

283870

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**NORMAL VE MALİGN LENFOPROLİFERATİF HASTALIKLARDA
CON A VE ANS ARACILIĞI İLE HÜCRE YÜZEY ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

**BİOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

ASLIHAN TURHAN

ANKARA - 1982

21

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

NORMAL VE MALİGN LENFOPROLİFERATİF HASTALIKLARDA
CON A VE ANS ARACILIĞI İLE HÜCRE YÜZEY ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

BİOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

ASLIHAN TURHAN

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : Doç. Dr. KAYA EMERK

ANKARA - 1982

Bilim Uzmanlığı çalışmalarımın başından beri gösterdiği sabırlı ve titiz rehberliği için değerli hocam Doç. Dr. Kaya Emerk ile, beni tez çalışması yönünde büyük özendirici ve katkıları ile yönlendiren ve çalışmam süresince gösterdiği hoşgörü nedeniyle araştırma asistanı olduğum laboratuvarın sorumlusu Doç. Dr. Emin Kansu'ya teşekkürü borç bilirim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
I. GİRİŞ	1
I.1. Lenfositler	1
I.2. Bağışıklık Sisteminin İşleyişi	4
I.3. Lektinler Hakkında Genel Bilgi	6
I.4. Hücre Zarı	9
I.5. Transformasyon ile Gelişen Değişiklikler ..	14
I.6. Lenfoproliferatif Hastalıklar	19
I.6.1. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)	20
I.6.2. Hairy Cell Lösemi (HCL)	23
I.7. Amaç	26
II. ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER	27
II.1. Araç ve Gereçler	27
II.2. Yöntemler	27
II.2.1. Lenfosit Ayrımı	27
II.2.2. Lenfosit Altgruplarının Sayısal Değerlen- dirilmesi	29
II.2.3. B-Lenfositlerinin Saflaştırılması	31
II.2.4. Protein Tayinleri	32
II.2.5. Radyoaktivite Sayımları	32
II.2.6. ³ H-Con A'nın Hazırlanması	33
II.2.7. Mikrohemaglutinasyon	33

II.2.8. Mikrofüj Tekniği ile Bağlanma Deneyi	34
II.2.9. Assosiasyon Sabiti (Ka) ve Reseptör Sayısı (N)'nin Hesaplanması	35
II.2.10. Fluorometrik Tayinler	37
III. BULGULAR	40
III.1. Hasta Gruplarında T ve B-Lenfositlerinin Sayısal Değerlendirilmesi	40
III.2. ³ H-Concanavalin A ile Hücrelerde Con A Reseptör Sayılarının ve Affinitelerinin İncelenmesi	43
III.3. Hücrelerde ANS Bağlanma Yerlerinin Sayı ve Affinitelerinin İncelenmesi	50
III.4. Hücrelerde ANS Bağlanma Yerleri ile Triptofan Molekülleri Arasındaki Uzaklığın (r) incelen- mesi	52
IV. TARTIŞMA	53
ÖZET	60
KAYNAKLAR	62

I- G İ R İ Ő

I.1. Lenfositler

Kanın Őekilli elemanlarından l6kositler kapsamında bulunan lenfositler v6cut savunmasında rol alan h6crelerdir. Lenfositler morfolojik olarak genellikle oval, 8-12 mikron arasında 7apları olan, yoğun bir n6kleer kromatin ve ince bir sitoplazma i7eren h6crelerdir. Sitoplazmalarında glikojen, mitokondrisel enzimler ve lizozomal hidrolazlar yer alır.

Kemik iliğindeki stem h6crelerinden kaynaklanan lenfositlerin bir kısmı timus yolu ile programlanarak geliŐimlerini tamamlarlar ve periferel dokulara ge7erler. Bu h6crelere T-lenfositleri adı verilir, v6cutta h6cresel bağışıklıktan sorumludurlar. Kemik iliğinden ayrılan diğer bir grup stem h6creleri ise periferel lenfoid dokulara ge7er ve insanda, kuŐlardaki Bursa Fabricius'a eşdeğer bir lenfoid dokuda (6rneğin: kemik iliği) farklılaşma g6stererek, B-lenfositlerine d6n6Ő6rl6r. B-lenfositleri, h6moral immuniteden sorumlu h6crelerdir. Lenfositler kapsamına giren 676nc6 h6cre grubu da "Null" lenfositler adını almaktadır (1).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda , Null lenfositlerin membranlarındaki paralel tübüler düzenlerin morfolojik belirleyici olarak kullanılabileceği ve diğer iki lenfosit grubundan ayırd etmede yararlanılabileceği öne sürülmektedir (2).

Böylelikle, T, B ve Null lenfosit olmak üzere üç alt sınıftan oluşan lenfositlerin sayısal değerlendirilmesinde yüzey belirleyicileri esas alınır. T-lenfositleri için yüzey belirleyicileri:

1. Koyun eritrosit reseptörleri, ve
2. Yüzey antijenleri'dir.

Bunlardan başka T-lenfositleri zarsal ATPaz enzimi içerirler.

B-lenfositleri için yüzey belirleyicileri:

1. Yüzey immünoglobülinleri
2. Kompleman reseptörleri
3. Fc-reseptörleri, ve
4. Eritrosit reseptörleri'dir. (Sensitize edilmiş koyun eritrositleri ve fare, maymun eritrositleri).

B-lenfositleri, ayrıca, zarsal 5'nükleotidaz enzimi içerirler.

Null lenfositler ise yüzey özellikleri açısından çok türellilik (heterogenity) göstermektedir ve özellikleri halen tam bir açıklık kazanmamıştır (1).

T-lenfositleri: Timusta işlem gören ve bu işlem sırasında yüzey özellikleri ve etkinlikleri değişen T-lenfositleri periferel lenfoid dokularda yer alırlar. Büyük oranda lenf bezlerinin parakortikal bölgesinde ve dalağın beyaz pulpasında periarteriolar kesiminde yerleşirler. T-lenfositleri, fakültatif organizmalara , doku ve organ graftlarına ve çeşitli viral enfeksiyonlara karşı oluşan bağışık etkinliklerde (gecikmiş hipersensitivite gibi) önemli rol oynarlar (3). Radyoaktif belirleyiciler, kromozom ve yüzey antijenik belirleyicileri kullanarak, lenfositlerin, T-lenfosit alt grubunun oluşturmak üzere timustan periferel dokulara göç ettiği saptanmıştır. Timus lenfositlerinin çoğu bağışıklık açısından tam olgunlaşmamıştır ve antijene cevap oluşturamaz. Bu farklılık da timustaki lenfositten periferel dolaşımdaki T-lenfositlerine geçişte bir diğer farklılaşma adımının olduğunu düşündürmektedir (4).

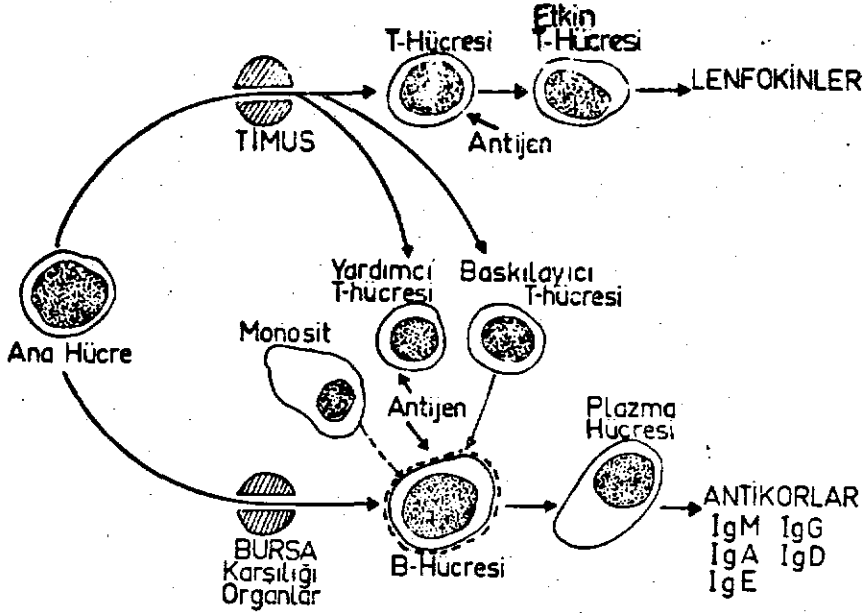
B-lenfositleri: Yüzey immünoglobülinine sahip olması ile diğer iki lenfosit alt grubundan kolaylıkla ayırd edilen B-lenfositleri, antijenik uyarım karşısında farklılaşmaya uğrar ve immünoglobülin salabilen plazma hücrelerine dönüşürler. Antijen ile uyarım sonucu B-lenfositinin plazma hücrelerine farklılaşmasını zarfda bulunan ve bir çeşit immünoglobülin yapısında olan bir reseptör yönlendirir. Bu immünoglobülin, 180 000 dalton molekül ağırlığında bir IgM

monomeridir. B-lenfositinin zarında, daha sonra, dalaktaki farklılaşma olayları sırasında IgD belirler (5).

B-lenfositlerinin tüm yüzeyine dağılmış olan bu immunoglobülin molekülleri, hücre 37°C'da tutulduğunda hücrenin bir kutbuna toplanmakta ve kutuplaşma (capping) adı verilen olay gerçekleşmektedir. Kutuplaşmanın hücre yüzeyi reseptörlerinin yeniden dağılımına olanak veren konformasyon değişimlerinde etkili olması yanında lenfositin plazma hücrelerine farklılaşması sürecindeki işlemlerin bir parçasını oluşturması da söz konusudur (3). Kutup oluşumu hücre zarının akışkanlığı (fluidity) ile ilgili bir olaydır.

I.2. Bağışıklık Sisteminin İşleyişi:

Bağışık yanıt, bir canlının vücuduna antijen niteliği olan yabancı bir maddenin girmesi halinde organizmanın oluşturduğu özgül bir yanıttır (1). İki tip bağışık yanıt saptanmıştır. Birinde antikor oluşturulurken (hümorale bağışık yanıt) diğesinde (hücresele bağışık yanıt) antikor oluşumu gözlenmez. Hümorale bağışıklıktan sorumlu B-lenfositlerinin antikor salan plazma hücrelerine dönüşümünde yardımcı ve baskılayıcı T-lenfositleri etki gösterirler.



Şekil 1: Hücresel ve Hümorale Bağışıklık Sistemleri

Timusa bağımlı antijenlere cevap olarak T-lenfositleri yardımcı veya baskılayıcı T-lenfositleri olarak gelişim gösterirler. Yardımcı T-lenfositleri ile zarında IgM taşıyan B-lenfositleri arasındaki işbirliği sonucu IgG oluşturan B-lenfositlerinin yapımı gerçekleşir. Bağışıklık sisteminde T ve B lenfositlerine ek olarak, makrofajlara da gerek duyulmaktadır. Antijenin makrofajla etkileşiminin yardımcı T-lenfositlerinin uyarımı için de gerekli olduğu düşünülmektedir. Monositler ile lenfositlerin etkileşiminin lenfosit proliferasyonunda önemli bir adım olduğu, lektinlerle yapılan etkinleştirme çalışmalarlarıyla da saptanmıştır (6). Hücresel ve hümorale bağışıklık sistemleri Şekil 1'de şematize edilmiştir.

I.3. Lektinler Hakkında Genel Bilgi:

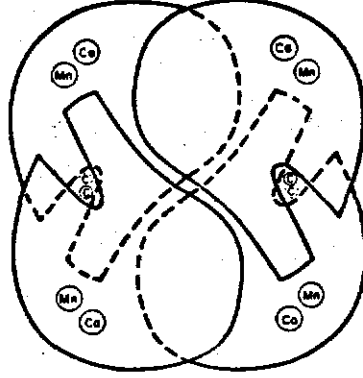
Lektinler yaklaşık 90 yıl önce, kırmızı küreleri kümeleştirme özelliklerinin gözlenmesi nedeniyle "hemaglutinler" olarak adlandırılmış olan bir grup bitkisel proteinlerdir. Daha sonraki çalışmalar ise, lektinlerin sadece kırmızı küreleri değil, lenfositleri, fibroblastları, spermatozoa'yı, bakteri ve mantarları da kümeleştirme özelliğine sahip olduklarını göstermiştir (7).

