

Candida türleri kullanılarak doğal hücresel sitotoksitenin ölçümü

Zeynep GÜLAY¹, Hülya OSKOVİ², Turgut İMİR¹

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD,

²SSK Çocuk Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

insan periferik kan lenfositlerinin *Candida stellatoidea* ve diğer candida türleri üzerindeki doğal sitotoksik etkileri bir koloni inhibisyon yöntemi ile incelendi. 20-40 yaşlar arasındaki sağlıklı erkek vericilerden elde edilen periferik kan mononükleer hücreleri *C. stellatoidea* maya formları ile 37°C'da 2 saat enkübe edildi. Enkübasyon sonunda maya koloni sayısı önemli ölçüde azaldı. Benzer deneylerde altı değişik *Candida* türü (*C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*) hedef hücre olarak kullanıldı. Kullanılan türün patojenitesine bağlı olarak antikandidiyal etkide İstatistiksel önemli bir fark gözlenmedi. Monositlerin ayrılması ile antikandidiyal etki ortadan kalkmadı. %5 otolog serum ilavesi sitotoksik etkiyi arttırdı. Doğal antikandidiyal etkiye sahip olan lenfosit alt grubunun fenotipik özelliklerini incelemek amacı ile anti CD 15 ve anti CD 16 monoklonal antikorları (MoAb) ve kompleman kullanıldı. Anti-CD 16 ve kompleman ön muamelesi ile antikandidiyal etkinin önemli ölçüde (%80) azaldığı ve dolayısıyla efektör aktivitenin çoğunun, Doğal Öldürücü (Natural Killer; NK) lenfositlerin de bulunduğu, CD 16 hücre alt grubunda yer aldığı saptandı.

Bu deneylerde görüldüğü gibi, NK hücreler *Candida* türlerine karşı doğal bağışıklıktan sorumlu hücreler arasındadır. Ayrıca, *C. stellatoidea* maya formlarının hedef, monositleri tüketilmiş periferik kan mononükleer hücrelerinin efektör hücreler olarak kullanıldığı bu yeni yöntem doğal sitotoksik aktivitenin saptanmasında kullanılabilir.

[Türk Tıp Araştırma 1992; 10(5):253-258]

Anahtar Kelimeler: Doğal hücresel sitotoksiste, Natural Killer hücreler, Koloni inhibisyon yöntemi

Doğal hücresel sitotoksik cevabın bir parçası olan doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücreler, önceden uyarılma gerek olmaksızın tümör hücreleri ile virüsle enfekte hücreleri parçalayabilen, sitoplazmalarındaki azurofilik granüller nedeniyle iri granüllü lenfositler (Large granular lymphocytes; LGL) olarak da tanımlanabilen lenfoid hücrelerdir (1-4).

NK hücreler, gerek morfolojik gerekse işlevsel açıdan diğer lenfosit alt gruplarından farklıdır. NK hücrelerin saptanması için halen tek ve özgül bir yüzey antijen tanımlanamamıştır. Son yıllarda geliştirilen monoklonal antikorlarla saptanmaları kolaylaşmıştır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan antikorlar, IgG Fc reseptörüne (CD16) özgül ve insan perifer kanındaki tüm NK hücrelerine bağlanan anti CD 16 (5-8), HNK-1 antijenine bağlanan anti CD 57 (9) ve KKH-1 antijenine bağlanan anti CD 56 (10)'dur.

NK aktivitesi ilk kez tümör hücre dizileri için tarif edilmiştir (2). Bu nedenle NK sitotoksitesi, genel olarak, tümör hücrelerinin hedef hücreler kullanıldığı 4 saatlik Cr51 salınım metodu ile ölçülmektedir (1-3). Bu çalışmalar, hücre kültürü yapabilecek ve radyoaktif materyal ile çalışabilecek teknik donanım ve yetişmiş personel bulunan laboratuvar şartlarını gerektirmektedir.

Son yıllarda, NK hücrelerin antimikrobiyal etkileri araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bazı araştırmacılar, değişik metodlar kullanarak NK hücrelerin çeşitli mantar türlerine karşı in vivo ve in vitro etkilerini bildirmişlerdir (11-14).

