

# Yarı Yapay Antijenlere Karşı Bağışıklık Kazanmış Tavşanlarda Hümorale Bağışıklık Süresi \*

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

## ÖZET

Yarı yapay antijenlere karşı bağışıklık kazanmış tavşanlarda hümorale bağışıklık süresinin saptanması amacıyla, tavşanlara ayrı ayrı ve kilo başına 30 mg. hesabıyla haftada iki gün ve üç hafta süreyle deri altına antranil-azopsödoglobulin ve arsenil-azopsödoglobulin yarı yapay antijenleri injekte edilmiştir. Son enjeksiyonu izleyen bir hafta aradan sonra (antikor titresinin kanda en yüksek düzeye eriştiği günden itibaren) günışığı kan örnekleri alınarak presipitin reaksiyonları yapılmıştır.

Presipitatlarda spektrofotometrik miktar tayinleri yapılarak antikör düzeyleri kantitatif olarak saptanmıştır. Bu suretle kandaki özgül antikörlerin kaçınıcı gün sıfıra indiği hesaplanmış ve bu sürenin ortalama 11 gün olduğu saptanmıştır.

## SUMMARY

### DETERMINATION OF HUMORAL IMMUNITY PERIOD IN RABBITS WHICH WERE IMMUNIZED BY ARTIFICIAL ANTIGENS

In order to determine the humoral immunity period of immunized rabbits by artificial antigens; the antranil-azo and arsenil-azopseudoglobuline had been injected subcutaneously 30 mg/kg. to the rabbits, during three weeks. One week after the last injection (beginning the day in which antibody titration is the highest), the precipitine reaction had been carried out with the blood sample procured from immunized rabbits. A spectrophotometric method was used, for the determination of precipitate (antigen-antibody complex).

The specific antibodies had been found and measured in blood of rabbits by this method. The mean period of humoral immunity is found to be 11 days.

(\*) Bu çalışma 7-9 Mayıs 1980 GATA-ANKARA IV. Türk Biyokimya Kongresinde tebliğ edilmiştir.

(\*\*) İ. Ü. Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Kürsüsü, Kürsü Profesörü-İstanbul

(\*\*\*) B. Ü. Tıp Fakültesi, Patoloji Kürsüsü Uzmanı-Bursa



## GİRİŞ

Bazı bulaşıcı hastalıkları geçiren bazı kimselerin genellikle hayatları boyu bu hastalığa tekrar yakalanmadıkları eskiden beri bilinmektedir. Buna neden olarak vücuda giren ve o canlı için yabancı olan ve antijen denilen maddelerin vücuda girdiği zaman bu giren maddeye karşı vücudun koruyucu spesifik bir madde (antikor) yapmasıdır. Herhangi bir maddenin antijenik etki gösterebilmesi için o maddenin canlı organizmaya çoğunlukla parenteral girmesi, o canlı için yabancı olması ve molekül ağırlığının genellikle 10.000'in üstünde bulunması gerekmektedir<sup>1-2</sup>. Herhangi bir antijen organizmaya girdiği zaman oluşan immun yanıt o canlının türüne göre farklılık göstermekte; özgül antikorların sentezi, kanda en yüksek düzeye erişme zamanı ve hüморal bağışıklık süresi değişmektedir. Bu sebepten dolayı adı geçen değişikliklerin bilinmesi uygulama alanında önem taşımaktadır.

İmmunolojik çalışmalarda deney hayvanı olarak çok kullanılan tavşanların bağışıklanmasında genellikle haftada iki defa olmak üzere ve üç hafta süre ile uygulanan enjeksiyonları izleyen bir hafta aradan sonra antikorun en yüksek düzeyde olduğu saptanmış ve çalışmalar bu yönde yapılmıştır<sup>3-5</sup>. Ayrıca tavşanlarda uygulanan bu immunizasyonla elde edilen özgül antikor düzeyinin zamanla düşerek bir süre sonra sifıra eriştiği görülmüştür. Ancak, tavşanlarda yarı yapay antijenlere karşı oluşturulan ve en yüksek düzeye eriştirilen bu antikorların bu düzeyden itibaren kaçınıcı gün sifıra indiğine dair literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu amaçla çalışmamızda yarı yapay antijen (antranil-azopsödoglobulin ve arsanil-azopsödoglobulin)'lerle antikor oluşturularak antikor konsantrasyonu en yüksek düzeye gelmiş tavşanlardan günaşırı kan örnekleri alınarak bir taraftan presipitin reaksiyonu ile kalitatif, diğer taraftan spektrofotometrik antikor tayinleri ile kantitatif olarak tayin edilmek suretiyle, hüморal bağışıklık süreleri saptanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Deneylerde yarı yapay antijen olarak kullanılan antranil ve arsanil azopsödoglobulinler, sığır serumundan doymuş amonyum sülfatla fraksiyonlu olarak çöktürmek suretiyle ayrılan psödoglobulinin diazotize antranilik ve diazotize arsanilik asitlerle ayrı ayrı kenetlenmesiyle hazırlandı<sup>4-6</sup>. Hazırlanan bu antijenlere karşı önceden bağışık olmadıkları presipitin reaksiyonu ile kontrol edilen, her iki cinsten 2-2,5 kg. ağırlığındaki 23 adet sağlıklı tavşana üç seri halinde kg. başına 30 mg. antijen, haftada iki defa olmak üzere üç hafta süre ile ve derialtı yoluyla, enjekte edildi.

