

Lenfositlerin doğal antikandiyal etkilerinin stafilokokkal enterotoksin B ve lipopolisakkarit ile arttırılması

Zeynep GÜLAY, Turgut İMİR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, ANKARA

Bu çalışmada, Doğal Antikandiyal indeks yöntemi kullanılarak, stafilokokkal enterotoksin B (SEB) ve Serratia marcescens lipopolisakkaritinin (LPS) lenfosit doğal sitotoksitesini arttırdığı saptandı. Monoklonal antikorlar ve kompleman uygulaması SEB'in uyarıcı etkisini baskıladı.

Bu bakteriyel ürünlerden toksin özelliği taşımayan fakat aynı immünolojik özelliklerde preparatların geliştirilmesi ve bu preparatın klinik immünoterapide kullanılması, hem antitümoral hem de antimikrobiyal tedavide önemli rol oynayacaktır. [Türk Tıp Araştırma 1992; 10(5):245-252]

Anahtar Kelimeler: Doğal hücrel sitotoksiste, Doğal öldürücü (Natural Killer) hücreler, Lipolisakkarit, Stafilokokkal enterotoksin B

Doğal Öldürücü (Natural Killer; NK) hücreler, 1972-73 yıllarında tanımlanmalarından itibaren, primer ve metastatik kanserlere karşı dirençte oynadıkları rol ile dikkati çekmiş hücrelerdir (1). Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda, kanserli farelerde NK aktivitesinin baskılandığı gösterilmiş ve kanser tedavisinde çeşitli uyarıcı ajanlar kullanılarak, NK aktivitesinin arttırılması amaçlanmıştır (2,3).

Bakteriyel Immün uyarıcılar da kanser tedavisindeki potansiyel yerleri ile dikkat çekmektedir (2,3). Adjuvant etkisi bildirilmiş bazı bakteriyel ajanlar arasında, bakteri duvar ürünleri, endotoksinler, gram (+) mikroorganizmaların glikoproteinleri ve ekzotoksinleri sayılabilir (3). Bakteriyel adjuvantların özellikle T lenfositlerden interferon (IFN) yapımı ve makrofajları uyarak özgül olmayan direnci arttırdığı öne sürülmektedir (2-7).

Gram negatif bakteri duvar ürünlerinden olan lipopolisakkaritlerin (LPS) in vivo ve in vitro olarak çeşitli biyolojik etkileri vardır. Bunlardan bir kısmı, bu bakterilerle enfeksiyon sırasında konakçıda görülen bir dizi patolojik olaydan hatta ölümden sorumludur. Pekçok hücre yüzeyinde LPS reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (8). Bunlar arasında lenfositler, mast hücreleri, makrofajlar sayılabilir. Gerek hücrelere direkt etkileri,

gerekse stimülasyon sonucu salınan IL-1, IL-8, TNF α , IFN α .p.y gibi sitotokinlerin etkileri sonucu, lipopolisakkaritler kuvvetli immün düzenleyici ajanlar olarak karşımıza çıkarlar (9-15).

Etkileri arasında B ve T hücreleri için mitojenik etki (16,17), sitotoksik T hücreleri, NK hücreler, makrofaj ve Kupffer hücrelerinin sitotoksik aktivitelerini arttırması sayılabilir (18,19). LPS, nötrofil göçünü kuvvetle uyarır (9,20). Antikor sentezi için güçlü adjuvant etkisi vardır. Lipopolisakkaritlerin antitümoral etkileri de eskiden beri bilinmektedir. Bu etki:

1. LPS'e bağlı hemorajik nekroz,
2. interlökinler, interferonlar, TNF α .p gibi çözümler mediatörlerin salınımı,
3. NK ve makrofaj sitotoksitesinin uyarılması, ..gibifaktörlere bağlanabilir (13).

Gram negatif bakterilerin 0.2 N asetik asit varlığında hidrolizi ile elde edilen White tipi polisakkarit, intakt lipopolisakkaritin hidrolizasyonu ile elde edilen Lipid A ve toksik olmayan polisakkaritlerin de, LPS etkisi ile uyumlu immünolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (13,21-24). Bunlardan monofosfolipid A (MPL^{ES})'nin klinik deneylerde kullanılmasına başlanmıştır (23).

