

## PREDNİZOLON VE SİKLOSPORİN A'nin LENFOSİTLERİN DOĞAL ANTİKANDİDİYAL AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Zeynep GÜLAY\*, Turgut İMİR\*\*

D.E.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı\*  
Gazi Üniv. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı\*\*

### ÖZET

*Prednizolon ve siklosporin A özellikle transplantasyon kliniklerinde yaygın olarak kullanılan immunosupresif ajanlardır. Bu çalışmada prednizolon ve siklosporin A'nin lenfositlerin doğal antikandidiyal aktivitesi üzerine etkileri bir kandidiyal koloni inhibisyon deneyi uygulanarak incelendi. Doğal antikandidiyal aktivitenin  $1 \times 10^{-9}$  M'dan  $1 \times 10^{-3}$  M'a kadar değişen konsantrasyonlarda prednizolon ile belirgin olarak haskalandığı buna karşılık 0,05 µg/ml-5 µg/ml siklosporin A ile oluşan inhibisyonun istatistiksel açıdan önemsiz olduğu saptandı. Siklosporin A ile doğal antimikrobiyal aktivitede önemli bir değişiklik olmaması bu ilacın transplantasyon sonrası immunosupresif tedaviye girmesi ile ölümcül enfeksiyon sıklığının azalışını açıklayabilir.*

**Anahtar sözcükler:** Doğal sitotoksisite, Doğal antikandidiyal aktivite, prednizolon, siklosporin A

### SUMMARY

*Prednisolone and cyclosporine A are widely used immunosuppressive agents especially in transplantation clinics. In this study, the effects of these agents on natural anticandidial activity were investigated by a candidial colony forming unit inhibition assay. Prednisolone at concentrations ranging from  $1 \times 10^{-9}$  M to  $1 \times 10^{-3}$  M significantly decreased the anticandidial activity whereas with different doses of cyclosporine varying in between 0,05 µg/ml -5 µg/ml the suppressive effect was statistically insignificant. The lack of significant suppression on natural antimicrobial activity may contribute to the reduction of fatal infection rate after Cyclosporine A was introduced into the antirejective therapy following transplantations.*

**Key words:** Natural cytotoxicity, natural anticandidial activity, prednisolone, cyclosporine A

Kortikosteroidler, otoimmün ve allerjik hastalıkların tedavisinde ayrıca transplantasyon sonrası atılım reaksiyonlarının önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır(1,2). Steroidlerin insan bağışıklık sisteminde yer alan çeşitli hücrelerin işlevlerini etkilediği bilinmektedir.

Bunlar arasında makrofajların ve nötrofil lökositlerin göç ve fagositoz işlevlerini bozarak yangısal cevabı engellemeleri(3,4), sitotoksik T hücre gelişimini(5,6), interferon (IFN) g, Interlökin (IL) -1 ve 2 sentezini bozmaları(7,8), lenfopeni ve cozinopeniye yol açmaları(1,4)

sayılabılır.

Son 10 yıldır siklosporin A'nın (CyA) klinik tedaviye girmesi ile transplantasyon sonrası başarı yüzdesi belirgin ölçüde artmıştır(1,9,10). CyA hem salgısal hem hücreselel efektör sistemleri etkilemektedir. Ancak bunun esas ativitesi T lenfositleri üzerindedir(9-11). CyA, bu hücrelerde IL-2 sentezini ve IL-2 reseptör ekspresyonunu engeller(2). Transplantasyon kliniklerinde atılım reaksiyonunun önlenmesi amacı ile kullanılan immunosupresif ajanlar sadece allografta özgül cevabı baskılamakla kalmaz tüm yönleri ile özgül hücreselel yanıt etkiler(1,2,12.). Bu nedenle enfeksiyonlardan korunmada doğal sitotoksik mekanizmalar önem kazanmaktadır.

Yaklaşık 15 yıl önce tanımlanmasından bu yana lenfositler doğal sitotoksisite konakçının enfeksiyöz ajanlara ve kanser gelişimine direncini sağlaması ile immünoloji çevrelerinde en fazla ilgi çeken alanlardan biri olmuştur. Periferel kanda MHC ürünlerinde bağımsız sitotoksisite gösteren lenfositler arasında hakim olan grup, iri granüllü lenfositler olarak da tanımlanan Doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücrelerdir(13,14). Bu hücrelerin klasik NK işlevi yanında Fc reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirdikleri antikora bağımlı hücreselel sitotoksisite (antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC) ativitesi de bulunmaktadır(2,15).

