

Bovine Leukemia Virusu (BLV) İle Doğal Olarak İnfekte Aleukemik Sığırların Humoral İmmun Yanıtı ve İn Vivo T-Hücresi Cevabı

K. Tayfun ÇARLI*

Hasan BATMAZ**

Ayşin ŞEN***

Ahmet MİNBAZ****

ÖZET

Bu çalışmada, aynı sayıda¹⁵ Enzootik Bovine Leukosis'li ve aleukemik (EBL + PL-) ve bu enfeksiyona sahip olmayan (seronegatif; EBL-) 2 inek grubu in vivo T-hücresi ve humoral immün yanıtları yönünden karşılaştırıldılar. EBL + PL- gruba ait in vivo T-hücresi yanıtının EBL-grubunkine göre istatistiki olarak daha düşük ($P \leq 0.01$) olduğu belirlendi. T-independent antijen (Brucella S19)'e karşı humoral immün yanıt yönünden iki grup arasında bir fark olmadığı saptandı.

SUMMARY

Humoral Immune Response and In Vivo T-Cell Response of Aleukemic Cattle Naturally Infected With BLV

In the present study, EBL + PL- and EBL- groups of cows were compared with each other for the in vivo T-cell and humoral

* Yard. Doç. Dr.; U.Ü. Veteriner Fak., Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

** Yard. Doç. Dr.; U.Ü. Veteriner Fak., İç Hast. Anabilim Dalı, Bursa.

*** Dr.; U.Ü. Veteriner Fak., Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

**** Prof. Dr.; U.Ü. Veteriner Fak., Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

immune responses. It was determined that in vivo T-cell response of EBL + PL- group was statistically lower ($P \leq 0.01$) than that of EBL- group. It was found out that there was not a significant difference between the two groups for humoral immune response to the T-independent antigen (Brucella S19).

Key words: Bovine Leukemia Virus, immune response, cattle.

GİRİŞ

Enzootik bovine leukosis (EBL) Bovine leukemia virus (BLV) tarafından oluşturulan kronik bir lymphocytic leukemiadır¹. BLV'nun ise sığır türüne özgü bir onkojenik RNA virusu olduğu bildirilmiştir^{2,3}. EBL, persistent lymphocytosis (PL) ve daha az olarak da lymphosarcoma formlarında gözlenir; tüm infekte sığırların en fazla % 10'unda tümör gelişiminin görüldüğü bildirilmiştir⁴. Lymphosarcoma ve PL olgularına sahip sığırların periferel kanlarında B-lenfositlerinin arttığı, bunun aksine T-hücresi alt gruplarından T4 ve T8'de göreceli bir azalmanın bulunduğu bildirilmiştir^{5,6}. Diğer taraftan, BLV-infekte sığırlarda humoral immun yanıtın nasıl etkilendiğini araştıran Heeney ve ark.⁷ BLV'ye karşı en yüksek IgG titresini oluşturan sığır grubunun lymphomalı grup olduğunu, bu grubun aynı zamanda en düşük düzeyde IgM'e sahip olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, IgG₂ titresinin değişiklik göstermediğini ve IgG₁ titresinde ise artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Gatei ve ark.⁸ BLV ile doğal olarak infekte sığırları BLV + PL+ ve BLV + PL- olarak iki gruba ayırmışlar, PL + grubun IgM düzeyinin diğer gruptan ve kontrol grubundan düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. Lenfosit ve immunoglobulin değerlerindeki değişiklikler gözönünde bulundurularak, IgM oluşturan B-hücrelerinin infeksiyondan etkilendiği ve ayrıca devamlı BLV ekspresyonuna hormonal immun yanıtın (IgG₁ ile ilgili) devam ettiği ve BLV ekspresyonunu tümüyle bloke edemese de büyük ölçüde geriletmediği görülmüştür⁷.

Bu çalışmada, yukarıdaki bilgilerin ışığı altında, BLV-infekte (seropozitif; aleukemik) ineklerde in vivo T-hücresi cevabı ve T-independent antijene karşı humoral immun yanıtındaki değişiklikler araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

İnekler: Çalışmada, değişik yaşlarda 10 adet Holstein ve 5 adet Esmer ırk toplam 15 adet inek test grubu (BLV-infekte; seropozitif; aleukemik), 8 adet Holstein ve 7 adet Esmer ırk, toplam 15 adet inek ise kontrol (sero-negatif) grubu olarak ele alındı. Bu inekler aynı bakım ve besleme şartlarında barındırıldılar.

Diyet: İneklerin rasyonları 15 günde bir yapılan süt verimi kontrollerinden elde edilen süt verimi değerleri gözönünde bulundurularak hazırlandı.