Stafilokokkal enterotoksinler (SE) insanlardaki besin zehirlenmesi olgularının çoğundan sorumludurlar. Bunun yanında, bilinen en kuvvetli T hücre mitojenleridir (7,25). Bu nedenle süperantijen olarak adlandırılmaktadırlar (7,25). Bu enterotoksinler, çeşitli Staphylococcus suşlarından salınan, yapı olarak benzer, fakat

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

serolojik olarak farklı bir grup proteindir. A, B, C, D, E olarak beş alt grup mevcuttur (26). Önceleri Stafilokokkal protein için bildirilen mitojenik etkinin preparatlarında kontamine olarak bulunan SEA ve SEB'den kaynaklandığı bulunmuştur (7,27). SEA'nın NK hücre aktivitesini, yine SEA ve SEB'nin değişik T hücre klonlarının aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (25,28). SE'lerin mitojenik ve stimulator etkilerinin ortaya çıkabilmesi için MHC Class II antijenleri taşıyan aksesuar veya hedef hücre varlığı gerekmektedir (7,27). Stafilokokkal enterotoksinler, insan mononükleer hücrelerinden, IL-1, IL-2, IFN sentezini uyarırlar (25,29).

Stafilokokkal enterotoksinlerin in vivo etkileri ise daha değişiktir. In vivo SE uygulaması poliklonal T hücre aktivasyonu yapmakta, dolayısıyla hücrel ve humoral immün cevapta baskılanma görülmektedir (28).

Bu çalışmada, fırsatçı bir patojen olan *Candida* maya hücreleri üzerinde geliştirilen Doğa Antikandidiyal İndeks yöntemi (30) kullanılarak, *Serratia marcescens* lipopolisakariti ve Stafilokokkal Enterotoksin B'nin doğal hücrel sitotoksiste üzerine etkisi incelenmiştir. Bu ajanların etkilediği lenfosit alt grubu ve immün uyarıcı olarak doğal hücrel antimikrobiyal direnç açısından oynayabilecekleri rol araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Effektör hücrelerin hazırlanışı: 20-40 yaş arası sağlıklı bireylerden alınan heparinli kan örnekleri PBS ile 1:1 oranında sulandırılarak lenfosit izolasyon solüsyonu Histopaque[®] 1077 (Sigma Chem. Company, St Louis, Mo, USA) üzerine ilave edildi 2000 devirde 15 dakika santrifüje edildikten sonra interfazdaki mononükleer hücreler alınarak, PBS ile üç kez yıkandı. Monositlerin tüketilmesi amacı ile verici serumu ile kaplanmış petri kutularına yayıldı. 37°C'da 2 saat enkübe edildikten sonra yüzeye yapışmayan hücreler (PBL) toplandı. RPMI 1640 hücre kültür besiyeri (Cell Raisers™ Flow Lab, UK) ile iki kez yıkandı. Hücreler trypan mavisi (%0.2'lik) ile Thoma lamında sayıldı. İstenilen hedef-effektör oranındaki efektör hücre sayısı RPMI 1640 besiyeri ilavesi ile ayarlandı. İlgili deney basamağına göre bakteriyel ürünleri ile veya sadece RPMI 1640 besiyeri ile muamele edildikten sonra sitotoksiste deneyinde kullanıldı..

Hedef hücrelerin hazırlanışı: G.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kolleksiyonundan alınan *C. stellatoidea* suşu, kanlı ağara tek koloni düşecek şekilde pasaj edildi. 24 saatlik kültürden 1 koloni alınarak steril serum fizyolojik içinde süspansiyon ve seri dilüsyonlar yapıldı. Son tüpte mililitrede 4000 canlı mikroorganizma saptandı.

Sitotoksiste Deneyi: Hedef (H) olarak kullanılan maya hücreleri, efektör (E) hücrelerle 1:5 ve 1:15 ve 1:15 H:E oranlarında karşılaştırıldı. 37°C da 2 saat enkübe edildi. Enkübyasyonun sonunda her tüpten en az 4 p 37°C'da 48 saat enkübe edilerek oluşan koloniler sayıldı.

Ayrıca sitotoksiste deneyine geçilmeden önce *Candida* süspansiyonundan yine 4 ayrı plağa 25 ul ekim yapıldı (KC1). Oluşan koloni sayısı hedef: efektör oranlarının yeniden düzenlenmesi için kullanıldı. Sitotoksiste deneyi esnasında da, %5 otolog serum içeren RPMI 1640 besiyeri ile (1:1 oranında) enkübe edilen hedef hücreler (KC2)'de Antikandidiyal İndeks (AKİ) hesaplanması için kullanıldı.

Antikandidiyal İndeks (AKİ) Hesaplanması: Doğal antikandidiyal etki aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı.

$$AKİ = \left(1 - \frac{\text{Deney K.O.Ü.*}}{\text{Kontrol C}_2, \text{ K.O.Ü.}}\right) \times 100$$

*K.O.Ü.: Koloni Oluşturulan Ünite

Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB) ile aktivasyon Deneyi

a. Doz etkisinin incelenmesi: Effektör hücreler (2×10^6) artan dozlarda (1 ugr/ml, 10 ugr/ml, 30 ugr/ml, 100 ugr/ml) SEB ile 18 saat enkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra sitotoksiste deneyinde kullanıldı. Karşılaştırma amacı ile SEB içermeyen besiyeri ile aynı süre inkübe edilen hücreler de kontrol (K) lenfosit grubu olarak kullanıldı.

