

A. Ü Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü  
Ord. Prof. Dr. Süreyya Aygün

A. Ü Veteriner Fakültesi Biyokimya Kürsüsü  
Doç. Dr. Ethem Erşoy

## DEMİR VASITASILE BAKTERİ EKZOTOKSİN VE ENDOTOKSİNLERİNİN İNAKTİVE EDİLMESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Ömer Ertürk\*

Kâmuran Ertürk\*\*

Uzun yıllardan beri bilindiği gibi, demir metabolizması çeşitli enfeksiyonlarda önemli olarak değişmektedir. Demir, hemosiderin halinde retiküloendotelial sistemde depo edilmek suretiyle yükseldiği zaman (2) serumdaki demir seviyesi düşmekte, azalmaktadır (1). Bazı araştırmacılara göre, bu devreler sırasında retiküloendotelial hücreler tarafından fagosite edilen toksinleri hemosiderin-demir inaktive edilebilmektedir. Bu sonuç son zamanlarda *Heilmeyer* (2) tarafından seri halinde yapılan araştırmalarla desteklenmiş ve bu araştırmalar sonucunda invitro şartlar altında demirin çeşitli bakteri eksotoksinlerinin toksin tesirinin ortadan kaldırılabileceği anlaşılmıştır. Bilindiği gibi, toksinler organizmada hemorajik şok ve letal endotoksemia gibi durumları meydana getirmekte ve plasmada bulunan demir bu durumlar esnasında azalmaktadır. Bu azalma, retiküloendotelial sistemi bloke edecek kolloidal bir maddenin enjeksiyonu ile muvakkat olarak önlenmektedir (4). Şok görülen hayvanlarda hemorajik şok müstesna olmak üzere, fagosit hücreler tarafından sirkülasyonda bulunan demirin bertaraf edilmesi diğer şiddetli reaksiyonlar esnasında demirin retiküloendotelial sistem tarafından hızla bertaraf edilmesi ile beraber husule gelir. Hemorajik şokta demir miktarı aksine bir durum göstermektedir. Hemorajik hipotansiyondan sonra meydana gelen demir yükselmesi; retiküloendotelial sistem aktivitesinin azalması neticesi husule gelebilir. (5). Bu fonksiyonel aktivitesinin, fetiküloendotelial hücrelerinin oksijene bağlı demir ile ilgisinin inhibe edilmesiyle bir münasebeti vardır. (7, 10) Bu sonuçlardan şu nokta meydana çıkmaktadır. Kısa süren hemorajik hipotansiyonu takibeden bakteri endotoksinlerine karşı duyarlılığın yükselmesi, retiküloendotelial sistem hücreleri tarafından demirin tutulması üzerine oksijen kifayetsizliğinin inhibe edici bir tesir yapması dolayısıyledir (8).

\* A. Ü. Veteriner Fak. Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü Profesörü

\*\* A. Ü. Veteriner Fak. Biyokimya Kürsüsü Dr. Asistanı

*Janoff* ve arkadaşları da bu konu üzerinde denemeler yapmışlardır (6). Bu araştırmacılar *Cl. perfringens* alpha toksini, *C. diphtheria* toksini ve *E. Colien-* dotoksini solusyonlarını çeşitli maddelerle inkube ettikten sonra farelere, kobay ve tavşanlara inokule etmişlerdir. Farelerde alpha toksinin öldürücü tesirini demir, bakır, cysteine, ascorbic acid ortadan kaldıracı olarak tesir ettikleri halde, magnesium, manganese, tuty ve citrate tesiri göstermemişlerdir. Yine araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara göre, demir, kobaylarda diphteri toksininin öldürücü tesirini de ortadan kaldırmıştır. Toksinin demir ile inkubasyonundan sonra tavşanlarda öldürücü ve dokuyu nekroze edici tesirleri ortadan kalkmış, fakat toksinin beden ısısı husule getiren tesiri giderilememiştir. Araştırmacılar göre, invitro şartlar altında bakteri toksinlerinin demir ile inaktivasyonu spesifik olmayıp reversibldir. Bununla beraber anorganik demir ile endotoksinin invitro olarak inaktive edilmesinin müşahade edilmesi böyle bir mekanizmanın olabileceğini araştırmacılar kabul etmektedirler.

Yukarıdaki müşahadeler, bozulan demir metabolizması ile hemorajik şoktaki bakteriler endotoksin arasında fonksiyonel bir münasebet olduğunu bize göstermektedir. Bunun için, biz de demirin toksin tesirini giderici fonksiyonunu diğer başka toksinler üzerinde incelemek için bu çalışmayı yaptık. Bu çalışmamızda bundan önceki çalışmalarda olduğu gibi, Heilmeyer'in invitro olarak demir vasıtasıyla bakteri ekzotoksinlerinin toksin tesirini giderici araştırmalarını genişletme amacını takip ettik.

