

Debrecen Megyei Jogú Város Önkormányzat Egészségügyi Szolgálat
Bőr- és Nemibeteg gondozó Intézet¹ (intézetvezető főorvos: Halmy Klára dr.), Állatételtani Tanszék
Kossuth Lajos Tudományegyetem² (intézetvezető: Varga Vince dr.).

Antimycoticumok in vitro hatása a fagocitózisra és a *Candida albicans* killingre In vitro effects of antimycotics on phagocytosis and killing of *Candida albicans*

HALMY KLÁRA DR.¹, SERFŐZŐ JÓZSEF DR.²

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők három antimycoticum az itraconazol, ketoconazol és fluconazol 10⁻⁷ és 10⁻⁵ M.ml⁻¹ koncentráció melletti hatását vizsgálták a polymorphonucleáris leukociták (PMNL) fagocitózisára és intracelluláris *Candida albicans* killingjére. A gyógyszerek közül az itraconazol és a ketoconazol stimulálta leginkább mind a fagocita aktivitást, mindig a killing funkciót. A hatékonyság növekedése egyenes arányban volt a koncentráció emelésével.

Kulcsszavak:
Antimycoticumok - fagocitózis -
***Candida albicans* killing**

SUMMARY

The authors investigated the effects of three antimycotics: itraconazole, ketoconazole and fluconazole, in two different concentration (10⁻⁷ and 10⁻⁵ M.ml⁻¹) both on the phagocytosis and intracellular *Candida albicans* killing of polymorphonuclear leucocytes. According to in vitro experiments, ketoconazole and itraconazole increased most effectively the phagocytic and killing functions. The effectiveness of examined antimycotics was proportional with the increasing concentration of antimycotics.

Key words:
Antimycotics - phagocytosis -
***Candida albicans* killing**

A humán szervezet celluláris védekezésében a PMNL és a makrofág fagocitózisnak, valamint az előző funkcióknak döntő szerepe van (8, 13, 15, 21). A sarjadzógombák – köztük a *Candida albicans* (*C. albicans*) – fonalas stádiumba való átalakulása bizonyos védelmet nyújt a fagocitákkal szemben (1, 12, 17, 21, 24, 28). A gomba proteináz termelése (11, 20), valamint sejtfalának polysaccharida összetevői (5) szintén a fagocitózissal szembeni védekezést biztosítják.

Az imidazol és triazol antimycoticumok a gomba ergosterol bioszintézisének gátlása révén elsősorban a fonalas stádiumba való átalakulást gátolják (2, 6, 10, 14, 18, 29, 31), de kis mértékben a csíraszámot is csökkentik. A fagocitált blasztospórákra nagyobb mértékben hatnak, mint a sejteken kívüliekre (27, 31).

Jelen vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy az imidazol és triazol típusú antimycoticumok közül – különböző koncentrációkat alkalmazva – melyik és milyen mértékben hat in vitro körülmények között a fagocita és *C. albicans* killing funkciókra.

Módszerek

52 különböző dermatophyton okozta dermatomycosisos beteg szérumban fagocitózis és *C. albicans* killing vizsgálatokat végeztünk. A betegek anamnézisében sem immunszuppresszió sem belszo-