Lektinler kimyasal yapıları açısından büyük farklılıklar gösteren moleküllerdir. Amino asit bileşimi, molekül ağırlığı ve moleküler özellikleri açısından birbirinden çok değişik olan bu bileşiklerin ortak yönleri protein olmaları ve biyolojik etkinlik göstermeleridir (8). Lektinler ayrıca glikoproteinlerin affinite kromatografisi ile saflaştırılmasında, kan hücresi ayırımında, kan grubu tayininde kullanılmaktadır (9). Bazı bitkisel lektinlerin kanser hücrelerini aglütine ettikleri ancak onların neoplastik olmayan ana hücrelerine aynı etkiyi göstermedikleri saptanmıştır (10). Bu lektinler plazma zarındaki farklılaşmaların çalışılmasında sıklıkla kullanılmaktadır (10,11, 12). Farklı hücrelerin lektinler ile aglütinasyonunun lektine özgü şekerlerce inhibe edilebildiğinin gösterilmesi, lektinlerin hücre yüzeyinde özgül şekerlere bağlandığı sonucunu çıkarmıştır (8).

Hücrenin mitojenik lektinler ile transformasyonu çarpıcı değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişimler arasında önemle protein, RNA ve DNA sentezinde artmayı sayabiliriz. Ayrıca yağ asiti sentezi, karbohidrat metabolizması ve küçük moleküllerin alımında da artma olduğu bildirilmektedir. Özgül inhibitörler ile lektinin yüzeyden uzaklaştırılması çalışmalarından, tüm bu olayların lektinin hücre yüzeyine bağlanması ile kısa bir sürede gerçekleştiği saptanmıştır (8). Bramwell ve Harris'in yaptığı çalışmada malign hücrelerin zarındaki lektin reseptörlerinin, olağan dışı olarak dimerik formda olduğu normal hücrenin glikoprotein yapıdaki reseptörünün ise monomerik yapıda olduğu öne sürülmüştür (10).

Concanavalin A: Concanavalin A (Con A) molekül ağırlığı 27 000 olan iki özdeş alt birimden oluşan bir proteindir. pH 7'de tetramer, pH 4.5'da ise dimer haldedir ve iki sakkarit bağlama bölgesi vardır (7, 13). Saflaştırılan diğer pek çok lektinin aksine kovalent bağlı karbohidrat içermez ve dolayısıyla bir glikoprotein değildir. Con A α -D-mannopiranozu, α -D-glukopiranozu, D-fruktofuranoz ve glikozidlerini ve sterik olarak benzer yapıları bağlar ve bu sakkaritleri içeren diğer maddeler ile bileşke oluşturur. Con A şekerlere ek olarak Ca^{+2} ve Mn^{+2} bağlar. Yapıda Ca^{+2} bağlama bölgesi Mn^{+2} bağlama bölgesine 5.3 \AA uzak-

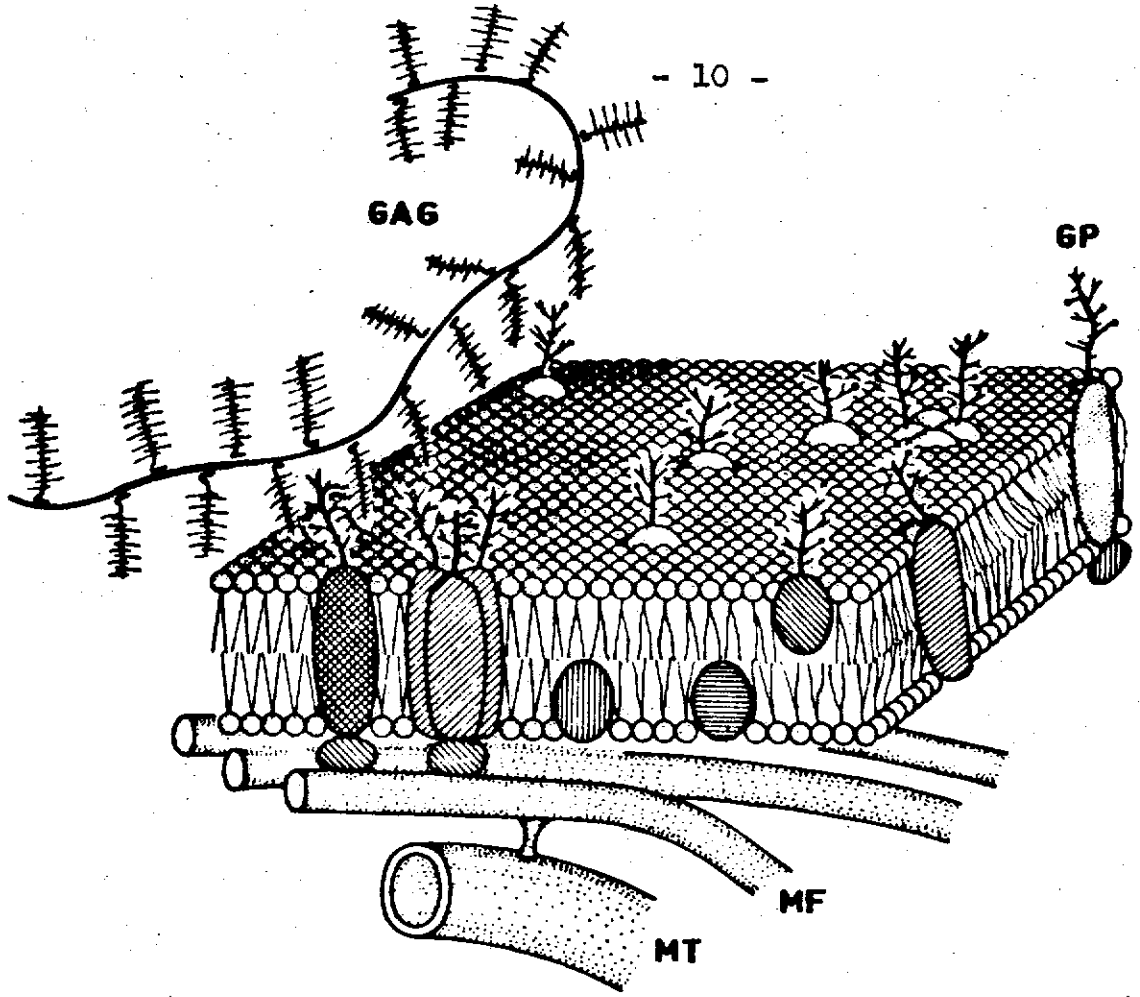
lıktadır. Kristal haldeki Con A tek polypeptid zincirinden oluşan alt birimler içerir ve bu alt birimler pH'ya bağlı assosiasyon göstermektedir. Alt birimler $42 \times 40 \times 29 \text{ \AA}^0$ boyutlarında globular proteinlerdir ve 238 amino asitten oluşurlar. Dört alt birim bir psödotetrahedral oluşturmak üzere bir araya gelir. Hakim yapısal özellik β -yapısında düzenlenen polypeptid zinciridir. β -yapısına girmeyen bölgeler serbest kıvrımlanma gösterir. Her bir alt birime bir sakkarit bağlanmaktadır (8). Con A'nın Ca^{+2} , Mn^{+2} , geçiş metal ionları ve sakkarit bağlama bölgelerinin doldurulmasında bir etkileşim olduğu göze çarpmıştır. Ca ionu ancak geçiş metal ionu bölgesi kaplandıktan sonra bağlanabilmekte ve sakkaritin bağlanabilmesi için her iki bölgenin doldurulmuş olması gerekmektedir. Con A'nın indirgenmeyen ucunda α -D-glukopiranozil, α -D-mannopiranozil, β -D-fruktofuranozil veya α -D-arabinofuranozil birimleri içeren bir çok polypeptidi çöktürme özgülüğü olduğu saptanmıştır. Con A'dan bivalent metal ionlarının uzaklaştırılması hücreyi aglütine etme yeteneğini yok etmektedir (7,14). Şekil 2'de Con A'nın tetramerik yapısı ve geçiş metal elementleri, Ca ve sakkaritlerin bağlanma bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 2: Concanavalin A'nın tetrametrik yapısı. Mn: geçiş metal elementleri Ca: Kalsiyum C:Sakkarit Bağlanma Bölgelerini İfade Etmektedir.

I.4. Hücre Zarı:

Genelde hücre zarı, özelde ise lenfosit zarı için sıvı mozaik model geçerliliğini korumaktadır. Bu modele göre, lipid ve protein karışımından oluşan zarda lipid birimlerinin hidrofobik kısımları birbirine bakacak şekilde çift tabaka oluşturmakta yapıdaki integral ve globular proteinler ise bazı bölgelerde glikoproteinleri oluşturacak şekilde lipid tabakaya gömülü olarak yer almaktadır (15). Şekil 3'de hücre zarı örneklenmiştir.



Şekil 3: Hücre zarının temsili şekli. GP: Glikoproteinler, GAG:Glukozaminoglikanlar, MT:mikrotübül, MF:mikrofilaman.

Zar kütlelerinin yarıya yakınının oluşturan lipidler 3 temel sınıfı ka samaktadır. Bu 3 temel sınıf fosfolipidler, nötral lipidler (özellikle kolesterol) ve glikolipidlerdir. Hepsi amfipatik olan bu moleküller, hidrofobik (polar) ve hidrofilik (polar olmayan) uçlar içermektedir. Bir çift tabakanın belirli bir sıcaklıktaki akışkanlığını bileşimi saptar. Bu sıcaklık da, fosfolipid grubunun doğası ve uzunluğu ile hidrokarbon yan zincirlerinin doymuşluk derecesine bağlıdır (16).

Zar kütlelerinin yarından fazlasını oluşturan proteinler ise,periferik ve integral proteinler olarak iki grupta toplanabilir (16). Zarın iç yüzeyine yakın yer alan proteinler

hücre içi olaylarda görev alır, hücre yüzeyi ise savunma ile ilgili proteinleri kapsamaktadır. Zarı boydan boya geçen proteinlerin ise belirli bir yerleşimi vardır. Bu proteinlerin bir kısmı hücre yüzeyinden dışa doğru uzanır ve genellikle şeker birimleri içerir. Başlıca apolar amino asitlerden oluşan küçük bir kısmı ise lipid çift tabakayo boydan boya aşarken, polar kısımlar hücre içine bakmaktadır (17).

Plazma zarının % 10'unu geçmeyen bir bileşkesi de karbohidratlardır. Zarda karbohidratlar başlıca proteinlere bağlı olarak bulunurlar. Doğada bulunan yüzü aşkın monosakkaritten yaklaşık on tanesine zar glikoprotein ve glikolipidlerinde sıklıkla rastlanmaktadır. Bu temel şekerler, galaktoz, mannoz, fukoz, glaktozamin, glukozamin, glukoz ve sialik asittir. Sialik asit, hücrenin net negatif yükünden sorumlu temel bileşkedir (16).

Zarda yer alan proteinlerin hem yatay hem de zara dik bir eksen etrafında hareket yeteneği vardır. Lenfosit zarında çift değerlikli antikorun reseptörüne bağlanması ile antijen-antikor kompleksinin yeniden düzenlenmeye (redistribution) uğraması buna bir örnektir (16). Bu yeniden düzenlenme sonucu, kutup oluşumu gibi yatay harekette bağlı olaylar ve endositoz gibi dikey harekete bağlı olaylar gerçekleşir (18).

Fare dalak lenfositleri ile yapılan bir çalışmada, lenfositlere dış kaynaklı kolesterolün eklenmesi ile mitojenik uyarımın 2 katına arttırılabileceği saptanmıştır (19). Bu bilgi ışığında Pozzan ve arkadaşları, B-lenfositlerinde optimal Con A derişimi ile oluşan kutuplaşmanın hızını kolesterolün azaltabileceğini önermişlerdir. Büyük olasılıkla çift tabakanın akışkanlığını etkileyerek gelişecek kutuplaşma hızındaki bu azalmanın, mitojenik uyarıma olanak sağlayacak düzeye inebileceğini öne sürmüşlerdir (20).

İşaretli lektinler ile yapılan çalışmalardan, lenfosit transformasyonunda hücre yüzeyindeki ilk bağlanmayı izleyerek endositozun gerçekleştiği saptanmıştır (18).

Mitojenlerin lenfositlere etkisi de zarda yer alan karbohidrat bileşkelere aracılığı ile olmaktadır. Con A'nın zarda karbohidrat bileşkelere ile etkileşime girdiği bağlanmanın α -metilmannopiranozid (α -MM) ile inhibe edilebilmesiyle kesinlik kazanmıştır (21,22,23). Lektinler ile etkileşimde görev alan karbohidratlar zarda glikoproteinler halinde bulunmakta ve tüm mitojenler için ortak reseptörler olarak kabul edilmektedir. Bugüne kadar hücre yüzeyi karbohidratının hangi biyolojik etkinlik nedeniyle özgül bir zar glikoproteinini ile bağıntılı olduğu saptanmamıştır. Bu belirsizliğin nedeninin glikolipid ve gliko-

proteinlerin karbohidrat belirleyicilerinin terminal oligosakkarit dizilerindeki yakın benzerlik olduğu düşünülmektedir (24).

