

283811

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ATAKSİ - TELENJEKTAZİ'DE  
LENFOSİTLERDEKİ BAZI ZAR PROTEİNLERİNİN  
VE BİLEŞENLERİNİN İNCELENMESİ**

Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ

NESRİN ÖZER

ANKARA — 1983

64

Çalışma materyalini sağlamada gösterdikleri ilgi ve kolaylıktan dolayı Sayın Prof. Dr. İzzet Berkel ve İmmünoloji Ünitesi ilgililerine, ayrıca autoradyografî işlemi için yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Münici Oran'a teşekkür ederim.

# İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa No.

## BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ	1
---------------	---

## BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER	3
II.1. Ataksi-Telenjektazi	3
II.2. Lenfositler	7
II.3. Zar Yapısı ve Zarsal Enzimler	9
II.3.1. Alkalen Fosfataz	10
II.3.2. 5' Nükleotidaz	12
II.3.3. Adenozin Trifosfataz	13

## BÖLÜM III

ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER	16
III.1. Maddeler	16
III.2. Aletler	16
III.3. Çalışma Materyali	16
III.4. Yöntemler	17
III.4.1. Lenfosit yüzey proteinlerinin incelenmesinde kullanılan yöntemler	17
III.4.1.1. Lenfositlerin total kandan ayrılması	17
III.4.1.2. Lenfosit yüzey proteinlerinin <sup>125</sup> I ile işaretlenmesi ve proteinlerin çözümlenmesi	18
III.4.1.3. Lenfosit proteinlerinin sodyum dodesil sülfatlı poliakrilamid disk jel elektroforezi ile ayrılması	19
III.4.1.4. Autoradyografi	20
III.4.1.5. Protein bantlarının boyanması	20
III.4.1.6. Molekül ağırlığı tayini	20

III.4.2. Lenfositlerde bazı zarsal enzimlerin incelenmesinde kullanılan yöntemler	20
III.4.2.1. Lenfositlerin homojenize edilmesi	20
III.4.2.2. Alkalen fosfataz aktivitesinin ölçümü	21
III.4.2.3. 5' Nükleotidaz aktivitesinin ölçümü	21
III.4.2.4. Total ve $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz aktivitelerinin ölçümü	22
III.4.2.5. $\text{Mg}^{+2}$ ATPaz aktivitesinin ölçümü	23
III.4.3. Lenfosit zarlarındaki bazı yapısal bileşiklerin incelenmesinde kullanılan yöntemler	24
III.4.3.1. Siyalik asit miktarının ölçümü	24
III.4.3.2. Kolesterol miktarının ölçümü	25
III.4.3.3. Protein miktarının ölçümü	25
III.4.4. İmmunolojik yöntemler	26
III.4.5. İstatistik	26

## BÖLÜM IV

BULGULAR	27
IV.1. Kandan elde edilen lenfositlerin saflık ve canlılık testleri	27
IV.2. Autoradyografi bulguları	27
IV.3. Protein boyamasına ait bulgular	36
IV.4. Lenfositlerde bazı zarsal enzimlerin aktiviteleri ve bunlar arasındaki ilişki	38
IV.5. Lenfosit zarındaki bazı yapısal bileşiklerin miktarları	38

## BÖLÜM V

TARTIŞMA ve SONUÇ	41
ÖZET - TÜRKÇE	48
ÖZET - YABANCI DİLDE	49
KAYNAKLAR	50

Ek 1. Çözeltiler

Ek 2. Ek Tablolar

## K I S A L T M A L A R

ADP	:	Adenozin Difosfat
ALPaz	:	Alkalen Fosfataz
AMP	:	Adenozin Monofosfat
A-T	:	Ataksi-Telenjektazi
ATP	:	Adenozin Trifosfat
ATPaz	:	Adenozin Trifosfataz
BPB	:	Brom Phenol Blue
BSA	:	Siğır Serum Albumini
2-ME	:	2-Merkaptoetanol
MA	:	Molekül Ağırlığı
5'N	:	5' Nükleotidaz
Pi	:	İnorganik Fosfat
PPi	:	Pirofosfat
PBS	:	Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
PNPP	:	p-Nitrofenilfosfat
PNP	:	p-Nitrofenol
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	:	Trikloroasetik asit
T <sub>H</sub>	:	Helper-Yardımcı T Lenfosit
T <sub>S</sub>	:	Suppressor-Baskılayıcı T Lenfosit

## BÖLÜM I

### G İ R İ Ő ve A M A Ç

Ataksi-Telenjiektazi (A-T), sinir sisteminin dejenerasyonuna bağlı olarak kasların uyumlu çalışmasında gittikçe artan bir bozukluk (ataksi), göz ve derideki kapiller damarlarda telenjiektaziler, hücrenel ve humoral bağışıklıkta bozukluk, iyonizan ışınlarla aşırı duyarlılık ve daha çok lenforetiküler sistemi tutan malignitelerin gelişmesine meyil gibi farklı belirtiler veren otozomal resessif bir hastalıktır. Hastalarda ayrıca, hormonal bozukluklara da rastlanabilir. Bu klinik bulgular, her hastada ortaya çıkmayabilir. Bu durumda, A-T'de genetik bir heterojenliğin söz konusu olduğu düşünülmektedir. Hastalar genellikle enfeksiyonlar ve özellikle sinus-akciğer enfeksiyonları veya malignite gelişimi ile kaybedilirler (1).

Hastalığı meydana getiren etkenlerin araştırılmasında daha çok DNA sentezi ile DNA onarım mekanizmalarında, doku farklılaşmasında ve bağışıklık sisteminin çalışmasında bozukluklar, kromozom (zellikle kromozom 7 ve 14) translokasyonları üzerinde durulmuştur (2-6). Bunlardan başka hücreleri toksik metabolitlerden koruyan superoksit dismutaz, katalaz enzimlerinin aktivitelerine hasta fibroblastlarında bakılmış, fakat normalden farklı bulunmamıştır (7). Bunların yanında ağır kanama tablosu gösteren bir A-T hastasının trombosit zarlarında birçok reseptör bozuklukları, başka bir grup A-T hastasının lenfositlerinde hücrenel etkileşimin azalmış olduğu görülmüştür (8,9). Bir başka A-T'li hastada ise lenfoid lösemi geliştikten sonra yapılan incelemede T lenfositlerinin % 45'inde immunoglobulin M nin  $F_c$  parçası için bir reseptör saptanmış olmasına rağmen % 10'unda immunoglobulin G'nin  $F_c$  parçası için bir reseptör bulunmuştur (10).

Geniş klinik, genetik, immünolojik ve biyokimyasal çalışmalara rağmen bugüne kadar A-T'de rastlanan bulguların, kesin olarak açıklanması mümkün olmamıştır. Mevcut bazı bulgulara dayanarak hastalığın patogenezi açıklanmada, iki hipotez öne sürülmüştür. Birinci hipoteze göre, A-T hücrelerinde DNA onarım bozukluğu ve kromozom anomalileri vardır. Bunlar, dejeneratif değişikliklere yol açmaktadır. İkinci hipoteze göre, doku farklılaşmasında bir bozukluk vardır. Bu da bağışıklık sistemindeki yetersizliklere neden olmaktadır. Hücre farklılaşması ve hücrelerin malign hale dönüşmesi hakkında bilgi edinebilmek için hücre zarındaki değişikliklerin incelenmesi, konuya bir yaklaşım olabilir (5,11).

A-T hastalarında bağışıklık sisteminin yetersizliğini ve lenfositlerin malign hale dönüşümünü anlayabilmek amacı ile çalışmanın ilk basamağında kontrol ve hasta grubunun lenfosit yüzey proteinleri, autoradyografi yöntemi ile incelenmiştir. İkinci basamakta, yine her iki grupta, lenfosit zarsal enzimlerinden bazılarının aktivitelerine bakılmış, bu arada zarların yapısal bileşeni olan siyalik asit ve kolesterol miktarları da saptanmıştır.

## BÖLÜM II

### G E N E L B İ L G İ L E R

#### II.1. Ataksi-Telenjiektazi :

Ataksi-Telenjiektazi, daha çok santral sinir sistemini ve damar sistemini tutan dejeneratif bozukluklar, iyonizan ışınlarla aşırı duyarlılık, özellikle lenfoproliferatif tipte malignitelere meyil ve bağışıklık sisteminde yetmezlik tabloları ile ortaya çıkan otozomal resessif bir hastalıktır. İlk önce 1926'da Syllaba-Henner ve daha sonra 1941'de Louis-Bar tarafından tanımlanmıştır. Ancak 1958'de Boder-Sedgwick bunun nörolojik hastalıklardan ve özellikle Friedreich ataksiden farklı olduğunu açıklamıştır. A-T üzerinde pek çok çalışma yapılmıştır, ancak hastalığın birçok sistemi ilgilendirmesi nedeni ile patogenezinin açıklanması zorlaşmaktadır. Örneğin A-T'yi immunolog bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklardan biri, dermatolog dermatozlardan biri, sitogenetikçi kromozom anomali sendromlarından biri olarak kabul edebilir. Bu kadar karmaşık bir klinik tabloyu basite indirgeyebilmek için, çeşitli bulgular 4 grupta toplanabilir (1).

#### a. Dejeneratif bozukluklar :

Serebellar ataksi ve okülokutanöz telenjiektaziler hastalığın tanısında önemlidir. Ataksik durum yaşamın ilk yılında bozuk yürüme ile açığa çıkmaktadır. Nörolojik harabiyet hızla artar; nistagmus, reflekslerde azalma ve uyarılmış sinir potansiyelinde düşme görülür, elektromiyografi normal değildir. Nöropatolojik incelemede, serebellar korteksin granular ve Purkinje hücrelerinde harabiyet olduğu, yine bu hastaların elektroensefalografi ve pnömoensefalografisinin normal olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca,



omuriliğin miyelinli liflerinde kayıp ve ganglionlarda dejeneratif değişiklikler saptanmıştır.

Telenjektaziler, 3-6 yaş arasında açığa çıkabilmektedir; Önce konjunktivada daha sonra göz kapakları, yüz, kulak ve çenede simetrik olarak, özellikle güneşe maruz kalan ve derinin sürtünen kısımlarında görülür (1).

b. Doku farklılaşmasındaki bozukluklar :

A-T'de genellikle hücre sel ve humoral bağışıklık bozuktur. Hücre sel bağışıklıktaki yetersizlik deri testlerinin normal olmaması, lenfositlerin mitojenlere karşı cevabında azalma ve lenfositopeni ile anlaşılmaktadır. Bu hastalarda timus gelişmemiştir. Hastaların % 40'ında immunoglobulin A hiç yoktur, % 30'unda ise çok düşük düzeydedir. % 80 hastada immunoglobulin E düzeyinde azalma görülmekte, yine % 80'inde molekül ağırlığı (MA) küçük immunoglobulin M bulunmaktadır. İmmunoglobulin G<sub>2</sub> düzeyi azalmış olan hastalar da vardır. İmmunoglobulin düzeylerindeki bu değişiklikler ve antijenik uyarıdan sonra dolaşımdaki antikor düzeyinin az olması humoral bağışıklıkta bir bozukluk olduğunu göstermektedir. Sık ve tekrarlayan enfeksiyonların ölümlerle sonuçlanması bağışıklık sistemindeki yetersizliğin derecesi ile ilişkilidir (12,13).

A-T hastalarında serum  $\alpha$ -fetoproteini yüksek bulunmuştur (14). Bu protein, fetal karaciğerden kaynaklanıp, fetusta yüksek düzeyde bulunmakta, miktarı doğumdan sonra hızla düşmektedir. Hastalarda görülen bağışıklık sisteminde yetersizlik ve organogenez bozuklukları (örneğin timus) embriyonik hayatta, endoderm ve mezoderm arasında, hatalı bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir. Endodermden epitel, mezodermden lenfoid doku gelişmektedir. Bu ikisi arasındaki bozuk etkileşim timusun olgunlaşmasında yetersizliğe, buna bağlı olarak T<sub>H</sub> (helper-yardımcı) hücresi fonksiyonla-

rında azalmaya neden olmaktadır. Sonuçta B hücreleri olgunlaşmamakta, immunoglobulin A ve E salgılanması azalmaktadır (13,14).

Her iki sekste de bazen gonadlar gelişemez; kadınlarda, over hipoplazisi görülmektedir. Bazı A-T hastalarında, diyabetin insüline rezistans şekli gösterilmiştir (1).

c. Malignite :

A-T'de malignite görülme şansı normallerden 1200 defa daha fazladır. Ençok lenfoproliferatif tipte lenfomalar görülmektedir. Bunların içinde Hodgkin ve Hodgkin olmayan lenfomalar ile lenfatik lösemiler yer alır. Ayrıca sindirim sistemi, santral sinir sistemi ve over tümörleri görülebilir (1,15). A-T genini heterozigot olarak taşıyanlarda da malignite görülme şansı oldukça fazladır (16).

d. İyonizan ışınlarla karşı aşırı duyarlılık :

A-T hastalarına tedavi amacı ile standart radyoterapi uygulandığında, ışınlama yerinde ülseratif dermatit, özofajit ve derin doku nekrozları gibi bulgular sıklıkla görülmektedir (17,18).

A-T'nin patogenezi :

A-T'nin otozomal resessif geçişli olduğu aile incelemeleri ile ortaya konmuştur (19). Hastalığa yakalanma şansı, 24 milyonda birdir. A-T, dünya üzerinde geniş bir şekilde yayılmıştır. Ancak İsrail'de oturan Fas musevilerinde daha sık rastlanmaktadır (1).

A-T'li hastalardan hazırlanan hücre kültürlerinde, DNA hasarı yapan etkenlere karşı aşırı duyarlılık ve hücre ölümü görülmektedir. A-T hücreleri, radyasyon etkisi ile oluşan DNA tek veya çift zincir kırıklarını ona-

rabilmekte, ancak 'baz'larda meydana gelen hasarı düzeltememektedir. Bu durum kanserli A-T hastalarında, radyasyon tedavisinden sonra gelişen, şiddetli dermatit ve derin doku nekrozlarını açıklamaktadır. A-T'de DNA'nın onarılamaması, ayrıca embriyonik gelişme sırasında doku farklılaşmasındaki bozuklukları da izah edebilir (20).

DNA onarım bozukluğu nedeni ile, A-T lenfosit ve fibroblastlarında normallerden daha fazla kromozom kırılmaları ve gelişigüzel birleşmeler olmaktadır (21-24). Kromozom 14 translokasyonunda 14q12 bandı kırılıp, uç kısmı diğer kromozom 14 veya 6,7 ve X kromozomu ile birleşmektedir. A-T hastalarında, bu tip translokasyonlardan oluşan kromozomları içeren lenfositlere rastlanmakta ve bunların miktarı, zamana bağlı olarak hızla artmaktadır. Bu tür lenfositlerde, mitojenlere karşı cevap immunoglobulin sentezi ve salgılanması, belirgin bir şekilde azalmakta, malign hale dönüşme şansı artmaktadır. Örneğin kronik lenfositik lösemili bir A-T hastasında 14/14 translokasyonu taşıyan hücreler bulunmuştur. Kromozom 14 bozukluğu Burkitt lenfoma, Hodgkin ve çeşitli lösemilerde görülmektedir. Bu nedenle, kromozom 14 ile lenfoproliferatif malignite gelişimi arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüştür (3,25,26).

Bu hastalıkta görülen gerek klinik ve gerekse hücresel düzeydeki bulgular, her vakada aynı şiddette açığa çıkmayabilir. Hatta, bir bulgu her hastada görülmeyebilir. Örneğin, bir A-T hastasında telenjiektazi varken, diğer bir hastada olmayabilir veya kromozom translokasyonu olan hücrelerin sayısı, hastalar arasında farklılık gösterebilir. Bu farklılıklar yalnızca hastalar arasında değil, aynı hastanın değişik yaşlarında ve değişik hücrelerinde de görülebilmektedir. Bu klinik ve hücresel heterojenliği genetik faktörler, henüz bilinmeyen bazı dış etkenlere maruz kalma derecesi ve hücre proliferasyonu sırasında baskının kalkması ile açıklamak mümkün olabilir (26,27).

## II.2. Lenfositler (28,29) :

Bütün omurgalıların sahip olduğu bağışıklık sistemi, mikroorganizmalara ve kanser hücrelerinin gelişme ve yayılmasına karşı korunmak için gelişmiş olabilir. Yabancı etkenlere karşı, bağışıklık sisteminin cevabı iki ana bölümde incelenebilir.

a. Hücre sel bağışıklık, yabancı etkene karşı retiküloendotelial sistem hücreleri aracılığı ile olur. Bu etken mantar, parazit, virus, kanser hücresi ve yabancı doku olabilir.

b. Humoral bağışıklık, kandaki antikorlarla olur.

Her iki cevapta da lenfoid hücrelerin özel bir şekli olan lenfositler yer alır.

Lenfositler, 6-8 mikron çapında hücrelerdir. Bunlar, küçük lenfositler olarak adlandırılır. Dolaşımında, daha az miktarlarda orta ve büyük lenfositlere de rastlanmaktadır. Lenfositlerde büyük bir çekirdek vardır. Kromatini belirgin kümeler şeklinde toplanmış olduğundan çekirdek, histolojik preparatlarda koyu görülür. Bu da lenfositlerin tanınmasında yardımcı olmaktadır. Çok az miktardaki sitoplazma çekirdeğin etrafında ince bir halka şeklinde görülmektedir. Sitoplazma içindeki organel sayısı da azdır. Bunlar birkaç ribozom, çok az endoplazma retikulumu, birkaç mitokondri, Golgi ve lizozomdur.