### M a t e r y a l v e M e t o d

Araştırmalarımızın başında maksat ve gayesini açıkladığımız bu çalışma Amerika Birleşik Devletlerinin Oregon State Üniversitesinin Veteriner Departmanında yapılmıştır. Denemeler iki çeşit toksin üzerine tatbik edilir. Bunlardan birincisi tetanus eksotoksini, ikincisi de Anthrax endotoksini. Her iki toksin nevi özel olarak hazırlandıktan sonra iki gruba ayrılmış, birinci gruba demir ilâve edilmiş, ikinci gruba ilâve edilmemiştir. Bundan sonra her iki grup toksin solusyonları 37 derecede çalkalamak suretiyle 8 saat müddet ile bırakıldı. Anthrax basilinin endoksini amonium sulfat ile fraksiyone ve dialize edilerek purifiye edildi (7). Her iki toksin üzerinde yapılan denemeler sonucunda, köpekler için Anthrax toksininin, tavşanlar için de tetanus toksininin MLD dozları tesbit edildi.

Anthrax toksini ile inkube edildikten sonra köpeklerde letal tesirine ilâve olarak, lokal ve genaralize reaksiyonlar (8) ve toksin tesirile husule gelen beden ısısı gibi biyolojik özellikleri de incelendi (9). Bu incelemelerden beklenen gaye, invitro toksin tesirinin giderme hadisesinde daha geniş bilgi elde etmektir. Köpeklere en az öldürücü dozdan aşağı olmak üzere intravenöz yolla anthrax toksini şırınga edildi. Aradan 1-3 saat geçtikten sonra ayrı hayvanlara intradermal olarak yine aynı dozda Anthrax toksini şırınga ederek lokal reaksiyon

meydana getirildi. 18-24 saat sonra hayvanlar öldürülerek iç organlarda husule gelen makroskopik ve mikroskopik prosesler muayene edildi. Köpeklerde beden ısısı yükselişi, toksin küçük dozlar halinde intravenöz yolla şırınga edildikten sonra ölçülmüştür. Yapılan bu toksin denemelerinde her bir hayvanın toksine karşı olan hassasiyeti derinin bir tarafına 100 micro g. epinephrine ve 10-15 micro g. toksin karışığı kontrol olarak enjekte edilerek denendi. Bu şekildeki kontroller sonucunda toksine mukavemeti olmayan köpeklerde hemorajik nekrozların husule geldiği tesbit edildi.

### S o n u ç l a r

I No. lu cetvelde demirin letalite üzerine tesiri açıklanmaktadır. Bu cetvelin incelenmesinde, inkube edilmiş toksin ile intravenöz yolla inokule edilmiş kontrol köpeklerinin hepsinin öldüğü anlaşılmaktadır. Halbuki ferro sulfat ile inkube edilen toksinden aynı doz inokule edilen köpekler canlı kalmıştır.

#### Cetvel I

Demirin Anthrax toksininin öldürücü ve Lokal Reaksiyonu Üzerinde Tesiri.

Deneme	köpek adedi	Beher hayvana yapılan inoku- lasyon dozu	Pozitif reaksiyon
Letal toksin	2	500 micro g. /Kg. Toksin, İ.V.	2/0
	2	500 micro g. /Kg. toksin + 100 micro g. /Kg. Fe, İ. V.	0/2
Lokal toksin reaksiyonu	3	500 micro g. toksin, i. V. 3 saat sonra 200 micro g. tok- sin i. d.	2/3
	3	500 micro g. toksin + 100 micro g. Fe, i. v. 3 saat sonra 200 micro g. Toksin + 100 micro g. Fe, i. d.	0/3

Yine 1 No. lu cetvelin incelenmesinde, iki doz halinde toksin verilen köpeklerde pozitif deri reaksiyonu görüldüğü belirtilmektedir. Bu iki doz halinde toksin verilmesi şu şekilde yapılmıştır. İntravenöz yol ile 500 micro g. toksin verilmiş, 3 saat sonra 200 micro g. toksin intra derm olarak inokule edilmiştir. Buna karşılık demir ile inkube edilmiş toksinin aynı şekilde köpeklere şırınga edilmesiyle pozitif deri reaksiyonu husule gelmemiştir. Denemede kullanılan köpeklerin % 50 si intravenöz yolla toksinin subletal dozu ile inokule edilmişler ve 12 saat sonra bağırsak cidarında, mesenterik lenf yumrularında ve dalakta enfeksiyonun lokalize olduğu görülmüştür. Bir grup deneme köpeği de toksin demir ile inkube edildikten sonra aynı şekilde inokule edilmişlerse de iç organlarda ne makroskopik, ne de mikroskopik bir proses görülmemiştir.