Normal lenfositlerin Con A ile kutuplaşmasının zar mikrotübül yapısı ile yakından ilgili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmada, normal T ve B-lenfositlerinin çok az bir kısmı kendiliğinden Con A ile kutup oluşturmaktadır. Yine aynı çalışmada lenfositlerin 10 dakika Con A ile inkübasyonunun mikrotübül yapısında önemli bir farklılık yaratmadığı saptanmıştır. Con A ile kutup oluşumunun zardaki mikrotübül yoğunluğu ile ters orantılı olduğu ve mikrotübüllerin dağılması (disassembly) ile kutuplaşmanın bağıntılı olduğu öne sürülmektedir. Normal lenfositlerin çoğunda zara bağlı Con A zar boyunca düzgün aralıklarla dağılmıştır. Yapı önemli miktarda sitoplazmik mikrotübüller gösterirken ortama GSH-oksitleyici bir ajan olan diamide katılması mikrotübüllerin düzenini bozmakta (disassembly) ve kutuplaşmaya yol açmaktadır. Mikrotübül düzeninin bozulması ile artan "Con A ile kutuplaşma" arasında bir bağıntı olduğu düşünülmektedir (23).

Con A ile kutuplaşma ile mitojenik uyarım arasındaki bağıntının araştırıldığı bir çalışmada en fazla mitojenik uyarımın gerçekleşebilmesi için kutup oluşumunun bağlanmadan bir süre sonra meydana gelmesi gerektiği saptanmıştır(20).

I.5. Transformasyon ile Gelişen Değişiklikler:

Transforme hücre sabit kalıtımsal bir değişikliğe uğrayarak alıcı canlıda tümör oluşturma özelliği kazanmış hücredir. Fibroblastlar ile yapılan çalışmalardan, hücrenin transforme olması ile morfolojik bir değişime uğradığı gözlenmiştir. Bu şekilsel değişim hücre zarındaki değişim ile elele gitmektedir (25). Bu tür değişimlere ek olarak hücrelerin kültürde onkojenik ajanlar ile transformasyonu büyüme denetiminin kaybolmasına, yüzey lektin reseptörlerinin artan hareketliliğine ve hücre içi yapısal düzenlenişte (cytoskeletal organization) değişime yol açar. Fluorescamine aracılığı ile yapılan bir çalışmada değişimin hücre transformasyonunun erken safhasında olduğu ve bu değişimin normal ve transforme hücrelerin büyüme hızları arasındaki farklılığa bağlı olmadığı saptanmıştır (26). Malign transformasyon ile bazı temel değişimlerin meydana geldiği yerin hücre zarı olduğuna dair deliller çoğalmaktadır. Bir karsinojenin DNA'da çok küçük bir bölgede değişiklik yaparak, farklılaşmış zar proteinlerinin sentezine neden olabileceği düşünülmektedir. Bu proteinlerin sonuç olarak, azalan yapışma (adhesivness) denetimsiz çoğalma veya besinlerin fazla alımı gibi bir dizi hücrenel farklılaşmaya yol açabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, çerkerdeki bir değişimin hücre yüzeyi aracılığıyla malign transformasyonu uyurabileceği düşünülmektedir (27).

İnsan periferik kan lenfositlerinin morfolojisi ve mikrofilament organizasyonuna ilişkin bir çalışmada, lenfositlerin başlıca iki tipte değişime uğrayabileceği savunulmaktadır. Lenfositlerin sodyum azidle muamele ve eritrosit ile rozet oluşumu sırasında olduğu gibi, mitojen ile karşılaştığında da mikrovilliler oluşturduğu saptanmıştır. Con A ve PHA ile yapılan çalışmada, lenfositler kabın yüzeyi ile temasa geçer geçmez, yassılaşma, uzama, cidarın düzgünlüğünün bozulması ve mikro uzantıların oluştuğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada, Concanavalin A (Con A) ve Phytohemaglutinin (PHA)'nin insan lenfositlerinde şekilsel değişime yol açtığı ve yüzeydeki aktinin yeniden düzenlenmesine neden olduğu saptanmıştır (28). Dolayısıyla, çekirdekte gerçekleşen bir modifikasyon hücre zarı aracılığı ile malign transformasyona neden olabilir. Transformasyon sonucu hücre yüzeyinin önemli bileşkelerinden olan glikolipid, glikoprotein ve karbohidratlarda çeşitli değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Glikolipidler, üzerinde en fazla çalışma yapılmış olan bileşkerlerdir. Genel olarak:

a) Kompleks glikolipidlerin miktarında genel bir azalma veya uç sakkarit birimlerinde kopma

b) Hücresel dokunmalara glikolipid sentezindeki yetersizlik nedeniyle gerekli cevabın oluşturulamaması ve bunun sonucu olarak ek uç sakkarit dizilerinin eklenmesi.

c) Glikolipidlerin enzim, antikor ve lektinleri bağlama özelliğinde artış, transformasyon sonucu gözlenen glikolipid farklılaşmalarıdır (30).

Malign transformasyonda glikopeptidlerin uğradığı değişimleri irdelemek amacıyla ise Leonard Warren ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda hücre zarının tripsin ile muamelesi sonucunda glikopeptidlerin zardan ayrıldığı ve hücrelerin yapışma özelliğini yitirdiği gözlenmiştir. Bu triptik glikopeptidlerin pronase ile muamelesi sonucunda da karbohidrat bileşkenin glukozaminglikan yapıda olduğu saptanmıştır. Yine aynı grubun normal ve malign transforme bebek hamster böbreği ile yaptıkları deneylerde, hücre yüzeyindeki glikopeptidler kolondan geçirilmiştir. İlk gelen bileşke glukozaminglikanlar, daha sonra ise sialik asit içeren glikopeptidlerdir. Malign transformasyonda glikopeptid değişimlerine ilişkin bu çalışmada, sialik asit içeren glikopeptidlerin malign hücrelerde arttığı gözlenmiştir. Bu artış hücre kökeninden ve transforme edici ajandan bağımsız olarak malign transformasyonda genel olarak görülmektedir. Bu bileşkelere normal hücre zarında çok az, malign transforme hücrelerde ise oldukça yüksek miktarda rastlanmaktadır. Kromatografik çalışmalarla, bu glikopeptidlerin L-fukoz, D-mannoz, D-galaktoz, D-glukozamin ve sialik asit içerdikleri, ayrıca değişik amino asitler içeren peptid kısımlarının olduğu

gözlenmiştir. Oligosakkarit yan zincirler ile polypeptid zincir arasında ise β -glukozamin bağı vardır (29).

Hücre zarında transformasyon ile gelişen değişiklikler en fazla lektinler aracılığı ile çalışılmaktadır (19, 20, 21). Bazı lektinlerin transforme hücreleri daha fazla aglütine ettikleri gözlenmiştir. Bu gözlem de transforme hücre ile normal hücrenin zarsal özellikleri arası farklılık olduğuna işaret etmektedir (7). Transforme ve normal hücrelerin, lektin reseptörlerinin dağılımı ve göreceli hareketliliğini kıyaslamak amacı ile floresan ve elektron mikroskopi çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda, lektin bağlama bölgelerinin transforme hücrelerde devamlılık göstermediği (discontinious) gözlenmiştir. Zarda lektin reseptör kompleksinin diffüzyonu sonucu lektin bağlama bölgelerinin kümeleştiği ve polivalent lektin moleküllerinin birden fazla lektin bağlama bölgesini çapraz bağladığı sanılmaktadır. Hücreler, önceden formaldehit veya glutaraldehit ile fikse edildiğinde hücre yüzeyi lektin reseptörlerinin kümeleştiği görülmüştür (30).

Burger ve arkadaşlarınca ise, neoplastik transformasyon sonucu lektin reseptörlerinde artma gözlemlendiği ancak, gerçekte, normal hücrelerin de aynı sayıda reseptöre sahip olduğu öne sürülmektedir. Lektin reseptörlerinin transforme hücrelerde fazla gibi görünmesinin nedeni, normal hücre-

relerde reseptörlerin kapalı bölgelerde (cryptic sites) bulunmasıdır. Bu düşünce normal hücrelerin proteolitik enzimler ile muamelesi sonucu transforme hücreler ile aynı sayıda lektin reseptörü göstermesine dayanmaktadır (31).

Normal ve transforme hücrelerin zarları arasında görülen diğer bir farklılık ise yüksek molekül ağırlıklı bir glikoprotein olan LETS (Large External Transformation Sensitive) proteinin malign transformasyon ile zardan kaybıdır (30,32,33).

Lenfositlerin mitojenik lektinler ile uyarımıyla gelişen diğer bir olay fosforilasyondur. Fare lenfositlerinin Con A ile uyarılmasının protein fosforilasyonuna etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, canlı hücrenin Con A ile uyarım sonucu 135 000 ve 150 000 molekül ağırlığında iki proteinin fosforilasyonunda artma olduğu saptanmıştır. Ancak, fosforilasyonun ortama Con A eklenmesinden hayli zaman sonra gerçekleşmesi söz konusu proteinlerin uyarım sinyalinin alımı ile ilgili olmadığını düşündürmektedir. 135 000 molekül ağırlığındaki bu proteine diğer proliferasyon gösteren sistemlerde de rastlanması fosforilasyonun hücre proliferasyonun önemli bir parçası olduğunu düşündürmektedir (34).

I.6. Lenfoproliferatif Hastalıklar:

Lenfoproliferatif hastalıklar genellikle lenfoid ve retikuloendotelial dokudan köken alan, çoğu malign gidişli, bir bölümü benign olmakla beraber malign transformasyon gösterebilen değişik hastalıklar grubunu kapsar. Lenfoproliferatif hastalıkların önemli bir bölümü, başta lenfositler olmak üzere retikulum hücreleri ve monosit-makrofaj'lardan köken alır.

Lenfoproliferatif hastalıklar kavramı içine Kronik Lenfositik Lösemi, Akut Lenfoblastik Lösemi, Hairy Cell Lösemi ve plazma hücresi tümörleri (Multiple Myelom, Waldenström makroglobulinemisi gibi) olarak nitelenen bir grup hastalık girmektedir.

Söz konusu hastalıkların çoğu lenfosit kökenli olduğundan klinik yönden çoğu kez lenfoid sistemdeki değişiklikler ile kendini gösterir. Multiple myelom ve Hairy Cell dışında kalan malign lenfoproliferatif hastalıklarda lenfodenopati, karaciğer ve dalak büyümesi görülür. Lenfoproliferatif hastalıkların diğer bir ortak yönü immün sistemdeki bozukluklardır. Lenfoproliferatif hastalıklar kapsamına giren kronik lenfositik lösemide (KLL) humoral immün bozukluk ön planda görülmektedir (35).

I.6.1. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL):

Çoğu kez B-lenfositlerin malign proliferasyonu sonucu oluştuğu düşünülen kronik lenfositik lösemide hücre Zarında çok yönlü değişimler gerçekleşmektedir. Çalışmalar her hastanın KLL hücrelerinin aynı immüoglobülin idiotipik determinantı taşıdığını göstermiştir. Bu homojenite KLL lenfositlerinde zar değişimini incelemek için eşsiz bir kaynak oluşturmaktadır (36).

İnsanlar ve hayvanlar ile yapılan çalışmalar dolaşımdaki lenfositlerin çoğunun (proliferasyon) farklılaşma göstermediğini ve uzun süre yaşadığını göstermiştir. Dolaşımda çok az sayıda kısa yaşamı olan lenfositler varsa da, büyük çoğunluğu aylarca veya yıllarca kan, lenf nodu, peyer plakları ve dalak aracılığı ile torasik kanala geçerek dolaşımını sürdürmektedir. Kronik lenfositik lösemide de hakim hücre grubu uzun yaşamlıdır ve farklılaşma (proliferasyon) potansiyeli azdır. KLL'de dolaşımdaki bu uzun yaşamlı lenfositlerin lenfoid organlarda birikerek zamanla organ büyümesine neden olduğu öne sürülmüştür. Radyoaktif işaretli timidin ile yapılan bir deneyde, KLL'de de uzun yaşamlı lenfosit grubunun hakim olduğu ama daha hızlı proliferasyon gösteren lenfositlerinde bulunduğu saptanmıştır. Organ büyümesi olan hasta grubunda, lenfosit popülasyonunu büyük oranda, uzun yaşamlı lenfositlerin oluşturduğu saptanmıştır (37).