Bu çalışmada lenfosit doğal sitotoksisitesinin ölçümü için geliştirdiğimiz ve koloni inhibisyon

temeline dayanan Antikandidiyal indeks (AKI) yöntemini (16,17) kullanarak prednizolon (PRD) ve CyA'nın doğal antikandidiyal ativite üzerine etkisini inceledik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Efektör (E) Hücrelerinin Hazırlanışı:

20-40 yaş arası sağlıklı kişilerden alınan 10ml. heparinli (Liquemine®, Roche) kan örneği steril tüplerde fosfat tamponlu fizyolojik tuzlu su (PBS) ile 1:1 oranında sulandırıldı. Buradan 8ml alınarak 2ml lenfosit ayırma solüsyonu (Histopaque®, Sigma Chem. Comp.) içeren tüplere yavaşça ilave edildi. 20 dakika 2000 rpm'de santrifüje edildikten sonra oluşan mononükleer hücre tabakası (PBMC) pastör pipeti ile toplandı. Hücreler üç kez PBS ile yıkandı. Bu işlemden sonra monositlerin uzaklaştırılabilmesi için hücreler RPMI 1640 besiyerli (Cell Raisers®, Flow Lab) ile karıştırılarak, 0.2cc verici serumu ile kaplanmış petri kutularına yayıldı. 37°C'de bir saat enkübe edildi ve sürenin sonunda petri kutusu yüzeyine yapışmayan hücreler steril şartlarda pastör pipeti ile toplandı. Bu hücrelerden yayma preparat yapıp Giemsa ile boyandığında %90-95 lenfositlerden oluştuğu görüldü.

Tripan mavisi (%0.2'lik) ile canlı hücre oranı %99'un üzerindeydi. Hücreler bir kez yıkandıktan sonra, ilgili deney basamağına göre PRD, CyA veya sadece besiyeri ile enkübe edilerek sitotoksisite deneyinde kullanıldı.

## II. Hedef (H) Hücrelerin Hazırlanışı:

Candida stellatoidea maya hücreleri, mililitrede  $4 \times 10^3$  canlı mikroorganizma olacak şekilde sulandırılmaları yapıldıktan sonra hedef hücreler olarak kullanıldı.

## III. Sitotoksosite Deneyi (16,17):

Maya hücreleri, efektör hücrelerle 1:5 ve 1:15 H:E oranlarında  $37^\circ\text{C}$ 'de 2 saat enkübe edildi. Enküasyonunun sonunda her tüpten en az 4 plak olmak üzere kanlı agara 25'er mikrolitre ekim yapıldı.  $37^\circ\text{C}$ 'de 48 saat bekletildikten sonra oluşan koloniler sayıldı. Sadece RPMI 1640+%5 otolog serum ile enkübe edilen hedef hücreler (Kontrol-K) Antikandidiyal İndeks (AKI) hesaplanmasında kullanıldı.

IV) Antikandidiyal etki aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı:

$$\text{AKI} = \left\{ 1 - \frac{\text{Deney KOÜ}^*}{\text{Kontrol KOÜ}} \right\} \times 100$$

\* KOÜ = Koloni oluşturan ünite

V) Efektör hücrelerin PRD ile muamele edilmesi:

a) Doz etkisi:

Efektör hücreler ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ),  $1 \times 10^{-3}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M prednizolon (Merck Sharp Dohme) ile 18 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de enkübe edildi. İnkübasyon sonunda PBS ile 2 kez yıkılarak sitotoksosite deneyinde kullanıldı.

b) İnkübasyon süresinin etkisi

Efektör hücreler ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ )  $1 \times 10^{-6}$  M PRD ile 2, 8, 16, 24 saat enkübe edildikten sonra yıkılarak sitotoksosite deneyinde kullanıldı.

VI) Efektör hücrelerinin siklosporin A ile muamele edilmesi:

a) Doz Etkisi:

Efektör hücreler ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) 0.05, 0.25, 1,  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  gibi değişik konsantrasyonlarda CyA (Sandimmün®, Sandoz Comp) içeren besiyerinde 18 saat enkübe edildikten sonra, yıkılarak sitotoksosite deneyinde kullanıldı. Siklosporinin bu düzeyleri klinikte uygulanan tedavi dozlarından sonra elde edilen farmakokinetik düzeylere uyum göstermektedir(18).

b) İnkübasyon süresinin etkisi:

Efektör hücreler ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ )  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  CyA ile 2,8,16,24 saat enkübe edildikten sonra sitotoksosite deneyinde kullanıldı.