Demirin köpeklerde beden ısısı üzerine olan tesirini meydan çıkarmak için üç grup üzerinde çalışıldı. Birinci grup köpeklere 100 mg. toksin, ikinci gruba 100 mg. toksin % 25 mg. demir, üçüncü gruba da yalnız 25 mg. demir inokule edildi. Denemeye giren bütün hayvanların beden ısıları gerek inokulasyondan önce ve gerekse inokule edildikten sonra rektal olarak ölçüldü. Elde ettiğimiz sonuçlar değişik olmakla beraber demirin, toksinin letalitesini, lokal ve genaralize tesirlerini inhibe eden miktarı kullanıldığı halde toksinin beden ısısını yükseltici tesirini inhibe etmediği anlaşılmıştır.

### Tetanus toksini:

1 — Demirin toksinin erime kabiliyeti ve kobaylarda letalite tesiri üzerine tesirini açıklamak maksadı ile kontrol kobaylara deri altı yolu ile açıklanan metod gereğince 1/2000 nisbetinde su ile sulandırılan ve inkube edilen tetanus toksininden 1 cc. enjekte edildi. Teste tâbi tutulan hayvanlar ise, aynı solusyon ferro sulfat ile inkube edildikten sonra enjeksiyona tâbi tutuldular. Denemeler sonucunda demir ile inkube edilen tetanus toksininin kobaylarda artık letal bir tesiri kalmadığı görüldü. Elde edilen sonuçlar 11 No. lu cetvelde açıklanmaktadır.

### Cetvel II

Tetanus Toksininin demir ile muamelesinden Elde edilen Sonuçlar:

Denemenin nevi	kobay adedi	Beher kobaya ya- pılan inokulasyon dozu	Toksın solubi- tesindeki deği- şiklik.	Kurtulanlar	
				3 gün	7 gün
Yalnız	8	1 cc. Toksin	Precipitation yok	0/8	
Toksın+De- mir.	8	1 cc. Toksin + 0. 33 mg. FeSO <sub>4</sub>	Precipitation var.	8/8	
Yalnız Toksın	5	1 cc Toksin	Precipitation yok	0/5	
Toksın+De- mir	5	1 cc Toksin + 0. 33 mg. Fe SO <sub>4</sub>	Precipitation var	5/5	

### T a r t i Ő m a

Çalışmamızın konusu üzerinde bu güne kadar çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Her ne kadar yaptığı araştırmalar tam olarak desteklenmekle beraber demirin hayvanlarda detoksifiye edici tesiri önceleri *Heilmeyer* (2) tarafından ileri sürülmüştür. Yine aynı araştırıcı ve arkadaşlarının (3) elde ettikleri sonuca göre, anemi gibi bakır noksanlığının diğer tesirleri bilinmeden, demir noksan-

lığı olan hayvanlarda bakteri toksinlerine karşı bir duyarlılığın meydana gelmesinin önemi ortaya atılmıyacağı inancına varmışlarsa da bu gün artık iz elementler denilen bu maddelerin noksanlığı halinde organizmada ne gibi bozuklukların husule geleceği hakkında bilgilerimiz çok fazla genişlemiştir. Netekim, son zamanlarda yine Heilmeyer ve diğer araştırmacıların müşahadeleri birleşmekte, enfeksiyon devresinde bakır metabolizması değişmekte ve bakır ile yapılan ön tedaviler ile deneme hayvanlarını bakteri endoksinlerinin öldürücü tesirlerinden koruduğu kabul edilmektedir. (3) Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar Heilmeyer (3), Janoff ve arkadaşlarının (6) elde ettikleri sonuçlara uymaktadır. Bu araştırmacılar önceden de bahsedildiği gibi, çeşitli bakteri ekso ve endo toksinleri üzerinde yaptıkları araştırmalarda demirin ve diğer bazı maddelerin invitro olarak bu çeşitli toksinlerin çeşitli tesirlerine karşı, bu tesirlerin bazılarını tamamen bağzılarını da kısmen giderici olarak bir etkiye sahip olduklarını meydana çıkarmışlardır. Yaptıkları denemelerde, tavşanlara bir demir birleşimi olan proferrin'in önceden verilmesiyle E. Coli endotoksinine karşı resistansın yükseldiğini müşahade etmişlerdir. Araştırmacılar, proferrin verilen bir seri deneme hayvanlarında endotoksinin hem generalize hem de lokal Schwarzman reaksiyonunun kaybolduğunu tesbit etmişlerdir (5). Bu sonuçlar da bizim elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Demir'in çeşitli ekso ve endotoksinleri detoksifiye etme etkisi üzerinde ve bilhassa hemorrajik şok esnasında eksik, abortiv demir metabolizması üzerinde daha bir çok çalışmaların yapılması lâzım geldiğine inanıyoruz. Bununla beraber Tetanus ve Arthrax aşılıları hazırlanırken bilhassa ileride toksinlerin antijen özellikleri üzerinde yapılacak çalışmalar da eklenmek suretiyle bu çalışmamızın bir yardımcı olabileceği inancına varmaktayız.

