görmüş tek tedavi yöntemidir. Üç-altı ay süre ile tedavi edilen hastalar arasında HBV DNA'sının ve HBeAg'nin kaybolması kontrol grubuna oranla % 20'den fazladır; bunun yanında HBsAg'nin kaybolması sadece % 5-6 daha fazladır. Ancak tedavi sırasında veya tedaviden hemen sonra HBeAg'nin kaybolduğu hastalarda takip eden 5-7 yıl içinde genellikle HBsAg negatiftir. Serum ALT düzeyi normal ve dolaşan virüs yükü fazla olan hastaların, IFN tedavisine verdiği yanıt düşüktür. IFN tedavisinin sirozu, son dönem karaciğer hastalığını ve HCC'nin ilerlemesini durdurup durdurmadığı tam olarak açıklık kazanmamıştır. Ancak HBeAg'nin tedavi ile veya kendiliğinden kaybolması hastalığın iyileşmesinin göstergesidir (5).

Çalışmamızda IFN α -2a, in vitro ve ex vivo koşullarda sağlıklı ve KHB'li hasta PNL' lerinin hücre içi öldürme aktivitesini etkilememiştir ($p>0.05$). İn vitro koşullarda IFN α -2a'nın (10 IU/ml); tedavi uygulanmayan KHB'li hasta PNL' lerinin fagositik aktivitesini hasta kontrol PNL' lerine göre anlamlı olarak artırdığı ($p<0.001$) ve bu artışın sağlıklı PNL fonksiyonlarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0.0005$). Ex vivo koşullarda IFN α -2a'nın; tedavi uygulanan KHB'li hasta PNL' lerinin fagositik

aktivitesini ise sağlıklı kontrol PNL'lerine göre anlamlı olarak artırdığı saptanmıştır (p<0.005).

Çalışmamızda da görüldüğü gibi IFN'nin, KHB'li hasta PNL'lerini aktive ve stimüle ederek antijenin tanınmasını ve fagositozunu kolaylaştırdığı anlaşılmaktadır. Bütün IFN'lerin hücre yüzeyinde bulunan MHC sınıf I antijenlerinin belirlenmesini stimüle ettiğini düşündüğümüzde tedaviye eklenen IFN, çalışmamızda muhtemelen hepatositlerde azalan IFN miktarını ve MHC sınıf I antijen sayısını artırmış, PNL fagositozunu stimüle ederek viral antijenlerin kaybına ve hastalığın iyileşmesine yardımcı olmuştur.

Sonuç olarak; çalışmamızda Faz II döneminde bulunan KHB'li hastaların tedavisinde kullanılan IFN α -2a (10 IU/ml) in vitro ve ex vivo koşullarda hasta PNL'lerinin hücre içi öldürme aktivitesini etkilememiş buna karşın, her iki deney koşulunda PNL'lerin fagositik aktivitesini anlamlı olarak (p<0.0005, p<0.005) artırmıştır.

Çalışmamızda IFN α -2a, (9-10 MU/ml), tedavisi uygulanan KHB'li hastaların tedavilerinin 3. ayında serum HBV DNA, ALT ve AST düzeyleri, tedavi öncesi değerlerle karşılaştırıldığında, serum HBV DNA düzeyinde azalma, ALT ve AST düzeylerinde normalleşme gözlenmiştir .

Bu bulguların ışığı altında IFN'nin KHB'li hastaların tedavisine immünoterapötik bir yaklaşım getirebileceğini ve tedavi süresinin uzaması (6-12 ay) ile daha olumlu yanıtlar (HBeAg ve HBsAg'nin negatifleşmesi) alınabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1- Akan E.: Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, s: 322-324, 1992.
- 2- Alexander J.W., Windhorst D.B., Good R.A.: Improved tests for the evaluation of neutrophil function in human disease. J. Lab. Clin.Med., 72(1): 136-148, 1968.
- 3- Aydoğdu S., Ertürk L., Yağcı R.V.: Kronik hepatit B virüs infeksiyonunda, alfa - interferonun yan etkileri. Ege Tıp Dergisi, 36 (3-4):117-119, 1997.
- 4- Balık İ.: İnterferonların Tedavide Kullanımı. Ed: Kılıçturgay, K., Viral Hepatit '98, 1.Baskı, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, s.107-118, 1998.
- 5- Balkwill F.R.: Interferons. Lancet, 8646: 1060-1063, 1989.
- 6- Baron E.J., Finegold S.M.: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. The C.V. Mosby Company. Eight Edition, p:681-775, 1990.
- 7- Boyum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 97: 77-89, 1968.
- 8- Demir K.: Kronik B Hepatitinde İnterferon - alfa Tedavisinin Uzun Süreli Sonuçları. Gastroenteroloji Yan Dal Uzmanlık Tezi, İstanbul Tıp Fakültesi Deneyimi, İstanbul 1999.
- 9- Dianzani F., Antonelli G., Capobianchi M.R.: The biological basis for clinical use of interferon. J. Hepatol., 11(Supp1.):5-10, 1990.