Lenfositler morfolojik olarak birbirlerine benzemelerine rağmen yine de heterojen bir hücre grubudur. Yapı ve işlev bakımından lenfositler başlıca T ve B lenfositleri olarak ikiye ayrılırlar. Her grubun bağışıklıktaki fonksiyonları farklıdır. Bu lenfositlerin her ikisi de, başlangıçta embriyoda kemik iliğinin lenfositik ana hücrelerinden kaynaklanır-

lar. Daha sonra bu ana hücrelerden türeyen hücrelerin bir kısmı, timus bezine gider ve orada farklılaşırlar. Farklılaşma, timustan sonra da devam etmekte ve bu işlemden timus salgılarının rolü olduğu sanılmaktadır. Bunlar, T (timus-bağımlı) lenfositleri olarak adlandırılırlar. Diğer hücreler ise kuşlarda 'bursa of fabricius' ta olgunlaşırlar. İnsanda bu işlemin nerede olduğu kesin bilinmemekle beraber, karaciğer veya dalakta olabileceği belirtilmiştir. Bu grup lenfositler de B (bursa-bağımlı) lenfositleri olarak adlandırılır.

Timus etkisi ile olgunlaşan, lenf düğümlerinde parakortikal bölgede, dalakta sentral arteri saran lenfoid kılıfta yerleşen T lenfositleri, hücre sel bağışıklıktan sorumludur. Kan dolaşımındaki lenfositlerin % 70-75'i T lenfositidir. Fare T lenfositlerinin yüzey zarında theta ( $\theta$ ), timus lösemi (TL) ve Lyt (lenfosit alloantijeni) antijenleri saptanmıştır. İnsan T lenfositleri, koyun eritrositleri ile rozet oluştururlar. Bu hücreler phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A, pokeweed mitojen (PWM) gibi bitki proteinleriyle uyarılıp, blast şekillerine dönüşmektedir. T lenfositleri homojen bir grup olmayıp görevlerine göre farklı alt gruplara ayrılmaktadır. Bunlardan biri  $T_H$  (helper-yardımcı) lenfositleri olup, B lenfositlerinin antikor yapımına (özellikle immunoglobulin A, E, G) yardım eden hücrelerdir; yüzeysel Lyt  $I^+$  antijeni taşırlar. Diğerleri  $T_S$  (suppressor-baskılayıcı) lenfositleridir. Bunlar bağışıklık cevabının baskılanmasında rol almaktadırlar; yüzey zarlarında Lyt 2,3 $^+$  antijeni taşırlar.

Kuşlarda 'bursa of fabricius', memelide ise eşdeğeri olan organlarda olgunlaşarak, lenf düğümlerinde germinal merkezde yerleşen B lenfositleri, humoral bağışıklıktan sorumludur; kan dolaşımındaki lenfositlerin % 25-30'unu oluştururlar. B lenfositleri, yüzeylerinde taşıdıkları immunoglobulin reseptörleri ile kolayca tanınabilirler. Ayrıca yüzeylerin-

de komplemanın  $C_{3b}$  parçasına ve immunoglobulin G'nin  $F_c$  kısmına karşı reseptörler vardır. B lenfosit yüzeyinde T'lerde bulunan theta, Lyt 1,2,3 antijenleri yoktur. Koyun eritrositleri ile rozet oluşturmazlar. E. coli polisakkaridi ve PWM ile uyarılabilirler. Uyarı sonucu B lenfositleri blast şekillerine, bunlar da antikor sentez eden plazma hücrelerine dönüşür. B lenfositlerinden bazılarının, belleme-hatırlama fonksiyonu vardır. Bu lenfositler antijenle karşılaşmış ancak, plazma hücrelerine dönüşmemiştir. Aynı antijenle tekrar karşılaştıklarında, hızla mitozu uğrar, plazma hücrelerine dönüşür ve antijene karşı antikor oluştururlar. Bu nedenle bir antijen ikinci defa verildiğinde, antikor oluşumu birinciye göre daha hızlı ve yüksek miktarda olmaktadır.

Tarama mikroskopisi ile çekilen fotoğraflarda, B lenfositlerinin yüzeyinde birçok uzantının olduğu gösterilmiştir. T lenfositlerinin yüzeyinde ise bu uzantıların olmadığı veya kısa ve az olduğu belirtilmiştir.

T veya B lenfositleri özellikleri taşımayan lenfositlere 'null' lenfositleri denir. İnsanda kan dolaşımında % 5-10 oranında bulunmaktadırlar.

### II.3. Zar Yapısı ve Zarsal Enzimler :

#### Zar Yapısı (30) :

Hücre, zar sistemi ile çekirdek, mitokondri, endoplazma retikulumu gibi birbirinden farklı kısımlara bölünmektedir. Hücre içi, dış ortandan hücre zarı ile ayrılmaktadır. Bu zar, hücre içi ve dışı arasında madde taşınmasında ve dış ortandan gelen uyarıları alıp cevap vermede önemli bir rol oynamaktadır. Zarlar, esas olarak protein ve lipidlerin kovalen olmayan etkileşiminden meydana gelmektedir. Singer ve Nicholson zarların yapısı için sıvı mozaik modelini önermişlerdir. Bu modele göre zarlar esas

olarak fizyolojik sıcaklıkta sıvı halde bulunan asimetrik fosfolipit çift tabakasından oluşmaktadır. Proteinler, bu tabakanın devamlılığını bozup ona mozaik görünümü vermektedirler. Zar yapısında bulunan lipitler özellikle fosfolipit, glikolipit ve kolesteroldür. Fosfolipit olarak fosfatidil kolin, fosfatidil serin ve fosfatidil etanolamin gibi fosfogliseritler ve sfingomyelin bulunmaktadır. Lipitlerdeki yağ asitleri 14 ile 24 karbon atom uzunluğunda olup doymuş veya doymamış halde bulunabilirler. Glikolipitler sfingozinden türeyen ve şeker taşıyan lipitlerdir. Bu şeker birimleri, zarın dış yüzüne dönük olarak bulunmaktadır.

Zar dinamik bir yapı olduğundan protein ve lipitleri hareket halinde dir. Zarın akışkanlığı, doymamış yağ asitlerinin zincir uzunluğu ve miktarına bağlıdır. Ayrıca kolesterol de zar akışkanlığını etkilemektedir.

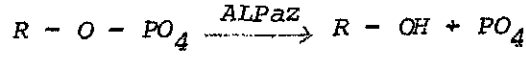
#### Zarsal Enzimler :

Zar yapısında bulunan proteinler reseptör, transport gibi görevleri yanısıra özellikle enzim olarak rol almaktadır. A-T hastalarının lenfosit zar yapısını incelemek amacı ile yapılan bu çalışmada yalnız aktivite lerine bakılan zarsal enzimlere ilişkin bazı bilgilerin sunulması düşünülmüştür.

#### II.3.1. Alkalen Fosfataz :

Alkalen fosfataz (ALPaz) (ortofosforik monoester hidrolaz, EC.3.1.3.1) salgı ve emilim yapan yüzeylerde bulunan, özgül olmayan bir fosfatazdır. Enzimin zarlarda veya sitoplazmada fosfazom adı verilen özel granüller içinde bulunduğu bildirilmiştir (31,32). Hücre zarında, Golgi cisimciğinde, lizozomlarda ve endoplazma retikulumunda enzim aktivitesi gösterilmiştir (33,36). ALPaz aktivitesi çekirdekte (37) ve özellikle çekirdek zarında da saptanmıştır (38).

ALPaz, alkali ortamda monofosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. Tepkime kısaca aşağıdaki şekilde gösterilebilir :



Bu enzimin, hücredeki fosfor metabolizması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Karaciğer, beyin gibi bazı dokularda piridoksinin fosforilasyonunu da düzenlediği belirtilmiştir (32,39).

Herbiri ayrı gen tarafından kodlanan üç farklı ALPaz vardır (40) :

- a. Karaciğer, kemik, böbrek ALPaz'ı
- b. Barsak ALPaz'ı
- c. Plasenta ALPaz'ı

Bulgular ALPaz'ın kinetik davranışının dokudan dokuya değiştiğini göstermektedir. Plasantaya ait ALPaz'ın en uygun substratları  $\beta$ -gliserofosfat ve fenilfosfattır. Buna karşın, barsağa ait enzim, adenozin monofosfat (AMP) ve pirofosfat (PP<sub>i</sub>)'ı hidroliz etmekte ve  $\beta$ -gliserofosfat ile çok düşük aktivite göstermektedir. Enzimin, homoarginin veya fenilalanin ile inhibisyonu, ısıya duyarlılığı ve pH bağımlılığı da dokuya göre değişmektedir (41).

İnsan karsinoma hücre kültürleri ile yapılan deneylerde ALPaz düzeyinin hücre motilitesi ile ilgili olduğu görülmüştür (42,43). ALPaz aktivitesinin, DNA sentezini inhibe ettiğine de değinilmiştir (44).

ALPaz aktivitesinin akut lenfositik lösemide değişmediği halde, bazı kronik lenfositik lösemilerde yükseldiği bulunmuştur (45). Bir grup araştırmacı da ALPaz'ın mitojenle aktive edilen B hücrelerinde de belirgin şekilde yüksek olduğunu göstermişlerdir (11).

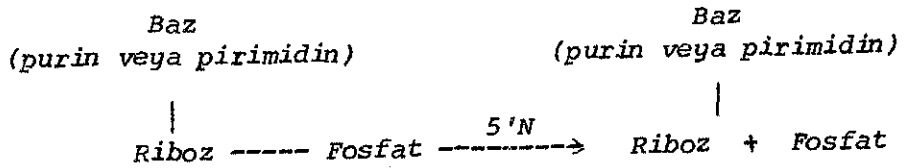


### II.3.2. 5'Nükleotidaz :

5'Nükleotidaz (5'N) (EC.3.1.3.5) memeli hücrelerinin çoğunda hücre zarında bulunan bir enzimdir. Enzim aktivitesinin hücre zarının dış yüzünde bulunması nedeniyle zarın tanınmasında kullanılabileceği belirtilmiştir (46,47). Endoplazma retikulumu, Golgi zarı ve mitokondri dış zarında, çekirdekte, lizozomlarda enzim aktivitesine rastlanmıştır (48-50). B hücrelerindeki 5'N aktivitesi T hücrelerine göre üç misli kadar fazla bulunmaktadır (47,51,52). Bu enzim T hücrelerinin alt grupları arasında bile farklı aktivite göstermektedir (53).

5'N 'ın bir lipoprotein (54) veya glikoprotein (55) olduğu söylenmektedir. Enzimin aktivitesinin lipitlere bağımlı olduğu saptanmıştır (54, 56). Lipitlerin, katalitik aktivite için gerekli özel konformasyonunu koruyarak etkili olabileceği düşünülmektedir. Dalak ve timustan elde edilen lenfositlerin 5'N aktivitelerinin, birbirinden farklı olduğu bulunmuştur. Bu durum, lipit ve karbohidrat içeriğindeki değişkenlikten ve lipitlerin dağılımındaki farklılıktan ileri gelebilir (46).

5'N, nükleozit 5'-monofosfatlardan fosfatın ayrılmasını katalizleyen bir enzimdir. Tepkime aşağıda kısaca gösterilmiştir :



Hücre zarları yalnız nükleozit ve 'baz'lara karşı geçirgendir. Bu nedenle, 5'N 'ın görevi nükleozit fosfatları parçalayarak, nükleotitlerin hücre içine taşınmasını sağlamak olabilir (57,58). Ayrıca, 5'N 'ın hücre farklılaşması ve olgunlaşmasında rolü olduğu belirtilmiştir (59).

İnsan karaciğer, aorta ve plasentasında bulunan 5'N enzimi, çinko ve nikel ile inhibe olurken lenfosit enzimi bu elementler ile aktive olmaktadır (60). Eritrosit 5'N 'ının iki izoenzimi olduğu bildirilmiştir (61).

Purin nükleotitlerinin parçalanması, bağışıklık sisteminin düzenli çalışmasında önemli rol oynamaktadır. Bağışıklık sistemi yetmezliğinde adenozin deaminaz, purin nükleozid fosforilaz eksikliklerine, T hücrelerinin fonksiyon bozukluklarına rastlanmıştır (62,63). 5'N aktivitesi de hipogamaglobulinemi, konjenital agramaglobulinemi ve primer immunoglobulin yetersizliği olan hastalarda düşük bulunmaktadır (52,64-66). Bazı akut ve kronik lösemilerde, 5'N aktivitesi düşük bulunmuştur. Bu aktivitedeki düşmenin enzim proteininin sentezinin azlığından mı, yoksa enzim molekülünün yapısındaki bozukluktan mı ileri geldiği kesin olarak açıklanamamıştır (67-69). Kronik miyeloid lösemide görülen blast krizinde 5'N artmaktadır; bunun hastalığın tanısında yardımcı olabileceğine değinilmiştir (70).

### II.3.3. Adenozin Trifosfataz :

Adenozin trifosfataz (ATPaz) (EC.3.6.1.3) zara yerleşmiş ve genellikle iyonların taşınmasında rolü olan bir grup enzimdir. Bu enzimlerin ortak özellikleri adenozin trifosfat (ATP)'ı adenozin difosfat (ADP) ve inorganik fosfata (Pi) parçalayarak açığa çıkan enerji ile, iyonların zardan taşınmalarını sağlamaktır. Bu enzimler, vektoryal enzimlerdir çünkü iyonları, derişimlerinin yüksek olduğu yöne doğru taşımaktadırlar. Bu ATPaz'lar arasında en iyi bilinenleri,  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  ile aktive olan  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz,  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  ile aktive olan  $\text{Ca}^{+2} - \text{Mg}^{+2}$  ATPaz, yalnızca  $\text{Ca}^{+2}$  veya  $\text{Mg}^{+2}$  ile aktive olan  $\text{Ca}^{+2}$  veya  $\text{Mg}^{+2}$  ATPaz'dır. Ayrıca bikarbonat ve klorür taşınmasında rol alan ATPaz, mide mukozasından hidrojen iyonunun salgılanmasında önemli rol oynayan ve  $\text{K}^+$  ile aktive olan  $\text{K}^+ - \text{H}^+$  ATPaz da vardır. Bunlardan başka iyon taşınımından

çok enerji metabolizması ile ilgili ATPaz'lar da vardır (71).

Farklı ATPaz'lar farklı organellerin zarlarında yerleşmiştir. Oubain ile inhibe olan  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz hücre zarında ve mikrozomlarda bulunmaktadır.  $\text{Ca}^{+2} - \text{Mg}^{+2}$  ATPaz aktivitesi daha çok hücre zarı ve sarkoplazma retikulumunda görülmüştür.  $\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz aktivitesi hücre zarları, mitokondri ve mikrozomlarda saptanmıştır. Oligomisin ile inhibe olan ATPaz mitokondride bulunmaktadır. Lizozomlar da az miktarda ATPaz aktivitesi göstermektedir (72-76).

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz aktivitesi daha çok uyarılabilen ve salgı yapan hücrelerde bulunur; özellikle hücre zarına yerleşmiştir. Bunun için enzim, hücre zarının tanınmasında kullanılmaktadır. Memeli hücrelerinde hücre içi  $\text{K}^+$  iyonu derişimi,  $\text{Na}^+$  'a oranla daha fazladır. Hücre dışında ise  $\text{Na}^+$  iyonu derişimi  $\text{K}^+$  'a oranla daha yüksektir. Bu iyon derişimi farkı  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz ile korunmakta ve gereken enerji ATP'ın hidrolizinden sağlanmaktadır.  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  iyonlarının hücre zarının iki tarafında böyle farklı dağılım göstermesi hücre hacmini, sinir ve kas hücrelerinin elektriksel uyarılabilirliğini kontrol etmekte, şeker ve amino asitlerin etkin taşınmasını sağlamaktadır. Bu enzim 270.000 MA'da bir tetrameridir. Büyük  $\alpha$  alt biriminde (MA 95.000) ATP ve kardiyotonik steroid inhibitörünün (Oubain) bağlanması için ayrı yerler bulunmaktadır. Zarın sitoplazmaya bakan iç yüzeyinde ATP hidroliz edilmektedir. Halbuki oubainin bağlanma yeri zarın dış ortama bakan kısmındadır. Buradan  $\alpha$  alt biriminin zarın iç ve dış yüzeyleri arasında boyluboyunca uzandığı anlaşılmaktadır. Küçük  $\beta$  alt birimi (MA 40.000) bir glikoproteindir. Buna bağlı karbohidrat grupları, diğer zar glikoproteinleri gibi, hücre zarının dış yüzeyinde bulunmaktadır.  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  bağlanma yerleri bu alt birim üzerindedir.  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz'ın çalışması sonunda  $3\text{Na}^+$  ile  $2\text{K}^+$  yer değiştirmektedir (71). Bu enzimin lenfositlerde blastik transformasyonda ve bağışıklık cevabında rolü olduğu belirtilmiştir (77).

$Mg^{+2}$  ATPaz'ın da, hücre zarının dış yüzeyinde bulunduğuna dair bulgular vardır. Ancak enzimin hücre zarındaki görevi tam olarak bilinmemektedir; hücre içi  $Mg^{+2}$  derişiminin düzenlenmesinden sorumlu olabilir (31,78). Ayrıca kültürlerde hücrelerin birbirlerine değmesi sırasında hücre zarındaki  $Mg^{+2}$  ATPaz aktivitesinin değıştiğı gözlenmiştir (74).