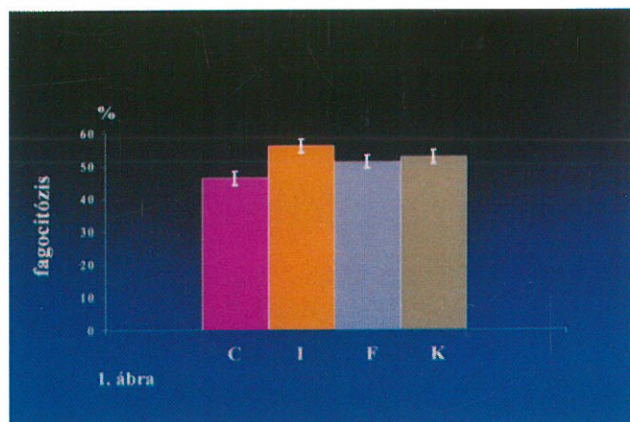
szervi megbetegedés nem szerepelt. A fagocitózist Lehrer és Cline (16) Csató és munkatársai (4) által módosított eljárása szerint végeztük. A PMNL szeparálására Ficoll-Uromiro gradienst alkalmaztunk. A leukocita sejtszám 2x10⁷ sejt ml⁻¹ volt. Tripánkéék exclusiós teszttel a nem festődő granulociták aránya 92–98%-os volt. A candida sejt-szuspenziót – amelynek sejtszámát 4x10⁷ sejt ml⁻¹-re állítottuk be – 1h-án át a három antimycoticum 10⁻⁷ és 10⁻⁵ M. ml⁻¹ koncentrációval előinkubáltuk. 1 ml candida sejt-szuspenzióhoz 1 ml leukocita szuszpenziót és 1 ml opsonizálásra alkalmas humán AB kevert szérumot adtunk, amelyet 1h-án keresztül 37 °C-on rázófürdőben inkubáltuk (fordulatszám 80 rpm). Fénymikroszkópos vizsgálatban 100 granulocitára eső fagocitáló sejteket fagocitózis %-ként értékeltük.

A killing vizsgálatra a leukocita és candida szuszpenziót 5 percig 2000 g mellett centrifugáltuk. A leukocitákat Triton x100-al 4 °C-on 5 percig tartva feloldottuk. Ismételt centrifugálás után a preparátumokat 0,1%-os Löffler metilénkéékkel festettük. Az élő és elölt blasztospóra arányát mint killing rátát fejeztük ki. Kontrollként a fagocitózis és killing vizsgálatokra a betegek antimycoticum nélküli leukocita szuszpenziójának a candida szuszpenzióval és humán AB szérummal elkészített keverékét használtuk.

Statisztikai analízisre a Student féle 2 mintás „t” próbát alkalmaztuk.

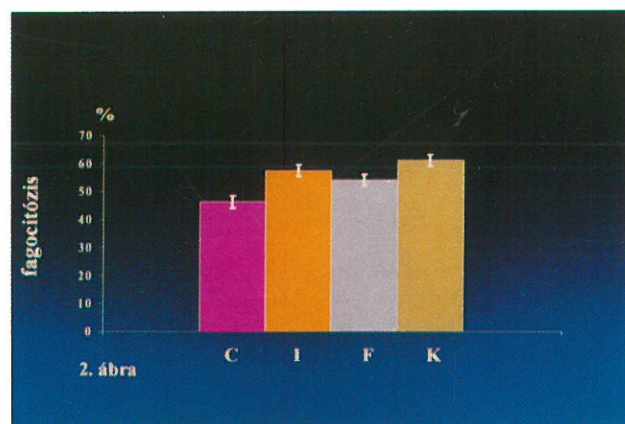
Eredmények

Alacsonyabb antimycoticum koncentráció mellett (10⁻⁷ M. ml⁻¹) az itraconazol és a ketoconazol szignifikánsan növelte a fagocitózis rátát (p<0,001, ill. P<0,05). A fluconazol esetében gyengébb hatás mutatkozott (p>0,05, 1. ábra, 1. táblázat). A három antimycoticum hatása között azonban nem volt szignifikáns különbség.



1. ábra

Antimycoticumok hatása a PMNL fagocitózisra
10⁻⁷ M. ml⁻¹ koncentrációjánál



2. ábra

Antimycoticumok hatása a PMNL fagocitózisra
10⁻⁵ M. ml⁻¹ koncentrációjánál

n = 52

C = kontroll
I = itraconazol
F = fluconazol
K = ketoconazol

n = 52

C = kontroll
I = itraconazol
F = fluconazol
K = ketoconazol

Antimycoticum	Fagocita aktivitás (%)	
	Antimycoticum mentes közeg	Antimycoticum koncentráció / M.ml ⁻¹ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁵
Itraconazol		56,2 ± 2 57,6 ± 1,8
Fluconazol		51,2 ± 2 54,2 ± 1,8
Ketoconazol		52,6 ± 2 61,2 ± 2,5
Kontroll	46,4 ± 2	

1. táblázat

Antimycoticumok hatása a PMNL-ek fagocita aktivitására (n = 52)