Bu makalede, kısıtlı imkanları olan laboratuvarlarda da doğal sitotoksik aktivite saptanmasında kullanılacak bir kandidiyal koloni inhibisyon yöntemi anlatılmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hedef hücrelerin hazırlanışı

Bu çalışma G.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Anabilim dalı koleksiyonundan alınan *Candida* susarı hedef hücre olarak kullanıldı. Çeşitli maya suşlarının stok kültürlerinden kanlı agar besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. 24 saatlik kültürden bir kolonP5 mililitre steril

Geliş Tarihi: 30.3.1992

Kabul Tarihi: 13.8.1992

Yazışma Adresi: Zeynep GÜLAY

9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD
İnciraltı - İZMİR

serum fizyolojik içinde homojen süspansiyon elde edilinceye kadar karıştırıldı. 1/2 oranında seri dilüsyonlar yapıldı. Son tüpte mililitrede 4×10^3 canlı mikroorganizma saptandı.

Periferik kan lenfositlerinin elde edilmesi

20-40 yaş arası sağlıklı vericilerden alınan heparinli kan örnekleri PBS ile 1:1 oranında sulandırılarak Ficoll-Isoaque lenfosit izolasyon solüsyonu (Histopaque[®] 1077, Sigma Chem. Company, St.Louis, Mo, USA) üzerine ilave edildi. 15 dakika 2000 devirde santrifüje edildi. Oluşan mononükleer hücre tabakası pastör pipeti ile alınarak üç kez PBS ile yıkandı ve RPMI 1640 besiyeri (Cell Raisers[®], Flow Lab, UM) ile karıştırılarak verici serumu ile kaplanmış petri kutusuna yayıldı. 37°C'ta iki saat enkübasyondan sonra petri kutusu yüzeyine yapışmayan hücreler, steril şartlarda, pastör pipeti ile toplandı ve RPMI 1640 ile bir kez yıkandı. Bu hücrelerden yayma preparatı yapıp Giemsa ile boyandığında monositlerin oranı %5-10'dan azdı. Effektör hücreler kullanılmadan önce trypan mavisi (%0.2'lik) ile viabilité tayini yapıldı. Tüm deneylerde ölü hücre sayısı %1'den azdı.

Effektör hücrelerin monoklonal antikolarla muamele edilmesi

Bu basamakta anti CD 16 (antiLeullb-IgG Fc reseptörü), anti CD 15 (anti Leu M1 - insan myelomonositer hücre antijeni) monoklonal antikoları (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, Ca, USA) ve yavru tavşan komplemanı (H.Ü.T.F., Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından sağlanmıştır) kullanıldı.

Lenfositler gruplara ayrılarak değişik gruplar:

1. RPMI 1640 besiyeri (kontrol)
2. Kompleman
3. Anti CD 16
4. Anti CD 16 + kompleman
5. Anti CD 15 + kompleman
6. Anti CD 16 + anti-CD 15 + kompleman

ile üretici firmanın önerilerine bağlı kalarak muamele edildi. İşlemin sonunda lenfositler RPMI 1640 ile üç kez

Tablo 1. Dört değişik vericiden alınan lenfositlerin değişik efektör:hedef oranlarında maya hücrelerine karşı antikandidiyal indeksleri (Ortalama±standart sapma, n=4)

Verici No	E.H*	%Sitotoksosite		
		10:1	30:1	100:1
1	8.0±5.6	13.0±4.8	35.0±7.4	63.0±7.8
2	11.4±6.5	23.2±6.2	40.0±5.5	65.8±5.9
3	11.5±5.8	24.5±5.2	37.1±4.8	46.5±6.4
4	8.3±4.7	23.0±4.5	35.3±3.2	58.0±5.6
Ortalama ±SD	8.8±1.9	20.9±5.3	36.8±2.4	58.3±8.6

*:Effektör:Hedef oranı

yıkılarak koloni inhibisyonu deneyinde effektör hücreler olarak kullanıldı.