Zar ATPaz'larının aktivite ve dağılımındaki değışme daha çok zardaki genel değışiklikleri düşündürmektedir. Çeşitli malign durumlarda dolaşımdaki lenfositlerin ATPaz aktivitesi geniş bir şekilde incelenmiştir. Akciğer, sindirim sistemi ve meme kanserlerinde, Hodgkin hastalığında lenfositlerdeki ATPaz aktivitesinin normalerden yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalarda lenfositlerdeki tümör antijenlerini tanıma yerlerinin değıştiğı ve bu değışiklik sonucu ATPaz aktivitesinin arttığı söylenmektedir (79-82).

### BÖLÜM III

#### ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER

##### III.1. Maddeler :

Ficoll 400 Pharmacia Fine Chemical İsveç'ten, Isopaque Winthrop ABD'den, I<sup>125</sup> Amersham İngiltere'den, X-omat film Kodak'tan, p-nitrofenil-fosfat Serva B.Almanya'dan, Oubain Aldrich ABD'den, laktoperoksidaz, 5'AMP ve ATP Sigma Chem. Co. ABD'den sağlandı.

Deneyleerde adı geçen diğer maddeler amaca uygun saflıktadır.

##### III.2. Aletler :

Deneyleerde Dubnoff metabolik çalkalayıcı, Beckman Model 25 spektrofotometre, Coleman Junior III kolorimetre ve Vitatron dansitometre kullanılmıştır.

##### III.3. Çalışma Materyali :

A. Hasta Grubu : Bu grup Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İmmünoloji Ünitesine başvurup, klinik bulgular ile ataksi-telenjiektazi tanısı konmuş hastalardan oluşmuştur. Autoradyografi 7 hastaya uygulanmıştır. Ayrıca 10 hastada da lenfosit zarsal enzimleri çalışılmıştır. Bu gruptaki hastaların yaşları 5-14 arasında değişmektedir.

B. Kontrol Grubu : Bu grubu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerine ufak cerrahi müdahaleler için yatırılmış olan hastalar ve

gönüllü personel oluşturmaktadır. Kontrol grubunu oluşturan kişilerin seçiminde sistemik ve özellikle bağışıklık sistemi ile ilgili bir hastalığın olmamasına özen gösterilmiştir. Bu grup, 18-35 yaşları arasında 10 kişiden oluşmaktadır.

Hasta ve kontrol grubundan alınan kandan lenfositler ayrılıp, hemen ilgili çalışmalara geçilmiştir. Her hasta yanı sıra bir kontrolün de çalışılmasına özellikle dikkat edilmiştir.

#### III.4. Yöntemler :

##### III.4.1. Lenfosit yüzey proteinlerinin incelenmesinde kullanılan yöntemler

##### III.4.1.1. Lenfositlerin total kandan ayrılması :

Lenfositler diğer kan hücrelerinden Ficoll Isopaque'da yoğunluk farklarına dayanarak ayrılırlar. Bunun için hasta ve kontrollerden heparinlenmiş enjektörle alınan 20 ml kan, 10 ml fosfat tamponlu serum fizyolojik (phosphate buffered saline-PBS-bkz. Ek 1.1.) ile karıştırılır. Total hacim 4 eşit parçaya bölünür; her biri 3 ml Ficoll Isopaque karışımı (bkz. Ek 1.2) üzerine tabaka oluşturacak şekilde konur ve 4°C'ta 500 xg 'de 30 dakika santrifüj edilir. Bundan sonra tüm işlemler 4°C'ta yapılır. Santrifüjden sonra üç farklı tabaka gözlenir. Lenfositler, üstteki plazma tabakası ile ortadaki Ficoll Isopaque tabakası arasında keskin bir band oluşturur. Bu band, plazma tabakasının atılmasından sonra, pastör pipeti ile ayrı bir tübe aktarılır. Lenfositlerle karışmış olabilecek eritrositleri uzaklaştırmak için, lenfositleri içeren tübe 10 ml % 0.87 NH<sub>4</sub>Cl eklenir. 10 dakika sonra 250 xg 'de santrifüj edilir. Çöken lenfositler iki kere 10 ml PBS ile yıkanır ve en sonunda 1 ml PBS içinde süspansiyon haline getirilir (83,84).

Kandan ayrılan bu lenfositlerin canlılık testi, Tripan Blue ile yapılır. Bu amaçla, lam üzerinde eşit hacimde lenfosit süspansiyonu ile Tripan Blue (bkz. Ek 1.3) karıştırıldıktan sonra, 3 dakika içinde mikroskopta hücreler sayılır ve boya almamış hücreler % olarak ifade edilir.

Bu lenfositlerin içinde granülosit, monosit, eozinofil ve nötrofil gibi başka kan hücreleri de bulunabilir. Miyeloperoksidaz boyamasında pozitif görülen bu bulaşık hücreler, sayılır ve miktarları % olarak belirtilir. Miyeloperoksidaz boyaması için lenfosit süspansiyonu lam üzerine konur. Kuruduktan sonra alkol-formalde (bkz. Ek 1.4.A) 1 dakika bekletilir, 10-15 saniye musluk suyunda yıkanır. Daha sonra lam, inkübasyon karışımı (bkz. Ek 1.4.B) içinde 30 saniye süre ile oda sıcaklığında tutulur; 15-20 saniye musluk suyunda yıkanır ve mikroskopta incelenir (85).

#### III.4.1.2. Lenfosit yüzey proteinlerinin $I^{125}$ ile işaretlenmesi ve proteinlerin çözümlenmesi (86) :

Lenfosit yüzey proteinlerindeki tirozin amino asitleri  $H_2O_2$  ve laktoperoksidaz varlığında  $I^{125}$  ile işaretlenir. Bunun için önce, III.4.1.1. de elde edilen lenfosit süspansiyonundaki hücreler Thoma kamerası kullanılarak sayılır ve  $2 \times 10^7$  lenfosit/ml olacak şekilde PBS ile sulandırılır. Bu süspansiyondan 1 ml alınıp santrifüj edilir, üst kısım atılır ve çökmüş  $2 \times 10^7$  hücre üzerine nihai olarak 10 mM sodyum potasyum fosfat tamponu (pH= 7.4), 0.15 M NaCl, 50 µg laktoperoksidaz, 0.5 M KI, 0.5 mCi  $I^{125}$  içeren 1 ml inkübasyon karışımı konur. Tepkime 25 µl 10 mM  $H_2O_2$  eklenmesi ile başlatılır. 5 dakika ara ile iki kere daha 25 µl 10 mM  $H_2O_2$  eklenir. Inkübasyon  $30^{\circ}C$ 'ta çalkalayıcı su banyosunda yapılır ve bu arada pH'nın 7.2-7.4 arasında kalmasına dikkat edilir (gerekirse 0.001 M NaOH eklenir). Tepkime son  $H_2O_2$  eklenmesinden 5 dakika sonra 17.5 ml soğuk PBS ilavesi ile durdurulur. Hücreler dört kere PBS ile yıkanır. Kör olarak laktoperok-

sidaz ve  $H_2O_2$  konmayan inkübasyon ortamları hazırlanır ve numunelerdeki gibi aynı işlemler uygulanır.

Yıkanmış lenfositler, 0.125 ml 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH=7.4) içinde süspansiyon haline getirilir. Tripa Blue ile tekrar canlılık kontrolü yapılır. 0.125 ml % 1 (v/v) Nonidet P-40 ile 10 dakika oda sıcaklığında çalkalanır. 4°C'ta 1300 xg'de 30 dakika santrifüjden sonra süpernatant elektroferez için ayrılır.

#### III.4.1.3. Lenfosit proteinlerinin sodyum dodesil sülfatlı poliakrilamid disk jel elektroferezi ile ayrılması (87) :

Proteinler yapılarındaki nicel ve nitel farklılıklar nedeniyle elektriksel bir alanda farklı hızlarda hareket ederek fraksiyonlara ayrılabilme özelliğindedir. Bölüm III.4.1.2'de % 1 Nonidet P-40 ile çözünürleştirilen lenfosit yüzey proteinlerinin elektroferezi için :

##### a. Numunenin hazırlanması :

III.4.1.2'de elde edilen süpernatanın 1 kısmı üzerine, 9 kısım 10 mM sodyum fosfat (pH=7.0) içinde % 1 (v/w) sodyum dodesil sülfat (SDS) ve % 1 (v/v) 2-merkaptoetanol (2-ME) bulunan çözelti eklenir. 2 dakika süre ile 100°C'ta inkübe edilir. Bunun 80 µg protein içeren miktarı (0.3-0.4 ml kadarı), 20 µl % 0.04 Brom Phenol Blue (BFB), 4 damla gliserol ve 20 µl 2-ME ile karıştırılır.

##### b. Elektroferez işlemi :

Her numunenin disk elektroferezi için 2 tane SDS'li % 7.5 poliakrilamid jelleri hazırlanır (bkz. Ek 1.5). Autoradyografide kullanılacak birinci jelin üzerine 60 µg, protein boyaması yapılacak ikinci jelin üzerine 20 µg protein içeren ve (a) kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmış



olan numune uygulanır. Elektroforez 0.1 M sodyum fosfat (pH=7.2) içinde % 0.1 g SDS içeren tampon ile yapılır ve 8 mA/gel uygulanır. BPB jelin ucuna yaklaşıncaya elektroforeze son verilir.

#### III.4.1.4. Autoradyografi :

Elektroforezden sonra 60 µg protein uygulanmış olan jel bir karton üzerine yerleştirilir, selofan kağıt ile örtülür. Bunlar üzerine Kodak X-Omat film ve silindirik jeli hafifçe yassıltacak kadar bir ağırlık konur. 10 gün karanlıkta bekletildikten sonra film, röntgen filmi gibi banyo edilir (88,89).

#### III.4.1.5. Protein bantlarının boyanması :

Elektroforezden sonra 20 µg protein uygulanmış olan jeller boyama çözeltisi (bkz. Ek 1.6) içinde 1 saat tutulur. Bir kere distile su ile çalkalandıktan sonra fazla boyanın atılması için yıkama çözeltisi (bkz. Ek 1.7) ile bolca yıkanır ve jeller % 7.5 asetik asit içinde saklanır. Boyanan protein bantları dansitometrede değerlendirilir (87).

#### III.4.1.6. Molekül ağırlığı tayini :

Standart olarak MA 68.000 olan sığır serum albumini (BSA), MA 58.000 olan katalaz ve MA 36.000 olan laktik dehidrogenaz kullanıldı. Absise elektroforezde bantların orijinden uzaklığı (cm olarak), ordinata MA konmak sureti ile semilogaritmik kağıt üzerinde standart eğri çizilir (87).

### III.4.2. Lenfositlerde bazı zarsal enzimlerin incelenmesinde kullanılan yöntemler

#### III.4.2.1. Lenfositlerin homojenize edilmesi :

Bölüm III.4.1.1'de belirtilen şekilde elde edilen 1 ml PBS içindeki lenfosit süspansiyonu, santrifüj edilir. Supernatan atıldıktan sonra

çöken hücreler 1 ml 0.25 M sukroz/30 mM Tris HCl (pH=7.4) içinde süspansiyon haline getirilir. 4°C'ta 10 dakika cam-teflon homojenizatörü ile homojenize edilir (80).

#### III.4.2.2. Alkalen fosfataz aktivitesinin ölçümü :

Yöntemin esası alkali ortamda ALPaz'ın p-nitrofenilfosfat (PNPP)'ı p-nitrofenol (PNP) ve fosfat'a parçalaması, açığa çıkan PNP'ün ölçülmesine dayanır.

ALPaz aktivitesini ölçmede, inkübasyon karışımı nihai olarak 50 mM Tris HCl (pH=9.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, % 1 Triton X-100, 2 mM KF, 1 mM PNPP içerir. Son hacim 1 ml'dir. Tepkime III.4.2.1'de elde edilen lenfosit homojenatı ilavesi ile başlatılır. Çalışma koşullarında 1 ml inkübasyon ortamına konması gereken en uygun protein konsantrasyonunun 0.48 mg ve inkübasyon süresinin 10 dakika olduğu saptandı. Inkübasyon 37°C'ta yapılır. 0. ve 10. dakikada alınan 0.4 ml inkübasyon karışımına 1 ml 0.1 M NaOH ilavesi ile tepkime durdurulur. Açığa çıkan PNP 400 nm'de ölçülür. PNP'ün molar ekstinksiyon katsayısı  $1.8 \times 10^4$  dür. Buradan aktivite nmol PNP/dakika/mg protein olarak hesaplanır (45,90).

#### III.4.2.3. 5'Nükleotidaz aktivitesinin ölçümü :

Yöntem,enzimin 5' AMP'yi parçalayarak açığa çıkan Pi'in ölçülmesine dayanır.

5'N aktivitesini ölçmede inkübasyon karışımı nihai olarak 5 mM 5' AMP (pH=7.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris HCl (pH=7.4), 100 mM KCl, 2 mM KF, % 0.1 Triton X-100 içerir. Son hacim 1 ml dir. Tepkime III.4.2.1'de elde edilen lenfosit homojenatının ilavesi ile başlatılır. Koşullarımızda 1 ml inkübasyon ortamına 0.3 mg protein konmasının uygun olduğu saptandı.

Karışımlar  $37^{\circ}\text{C}$ 'ta 30 dakika inkübe edilir. 0. ve 30. dakikada alınan 0.4 ml inkübasyon karışımına 0.2 ml soğuk % 25 trikloroasetik asit (TCA) ilavesi ile tepkime durdurulur. TCA'li tüpler 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir. Supernatanda aşağıda anlatıldığı gibi  $P_i$  miktarı ölçülür. Buradan aktivite  $\text{nmol } P_i / 30 \text{ dakika} / \text{mg protein}$  olarak hesaplanır (91,92).

*Inorganik fosfat miktarının ölçümü :*

Yöntem  $P_i$ 'in amonyum molibdat ile fosfomolibdat kompleksi oluşturmaya ve bunun da askorbik asit ile indirgenmesine dayanır.

0.05 ml supernatana 0.25 ml su ilavesiyle 0.30 ml ye getirilen numune üzerine 0.7 ml renk reaktifi (bkz. Ek 1.8) eklenir. Karışımlar  $37^{\circ}\text{C}$  ta 1 saat inkübe edildikten sonra 820 nm'de köre karşı okunur. Kör tüpünün hazırlanması için 0.3 ml su üzerine 0.7 ml renk reaktifi eklenir. Standartlar ise ayrı tüplere 0.05 ml ve 0.1 ml 0.4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pipetlenmesi, herbirinin hacminin 0.3 ml ye tamamlanması ve bunların üzerine 0.7 ml renk reaktifi ilave edilmesiyle hazırlanır. Kör ve standartlar numuneler gibi  $37^{\circ}\text{C}$ 'ta 1 saat inkübe edilir (93).

0.02  $\mu\text{mol}$  ile 0.4  $\mu\text{mol}$   $P_i$  konsantrasyonları arasında standart eğrinin lineer olduğu görülmüştür.

III.4.2.4. Total ve  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz aktivitelerinin ölçümü :

ATPaz enzimi uygun şartlarda ATP'yi, ADP ve  $P_i$  'a parçalar. Enzimin aktivitesi açığa çıkan  $P_i$  üzerinden belirtilir. Oubain,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz aktivitesini inhibe eder.

Total ATPaz aktivitesinin ölçüldüğü inkübasyon ortamı nihai olarak 3 mM ATP (pH=7.0), 100 mM NaCl, 15 mM KCl, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30 mM Tris HCl (pH=7.4) içerir.  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz aktivitesinin ölçüldüğü inkübasyon ortamına,

yukarıdakilere ek olarak, nihai 1 mM oubain konur. Her iki karışımın son hacmi 1 ml dir. Tepkime III.4.2.1'de elde edilen lenfosit homojenatı ilavesi ile başlatılır. İnkübasyon ortamınının 1 ml sine 0.3 mg protein konmasının uygun olduğu çalışma koşullarımızda saptandı. Karışımlar 37°C'ta 30 dakika inkübe edilir. 0. ve 30. dakikada alınan 0.4 ml inkübasyon karışımına 0.2 ml soğuk % 25 TCA ilavesi ile tepkime durdurulur. TCA'lı tüpler 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir. Süpernatanda III.4.2.3'de belirtilen şekilde Pi miktarı ölçülür. Buradan aktivite  $\mu\text{mol Pi} / 30 \text{ dakika} / \text{mg protein}$  olarak ifade edilir. Total ATPaz aktivitesinden oubainle inhibe edilmeyen ATPaz aktivitesi çıkarılarak  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz aktivitesi hesaplanır (79).

#### III.4.2.5. $\text{Mg}^{+2}$ ATPaz aktivitesinin ölçümü :

İnkübasyon ortamında  $\text{Mg}^{+2}$  bulunduğu zaman  $\text{Mg}^{+2}$  ATPaz enzimi ATP'yi ADP ve Pi'a hidroliz eder. Açığa çıkan Pi miktarından enzim aktivitesi hesaplanır.

Bu enzimin aktivitesi, nihai olarak 3 mM ATP (pH=7.0), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 60 mM Tris HCl (pH=8.0) içeren inkübasyon karışımında ölçülür. Son hacim 1 ml dir. Tepkime III.4.2.1'de elde edilen lenfosit homojenatı ilavesi ile başlatılır. Koşullarımızda 1 ml inkübasyon karışımına 0.3 mg protein konmasının uygun olduğu saptandı. Karışımlar 37°C'ta 30 dakika inkübe edilir. 0. ve 30. dakikada alınan 0.4 ml inkübasyon karışımına 0.2 ml soğuk % 25 TCA ilavesi ile tepkime durdurulur. TCA'lı tüpler 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir. Süpernatanda III.4.2.3'de belirtilen şekilde Pi miktarı ölçülür. Buradan aktivite  $\mu\text{mol Pi} / 30 \text{ dakika} / \text{mg protein}$  olarak hesaplanır (94,95).