Son enjeksiyonu takiben bir hafta ara verildi. Bu aradan sonra, kulak veninden 3-4 ml. kan alınarak presipitasyonla bağışıklık kontrolleri yapıldı. Pozitif bağışıklık gösteren tavşanların kulak veninden negatif presipitin reaksiyonu verene dek günaşırı 3-4 ml. kan alındı ve ayrılan antiserumlarla presipitin reaksiyonları yapıldı. Antijen-antikor kompleksine ait kalitatif 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 sonucunda meydana gelen ve bu presipitatların 5 ml. 0.01 N NaOH'ta çözülmesiyle elde edilen çözeltilerin absorpsiyonları 215 nm ve



225 nm dalga boylarında, Perkin Elmer Model 55 spektrofotometrik ölçüldü. Bu suretle presipitat (antijen - antikor kompleksleri)ların protein miktarı  $\Delta (215 - 225) \times 144 = \mu\text{g/ml}$ . formülüne göre hesaplandı<sup>7-10</sup>. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak hümorale bağışıklık durumu grafik şeklinde gösterildi.

## BULGULAR

Üç seri halinde deneye alınan toplam 23 tavşanın pozitif bağışıklık reaksiyonunu gösteren 18'inin kulak venlerinden günasırı alınan kan örneklerinin serumlarıyla bağışıklamada kullanılan antijenlerin presipitin reaksiyonları yapılarak, oluşan presipitatların bulanıklık derecelerine göre kalitatif bir değerlendirme yapıldı. Her iki antijen türüne ait reaksiyon şiddetleri ve pozitif reaksiyon elde edilen günler Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterildi. Pozitif presipitasyon sağlanan günlerin ortalaması 11 gün olarak bulundu.

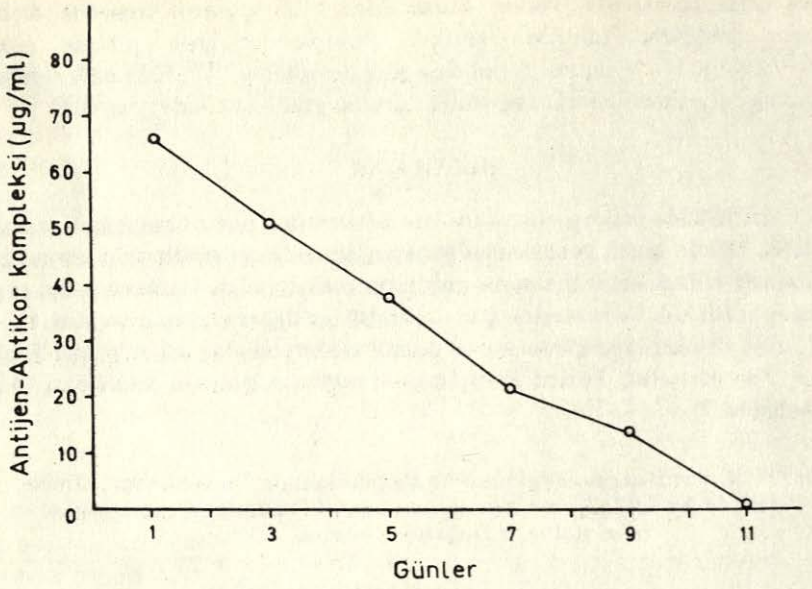
*Tablo: 1— Antranil-azopsödoglobulinle Bağışıklanmış Tavşanlardan, Örnek Olarak 10 No'lu Tavşanın Antiserumuna Ait Presipitin Reaksiyonunun Kalitatif Değerlendirilmesi*

