

Tavşanlarda Yarı Yapay Antijenlerle Oluşturulan Hümmoral Bağışıklık Süresine Aşırı Kan Kaybının Etkisi*

Dr. Şevket TEKMAN (**)
Dr. Vahdet GÜL (***)

ÖZET

Yarı yapay antijenlerle bağışıklanmış tavşanlarda, aşırı kanatmaların hümmoral bağışıklık üzerine etkisini araştırmak amacıyla; antikorların en yüksek düzeyde bulunduğu günden itibaren gün aşırı yapılan 12 - 15 ml lik kanatmalara negatif presipitasyon elde edilene kadar devam edildi. Aynı günlerde paralel yürütülen iki çalışmadan birinde yayma preparatlarla yüzde lenfosit sayısı araştırıldı. Diğer çalışmada ise, anti serumların selüloz asetat elektroforezleri yapılarak gama globulin oranlarındaki değişmeler incelendi. Sonuçta, aşırı kanatmalara rağmen pozitif bağışıklık süresi, kanatmaksızın bulunan 11 günlük süreye eşit olduğu görüldü. Kanatmalarla birlikte lenfositlerde süratli bir proliferasyon, gama globulinlerde ise, nisbeten yavaş bir düşüş saptandı.

SUMMARY

THE EFFECTS OF EXCESSIVE BLEEDING ON HUMORAL IMMUNITY OF RABBITS WHICH WERE IMMUNIZED WITH ARTIFICIAL ANTIGENS

We have intended to detect the effects of excessive bleeding on humoral immunity of the rabbits which were immunized by artificial antigens. For this purpose, we have continued to the bleedings (12-15 ml every other day) until we have got a negative precipitin reaction.

(*) TUBİTAK VII. Bilim Kongresi, Biyoloji Seksiyonunda tebliğ edilmiştir.
6 - 10 Ekim 1980, Kuşadası - AYDIN.

(**) İ.Üniv. Eczacılık Fak. Biyokimya Kürsü Profesörü, ÜNİVERSİTE/İSTANBUL

(***) B.Üniv. Tıp. Fak. Patoloji Kürsüsü Uzmanı, BURSA.

We studied in the meanwhile, on the dedection of the percentage of the lymphocytes on blood smears. We have studied on the other hand, the variation of the percentage of gamma globulins by cellulose acetat electrophoresis of the anti-seras. At the end of our research, we have found out that, there were no significant difference in the positive immunity periods of rabbits which were bled and not bled. We have also notified, together with the bleedings, a speedy proliferation of lymphocytes and a slow decrease in the gamma globulin levels ocured.

Gelişmiş omurgalı canlı türüne özgü bir protein, aynı tür diğer canlılara oral yol dışında bir yoldan verildiğinde antijenik etki gösterir. Bu etki, diğer tür canlılar için daha da güçlü antijenik özellikler taşıyabilir. Herhangi bir canlı organizma antijenik bir uyarım karşısında özgül antikor yapımı ile yanıt vererek bağışıklık kazanmış olur. İmmunizasyon sırasında önce antijen antikordan daha fazladır. Bu devrede *in vivo* meydana gelen antijen - antikor kompleksleri, antijen fazlalığında oluşan solubil komplekslerdir. Antikor yapımı arttıkça önce bir denge oluşur. Daha sonra bir yandan antijen azalırken diğer taraftan antikor arttığı için, antikor fazlalığında insolubil kompleksler oluşur^{1.2}. En sonunda antijen kaybolur fakat, özgül antikorlar dolaşımında bulunmaya devam eder. Örneğin, bazı bulaşıcı hastalıkları geçiren kimselerin hayatları boyu bu hastalığa tekrar yakalanmadıkları eskiden beri bilinmektedir.

İmmunizasyonda oluşan antikorların gerek fonksiyonel gerekse biyolojik özellikleri, homolog antijeni özelliklerine ve o canlının ait olduğu türe göre farklılık göstermekte; özgül antikorların sentezi kanda en yüksek düzeye ulaşma zamanı ve pozitif hümorale bağışıklık süresi değişmektedir.

Herhangi bir maddenin antijenik etki gösterebilmesi için, verileceği canlı için yabancı olması molekül ağırlığının 10.000'in üzerinde bulunması ve o canlı organizmaya sindirim işlemine uğramadan girmesi gerekmektedir³.