III.4.3. Lenfosit zarlarındaki bazı yapısal bileşiklerin incelenmesinde kullanılan yöntemler

III.4.3.1. Siyalik asit miktarının ölçümü (96,97) :

Siyalik asit, tiyobarbitürik asit yöntemi ile ölçülür. Bu yöntem yalnız serbest siyalik asidi ölçtüğünden glikoproteinler içindeki siyalik asit önce zayıf bir asit hidrolizi ile ayrılır. Periyodat ile okside edildikten sonra oluşturulan renk sikloheksanon fazına alınır. Renk siyalik asit miktarı ile orantılıdır.

III.4.2.1'de elde edilen lenfosit homojenatının 0.1 ml'si aynı miktar 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 80°C'ta 1 saat hidroliz edilir. Bu hidrolizatın 0.1 ml sine 0.05 ml 0.2 M sodyum metaperiyodat (bkz. Ek 1.9) konur ve 20 dakika oda sıcaklığında beklenir. Bu süre sonunda 0.5 ml % 10 sodyum arsenit (bkz. Ek 1.10) ilave edilip sarı-kahve renk kayboluncaya kadar karıştırılır. 1.5 ml % 0.6 tiyobarbitürik asit (bkz. Ek 1.11) konur. Kaynar su banyosunda 15 dakika kaynatılıp, soğutulur. Karışıma 2.15 ml sikloheksanon ilave edilir ve şiddetle çalkalanarak oluşan renk, sikloheksanon tabakasına geçirilir. 3 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üstteki sikloheksanon fazı 532 ve 549 nm'de köre karşı okunur. 2-Deoksiriboz bu yöntemde 532 nm'de maksimum absorpsiyon verdiği için, numuneler iki dalga boyunda da okunmaktadır. Kör, hidrolizat yerine 0.1 ml distile su konarak hazırlanır ve numune gibi aynı işlemler uygulanır. Lenfositlerin homojenize edildiği ortamda renk teşekkülünü etkileyebilecek faktörler nedeniyle kontrol, 0.1 ml lenfosit içermeyen homojenat ortamı konarak hazırlanır ve numune gibi çalışılır. Siyalik asit miktarı, kontrollerle ilgili düzeltmeler yapılarak aşağıdaki formülden hesaplanır.

$$\mu\text{mol (N-asetilnöraminik asit)} = 0.09 \times OD_{549} - 0.033 \times OD_{532}$$

Sonuçlar nmol siyalik asit / mg protein olarak değerlendirilir.

### III.4.3.2. Kolesterol miktarının ölçümü (98) :

Yöntemde kolesterol, önce izopropanol fazına alınır. Daha sonra ortama konan  $FeCl_3$  ile oluşan demir-kolesterol kompleksi, derişik sülfürik asit ile kahve-mor renk verir.

III.4.2.1'de elde edilen lenfosit homojenatının 0.05 ml si üzerine, 1.2 ml izopropanol konur. Tüpün ağızı iyice kapatılıp 15 saniye şiddetle çalkalanır. 5 dakika bekletildikten sonra tekrar karıştırılıp 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. 0.25 ml supernatan üzerine önce 0.5 ml  $FeCl_3$  çözeltisi (bkz. Ek 1.12), sonra 0.5 ml derişik  $H_2SO_4$  konur. 10 dakika sonra 540 nm'de köre karşı okunur. Kör tüpü numune yerine 0.25 ml izopropanol konması ve aynı işlemlerin uygulanması ile hazırlanır. Standart tüpü de, numune yerine % 8 mg kolesterol (izopropanol içinde) içeren çözeltiden 0.25 ml alınması ve sonra aynen numune gibi çalışılması ile hazırlanır. Kolesterol miktarı aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanır.

$$\frac{\text{Numunenin O.D.}}{\text{Standartın O.D.}} \times \frac{0.08}{0.04} = \text{mg kolesterol/ml}$$

Sonuçlar  $\mu\text{g}$  kolesterol/mg protein olarak değerlendirilir.

% 8 mg kolesterol içeren standart çözeltiden 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 ve 0.25 ml alınarak kolesterol standart eğrisi çizilmiştir. Bu konsantrasyonlarda standart eğrinin lineer olduğu görülmüştür.

### III.4.3.3. Protein miktarının ölçümü (99) :

Bu yöntemde protein, alkali ortamda bakır iyonları ile biüre reaksiyonu verir, yani peptit bağları alkali ortamda bakır tuzları ile mor renkli bir kompleks oluşturur; ayrıca proteindeki tirozin ve triptofan fosfomolibdat-fosfotungstat çözeltisi ile indirgenir.

Standart olarak % 0.5 sığır serum albumini içeren çözeltiden 0.010, 0.020, 0.030, 0.040 ve 0.050 ml, numune olarak III.4.2.1'de elde edilen lenfosit homojenatından 0.005 ml ayrı tüplere pipetlenir, hacimleri 0.05 ml'ye su ile tamamlanır. Her bir tüpe 1 ml renk reaktifi (bkz. Ek 1.13) eklenir. 15 dakika oda sıcaklığında beklenir ve karışımlara 1/1 distile su ile sulandırılmış Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0.1 ml konur, karıştırılır. Yine oda sıcaklığında 1 saat beklenir. 750 nm'de köre karşı okunur. Kör, numune yerine 0.05 ml su konarak hazırlanır ve numuneler gibi aynı işlemlere tabi tutulur. Sonuçlar mg protein / ml olarak değerlendirilir. Çalışılan standart konsantrasyonlarında standart eğrinin lineer olduğu görülmüştür.

#### III.4.4. İmmunolojik yöntemler :

Total lenfosit sayımı ve deri testleri klinikte kullanılan rutin metodlar ile yapılır. Deri testlerinde, ön kol derisi içine 0.1 ml standart antijen uygulanır ve 48 saat sonra 5 mm'den büyük endürasyon pozitif olarak değerlendirilir (100).

E rozet testi M.Jondal'ın metoduna göre yapılmıştır (101).

Serum immunoglobulinleri Behring Werke Firmasının plakları ile radial immunodiffüzyon yöntemine göre tayin edilir (102).

Bu kısımda sözkonusu immunolojik yöntemler çalışma materyalinin sağlandığı H.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İmmunoloji Ünitesinde yapılmıştır. Hasta grubumuz hakkında daha geniş bilgiye sahip olmak amacı ile bu test sonuçlarına da yer verilmiştir.

#### III.4.5. İstatistik :

Gözlem sayılarının azlığı ve dağılımın homojen olmaması parametrik test varsayımlarına uymamaktadır. İki ortalama arasındaki farkın önemini anlamak amacı ile parametrik olmayan Mann Whitney U testi kullanılmıştır (103,104).

## BÖLÜM IV

### B U L G U L A R

Autoradyografi uygulanan ve enzim aktivitelerine bakılan hastaların klinik, radyolojik ve immunolojik bulguları sırası ile Tablo 1,2 ve Tablo 3,4'de görülmektedir. Hastalardan ikisi (İ.B. ve M.B.) kardeştir. Diğerleri arasında bir akrabalık yoktur.

#### IV.1. Kandan elde edilen lenfositlerin saflık ve canlılık testleri :

Bölüm III.4.1.1'de anlatıldığı gibi elde edilen lenfositlerin içinde 5 vakada yapılan miyeloperoksidaz boyaması ile ortalama % 12 oranında başka hücrelerinde bulunduğu gözlemlendi. Her vakadan elde edilen lenfositlerin % 90 civarında canlı olduğu Tripán Blue testi ile saptandı. Bu test, autoradyografi için iyodinizasyondan sonra da tekrarlandı ve lenfositlerin canlılık oranında bir değişiklik olmadığı görüldü.

#### IV.2. Autoradyografi bulguları :

Autoradyografi sonunda kontrol grubunda iki bant gözlenmektedir. Biri orijinde olup keskin bir bant görünümündedir (I.Bant). Diğeri ise 7 kontrolde  $R_f$ 'i 0.09-0.12, MA 145.000-132.000 arasında değişen yaygın bir bant halindedir (II.Bant) (Tablo 5). Resim 1'de iki kontrole (N.G., İ.Ü.) ait autoradyografi sonucu görülmektedir.

Hasta grubunu oluşturan 7 vakanın hepsinde normalde orijinde bulunan I.bant görülmemektedir. Yine normalde gözlenen II. bant 7 hastadan 4'ünde (S.A., A.E., Y.P., M.Y.) mevcut olup diğerlerinde bulunmamaktadır. Ancak hastaların 6'sında II.banda yakın veya uzakta yani daha küçük MA'lı bir veya daha fazla ilave protein bantları gözlenmiştir (Tablo 5).



Tablo 1 : Autoradyografi uygulanan hastaların klinik ve radyolojik bulguları.

Hasta No.	Adı - Soyadı	Yaşı	Cinsi	Yakın akraba evliliği	Aile hikayesi	Ataksi başlama yaşı	Telenjeksiyon başlama yaşı	Fizik Muayene	Sinus Grafisi	Akciğer Grafisi
1	Ö.A.	9	E	-	+	5	?		Sinuzit	Kronik fibrotik değişiklikler
2	S.A.	10	K	-	+	1	?		Sinuzit	Hafif infiltrasyon
3	İ.B.	8	K	+	+	3	5		Normal	Normal
4	M.B.	14	E	+	+	4	?	Horizontal nistagmus	Normal	Normal
5	A.E.	8	E	-	-	2	4	Nistagmus	Sinuzit	Kronik fibrotik değişiklikler
6	Y.P.	5	K	-	-	4	2.5	Hemipleji	Normal	Normal
7	M.Y.	6	K	-	-	1			Sinuzit	Normal

Tablo 2 : Autoradyografi uygulanan hastaların immünolojik bulguları.

Hasta No	Adı - Soyadı	Total lenfosit / mm <sup>3</sup>	E rozet %	Deri testleri mm endürasyon				Serum immünoglobulinleri mg/100 ml		
				PHA	Kandida	SK-SD	PPD	IgG	IgM	IgA
1	Ö.A.	1548	35	+	-	+	-	1230	175	0
2	S.A.	2921	43	+	-	-	-	1400	253	14
3	İ.B.	2800	54	+	-	+	-	795	127	80
4	M.B.	2100	68	+	-	+	-	1010	115	103
5	A.E.	1408	39	+	-	+	+	1170	129	0
6	Y.P.	1368	-	+	-	-	-	970	114	112
7	M.Y.	1900	49	-	-	-	-	840	85	0
Normal Değer		2000	67±7	>5	>5	>5	>5	1200±300	120±35	138±37.5

Tablo 3 : Enzim aktivitetlerine bakılan hastaların klinik ve radyolojik bulguları.

Hasta No.	Adı - Soyadı	Yaşı	Cinsi	Yakın akraba evliliği	Aile hikayesi	Ataksi başlama yaşı	Telenji-ektazi başlama yaşı	Fizik Muayene	Sinus Grafisi	Akciğer Grafisi
1	Ö.A.	9	E	-	-	5	?	Horizontal nistagmus	Sinuzit	Kronik fibrotik değişiklikler
2	Ş.A.	6	E	-	+	?	6		Sinuzit	Kronik fibrotik değişiklikler
3	I.B.	8	K	+	+	3	5		Normal	Normal
4	M.B.	14	E	+	+	4	?	Horizontal nistagmus	Normal	Normal
5	Ö.Ç.	5	E	+	-	2.5	?		Sinuzit	Normal
6	T.E.	9	E	-	-	?				Normal
7	M.K.	6	E	-	+	2	2		Sinuzit	Kronik fibrotik değişiklikler
8	A.S.	7	E	-	+	1	1			
9	B.S.	9	K	-	-	4	?		Normal	Normal
10	C.Y.	9	E	+	-	1.5	?			

Tablo 4 : Enzim aktivitelere bakılan hastaların immunolojik bulguları.

Hasta No.	Adı - Soyadı	Total lenfosit / mm <sup>3</sup>	E rozet %	Deri testleri mm endürasyon				Serum immunoglobulinleri mg/100 ml		
				PHA	Kandida	SK-SD	PPD	IgG	IgM	IgA
1	Ö.A.	1548	35	+	-	+	-	1230	175	0
2	Ş.A.	3136	43	+	-	+	+	1050	121	0
3	İ.B.	2800	54	+	-	+	-	795	127	80
4	M.B.	2100	68	+	-	+	+	1010	115	103
5	O.Ç.	3980	51	+	-	+	-	1170	163	75
6	T.E.	-	61	+	-	+	-	830	137	0
7	M.K.	1602	39	+	-	+	-	750	100	80
8	A.S.	1638	50	+	-	-	+	1070	57	73
9	B.S.	2400	64	-	-	-	-	1130	138	87
10	C.Y.	-	-	+	-	-	-	1380	148	0
Normal Değer		2000	67±7	>5	>5	>5	>5	1200±300	120±35	138±37.5

Tablo 5 : Autoradyografi sonucu kontrol ve hasta grubunda gözlenen protein bantları.

GRUP	I. BANT	II. BANT		İLAVE BANTLAR				
				A		B		
		MA	R <sub>f</sub>	MA	R <sub>f</sub>	MA	R <sub>f</sub>	
KONTROL	1 (A.A.)	+	132.000	0.12				
	2 (H.A.)	+	145.000	0.09				
	3 (N.G.)	+	133.000	0.10				
	4 (O.Ö.)	+	135.000	0.11				
	5 (Ö.Ö.)	+	135.000	0.11				
	6 (R.T.)	+	133.000	0.10				
	7 (İ.Ü.)	+	145.000	0.09				
HASTA	1 (Ö.A.)	-	-	-	-	-	-	
	2 (S.A.)	-	132.000	0.12	108.000	0.21		
	3 (İ.B.)	-	-	-	80.000	0.33	60.000	0.43
	4 (M.B.)	-	-	-	115.000	0.17	51.000	0.50
	5 (A.E.)	-	130.000	0.15	76.000	0.36	34.000	0.68
	6 (Y.P.)	-	135.000	0.11	80.000	0.33		
	7 (M.Y.)	-	130.000	0.15	84.000	0.32		

S.A.'da I.bant görülmemektedir. Buna karşın II.bant mevcuttur. Bu protein bandının  $R_f$ 'i 0.12 olup 132.000 MA'na uymaktadır. Ayrıca  $R_f$ 'i 0.21 olan ve 108.000 MA'na uyan ilave bir protein bandı daha vardır.

İ.B.'de I. ve II.bant yoktur.  $R_f$ 'i 0.33, 0.43 olan ve sırası ile 80.000, 60.000 MA'na uyan iki ilave protein bandı mevcuttur.

M.B.'de I. ve II.bant görülmemektedir. Ancak  $R_f$ 'i 0.17 olup 115.000 MA'na ve  $R_f$ 'i 0.50 olup 51.000 MA'na uyan ilave iki protein bandı vardır.

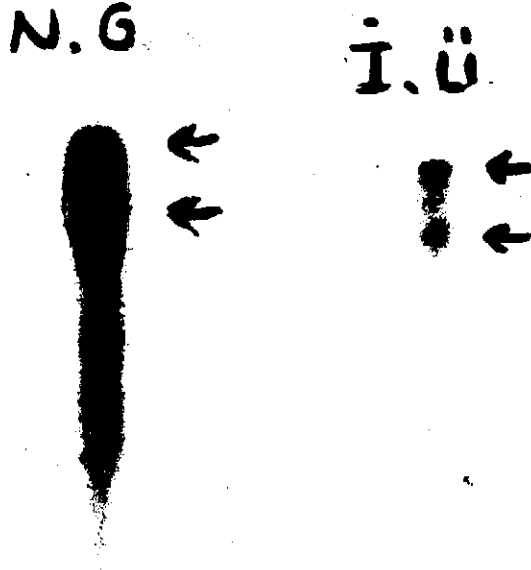
A.E.'de I.bant yoktur. Normallerde bulunan II.bant daha küçük MA'da bir protein bandı olarak görülmektedir. Bu bandın  $R_f$ 'i 0.15 olup 130.000 MA'na uymaktadır. Ayrıca  $R_f$ 'i 0.36 ve 0.68 olan ilave iki protein bandı daha vardır. Bunların MA sırası ile 76.000 ve 34.000 civarındadır.

Y.P.'de I.bant görülmemektedir. Buna karşın II.bant vardır. Bu protein bandının  $R_f$ 'i 0.11 ve MA 135.000 olarak saptanmıştır.  $R_f$ 'i 0.33 ve MA 80.000 olan ilave bir protein bandı vardır.