b. İnkübasyon süresinin etkisi: Effektör hücreleri (2×10^6), 30 ug/ml SEB ile değişen sürelerde (0,2,8,16,24 saat) inkübe edilerek, sitotoksiste incelendi.

c. Monoklonal Antikorlarla Ön muamelenin Etkisi: Bu basamakta anti-CD16 (IgG Fc reseptörü) ve anti-CD15 (insan myelomonositer hücre antijeni) monoklonal antikorları (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA) kullanıldı. Effektör hücreler 3 gruba ayrıldı:

1. grup sadece RPMI 1640 besiyeri

2. grup Anti-CD16 + Kompleman

3. grup Anti - CD16 + anti-CD15+Kompleman ile muamele edildi. Kısaca, lenfositler, $0.1 \text{ ugr}/10^6$ hücre olacak şekilde MoAb'larla 45 dakika, oda sıcaklığında bekletildi. Bir kez yıkandıktan sonra yavru tavşan komplemanı ile 60 dakika enkübe edildi. Hücreler yıkayıp besiyeri ile tekrar karıştırıldı ve her grup tekrar 2 kısma (A ve B) ayrıldı:

A grupları, %10 otolog serum içeren RPMI 1640 besiyeri ile,

B grupları, 30 pgr/ml/ 2×10^6 hücre SEB ile 18 saat enkübe edildi. Yıkayıp sayılarak sitotoksiste deneyinde kullanıldı.

Serratia Marcescens lipopolisakariti ile aktivasyon deneyi

a. Doz etkisi: Effektör hücreler artan dozlarda (10ug/ml, 30 ug/ml, 100 ugr/ml, 300 ugr/ml) LPS ile 18 saat enkübe edildi. PBS ile iki kez yıkandı. Sayılarak sitotoksiste deneyinde kullanıldı.

b. LPS ile İnkübasyon süresinin etkisi: Effektör hücreler sitotoksosite deneyi öncesi 100 ugr/ml LPS ile değişen inkübasyon sürelerinde (0,2,8,16,24 saat) en-kübe edildi. Hücreler yıkandıktan ve sayıldıktan sonra sitotoksosite deneyinde kullanıldı.

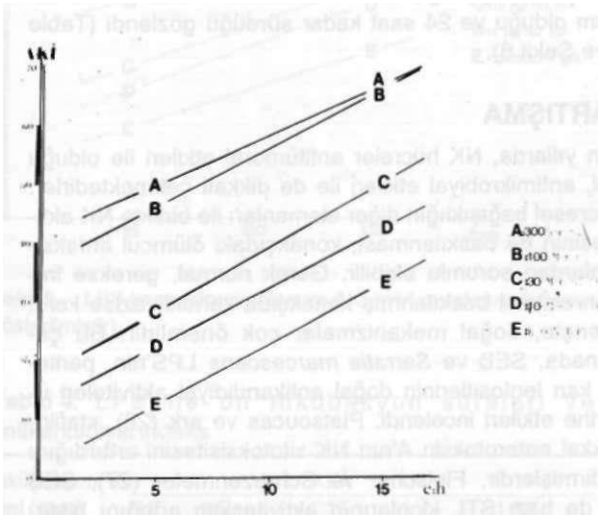
Bulguların değerlendirilmesinde Mann-Whitney U Testi kullanıldı (31).

BULGULAR

I. Stafilokokkal enterotoksin B (SEB) ile aktivasyon deneyi

A. Doz etkisi

4 ayrı vericiden alınan efektör hücreler, 0 (kontrol) 1 ugr/ml, 10 ugr/ml, 30 ugr/ml, 100 ugr/ml olacak şekilde değişen konsantrasyonlarda SEB ile 18 saat 37°C'da inkübe edildi. 1:5 ve 1:15 H:E oranında doğal antikandiyal etki incelendiğinde, artan SEB konsantrasyonları ile, antikandiyal indeksin de arttığı gözlemlendi (Şekil 1,



Şekil 1. SEB konsantrasyonları ve AKİ (n=4, Grafikte ortalama değerler gösterilmiştir).

Tablo 1. Değişen konsantrasyonlarda stafilokokkal enterotoksin B'nin antikandiyal indeks üzerine etkileri

SEB kons. (ugr/ml)	AKİ			
	H:E 1:5	1:10	1:15	
0 (kontrol)	17.75±10.2*	27.38±11.1	35.0±10.7(—)	
1	25.90±9.3	36.30±8.6	46.5±11.0(32.)-	
10	31.80±1.2	41.30±5.2	51.0±8.07(45.7)-	
30	46.30±8.7	51.60±6.2	57.3±6.10(63.7)-	
100	49.60±9.6	55.40±5.9	60.8±6.00(73.0)-	

n:4 Değerler ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir.