Sitotoksosite deneyi (Koloni inhibisyon deneyi)

Hedef (H) olarak kullanılan hücreleri effektör (E) hücrelerle değişik hedef: effektör hücre oranlarında 37°C'da iki saat (değişiklikler belirtilmiştir) enkübe edildi. Enkübasyonun sonunda her tüpten kanlı agar plaklarına (dörder plak) 25'er mikrolitre ekim yapıldı. Kültürler 37°C'da 48 saat enkübe edildikten sonra, koloniler sayıldı ve koloni sayısındaki azalma yüzdesi Antikandidiyal İndeks (AKİ) olarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$AKİ = \left(1 - \frac{\text{Deney tüpündeki koloni sayısı}}{\text{Kontrol tüpündeki koloni sayısı}}\right) \times 100$$

Sitotoksosite deneyine geçilmeden önce Candida süspansiyonundan 4 ayrı plağa 25 ul ekim yapıldı. Bu ekim sonucu oluşan koloni sayısı (KC-1) hedef: effektör oranlarının yeniden düzenlenmesi için kullanıldı. Sitotoksosite deneyi esnasında %5 otolog serum içeren (değişiklikler belirtilmiştir) RPMI 1640 besiyeri ile enkübe edilen hedef hücreler (KC2)'de Antikandidiyal İndeks hesaplanmasında kontrol olarak kullanıldı.

Bütün deneyler en az dört kez değişik kişilerden elde edilen lenfositlerle tekrarlandı.

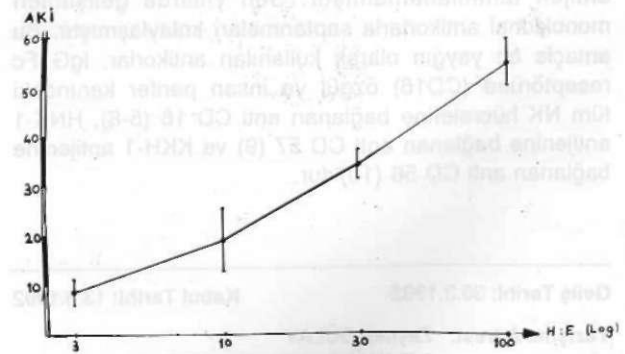
İstatistiksel Testler

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak bildirildi. Bulguların değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı (15).

BULGULAR

I. Değişen Hedef: Effektör hücre oranlarında antikandidiyal etki

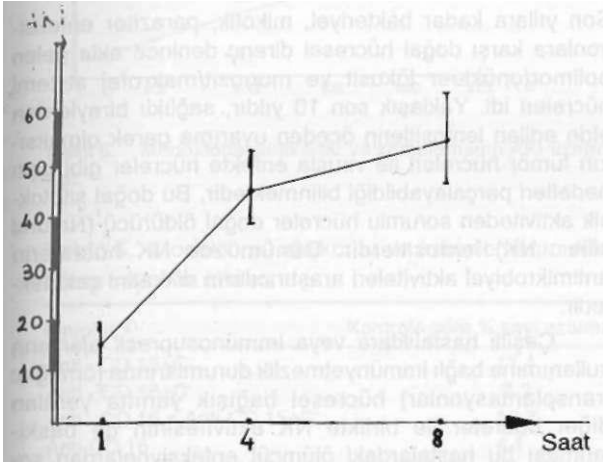
Monositleri ayrılmış effektör hücre grubu ve hedef *C. stellatoidea* maya hücreleri, hedef effektör hücre oranı 1:3, 1:10, 1:30, 1:100 olacak şekilde karşılaştırıldı. Bu oranlara karşılık gelen AKİ kişiden kişiye değişmekle birlikte ortalama 9.8±1.3, 20.8±5.4, 36.8±2.4, 58.3±8.6 idi. Effektör hücre sayısı arttıkça antikandidiyal etki de artmaktaydı (Tablo 1 ve Şekil 1).



Şekil 1. Değişen hedef:effektör oranlarında AKİ (dikey çizgiler ±Standart sapma).