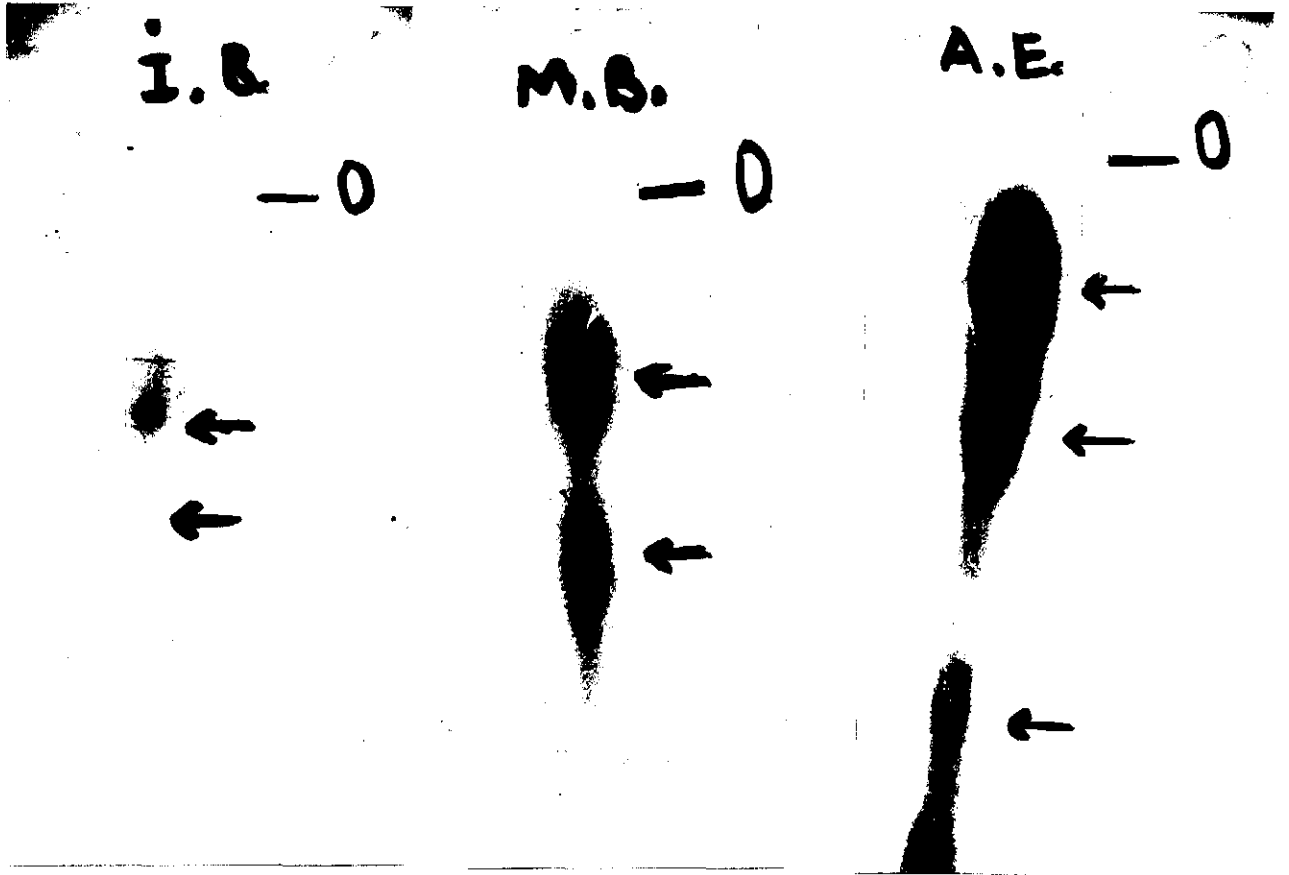
M.Y.'de I.bant yoktur. Normallerde bulunan II.bant daha küçük MA'da bir protein bandı olarak görülmüştür. Bunun  $R_f$ 'i 0.15 ve MA 130.000 dir. Ayrıca  $R_f$ 'i 0.32 olan 84.000 MA'da ilave bir protein bandı vardır.

Tablo 5'de görüldüğü gibi yalnız bir hastada (Ö.A.) autoradyografiden sonra işaretlenmiş hiçbir protein bandı gözlenmemiştir. Bu hastaya aynı zamanda lenfoma teşhisi de konmuştur. Üç hastaya (İ.B., M.B., A.E.) ait autoradyografi sonucu Resim 2'de sunulmuştur. Her protein bandının MA Bölüm III.4.1.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan standart eğriden (Şekil 1) yararlanılarak hesaplanmıştır.

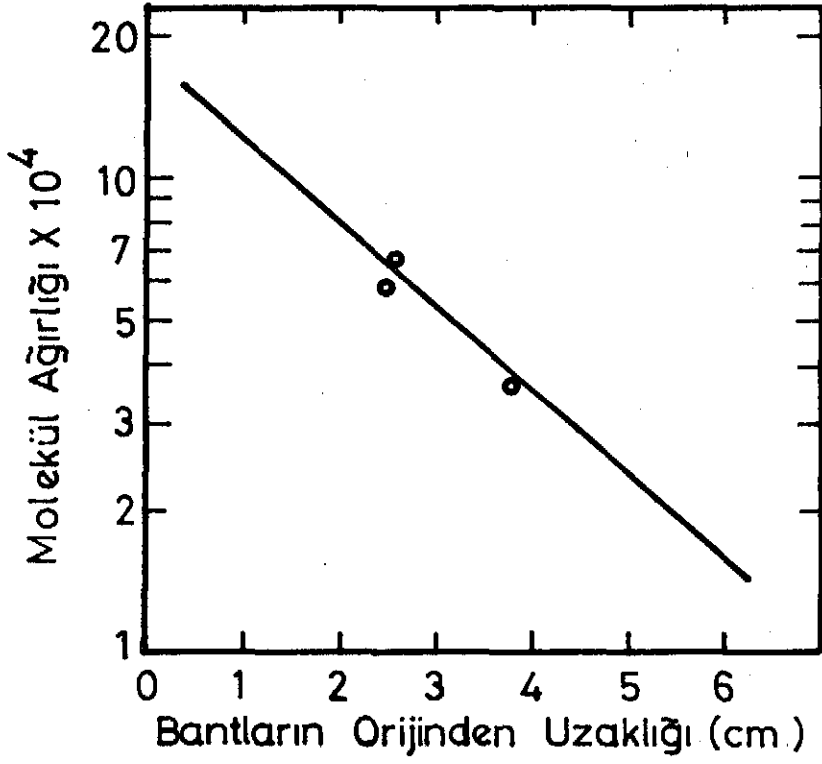
Laktoperoksidaz ile hidrojen peroksit konmadan III.4.1.2'de anlatıldığı gibi çalışılan körün autoradyografisinde hiçbir işaretlenme saptanmamıştır.



Resim 1 : Kontrol grubuna ait autoradyografi (oklar işaretlenen protein bantlarını göstermektedir).



Resim 2 : Hastalara ait autoradyografi (oklar işaretlenen protein bantlarını, "0" orijini göstermektedir).



Şekil 1 : Molekül ağırlığı tayini standart eğrisi.

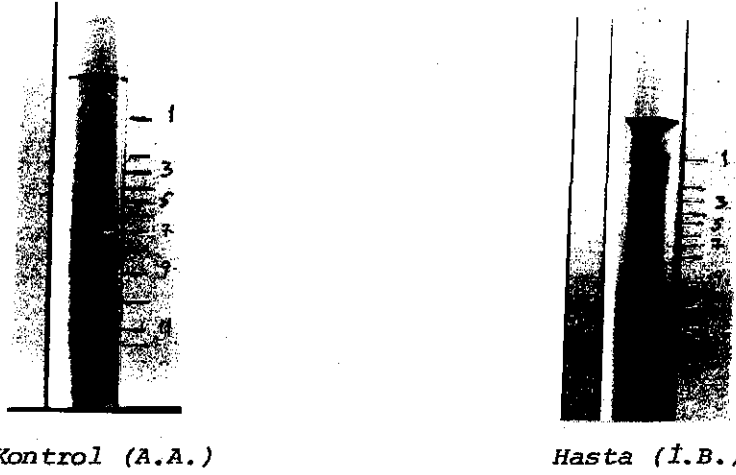


#### IV.3. Protein boyamasına ait bulgular :

Bir kontrol (A.A.) ve bir hastanın (İ.B.) protein boyanmış jelleri Resim 3'de görülmektedir. Jeller BPB hizasından kesilmiştir. Normallerde başlıca 12 protein bandı sayılabilmektedir (Resim 3).

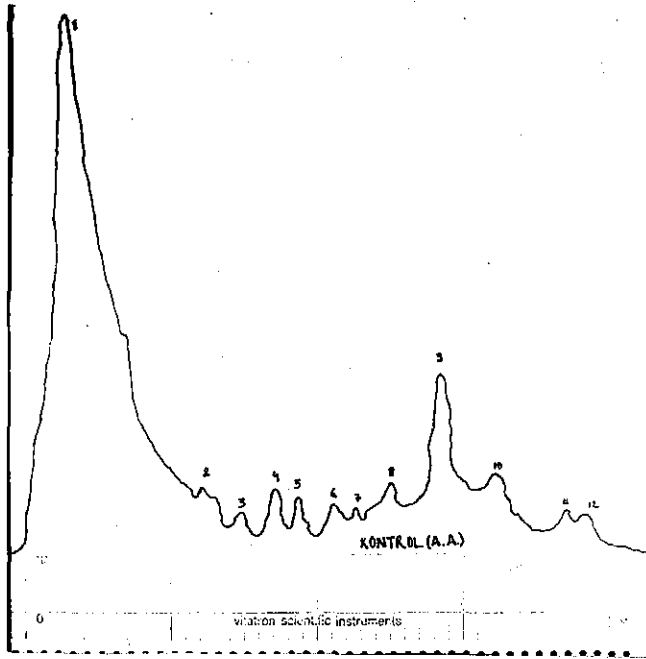
Bir hastada (İ.B.) protein boyaması farklı bir görünüm vermiştir (Resim 3). Bu hastada : a) bant sayısında ilaveler vardır. Özellikle I. ile II.bant arasında birkaç tane ince boyanan protein bandı gözlenmiştir. b) bantlar koyu ve keskin bir şekilde boyanmıştır. Bu hastanın iki kez tekrarlanan elektroforezinde aynı sonuç elde edilmiştir.

Diğer hastalarda ise bantlar normallerdeki gibi boyanmış olup, boyanma şeklinde bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak ek protein bantları bulunmuştur.

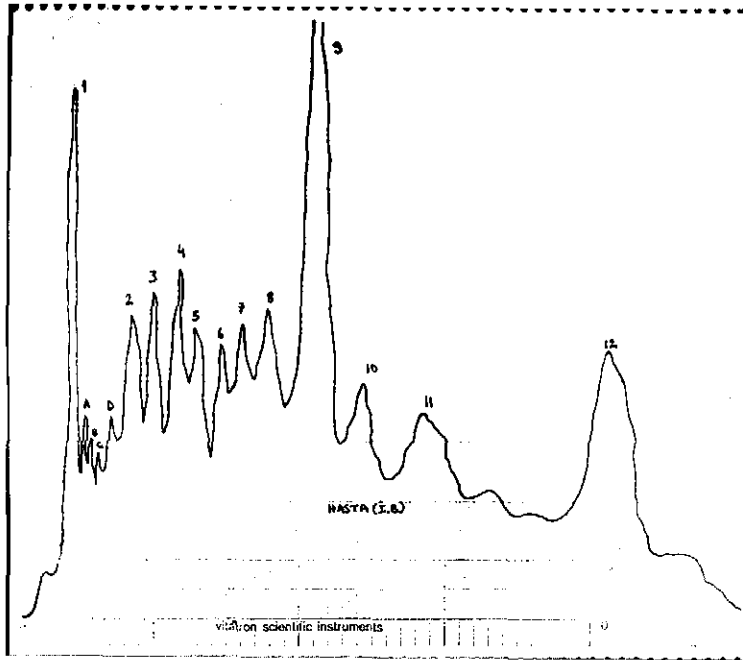


Resim 3 : Kontrol ve hastaya ait protein boyaması.

Resim 4'de bir kontrol (A.A.), Resim 5'de ise bir hastaya (İ.B.) ait protein bantlarının dansitometrede değerlendirilmesi görülmektedir. Hastadaki ilave bantlar A, B, C, D olarak gösterilmiştir.



Resim 4 : Kontrole ait protein bantlarının dansitometrede değerlendirilmesi.



Resim 5 : Hastaya ait protein bantlarının dansitometrede değerlendirilmesi.

#### IV.4. Lenfositlerde bazı zarsal enzimlerin aktiviteleri ve bunlar arasındaki ilişki :

Kontrol ve hasta grubunda ölçülen enzim aktivitelerine ilişkin değerler Ek 2. Tablo 1,2,3,4,5'de sunulmuştur. Her hasta ile paralel çalışılan kontrolün değeri tablolarda aynı hizada verilmiştir.

Kontrol ve hasta grubunda incelenen enzim aktivitelerinin ortalama değerleri ve ortalamalar arasındaki farkların önemi Tablo 6'da belirtilmiştir. Bu değerlerden kontrol ve hasta grubundaki ALPaz, total ATPaz ve  $Mg^{+2}$  ATPaz aktivitelerinin ortalamaları arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür (Sırası ile  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  ve  $P < 0.05$ ). Buna karşın 5'N aktiviteleri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ).

$Na^{+}$  -  $K^{+}$  ATPaz 10 kontrolden 6'sında hesaplanabilmiştir. Buna karşın 10 hastanın hepsinde bu enzim aktivitesi bulunmuştur (Ek 2. Tablo 4).

Kontrol ve hasta grupları içinde zarsal enzimlerin biribiri ile ilişkisi istatistiksel yöntemle incelenmiştir. Kontrol ve hasta gruplarında total ATPaz aktivitesi ile  $Mg^{+2}$  ATPaz aktivitesi arasında anlamlı bir korelasyon olduğu saptanmıştır (Kontrol grubu için,  $r = 0.92$ ,  $P < 0.01$ ; hasta grubu için,  $r = 0.95$ ,  $P < 0.01$ ). 5'N aktivitesi ile ALPaz aktivitesi arasında kontrol grubunda anlamlı bir korelasyon ( $r = -0.21$ ,  $P > 0.05$ ) bulunamamasına karşın bu iki enzim arasında hasta grubunda anlamlı bir korelasyon ( $r = 0.74$ ,  $P < 0.02$ ) olduğu saptanmıştır. Diğer enzim aktiviteleri arasında gerek kontrol gerekse hasta grubu içinde yapılan karşılaştırmada anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır (Tablo 7).

#### IV.5. Lenfosit zarındaki bazı yapısal bileşiklerin miktarları :

Kontrol ve hasta grubuna ait siyalik asit değerleri Ek 2. Tablo 6'da, kolesterol değerleri ise Ek 2. Tablo 7'de görülmektedir. Bu iki gruba ait

siyalik asit ve kolesterol miktarlarının ortalamaları Tablo 8'de verilmiştir. Kontrol grubunun ortalama siyalik asit değeri  $16.65 \pm 3.55$  nmol/mg protein, hasta grubunun ortalaması ise  $15.15 \pm 3.89$  nmol/mg proteindir. Bu iki grubun ortalama değerleri arasındaki farkın anlamlı olmadığı bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). Kolesterol miktarının kontrol grubu ortalaması  $127.42 \pm 29.02$  µg/mg protein, hasta grubunun  $162.20 \pm 77.00$  µg/mg protein olarak bulunmuştur. Bu iki ortalama arasındaki farkın da anlamlı olmadığı saptanmıştır ( $P > 0.05$ ).

Tablo 6 : Bazı zar enzimlerinin aktiviteleri.

GRUP	Alkaleen fosfataz (nmol PNP/dk/mg protein) Ortalama $\pm$ S.D.	5' Nükleotidaz (nmol Pi/30 dk/ mg protein) Ortalama $\pm$ S.D.	Total ATPaz (µmol Pi/30 dk/mg protein) Ortalama $\pm$ S.D.	<sup>+2</sup> Mg ATPaz (µmol Pi/30 dk/mg protein) Ortalama $\pm$ S.D.
Kontrol n=10	$0.98 \pm 0.22$ (0.64 - 1.24)	$90.62 \pm 36.22$ (52.30 -167.00)	$1.45 \pm 0.35$ (0.97 - 2.15)	$1.49 \pm 0.43$ (0.81 - 2.35)
Hasta n=10	$1.67 \pm 0.52$ (1.05 - 2.63)	$91.51 \pm 57.11$ (17.00 -194.00)	$1.93 \pm 0.48$ (1.22 - 2.84)	$1.94 \pm 0.65$ (1.13 - 3.06)
P	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.05$

n : Vaka sayısı

SD : Standart sapma

Parantez içindeki rakamlar alt ve üst sınırları göstermektedir.

Tablo 7 : Bazı zar enzimlerinin aktiviteleri arasındaki korelasyon.

Enzimler	Kontrol Grubu		Hasta Grubu	
	r	P	r	P
Total ATPaz aktivitesi ile korelasyonuna bakılan enzimler				
Mg <sup>+2</sup> ATPaz	0.92	<0.01	0.95	<0.01
5' Nükleotidaz	0.33	>0.05	0.15	>0.05
Alkalen Fosfataz	0.42	>0.05	0.38	>0.05
Mg <sup>+2</sup> ATPaz aktivitesi ile korelasyonuna bakılan enzimler				
5' Nükleotidaz	0.20	>0.05	0.13	>0.05
Alkalen Fosfataz	0.28	>0.05	0.25	>0.05
5' Nükleotidaz aktivitesi ile korelasyonuna bakılan enzim				
Alkalen Fosfataz	-0.21	>0.05	0.74	<0.02

r = korelasyon katsayısı.

Tablo 8 : Sialik asit ve kolesterol değerleri.

Grup	Sialik asit (nmol/mg protein)	Kolesterol (µg / mg protein)
	Ortalama ± S.D.	Ortalama ± S.D.
Kontrol n=10	16.65 ± 3.55 (12.33 - 23.41)	127.42 ± 29.02 ( 87.70 - 175.20)
Hasta n=9	15.15 ± 3.89 ( 7.12 - 21.75)	162.20 ± 77.00 ( 75.80 - 351.90)
P	P > 0.05	P > 0.05

n : Vaka sayısı

S.D. : Standart sapma

Parentez içindeki rakamlar alt ve üst sınırları göstermektedir.