Serolojik Test: İneklerin seropozitif veya seronegatif oluşları daha önce uygulanan BLV-monoklonal-gp51-ELISA testinin (Smith Kline Becham, Belgium) protokolüne uygun olarak yapılmasıyla belirlendi⁹.

Hematolojik Muayene: BLV-infekte ineklerin PL'e sahip olmadıklarına (aleukemik olduklarına) 45'er gün ara ile total lökosit ve formül lökosit değerleri saptanarak karar verildi¹⁰. Deneysel çalışma bu muayene sonucu başlatıldı.

İmmun Parametreler: Her hayvanın boynunun farklı 2 bölgesine 10 ml intramuscular Complete Freund's Adjuvant'ı (Difco, Detroit, Michigan) inoküle edilerek, bovine-purified protein derivate (PPD)'e karşı hipersensitivite oluşturuldu. Üç haftalık sensitizasyon periyodunu takiben her sığırın boyun derisi kalınlığı kompas yardımıyla ölçüldü. Daha sonra, her sığırın boynunun bir tarafına 0.1 ml bovine PPD (Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Ankara), diğer tarafına aynı miktarda steril phosphate buffered saline (PBS) intradermal olarak injekte edildi. İnjesiyondan 72 saat sonra deri kalınlıkları tekrar belirlendi. PPD yanıtı (In vivo T-hücresi yanıtı) aşağıdaki formüllerle hesaplandı: Yanıt = (DKa - DKb) - (KKa - KKb). Bu formülde DKa = PPD inokülasyonundan 72 saat sonraki deri kalınlığı (mm), DKb = PPD ile inokülasyondan önce deri kalınlığı (mm), KKa = PBS injeksiyonundan 72 saat sonraki deri kalınlığı (mm) ve KKb = PBS injekte edilmeden önceki deri kalınlığı anlamındadır. Bu test Cook ve Springer¹¹'den modifiye edilerek uygulandı.

Brucella S19'a karşı aglutine edici antikorlar (AA; Humoral immün yanıt) injeksiyonu takiben 15 gün sonra belirlendi. AA titreleri antijenin aglutine ettiği en yüksek serum sulandırmasının log₂'sı olarak ifade edildi.

Deneysel Plan: 1. gün - antijen verilmeden önce aglutinasyon testiyle brucella aglutinasyon titreleri en yüksek 1:10 olan tüm sığırlara Brucella S19 (SC) ve Complete Freund's Adjuvant'ı (IM) olarak uygulandı. Böylece sırasıyla humoral ve hücrel immün yanıtlar stimüle edilmiş oldu.

16. gün - aglutinasyon testi (tüp aglutinasyonu) ile Brucella S19'a karşı oluşan humoral immün yanıt belirlendi.

21. gün - PPD ve PBS inokülasyonları yapıldı.

24. gün - Deri kalınlıkları ölçüldü ve in vivo T-hücresi yanıtı hesaplandı.

İstatistiki Analiz: Elde edilen her iki gruba ait verilerin aritmetik ortalamaları "t" student test kullanılarak karşılaştırıldı.

BULGULAR

Tablo I'de görüldüğü gibi seropozitif grubun in vivo T-hücresi yanıtında seropozitif grubunkine göre istatistiki olarak önemli ölçüde düşme ($P \leq 0.01$)

gözlemlendi. Her iki grubun humoral immün yanıtlarının ortalama değerleri arasında ise herhangi bir fark gözlenmedi.

Tablo: I
EBL+ ve EBL- İneklerdeki Humoral ve Hücresel İmmün Yanıt

Gruplar	n	Humoral İmmün Yanıt (\log_2) $\bar{X} + S\bar{x}$	In vivo T-hücreyi Yanıtı (mm) $\bar{X} + S\bar{x}$
Seronegatif (EBL negatif)	15	6.04 $\bar{+}$ 0.39	1.43 $\bar{+}$ 0.34
Seropozitif (EBL pozitif)	15	6.03 $\bar{+}$ 0.40	0.49 $\bar{+}$ 0.10*