VII) Bulguların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Testler:

Mann Whitney U testi kullanıldı (19)

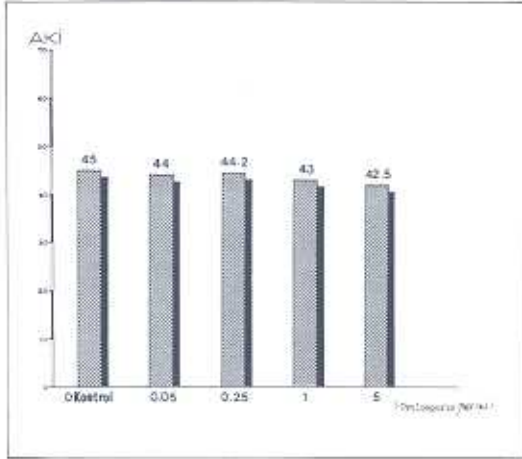
## BULGULAR

1) Cy A'nın Doğal Antikandidiyal Aktivite Üzerine Etkisi:

a) Doz etkisi:

4 farklı vericiden alınan kan örnekleri ile yapılan deneylerde değişen konsantrasyonlarda CyA ile

inkübasyon sonrasında antikandidiyal aktivitede %1-2,5 arasında azalmıştı (p>0.05) (Şekil 1).



Şekil 1: Değişen siklosporin A konsantrasyonları ve AKI (h=e 1:15)

#### b) İnkübasyon süresinin etkisi:

Efektör hücreler, 1µg/ml CyA ile değişen sürelerde (0 "kontrol", 2, 8, 16, 24 saat) inkübe edilerek AKI incelendi. Tablo I'de görüldüğü gibi 1: 15 H: E oranında 24 saatte görülen maksimal baskılama %6.4 idi (p>0.05).

Tablo I. Cy A ile Ön inkübasyon süresinin antikandidiyal indeks üzerine etkisi

İnkübasyon süresi (st)	AKI	
	H:E	1: 15
0 (kontrol)	34.1±11.7*	
2	37.1±15.1	
8	33.2±14.4	(2.7)
16	33.2±11.2	(2.7)
24	31.9±11.4	(6.4)

n=4

\* : Değerler ortalama ± SD Olarak verilmiştir.

( ) : Kontrolle göre baskılama yüzdesi

#### II) Prednizolonun Antikandidiyal Aktivite Üzerine Etkisi

##### a) Doz Etkisi:

4 vericiden alınan kan örneklerinden izole edilen periferik kan lenfositleri ( $5 \times 10^6$  hücre/ml), değişen dozlarda (0 "kontrol",  $1 \times 10^{-3}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M) PRD ile 18 saat inkübe edilerek AKI incelendi. Doğal antikandidiyal etkinin doza bağımlı bir şekilde baskılandığı gözlemlendi (Tablo II, Şekil 2) H: E oranı 1:10 olarak alındığında  $1 \times 10^{-9}$  M/PRD ile AKI'de kontrole göre %15.3,  $1 \times 10^{-6}$  M ile %56.9,  $1 \times 10^{-3}$  M ile %91.3 azalma olduğu saptandı (p<0.05).

Tablo II. Değişen konsantrasyonlarda prednizolonun doğal antikandidiyal aktivite üzerine etkisi

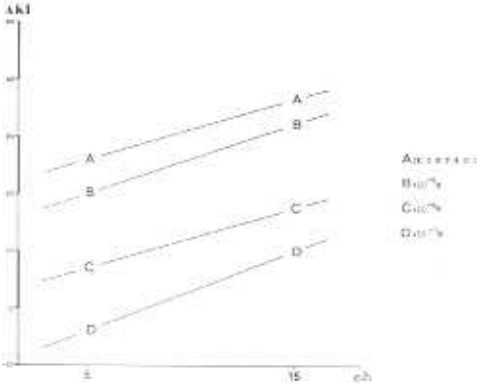
PRD kons (M)	AKI			
	H:E	1:5	1:10	1:15
0 (kontrol)	26.8±7.1*	30.8±8.9	35.9±12.3	
$1 \times 10^{-9}$	22.5±11.2 (16.0)	26.1±12.1 (15.3)	31.7±11.7 (11.9)**	
$1 \times 10^{-6}$	7.6±12.5 (71.0)	13.3±9.7 (56.9)	17.6±8.6 (51.0)***	
$1 \times 10^{-3}$	-3.0±8.7 (111.0)	2.7±6.9 (91.3)	10.0±6.3 (72.0)***	

n=4 \* : Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

( ) : Kontrolle göre baskılama yüzdesi

\*\* : p>0.05

\*\*\* : p<0.05

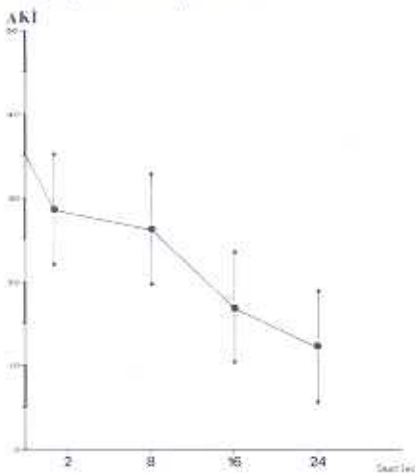


Şekil 2: Prednizolon konsantrasyonları ve AKI (n=4)