### Ö z e t

1 — Tetanus toksini ile Anthrax basilinin toksin solusyonları özel metodlarla hazırlandıktan sonra iki gruba ayrıldı.

2 — Birinci gruptaki toksinlere demir ilâve edilip ikinci grup toksinlere ilâve edilmedi. Her iki grup toksin solusyonları 37° C. de çalkalanarak 8 saat bırakıldı.

3 — Anthrax toksini demir ile inkube edildikten sonra, köpeklerde letal tesirine ilâve olarak lokal ve generalize reaksiyonlar ve toksin tesiriyle husule gelen beden ısısı gibi biyolojik özellikleri de incelendi.

4 — Aynı şekilde tetanus toksinini de demir ile inkubasyonundan sonra kobaylarda letalite üzerinde denemeler yapıldı.

5 — Gerek Anthrax gerekse tetanus toksinlerinin demir ile inkubasyonlarından sonra deneme hayvanları için letalite tesirlerinin ortadan kalktığı görüldü.

6 — Anthrax toksini demir ile inkube edildikten sonra deneme hayvanlarında husule gelen lokal ve genaralize reaksiyonların da kaybolduğu müşahade edilmiştir.

7 — Elde edilen sonuçlara göre, demir ile Anthrax toksinini inkube etmenin toksinin beden ısısını yükseltici tesirini inhibe etmemiştir.

### S u m m a r y

#### Studies on The Inactivation of Bacterial Exotoxins and Endotoxins By Iron

1. After preparation with specific methods of toxin solutions of Tetanus and Anthrax Bacillus, these toxin solutions have been separated in two groups.

2. The iron has been added in first group: It has been not added in second group. Both two groups toxin solutions have been incubated on 37 and shaken for 8 hours.

3 — After incubation with iron; the Anthrax toxin solution, its biological specificities such as lethal action, local and generalized reactions and pyrogenic properties in dogs have been studied.

4. It has been carried out also some experiments in guinea pigs concerning lethal action of Tetanus toxin solution after incubation with iron.

5. It has been found out that after incubation with iron of whether Anthrax or Tetanus toxin solutions, the lethal effects of these toxins have been counteracted in experimental animals.

6. It has been found out also that local and genaralized reactions of Anthrax toxin solution in experimental animals have been counteracted after incubation with iron.

7. According to results there is no effect on pyrogenic properties of Anthrax toxin solution incubation with iron.

### L i t e r a t ü r

- 1 — Heilmeyer, L., and Plötner, R., (1937): *Das Serumeisen und die Eisenmangelkeit*, Jena, Gustav Fischer.
- 2 — Heilmeyer, L., Keiderling, W., and Stüwe, G., (1941), *Kupfer und Eisen als Körpereigene Wirkstoffe*, Jena, Gustav Fischer.

- 3 — Heilmeyer, L., Keiderling, W. and Wöhler, F.,: (1959), *Iron metabolism in infection and the detoxifying function of storage iron*, Germ. Med. Montly, 4, III.
- 4 — Janoff, A., Zweifach, B.W, Shapiro. L.,: *Levels of plasma bound-iron in experimental shock in the rabbit and dog*, Am. Jour. physiol., in press.
- 5 — Jonnoff, A.,: *Unpublished Observation*.
- 5 — Janoff, A., and Zweifach W., Benjamin.: ( 1960), *Inactivation of Bacterial Exotoxin and Endotoxin By Iron*. Invitro studies. The Jour. of Expr. Med. vol. 112, PP. 23-34, NO. I, July I.
- 7 — Mazur, A., Green , S. and Carleton, A.,: (1960), *Mechanism of iron incorporation into ferritin*, Jour. Biol. Chem., 225, 595.
- 8 — Ranson, S. W, Jr.,: (1938), *Fever induced by the intravenous injection of typhoid-paratyphoid vaccine*, Arch. Int. Med. 61, 282.
- 9 — Schwartzman. G.,: (1937), *The phenomenon of local tissue reactivity*, New York, Paul B. Hoeber, Inc.
- 10 — Schweinburg, F. B., and Fine, J.,: (1955), *Resistance of Bacteria in hemorrhagic shock*. II. Effect of transient vascular collapse on sensitivity to endotoxin, Proc. Soc. Expr. Biol: and Med., 88, 589.