KLL'de yüzey immünoglobülinine sahip lenfositler çoğunluğu oluşturmaktadır (36). Immünofloresan çalışmaları KLL'de hakim lenfosit grubunun IgM ve IgD taşıdığını belirlemiştir (38). Normal lenfositlerin yaklaşık % 15'nin IgG, % 6'sının IgA ve % 8'nin IgM tipi yüzey immünoglobülin içerdiği, buna karşın KLL lenfositlerinin monoklonal tipte immünoglobülin içerdikleri saptanmıştır (30). Ayrıca, normal lenfositler anti-immünoglobülin ile inkübasyon sonucu kolaylıkla kutup oluşumu gösterirken, KLL lenfositleri aynı şekilde kutuplaşmamaktadır (35).

Yapılan çalışmalar KLL lenfositlerinin normale göre, bazı antijenik belirleyicilerin ifade edilmesinde, lipid içeriğinde, zar mikrovizkozitesinde değişme olduğunu ve sialik asit miktarında azalma olduğunu göstermiştir (36). Zardaki kolesterol fosfolipid oranının KLL lenfositlerinde normale göre azaldığı saptanmıştır. Ayrıca, yağ asidi içerikleride farklılık göstermektedir. KLL lenfositlerinde doymamış yağ asitlerinin hakimiyeti göze çarparken, normal lenfositlerde doymuş yağ asitleri çoğalmıştır. KLL'de doymamış yağ asitlerinin çoğalması ile zar kolesterolündeki yetmezliğin bu zarların fizyolojik sıcaklıklarda normale göre daha akışkan olmasına yol açtığını düşündürmektedir. Zar lipidlerinde akışkanlığı iki faktör etkilemektedir. Bu faktörler kolesterol: fosfolipid molar oranı ve fosfolipid yağ asidi zincirlerinin uzunluk ve doymamışlık

derecesidir (39). Yapılan çalışmalar lösemik hücrelerde zar lipidlerinin akışkanlığında belirgin bir artışa karşın Con A reseptör mobilitesinde azalma olduğunu göstermiştir (39, 40). Aynı yönde Mintz ve Sachs'ın çalışmalarında, normal lenfositlerin Con A ile uyarılmış kutup oluşturma yeteneği % 25-34 iken, KLL lenfositlerinde % 5-9'a düştüğü saptanmıştır (41).

Zara ilişkin diğer bir çalışmada ise KLL lenfositlerinin zarlarında, normal lenfositlerde ve diğer neoplastik olmayan transformasyon göstermiş hücrelerde rastlanmayan, leukemia associated antijenler taşıdığı saptanmıştır. Bu antijene karşı oluşturan antiserum aracılığı ile söz konusu antijenlerin KLL'ye özgü olduğu gösterilmiştir (42).

Yakın zamanda monoklonal antikorlar ile yapılan bir çalışma ile de B-KLL'de sitoplazmik immunoglobülini olup, yüzey immunoglobülini gözlenmeyen ve yüzey immunoglobülini bulunan lenfositler monoklonal antikor ile karşılaştırılmıştır. Her iki grubunda aynı monoklonal antikor ile boyanması nedeniyle, yüzey immunoglobülini görülmeyen grubun gerçekte, çok hafif boyanma gösterdiği düşünülmüştür. Aynı çalışmada, tüm B-hücresi orijinli kronik lösemilerin aynı antijenik fenotipte olduğu gösterilmiştir (43).

I.6.2. Hairy Cell Lösemi (HCL)

"Hairy Cell" lösemi (HCL), klinik ve histopatolojik yönden özellikleri olan bir lenfoproliferatif hastalıktır. Literatürde histiroleukemia, reticulum cell leukemia, leukemic reticuloendotheliosis gibi başka isimlerle de anılmıştır (35).

"Hairy Cell" lösemi kan, kemik iliği, dalak ve diğer dokularda anormal mononükleer saçaklı uzantılı hücrelerin bulunduğu yavaş ilerleyen proliferatif bir bozukluktur. Bu hücreler genellikle tartarata dirençli asit fosfataz izoenzimi ve mikrovilluslar içerirler (44).

Hastalığın en önemli özelliğini simgeleyen çok ince sitoplazmik uzantıları olan ve bu nedenle "hairy cell" adı verilen mononükleer hücrelerin kökeni henüz belirlenmemiştir. Bu hücrelerin çeperinde IgM ve/veya IgD'nin gösterilmiş olması, çoğu araştırmacıya bu hücrelerin B-lenfosit kökenli olduğunu düşündürmüştür. Ancak, hairy hücreler latex partiküllerini fagosite etmek gibi monosit özellikleri de göstermektedir. Bu hücrelerin T-lenfosit kökenli olduğunu öne sürenler de olmuştur. Ancak, bazı araştırmacılar çoğu hairy hücrelerin B-lenfosit, monosit veya iki tip hücre özelliğini de gösteren "hibrid hücre" kökenli olduğunu ileri sürmektedir (35, 44).

"Hairy Cell" lösemi seyrek görülen ve bütün lösemilerin yalnızca % 2-5'ini oluşturan bir hastalıktır. En sık rastlanan fizik bulgu splenomegali olup karaciğer vakaların yaklaşık yarısında büyümekte, lenf bezlerinde büyüme ise belirgin olmamaktadır.

"Hairy Cell" lösemi sıklıkla, kronik lenfositik lösemi, malign lenfoma ve Waldenström makroglobülinemisi gibi diğer lenfoproliferatif hastalıklarla karıştırılabilir. KLL ve malign lenfomalardan ayırıcı tanının yapılmasında HCL'de lenfodenopatinin belirgin olmaması, hücrelerin çok az mitotik aktivite göstermelerinin yanısıra kemik iliği ve lenf bezlerinin histopatolojik özellikleri ile hücre morfolojileri geniş çapta yardımcı olmaktadır (35).

Hairy Cell hücrelerinin belirgin bir özelliği Con A reseptörü ve yüzey immunoglobülinlerinde kutuplaşma özelliği göstermesidir. Hairy Cell'e karşın KLL veya lenfoma hücrelerinde kutuplaşmaya nadiren rastlanır. Lenfosit veya monositlerin hücre zarında kutuplaşma veya yeniden düzenlenme mikrofilaman ve mikrotübüllerce yönlendirilmektedir. Mikrofilamanlar aktin içeren kasılabilen bileşeklerdir. Mikrotübüller ise, globular protein alt birimleri içeren silindirik yapılardır ve tüm ökaryot hücrelerde bulunduğu sanılmaktadır. Mikrotübüllerin ligand-reseptör kompleksinin kutuplaşmasını sınırladığı düşünülmektedir(44).

Filamentlerin fiziksel düzenini, hücre hareketini ve kutuplaşmayı önleyen sitokalasin B'nin aynı etkiyi "hairy cell" hücrelerinde de göstermesi bu plazma zarı reseptörlerinin integral makromoleküller olduğunu ve hareket ve yeniden dağılımının mikrofilaman ve mikrotübüllerce düzenlendiğini göstermiştir (44).

I.7. Amaç:

Bu çalışmada, normal insan B-lenfositleri ile kronik lenfositik lösemili hastalarda B-lenfositlerinin yüzey özellikleri açısından karşılaştırılması amaçlandı. Bu hücreler özel bir lösemi türü olan "Hairy Cell" lösemi hücreleri ile de karşılaştırıldı. Bu amaçla hücre zarı Con A reseptörleri sayı ve affinite açısından, bağlanma deneyleri ile ve zar hidrofobisitesi ANS aracılığı ile karşılaştırıldı. Ayrıca, ANS'nin zarda triptofan birimlerine yakın bölgelere bağlanması özelliğinden yararlanılarak triptofan birimleri ile ANS reseptörleri arası uzaklık saptandı.

II- A R A Ç , G E R E Ç v e Y Ö N T E M L E R

II.1. Araç ve Gereçler:

Concanavalin A, α -MM ve Ficoll (type 400) Sigma firmasından (ABD), PPO, POPOP, naftalen, metanol BDH firmasından (İngiltere), dioksan ve etilen glikol Merck firmasından (F. Almanya), hyamin hidroksit Packard Instrument firmasından (ABD), RPMI-1640 Gibco firmasından (ABD), Fetal Calf Serum Flow laboratories firmasından (İngiltere), metil selüloz Fisher Scientific Company firmasından (ABD), sığır serumu albümini Armour Pharmaceutical Company firmasından (ABD), hypaque (Urografin) Schering firmasından (F. Almanya) sağlandı.

Çalışmamızda, Sıvı sintilasyon cihazı(Packard Tri-carb Model 3004(ABD)) Spektrofotometre(Beckman (R) (Model-25)), Santrifüjler(International Equipment Co. Model K-2 (ABD)), Işık mikroskobu(Olympus (Japon)) ve sallaman su banyosu(Nüve (Türk)) kullanılmıştır.

II. 2. Yöntemler:

II.2.1. Lenfosit Ayrımı:

Çalışmaya beyaz küresi yüksek olan kronik lenfositik lösemi (KLL) tanılı hastalardan 20 cc periferik kan alına-

rak başlandı. 1/19 oranında EDTA (disodyum etilen-diamin tetraasetikasit, % 0.9 NaCL içinde % 2'lik olarak hazırlandı ve pH:7.4'e ayarlandı) üzerine toplanan periferik kan eşit miktarda RPMI-1640 ile sulandırılarak Ficoll-Hypaque üzerine yayıldı ve 1350 rpm'de (850 g) 35 dakika oda ısısında santrifüjlendi. Elde edilen Ficoll-Hypaque interfazı dikkatle toplanarak 3 kez 4°C'da RPMI-1640 ile yıkandı ve hücre sayımı yapıldı (45).

Lenf bezlerinden çalışma yapıldığında ise lenf bezini tel süzgeç aracılığı ile süspansiyon haline getirildikten sonra 3 kez RPMI-1640 ile yıkandı ve sayım yapıldı.

Normal kişilerin kanından B-lenfosit izolasyonu için 150 cc. periferik kan 15 cc. EDTA üzerine toplandı. Üzerine 1/4 oranında metil selüloz (% 0.9'luk NaCL içinde) eklenerek karıştırıldı ve 1 saat 37°C'da çökmeye bırakıldı. İnkübasyon sonunda süpernatant kırmızı küre tabakasına kadar alınıp, santrifüjlendi ve hücreler 20 cc. RPMI-1640'da çözüldü. Süspansiyon haline getirilen hücrelerden lenfositleri ayırmak için Ficoll-Hypaque üzerine yayıldı ve 1350 rpm'de (850 g) 35 dakika oda ısısında santrifüjlendi. Elde edilen Ficoll-Hypaque interfazı dikkatle toplanarak 3 kez 4°C'da RPMI-1640 ile yıkandı ve hücre sayımı yapıldı(46).