#### b) İnkübasyon süresinin etkisi:

Efektör hücreler ( $5 \times 10^6$ /ml)  $1 \times 10^{-6}$  M PRD ile değişen sürelerde (0 "kontrol", 2, 8, 16, 24 saat) inkübe edilerek AKI incelendi:

Doğal antikandidiyal aktivitedeki baskılanmanın 2. saatte başladığı ve 24 saate kadar artarak sürdüğü gözlemlendi (Şekil 3).



Şekil 3. İnkübasyon saatleri ve AKI (1:15  $10^{-6}$  M prednizolon (Dikey çizgiler  $\pm$  SEM göstermektedir).

## TARTIŞMA

Lenfosit doğal sitotoksitesisi konağın tümör hücrelerine ve infeksiyöz etkenlere direncinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında geliştirilmiş olan bir kandidiyal koloni inhibisyon yöntemi kullanılarak iki immunosupresif ajanın (PRD ve CyA) lenfosit doğal sitotoksitesisi üzerine etkileri incelendi. Daha önce yapılan çalışmalarda basit laboratuvar şartlarında uygulanabilen bu yöntemde doğal antikandidiyal aktiviteye sahip hücrelerin NK hücreler gibi CD 16 yüzey antijeni taşıyan lenfositler olduğu gösterilmiştir (16,17). Çalışmamızda görüldüğü gibi doğal antikandidiyal etki değişen konsantrasyonlarda prednizolon ile belirgin olarak baskılanmaktadır.

Bu inhibitör etki iki saatlik inkübasyonla başlamakta ve 24 saate kadar artarak sürmektedir. Baskılanma efektör hücre ölümü ile ilgili değildir. Çünkü prednizolon ile ön muamele sonrası hücre canlılık oranı, kontrol hücre gurubununki ile aynı idi (sonuçlar gösterilmemiştir). Ayrıca enkübasyonu takiben hücreler yıkanmakta böylelikle ilaçların olası antikandidiyal etkileri de elimine edilmektedir.

Literatürde tümör hücreleri ve  $Cr^{51}$  salınım metodu kullanılarak yapılmış benzer çalışmalar vardır. İmir ve arkadaşları (20), NK aktivitesinin deksametazon ile önemli ölçüde baskılandığını buna karşılık IL-2 ön muamelesinin bu inhibitör etkiyi azalttığını göstermişlerdir. Hochman (21)

Nair (22)'in çalışmalarında da benzer bulgular elde edilmiştir. Ancak araştırmacıların prednizolon etki mekanizması ile ilgili bulguları farklıdır. Nair ve arkadaşları (22) bu etkinin özellikle ADCC aktivitesi üzerine olduğunu öne sürmüşlerdir. Daha önce yaptığımız çalışmalar (16) doğal antikandiyal etkinin ADCC aktivitesinden farklı olduğunu göstermişse de PRD ile askılanan işlevin özelliklerinin incelenebilmesi için ek çalışmalara gerek olduğu kamsındayız.

rgan transplantasyonu sonrası serum düzeyleri ile uyumlu konsantrasyonlarda (0.05-5 µg/ml) siklosporin A ile tekrarlanan benzer deneylerde, 24 saatlik maksimal inhibisyonun % 6,5 civarında olduğu saptandı. Literatürdeki diğer çalışmalarda da 0.1-10µg/ml konsantrasyonlarında siklosporinin NK ve ADCC

aktivitelerinin direkt olarak etkilemediği fakat immun uyarıcılarla aktivasyonu engellediği gösterilmiştir (23,24). Bu, NK hücre aktivasyonu için gerekli ve T hücreleri tarafından sentezlenen IL-2, g-IFN gibi sitokinlerin salınımının önlenmesine bağlı olabilir (9).

Siklosporin A ile belirgin NK baskılanması olmaması, bu ilacın transplantasyon sonrası immunosupresif tedaviye girmesi ile ölümcül enfeksiyon riskinin azalmasını açıklayabilir.

