

AMFOTERİSİN-B VE FLUKONAZOLÜN *CANDIDA ALBICANS* ÜZERİNDEKİ POSTANTİFUNGAL ETKİNLİĞİ*

Aydan ÖZKÜTÜK, Sevin KIRDAR, Yavuz DOĞAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

ÖZET

Amfoterisin-B ve flukonazol sistemik kandidiyazis sağaltımında en sık kullanılan ilaçlardır. Bu ajanların etkinliğini araştıran birçok çalışma mevcuttur. Ancak antifungal ilaçların etkinliğinde ilacın farmakokinetik özelliklerinin yanında postantifungal etkisinin de rolü vardır. İlaçların gösterdiği postantifungal etki uygun doz aralıklarının belirlenmesinde önemli olabilir. Bu çalışmada dört klinik Candida albicans izolatına karşı amfoterisin-B ve flukonazolün postantifungal etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla logaritmik üreme fazına getirilmiş olan suşlar ilaçların 1x-8x minimum inhibitör konsantrasyonlarıyla 1.5 saat süre ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak Candida albicans suşlarına karşı flukonazolün ölçülebilir bir postantifungal etkisi görülmezken, amfoterisin-B'nin 7.5 ile 20 saat arası süren postantifungal etkisi saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: amfoterisin-B, Candida albicans, flukonazol, postantifungal etki

SUMMARY

Postantifungal Effects of Amphotericin-B and Fluconazole against Candida albicans

Amphotericin-B and fluconazole are most commonly used drugs in the treatment of systemic candidiasis. Several in vitro procedures have been used to assess to effectiveness of these antifungal agents. However the efficacy of antifungal agents may not only depend on their pharmacokinetic properties but it also depends on the postantifungal effect (PAFE) of these agents. PAFE may be important for determining the reliable dosing intervals.

In this study, the PAFE of amphotericin-B and fluconazole was evaluated against four clinical isolates of Candida albicans. Strains in logarithmic growth phase were exposed to the antifungal agents for 1.5 hour in concentrations from 1 to 8 times of the MIC. Fluconazole displayed no measurable postantifungal effect but amphotericin-B displayed a prolonged PAFE from 7.5 to 20 hours against Candida albicans isolates.

Keywords: amphotericin-B, Candida albicans, fluconazole, postantifungal effect

GİRİŞ

Candida albicans insan normal deri ve mukozalarında bulunan fırsatçı bir mantar türüdür. Özellikle bağışık yanıtı baskılanmış hasta gruplarında ciddi invaziv infeksiyonlara yol açmaktadır. İnvaziv fungal infeksiyonların yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olmaları nedeni ile antifungal ilaçlar üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır⁽⁶⁾.

Antimikrobiyal ajanların etkinliğinde farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin önemi büyüktür. Antibiyotiğin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin üzerinde kaldığı süre ($T > MİK$), zamana bağlı konsantrasyon eğrisinin altında kalan alanın (AUC) MİK değerine oranı (AUC/MİK) ve ilacın serumdaki maksimum konsantrasyon değerinin (Cmax) MİK değerine oranı (Cmax/MİK) ilaçların etkinliğini göstermede kullanılmaktadır. AUC/MİK ve Cmax/MİK oranları klinik ve bakteriyolojik etkinliği

Yazışma adresi: Aydan Özkütük, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

Tel.: (0232) 412 45 10

e-posta: aydan.ozkutuk@deu.edu.tr

Alındığı tarih: 03.11.2004, revizyon kabulü: 27. 01. 2005

*3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi'nde sunulmuştur (27-30 Mayıs 2003, Bodrum).

göstermede en iyi parametreler olarak ifade edilmektedir^(3,11). Benzer durum antifungal ilaçlar için de geçerlidir.

Postantifungal etki (PAFE) antifungalın mantarla belirli bir süre bir arada tutulmasının ardından ortamdan uzaklaştırılmasına rağmen üremedeki baskılayıcı etkinin bir süre daha devam etmesidir. Klinik olarak bir antifungal ilacın uygun doz rejiminin belirlenmesinde MİK değeri yanında bu etkinin değerlendirilmesinin sağaltım başarısını arttırabileceği belirtilmektedir^(5,13). Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde postantibiyotik etkinin (PAE) incelendiği birçok çalışma mevcuttur^(8,14). Ancak *Candida* türleri üzerinde antifungallerin postantifungal etkinliğini (PAFE) gösteren çalışmalar az sayıdadır.