() Kontrolle göre uyarım yüzdesi.

" p > 0.05

*** p < 0.05

Tablo 1). Ancak 100 ugr/ml ve üstü SEB konsantrasyonlarında ölü hücre sayısının arttığı görüldü.

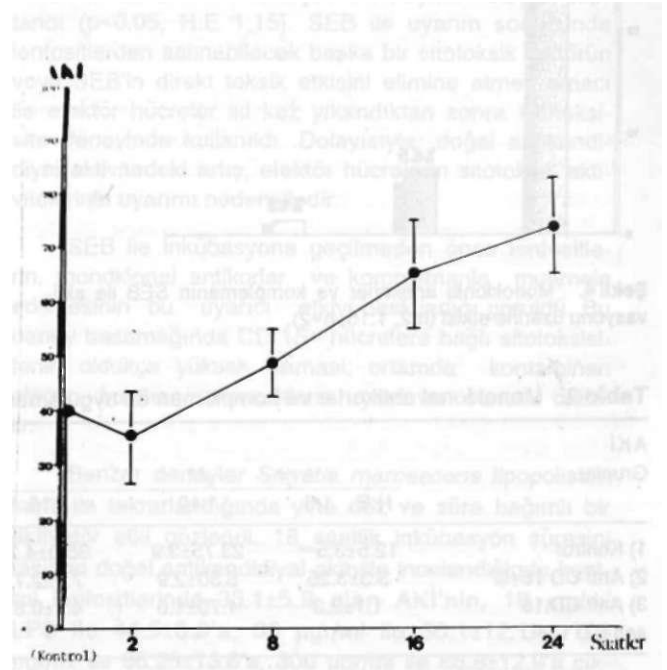
B. SEB ile ön inkübasyon sürelerinin doğal antikandiyal aktivite üzerine etkisi:

Periferel kandan izole edilen efektör hücreler, 30 ugr/ml SE ile 0, 2, 8, 16, 24 saat inkübe edilerek antikandiyal indeks değerlendirildi. SEB'nin stimulator etkisi 8. saatten itibaren başlamakta (p>0.05), 24. saate kadar artarak devam etmekteydi (Şekil 2). 24. saate 1:15 H:E oranında kontrol grubunda %40.75±17.9 olan AKİ'nin, %86.7 artarak, %75.9±18.2 olduğu gözlemlendi (p<0.05). SEB ile 2 saatlik inkübasyonu takiben AKİ'de %15 baskılanma görüldü (p>0.05).

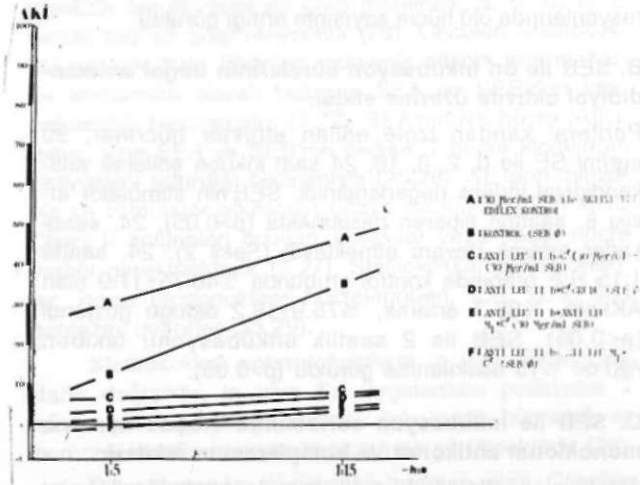
C. SEB ile inkübasyon sonucunda oluşan uyarıma monoklonal antikorlar ve komplemanın etkileri:

Aktive olan efektör hücre(ler)nin fenotipik özelliklerini tanımlamak amacı ile daha önce ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde aktivasyon öncesi 1) RPMI 1640 (kontrol), 2) Anti-CD 16 ve kompleman, 3) Anti-CD 16 + anti-CD 15 ve kompleman ile muamele edildi. Daha sonra 30 ugr/ml SEB ile 18 saat inkübe edilerek 1:5 ve 1:15 H:E oranında AKİ değerlendirildi.