II.2.2. Lenfosit Altgruplarının Sayısal Değerlendirilmesi:

Ficoll-Hypaque yoğunluk gradienti ile ayrılan hasta periferik kan lenfositleri E⁺ rozet, EAC rozet oluşumu ve Sig'nin açısından değerlendirildi.

a) E⁺ rozet oluşumu: T-lenfositlerinin sayısal değerlendirilmesinde koyun eritrositleri ile kendiliğinden rozet oluşturma özelliğinden yararlanıldı. Bu amaçla heparinize koyun kanı 3 kez PBS ile yıkanarak, RPMI-1640 içinde 0.5 %'lik sulandırımı hazırlandı. Hasta lenfositleri ise 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde yine RPMI-1640 içinde sulandırıldı. % 0,5'lik koyun eritrositlerinden 0.5 cc, 0,5 cc 2×10^6 hücre/ml periferik lenfositler ile karıştırıldı ve karışıma 100 λ Fetal Calf Serum (FCS) eklenerek 37°C'da 15 dk. inkübe edildi. Daha sonra karışım oda ısısında hafifçe santrifüjlenerek 18 saat 4°C'da bekletildi. Ertesi gün hafifçe eğerek süspansiyon haline getirilen lenfosit -koyun eritrositi karışımında rozet sayımı yapıldı. Toplam 200 hücre sayılarak rozet %'si saptandı (47,48).

b) EAC rozet oluşumu: B-lenfositlerin sayısal değerlendirilmesinde sensitize koyun eritrositleri ile rozet oluşturma özelliğinden yararlanıldı. Bu amaçla PBS ile 3 kez yıkanan heparinize koyun kanından yine PBS içinde % 5'lik süspansiyon yapıldı. 1 cc. % 5'lik koyun eritrositleri üzerine 1 cc. Hemolitik Serum (GVB⁺⁺ içinde,

Biomeriux) eklenerek 30 dk. 37°C'da bekletildi. İnkübasyon sonunda 3 kez PBS ile yıkanın koyun eritrositleri 1 ml GVB içinde süspansiyon haline getirildi ve üzerine 100 λ fare komplemanı eklendi. 37°C'da 30 dk. inkübasyon sonunda komplemanın fazlasından kurtulmak amacı ile karışım 3 kez GVB⁺⁺ ile oda ısısında yıkandıktan sonra 2 ml RPMI-1640 içinde süspansiyon haline getirildi. Bu karışımdan 100 λ 1×10^6 hücre/ml lenfosit ile karıştırılarak 37°C salanan su banyosunda 30 dk'a inkübe edildi ve hemen toplam 200 hücre sayılarak % EAC-rozet saptandı (47,48).

c) Yüzey İmmünoglobülinlerinin Fluoresan anti-Ig (polyvalent) ile işaretlenmesi:

2×10^6 hücre/ml olarak RPMI-içinde süspansiyon haline getirilen lenfositler, TC Medium 199 (IX) (% 20 FCS, % 0.1 % Na Azide içeren) ile 4°C'da üç kez yıkandı. 100 λ TC Medium 199 (IX) içinde süspansiyon haline getirilen hücrelere 100 λ polyvalent FITC-a-human Ig'nin (Behring) 1:8 dilüsyonu eklenerek 30 dakika 4°C'da inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, hücre süspansiyonu, antiserumun fazlasından kurtulmak amacıyla 3 kez TC Medium 199 (IX) ile 4°C yüksek hızda yıkandı. Üçüncü yıkama sonunda hücreler 100 λ ortam içinde süspansiyon haline getirilerek lam üzerine dikkatle yayıldı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı. Yayma iyice kurduktan sonra, 5 dakika absolu ethanol'de bekletilip tekrar kurumaya bırakıldı. Ardından 3 kez PBS

ile yıkandı ve kuruduktan sonra üstüne bir damla glycerol-PBS (1:9) karışımı damlatılıp lamel ile kapatıldı. Lamelin kenarları oje ile yapıştırıldıktan sonra immüno-fluoresan mikroskopta sayım yapılana kadar 4°C'da bekletildi. Sayımlar en geç 24 saat içinde yapıldı.

II.2.3. B-lenfositlerinin Saflaştırılması:

Ficoll-Hypaque yoğunluk gradientinden elde edilen periferik kan lenfositleri (PBL) 15×10^6 hücre/ml olarak RPMI-1640 ile sulandırıldıktan sonra eşit hacimde % 5 koyun eritrositi (RPMI-1640 içindeki süspansiyonu) ve % 0.1 FCS ile karıştırılarak 30 dakika 37°C su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda 10 dakika oda ısısında hafifçe santrifüjlendi ve 60 dakika 4°C'da bekletildi. 60 dakika sonunda oluşan aktif rozet popülasyonunu ayırmak amacıyla karışım 1/1 oranında soğuk RPMI-1640 ile sulandırıldıktan sonra tekrar Ficoll-Hypaque yoğunluk gradienti üzerine yayıldı. 35 dakika 1350 rpm'de (850 g) oda ısısında santrifüjlenen rozet süspansiyonundan elde edilen interfaz toplanarak yine 3 kez RPMI-1640 ile 4°C'da yıkandı ve hücre sayımı yapıldı. 15×10^6 hücre/ml olarak sulandırılan T-lenfositçe fakir hücreler, bir kez daha 4°C'da sensitize edilmiş koyun eritrositleri ile kendiliğinden rozet oluşturmaya bırakıldıktan sonra Ficoll-Hypaque aracılığı ile B-lenfositçe zengin interfaz toplanarak 3 kez soğuk RPMI-1640 ile

yıkandı ve soğuk PBS içinde $0,5 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde ^3H -Con A ile bağlanma deneyinde kullanılmak üzere sulandırıldı (46).

Fluorimetrik tayinlerde kullanılacak B-lenfositler ise $200-400 \times 10^3$ hücre/ 10λ olarak sulandırıldı.

II.2.4. Protein Tayinleri:

Con A ve türevleri için protein tayinleri 280 nm'de absorban ölçümü ile yapıldı. Con A için molar ekstinksiyon katsayısı olarak 1.14 kullanıldı (50).

II.2.5. Radyoaktivite Sayımları:

Radyoaktivite sayımları 5 ml. Bray çözeltisinde Packard Tri-Carb sıvı sintillasyon cihazında yapıldı. Aletin okuma verimi trityum için % 49 olarak bulundu.

Dioksan'ın Peroksitlerden Arındırılması:

Bray çözeltisinde kullanılan dioksan'ı sayım sonuçlarını yükselten peroksitlerden arındırmak için dioksan 2 saat sodyum üzerinden geri soğutucuda kaynatıldıktan sonra yine sodyum üzerinden distillendi (51).

Bray Sayım Çözeltisinin Hazırlanması:

4 gm PPO, 200 mg. POPOP, 60 gm naftalen, 100 ml metanol, 20 ml etilen glikol karıştırıldı ve dioksan ile bir litreye tamamlandı (52).

II.2.6. ³H-Con A'nın Hazırlanması:

100 mg Con A (BDH Biochemicals) 10 ml. 10 mM fosfat tamponu içeren serum fizyolojikte çözüldü. 10 mg/ml olan bu Con A çözeltisine, son derişimleri, 60 mM/ml olacak şekilde α -Metilmannopiranozid (SIGMA M-6882) ve 1 mM olacak şekilde Ca^{+2} Mn^{+2} eklendi ve 0°C'da 60 dk bekletildi. İnkübasyon sırasında, özgül etkinliği 500 uCi/mol olan ³H-asetik anhidrit sodyum üzerinden distillenmiş dioksan-da çözüldü. Con A'nın α -Metilmannopiranozid ile inkübasyonu bitiminde pH'sı katı Na_2CO_3 ile 8.85'e getirildikten hemen sonra, 5 μ Ci ³H/mg Con A olacak şekilde ³H-asetik anhidrit ortama katıldı ve 90 dakika 0°C'da inkübe edildi. İnkübasyon sonunda karışım 90x1.5 cm boyutlarında PBS ile dengelenmiş Sephadex G-25 kolonuna uygulandı ve 2,5 ml/3 dakika akış hızı ile 50 fraksiyon toplandı. Tüm fraksiyonlarda protein tayini ve radyoaktivite sayımı yapıldıktan sonra aktif fraksiyonlar birleştirilerek radyoaktivitenin fazlasından kurtulmak amacı ile 24 saat 4°C'da PBS'ye karşı dializ edildi. Hazırlanan ³H-Con A'nın biolojik etkinliğini koruyup korumadığını saptamak amacıyla hemaglutinasyon etkinliğine bakıldı (53).

II.2.7. Mikrohemaglutinasyon:

Defibrine kandan ayrılmış ve serum fizyolojik ile 3 kez 1/10 oranında yıkanmış erkek tavşan eritrositlerinden % 1,5'lük süspansiyon hazırlandı. ³H-Con A 10 mM fosfat

tamponu içeren serum fizyolojik ile seyreltildi ve eritrositlerle U tipi hemaglutinasyon plaklarında 1 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Doğal Con A'ya karşı sınıanan ^3H -Con A'nın hemaglutinasyon etkinliği gösteren en düşük derişimi 2x sulandırımmlarla saptandı (54).

II.2.8. Mikrofüj tekniğı ile bağlanma deneyi:

Saflaştırılmış B-lenfositler (0.5×10^6 hücre/100 λ) ^3H -Con A, PBS ve Ca^{+2} , Mn^{+2} ile son hacim 1 ml. olacak şekilde karıştırıldı. Fikse edilmiş hücreler ile bağlanma çalışıldığında, hücreler % 0.25'lik glutaraldehid ile 0°C 'da 30 dakika inkübe edildi ve 3 kez PBS ile yıkanarak 0.5×10^6 hücre /100 λ olacak şekilde sulandırıldı. Fikse edilmiş ve edilmemiş hücreler, ardışık olarak 20 veya 60 dakika 4°C 'da ^3H -Con A ile bekletildikten sonra 4°C 'da yüksek dozda santrifüjlendi ve 150 μl PBS ile kaldırılarak 0.35 ml % 5'lik BSA üzerine yayıldı. 4°C 'de yüksek hızda santrifüj sonrası, hücre çökeleğı 100 λ Hyamin ile çözüldü. α -Metilmanopiranozid Ca^{+2} , Mn^{+2} PBS ve 0.5×10^6 hücre içeren kontrol tüpleri Con A ile önceden 45 dakika 0°C da bekletildi. Radyoaktivite sayımları Packard Tri-carb sıvısı sintillasyon cihazında Bray sayım çözeltisi ile yapıldı (12).

II.2.9. Assosiasyon sabiti (K_a) ve reseptör sayısı
(N)'nin hesaplanması:

Reseptör-ligand ilişkisi:

$$R-L \rightleftharpoons RL \dots\dots\dots (1)$$

olarak ifade edilecek olursa

$$K_a = \frac{(RL)}{(R)(L)} \dots\dots\dots (2)$$

burada :

- K_a : Asosiasyon sabiti
- (R) : Serbest reseptör derişimi
- (L) : Serbest ligand derişimi
- (RL): Reseptör-ligand kompleksi

Scatchard'in (55) ifadesine göre,

$$\frac{(L)_b}{(L)_f} = K_a(L)_b - K_a(R) \dots\dots\dots (3)$$

burada:

- $(L)_b$: bağılı ligand derişimi
- $(L)_f$: serbest ligand derişimi
- (R) : toplam reseptör derişimi
- K_a : asosiasyon sabiti

eğer,

- B : bağılı Con A
- F : serbest Con A
- N : Con A reseptörlerinin sayısı denilecek olursa

(3) numaralı denklem

$$\frac{B}{F} = K_a B - K_a N \dots\dots\dots (4)$$

haline gelecektir.

(4) numaralı ifadeden faydalanarak B/F'ye karşı B çizilecek olursa, elde edilecek doğrunun eğimi ($-K_a$), x-ksenini kestiği nokta da N olacaktır.

Radyoaktivite sayımları ile çizilmiş örnek bir grafikte,

$$\frac{\text{Sbd}}{\text{Özgül etkinlik X Mol. ağırlık}} = \mu\text{M Con A (bağlı)}$$

(Sbd/ μg Con A) (Con A)

$$\frac{\mu\text{M Con A (bağlı)} \times 6.02 \times 10^{23} \text{ (Avagadro sayısı)}}{\text{Deneyde kullanılan hücre sayısı}} = \frac{\text{(reseptör/ hücre sayısı)}}{\text{hücre sayısı}}$$

Aynı şekilde radyoaktivite sayımları ile çizilmiş bir grafikte;

$$\text{Eğim} = \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0} = \frac{y}{x'} = -K_a$$

Özgül etkinlik (sbd/ μg Con A)

$$-K_a = \frac{y}{x' \cdot 10^{-6}} \times 10^{-3}$$

Mol. ağırlık(Con A)

$$K_a (M^{-1}) = \frac{y}{x'} \times 10^3 \times \text{Mol. ağırlık Con A olarak}$$

hesaplanır.

II.2.10. Fluorometrik Tayinler:

2.4 ml PBS içeren fluorometre küvetine 5 µl, 5 mM ANS (1-anilinonaftalene-8-sulfonat Mg^{+2} tuzu) katıldı, emisyon dalga boyu 500 nm'ye ayarlanarak eksitasyon spektrumu saptandı. 350 nm de bulunan maksimum eksitasyona ayarlanan alette bu kez maksimum emisyon dalga boyu 515nm olarak bulundu. Aynı işlemler hücreler varlığında da tekrarlanarak emisyon maksimumunda sapma olmadığı saptandı.