## BÖLÜM V

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Genetik ve dolayısı ile klinik heterojenlik gösteren A-T'li hastalar, genellikle, enfeksiyonlar ve malignite oluşumu ile kaybedilmektedirler. Bu hastaların lenfosit sayısının azalması, deri testlerine ve mitojenlere cevap vermemesi hücrel bağışıklık sisteminde, düşük immunoglobulin düzeyleri de humoral bağışıklık sisteminde yetersizlik olduğunu göstermektedir. Hastaların % 70-80'inde serum immunoglobulin A ve E miktarlarının çok düşük olması, B hücrelerinin immunoglobulin A salgılayan plazma hücrelerine dönüşmelerinde bir bozukluk olduğunu düşündürmektedir. B hücrelerinin olgunlaşmalarında gerekli olan  $T_H$  hücrelerinin de normal fonksiyon görmediği ileri sürülmüştür (10,13,26,105,106).

Bu hastalıkta bağışıklık sisteminde yetersizlik ve sıklıkla malignite oluşması, ayrıca başka birçok malignite durumlarında hücre zarlarında önemli değişikliklerin gösterilmiş olması (45,67-69,79-82) bizi, lenfosit yüzeyinin incelenmesine yöneltmiştir. Bu amaçla autoradyografi uygulanmış ve bazı zarsal enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Böylece A-T'li hastaların hepsinde görülebilen ortak bir zarsal bozukluğun olup olmadığı araştırılmıştır.

Hücre zarının ana bileşenleri proteinler ve lipitler olduğuna göre lenfosit hücre zarındaki değişiklikler; a. yapısal veya fonksiyonel proteinleri, b. lipitleri, c. protein-lipit ilişkisini kapsayabilir. Uygun proteinler ve lipitler zar yapılarında hiç bulunmayabilir, ya da az veya değişmiş olarak bulunabilirler. Bu değişiklikler, DNA kaynaklı olabilir veya

çevresel faktörlerin etkisi ile meydana gelebilirler. A-T'de serumda böyle etkenler araştırılmaktadır (27). Zar yüzeyinin  $I^{125}$  ile işaretlenerek incelenmesi ve zara bağlı enzim aktivitelerine bakılması, yapısal ve fonksiyonel yapı taşlarındaki değişikliklerin nitel ve nicel analizi için ilk basamağı oluşturabilir.

A-T patogenezinin açıklanmasında Bölüm II'de de değinildiği gibi daha çok DNA sentezi, onarımı ile ilgili bozukluklar ve kromozom hataları üzerinde durulmuştur. A-T'de biyokimya alanında yapılan çalışmalar da daha çok DNA onarım mekanizmaları, iyonizan ışınlarla duyarlılık ve superoksit,  $H_2O_2$  gibi arametabolizma sırasında açığa çıkan zararlı bileşikleri parçalayan superoksit dismutaz, katalaz enzimleri üzerinedir (7,20). Hücre zarı ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

A-T gibi çeşitli kromozom anomalileri gösteren ve malignite oluşumuna sık rastlanan Bloom sendromu, Fanconi anemisi, Xeroderma pigmentosa gibi hastalıklarda da zarsal enzimler ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır (107). Buna karşın hücre zarı yapısının çok iyi çalışılmış olduğu eritrositlerde, belirli bir zarsal proteinin eksikliğinde herediter sferositoz, herediter eliptositoz gibi fonksiyonel bozuklukların açığa çıktığı gösterilmiştir (108-111). A-T'de de zarsal bozuklukların olabileceğini düşündüren bulgular vardır (10,26,106). A-T'de enzim eksikliğinin söz konusu olabileceği öne sürülmüştür (112).

B ve T hücrelerinde hücre zarı yapısının farklı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hücre zarının incelenmesi için B ve T hücrelerinin birbirinden ayrılması ve bu zarın diğer hücre organellerinden ayrılarak saf olarak elde edilmesi düşünülmüştür. Ancak bazı zorluklar ile karşılaşmıştır : Örneğin, fazla kan (100 ml kadar) gereklidir ve bu yaş grubundaki hastalardan bu kadar kan almak kolay olmamaktadır; lenfosit zarının

elde edilebilmesi için uzun bir santrifüj işlemi gereklidir (90.000 xg'de 16 saat) (46,86,113). Bu nedenlerle autoradyografi, sağlam hücreler ile yapılmış fakat zarsal enzimlerin aktivitelerini, lenfosit homojenatında ölçmek zorunluluğunda kalınmıştır. Aynı tepkimeyi katalizleyen fakat bir hücrenin farklı organellerine yerleşmiş enzim proteinlerinin aynı genetik kontrol altında olduğunu varsayarak, sonuçların, hücre zarlarındaki durumu aksettireceği düşünülmüştür. Lenfositlerde büyük bir çekirdek, çok az organel ve ince bir sitoplazma tabakası bulunmaktadır. Buna dayanarak da bulguların daha çok hücre zarındaki değişiklikleri göstereceği belirtilmiştir (113).

Autoradyografide işaretlenen bantların  $R_f$ 'ine uygun bantların, protein boyanmasında da bulunması ve laktoperoksidaz ile  $H_2O_2$  konmadan yapılan inkübasyonların autoradyografisinde hiç bant gözlenmemesi,  $I^{125}$  in özgül olarak proteinlere bağlandığını doğrulamaktadır.

Normalde bulunan I.bant hastalarda görülmemiştir. Buna karşın normalde bulunan II.bant bazı hastalarda vardır. Altı hastada, I. ve II. banttan daha küçük MA'da olan bir veya daha fazla ilave bant gözlenmiştir. Bunlar A-T'de hücre yüzeyinde büyük değişikliklerin olduğunu göstermektedir. Bu değişiklikleri şöyle açıklamak mümkündür : a) normalde işaretlenen proteinlerden daha küçük MA'deki iç proteinler yüzeye gelip işaretlenmiş olabilir veya, b) normalde görülen proteinler sentezlenmeyip yerine daha küçük MA'daki proteinler sentezlenmiş olabilir ya da, c) normalde işaretlenen proteinlerin konformasyonunda değişiklikler olmuş olabilir (örneğin, kuarterner yapı bozulmuş olabilir). Lenfoma oluşmuş bir A-T hastasının (Ö.A.) autoradyografisinde hiç bir işaretlenme gözlenmemiştir. Öyle ise bu hastanın lenfosit yüzeyleri hiç veya çok az tirozin bulunduracak kadar değişmiştir.



Poliakrilamid jel elektroforezine uygulanan hasta lenfositlerinin protein boyamasında, autoradyografinin I. ve II.bantları arasında yer alan ilave bantlar gözlenmiştir. Autoradyografide bunların  $R_f$ 'ine uyan proteinlere rastlanmamıştır. Öyle ise hastalarda görünen bu ilave bantlar, zar iç proteinleri veya sitoplazma proteinleri olabilirler. Bu sonuç kontrol ve hastaların lenfosit total proteinleri arasında bir fark olduğunu düşündürmektedir. Bir hastamızdaki (İ.B.) lenfosit protein boyaması kontrol ve diğer hastalarınkinden farklı bulunmuştur (Resim 3). Bantlar keskin ve koyu boyanmıştır. Elektroforez iki kez tekrarlanmış ve aynı sonuç alınmıştır. Bu da protein moleküllerinin primer, sekonder, tersiyer veya kuarterner yapısındaki değişiklikleri düşündürebilir.

ALPaz'ın, özellikle, B lenfositlerinin hücre zarında bulunduğu ve hücrelerin olgunlaşması ile aktivite arasında ters bir ilişki olduğuna değinilmiştir (11,45). A-T'de B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşümünde bir bozukluk söz konusu ise ALPaz aktivitesinin yükselmesi beklenebilir. Ayrıca DNA sentezi inhibisyonu ile ALPaz indüksiyonu arasında bir ilişki olduğunu gösteren bulgular vardır (44,114). Bir çalışmada da A-T fibroblastlarında DNA polimeraz I'in eksik olduğu gösterilmiştir (115). O zaman A-T'de bir DNA sentezi bozukluğu söz konusu ise ALPaz aktivitesi de yüksek bulunmalıdır. Bulgularımız ALPaz aktivitesinin hastalarda kontrollerden önemli derecede yüksek olduğunu göstermektedir ( $P < 0.01$ ). Buna karşın iyi farklılaşmamış B hücresi lenfomasında (Burkitt lenfoma) başka bir ALPaz izoenziminin (N-alkalen fosfataz) yükseldiği yayınlanmıştır (90).

5'N aktivitesinin bağışıklık sistemi hastalıklarından bazılarında azaldığı gösterilmiştir (47,52,59). Kontrol ve hasta grubumuzun ortalama 5'N aktiviteleri arasındaki fark önemli bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ). Has-

taların bir kısmında enzim aktivitesi yüksek, bir kısmında da düşüktür. 10 kontrolden ikisinde de enzim aktivitesinin diğerlerine göre yüksek olduğu görülmüştür. 5'N aktivitesinin aynı grup içinde bu kadar değişkenlik göstermesine primer immun yetmezliği olan hastalar ile yapılan bir çalışmada değinilmiştir (52). Bu durum; a) plazmada bir inhibitörün varlığı, b) enzim B lenfositlerinde T hücrelerine göre üç misli kadar fazla bulunduğu için B lenfositlerinin azlığı, c) başka mononükleer hücreler ile bulaşıklık olasılıkları ile açıklanmaya çalışılmıştır (47).

Vakalarımızdan elde ettiğimiz lenfositlerde fazla mononükleer hücre bulaşması olmamasına rağmen, yukarıdaki diğer etkenler gözönünde tutularak 5'N 'ın tekrar incelenmesi uygun olabilir.

Hodgkin, sindirim sistemi ve larinks kanserleri gibi çeşitli durumlarda dolaşımdaki lenfositlerde total ATPaz aktivitesinin yüksek bulunduğu yayınlanmış ve enfeksiyon dahil malign olmayan başka hastalıklarda aktivitenin polimorf nüveli lökositlerde yükselmediği ileri sürülmüştür (80-82). Bu aktivitenin hasta grubumuzda da kontrollere göre önemli derecede yüksek bulunmuş olması ( $P < 0.01$ ), daha sonra gelişebilecek bir malignitenin işareti olup olmayacağını düşündürmektedir.

$Mg^{+2}$  ATPaz'ın timus, dalak, tonsil ve lenf bezindeki T lenfositlerinde bulunmadığı, B lenfositlerinde bulunduğu belirtilmiştir (116). Doku kültürlerinde hücre-hücre teması olduğunda hücre zarı  $Mg^{+2}$  ATPaz'ı yüksek bulunmuştur (74). Sonuçlarımız doku kültürlerinde olduğu gibi malignite şansı yüksek olan A-T hastalarının lenfositlerinde de bu enzim aktivitesinin normallerden önemli derecede yüksek olduğunu göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

Lenfosit  $Na^{+}-K^{+}$  ATPaz'ının tayininde zorluklar olduğu ancak bazı

deterjanlar ile aktivitenin açığa çıkarılabileceği bildirilmiştir (77, 116). Kontrol grubunda 10 vakadan yalnız 6'sında, hastaların ise hepsinde aktiviteyi saptamak mümkün olmuştur. İki grubun bu enzim aktiviteleri arasında fark olmamasına rağmen 6 hastada (Ö.A., İ.B., M.B., T.E., M.K. ve A.S.) bulunan aktivite, kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında (Ek 2. Tablo 4) daha yüksek bulunmuştur. Hasta grubunda aktivitenin kolayca saptanabilmiş olması, enzimin A-T lenfosit zarlarında daha yüzeysel yerleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Enzim aktivitelerinin birbirleri ile ilişkileri incelendiğinde de kontrol ve hasta grubu arasında fark bulunmuştur. Normallerde 5'N ile ALPaz arasında korelasyon yokken ( $r = -0.21$ ,  $P > 0.05$ ), hasta grubunda korelasyon ( $r = 0.74$ ,  $P < 0.02$ ) bulunmuştur. Bu da, yine, bu iki enzimin yer ve fonksiyon yönünden birbirleri ile olan ilişkilerinin A-T'de değişmiş olduğunu işaret edebilir. Primer immun yetmezlikte mononükleer hücrelerin zarlarındaki bazı enzimlerin farklı bir yerleşim gösterdikleri ileri sürülmüştür (52).

Enzimlerin zar içindeki çevresini inceleyebilmek için siyalik asit ve kolesterol miktarları araştırılmıştır. Siyalik asidin zardaki enzimleri aktif tutmada önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Çünkü periyodat ile siyalik asit okside edildiğinde, mikrozomlardaki  $Na^+ - K^+$  ATPaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (75). Bu çalışmada kontrol ve hasta gruplarının siyalik asit miktarları arasında bir fark olmadığı bulunmuştur ( $P > 0.05$ ).

Kolesterol zar akışkanlığını düzenleyen etkenlerden biridir. Bazı lösemilerde zar akışkanlığının arttığı ve kolesterolün azaldığı bildirilmiştir (117). Bu çalışmada hücre zarı elde edilemediği için total kolesterole bakılmak zorunluluğunda kalınmıştır. Bu koşullarda kontrol ve hasta grubunun kolesterol değerleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Sonuç olarak;

a. Autoradyografide A-T lenfositlerinde normal bantların görülmesi ve ilave küçük MA'lı bantların açığa çıkması, hücre zarı proteinlerinde önemli yer değişikliklerinin olduğunu düşündürmektedir.

b. Birer zarsal enzim olan ALPaz, total ATPaz ile  $Mg^{+2}$  ATPaz aktivitelerinin A-T lenfositlerinde yüksek olarak saptanmış olması ve 5'N ile ALPaz arasında yalnız A-T lenfositlerinde bir korelasyon bulunması, autoradyografi bulgularını desteklemektedir.

ALPaz aktivitesi ile hücre farklılaşması arasında ters bir ilişki olduğuna göre hastalarda aktivitenin artmış olması, A-T ile B hücrelerinin olgunlaşması arasındaki ilişkiyi belirtebilir.  $Mg^{+2}$  ATPaz, T hücrelerinde bulunmayıp yalnız B lenfositlerinde bulunduğu göre hastalarda bu aktivitenin artmış olması, yine, A-T ile B hücre fonksiyon bozuklukları arasındaki ilişkiyi açıklayabilir. Ayrıca çeşitli malign durumlarda artmış olduğu saptanan üç enzim aktivitesinin (ALPaz, total ATPaz ve  $Mg^{+2}$  ATPaz) hasta lenfositlerinde de yüksek bulunmuş olması, A-T ile malignite arasındaki yakın ilişkiyi belirtebilir.

Lenfosit yüzeyindeki bu değişiklikler, DNA onarım mekanizmalarındaki veya doku farklılaşmasındaki bir bozukluk ile açıklanabilir.

Zar yapısındaki değişikliklerin daha detaylı incelenebilmesi için herşeyden önce B ve T hücrelerinin ayrılması, zarların saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bundan sonra, proteinazlar ile sindirim gibi başka biyokimyasal ve elektron spin rezonans (ESR), sirkuler dikroizm (CD) gibi fiziksel yöntemlere gereksinim vardır.

## Ö Z E T

Bu çalışmada A-T tanısı konmuş hastaların lenfosit yüzey proteinleri autoradyografi ile incelendi. Lenfositlerdeki bazı zarsal enzimlerin aktiviteleri (ALPaz, 5'N, total ATPaz,  $Mg^{+2}$  ATPaz) ölçüldü. Zar bileşenlerinden siyalik asit ve kolesterol miktarları da saptandı. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Autoradyografide kontrol grubunda  $I^{125}$  ile işaretlenmiş iki bant gözlemlendi (I. ve II. bant). Hasta grubunda I. bantın olmadığı, II. bantın ise 7 hastadan yalnız 4'ünde bulunduğu görüldü. 6 hastada bant I ve bant II den daha küçük molekül ağırlıklı bir veya daha fazla ilave protein bandı bulundu.

Autoradyografi için hazırlanan jellerin protein boyamasında hastalarda bant I ve II arasında hareket eden ilave bantlar açığa çıktı.

Hastalarda ALPaz, total ATPaz,  $Mg^{+2}$  ATPaz aktiviteleri kontrollerden yüksek bulundu (sırası ile  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  ve  $P < 0.05$ ). Buna karşın 5'N aktivitesi iki grup arasında önemli bir fark göstermedi ( $P > 0.05$ ).

Lenfosit zarsal enzimleri arasındaki ilişki incelendiğinde kontrol grubundan farklı olarak A-T'de 5'N ile ALPaz arasında anlamlı bir korelasyon olduğu saptandı ( $r = 0.74$ ,  $P < 0.02$ ).

Kontrol ve hasta grupları arasında gerek siyalik asit ve gerekse kolesterol miktarlarının ortalamaları açısından önemli bir fark gözlemlenmedi ( $P > 0.05$  ve  $P > 0.05$ ).

Autoradyografi ve enzim aktivitelerinin sonuçlarına dayanarak A-T'de lenfosit zar proteinlerindeki değişiklikler tartışıldı.

## S U M M A R Y

The cell surface proteins of lymphocytes isolated from ataxia-telangiectasia (A-T) patients are studied by autoradiography. The activities of some membrane-bound enzymes (ALPase, 5'N, total ATPase,  $Mg^{+2}$  ATPase) are determined in the lymphocytes of the same patients. The amount of two membrane components (sialic acid and cholesterol) are, also, determined. The results are compared with controls.