Kanatma No.	Antijenin Seyreltilme Oranları						Kontrol
	1/10	1/30	1/100	1/300	1/1000	1/3000	
1.	—	+	+++	+++	+++	++	—
2.	—	—	++	+++	+++	++	—
3.	—	—	+	++	++	—	—
4.	—	—	—	+	+	—	—
5.	—	—	—	+	—	—	—

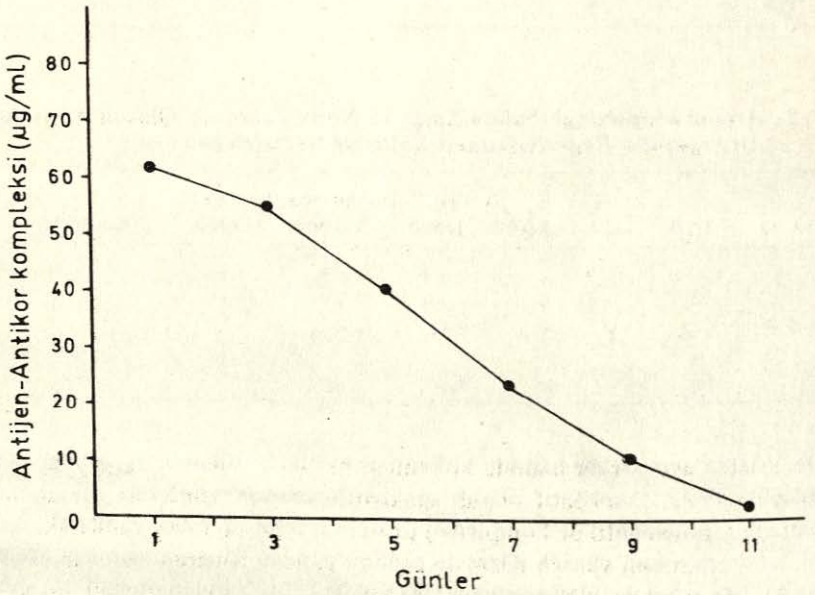
*Tablo: 2— Arsanil-azopsödoglobuline Karşı 15 No'lu Tavşanda Oluşan Antiseruma Ait Presipitin Reaksiyonunun Kalitatif Değerlendirilmesi*

Kanatma No.	Antijenin Seyreltilme Oranları						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 hümorale bağışıklık süreleri kantitatif olarak spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. Presipitatların (antijen-antikor kompleksi) protein miktar tayinleri yapılarak, dolaylı olarak, antikorların en yüksek düzeyde olduğu günden itibaren zamanla azalarak ortalama 11. gün sıfıra düştüğü görülmüştür (Şekil: 1, 2). Yapılan ölçümlerin sonuçta, iki ayrı antijenle elde edilen hümorale bağışıklığın titresi ve süresi oldukça benzerlik göstermektedir. Bu süre her iki antijende de ortalama 11 gün bulunmuştur.



Şekil: 1— Antranil azo-psödoglobulinle bağışıklanmış tavşanlara ait hümorale bağışıklık durumunun kantitatif değeriendirilmesi.



Şekil: 2— Arsanil azo-psödoglobulinle bağışıklanmış tavşanlarda, kantitatif olarak değeriendirilen hümorale bağışıklık eğrişi.



Doğal antijenlerle yapılan çalışmalarda antijenin organizmaya girişinden immun yanıtın oluşmasına kadar antijenin, önce retikulo-endotelial sistem (RES) hücrelerince tutulduğu gösterilmiş<sup>11-13</sup>, fakat antijenin burada kaldığı süreye ve antijenin konsantrasyonu ile oluşan bağışıklık arasındaki bağlantıya değinilmemiştir.

Bunların bilinmesi, oluşan humoral bağışıklığın süresi bakımından önem taşır. Deneysel hayvanlarının immunizasyonunda tekrarlanan enjeksiyonlarla verilen antijenik maddelerin RES'de kalma süresinin, antijenin tabiatına ve konsantrasyonuna göre değişmesi sav'ı immunolojik ve biyokimyasal kurallara en uygun olanıdır<sup>14,15</sup>. Ayrıca, kısa süren pozitif humoral bağışıklık süreci içinde organizmada antijen bulunup bulunmadığı tartışılmalı olduğu gibi, immunizasyonda oluşan özgül antijenik bilginin, önce bellek hücrelerince öğrenilerek antijenin kısa sürede eliminasyonunu izleyen günlerde özgül antikor yapımını bu bellek hücrelerinin mi üstlendiği de henüz aydınlığa kavuşturulamamıştır.