ANS bağlama bölgelerinin polaritesi için:

$$Q = \frac{0.4 \times F_{\text{maks}}}{F_{\text{etanol}}}$$

bağıntısından yararlanıldı. Burada Q kuantum verimi, F_{maks} (PBS deki maksimum fluoresans), F_{etanol} (mutlak etanoldeki fluoresans), 0.4 ANS'nin etanoldeki kuantum verimidir. Buna bağlı olarak 0.4 değerinde düşme, ortam polaritesinin azalma derecesi ile orantılıdır. F_{maks} 'in saptanması için 2.4 ml PBS içeren fluorometre küvetine 5 µl 5 mM ANS varlığında ve yokluğunda, yaklaşık 5×10^5 hücre/ 10λ lık hücre süspansiyonları katıldı ve fluoresans saptandı. Düzeltilmiş fluoresans ANS varlığında elde edilen değerlerden ANS yokluğunda elde edilen ve ışık saçıl-

lımına ait değerlerin çıkarılması ile elde edildi (F_d). $1/F_d$ değerleri $1/hücre$ değerlerine karşı grafiklenerek sıfıra ekstrapole edildi ve F_{maks} saptandı. ANS bağlanma bölgelerinin sayı ve affinitelerinin saptanması için yaklaşık 4×10^6 hücre içeren 2.5 ml PBS üzerine değişik derişimlerde ANS katıldı ve fluoresans değerleri saptandı (F). Aynı işlem hücre yokluğunda yalnız ANS ile tekrarlanarak elde edilen değerler (F_0) düzeltme için kullanıldı. Bağlı ANS miktarı

$$\text{ANS bağlı} = \frac{(F - F_0) \times l}{F_{maks}}$$

bağıntısı kullanılarak hesaplandı. Bu değerler ortama konulan toplam ANS derişiminden çıkarılarak serbest ANS miktarları bulundu.

Bağlı/serbest ANS değerleri bağlı ANS değerlerine karşı grafiklenerek elde edilen Scatchard doğrularından K affinite sabiti ve N reseptör sayıları hesaplandı. Bağlı ANS ile zardaki triptofanlar arasındaki enerji transferi aracılığı ile zardaki triptofanlar ve ANS arası uzaklıklar hesaplandı. Yaklaşık 5×10^6 hücre içeren 2.5 ml'lik süspansiyonun önce 290 nm'de absorpsiyonu ölçüldü (A_1), aynı örneğin fluoresansı 290 nm ile eksite edilerek 335 nm emisyon dalga boyunda ölçüldü (F_1). Bundan sonra ANS

(10 μ l, 5 mM) katılarak tekrar fluoresans(F_2) ve absorpsiyon (A_2) ölçüldü. Enerji transferinin verimi F_1/F_2 olarak alındı. F_1 ve F_2 "iç filtre etkileri" için düzeltil-di. Bu düzeltme için:

$$K (A): \frac{2.3 A \Delta y}{T^{y_1} - T^{y_2}}$$

bağıntısı ile elde edilen değerler kullanıldı. Burada A absorpsiyon, T transmittans, y_1 kuvvet ile emisyon sliti arasındaki uzaklık, Δy emisyon slit açıklığıdır ($\Delta y = y_2 - y_1$). Enerji transferinin verimi;

$$T = 1 - \frac{F_2}{F_1} \text{ dir.}$$

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1}{T} - 1} \text{ bağıntısı ile triptofan ve ANS}$$

arası uzaklık (R) hesaplanabilir. Burada R_0 ANS için 23.3 A^0 'dür. Değişik ANS derişimlerinde hesaplanan K değerleri ANS derişimine karşı grafiklenerek sıfıra ekstrapolasyonu ile limit değeri elde edildi (56).

III- B U L G U L A R

III.1. Hasta gruplarında T ve B-lenfositlerinin Sayısal Değerlendirilmesi:

Çalışma kapsamına H.Ü. Tıp Fakültesi Onkoloji Bilim Dalından klinik olarak KLL tanısı almış ve E ve EAC rozet aracılığı ile B-lenfosit hakimiyetli KLL olduğu saptanmış 6 hasta alınmıştır. E ve EAC rozet sonuçları Tablo I'de görülmektedir.

H.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji Bilim Dalından lenfoma tanısı almış 4 hastanın lenf nodu biopsisi E, EAC rozet ve yüzey immünoglobulini (SIG) açısından değerlendirilmiştir. Lenf nodu biopsilerinin E, EAC rozet ve yüzey immunoglobulin sonuçları Tablo II'de görülmektedir.

Ayrıca, Onkoloji Bilim Dalından "Hairy Cell" lösemi tanısı almış ve yine E, EAC rozet ve SIG ile tiplendirilmesi yapılmış 2 "Hairy Cell" vakası çalışma kapsamına katılmıştır. "Hairy Cell" vakalarının E, EAC rozet ve SIG değerleri Tablo III'de görülmektedir.

TABLO I

KLL Tanılı Hastaların Periferik Lenfositlerinin T ve B
Lenfositler Açısından İncelenmesi

HASTA	T-Lenfosit (% E ⁺)	B-Lenfosit (% EAC ⁺)
1) Ş.T.	3	32
2) B.E.	5	75
3) B.Ç.	14	45
4) İ.Ü.	5	70
5) H.B.	10	50
6) G.Ö.	25	43

TABLO II

Lenfoma Tanılı Hastaların Lenf Nodu Lenfosit Popülasyonu-
nun T ve B-Lenfositler Açısından İncelenmesi

HASTA	T-Lenfosit (% E ⁺)	B-Lenfosit (% EAC ⁺)	B-Lenfosit (% SIG ⁺)
1) M.E.	3	77	44
2) F.K.	7	49	7
3) A.A.	5	75	55

TABLO III

"Hairy Cell" Tanılı Hastaların Periferik Lenfositlerinin
T ve B Lenfosit Açısından İncelenmesi

HASTA	T-Lenfosit (% E ⁺)	B-Lenfosit (% EAC ⁺)	B-Lenfosit (% SIG ⁺)
1) H.Y.	20	2	25
2) Ö.A.	75	5	16

"Hairy Cell" lösemi tanısı konmuş hastaların periferik lenfositleri T ve B+null olarak ayrıldıktan sonra her iki grup "hairy cell" görünümlü hücrelerin sayısal oranını saptamak amacıyla faz kontrast mikroskopta incelenmiştir. Sonuçlar Tablo IV'de verilmiştir.

TABLO IV

"Hairy Cell" Lösemi Tanılı Hastaların T ve B+Null olarak
ayrılmış Periferik Lenfositlerinde "Hairy Cell" görünümlü
Hücreler

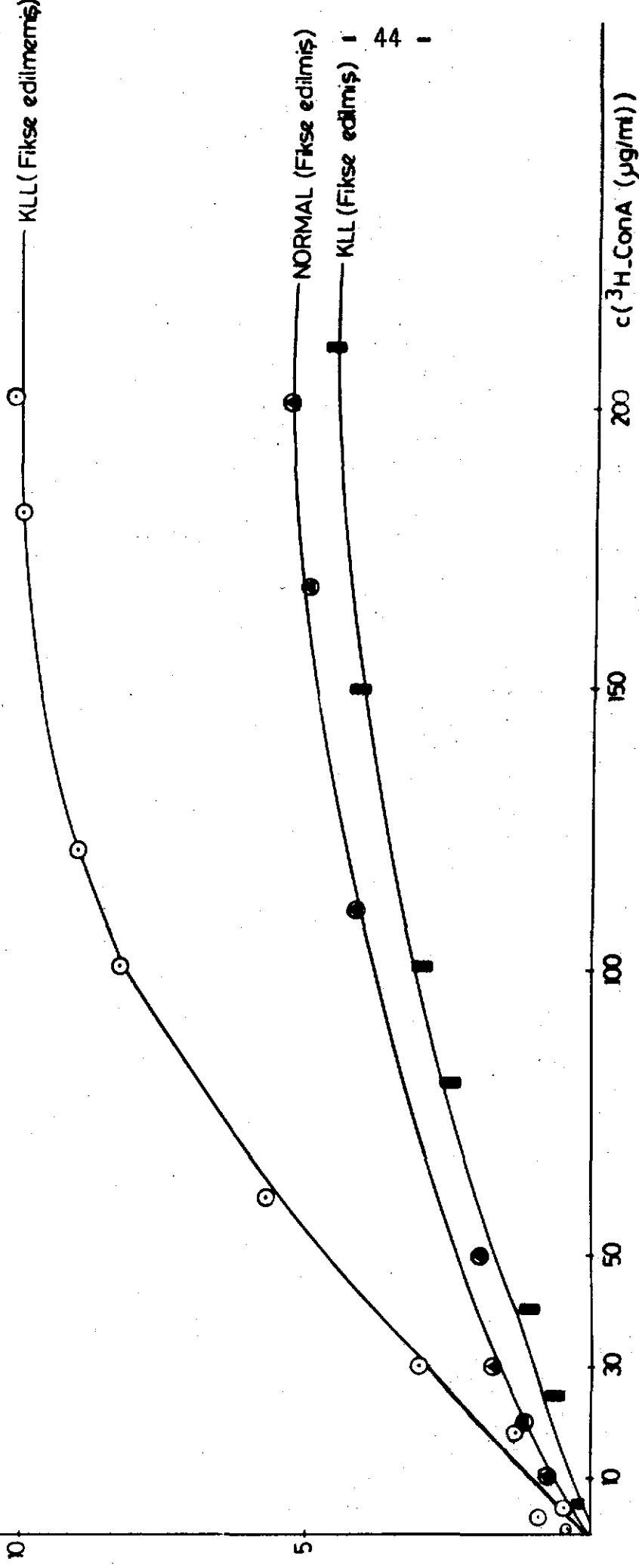
HASTA	% Hairy Hücresi
1) H.Y.	
B+Null Lenfositleri	88
T-Lenfositleri	6
2) Ö.A.	
B+Null Lenfositleri	60
T-Lenfositleri	5

KLL ve "Hairy Cell" lösemili hastaların periferik kanlarından Ficoll-Hypaque yoğunluk gradienti ile ayrılan lenfositlerden $2x E^+$ rozet aracılığı ile B+Null lenfosit popülasyonu ayrılmış ve 3H -Con A ile bağlanma deneylerinde kullanılmıştır. Fikse edilmiş lenfositlerin kullanıldığı deneylerde ise $2x E^+$ rozet aracılığı ile ayrılan B-Null lenfosit popülasyonu glutaraldehid aracılığı ile fikse edildikten sonra 3H -Con A ile bağlanma deneylerinde kullanılmıştır.

III.2. 3H -Concanavalin A ile Hücrelerde Con A Reseptör Sayılarının ve Affinitelerinin İncelenmesi:

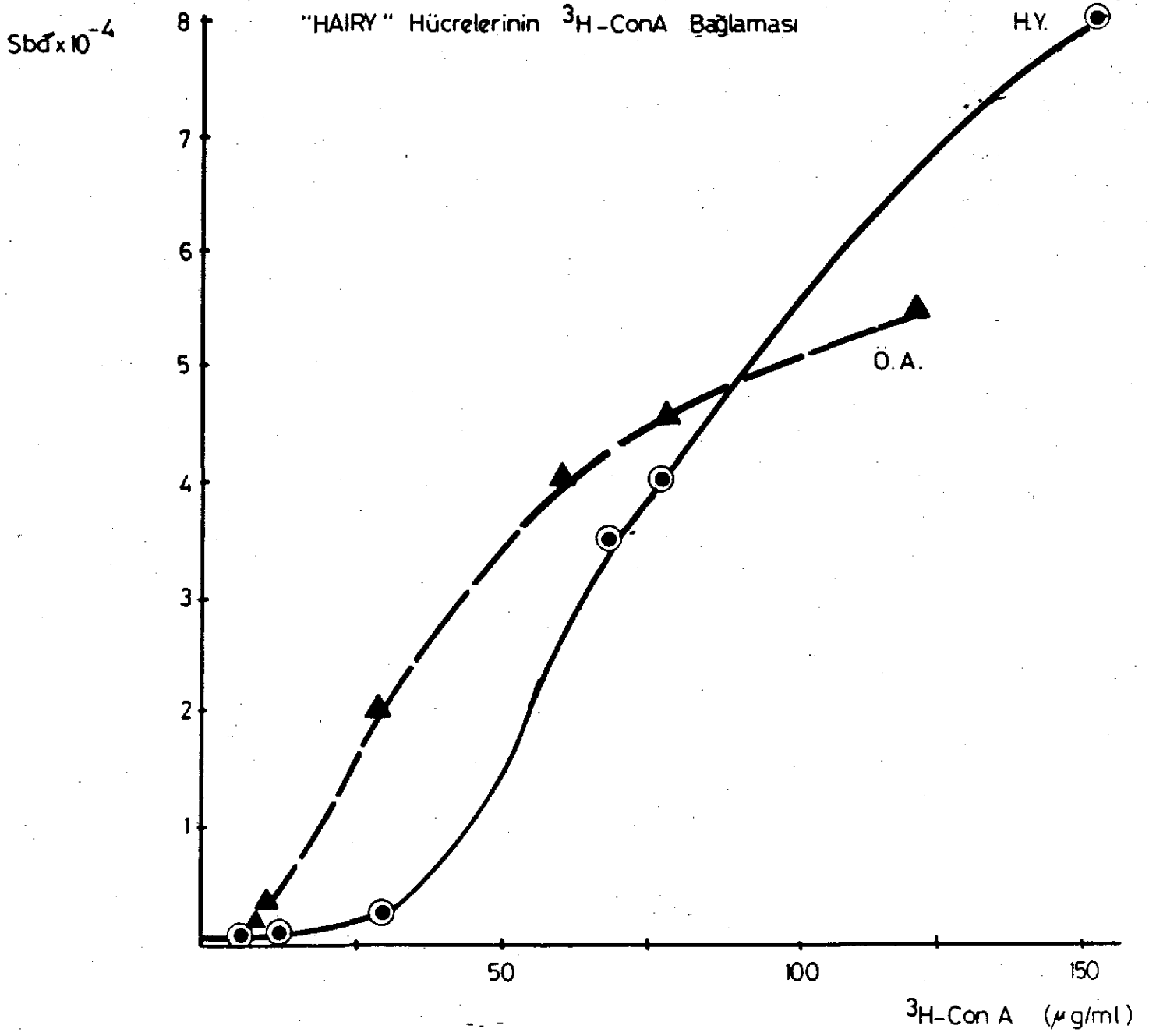
Sağlıklı kişilerin ve KLL'li hastaların B+Null lenfositleri ile yapılan bağlanma deneylerinin sonuçları Tablo V'de özetlenmiştir. Şekil 4'de fikse edilmiş normal B-lenfositler ve KLL'li hastaların fikse edilmiş ve edilmemiş B-lenfositleri için bağlanma eğrileri görülmektedir. "Hairy Cell" lösemili hastaların bağlanma eğrisi Şekil 5'de görülmektedir. Normal ve KLL B-lenfositlerinin aksine, "Hairy Cell" lösemili hastalarda, bağlanma eğrisi "sigmoid"dir, bu nedenle, Hairy hücreleri için Scatchard doğruları çizilemediğinden Con A reseptör sayısı ve assosiasyon sabitle-ri saptanamamıştır.