- 10- Galvani D., Griffiths D.S., Cawley C.J.: Interferon for treatment: the dust settles. *Br Med J*, 296: 1554-1556, 1988.
- 11- Greenberg H.B., Pollard R.B., Lutwick L.I., Gregory P.B., Robinson W.S., Merigacan T.C.; Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virüs infection in patients with chronic active hepatitis. *N Engl J Med*, 2295: 517-522,1976.
- 12- Gyllenhammar H., Hafström I., Ringertz B., Uden A.M., Palmblad J.: Recombinant human leukocyte interferon modulates neutrophil function in vitro. *J Interferon Res.*, 8: 441-449, 1988.
- 13- Hardman J.E., Limbird L.E.: Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Mc Graw-Hill, p: 1211-1214, 1996.
- 14- Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A.: Review of Medical Microbiology. Middle East Edition, 1982.
- 15- Kaymakoglu S.: Kronik B Hepatitinde İnterferon Tedavisi. III. Ulusal Hepatoloji Kongresi Bildirisi., s.25-28, 1999.
- 16- Kılıçturgay K.: Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji, Onur Yayıncılık, 1992.
- 17- Kılıçturgay K.: İmmünoloji, Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri, s: 15-21, 1997.
- 18- Kıyan M.: HBV Enfeksiyonu. Ed. Kılıçturgay K., Viral Hepatit '98, 1.Baskı, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, s. 66-93, 1998.
- 19- Krawitt E.L.: Chronic Hepatitis. Mandel, G.L., Benna, J.E., Dolin, R., Principles and Practice of Infectious Disease, vol.1, Churchill Livingstone, 1153-1159, 1995.

- 20- Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J., Shadomy H.J.: Manual of Clinical Microbiology, Fourth Edition, p: 526-541, 1985.
- 21- Levinson W., Jawetz E.: Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, 4. Baskı, Barış Kitabevi, Bölüm 50, s: 230-237, 279-282.
- 22- Lohr K.M., Synderman R.: Amphotericin B alters the affinity and functional activity of the oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocytes. J. Immunol, 129 (4): 1594-1599, 1982.
- 23- Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett J.E.: Principles and Practice of Infectious Diseases, Third Edition, Vol. 1, Churchill Livingstone Inc., 1990.
- 24- Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett J.E.: Principles and Practice of Infectious Diseases, Third Edition, Vol. 2, p: 1943 Churchill Livingstone Inc., 1990.
- 25- Michael W., Fired M.D.: Therapy of Chronic Viral Hepatitis. Management of Chronic Liver Disease, volume 80, Number 5, 1996.
- 26- Moran F.J., Puente L.F., Perez-Giraldo C., Hurdato C., Blanco M.T., Gomez-Garcia A.C.: Effect of cefpirome in comparison with cefuroxime against human polymorphonuclear leukocytes in vitro. J Antimicrob Chemother, 33:57-62, 1994.
- 27- Ohmann, H.B., Babiuk, L.A.: Alternation of some leukocyte functions following in vivo and in vitro exposure to recombinant bovine alpha - and gamma - interferon. J. Interferon Res., 6:123-136, 1986.
- 28- Ökten, A.: B Tipi Viral Hepatit Klinik Gidişi ve Tedavi. Ed. Kılıçturgay, K., Viral Hepatit 92, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, s.73-86, 107-119, 1992.
- 29- Özbal Y.: Temel İmmünoloji. I.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri., s: 34-38, 1994.