Tablo 2. Çeşitli Hedef:Effektör oranlarında değişen enkübasyon sürelerinin AKİ üzerine etkisi

Deney No	H:E	İM			% Sitotoksiste			8.st		
		1:5	1:15	1:25	1:5	1:15	1:25	1:5	1:15	1:25
1		10.0	15.0	24.0	40.5	49.0	55.5	52.5	62.5	74.0
2		16.0	23.0	35.6	32.0	44.0	55.0	52.2	52.2	55.0
3		5.0	14.0	26.0	50.0	58.0	66.0	64.0	64.0	72.5
4		7.0	11.0	19.5	26.5	32.5	38.0	45.0	45.0	48.0
Ortalama		9.5	15.5	26.2	37.2	45.9	53.6	48.8	56.0	62.5
+		+	+		+	+	±	+	+	+
St.Sapma		4.8	5.1	6.7	6.7	10.6	4.4	4.4	8.9	12.9

**Şekil 2.** AKİ ve süre ilişkisi (H:E 1:15, 4 değişik deneyin ortalama sonuçları gösterilmiştir; dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).**II. Enkübasyon süresinin antikandidiyal indeks üzerine etkisi**

Dört farklı vericiden alınan efektör hücreler ve *C. stellatoidea* maya hücreleri 1:5 ve 1:15 H:E oranlarında 1, 4 ve 8 saat enkübe edilerek sitotoksik aktivite incelendi (Tablo 2).

Antikandidiyal aktivitenin NK özellikleri ile uyumlu olarak 1. saatte başladığı ve yaklaşık 4. saatte maksimal olduğu gözlemlendi (Şekil 2).

III. Monositlerin ve otolog serumun antikandidiyal aktiviteye etkisi

Monositler ve otolog serum ilavesinin AKİ üzerine etkisinin gösterilmesi amacı ile dört değişik efektör hücre grubu kullanıldı.

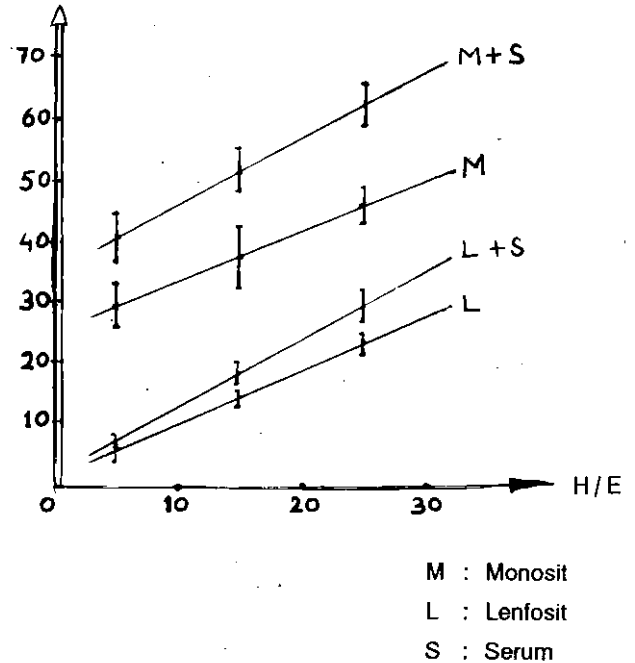
1. grup - Ficoll-Isopaque karışımı ile izole edilen mononükleer hücrelerin, monositler ortamdaki uzaklaştırılmadan kullanıldığı grup (M).

2. grup - Monositleri ayrılmamış hücre grubuna %5 otolog serum ilavesi ile elde edilen efektör hücre grubu (M+S).

3. grup - Monositler cama yapışma özellikleri ile ayrıldıktan sonra elde edilen efektör hücreler (L).

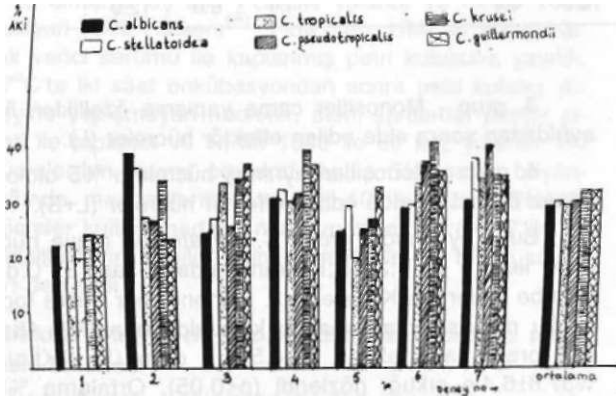
4. grup - Monositleri ayrılmış hücrelere %5 otolog serum ilavesi ile elde edilen efektör hücreler (L+S).