Sbd x 10³



Şekil 4: Normal ve KLL B-Lenfositleri için Bağlanma Eğrileri

- : Normal B-Lenfositleri
- : Fikse edilmemiş KLL B-Lenfositleri
- : Fikse edilmiş KLL B-Lenfositleri

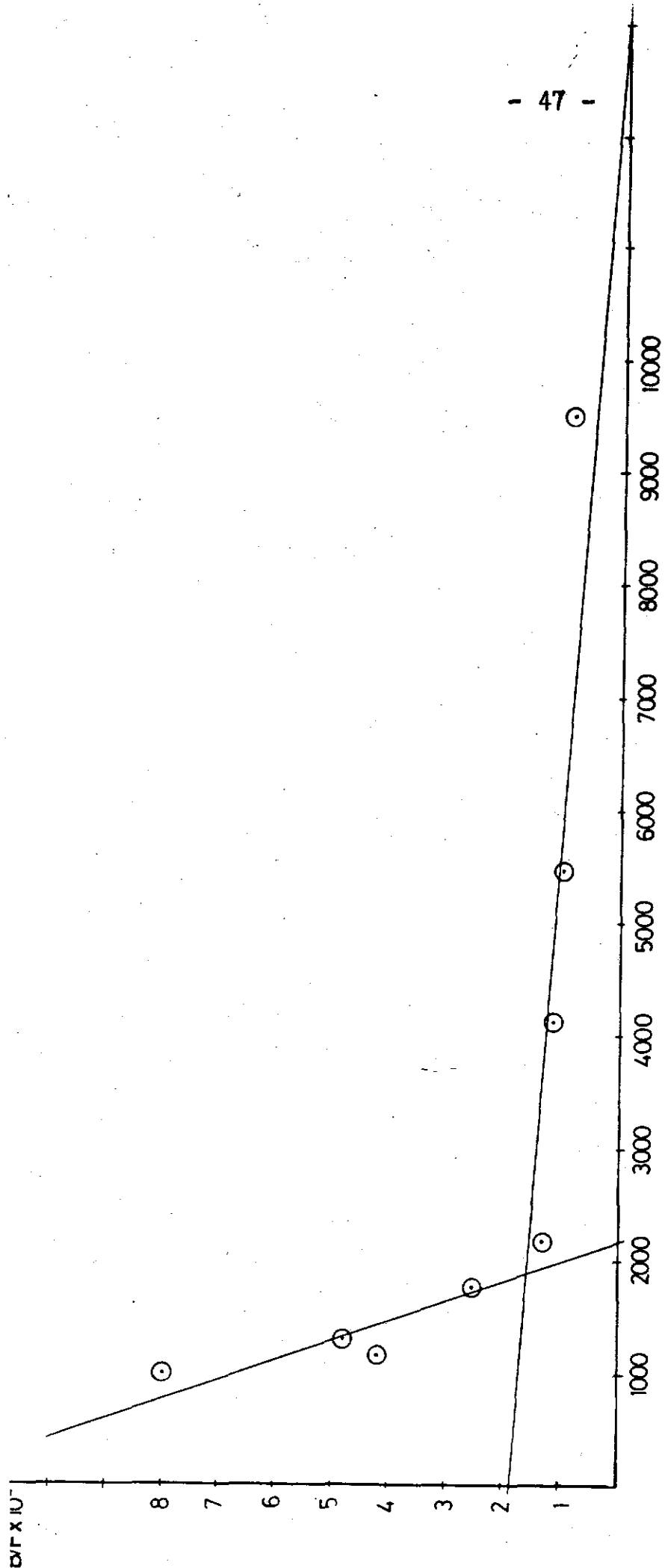


Şekil 5: Hairy Cell Hücrelerinin Bağlanma Eğrisi.

KLL'li hastaların lenfositleri ve "Hairy Cell" lösemili hastaların periferik hücreleri ile yapılan tüm bağlanma deneylerinde özellikle yüksek Con A derişimlerinde α -Metilmannopironozid'li kontrol değerleri çok yüksek bulunduğundan bağlanma eğrilerinde gösterilmemiştir (Bakınız tartışma).

Fikse edilmiş normal ve KLL B-lenfositlerinin Scatchard doğruları ardışık olarak Şekil 6 ve 7'de görülmektedir. Scatchard analizi sonucu hem normal hem de lösemik B-lenfositlerde farklı affinitede iki reseptör olduğu saptanmıştır. Bağlanma çalışmalarında fikse edilmemiş lenfositler kullanıldığında, lösemik B-lenfositler için yüksek affiniteli reseptörün normale göre yaklaşık 3 misli daha yüksek affinitede olduğu gözlenmiştir. Normal ve lösemik grubun B-lenfositleri glutaraldehid aracılığı ile fikse edildiğinde ise, normal lenfositler için hesaplanan affinite değerinde farklılık olmazken lösemik grupta bu değer on kez azalmaktadır.

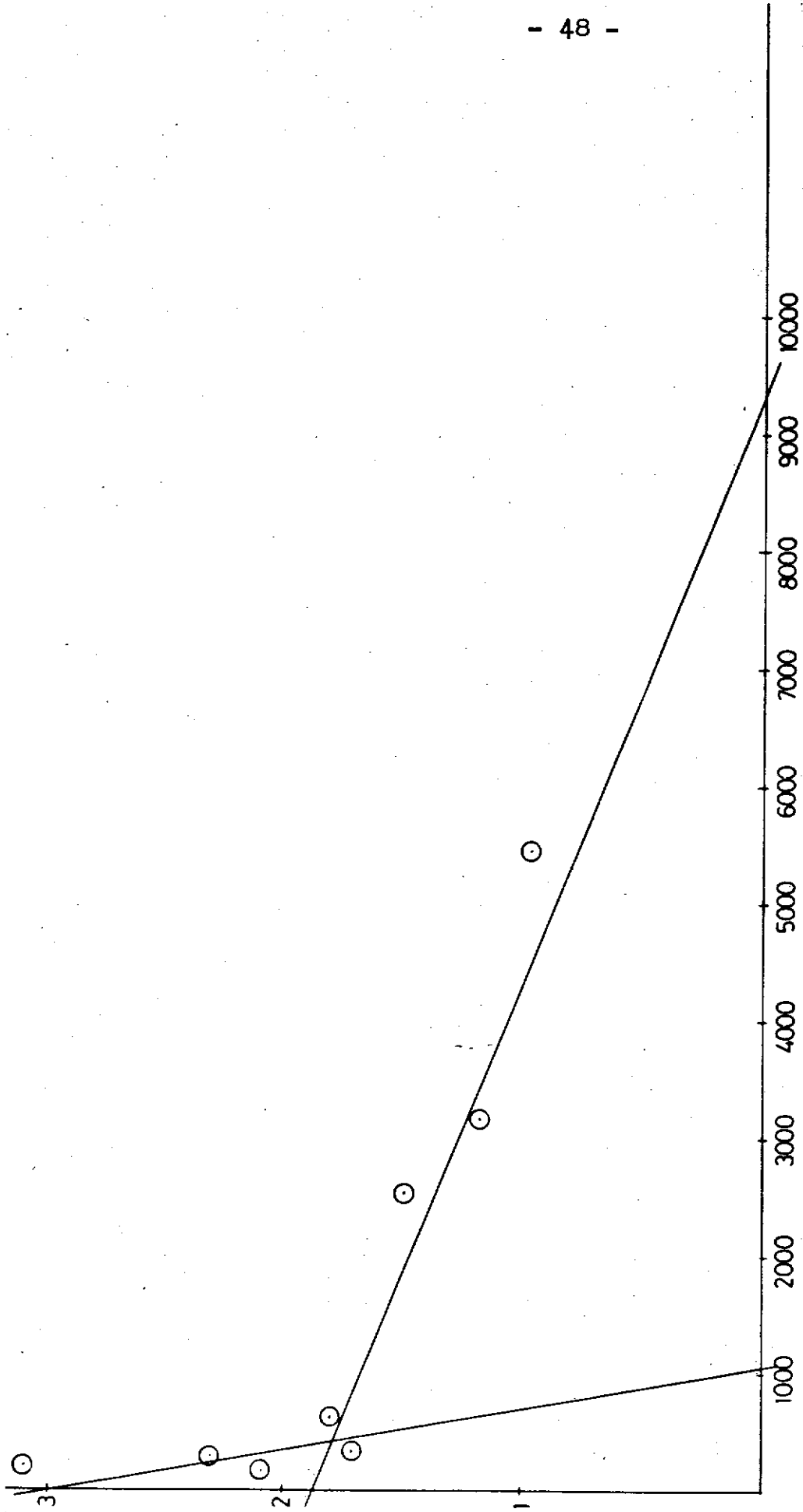
Düşük affiniteli ikinci reseptör ise normal, lösemik, fikse edilmiş veya edilmemiş lenfositlerde yaklaşık aynı değeri vermektedir.



Şekil 6: Fikse edilmiş Normal B-Lenfositlerinin Scatchard Doğrusu

Ordinat: Bağlı/Serbest $^3\text{H-Con A}$.

Absissa: $^3\text{H-Con A}$ ($\mu\text{g/ml}$)



Şekil 7: Fikse edilmiş KLL B-lenfositlerinin Scatchard Doğrusu.

Ordinat: Bağlı/Serbest $^3\text{H-Con A}$

Absissa: $^3\text{H-Con A} (\mu\text{g/ml})$

TABLO V
Con A Reseptörlerinin Sayı ve Affiniteleri

	Ka_1 (M^{-1})	Ka_2 (M^{-1})	N_1 Bağlama Bögesi/Hücre	N_2 Bağlama Bögesi/Hücre
Normal (Fikse edilmemiş) n = 2	18.6×10^6	0.7×10^6	9.1×10^6	40×10^6
KLK (Fikse edilmemiş) n = 2	54.4×10^6	0.6×10^6	2.7×10^6	36.6×10^6
Normal (Fikse edilmiş) n = 2	19.1×10^6	0.7×10^6	5.3×10^6	29.5×10^6
KLK (Fikse edilmiş) n = 4	6.2×10^6	0.5×10^6	4.9×10^6	33.8×10^6

Reseptör sayılarında ise, fiksasyon ile her iki grupta da farklılık oluşmuştur. Fiksasyon ile normal lenfositlerin yüksek affiniteli reseptörlerinde sayısal azalma gözlenirken, lösemik grupta artma gözlenmektedir. Düşük affiniteli reseptörlerin sayısı ise fiksasyon sonunda her iki grupta da azalmıştır.