Yarı yapay antijenler, gerek hazırlanmaları ve gerekse çalışma kolaylığı açısından deneysel immunolojik çalışmalarda uzun yıllar oldukça sık kullanılmış ve antijen - antikor reaksiyonlarının en can alıcı noktaları bu suretle açıklanabilmiştir^{4.5}

Tıp'ta teşhis ve tedavi amacıyla canlı organizmaya verilen bazı kimyasal maddelerin kan ve doku proteinlerine bağlanmak suretiyle bir nevi haptene rolü üstlenerek vücut proteinlerine antijenik özellik kazandırabilir. Bu suretle organizmanın kendi yapılarına karşı immun reaksiyonlar oluşturmaya neden olarak hayati önem taşırlar.

Bu çalışmada yarı yapay antijenlerle immunize edilmiş tavşanlarda pozitif hümorale bağışıklık süresinin ve antikor titresinin aşırı kanatmalarla değişip değişmeyeceğini araştırmak istedik. Bu amaçla, antijen olarak sağır serumundan elde edilen 160.000 mol. ağırlığındaki püsodoglobuline antranilik ve arsanilik asitlerin haptene olarak ilavesiyle hazırlanan antranil azo - ve arsanil azo - psödoglobulinler ayrı ayrı kullanıldı. Tavşanların immunizasyonu klâsik usulle yapıldı. Bağışıklığın en yüksek düzeye ulaştığı günden itibaren gün aşırı 12 - 15 ml kadar kulak venlerinden kanatılarak, bir taraftan presipitin reaksiyonu ile kalitatif, diğer taraftan spektrofotometrik yöntemle presipitatları kantitatif olarak tayin etmek suretiyle hümorale bağışıklık durumu saptandı.

Bulunan sonuçlar, aynı antijenlerle yapılan daha önceki bir çalışmada ortalama 11 gün olarak bulunan sero pozitif hümorale bağışıklık süresi ile karşılaştırıldı⁶.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deneylerde antijen olarak kullanılan antranilazo - ve arsanilazo - psödoglobulinler, sığır serumundan doymuş amonyum - sülfatla fraksiyonlu olarak çöktürmek suretiyle ayrılan psödoglobulinin diazotize antranilik ve diazotize arsanilik asitlerle ayrı ayrı kenetlenmesiyle hazırlandı^{5,7,8}. Hazırlanan bu antijenlere karşı önceden bağışık olmadıkları presipitin reaksiyonu ile kontrol edilen, her iki cinsten 2-2,5 kg ağırlığındaki toplam 45 adet sağlıklı tavşana dört seri halinde kg. başına 30 mg antijen haftada iki defa olmak üzere 3 hafta süre ile subkütan enjekte edildi. Son enjeksiyondan sonra bir hafta ara verildi. Bu aradan sonra, kulak venlerinden 2-3 ml kan alınarak presipitasyonla bağışıklık kontrolleri yapıldı. Pozitif bağışıklık gösteren tavşanların kulak veninden negatif presipitin reaksiyonu verene dek gün aşırı 12-15 ml kadar kan alındı ve ayrılan antiserumlarla presipitin reaksiyonları yapıldı. Antijen - Antikor kompleksine ait gözlemler teşekkül eden kompleksin bulanıklığına göre, en iyi presipitin tüpü +++++, iyi +++, orta ++, az +, şüpheli ±, yok-, olarak değerlendirildi.

Sonuçlar tablo halinde gösterildi. Kantitatif tayinlerde, pozitif presipitin reaksiyonları sonunda meydana gelen ve bu presipitatların 5 ml 0,01 N Na OH te çözülmesiyle elde edilen çözeltilerin absorpsiyonları 215 ve 225 nm dalga boylarında, perkinelmer model 55 spektrofotometrede ölçüldü. Bu suretle presipitatların (Antijen - Antikor kompleksine) protein miktarları $\Delta(215-225) \times 144 = \mu\text{g/ml}$. formülüne göre hesaplandı^{9,10}.

Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak hümorale bağışıklık durumu grafikte gösterildi. Gün aşırı kanatma günlerinde paralel yürütülen diğer bir çalışmada kanatma günlerine ait serumların, Gelman - Digiscreen tip aygıtta sepharose III selüloz poliasetat kağıtları kullanılarak elektroforezleri yapıldı. Elektroforez için; tris Barbitol - Na/barbitol tamponuyla pH 8.8 de 30'220 V, mA'lik doğru akım uygulandı. Bu süre sonunda şeritler, 10' ponceau - S boyasıyla boyandı. %5'lik CH₃ COOH le yıkanarak %40'lık dimetilformamit transparan çözeltilisinde bekletildi. Etüde kurularak optik dansitometrede fraksiyonların renk şiddetine göre eğrileri çizildi ve gamaglobulin yüzdeleri hesaplandı.

Kanatma günlerinde lenfositlerin durumunu araştırmak amacıyla lökosit formülleri yapıldı. Temiz bir lama damlatılan taze bir damla kan yayma yapılarak kurutuldu. May Grünwald eriyiğinde fikse edildikten sonra Giemsa boyası ile boyandı. Mikroskopta, İmmersion objektifi ile her preparatta sayılan 100 lökosit içinde rastlanan lenfositler sayılarak ortalama yüzde lenfosit sayıları bulundu.

BULGULAR

4 seri halinde deneye alınan toplam 45 tavşanın pozitif bağışıklık reaksiyonu gösteren 24'ünün kulak venlerinden gün aşırı ve her seferinde 12 - 15 ml kan alınıp presipitin reaksiyonları yapılarak oluşan presipitatların bulanıklık derecesine göre kalitatif bir değerlendirme yapıldı. Örnek olarak seçilen iki ayrı tavşanda, her iki antijene ait pozitif reaksiyon elde edilen günler ve reaksiyon şiddetlerinin değerlendirilmesi tablo 1 ve 2'de gösterildi.

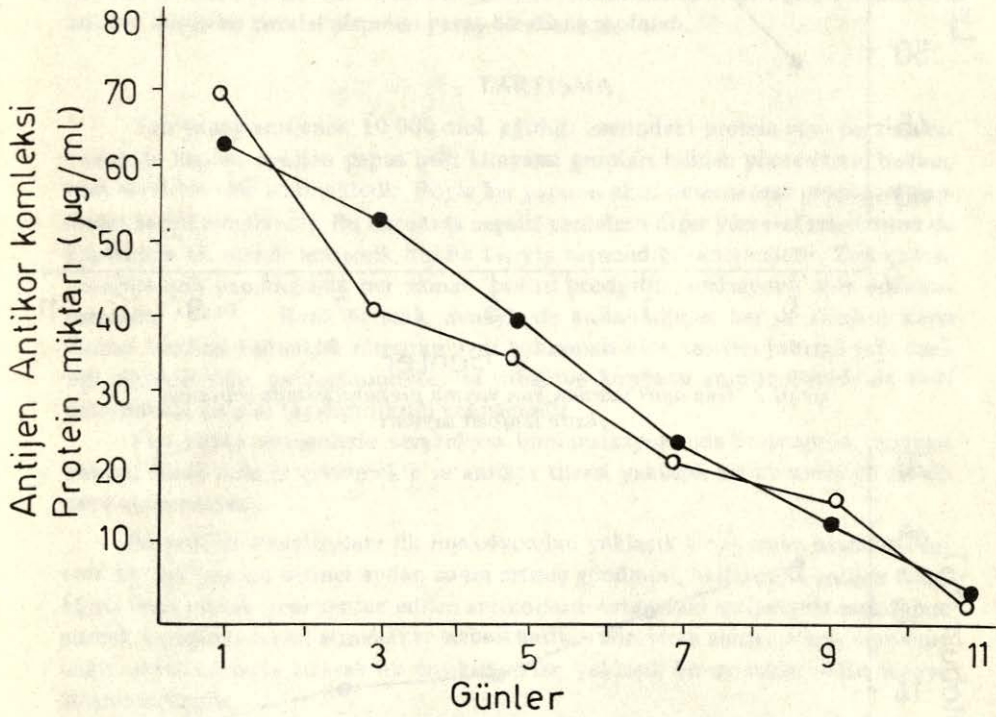
Tablo 1 : Antranilazo - psödoglobulinle bağışıklanmış bir tavşanda presipitin reaksiyonunun kalitatif değerlendirilmesi

Kanatma No.	ANTİJENİN SEYRELTİLME ORANLARI						Kontrol
	1/10	1/30	1/100	1/300	1/1000	1/3000	
1.	—	+	+++	+++	+++	++	—
2.	—	—	++	+++	++	+	—
3.	—	—	+	++	++	—	—
4.	—	—	—	+	+	—	—
5.	—	—	—	+	—	—	—