Bu 4 ayrı hücre grubu *C. stellatoidea* maya hücreleri ile 1:5 ve 1:25 H:E oranlarında 2 saat 37°C'da enkübe edilerek AKİ incelendi. Mononükleer hücre topluluğu monositler ayrılmadan kullanıldığında (M), 15:1 E:H oranında ortalama %14.5±2.5 olan (L) AKİ'nin %37.8±6.4'e çıktığı gözlemlendi ($p < 0.05$). Ortalama %5 oranında otolog serum ilavesi monositli grubun antikandidiyal aktivitesini önemli ölçüde arttırdı ($p < 0.05$). Monositleri ayrılmış grupta serumun bu etkisi daha az oranda idi ($p > 0.05$) (Şekil 3).

**Şekil 3.** Monosit ve otolog serum ilavesinin AKİ üzerine etkisi (Dört deneyin ortalama değerleri gösterilmiştir; dikey çizgileri standart hatayı göstermektedir).

Tablo 3. Değişik *Candida* türlerine karşı AKİ'nin ortalama değerleri (H:E 1:15, *:±SD)

Candida alt türleri	AKİ
<i>C. albicans</i>	28.7±5.4*
<i>C. stellatoidea</i>	29.9±6.7*
<i>C. tropicalis</i>	28.6±5.6*
<i>C. pseudotropicalis</i>	29.4±7.5
<i>C. krusei</i>	32.2±7.2*
<i>C. guilliermondii</i>	32.1±6.0*



Şekil 4. Değişik *Candida* türleri ve AKİ (n=7, H:E 1:15).

IV. Değişik *Candida* Alt türleri ve AKİ

Yedi ayrı deney yapılarak, efektör hücrelerin 6 değişik *Candida* alttürü (*C. stellatoidea*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*) üzerindeki sitotoksik aktiviteleri incelendi. Tablo 3'de bu deneylerin 1:15 H:E oranındaki ortalama sonuçları gösterilmiştir.

1:15 hedef:effektör oranında değişik *Candida* türlerine karşı AKİ'de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4).

V. Monoklonal Antikor ve Kompleman Uygulamasının Antikandidiyal İndeks Üzerine Etkisi

Antikandidiyal aktivitesi gösteren efektör hücrelerin immünofenotipik özelliklerinin incelenmesi amacı ile anti

CD 16, anti CD 15 monoklonal antikorları ve kompleman kullanıldı.

Anti CD 16 + kompleman uygulanan grupta AKİ'nin %80, Anti CD 16 + Anti CD 15 + kompleman uygulanan grupta ise %96 azaldığı saptandı (p<0.05) (Tablo 4, Şekil 5).

Sadece anti CD 16 veya sadece kompleman uygulanan grupta kontrole göre AKİ'de azalma saptanmadı. Hatta sadece kompleman kullanılan grupta AKİ'de %5 oranında bir artış saptandı (H:E 1:20).

Monoklonal antikorlar ve komplemanın efektör hücre sayısına etkileri ise Tablo 5'de gösterildi.

TARTIŞMA

Son yıllara kadar bakteriyel, mikotik, paraziter enfeksiyonlara karşı doğal hücrel direnç denince akla gelen polimorfonükleer lökosit ve monosit/makrofaj sistemi hücreleri idi. Yaklaşık son 10 yıldır, sağlıklı bireylerden elde edilen lenfositlerin önceden uyarıma gerek olmaksızın tümör hücreleri ile virüsle enfekte hücreler gibi bazı hedefleri parçalayabildiği bilinmektedir. Bu doğal sitotoksik aktiviteden sorumlu hücreler doğal öldürücü (Natural killer: NK) lenfositlerdir. Günümüzde NK hücrelerin antimikrobiyal aktiviteleri araştırmacıların dikkatini çekmektedir.

Çeşitli hastalıklara veya immüno-supresif ajanların kullanımına bağlı immünyetmezlik durumlarında (örneğin: transplantasyonlar) hücrel bağışık yanıtta yer alan diğer hücreler ile birlikte NK aktivitesinin de baskılanması bu hastalardaki ölümcül enfeksiyonlardan sorumlu olabilir (20). Lenfositlerin, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* gibi funguslara karşı doğal sitotoksik aktivitesi, daha önce, in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir (11-14).