Bu çalışmanın amacı invaziv mantar infeksiyonlarında sık kullanılan antifungal ajanlardan flukonazol ve amfoterisin-B'nin postantifungal etkinliğinin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar

Flukonazolü test etmek için iki duyarlı (MİK: 0.25 µg/mL), iki doza bağımlı duyarlı (MİK 16 ve 32 µg/mL) ve amfoterisin-B için de MİK değerleri 0.125 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.50 µg/mL, 1 µg/mL olan dört *Candida albicans* suşu çalışmaya alınmıştır.

Antifungal ajanlar

Flukonazol (Pfizer, Türkiye)'ün 256 µg/mL, amfoterisin-B (Pfizer, Türkiye)'nin 500 µg/mL olacak şekilde stok solüsyonları, RPMI 1640 besiyeri kullanılarak (0.165 M morfolinopropansulfonik asit ile tamponlanmış, L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız, pH: 7) hazırlanmıştır.

PAFE Yöntemi

Mantarın üreme kinetiğinin takibi için Shu ve ark.⁽¹³⁾'nün önerdiği spektrofotometrik olarak optik dansite ölçümü temeline dayanan bir yöntem uygulanmıştır. Çalışmaya alınan suşların Sabouraud dekstroz agar (SDA)'da 24 saatlik kültürlerinden birkaç koloni 15 ml sıvı besiyerinde süspanse edilerek 37°C'de 6-8 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra tüplerden ikinci bir sıvı besiyerine 150 µL aktarılacak aynı koşullarda 16 saat daha inkübe edilerek suşlar logaritmik üreme fazına getirilmiştir. Maya süspanسیونlarının bulanıklıkları spektrofotometre ile 520 nm'de 1.5 olacak şekilde fosfat tamponunda (PBS) dilüe

edilmiştir. Flukonazol ve amfoterisin-B'nin stok solüsyonlarından her bir suşun MİK değerlerinin 1, 2, 4 ve 8 katı konsantrasyonlarda olacak şekilde ilaç konsantrasyonları hazırlanmıştır. İki mL RPMI 1640 / ilaç içeren tüpler ile ilaç içermeyen kontrol tüpleri üzerine maya süspanسیونlarından 0.5'er mL eklenmiştir. Tüm tüpler 1.5 saat 37°C'de 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İlaçları uzaklaştırmak amacıyla tüpler steril serum fizyolojik ile 3000 g'de 10 dakika süreyle santrifüjlenerek iki kez yıkanmıştır. Santrifüj sonrasında maya hücre peletleri 2.5 mL steril PBS ile yeniden süspanse edilerek 0.5 McFarland bulanıklığına (10⁶ hücre/mL) ayarlanmıştır. Önceden her bir kuyucuğuna 150 µL RPMI 1640 dağıtılmış düz tabanlı plaklara hücre süspanسیونlarından 100'er µL pipetlenmiştir. Plaklar 37°C'de 200 rpm hızda çalkalanarak inkübe edilmiştir. 24 saat boyunca her saat başında 595 nm'de spektrofotometrik olarak optik dansiteleri ölçülmüştür. Her bir suş (1x, 2x, 4x, 8x MİK) her bir plakta 4'er kez olmak üzere iki kez denenmiştir.

PAFE'nin değerlendirilmesi: PAFE süreleri, PAFE = T-C formülü kullanılarak hesaplanmıştır. T, ilaçla karşılaşmış maya hücrelerinin relatif optik dansitelerinin ilaç uzaklaştırıldıktan sonra 0.05 absorbans düzeyine ulaşması için geçen süreyi göstermektedir. C ise ilaç içermeyen kontrol maya hücrelerinin optik dansitelerinin aynı absorbans düzeyine ulaşması için geçen süre olarak tanımlanmaktadır.

BULGULAR

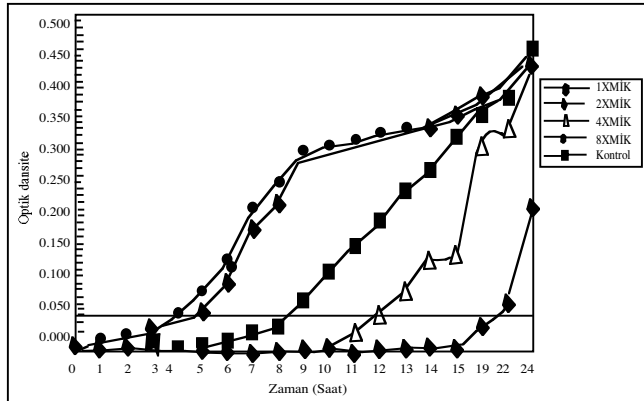
Amfoterisin-B'nin 1x, 2x, 4x ve 8x MİK'larında zamana bağlı üreme çizelgesinde 0.05 optik değere ulaştığı süre olan T ve amfoterisin-B içermeyen kontrol suşlarının aynı optik değere ulaştığı C süreleri saptanarak, postantifungal etki süresi hesaplanmıştır.