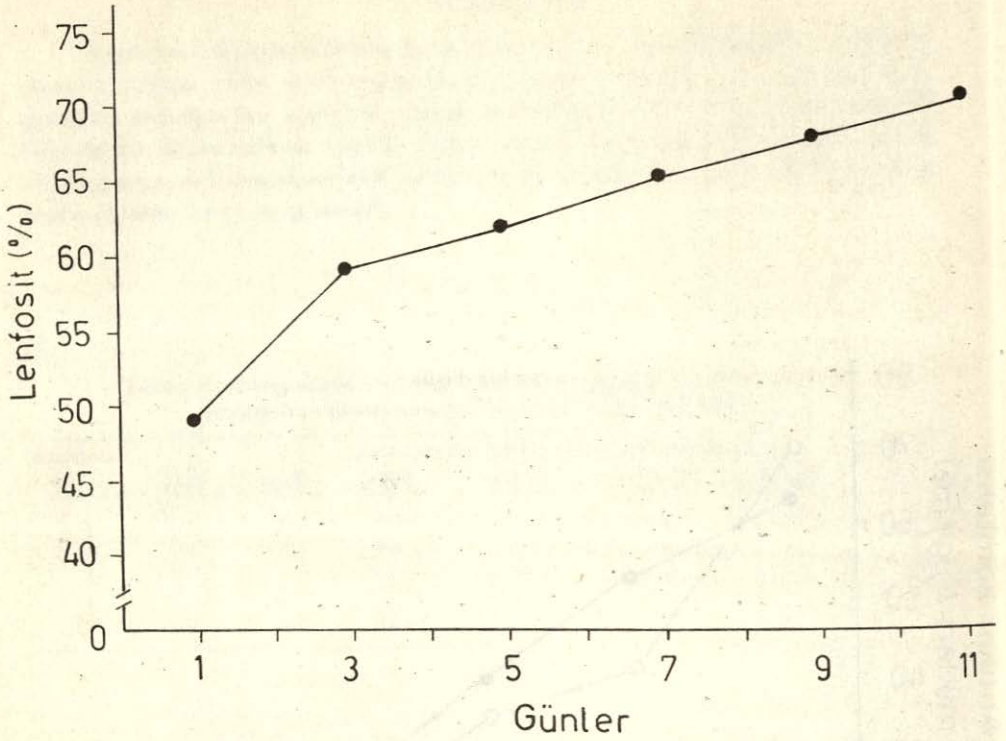
Tablo 2 : Antranilazo - psödoglobulinle bağışıklanmış bir tavşanda presipitin reaksiyonunun kalitatif değerlendirilmesi

Kanatma No.	ANTİJENİN SEYRELTİLME ORANLARI						Kontrol
	1/10	1/30	1/100	1/300	1/1000	1/3000	
1.	—	+	+++	+++	+++	++	—
2.	—	—	+	+++	++	+	—
3.	—	—	+	++	++	—	—
4.	—	—	—	+	+	—	—
5.	—	—	—	+	—	—	—