Two  $^{125}I$ -labelled bands (band I and II) are detected in the autoradiography of controls. Band I is absent in all patients, while band II is present in only 4 of 7 patients studied. 6 of the patients have additional one or more bands with lower molecular weights than band I or band II.

The protein staining of the gels prepared for autoradiography reveals additional bands migrating between band I and band II in patient group.

ALPase, total ATPase,  $Mg^{2+}$  ATPase activities were higher in patients than the controls ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively). On the other hand, the differences of the 5'N activities between the control and patient groups were found to be non-significant ( $P > 0.05$ ).

A correlation between 5'N and ALPase is found in A-T patients ( $r = 0.74$ ,  $P < 0.02$ ) and not in controls.

The differences of sialic acid and cholesterol levels in two groups are not found to be significant, statistically ( $P > 0.05$  and  $P > 0.05$ ).

Autoradiographic and enzyme measurement results are discussed in relation to possible alterations in lymphocyte membrane protein from A-T patients.

K A Y N A K L A R

1. Paterson, C.M. ve Smith, P.J., *Ataxia telangiectasia : An inherited human disorder involving hypersensitivity to ionizing radiation and related DNA damaging chemicals, Ann Rev Genet, 13, 291-318 (1979).*
2. Painter, R.B. ve Young, B.R., *Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia : a new explanation, Proc Natl Acad Sci USA, 77, 7315-7317 (1980).*
3. Al Saadi, A., Palutke, M. ve Kumar, G.K., *Evolution of chromosomal abnormalities in sequential cytogenetic studies of ataxia-telangiectasia, Hum Genet, 55, 23-29 (1980).*
4. Tamura, T., Chiba, S., Abo, W., Chiba, Y. ve Nakao, T., *Cytomegalovirus-specific lymphocyte transformations in subjects of different ages with primary immunodeficiency, Infect Immun, 28, 49-53 (1980).*
5. Mumane, J.P. ve Painter, R.B., *Altered protein synthesis in ataxia-telangiectasia fibroblasts, Biochemistry, 22, 1217-1222 (1983).*
6. Setlow, R.B., *Repair deficient human disorders and cancer, Nature, 271, 713-717 (1978).*
7. Sheridan, R.B. ve Huang, P.C., *Superoxide dismutase and catalase activities in ataxia telangiectasia and normal fibroblast cell extracts, Mutat Res, 61, 381-386 (1979).*
8. Arkel, Y.S., Kinchelov, T.E., Oleske, J., Searle, B.M. ve Desposito, F.,

- Ataxia telangiectasia with thrombasthenia, platelet dysfunction, and a chromosomal translocation. A monoclonal defect?, *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 3, 27-33 (1981).
9. Weisbart, R.H., Kacena, A., Golde, D.W. ve Costea, N.V., Impaired cellular interactions involving lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia and ataxia-telangiectasia, *J Lab. Clin Med*, 96, 114-118 (1980).
  10. Saxon, A., Stevens, R.H. ve Golde, D.W., Helper and suppressor t-lymphocyte leukemia in ataxia telangiectasia, *N Eng J Med*, 300, 700-704 (1979).
  11. Garcia-Rozas, C., Palaza, A., Diaz-Espada, F., Kreisler, M. ve Martinez-Alonso, C., Alkaline phosphatase activity as a membrane marker for activated B cells, *J Immunol*, 129, 52-55 (1982).
  12. Peterson, R.D.A., Kelley, W.D. ve Good, R.A., Ataxia-telangiectasia : Its association with a defective thymus, immunological deficiency disease and malignancy, *Lancet*, 1, 1189-1193 (1964).
  13. Waldmann, T.A., Broder, S., Goldman, C.K., Frost, K., Krosmeier, S.J. ve Medici, M.A., Disorders of B cells and helper T cells in the pathogenesis of the immunoglobulin deficiency of patients with ataxia telangiectasia, *J Clin Invest*, 71, 282-295 (1983).
  14. Waldmann, T.A. ve McIntire, K.R., Serum-alpha-fetoprotein levels in patients with ataxia-telangiectasia, *Lancet*, 2, 1112-1115 (1972).
  15. Hecht, F., Koler, R.D., Rigas, D.A., Dahnke, S.G., Case, M.P. ve Tisdale, V., Leukaemia and lymphocytes in ataxia-telangiectasia, *Lancet*, 2, 1193 (1966).



16. Swift, M., Sholman, L., Perry, M. ve Chase, C., Malignant neoplasms in the families of patients with ataxia-telangiectasia, *Cancer Res*, 36, 209-215 (1976).
17. Gotoff, S.P., Amirmokri, E. ve Leibner, E.J., Ataxia telangiectasia; neoplasia, untoward response to X-irradiation and tuberous sclerosis, *Am J Dis Child*, 114, 617-625 (1967).
18. Morgan, J.L., Holcomb, T.M. ve Morrissey, R.W., Radiation reaction in ataxia telangiectasia, *Am J Dis Child*, 116, 557-558 (1968).
19. Tadjoeidin, M.K. ve Fraser, F.C., Heredity of ataxia telangiectasia (Louis-Bar syndrome), *Am J Dis Child*, 110, 64-68 (1965).
20. Natarajan, A.T. ve Meyers, M., Chromosomal radiosensitivity of ataxia telangiectasia cells at different cell cycle stages, *Hum Genet*, 52, 127-132 (1979).
21. Taylor, A.M.R., Metcalfe, J.A., Oxford, J.M., Harnden, D.G., Is chromatid-type damage in ataxia telangiectasia after irradiation at G<sub>0</sub> a consequence of defective repair? *Nature*, 260, 441-443 (1976).
22. Cohen, M.M., Sagi, M., Ben-Zur, Z., Schaalp, T., Voss, R. ve Kohn, G., Ataxia telangiectasia : Chromosomal stability in continuous lymphoblastoid cell lines, *Cytogenet Cell Genet*, 23, 44-52 (1979).
23. Scheres, J.M.J.C., Hustinx, T.W.J. ve Weemaes, C.M.R., Chromosome 7 in ataxia telangiectasia, *J Pediatr*, 97, 440-441 (1980).
24. Taylor, A.M.R., Oxford, J.M. ve Metcalfe, J.A., Spontaneous cytogenetic abnormalities in lymphocytes from thirteen patients with ataxia telangiectasia, *Int J Cancer*, 27, 311-319 (1981).

25. McCaw, B.K., Hecht, F., Hamden, D.G. ve Teplitz, R.L., Somatic rearrangement of chromosome 14 in human lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, 2071-2075 (1975).
26. Hecht, F., McCaw, B.K. ve Koler, R.D., Ataxia-telangiectasia-clonal growth of translocation lymphocytes, *N Eng J Med*, 289, 286-291 (1973).
27. Shaham, M., Becker, Y. ve Cohen, M.M., A diffusible clastogenic factor in ataxia telangiectasia, *Cytogenet Cell Genet*, 27, 155-161 (1980).
28. Gülmezoğlu, E., "Bağışıklığın Temelleri", Sevinç Matbaası, Ankara, s. 54-59 (1983).
29. Junqueira, L.C., Carneiro, J. ve Contopoulos, A.N., "Basic Histology" Lange Medical Publications, Los Altos California, s. 233-237 (1975).
30. Stryer, L., "Biochemistry", W.H. Freeman and Company, San Francisco, s. 205-231 (1981).
31. Long, G., DeChatelet, L.R., McCall, C.E., Bass, D.A. ve Cooper, M.R., Distinction between alkaline phosphatase and  $Mg^{2+}$ -ATPase of human polymorphonuclear leucocyte, *Biochem Med*, 22, 88-97 (1979).
32. Smith, G.P. ve Peters, T.J., Subcellular localization and properties of pyridoxal phosphate phosphatase of human polymorphonuclear leucocytes, and their relationship to acid and alkaline phosphatase, *Biochim Biophys Acta*, 661, 287-294 (1981).
33. Culvenor, J.G., Harris, A.W., Mandel, T.E., Whitelaw, A. ve Ferber, E., Alkaline phosphatase in hematopoietic tumor cell lines of the mouse : high activity in cells of the B lymphoid lineage, *J Immunol*, 126, 1974-1977 (1981).

34. Ruuskanen, O.J., Peilliniemi, L.J. ve Kouvalainen, K.E., Alkaline phosphatase in differentiating guinea pig thymocytes : an ultra-cytochemical study, *J Immunol*, 114, 1611-1615 (1975).
35. Hugon, J. ve Borgers, M., Submicroscopic localization of alkaline phosphatase in the duodenum of the rat, *Exp Cell Res*, 45, 698-702 (1967).
36. Lietz, H., Böcker, W. ve Gröblichhoff, M., Immunochemical demonstration of intestinal alkaline phosphatase, *Histochemistry*, 42, 181-191 (1974).
37. Griffin, M.J., Cox, R.P. ve Grujic, N., A chemical method for the isolation of HeLa cell nuclei and the nuclear localization of HeLa cell alkaline phosphatase, *J Cell Biol*, 33, 200-203 (1967).
38. Franke, W.W., Deumling, B., Erman, B., Jarasch, E. ve Kleinig, H., Nuclear membranes from mammalian liver. I. Isolation procedure and general characterization, *J Cell Biol*, 46, 379-395 (1970).
39. Nesmeyanova, M.A., Tsfasman, I.M. ve Kulaev, I.S., Changes of the membrane protein composition in the mutants on regulatory genes of *Escherichia Coli* alkaline phosphatase, *FEBS Lett*, 124, 210-214 (1981).
40. Wray, L.K. ve Harris, H., Monoclonal antibodies to an ectopically expressed alkaline phosphatase in a human malignant cell line, *Cancer Res*, 43, 758-762 (1983).
41. Graham, J.M., Surface membrane enzymes in neoplasia, "Surfaces of Normal and Malignant Cells" (Ed. Hynes, R.O.), John Wiley and Sons Ltd., Chichester, New York, s. 199-246 (1979).

42. Berwick, L. ve Coman, D.R., *Some chemical factors in cellular adhesion and stickiness*, *Cancer Res*, 22, 982-987 (1962).
43. Miedema, E. ve Kruse, P.F., *Effect of prednisolone and contact phenomena on the alkaline phosphatase activity of HEp-2 cells*, *Biochem Biophys Res Commun*, 26, 704-711 (1967).
44. Rubini, J.R., Keller, S. ve McCall, M.S., *Inhibition of triated thymidine incorporation into DNA by alkaline phosphatase preparations*, *Cancer Res*, 24, 655-661 (1964).
45. Kramers, M.T.C., Catavsky, D. ve Foa, R., *Cell membrane enzymes : II. Alkaline phosphatase and alkaline phosphodiesterase I in normal and leukaemic lymphocytes*, *Br J Haematol*, 40, 111-118 (1978).
46. Misra, D.N., Ladoulis, C.T., Estes, L.W. ve Gill III, T.J., *Biochemical and enzymatic characterization of thymic and splenic lymphocyte plasma membranes from inbred rats*, *Biochemistry*, 14, 3014-3024 (1975).
47. Thompson, L.F., Boss, G.R., Spiegelberg, H.L., Jansen, I.V., O'Connor, R.D. ve Seegmiller, J.E., *Ecto-5'-nucleotidase activity in T and B lymphocytes from normal subjects and patients with congenital X-linked agammaglobulinemia*, *J Immunol*, 123, 2475-2478 (1979).
48. Widnell, C.C., *Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in subcellular fractions of rat liver*, *J Cell Biol*, 52, 542-558 (1972).
49. Warley, A. ve Cook, G.M., *The isolation and characterization of plasma membranes from normal and leukaemic cells of mice*, *Biochim Biophys Acta*, 323, 55-68 (1973).
50. Pletsch, Q.A. ve Coffey, J.W., *Studies on 5'-nucleotidase of rat liver*, *Biochim Biophys Acta*, 276, 192-205 (1972).

51. Carson, D.A., Kaye, J., Matsumoto, S., Seegmiller, J.E. ve Thompson, L., Biochemical basis of the enhanced toxicity of deoxyribonucleosides toward malignant human T cell lines, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 2430-2433 (1979).
52. Losa, G., Morell, A. ve Barandun, S., Correlations between enzymatic and immunologic properties of human peripheral blood mononuclear cells, *Am J Pathol*, 107, 191-201 (1982).
53. Thompson, L.F., Saxon, A., O'Connor, R.D. ve Fox, R.I., Ecto-5'-nucleotidase activity in human T cell subsets, *J Clin Invest*, 71, 892-899 (1983).
54. Widnell, C.C. ve Unkeless, J.C., Partial purification of a lipoprotein with 5'-nucleotidase activity from membranes of rat liver cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 61, 1050-1057 (1968).
55. Gurd, J.W. ve Evans, W.H., Distribution of liver plasma membrane 5' nucleotidase as indicated by its reaction with anti-plasma membrane serum, *Arch Biochem Biophys*, 164, 305-311 (1974).
56. Tanaka, R., Sakamoto, T. ve Sakamoto, Y., Mechanism of lipid activation of Na, K, Mg-activated adenosine triphosphatase and K, Mg-activated phosphatase of bovine cerebral cortex, *J Membr Biol*, 4, 42-51 (1971).
57. Fleit, H., Conklyn, M., Stebbins, R.D. ve Silber, R., Function of 5' nucleotidase in the uptake of adenosine from AMP by human lymphocytes, *J Biol Chem*, 250, 8889-8892 (1975).
58. Lichtman, A.H., Segel, G.B., Lichtman, M.A., Calcium transport and calcium ATPase activity in human lymphocyte plasma membrane vesicles, *J Biol Chem*, 256, 6148-6154 (1981).

59. Cohen, A., Mansour, A., Dosch, H. ve Gelfand, E.W., Association of a lymphocyte purine enzyme deficiency (5'-nucleotidase) with combined immunodeficiency, *Clin Immunol Immunopathol*, 15, 245-250 (1980).
60. Pilz, R.B., Willis, R.C. ve Seegmiller, J.E., Regulation of human lymphoblast plasma membrane 5'-nucleotidase by zinc, *J Biol Chem*, 257, 13544-13549 (1982).
61. Swallow, D.M., Aziz, I., Hopkinson, D.A. ve Miwa, S., Analysis of human erythrocyte 5'-nucleotidase in healthy individuals and a patient deficient in pyrimidine 5'-nucleotidase, *Ann Human Genet*, 47, 19-23 (1983).
62. Gilbett, E.R., Anderson, J.E., Cohen, F., Pollara, B. ve Meuwissen, H.J., Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity, *Lancet*, 2, 1067-1069 (1972).
63. Cohen, A., Doyle, D., Martin, D. ve Amman, A., Abnormal purine metabolism and purine over production in a patient deficient in purine nucleoside phosphorylase, *N Engl J Med*, 295, 1449-1454 (1976).
64. Johnson, S.M., Asherson, G.L., Watts, R.W.E., North, M.E., Allsop, J. ve Webster, A.D.B., Lymphocyte purine 5'-nucleotidase deficiency in primary hypogammaglobulinaemia, *Lancet*, 1, 168-170 (1977).
65. Edwards, N.L., Magilavy, D.B., Cassidy, J.T. ve Fox, I.H., Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase deficiency in agammaglobulinemia, *Science*, 201, 628-630 (1978).
66. Edwards, N.L., Cassidy, J.T. ve Fox, I.H., Lymphocyte 5'-nucleotidase deficiency in hypogammaglobulinemia : Clinical characteristics, *Clin Immunol Immunopathol*, 17, 76-88 (1980).

67. Quagliata, F., Faig, D., Conklyn, M. ve Silver, R., Studies on the lymphocyte 5'-nucleotidase in chronic lymphocytic leukemia, infectious mononucleosis, normal subpopulations, and phytohemagglutinin-stimulated cells, *Cancer Res*, 34, 3197-3202 (1974).
68. Reaman, G.H., Levin, N., Muchmore, A., Holiman, B. ve Poplack, D.G., Diminished lymphoblast 5'-nucleotidase activity in acute lymphoblastic leukemia with T-cell characteristic, *N Eng J Med*, 300, 1374-1377 (1979).
69. Poplack, D.G., Blatt, J. ve Reaman, G., Purine pathway enzyme abnormalities in acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Res*, 41, 4824-4832 (1981).
70. Koya, M., Kanoh, T., Sawada, H., Uchino, H. ve Ueda, K., Adenosine deaminase and ecto-5'-nucleotidase activities in various leukemias with special reference to blast crisis : Significance of ecto-5'-nucleotidase in lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia, *Blood*, 58, 1107-1111 (1981).
71. Schuurman; S., Stekhoven, F. ve Bonting, S.L., Transport adenosine triphosphatase; properties and functions, *Physiol Rev*, 61, 1-76 (1981).
72. Black, B.L., McDonald, J.M. ve Jarett, L., Characterization of  $Mg^{2+}$ - and  $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase activity in adipocyte endoplasmic reticulum, *Arch Biochem Biophys*, 199, 92-102 (1980).
73. Chung, C., Elliott, R.L. ve Mego, J.L., Lysosomal membrane adenosine triphosphatase; solubilization and partial characterization, *Arch Biochem Biophys*, 203, 251-259 (1980).