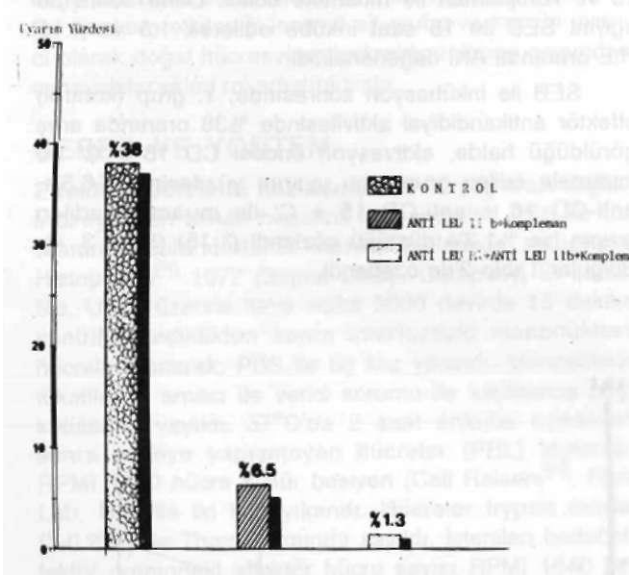
SEB ile inkübasyon sonrasında, 1. grup (kontrol) efektör antikandiyal aktivitesinde %38 oranında artış görüldüğü halde, aktivasyon öncesi CD 16 + C ile muamele edilen grupta bu uyarım yüzdesinin %6.5'a, anti-CD 16 + anti-CD 15 + C ile muamele edilen grupta ise %1.3'e düştüğü gözlemlendi (1:15) (Şekil 3, 4). Bulgular Tablo 2'de özetlendi.



Şekil 2. 30 ugr/ml SEB ile ön inkübasyon sürelerinin AKİ üzerine etkileri (n=4, h:e 1:15 dikey çizgiler ± standart hatayı göstermektedir).



Şekil 3. Monoklonal antikorlar ve komplemanın SEB aktivasyonu üzerine değişik hedef:efektör oranlarında etkisi (n=2, ortalama değerler gösterilmiştir).



Şekil 4. Monoklonal antikorlar ve komplemanın SEB ile aktivasyonu üzerine etkisi (h:2,1:15, n=2).

II. *Serratia marcescens* lipopolisakariti (LPS) ile aktivasyon deneyi

A. Artan konsantrasyonların AKİ üzerine etkisi

4 ayrı vericiden alınan efektör hücreler üzerinde, artan LPS konsantrasyonlarının etkisi incelendi. Bu deneyde efektör hücreler 0 (kontrol) 10 ugr/ml, 30 ugr/ml, 100 ugr/ml, 300 ugr/ml LPS ile 18 saat 37°C'da inkübe edildi. 1:5 ve 1:15 hedef:efektör oranlarında Antikandidiyal indeks değerlendirildi (Tablo 3, Şekil 5).

Tablo 3'de de görüldüğü gibi 100 ugr/ml ve 300 ugr/ml LPS konsantrasyonları ile AKİ'de %100 artış saptandı (H:E 1:15).

B. Lipopolisakarit ile inkübasyon sürelerinin doğal antikandidiyal aktivite üzerine etkisi

4 ayrı vericiden alınan efektör hücreler, sitotoksitesite deneyi uygulanmadan önce 100 pgr/ml LPS ile, 0 (kontrol), 2, 8, 16, 24 saat inkübe edildi. Uyarıcı etkinin 2. saatte başladığı, 8 ve 16. saatler arasında maksimum olduğu ve 24 saat kadar sürdüğü gözlemlendi (Tablo 4 ve Şekil 6).

TARTIŞMA

Son yıllarda, NK hücreler antitümoral etkileri ile olduğu gibi, antimikrobiyal etkileri ile de dikkati çekmektedirler. Hücrel bağışıklığın diğer elemanları ile birlikte NK aktivitesinin de baskılanması, konakçıdaki ölümcül enfeksiyonlardan sorumlu olabilir. Gerek normal, gerekse immün sistemi baskılanmış konakçıda kandidiyazise karşı dirençte, doğal mekanizmalar çok önemlidir. Bu çalışmada, SEB ve *Serratia marcescens* LPS'nin, periferik kan lenfositlerinin doğal antikandidiyal aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. Platsoucas ve ark (28), stafilkokkal enterotoksin A'nın NK sitotoksitesitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Fleischer ve Schrezenmeier (27), SEB ile de bazı STL klonlarının aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Otani ve ark. (32) ise, SEA'nın doğal antimikrobiyal direnci arttırdığını, ancak SEB ve diğer enterotoksinlerin etkisiz olduğunu öne sürmüşlerdir. Hirai ve

Tablo 2. Monoklonal antikorlar ve kompleman ön uygulamasının SEB ile oluşturulan AKİ artışına etkisi

AKİ Gruplar	A*			B**		
	H:E 1:5	1:10	1:15	1:5	1:10	1:15
1) Kontrol	12.5±3.5~	23.75±3.9	35.0±4.2	30.0±4.2	39.214.7	47.9±2.9(38)
2) Anti-CD 16+C	3.3±3.25	5.50±2.9	7.0±2.7	6.6±2.97	7.2±2.97	8.2±3.4(6.5)
3) Anti-CD 16 anti-CD 15+C	1.1 ±3.3	1.7011.6	4.7±0.8	0.3±1.84	1.8±1.13	4.8±1.13(1.3)
	+	+	+	+	+	+

n:2

* 18 saat %10 otolog serum içeren RPM11640 besiyeri ile inkübe edilen efektör hücreler.