- 30- Pallister C.J., Warnock D.W.: Effect of antimicrobial and antineoplastic drugs alone and in combination on the phagocytic and candidacidal function of human polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 23:87-94, 1989.
- 31- Pascual A., Garcia I., Conejo C., Perea E.J.: Uptake and intracellular activity of fluconazole in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 37(2): 187-290, 1993.
- 32- Pelczar M.J., Chan E.C.S., Krieg N.R.: *Microbiology Concepts and Applications. International Edition, Mc Graw - Hill, Inc, p: 487-491, 1993.*
- 33- Poyraz,Ö.: Genel ve Özel Tıbbi Viroloji, No:71, Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, s.198-221, 1998.
- 34- Richardson M.D., Scott G., Shankland G.S.: Effect of cilofungin on phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by human neutrophils. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 11(1): 22-26, 1992.
- 35- Roilides E., Walsh T.J., Rubin M., Venzon D., Pizzo P.A.: Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 34 (2): 196-201, 1990.
- 36- Saltoğlu N., Çetiner S., Taşova Y., Güler Ö., Alpaslan N., Dündar İ.H.: Hepatit B Virüs ile bazı immün parametrelerinin ilişkisinin değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi* (1): 16-21, 1998.
- 37- Schaechter M., Medoff G., Einstein B.J.: *Mechanisms of Microbial Disease, International Second Edition, p: 577, 1993.*

- 38- Soyoğul Ő.: *Candida albicans*'a karşı Flukonazol'ün İnsan Polimorf NŐveli LÖkosit Fonksiyonları Őzerine İn Vivo Etkisinin Araştırılması, Marmara Őniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 1994.
- 39- Stites D.P., Stobo J.D., Wells J.V.: *Basic and Clinical Immunology*. Sixth Edition p: 106-113, 554-556, 1987.
- 40- Taşova Y., Saltoğlu N., Erdurak Ő., Aksu H.S.Z.: Kronik Hepatit B infeksiyonlarında interferon tedavisi. *Viral Hepatit Dergisi.*, 1: 46-50, 1998.
- 41- Taşyaran A.M.: *Epidemiyoloji*. Ed. Kılıçturgay K., *Viral Hepatit '98*, 1.Baskı, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, s. 94-100, 1998.
- 42- Thomas, H.C.: The Hepatitis B virus and the host response. *J. Hepatol.* 11(Supp1.):83-89, 1990.
- 43- Topçu, A.W., SŐyletir, G., Doğanay, M.: *İnfeksiyon Hastalıkları*, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996.
- 44- TŐmbay E.: *Pratik Tıp Mikolojisi*, I. Baskı, s: 45-61, 1983.
- 45- Unat E.K.: *Temel Mikrobiyoloji*, 2. Baskı, İ.Ő. Cerrahpaşa Tıp FakŐltesi Yayınları, s: 41-47, 1993
- 46- Ustaçelebi ř.: *Genel Viroloji, VirŐs İnfeksiyonlarından Korunma ve Tedavi*, 1. Baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık, s.121-138, 1992.
- 47- Vering E.M., Verhoef J.: Clindamycin at subinhibitory concentrations enhances antibody - and complement - dependent phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*, 33: 243-249, 1987.

ÖZGEÇMİŞ

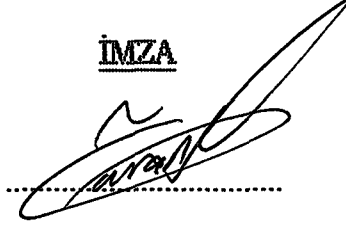
1974 yılında İzmit'te doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Isparta'da, lise öğrenimimi İstanbul'da tamamladım.1992 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girdim ve 1996 yılında iyi derece ile mezun oldum. Aynı yıl Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans öğrencisi Burçak GÜRBÜZ'ün, çalışması jürimiz tarafından Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Ünvan SOYOĞUL GÜRER
Üniversitesi : Marmara



Üye : Prof.Dr.Adile ÇEVİKBAŞ
Üniversitesi : Marmara




Üye : Prof.Dr.Candan JOHANSSON
Üniversitesi : İstanbul



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 1.8/...11/1999 tarih ve 01..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr. Sevim ROLLAS
Müdür