Bulgularımızın literatürdeki Cr<sup>51</sup> salınım yöntemleri ile saptanan bulgularla uyumlu olması, bu çalışmada kullanılan Antikandiyal İndeks yönteminin, doğal sitotoksik aktivite değerlendirilmesi için uygun bir yöntem olduğunu kanıtlamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Tilney NL, Strom TB. Chemical manipulation of the immune response. In: G. James Cerilli, ed. Organ transplantation and replacement, First edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1988; 118-36
2. Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS. Immunity to tissue transplants. In: MJ. Wansiewicz, ed. Cellular and Molecular Immunology. First edition. Philadelphia: WB. Saunders Company, 1991; 317-34.
3. Cupps TR, Fauci AS. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. Immunol Rev 1982; 65: 133-42.
4. Hogan M, Vogel S. Inhibition of macrophage tumoricidal activity by glucocorticoids. J Immunol 1988; 140: 513-9.
5. Papa MZ, Vetto JT, Eitinghausen SE ve ark. Effect of corticosteroid on the antitumor activity of lymphokine activated killer cells and interleukin in mice. Cancer Res 1989; 46: 5618-23.
6. Kelso A, Munck A. Glucocorticoid inhibition of lymphokine secretion by alloreactive T lymphocyte clones. J Immunol 1984; 133: 784-9.
7. Arya S, Wong-staahl R, Gallo R.C. Dexamethasone mediated inhibition of human T cell growth factor and g-interferon messenger RNA. J Immunol 1984; 133: 273-6.
8. Synder DS, Unanue E. Corticosteroids inhibit macrophage I-a expression and interleukin 1 production. J Immunol 1982; 129: 1803-10.
9. Mc Kenna RM, Rush DN, Legore P, Jeffery JR. Interleukin 2, interferon and lymphotoxin in renal transplant recipients. Transplantation 1988;45: 76-81.

10. Nelson PW. Cyclosporin. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 1983; 159: 297-308.
11. Zeevi A, Venkataraman R, Burckart G ve ark. Sensitivity of activated human lymphocytes to cyclosporine and its metabolites. *Human Immunol* 1988; 21: 143-53.
12. Nugent KM, Kopp WC. Effects of Cyclosporine on pulmonary clearance of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1986; 154: 352-5.
13. Ortaldo JR, Reynolds CW. Natural killer activity: definition of a function rather than a cell type. *J Immunol* 1987; 138: 4545-6
14. Trinchieri G, London L, Kobayashi H, Perrussia B: Regulation of activation and proliferation of human natural killer cells. *Adv Exp Med Bio* 1987; 213: 285-98.
15. Perrussia B, Trinchieri G, Jackson Av ark. The Fc receptor for Ig G on human natural killer cells: Phenotypic, functional and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984; 33: 180-9.
16. Gülay Z, Oskovi H, İmir T. *Candida* türleri kullanılarak doğal hücre sel ölçümü. *Türkiye Klinikleri Tıp Araştırma Dergisi* 1992; 10: 253-8.
17. Gülay Z, İmir T. Lenfositlerin antikandidiyal etkilerinin SEB ve LPS ile artırılması *Türkiye Klinikleri Tıp Araştırma Dergisi* 1992; 10: 245-52.
18. Groth CG, Kundgren G, Albrechtsen D. ve ark. Optimal use of Cyclosporine A in renal transplantation: factors influencing graft survival. In *Chronic Renal Failure and Transplantation* M. A. Haberal First edition (ed), Semih Ofset, İstanbul, 1985; 299-309.
19. Sömbüloğlu K. İstatistik. Çağ matbaası, 1978; 146-150.
20. İmir T, Sibbitt W, Bankhurst A. The relative resistance of lymphokine activated killer cells to suppression by prostaglandins and glucocorticoids. *Prostaglandins, Leukotrienes Med* 1987; 28: 111-8.
21. Hochman PS, Cudkowiec G. Suppression of natural cytotoxicity by spleen cells of hydrocortisone-treated mice. *J Immunol* 1979; 1: 968-76.
22. Nair MPN, Schwartz SA. Immunomodulatory effects of corticosteroids on natural killer and antibody dependent cellular cytotoxic activities of human lymphocytes. *J Immunol* 1984; 132: 2876-82.
23. Yanagihara H, Adler WH. Cyclosporine A inhibits T cell-mediated augmentation of mouse natural killer activity. *Immunopharmacol* 1982; 14: 243-52.
24. Shao-Hsien C, Lang I, Gunn H ve ark. Effect of in vitro cyclosporin A treatment on human antibody dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transplantation* 1983; 35: 1279.