Antimycoticum	Killing aktivitás (%)	
	Antimycoticum mentes közeg	Antimycoticum koncentráció / M.ml ⁻¹ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁵
Itraconazol		25 ± 1 37,1 ± 1
Fluconazol		22 ± 1 28,7 ± 1
Ketoconazol		31,2 ± 1,5 38 ± 1,4
Kontroll	20,9 ± 0,8	

2. táblázat

Antimycoticumok hatása a PMNL-ek *Candida albicans* killingjére (n = 52)

A fagocitózis ráta 10⁻⁵ M. ml⁻¹ koncentráció mellett mindhárom gyógyszer befolyása alatt szignifikánsan növekedett. Ezen dózisok alkalmazásakor a ketoconazol és fluconazol fagocitózis aktivitást növelő hatása között lényeges különbség mutatkozott ($p < 0,02$, 2. ábra, 1. táblázat). Az antimycoticumok kétféle koncentrációja hatásának összehasonlításakor megállapítottuk, hogy a nagyobb dózis esetén (10⁻⁵ M. ml⁻¹) a fagocitózis ráta magasabb is volt. A legszembetűnőbb növekedést e téren a ketoconazol idézte elő ($p < 0,05$, 3. ábra).

Az antimycoticumok hatása alatt – ellentétben az antimycoticum nélküli kultúrákkal – a gomba fonális stádiumba való átalakulása csak elvétve vagy egyáltalán nem következik be, a fagociták több sarjadzósejtet kebeleznek be (4. ábra).

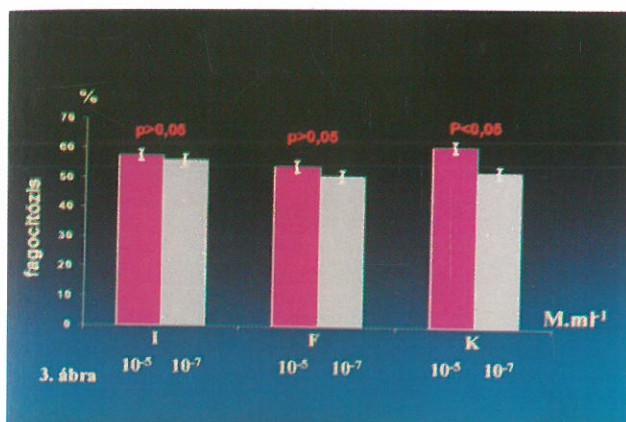
Valamennyi antimycoticum 10⁻⁷ M. ml⁻¹ koncentrációban növeli a killing ráta értékét. A hatékonysági sorrend: ketoconazol, itraconazol, fluconazol (5. ábra, 2. táblázat). Magasabb dózisban alkalmazva az antimycoticumokat a hatékonysági sorrend a következő módon változik meg: itraconazol, ketoconazol, fluconazol. Ez a változás a ketoconazol és itraconazol között azonban nem szignifikáns jellegű ($p < 0,05$, 6. ábra). Bár a koncentráció függőség ebben a vizsgálatban is kimutatható volt, a ketoconazalnál a kétféle koncentráció befolyása csaknem azonosnak mutatkozott (7. ábra).

Megbeszélés

Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a ketoconazol, itraconazol és fluconazol koncentráció függően növeli a fagocitózis és *C. albicans* elölési rátáját. A gyógyszerek inkább a csírázósejt gátlása révén hatnak és kevésbé befolyásolják az intracelluláris *Candida* sejtszámot (31).

Korábbi vizsgálatok szerint (3, 30) bizonyos leukocita funkciókra nincs befolyásuk, nem kapcsolódnak a membrán receptorokhoz, nem serkentik az opsonizációt vagy a kemotaxist (23). A ketoconazol immunszuppresszív hatását a limfocitákra gyakorolt citokin felszabadulás gátlásával hozzák kapcsolatba (25, 26, 27).