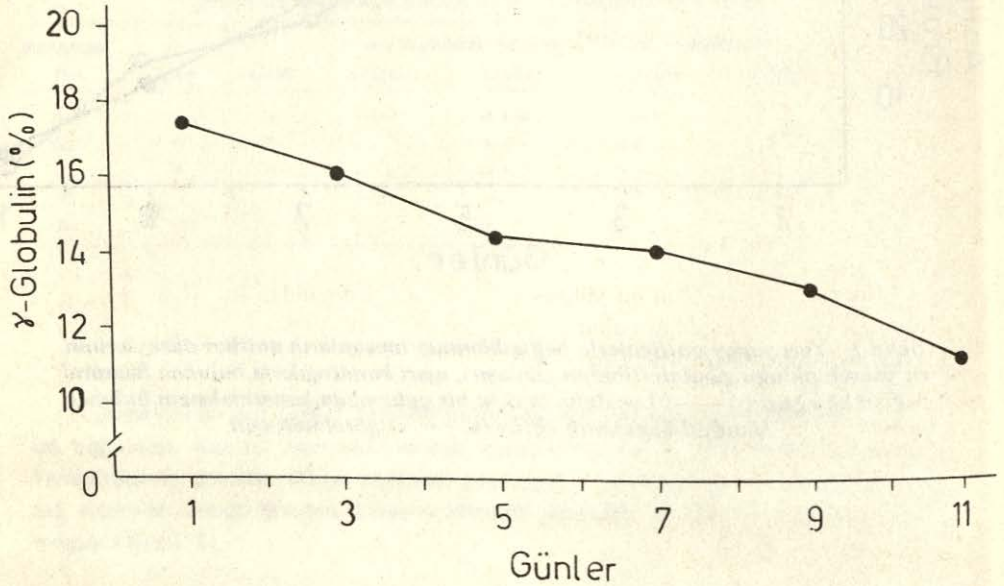
Deneylerde ayrı seriler halinde kullanılan her iki antijene karşı oluşan hümo-ral bağışıklık süreleri kantitatif olarak spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. Presipitatların protein miktar tayinleri yapılarak dolaylı olarak, antikorların en yüksek düzeyde olduğu günden itibaren zamanla azalarak 11. gün sıfıra düştüğü görülmüştür (Şekil: 1).



Şekil 1 : Yarı yapay antijenlerle bağışıklanmış tavşanların antikor düzeylerinin en yüksek olduğu günden itibaren gün aşırı, aşırı kanatmalarla bulunan hümorale bağışıklık eğrisi (○—○) ve daha önceki bir çalışmada kanatmaksızın bulunan hümorale bağışıklık eğrisi (●—●) görülmektedir.



Şekil 2 : Gün aşırı yapılan kan yayma preparatlarında saptanan yüzde lenfosit sayıları



Şekil 3 : Gün aşırı anti serumların elektroforezinde hesaplanan yüzde gamaglobulin oranları

Kanatma günlerinde taze kandan yayma preparatlar hazırlanarak lökosit formülleri yapıp lenfosit yüzde oranları bulundu (Şekil: 2). Paralel yürütülen diğer bir çalışmada da aynı kanatma günlerine ait antiserumların selüloz asetat elektroforezleri yapılarak gamaglobulin oranları tayin edildi (Şekil: 3). Şekil 2 ve 3 te görüldüğü gibi, bir taraftan da yüzde lenfosit oranı kanatmalarla birlikte hızlı bir artış göstermekte diğer taraftan gamaglobulin oranları nispeten yavaş bir düşüş göstermektedir.

Sonuç olarak, yarı yapay antijenlerle immunize edilmiş tavşanların presipitin reaksiyonu ile izlenen hümmoral bağışıklık süreleri aşırı kanatmalara rağmen değişmediği ve bu sürenin ortalama 11 gün olduğu bulundu. Kanatma günlerindeki yüzde lenfosit sayıları ise, kan kaybı ile eksildiği düşünülen antikorların telafi etmek üzere süratle arttığı görüldü. Bunun yanı sıra homolog antijene karşı oluşan antikorlar kanda azaldıkça antiserum elektroforezlerinde hesaplanan gamaglobulin oranlarında, antikor düşüşüne paralel nispeten yavaş bir düşüş saptandı.

TARTIŞMA

Yarı yapay antijenler 10 000 mol. ağırlığı üzerindeki protein veya organik bir moleküle hapten denilen yapısı belli kimyasal grupları bilinen yöntemlerle bağlanmak suretiyle elde edilmektedir. Böyle her yapının aktif determinant gruplarını haptenler teşkil etmektedir. Bu durumda negatif proteinin diğer yüzeysel gruplarının da haptenlere ek olarak antijenik özellik taşıyıp taşımadığı tartışmalıdır. Zira çapraz presipitasyon yapıldığında her zaman pozitif presipitin reaksiyonu elde edilememektedir ^{11.12}. Buna karşılık, deneylerde kullandığımız her iki antijene karşı oluşan hümmoral bağışıklık süresinin aynı bulunması bize, taşıyıcı yabancı yapı özelliği gösteren sığır psodoglobulinin, bu substitüe kimyasal gruplar dışında da aktif determinant gruplar taşıdığı fikrini vermektedir.

Yarı yapay antijenlerle tavşanların immunizasyonunda başlangıçta, hümmoral yanıtın düşük olduğu görülmekte ve antikor titresi yaklaşık bir ay sonra en üst düzeye ulaşmaktadır.