74. Ohnishi, T., Suzuki, T., Suzuki, Y. ve Ozawa, K., A comparative study of plasma membrane  $Mg^{2+}$ -ATPase activities in normal, regenerating and malignant cells, *Biochim Biophys Acta*, 684, 67-74 (1982).
75. Bertoni, J.M., Inhibition of rat brain microsomal  $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase and  $K^{+}$ -p-nitrophenylphosphatase by periodic acid, *Biochim Biophys Acta*, 688, 101-106 (1982).
76. Agren, G., Nilsson, K. ve Ronquist, G.,  $Mg^{2+}$  - and  $Ca^{2+}$  -stimulated ATPase at the outer surface of human peripheral lymphocytes and hematopoietic cell lines. Correlation between enzyme activity and immunoglobulin secretion, *Acta Physiol Scand*, 98, 67-73 (1976).
77. Dorand, J., Reminiac, C. ve Mani, J., Studies of  $(Na^{+}+K^{+})$  sensitive ATPase activity in pig lymphocytes, *Biochim Biophys Acta*, 509, 194-200 (1978).
78. Knowles, A.F. ve Kaplan, N.O., Variable ATPase composition of human tumor plasma membranes, *Biochem Biophys Res Commun*, 99, 1443-1448 (1981).
79. Ellegaard, J. ve Dimitrov, N.V., ATP-ase activity of lymphocytes from normal individuals and patients with cancer, *Cancer*, 30, 881-884 (1972).
80. Dimitrov, N.V. ve Ellegaard, J., Elevated lymphocyte adenosine triphosphatase activity in patients with gastrointestinal carcinoma, *N Engl J Med*, 286, 353-355 (1972).
81. Ellegaard, J., Traunberg, H. ve Esmann, V., Lymphocyte ATPase activity in treated cases of Hodgkin's disease, *Scand J Haematol*, 15, 88-95 (1975).



82. Ellegaard, J. ve Toft, A., Lymphocyte ATPase activity in patients with carcinoma of the larynx, *Acta Otolaryngol*, 89, 555-561 (1980).
83. Boyum, A., Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g., *Scand J Lab Invest*, 21 (Suppl. 27), 77-89 (1968).
84. Pettegrew, J.W., Nichols, J.S. ve Stewart, R.M., Membrane studies in Huntington's disease : Steady state and time-dependent fluorescence spectroscopy of intact lymphocytes, *J Neurochem*, 36, 1966-1976 (1981).
85. Kaplow, L.S., Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride, *Blood*, 26, 215-219 (1965).
86. Smith, W.I., Ladoulis, C.T., Misra, D.N., Gill III, T.J. ve Bazin, H., Lymphocyte plasma membranes, III. Composition of lymphocyte plasma membranes from normal and immunized rats, *Biochim Biophys Acta*, 382, 506-525 (1975).
87. Weber, K., Pringle, J.R. ve Osborn, M., Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel, "Methods in Enzymology" (Ed. Hirs, C.H.W. ve Timashef, S.N.) Academic Press New York London, 26, 3-27 (1972).
88. Ho, N.N.Y., Direct autoradiography of cylindrical gels, introducing a simple longitudinal gel slicer, *Anal Biochem*, 97, 51-55 (1979).
89. Barritault, D.S. ve Hayes, D.H., Rapid scanning of <sup>32</sup>P-labeled acrylamide gels, *Anal Biochem*, 53, 272-277 (1973).
90. Neumann, H., Klein, E., Hauck-Granoth, R., Yachnin, S. ve Ben-Bassat, H., Comparative study of alkaline phosphatase activity in lymphocytes,

mitogen-induced blasts, lymphoblastoid cell lines, acute myeloid leukemia and chronic lymphatic leukemia cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 73, 1432-1436 (1976).

91. Michell, R.H. ve Hawthorne, J.N., The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver, *Biochem Biophys Res Commun*, 21, 333-338 (1965).
92. Dupus, G. ve Doucet, J.P., Electrophoretic studies of protein constituents of pig spleen lymphocyte plasma membrane and of a non-ionic detergent extract of intact cells, *Biochim Biophys Acta*, 669, 157-170 (1981).
93. Ames, B.N., Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases, "Methods in Enzymology" (Ed. Neufeld, E.F. ve Ginsburg, V.) Academic Press, New York London, 8, 115-118 (1966).
94. Dornand, J., Mani, J.C., Mousseron-Conet, M. ve Pau, B., Propriétés d'une ATPase  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  dependante des membranes plasmiques de lymphocytes. Effect de la concanavaline A sur les ATPases membranaires, *Biochimie*, 56, 1425-1432 (1974).
95. Pau, B., Dornand, J. ve Mani, J.C., Etude cinétique de l'activité ATPases activée par  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  des membranes plasmiques lymphocytaires, *Biochimie*, 58, 593-599 (1976).
96. Warren, L., The thiobarbituric acid assay of sialic acids, *J Biol Chem*, 234, 1971-1975 (1959).
97. Spiro, R.G., Analysis of sugars found in glycoproteins, "Methods in Enzymology" (Ed. Neufeld, E.F. ve Ginsburg, V.) Academic Press, New York London, 8, 3-26 (1966).

98. Leffler, H.H. ve McDougald, H., Estimation of cholesterol in serum, *Am J Clin Pathol*, 39, 311-315 (1963).
99. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193, 265-271 (1951).
100. Ersoy, F. ve Berkel, A.İ., Clinical and immunological studies in twenty families with ataxia-telangiectasia, *Turk J Pediatrics*, 16, 145-160 (1974).
101. Jondal, M., Holm, G. ve Wigzell, H., Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells, *J Exp Med*, 136, 207-215 (1977).
102. Fahey, J.L. ve McKelvey, E.M., Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates, *J Immunol*, 94, 84-90 (1965).
103. Sümbüloğlu, K., "Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik", Çağ Matbaası, Ankara (1978).
104. Rohlf, F.J. ve Sokal, R.R., "Statistical Tables", W.H. Freeman and Company, San Francisco (1969).
105. Bridges, B.A. ve Hamden, D.G., Untangling ataxia-telangiectasia, *Nature*, 289, 222-223 (1981).
106. O'Connor, R.D. ve Linthicum, D.S., Mitogen receptor redistribution defects and concomitant absence of blastogenesis in A-T T lymphocytes, *Clin Immunol Immunopathol*, 15, 66-75 (1980).
107. German, J., Chromosome-breakage syndromes : diferent genes, different

treatments, different cancers, *Basic Life Sci*, 15, 429-439 (1980).

108. Goodman, S.R., Shiffer, K.A., Casoria, L.A. ve Eyster, M.E., Identification of the molecular defect in the erythrocyte membrane skeleton of some kindreds with hereditary spherocytosis, *Blood*, 60, 772-784 (1982).
109. Smith, J.E., Moore, K., Arens, M., Rinderknecht, G.A. ve Ledet, A., Hereditary elliptocytosis with protein band 4.1 deficiency in the dog, *Blood*, 61, 373-377 (1983).
110. Dhermy, D., Lecomte, M.C., Garbarz, M., Boumier, O., Galand, C., Gautero, H., Feo, C., Alloiso, N., DeLaunay, J. ve Boivin, P., Spectrin  $\beta$ -chain variant associated with hereditary elliptocytosis, *J Clin Invest*, 70, 707-715 (1982).
111. Lawler, J., Liu, S., Palek, J. ve Prchal, J., Molecular defect of spectrin in hereditary pyropoikilocytosis, *J Clin Invest*, 70, 1019-1030 (1982).
112. Hecht, F. ve McCaw, B.K., Ataxia-telangiectasia : the primary defect, *J Pediatr*, 93, 897-898 (1978).
113. Allan, D. ve Crumpton, M.J., Preparation and characterization of the plasma membrane of pig lymphocytes, *Biochem J*, 120, 133-143 (1970).
114. Cox, G.S., Park, K.C., Induction of alkaline phosphatase and glycoprotein hormone alfa-subunit in HeLa cells by inhibitors of DNA polymerase, *Arch Biochem Biophys*, 216, 234-246 (1982).
115. Edwards, M.J., Taylor, A.M. ve Duckworth, G., An enzyme activity in normal and ataxia-telangiectasia cell lines which is involved in the repair of gamma-irradiation-induced DNA damage, *Biochem J*, 188, 677-682 (1980).

116. Harigaya, K., Mikata, A., Suzuki, H., Ohiski, T., Kageyama, K., Minato K. ve Shimoyama, M.,  $Mg^{2+}$ -dependent adenosine triphosphatase as an enzyme histochemical marker for lymphomas of B-cell origin, *Am J Pathol*, 97, 359-370 (1979).
117. Vlodavsky, I. ve Sachs, L., Difference in the cellular cholesterol to phospholipid ratio in normal lymphocytes and lymphocytic leukaemic cells, *Nature*, 250, 67-68 (1974).

## Ek 1. Çözeltiler

1. Fosfat tamponlu serum fizyolojik : % 0.9 NaCl içeren 0.01 M sodyum fosfat tamponu (pH=7.2).

2. Ficoll Isopaque : A) 34 g Isopaque, 66 ml distile suda çözülür.  
B) 18 g Ficoll 182 ml distile su içinde çözülür.

10 kısım A, 24 kısım B ile karıştırılır. Yoğunluğu 1.076-1.078 olunca-ya kadar distile su konur. Süzgeç kağıdından süzülür.

3. Tripan Blue : 1 ml % 2 lik Tripan Blue 6.5 ml PBS ile karıştırılır.

4. A) Alkol-formalin :

10 kısım % 37 lik formalin  
90 kısım absöü etanol, karıştırılır.

B) İnkubasyon karışımı :

% 30 etanol	100 ml
Benzidin dihidroklorür	0.3 g
0.132 M (% 3.8 w/v) ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.0 ml
Sodyum asetat (NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> .3H <sub>2</sub> O)	1.0 g
% 3 hidrojen peroksit	0.7 ml
1.0 N sodyum hidroksit	1.5 ml
Safranin O	0.2 g

sıra ile karıştırılır, süzülür ve saklanır.

5. Jelin hazırlanışı :

10.1 ml akrilamid çözeltisi (22.2 g akrilamid ve 0.6 g N,N'-metilen-bisakrilamid 100 ml distile suda çözülür),  
3 ml % 5 sodyum dodesil sülfat (SDS),  
0.4 ml distile su,  
15 ml jel tamponu (% 0.2 SDS içeren 0.2 M sodyumfosfat tamponu pH=7.2),  
1.5 ml % 1.5 amonyum persülfat,  
0.045 ml N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED)

karıştırılır ve elektroforez tüplerine dökülür.

6. Protein boyama çözeltisi :

Coomassie Brilliant Blue R 250	1.25 gr
Metanol	227 ml
Asetik asit	46 ml

500 ml ye distile su ile tamamlanır.

7. Protein boya yıkama çözeltisi :

Metanol	50 ml
Asetik asit	75 ml

1000 ml ye distile su ile tamamlanır.

8. İnorganik fosfat renk reaktifi :

1 kısım % 10 askorbik asit,  
6 kısım % 0.42 amonyum molibdat .  $4H_2O$  içeren  $1N H_2SO_4$

karıştırılır.

9. 0.2 M sodyum metaperiyodat : 9 M  $H_3PO_4$  içinde hazırlanır.

10. % 10 sodyum arsenit : 0.5 M sodyum sülfat içeren 0.1 N  $H_2SO_4$  içinde hazırlanır.

11. % 0.6 tiyobarbitürik asit : 0.5 M  $Na_2SO_4$  içinde hazırlanır.

12.  $FeCl_3$  çözeltisi : 500 mg  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  500 ml asetik asit içinde çözülür.

13. Protein renk reaktifi :

1 kısım % 1 sodyum veya potasyum tartarat içinde % 0.5  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$   
50 kısım 0.1 N NaOH içinde % 2  $Na_2CO_3$

karıştırılır.

## EK 2. EK TABLOLAR

Tablo 1 : Alkalen fosfataz aktiviteleri.

Kontrol Grubu	Aktivite (nmol PNP/dk/mg protein)	Hasta Grubu	Aktivite (nmol PNP/dk/mg protein)
1	0.85	1 (Ö.A.)	1.20
2	1.22	2 (Ş.A.)	1.82
3	1.20	3 (İ.B.)	2.63
4	0.93	4 (M.B.)	1.82
5	1.21	5 (O.Ç.)	2.11
6	0.83	6 (T.E.)	1.05
7	0.73	7 (M.K.)	1.53
8	0.64	8 (A.S.)	1.17
9	0.94	9 (B.S.)	1.25
10	1.24	10 (C.Y.)	2.11
Ort.±S.D.	0.98 ± 0.22	Ort.±S.D.	1.67 ± 0.52

Tablo 2 : 5' Nükleotidaz aktiviteleri.

Kontrol Grubu	Aktivite (nmol Pi/30 dk/mg protein)	Hasta Grubu	Aktivite (nmol Pi/30 dk/mg protein)
1	167.0	1 (Ö.A.)	65.9
2	129.0	2 (Ş.A.)	89.8
3	55.5	3 (İ.B.)	147.8
4	92.4	4 (M.B.)	194.0
5	52.7	5 (O.Ç.)	87.8
6	94.0	6 (T.E.)	17.0
7	52.3	7 (M.K.)	49.3
8	99.8	8 (A.S.)	56.5
9	89.0	9 (B.S.)	48.0
10	74.5	10 (C.Y.)	159.0
Ort.±S.D.	90.62 ± 36.22	Ort.±S.D.	91.51 ± 57.11



Tablo 3 : Total ATPaz aktiviteri.

Kontrol Grubu	Aktivite ( $\mu\text{mol Pi}/30 \text{ dk}/\text{mg protein}$ )	Hasta Grubu	Aktivite ( $\mu\text{mol Pi}/30 \text{ dk}/\text{mg protein}$ )
1	1.68	1 (Ö.A.)	1.83
2	2.15	2 (Ş.A.)	2.84
3	1.23	3 (İ.B.)	1.78
4	1.21	4 (M.B.)	1.41
5	1.61	5 (O.Ç.)	2.13
6	1.08	6 (T.E.)	1.22
7	1.55	7 (M.K.)	1.99
8	0.97	8 (A.S.)	1.79
9	1.67	9 (B.S.)	1.83
10	1.34	10 (C.Y.)	2.50
Ort. $\pm$ S.D.	1.45 $\pm$ 0.35	Ort. $\pm$ S.D.	1.93 $\pm$ 0.48

Tablo 4 :  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaz aktiviteri.

Kontrol Grubu	Aktivite ( $\mu\text{mol Pi}/30 \text{ dk}/\text{mg protein}$ )	Hasta Grubu	Aktivite ( $\mu\text{mol Pi}/30 \text{ dk}/\text{mg protein}$ )
1	0.02	1 (Ö.A.)	0.22
2	0.32	2 (Ş.A.)	0.27
3	0.07	3 (İ.B.)	0.22
4	-	4 (M.B.)	0.10
5	0.29	5 (O.Ç.)	0.22
6	-	6 (T.E.)	0.31
7	-	7 (M.K.)	0.04
8	-	8 (A.S.)	0.40
9	0.12	9 (B.S.)	0.12
10	0.15	10 (C.Y.)	0.05

Tablo 5 : Mg<sup>+2</sup> ATPaz aktiviteleri.

Kontrol Grubu	Aktivite ( $\mu\text{mol Pi}/30 \text{ dk}/\text{mg protein}$ )	Hasta Grubu	Aktivite ( $\mu\text{mol Pi}/30 \text{ dk}/\text{mg protein}$ )
1	1.60	1 (Ö.A.)	1.93
2	2.35	2 (Ş.A.)	2.99
3	1.36	3 (İ.B.)	1.55
4	1.29	4 (M.B.)	1.20
5	1.66	5 (O.Ç.)	1.85
6	0.81	6 (T.E.)	1.13
7	1.79	7 (M.K.)	2.03
8	1.18	8 (A.S.)	1.74
9	1.75	9 (B.S.)	1.89
10	1.14	10 (C.Y.)	3.06
Ort.±S.D.	1.49 ± 0.43	Ort.±S.D.	1.94 ± 0.65

Tablo 6 : Siyalik asit miktarları.

Kontrol Grubu	Siyalik asit (nmol/mg protein)	Hasta Grubu	Siyalik asit (nmol/mg protein)
1	12.64	1 (Ö.A.)	7.12
2	18.81	2 (Ş.A.)	21.75
3	23.41	3 (İ.B.)	15.46
4	15.60	4 (M.B.)	16.90
5	14.25	5 (O.Ç.)	15.52
6	16.78	6 (T.E.)	13.87
7	16.76	7 (M.K.)	16.54
8	20.95	8 (A.S.)	12.90
9	14.96	9 (B.S.)	16.30
10	12.33	10 (C.Y.)	- *
Ort.±S.D.	16.65 ± 3.55	Ort.±S.D.	15.15 ± 3.89

\* : Bu hastanın siyalik asit miktarı ölçülmemiştir.

Tablo 7 : Kolesterol miktarları.

Kontrol Grubu	Kolesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	Hasta Grubu	Kolesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
1	95.0	1 (Ö.A.)	- *
2	143.7	2 (Ş.A.)	181.8
3	140.7	3 (İ.B.)	148.7
4	115.9	4 (M.B.)	132.1
5	153.7	5 (O.Ç.)	125.4
6	114.8	6 (T.E.)	146.6
7	148.4	7 (M.K.)	132.2
8	175.2	8 (A.S.)	165.3
9	99.1	9 (B.S.)	351.9
10	87.7	10 (C.Y.)	75.8
Ort. $\pm$ S.D.	127.42 $\pm$ 29.02	Ort. $\pm$ S.D.	162.20 $\pm$ 77.00

\* : Bu hastanın kolesterol miktarı ölçülmemiştir.