A dermatomikózisos betegek szérumban mért fagocita



3. ábra

Antimycoticumok hatása a PMNL fagocitózisra

n = 52

C = kontroll

I = itraconazol

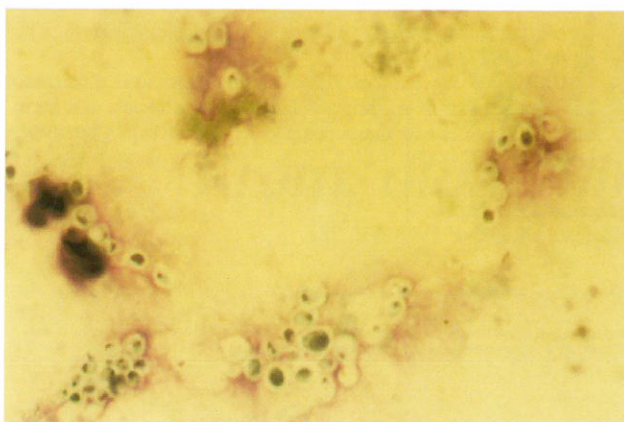
F = fluconazol

K = ketoconazol

aktivitást valamennyi általunk vizsgált antimycoticum serkentette. A fagocitózis ráta átlaga ($46,4 \pm 2$) alacsonyabb, mint korábban (9) az egészségeseknél mért érték ($68,0 \pm 5$). Egészségeseknél a ketoconazol nem növelte a fagocita aktivitást (7, 9, 23).

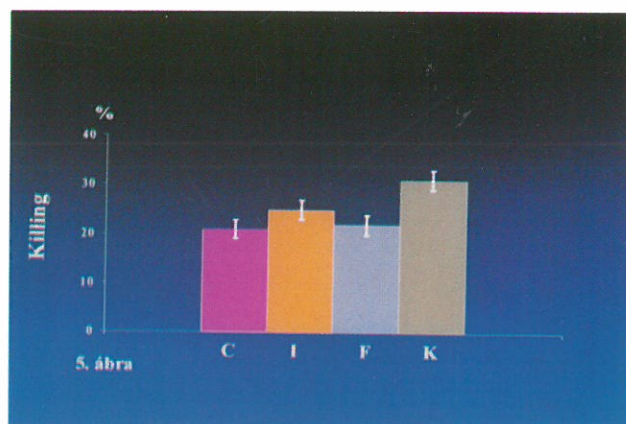
Az itraconazol és ketoconazol jelentékenyebben hatott, mint a fluconazol. A gyógyszerekkel azonos koncentrációban végzett in vitro vizsgálatokban megállapítást nyert, hogy a fluconazol csíratömlő képződést gátló hatása gyengébbnek mutatkozik (31). Az említett antimycoticumok mellett a polyen típusú amphotericin B is koncentráció függő módon növelte a fagocitózis hatékonyságát (19, 22, 31).

A PMNL killing aktivitását a vizsgált antimycoticumok egyaránt koncentráció függően serkentették. A ketoconazzal végzett korábbi vizsgálatokban ugyanez a hatás mutatkozott (7, 9). Az egészséges kontrollokéhoz ($27,4 \pm 2,3$) képest (9) a betegeknél a killing ráta átlaga alacsonyabb ($20,9 \pm 0,8$) volt. A ketoconazol és itraconazol



4. ábra

Fagocitózis 10^{-7} M. ml⁻¹ itraconazol hatása alatt



5. ábra

Antimycoticumok hatása PMNL *Candida albicans* killingre 10^{-7} M.ml⁻¹ koncentrációnál

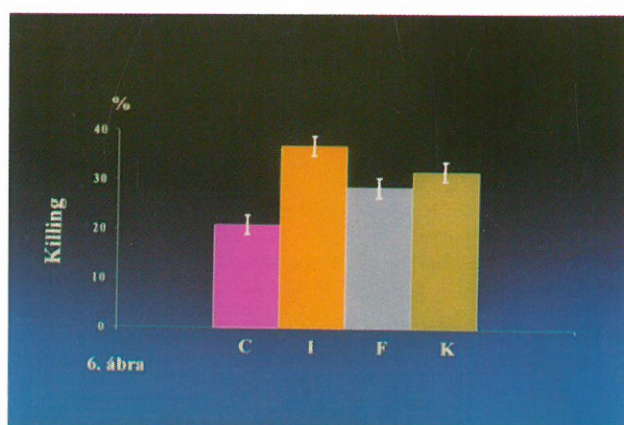
n = 52

C = kontroll

I = itraconazol

F = fluconazol

K = ketoconazol



6. ábra

Antimycoticumok hatása PMNL *Candida albicans* killingre 10^{-5} M.ml⁻¹ koncentrációnál