Bu nedenle kanatmalara ilk injeksiyondan yaklaşık bir ay sonra başlandı. Burada immun yanıtın birinci aydan sonra artmış görülmesi, başlangıçta antijen fazlalığına bağlı olarak yeni sentez edilen antikorların ortamdaki antijenlerle reaksiyona girerek kompleks teşkil etmeleri ve serbest antikor düzeyinin antijen eliminasyonuna bağlı olarak zamanla artarak ilk enjeksiyondan yaklaşık bir ay sonra en üst düzeye ulaşmasındandır.

Hümmoral bağışıklığın en yüksek düzeyde olduğu günden itibaren başlanan ve presipitasyonla saptanmaya çalışılan pozitif bağışıklık süresinin 11. günde son bulmadığı ve bu süreden sonrada özgül antikorların dolaşımında bulunduğu fakat, fazla hassas olmayan ve gözle değerlendirilen presipitin reaksiyonlarıyla saptıyamadığımız kanısını taşımaktayız. Yaklaşık 100 - 150 cc kanı olan tavşanların her seferinde 1/10'una yakın miktarlarda olmak üzere 5 - 6 kez yapılan kanatmalar karşısında özgül antikorların, daha düşük titre göstermesi ve daha kısa sürede bitmesi beklenirdi. Oysa, total kanın yarısına yakın miktarını birkaç gün içinde kaybeden hayvanlarda özgül antikorlar, kanatma yapılmaksızın bulunan bağışıklık süresine yakın bir sürede pozitif bağışıklık gösteriyor. Antiserumların, yapılan elektroforezleriyle de bu düşüşün birden olmadığı, yavaş seyirle normaline indiği görülmektedir.

Gün aşırı kanatma günlerinde yapılan lökosit formüllerinde kanatma sayı ve miktarı ile orantılı olarak yüzde lenfosit sayıları hızla artıyor. Bu artış, kanatmalarla eksilen antikörlerin kısa sürede, lenfositlerden gelişen plazma hücrelerince telafi edildiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. HALBOROW, J.E. : Immune complexes (Serbest bildiri). V. Ulusal İmmunoloji Kongresi, 5 - 7 Aralık 1978 İstanbul.
2. STEENSGAARD, J., LIU, M.B., CLINE, B.G., MOLLER, N.P. : The properties of Immune complex - forming systems., Immunology., 32: 445, 1977.
3. ROITT, M.I. : Essential Immunology., 3 rd edit. Blackwell Scientific publications., London, 1977.
4. LANDSTEINER, K. : The Specificity of Serological Reaction., Cambridge Mass; Harvard Univ. Press (1945). Ref: Weir, M.D., Immunology for Under graduates., Churchill Livingstone, London, 1975.
5. HAUROWITZ, F. : Über die Bindung zwischen Antigen und Prazipitieren dem Antiköprer., Zs. Physiol Chem., 245: 23, 1936.
6. TEKMAN, Ş., GÜL, V. : Yarı yapay antijenlere karşı bağışıklık kazanmış tavşanlarda humoral bağışıklık süresi., IV. Türk Biyokimya Kongresi'nde tebliğ edilmiştir. 7 - 9 Mayıs 1980, Ankara.
7. HAUROWITZ, F., SARAFIAN, K., SCHWERIN, P. : Antigenic properties of substituted serum globuline., J. Immunol., 40: 391, 1941.
8. BURK, J., BIOL. CHEM., 121: 373, 1937, Ref: Haurowitz, F., Ibid., 40: 391 1941.
9. WADDEL, W.J. : A simple U.V. spectrophotometric method for the determination of protein., J. Lab. and clin. Med., 48: 311, 1956.
10. MURPHY, J.B., KIES, M.W. : Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions., Biophys. Biochem. Acta., 45: 382, 1969.
11. ÖZDEN, I. : Çeşitli antijen ve antikörlerde biyokimyasal ve immunokimyasal bazı incelemeler., Doktora tezi., İst. Üniv. Ecz. Fak. Biyokimya Kürsüsü, İstanbul - 1975.
12. MACHIDA, A., KUMAZAWA, Y., MIZUNOE, K. : Regulation of anti-hapten antibody respons by chemically modified carrier antigen preferentially provoking delayed - type hypersensitivity., Immunology., 33: 199, 1977.