** 18 saat 30 figr/ml SEB ile inkübe edilen efektör hücreler.

*** Değerler, ortalama + SD cinsinden ifade edilmiştir.

() 30 ugr/ml SEB ile uyarım yüzdesi.

saate kadar sürdüğü ($p < 0.05$) gözlemlendi. Bu çalışmalar İmir ve Bankhurst (34)'ün bulguları ile uyumludur.

Efektör hücreler sitotoksosite deneyinde kullanılmadan önce yıkandıkları için LPS'in direkt toksik etkisi veya TNFa gibi LPS ile uyarım sonucu salınabilecek bir mediatörün etkisi söz konusu değildir.

Bu çalışmalar, SEB ve LPS'in doğal antikandidiyal aktiviteyi, efektör hücreleri uyararak arttırdığını göstermektedir. Ancak deney şartları ve imkanlar kısıtlı olduğundan mekanizma üzerinde çalışılmamıştır.

Aktivasyon, toksinin hücre içine alınıp işlenmesi ile ilgili olabileceği gibi, toksin doğrudan bir yüzey antijenine bağlanıp uyarım yapabilir. Fleischer (7), stafilokokkal enterotoksinlerin mitojenik etkileri için ortamda yüzeyinde Class II MHC gen ürünleri taşıyan aksesuar hücrelerin bulunması gerektiğini belirtmektedir. Yapılan araştırmalar, toksinin aksesuar hücreyi uyarmasının ve aksesuar hücrenin antijeni sunması ile T hücrelerinde oluşan mitojenik ve sitotoksik aktivite artışının, toksinin hücre içine alınması ve işlenmesi ile ilgili olmadığını göstermiştir. Hücre yüzeyinde bir reseptör işlevi gören Class II antijenlerine bağlanan toksinin bir çapraz bağlayıcı rolü oynadığı ve hem aksesuar hücreyi hem de T hücrelerini direkt uyardığı öne sürülmektedir (7). Bilindiği gibi, makrofaj/monosit serisi elemanları gibi, bazı NK alt sınıfları yüzeyinde de Class II MHC gen ürünleri mevcuttur. Hatta bu alt sınıfın kısıtlı da olsa fagositoz ve pinositoz özelliği olması nedeni ile APC işlevi görebileceği öne sürülmektedir (35).

Kang ve arkadaşları (19) ise, elektron mikroskopik yöntemlerle LPS'in CD16⁺ hücreler tarafından alındığını ve bu yolla aktivasyon olduğunu göstermişlerdir.

Ayrıca aktivasyon, LPS veya SEB ile inkübasyon sırasında salınabilecek IL-1, IL-2, IFN gibi çözünür mediatörlerin etkisi ile de olabilir. Endotoksinin, lenfosit preparatlarında esas olarak IFNa ve p, makrofaj veya IL-2 varlığında da kuvvetli IFN salınımına neden olduğu bildirilmektedir (36,37).

Carlsson ve Sjögren (29), SEA'nın insan mononükleer hücrelerinden IL-2 salınımını uyardığını bildirmişlerdir. IL-2 salınımı, 18-24 saat arasında en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Bu düzey (20-70 U/ml), değişik vericilerden alınan mononükleer hücre preparatları arasında değişmekle birlikte, sitotoksitede belirgin aktivasyon yapabilecek kadar yüksektir. Hücre yüzeyinde IL-2 reseptör belirlemesi ise 12. saatte başlamakta 72. saatte en yüksek düzeye ulaşmaktadır. IFN γ salınımı ise daha yavaş olmaktadır ve süpernatanda IL-2 belirmesi ile başlamaktadır. Bu deneyler SEA ile yapılmış olmasına rağmen SEB ile de benzer sonuçlar beklenebilir. Çünkü iki enterotoksinin biyolojik aktiviteleri de çok benzerdir. Daha önceki sonuçlarımızda belirtildiği gibi IL-2 ile 2 saat gibi kısa süreli bir ön inkübasyon sitotoksik aktivitede artış için yeterli olmaktadır. IFN γ

ise özellikle monosit/makrofaj serisi elemanları için çok kuvvetli bir uyarandır (37). Dolayısıyla, bu faktörler, lenfositler ve/veya ortamda kontaminan olarak bulunabilecek monosit/makrofaj serisi hücreleri, doğrudan veya başka önemli mediatörlerin salınımı yoluyla uyararak, antikandidiyal aktiviteye etkili olabilirler.

Ayrıca, 48-72 saatlik kültürlerde, Lenfokinle (veya toksinlerle) aktive olmuş Öldürücü Hücre (LAK) aktivitesinin ortaya çıkması beklenebilir. Dolayısıyla, lenfosit kültür şartlarının uyarım sonucu artan lenfosit metabolizmasını karşılayacak düzeyde olmaması ve bu nedenle 24 saatten uzun deney sürelerinin incelenememesi de çalışmanın eksik yönlerindedir.