Kandidiyazise karşı immün sistemi normal veya baskılanmış olan konakçı savunmasında da doğal mekanizmaları çok önemlidir. Bu çalışmanın amacı, periferik kan lenfositlerinin doğal bir antikandidiyal etkileri olup olmadığını incelemek ve böylelikle lenfositlerin doğal sitotoksik cevabının ölçülmesinde kullanılacak basit ve yeni bir yöntem tariflemek idi.

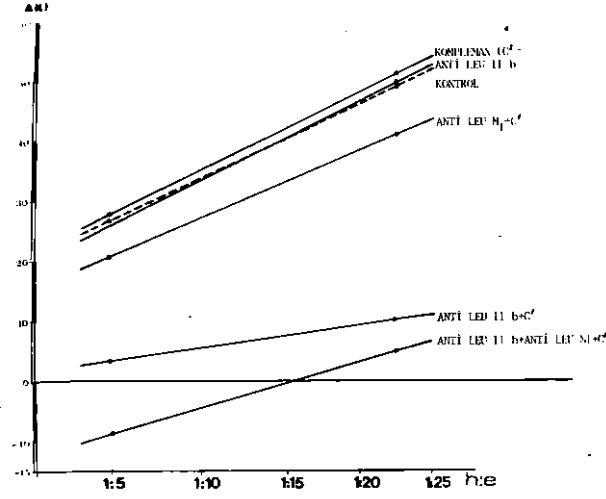
Hedef olarak kullanılan *C. stellatoidea* maya hücrelerinin lenfositler ile enkübasyonu sonucu koloni sayı-

Tablo 4. Monoklonal antikorlar ve komplemanın antikandidiyal indeks üzerine etkisi

Gruplar	H:E 1:5	AKİ	
		1:20	1:25
Kontrol	26.75±3.2*	43.50±6.4	49.0±9.9
Kompleman (Ce)	27.25±2.5(—)	45.50±2.5 (—)	51.5±9.2(—)
Anti-CD 16	25.75±6.0 (3.8)	43.50±6.4 (—)	49.5±10.6(—)
Anti-CD 15+ Ce	20.60±2.0 (22.9)	36.50±6.0(16)	41.5±9.2(15.3)
Anti-CD 16+Ce	3.80±0.4 (86)	9.00±1.4 (79.3)	10.7±2.0(78.2)
Anti-CD 16 + anti-CD 15+Ce	—8.50±2.1 (13)	1.60±1.8 (96.3)	5.0±3.0 (89.7)

* : AKİ değerleri ortalama + Standart Sapma (SD) olarak belirtilmiştir

() : Kontrol AKİ 'ne göre baskılanma yüzdesi.



Şekil 5. Monoklonal antikorlar ve komplemanın AKI üzerine etkisi.

Tablo 5. Monoklonal antikorlar ve komplemanın efektör hücre sayısına etkileri

Gruplar	Kontrole göre % sayı azalması
Anti-CD16+C	11.1
Anti-CD16+C'	3.2
Anti - CD 16 + Anti-CD 15+C	12.3
Anti-CD 16	4.1
Kompleman (C)	0.0

sının önemli ölçüde azaldığı görüldü. Bu etki hedef:efektör hücre oranları ve enkübasyon süresine bağlı idi. Yapışma özelliği olan hücrelerin deneye ilavesi, muhtemelen bu hücrelerin fagositoz etkisi ile antikandidiyal etkiyi arttırdı. NK hücreler de klasik olarak yapışma özelliği olmayan hücreler olarak tanımlanırlarsa da, Freundlich ve arkadaşları, plazma ve jelatin ile kaplı yüzeylere yapışma özellikleri ile ayrılmış hücre popülasyonunda K562 eritrolökemik hücre dizisine karşı yüksek NK aktivitesi saptamışlar ve bunun yüzeye yapışma özelliği gösteren hücreler arasındaki B73.1' (Leu 11c') NK hücrelerden ileri geldiğini göstermişlerdir (21). İlginç bir özellik de bu hücre preparatında kontaminan olarak bulunan lenfositlerin periferik kan ile karşılaştırıldığında, NK'lardan özellikle zengin olmalarıdır (21). Dolayısıyla, yüzey yapışma özelliği olan mononükleer hücrelerin ayrılması işleminde bu hücre grubunun da ortamdan uzaklaştırıldığı ve tüketim işleminin kaldırılması ile bu grubun efektör hücrelere ilavesi ile sitotoksik aktivitede bir artış olması da düşünülebilir.