* - $P \leq 0.01$

TARTIŞMA

BLV^vunun immün sistem hücrelerine, fonksiyonlarına ve değişik immüno-lojik parametrelere etkileri araştırılmış, özet olarak virusun T-hücreyi alt gruplarında azalmaya, B-hücrelerinde ise onkojenik bir çoğalmaya neden olduğu saptanmıştır^{5,6,7}. Bunun yanı sıra, immunoglobulin konsantrasyonlarında ise IgM düzeyinde PL⁻li ve lymphomalı ineklerde düşüş, IgG₁ titrelerinde ise yükselme belirlenmiştir. IgG₂ düzeyinde ise bir değişiklik gözlenmemiştir. Yine seropozitif PL⁻ (aleukemik) sığırlarda immunoglobulin fraksiyonlarının normal sığırlardan farklı olmadığı gözlenmiştir^{7,8}. Bu çalışmada EBL+ PL⁻ sığırlarla EBL⁻ sığırların in vivo T-hücreyi ve humoral immün yanıtları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bilindiği gibi, her ne kadar hipersensitiviteden sorumlu T-hücreyi tipi T_{DH} (T-delayed hypersensitivity) olarak gösterilmişse de, bu hücrelerin yüzeylerinde Lyt 1⁺ 23⁻ ve Lyt 1⁻ 23⁺ gibi antijenik yapıların bulunuşu ve bunların T_H (T helper) ve T_S (T supressor) hücrelerinde de varoluşu olayın T_H ve T_S hücrelerine bağımlı olarak geliştiği bildirilmiştir¹². Mevcut çalışmanın sonucunda, in vivo T-hücreyi yanıtının EBL+ PL⁻ ineklerde düşük bulunuşu bu hayvanların T_H ve T_S hücre gruplarının BLV^vu tarafından etkilenişinin bir diğeri ifadesi olacağı kanısına varılmıştır. Ayrıca temel olarak hücresel immün yanıtı çalışmada faydalanılan yöntem tüberkülin uygulaması olduğuna göre, EBL infeksiyonunun sadece serolojik olarak ortaya koyulabilen formuna sahip sığırlarda tüberkülin reaksiyonunun bozulabileceği akla gelmektedir. Bu durum EBL+ olup aynı zamanda Myco. tuberculosis (Myco. bovis) basili ile infekte sığırların şüpheli, hatta negatif değerlendirilmesine yol açabilir.

Araştırmanın diğeri basamağında, T-hücreyi bağımlı olmayan (T-independent) bir antijenin (Brucella S19) EBL+ PL⁻ sığırlarda, EBL⁻ sığırlarda

kiyle hemen hemen aynı düzeyde humoral immün yanıtı uyardığı saptanmıştır. Bu durum IgG üretiminin sadece seropozitif durumdaki sığırlarda normal olduğunun bir indikatörü olup, bu konudaki diğer çalışmaların verileriyle uygunluk göstermektedir^{7,8}.

KAYNAKLAR

1. MILLER, L.D., MILLER, J.M. and OLSON, C.: Inoculation of calves with resembling c-type virus from cultures of bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 48, 423-428 (1972).
2. KETTMANN, R., PORTETELLE, D., MAMMERICKX, M., CLEUTER, Y., DEKEGEL, D., GALOUS, M., GHYSDAEL, J., BURNY, A. and CHANTRENNE, H.: Bovine leukemia virus: An exogenous RNA oncogenic virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 1014-1018 (1976).
3. DESCHAMPS, J., KETTMANN, R. and BURNY, A.: Experiments with cloned complete tumor derived bovine leukemia virus information prove that the virus is totally exogenous to its target animal species. J. Virol. 40, 605-609 (1981).
4. FERRER, J.F., ABT, D.A., BHATT, D.M. and MARSHAK, R.R.: Studies on the relationship between infection with bovine C-type virus, leukemia and persistent lymphocytosis in cattle. Cancer. Res. 34, 893-900 (1974).
5. GATEI, M.H., BRANDON, R.B., NAIF, H.M., McLENNON, M.W., DANIEL, R.C.W. and LAVIN, M.F.: Changes in B and T cell subsets in bovine leukemia virus-infected cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 23, 139-147 (1989).
6. STOTT, M.L., THURMOND, M.C., BUNN, S.C., OSBURN, B.I. and STOTT, J.L.: Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. J. Gen. Virol. 72, 307-315 (1991).
7. HEENEY, J.L., VALLI, V.E. and MONTESANTI, J.: Alterations in humoral immune response to bovine leukemia virus antigens in cattle with lymphoma. J. Gen. Virol. 69, 659-666 (1988).
8. GATEI, M.H., LAVIN, M.F. and DANIEL, R.C.W.: Serum immunoglobulin concentrations in cattle naturally infected with bovine leukemia virus. J. Vet. Med. B. 37, 575-580 (1990).
9. ANONYMUS: Norden Laboratories, Labease BLV-antibody detection assay, Product. Manual, Belgium (1989).
10. STÖBER, M.: Lymphatische leukose erimachsener Rinder. G. Rosenberg:

Krankheiten des rindes. 2. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 54-73 (1978).

11. COOK, M.E. and SPIRINGER, W.T.: Effect of reovirus infection and dietary levels of selected vitamins on immunocompetence of chickens. *Avian. Dis.* 27, 367-377 (1983).
12. TIZARD, I.R.: *Immunology: An introduction*. CBS College Publishing. 1st. edition, Tokyo (1984).