Yarı yapay antijenlerle tavşanlarda yapılan immunizasyon çalışmalarında bağışıklığın en yüksek düzeyde olduğu günün son enjeksiyonu izleyen yedinci gün olduğu bildirilmiştir<sup>3,4</sup>. Bu çalışmada kullanılan yarı yapay antijenlere karşı bağışıklığın en yüksek düzeyde olduğu gün yapılan kontrollerle literatüre uygun olarak son enjeksiyonu izleyen yedinci gün olduğu saptanmıştır. Bu antikor titresinin en yüksek olduğu gün birinci kanatma günü alınarak yapılan günışırayı tayinlerde antikor seviyesi gittikçe düşerek ortalama 11. gün sifıra inmektedir (Şekil: 1, 2). Her iki ayrı antijende aynı sürenin bulunması, iki antijende de taşıyıcı protein görevini yapan psödoglobulinden mi, yoksa haptene olarak ilave edilen aromatik asidik yapıların özelliğinden mi ileri geldiği tartışılmalıdır. Bu sürenin saptanmasında kullanılan serolojik yöntem nispeten az hassas olan presipitin reaksiyonuna dayandığından, 11. günden sonrada dolaşmada özgül antikorların oldukça düşük düzeyde bulunduğu fakat, bu yöntemle saptayamadığımız kanısını taşımaktayız.

#### Açıklama:

*Bu çalışmanın yürütülmesinde destek olan, Lokman İlâç ve Gıda Sanayii Laboratuvarı A.Ş. adına Sayın Ecz. Bayer Hacibeyoğlu'na teşekkür ederiz.*

## KAYNAKLAR

1. HAUROWITZ, F., YENSON, M.: Quantitative determination of antigen, antibody and complement in precipitates. *J. Immunol.*, 47: 4, 1943.
2. GÜLMEZOĞLU, E.: Bağışıklığın temelleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, A/16, Ankara- 1975.
3. LANDSTEINER, K.: The specificity of serological reaction. Cambridge Mass; Harvard Univ. Press. 1945. Ref: Weir, M.D., *Immunology for undergraduates*, Churchill Livingstone, London, 1975.
4. HAUROWITZ, F.: Über die Bindung Zwischen Antigen und Präzipitieren dem Antikörper. *Zs. Physiol. Chem.*, 245: 23, 1936.
5. HAUROWITZ, F., SARAFIAN, K., SCHWERIN, P.: Antigenic properties of substituted serum globuline. *J. Immunol.*, 40: 391, 1941.

6. BURK.: J. Biol. Chem., 121: 373, 1937. Ref: Haurowitz, F., Ibid., 40: 391, 1941.
7. BENDIXEN, G.: Kvantitativ protein bestemmelse pa serum og spinal vaedske. Nord. Med., 58: 1487, 1957.
8. WADDEL, W.J.: A. simple U.V. spectrophotometric method for the determination of protein. J. Lab. and Clin. Med., 48: 311, 1956.
9. MURPHY, J.B., KIES, M.W.: Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. Biophys. Biochem Acta., 45: 382, 1969.
10. EISEN, N.H.: J. Immunol., 60: 77, 1948. Ref: Curtis, W.A., Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. II., Chapter 10, optical analysis, Academic Press, London, 1968.
11. TEKMAN, Ş., DALGLISH, E.C.: Isotopic Labelling of a specific antibody. British J. Exp. Pathology., 35: 2, 1954.
12. BENNER, R., OUDENAREN, V.A.: Antibody formation in mause bone marrow. Immunol., 32: 513, 1977.
13. ÖMER, A., VERESS, B., SATIR, A., EL HASSAN, M.A.: Morphology of the spleen and Lymph nodes in fatal visceral Leishmaniasis. Immunol., 33: 605, 1977.
14. BOREK, F.: Immunogenecity. C.L., Amsterdam, North Holland, 1972.
15. TEKMAN, Ş., GÜL, V., KARACA, A.R.: Yapay bir antigene karşı bağışıklık kazanmış tavşanların R.E.S.'le ilgili organlarında görülen histopatolojik değişiklikler. Bursa Üniv. Tıp Fak. Dergisi, Cilt 5, Sayı 1-4: 1, 1978.