Serum ilavesinin genel olarak efektör hücrelerin antimikrobiyal aktivitesini artırıcı etkisi vardır. Bu çalışmada da %5 otolog serum ilavesinin özellikle yapışma özelliği olan hücrelerin ayrılmadığı grupta antikandidiyal aktiviteyi arttırdığı saptandı. Bu opsonizasyonun,

fagositozu artırıcı etkisine bağlanabilir. Çünkü, normal floranın bir üyesi olan Candidalara karşı insan serumunda belli bir antikor cevabı olması beklenebilir. Buna karşılık, monositleri ayrılmış grupta serumun sitotoksik aktiviteyi artırıcı etkisi istatistiksel açıdan önem taşımıyordu. Bu bulgular, lenfosit antikandidiyal aktivitesinde opsonizasyona gerek olmadığını göstermektedir.

Farklı *Candida* türleri hedef olarak kullanıldığında elde edilen AKI değerlerinin birbirine çok yakın olması, türlerin patojenliği ile antikandidiyal aktivite arasında önemli bir bağıntı olmadığını göstermektedir. Ancak burada kullanılan tüm suşların klinik örneklerden (idrар, kan, yara kültürü) soyutlandığını belirtmek önemli olabilir.

Doğal antikandidiyal aktiviteyi gösteren lenfositlerin fenotipik özelliklerini incelemek amacı ile anti CD 15 (insan myelomonositik hücre antijeni (CD15)'e karşı MoAb), anti CD 16 (IgG Fc reseptörüne (CD16) karşı monoklonal Ab) ve kompleman kullanıldı. 1:20 hedef:efektör oranında, anti Leu 11b ve kompleman uygulaması ile, antikandidiyal aktivitenin %80, anti CD 15 + anti CD 16 ve kompleman kullanılması ile %96 düştüğü saptandı. Bu bulgular, doğal antikandidiyal aktivitenin, esas olarak, CD 16' lenfosit alt grubunda yer aldığını göstermektedir. Bilindiği gibi, NK hücreler de CD 16' hücrelerdir. Doğal antikandidiyal etkinin %15 kadarının CD 15' hücreler tarafından gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu, Ficoll-Isopaque densite santrifüjasyon metodu ile hazırlanan efektör hücre topluluğundaki monosit kontaminasyonu ve fagositik aktivite nedeniyle olabilir. Ayrıca, bazı NK'ların monosit/makrofaj hücre yüzey özellikleri taşımasına da bağlı olabilir ve bu günümüzde pek çok araştırmacı tarafından tartışılan bir konudur (1,21).

Literatürde NK aktivitesinin saptanması amacı ile çeşitli yöntemler bildirilmiştir. Baccarini ve arkadaşları 1985'de benzer deneyler yapmışlar ve *C. albicans* maye ve hif formlarını hedef olarak kullandıkları bir Cr⁵¹ salınım yöntemi tariflemişlerdir (12). Ancak bu yöntem de diğer radyoaktif yöntemlerin dezavantajlarına sahiptir.

Bu makalede tarif edilen koloni inhibisyon yöntemi ise, kısıtlı laboratuvar şartlarında lenfosit doğal sitotoksitesinin ölçülmesinde kullanılabilecek basit ve ucuz bir yöntemdir.

Assesment of natural cell-mediated cytotoxicity by using *Candida* species

The natural cytotoxic effects of human peripheral blood lymphocytes (PBL) on *Candida stellatoidea* and other *Candida* species were examined by a colony forming unit inhibition assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from healthy male donors, aged 20 to 40 years, were incubated with *C. stellatoidea* yeast forms for two hours at 37°C. After the incubation period the

number of the yeast colonies was significantly reduced. In similar experiments six different *Candida* species (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*) were used as target cells. There was no statistically significant difference among the anticandidial activities according to the pathogenicity of the yeast species used. The anticandidial effect of PBMC did not diminish after monocyte depletion and addition of 5% autologous serum enhanced the cytotoxic activity. In order to show the phenotypic characteristics of the lymphocytes that had the natural anticandidial activity anti CD 15 and anti CD 16 monoclonal antibodies (MoAb) plus complement, were used. It was observed that the anticandidial activity was significantly (80%) reduced with anti CD 16 plus complement pretreatment and the effector cells are among the CD 16+ lymphocyte subpopulation which also includes Natural Killer (NK) cells. Besides the fact that NK cells are among the cells responsible for natural immunity against *Candida* species, this new assay performed with *C. stellatoidea* yeast forms as target and monocyte depleted PMBC as effector cells can be used for detection of natural cytotoxicity. [Turk J Med Res 1992; 10(5):253-258]