Amfoterisin-B'nin 7.5 ile 20 saat arasında değişen sürelerde postantifungal etkinliği devam etmiştir. *C.albicans* suşlarının postantifungal etkinlik süreleri tabloda ve bir suşun amfoterisin-B'nin farklı konsantrasyonlarındaki üreme eğrisi grafikte gösterilmiştir.

Amfoterisin-B'nin postantifungal etkinliğinin konsantrasyon artışı ile paralel olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Flukonazolün ise *C.albicans* suşları üzerinde aynı konsantrasyonlarda postantifungal etkinliği görülmemiştir.

Tablo: Amfoterisin B'nin *C.albicans* suşlarına in-vitro PAFE süreleri (saat).

Konsantrasyon	C.albicans 1	C.albicans 2	C.albicans 3	C.albicans 4	Ortalama
AmB 1xMİK	0.54±0.07	3.48±0.07	9.11±0.06	16.25±0.03	7.34
AmB 2xMİK	4.66±0.36	7.23±0.15	14.71±0.09	19.45±0.02	11.51
AmB 4xMİK	7.74±0.14	18.72±0.10	15.88±0.02	20.98±0.12	15.83
AmB 8xMİK	16.35±0.28	19.31±0.07	19.86±0.16	21.54±0.29	19.26
Ortalama	7.32	12.1	14.89	19.55	

Grafik: Bir suşun AmB'nin farklı konsantrasyonlarındaki üreme eğrisi.

TARTIŞMA

Antifungal ilaçların farmakodinamiği ilaç konsantrasyonları ile zaman ve antimikrobiyal etkinlik arasındaki ilişkileri incelemektedir. Antifungal ilaçların dinamiğini inceleyen time-kill çalışmalar antifungalın hangi dozda ve sıklıkta verilmesi ile ilgili önemli ipuçları vermektedir^(1,9). İnvaziv fungal infeksiyonların başarılı sağaltımı için yeni antifungal ilaç geliştirme çalışmaları yanında mevcut antifungallerden de daha etkili olarak nasıl yararlanılabileceği önemli araştırma konularıdır. Uygun dozun belirlenmesinde sıklıkla kullanılan değerlendirme ölçütü ilacın MİK değerinin belirlenmesidir. MİK değeri yanında incelenmesi önerilen diğer bir faktör de postantibiyotik etkidir. Bakteriler üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar sonrasında yöntem mantarlara adapte edilmiştir. Postantifungal etkinin klinik anlamı; seçilen antimikrobiyal ajanın yan etki oluşumuna yol açmadan etkinliğini gösterebildiği doz aralıklarının ayarlanabilmesini sağlamasıdır⁽¹³⁾.

PAFE'nin belirlenmesi için değişik yöntemler uygulanabilmektedir. Kantitatif koloni sayımı ile, spektrofotometrik olarak ya da BacT/Alert ticari sistemleri ile PAFE saptanabilmektedir^(2,7,10,13). Koloni sayımı yöntemi zahmetli ve fazla malzeme harcanmasına yol açmakla birlikte kantitatif olarak net değerlendirme yapılabilmektedir. Spektrofotometrik yöntemler ise daha kolay ve ekonomik olmaktadır.

PAFE'nin değerlendirilmesinde kullanılan besiyeri, ısı ve ilacın konsantrasyonuna göre farklı sonuçlar alınabilmektedir. Amfoterisin-B'nin PAFE'si bu koşullara bağlı olarak çeşitli çalışmalarda 0.5-12 saat arasında değişebilmektedir^(2,7,13). Çalışmamızda amfoterisin-B'nin 7.5 ile 20 saat arası PAFE'si saptanmıştır. RPMI-1640 besiyeri ile Sabouraud dekstroz buyyonu (SAB) arasında poliyen antifungal ilaçların denenmesinde anlamlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. SAB ile elde edilen PAFE değerleri daha

yüksek olmakta, bunun yanında NCCLS duyarlılık testlerinde RPMI-1640 besiyerini önermektedir^(12,13). Çalışmamızda RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır.