Sonuç olarak, bakteriyel adjuvantların özgül olmayan direnci çeşitli mekanizmalarla arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, SEB ve *Serratia marcescens* LPS'nin, doğal antikandidiyal aktiviteyi arttırdığı saptanmıştır. Bulgular, bu bakteriyel ürünlerin antitümoral direnç açısından olduğu gibi enfeksiyonlar açısından da önemli adjuvantlar olduğunu göstermektedir. Özellikle, toksin özelliğinden arındırılmış, fakat aynı immünolojik etkilere sahip preparatların geliştirilmesi ile immünoterapi açısından büyük mesafe katedilecektir. Ayrıca, günümüzde stafilokokkal protein A ile hazırlanan klonlar plazmaferezis yönteminin yerini almaktadır (7). Bu klonlarda kontaminan olarak bulunabilecek ufak enterotoksin düzeylerinin, hastada immünomodülasyon yapabilecek güçte olduğu unutulmamalıdır.

Bulgularımızın, literatürdeki Cr⁶⁺ salınım yöntemleri ile saptanan bulgularla uyumlu olması, bu çalışmada kullanılan doğal antikandidiyal İndeks yönteminin, doğal sitotoksik aktivite değerlendirmesi için uygun bir yöntem olduğunu kanıtlamaktadır.

Augmentation of the natural anticandidial activity of lymphocytes by staphylococcal enterotoxin B and lipopolysaccharide

In this study, it was observed that Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) and lipopolysaccharide (LPS) from Serratia marcescens, enhanced the natural cell-mediated cytotoxicity, as assessed by the Natural Anticandidial Index method. The cytotoxicity-enhancing activity of SEB was significantly decreased when the effector cells were depleted by monoclonal antibodies and complement.

The isolation of nontoxic derivatives from these bacterial products that have the same immunological properties as the native toxin, and that can be used in clinical immunotherapy, will be of importance in antitumoral and antimicrobial therapy.

[Turk J Med Res 1992; 10(5):245-252]

Keywords: Natural cell-mediated immunity, Natural Killer cells, Lipopolysaccharide, Staphylococcal enterotoxin B