Key Words: Natural cell-mediated cytotoxicity, Natural killer cells, Colony forming unit inhibition assay

KAYNAKLAR

- Trinchieri G, London L, Kobayashi H, Perussia B. Regulation of activation and proliferation of human natural killer cells, *Adv Exp Med Bio* 1987; 213:285-98.
- Herberman RB, Holden HT. Natural cell mediated immunity, *Adv Cancer Res* 1988; 27:305-17.
- Herberman RB. Activation of natural killer (NK) cells and mechanism of their cytotoxic effects, *Adv Exp Med Bio* 1987; 213:275-83.
- İmir T, Gibbs DL, Sibbitt W, Bankhurst AD. Generation of natural killer cells and lymphokine activated killer cells in human AB serum or fetal bovine serum, *Clin Immunol Immunopathol* 1985; 36:289-96.
- Hart DNJ, Leahy MF, McKenzie JL, Furley AJ, Beard MEJ. Functional analysis of Leu 11 positive NK active lymphoid cells, *Br J Haem* 1987; 65:277-87.
- Egawa S, Abo T, Hitwash N. Enhancement of human natural killer activity by the monoclonal Leu 11 antibodies, *Cell Immunol* 1987; 104:386-99.
- Perrussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984; 33:180-9.
- Werfel T, Ulechowski P, Tetteroo PA, Schmidt RE, et al. Activation of cloned human natural killer cells via FcγRIII. *J Immunol* 1989; 142:1102-6.
- Abo T, Cooper MD, Balch CM. Characterization of HNK-1* (Leu 7) human lymphocytes. I. Two distinct phenotypes of human NK cells with different cytotoxic capability. *J Immunol* 1982; 129:1752-7.
- Griffin JD, Hercend T, Beueridge R, Schlossman SF. Characterization of an antigen expressed on human NK cells. *J Immunol* 1983; 130:2947-53.
- Petkus AF, Baum LL. Natural killer cell inhibition of young sporules and endospores of *Coccidioides immitis*. *J Immunol* 1987; 139:3107-11.
- Baccarini M, Vecchiarelli A, Cassane A, Bistoni F. Killing of yeast, germ tube and mycelial forms of *C. albicans* by murine effectors as measured by a radiolabel release microassay. *J Gen Microbiol* 1985; 131:505-13.
- Lipscomb MF, Alvarellos T, Toews GB, Kumar V. Role of natural killer cells in resistance to *Cryptococcus neoformans* in mice. *Am J Pathol* 1987; 128:354-61.
- Jimenez BE, Murphy JW. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infect Immun* 1984; 46:552-8.
- Sümbüloğlu K. İstatistik, Çağ Matbaası, Ankara: 1978: 146-50.
- Santoli D, Trinchieri G, Lief S. Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. I. Characterization of the effector lymphocyte. *J Immunol* 1978; 121:526-31.
- Santoli D, Trinchieri G, Koprowski H. Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. *J Immunol* 1978; 121:532-8.
- Garcia-Penarrubia P, Bankhurst AD, Koster FT. Experimental and theoretical kinetics study of antibacterial killing mediated by human natural killer cells. *J Immunol* 1989; 142:1310-7.
- Niederhorn JY ve ark. *Trichinella pseudospiralis* larvae express NK cell associated Asialo GM1 antigen and stimulate pulmonary NK activity. *Infect Immun* 1988; 56:1011-6.
- Müller C, Kalinowska W, Pohenka E. Lytic effector cell function following kidney transplantation. *Transplant Proceedings* 1987; XIX:2932-8.
- Freundlich B, Trinchieri G, Perussia B, Zurter RB. The cytotoxic effector cells in preparations of adherent mononuclear cells from human peripheral blood. *J Immunol* 1984; 132:1255-60.