Amfoterisin-B ile yapılan çalışmalarda MİK değerinin 1-20 katı arasında değişen (1x, 4x, 8x, 10x, 20x) konsantrasyonlarda değerlendirilmelerin yapıldığı görülmektedir^(2,6,4). Çalışmamızda 1x-8x konsantrasyonlarda çalışılmış ve amfoterisin-B'nin konsantrasyonuna bağlı olarak PAFE'in arttığı gözlenmiştir. İnkübasyon ısısı olarak literatürde 22, 35 ve 37°C ısılarında yapılan çalışmalarda en yüksek PAFE değerlerinin 37°C'de görüldüğü bildirilmektedir⁽⁷⁾. Çalışmamızda inkübasyon ısısı olarak 37°C seçilmiştir.

Amfoterisin-B'nin PAFE sürecinde suşların MİK değerleri ile etki süresi arasında bir ilişki gözlenmemiştir.

Çalışmada flukonazol için ölçülebilir bir PAFE süresi saptanmamıştır. Azol grubu ilaçlar konsantrasyondan bağımsız fungistatik ilaçlardır. PAFE'nin görülmeyişinin nedeni, ilacın yıkamalarla uzaklaştırılmasının ardından hızlı reversibl fungal metabolizma ile kültürlerin kendini onararak üremelerini hızlandırmaları olabilir. Flukonazolün postantifungal etkinliğinin değerlendirilmesinde konsantrasyon ya da zamana bağlı bir değişiklik görülmemiştir.

Flukonazolün postantifungal etkinliğinin görülmemiş olması bu ajanların kullanıldığı infeksiyonlarda suprainhibitör konsantrasyonlarda kısa aralarla verilme gerekliliğini ortaya koymaktadır. Öte yandan amfoterisin-B'nin konsantrasyona bağlı olarak fungusid aktivitesinin artması ve uzun süreli PAFE'sinden dolayı, ilacın kandaki düzeyi MİK değerinin altına düşse dahi üremenin bir süre engelleneceği düşünülebilir. Bu durum daha yüksek dozların uzun aralıklarla verilebilmesine olanak tanıyacaktır. Ancak kesin sonuçlar in-vivo çalışmalarda da desteklenmelidir.

Sonuç olarak antifungal sağaltımında ilaçların MİK değerleri yanında postantifungal etkisinin de bilinmesinin ideal doz rejimlerinin düzenlenmesine ve uygun bir sağaltım planının oluşturulmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Andes D: In vivo pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis, *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(4):1179-86.
- Chryssanthou E, Cars O, Sjolín J: New automated method for determining postantifungal effect of amphotericin B against *Candida* species: Effects of concentration, exposure time and area under the curve, *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(12):4016-8.
- Craig WA: Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men, *Clin Infect Dis* 1998;26(1):1-10.
- Ellepola AN, Samaranyake LP: The in vitro post-antifungal effect of nystatin on *Candida* species of oral origin, *J Oral Pathol Med* 1999;28(3):112-6.

5. Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA: Postantifungal effects of echinocandin, azole and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(4):1108-11.
6. Garcia MT, Llorente MT, Minguez F, Prieto J: Postantifungal effect and effects of sub-mic concentrations on previously treated *Candida* spp. influence of growth phase, *J Infect* 2002;45(4):263-7.
7. Garcia MT, Llorente MT, Minguez F, Prieto J: Influence of temperature and concentration on the postantifungal effect and effects of sub-mic concentrations of four antifungal agents on previously treated *Candida* species, *Chemotherapy* 2000;46(4):245-52.
8. Gerçeker AA, Saraçoğlu K: Seftazidimin tek başına ve amikasin ile kombinasyon halinde *Pseudomonas aeruginosa* suşları üzerine oluşturduğu postantibiyotik etkinin araştırılması, *ANKEM Derg* 2003;17(1):70-4.
9. Groll AH, Piscitelli SC, Walsh TJ: Antifungal pharmacodynamics: Concentration-effect relationships in vitro and in vivo, *Pharmacotherapy* 2001;21(8):133-48.
10. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA: Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods, *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(5):1207-12.
11. MacGowan AP: Role of pharmacokinetics and pharmacodynamics: does the dose matter?, *Clin Infect Dis* 2001;33(Suppl 3):238-9.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved standard. Document M27-A, NCCLS, Wayne, Pa (1997).
13. Shu M, Ellepola AN, Samaranyake LP: Effects of two different growth media on the postantifungal effect induced by polyenes on *Candida* species, *J Clin Microbiol* 2001;39(7): 2732-5.
14. Spangler SK, Lin G, Jacobs MR, Appelbaum PC: Postantibiotic effect and postantibiotic sub-mic effect of levofloxacin compared to those of ofloxacin, ciprofloxacin, erythromycin, azithromycin and clarithromycin against 20 pneumococci, *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(5): 1253-5.