n = 52

C = kontroll

I = itraconazol

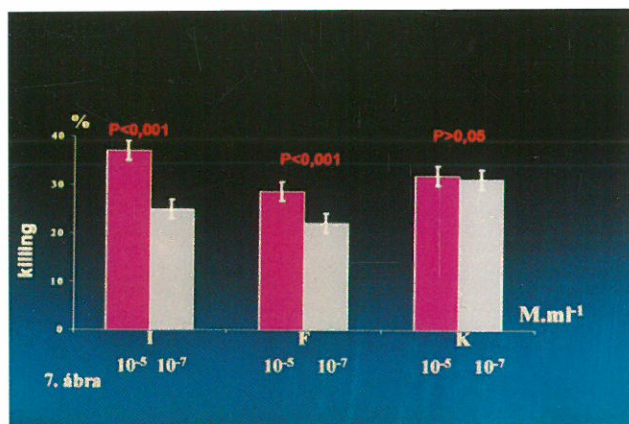
F = fluconazol

K = ketoconazol

zol killingre való hatása itt is erőteljesebbnek mutatkozott a fluconazolhoz képest.

A mikroszkópos vizsgálatokban megfigyelhettük, hogy a megnövekedett fagocita aktivitás következtében az intracelluláris blasztospórák száma emelkedik. Az antimycoticumok leállítják a sarjadzási folyamatot, a blasztospórák számát nem befolyásolják (31).

Vizsgálataink konklúziójaként megállapíthatjuk, hogy az antimycoticumok a gombás betegeknél előnyösen befolyásolják a szervezet védekező funkcióit, gátolják a *C. albicans* reprodukcióját, ezáltal megkönnyítik a PMNL-ek és makrofágok fagocita és előlő tevékenységét (7, 31).