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Wojdani A, Ghoneum M. In vivo augmentation of natural killer cell activity by *Candida albicans*, *Int J Immunopharmac* 1987; 9:827-32.
3. Fauci SA, Rosenberg SA, Sherwin SA, Dinarello CA, Longo DL, Lance CN. Immunomodulators in clinical medicine (NIH Conference), *Ann Int Med* 1987; 106:421-33.
4. Tarkkanen J, Saksela E, Lanier LL. Bacterial activation of human natural killer cells, characteristics of the activation process and identification of the effector cell, *J Immunol* 1986; 137:2428-33.
5. Bulau A. Not just cachectin involved in toxic shock, *Nature* 1988; 331:665.
6. Anonaci S, Jirillo E, Ventura MT, Mc Ghee JR. Relationship between immune system and gram-negative bacteria. II. Natural killer cytotoxicity of *Salmonella minnesota R 345*-unbound human peripheral blood lymphocytes, *J Immunol* 1984; 133:729-33.
7. Fleischer B. Bacterial toxins as probes for the T-cell antigen receptor. *Immunology Today* 1989; 10:262-4.
8. Lei MG, Flebe L, Roederz D, Morrison DC. Identification and characterization of lipopolysaccharide receptor molecules on mammalian lymphoid cells, *Adv Exp Med Bio* 1990; 256:445-466.
9. Cybulsky MI, Mc Comb DJ, Movat HZ. Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin: mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor α . *J Immunol* 1988; 140:3144-49.
10. Blanchard DK, Djeu JY, Klein TW, Friedman H, Stewart II WE. Interferon- γ induction by lipopolysaccharide: dependence on interleukin 2 and macrophages. *J Immunol* 1986; 136:963-70.
11. Jephthah-Ochola J, Urman J, Farkas S, Halloran PF. Regulation of MHC expression in vivo: bacterial lipopolysaccharide induces Class I and II MHC products in mouse tissues by a T cell independent, cyclosporine-sensitive mechanism. *J Immunol* 1988; 141:792-800.
12. Lasfargues A, Chaby R. Endotoxin-induced tumor necrosis factor (TNF). Selective triggering of TNF and interleukin I production by distinct glucosamine-derived lipids. *Cell Immunol* 1988; 115:165-78.
13. Friedman H, Blanchard K, Newton C, Nowotny A et al. Distinctive immunomodulatory effects of endotoxin and non-toxic lipopolysaccharide derivatives in lymphoid cell cultures. *J Biol Response Modif* 1987; 6:664-77.
14. Matsamura H, Nakano M. Endotoxin-induced interferon γ production in culture cells derived from BCG-infected C3H/HeJ mice. *J Immunol* 1988; 140:494-500.
15. Whichner JI, Evans SW. Cytokines in disease. *Clin Chem* 1990; 36:1269-1281.
16. Faundleroy MB, Rudbach JA, Prescott B, Baker PJ. Increased activation of antigen-primed or memory B cells by bacterial lipopolysaccharide. *Cell Immunol* 1987; 263-272.
17. Skidmore BJ, Chiller JM, Morrison DC, Weigle WO. Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS). Correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities. *J Immunol* 1975; 114:770-5.
18. Harmsen AG. Role of alveolar macrophages in lipopolysaccharide-induced neutrophil accumulation. *Infect Immun* 1988; 56:1858-63.
19. Kang Y, Carl M, Maheshwari RK, Grimley PM, et al. Incorporation of bacterial lipopolysaccharide by human Leu 11a⁺ natural killer cells: ultrastructural and functional correlations. *Lab Invest* 1988; 58:196-209.
20. Megyeri P, Sadowska J, Issekutz B, Issekutz AC. Endotoxin-stimulated human macrophages produce a factor that induces polymorphonuclear leucocyte infiltration and is distinct from interleukin-1, tumor necrosis factor α and chemotactic factors. *Immunology* 1990; 69:155-61.
21. Rothman J, Johnson AG, Friedman H, Nowotny A et al. Biological effects of white-type polysaccharides of gram-negative bacteria. *J Biol Response Modif* 1988; 7:296-308.
22. Nowotny A, Keler T, Pham PH, Johnson AG, et al. Isolation of nonendotoxic antitumor preparation from *Serratia marcescens*. *J Biol Response Modif* 1988; 7:296-308.
23. Rudbach JA, Cantrell JL, Ulrich JT, Mitchell MS. Immunotherapy with bacterial endotoxins. *Adv Exp Med Bio* 1990; 256:665-76.
24. Friedman H, Klein T, Specter S, Newton C, Nowotny A. Immunoadjuvanticity of endotoxins and nontoxic derivatives for normal and leukemic immunocytes. *Adv Exp Med Bio* 1990; 256:525-35.
25. Dahlsten M, Hedlung G, Kalland T. Staphylococcal-enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 1991; 12:147-50.
26. Ayhan H. Stafilokokkal enterotoksinler. *Türk Hijyen ve De-neyisel biyoloji Dergisi* 1988; 45:77-91.
27. Fleischer B, Schrezenmeier H. T cell stimulation by Staphylococcal enterotoxins: clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex Class II molecules on accessory or target cells. *J Exp Med* 1988; 167:1697-1707.
28. Platsoucas CD, Oleszak EL, Good RA. Immunomodulation of human leukocytes by Staphylococcal Enterotoxin A. Augmentation of natural killer cells and induction of suppressor cells. *Cell Immunol* 1986; 97:371-85.

Carlsson R, Sjogren HO. Kinetics of IL-2 and interferon γ production, expression of IL-2 receptors and cell proliferation in human mononuclear cells exposed to Staphylococcal Enterotoxin A. *Cell Immunol* 1985; 96:175-83.

Gülay Z, Oskovi H, İmir T. İnsan periferik kan lenfositlerinin doğal antikandiyal etkileri, X. Türk İmmünoloji Kongresi kitabı, Ankara, 1988.

Sümbüloğlu K. İstatistik, Çağ Matbaası, Ankara 1978:146-50.

Otani T, Katami K, Osada Y. Stimulation by Staphylococcal Enterotoxin A of nonspecific resistance of mice to microbial infection. *Infect Immun* 1985; 47:767-73.

Hirai N, Georgiades J, Berg K. A cytotoxic substance (CTS-51) produced by human buffy coat culture stimulated by Staphylococcal Enterotoxin B: specificity to malignant cells and kinetics of action. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 1985; 76:378-85.

34. İmir T, Bankhurst A. Stafilkokkal Enterotoksin B'nin lenfosit aktivasyonlarında kullanılması, I. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, izmir, 20-23 Nisan 1987, Kongre Kitabı, derleyenler: Tümbay E, Ang Ö, Karakartal G, Bilgehan Basımevi, 1987.

35. Brooks CF, Moore M. Presentation of a soluble bacterial antigen and cell surface alloantigens by large granular lymphocytes (LGL) in comparison with monocytes. *Immunology* 1986;58:343-50.

36. Nowotny A, Blanchard DK, Newton C, Klein T, Friedman H, et al. Interferon induction by endotoxin-derived nontoxic polysaccharides. *J Interferon Res* 1987; 7:371-8.

37. Dijkmans R, Billau A. Interferon γ : a master key in the immune system. *Current Opinion in Immunology* 1988; 1:269-74.