7. ábra

Antimycoticumok hatása PMNL *Candida albicans* killingre

n = 52

I = itraconazol

F = fluconazol

K = ketoconazol

IRODALOM

- Barnes, J. L. és mtsai: Host-parasite interactions in the pathogenesis of experimental renal candidosis. *Lab. Invest.* (1983) 49, 460–467.
- Borgers, M., Marie-Anne de Van: Mode of action of itraconazole morphological aspects. *Mycoses* (1989) 32 (Suppl. 1) 53–59.
- Chan, C. K., Balish, E.: Inhibition of granulocyte phagocytosis of *Candida albicans* by amphotericin B. *Can. J. Microbiol.* (1978) 24, 363–364.
- Csató, M. és mtsai: Polymorphonuclear leukocyte function in psoriasis vulgaris. *Dermatol. Mon. schr.* (1983) 169, 238–242.
- Djeu, J. Y., Blanchard, D. K.: Regulation of human polymorphonuclear neutrophil (PMN) activity against *Candida albicans* by large granular lymphocytes via release of a PMN-activating factor. *J. Immunol.* (1987) 139, 2761–2767.
- Faergemann, J., Borgers, M.: The effect of ketoconazole and itraconazole on the filamentous form of *Pityrosporum ovale*. *Acta Derm. Ven. (Stockh)* (1990) 70, 172–176.
- Farkas, B., Dobozy, A.: A ketoconazol és a fagocita rendszer kölcsönhatásának in vitro vizsgálata. *Bőrgyógy. Vener. Szle.* (1983) 59, 111–114.
- Fromtling, R. A., Shadomy, J.: An overview of macrophage-fungal interactions. *Mycopathol.* (1986) 93, 77–93.
- Halmi, K., Serfőző, J., Halmi, M.: Fagocitózis és *Candida albicans* killing vizsgálatok különböző gombás kórképekben. *Bőrgyógy. Vener. Szle.* (1989) 65, 97–102.
- Hector, R. F., Braun, P. C.: The effects of bifonazole on chitin synthesis in *Candida albicans*. In: recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents. Fromtling, R. A. (Ed.) Copyright Prous, J. R. Science Publishers S. A. (1987) 369–382.
- Hilger, A. E., Danley, D. L.: Alteration of polymorphonuclear leukocyte activity by viable *Candida albicans*. *Infect. Immun.* (1980) 27, 714–720.
- Hill, D. W., Gebhardt, L. P.: Morphological transformation of *Candida albicans* in tissues of mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1956) 92, 640–644.
- Hurtrel, B., Lagrange, P. H., Michel, J. C.: Systemic candidiasis in mice. II. Main role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to infection. *Ann. Immunol. C* (1980) 131–135.
- Johnson, E. M. és mtsai: Effect of ketoconazole on the initial stages of germ tube formation by strains of *Candida albicans*. *Mykosen* (1982) 25, 481–486.
- Klebanoff, S. J., Clark, R. A.: *The Neutrophil*. Elsevier North-Holland Biomedical Press. New York (1978)
- Lehrer, R. I., Cline, M. J.: Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. *J. Bacteriol.* (1969) 98, 996–1004.
- Mackenzie, D. W. R.: Morphogenesis of *Candida albicans* in vivo. *Sabouraudia* (1964) 3, 225–232.
- Marichal, P. és mtsai: Culture media for the study of the effects of azole derivatives on germ tube formation and hyphal growth of *Candida albicans*. *Mykosen* (1986) 29, 76/81.
- Martin, E., és mtsai: Novel aspect of amphotericin B action, accumulation in human monocytes potentiates killing of phagocytosed *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* (1994) 38, 13–22.
- Odds, F. C.: *Candida albicans* proteinase as a virulence factor in the pathogenesis of candida infections. *Zentralbl. für Bacter. Microbiol. und Hygiene I. Abt. Orig. A.* (1985) 260, 539–542.
- Odds, F. C.: *Candida and Candidosis* 2nd edn. Bailliere Tindall, London (1988).
- Richardson, M. D. és mtsai: Intracellular killing of *Candida albicans* by human neutrophils in potentiated by exposure to combinations of amphotericin B and 5-Fluorocytosine. *Mycoses* (1991) 34, 201–204.
- Richardson, M. D., Brownlie, C. E. D., Shankland, G. S.: Enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by GM-CSF-activated human neutrophils. *J. Med. and Vet. Mycology* (1992) 30, 433–441.
- Scherwitz, C., Martin, R.: The phagocytosis of *Candida albicans* blastospores and germ tubes. *Dermatologica* (1979) 159, 12–23.
- Schütt, C. és mtsai: Wirkungen von Ketoconazol auf das Immunsystem II. Studien zum Wirkungsmechanismus. *Mykosen* (1987) 30, 559–573.
- Schütt, C. és mtsai: Wirkungen von Ketoconazol auf das Immunsystem III. in vitro Testungen und Therapie-Verlaufscontrollen bei chronischen Dermatophytosen. *Mykosen* (1988) 31, 52–58.
- Senior, D. S., Shaw, J. T. B.: In vitro effects of fluconazole (UK-49858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on *Candida* blastospore destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Int. J. Immunopharmac.* (1988) 10, 169–173.
- Taschdjian, C. L., Reiss, F., Kozinn, P. J.: Experimental vaginal candidiasis in mice, its implications for superficial candidiasis in humans. *J. Invest. Dermatol.* (1960) 34, 89–94.
- Van Cutsem, J.: The in vitro antifungal spectrum of itraconazole. *Mycoses* (1989) 32, 7–13.
- Van Resenburger, C. E. J. és mtsai: The effects of ketoconazole on cellular and humoral immune functions. *J. Antimicrob. Chemother.* (1983) 11, 49–55.
- Van't Wout, J. W. és mtsai: Effect of amphotericin B, fluconazole and itraconazole on intracellular *Candida albicans* and germ tube development in macrophages. *J. Antimicrob. Chemother.* (1990) 25, 803–811.

Érkezett: 1998. V. 14.

Közlésre elfogadva: 1998. VII. 28.