III.3. Hücrelerde ANS Bağlanma Yerlerinin Sayı ve Affinitelerinin İncelenmesi:

KLL, lenf bezi ve "Hairy Cell" lösemi hücrelerinin görelî hidrofobisitesini saptamak amacıyla ANS bağlanma bölgelerinin sayı ve affiniteleri hesaplanmıştır. Sonuçlar normal ve hastalar için Tablo VI'da özetlenmiştir. KLL B-lenfositlerinin hidrofobik bölgelerinin sayısı normale göre oldukça azalmıştır. Buna karşın bu bölgelerin hidrofobisitesi normale göre yükselmiştir. Lenf nodu B-lenfositleri hidrofobik bölgelerin sayısı açısından KLL B-lenfositlerine yakın benzerlik göstermektedir. Buna karşın lenf nodunda, bu bölgelerin hidrofobisitesi normal B-lenfositler için elde edilen değerin altına düşmüştür. "Hairy" hücrelerinde ise hidrofobik bölgelerin sayısı normalin yarısına karşıt gelmektedir. Hidrofobisite açısından ise Hairy hücreleri lenf nodu lenfositlerine benzerlik göstermektedir.

TABLO VI
ANS Bağlanma Bölgelerinin Sayı ve Affinitesi

	Bağlanma bölgelerinin affinitesi M-1 Ka	Bağlanma bölgelerinin sayısı (N/hücre) N	Bağlanma bölgesi ile Triptofan birimi arası uzaklık R
Normal n = 4	14.3×10^4	4.8×10^8	32.6
KLL n = 5	20.5×10^4	0.9×10^8	29.2
Lenf Nodu n = 4	9.3×10^4	1.1×10^8	29.6
"Hairy Cell" Lösemi n = 2	9.23×10^4	2.86×10^8	28.2

III.4. Hücrelerde ANS Bağlanma Yerleri ile Triptotan Molekülleri Arasındaki Uzaklığın (r) İncelenmesi:

Tablo VI'da ayrıca zardaki ANS bağlanma bölgeleri ile en yakın Triptofan birimleri arası uzaklıklar özetlenmiştir. Triptofan birimlerinin ANS bağlanma bölgesine uzaklığı normal B-lenfositlerinde $32,6 \text{ \AA}$ iken, KLL ve lenf nodu B-lenfositlerinde azalmış görünmektedir. KLL ve lenf nodu B-lenfositleri bağlanma bölgelerinin Triptofan birimlerine uzaklığı açısından birbirine benzerlik göstermektedir. Hairy hücrelerinde ise bu uzaklık oldukça azalmış görünmektedir.

IV- T A R T I Ő M A

Normal insan kanından periferel lenfositlerin ayrılması ve daha sonra bu lenfositlerden B-lenfositlerinin saflaştırılması amacıyla kullanılan yöntem Boyum'un (45) yoğunluk santrifügasyonu prensibine dayanan yönteminin bir modifikasyonudur (46). Bu modifikasyonun önemi çok az Ficoll-Hypaque kullanarak (diğer yöntemlerin 1/10'nu kadar) ayırım yapması ve eritrosit bulaşığının en düşük düzeyde tutulabilmesidir.

B-lenfositlerin saflaştırılmasında rozet oluşumunun 30 dk. 37°C'da iki kez gerçekteştirilmesi ve özellikle ikinci rozetlemede yaklaşık 18 saat beklenmesi T-lenfositlerinin büyük ölçüde giderilmesini sağlamıştır. Bu yöntem ile ilk rozetlemede aktif T-lenfositleri, ikinci rozetlemede ise geri kalan lenfositler uzaklaştırılmış olmaktadır. Bu çalışmada B-lenfositi denildiğinde T-lenfositlerinden fakir B+Null lenfosit popülasyonu ifade olunmaktadır.

Bu çalışmada, kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalara tanı konulmasında klinik ve hematolojik yöntemlerin

yanısıra B-lenfositlerinin tanımı için yüzey immunoglobulin ve EAC-rozet yöntemleri immunolojik kriterler olarak kabul edilmiştir.

Con A hücre yüzeyinin yapısı açısından normal ve transforme hücrelerin karşılaştırılmasında pek çok araştırmacı tarafından özgül bir ligand olarak kullanılmıştır (20,30) Bu amaçla çok değişik yöntemlerle işaretlenmiş Con A kullanılmaktadır. Deneylerimizde kullanılan ³H-asetil türevinin, hemaglutinasyon deneyi ile doğal lektine eşdeğer biyolojik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Yanısıra, yüksek özgül etkinlikte ve dayanıklı olması nedeniyle diğer lektin işaretleme yöntemlerine tercih edilmiştir. Bu nitelikler, özellikle hücre yüzeyindeki az sayıda ve yüksek affiniteli reseptörün saptanmasında önem kazanmaktadır (57).

Bu çalışmada kullanılan bağlanma yöntemi ve sonuçların Scatchard yöntemi ile analizi özgül olmayan bağlanmayı minimale indirmekte ve endositozu duyarlı bir şekilde ölçmektedir. Ayrıca, yöntemin yeğlenmesinin bir diğer nedeni, hücreleri yıkama ve pipetleme gibi mekanik etkilerle fazla oranda karşı karşıya bırakmamasıdır. Bağlanma deneylerinin 0-4°C aralığında yapılması zar akışkanlığını azaltarak reseptör çevresini etkilemektedir. Zar akışkanlığındaki bu azalma ise, deney sonuçlarının hatalı yorumuna neden

olabilecek endositozun önüne geçilmesine olanak vermektedir. Virus ile transforme doku kültürü hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada 0°C 'daki deneylerin 22°C 'da yapılan deneylere kıyasla, hücre içine alınan lektin miktarında (internalized) önemli azalma sağlandığı saptanmıştır. Yine aynı çalışmada 22°C 'da yapılan bağlanma deneyinde Con A'nın özgül reseptörler dışında da hücre yüzeyine bağlandığı ve hücre içine alındığı belirtilmektedir. 0°C bağlanmanın azalışı 22°C 'da kıyasla bu sıcaklıkta lipid fazının fiziksel durumundaki farklılığa bağlanmıştır (58). Ancak, KLL'li hastalarda B-lenfositleri ile yapılan deneyler $0^{\circ}-4^{\circ}\text{C}$ aralığının endositozun önüne geçmek için yeterli olmadığını göstermiştir. Normal (fikse edilmiş ve edilmemiş) B-lenfositleri ile yapılan deneyler ise $0-4^{\circ}\text{C}$ aralığının endositozu yeterli düzeyde engellediğini ortaya koymaktadır.

Reseptörlerin sayı, affinite ve heterojenliğinin ölçülmesinde en çok kullanılan yöntem Scatchard yöntemidir (55). Scatchard analizi ile değerlendirilmede, ortama konan ligandın % 10'nu veya daha fazlası bağlandığı takdirde, sonsuz reseptör olduğu anlamında yatay bir doğru elde edilir. Deneylerimizde bağlanma daima ortama konan toplam serbest lektinin % 5'inden az olmuştur. Bu da Scatchard analizi sonuçlarının geçerliliğine işaret etmektedir.

Hücre zarının yapısında hidrofilik bölgeleri protein ve glikoproteinler oluşturmaktadır. Fosfolipidler ise büyük ölçüde hidrofobik bir matriks oluşturur. Bu çalışmada, zar hidrofobisitesi hakkında fikir edinmek amacıyla ANS'den yararlanılmıştır. ANS hidrofilik ve hidrofobik ortamlarda farklı fluoresans veren bir bileşiktir. Herhangi bir zarın ANS bağlayan bölgelerinin çokluğu, zarın hidrofobisitesinin yüksekliği ile doğru orantılıdır (56). ANS ile yapılan deney sonuçlarının yine Scatchard yöntemi ile analiz edilmesi, zardaki hidrofobik bölgelerin sayısı ve hidrofobisitesi hakkında fikir edinilmesine olanak sağlamıştır. ANS, ayrıca, zar proteinlerinin triptofanları ile enerji alışverişine girdiğinden (56), bağlanma bölgesi ile triptofan birimleri arası uzaklığın hesaplanması mümkün olmuştur.

Şekil 4'deki bağlanma eğrisinde fikse edilmemiş KLL lenfositlerinin normal B-lenfositlerine oranla iki kez daha fazla Con A bağladığı görülmektedir. KLL lenfositlerindeki yüksek bağlanmanın α -MM kontrollerinin çalışmamasına bağlı olduğu düşünülebilirse de Şekil 4'de görüldüğü gibi normal lenfositler için bağlanmada da α -MM kontrolleri hesaba katılmamıştır. Bu nedenle iki lenfosit türü arasındaki bağlanma farkı özellikle düşük derişimler için özgül olmayan bağlanmadan ileri gelmemektedir. Diğer taraftan fikse edilmiş KLL lenfositlerinde de α -MM kontrollerinin

çalışmamasına karşın toplam bağlanma yaklaşık olarak normal düzeyine düşmektedir.

Bu çalışmada kullanılan hücrelerin çoğunda α -MM kontrollerinin çalışmıyor olması özellikle yüksek derişimlerde özgül olmayan bağlanmanın denetim altında tutulamadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle düşük affiniteli çok sayıdaki reseptörlerin sayı ve affinitelerinin karşılaştırılması kanımızca fazla önem taşımamaktadır. Diğer taraftan yüksek affiniteli az sayıdaki reseptörün karşılaştırılması büyük önem taşımaktadır.

Özellikle fikse edilmiş KLL lenfositlerinde toplam bağlanmanın düşmesi bu tür lenfositlerin büyük ölçüde reseptör aracılı endositoz yaptığını düşündürmektedir (59). Daha önce yapılan çalışmalar normal büyüme ve farklılaşmanın hücre zarının dinamik değişikliği ile el ele gittiğini ortaya koymuştur (60) bu değişiklikler mikrotübül ve mikrofilaman sistemindeki değişimlere bağlı olabileceği gibi lipid bileşimindeki değişimlere de bağlı olabilir (38). KLL lenfositleri ile daha önce yapılmış çalışmalarda lipid tabakada kolesterol miktarlarının azaldığı ve buna bağlı olarak zarın akışkanlığında artma gözleendiği belirtilmektedir (61,62). Zar akışkanlığındaki artmaya karşın bu tür lösemili hücrelerin kutup oluşturma yeteneğinin çok azaldığı da saptanmıştır (39). Zarda yatay

(lateral) harekete bağlı bir olay olan kutup oluşturma KLL'de azalırken, fikse edilmemiş normal ve KLL lenfositleri ile yaptığımız deneylerde KLL lenfositlerinin çok daha yüksek Con A bağlaması endositozun bu hücrelerde farklı bir mekanizma ile oluştuğunu düşündürebilir.

"Hairy Cell" lösemili hastalarda morfolojik olarak zarda uzantılar ve saçaklar gösteren "Hairy" hücrelerinde ise bağlanmanın sigmoid karakterli olduğu gözlenmiştir. Fiksasyon ile sigmoid bağlanmanın önüne geçilememektedir. Bu da reseptörler arası etkileşimin zar akışkanlığı nedeniyle ortaya çıkmadığını göstermektedir. Sigmoid bağlanmanın dimer-tetramer Con A arasında seçim yapan farklı tür reseptörlere bağlı olduğu kanısına varılmıştır.

Hairy Cell lösemili iki hastadan elde edilen sonuçlar splenektomi sonrası değişik zamanlarda tekrarlandığında sigmodisitenin periferdeki toplam hairy hücre yüzdesi ile doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Bu bulguda sigmoid bağlanma davranışının tümüyle hairy hücre karakteriştiği olduğuna işaret etmektedir. Yapılan bir diğer çalışmada yine "Hairy" hücrelerinin özelliği olarak bu hücrelerin spontan kutup (capping) oluşturmasının hiçbir şekilde önlenemediği ileri sürülmüştür (63).

ANS aracılığı ile yapılan deneylerde KLL, lenf bezi ve hairy hücrelerinin zar hidrofobisiteleri normalden çok

farklı bulunmuştur. KLL B-lenfositlerinin yüksek hidrofo-
bisitede, daha az sayıda hidrofobik bölge içermesi kutup-
laşmaya kadar gitmeyen gruplaşma (patching) ile açıklana-
bilir (64). Bu da yukarıda sözü edilen edositozu hızlan-
dırıcı bir etken olabilir.

Özetle, bazı malign lenfoproliferatif hastalıklarda
transforme hücrelerin Con A bağlama özellikleri normal-
den farklılıklar göstermektedir. KLL lenfositlerinin nor-
male göre daha fazla Con A bağlaması Hairy hücrelerinin
ise sigmoid bağlanma göstermesi en belirgin özellikleri-
dir. Fikse edilmemiş hücreler ile yapılan deneylerin so-
nuçları fikse edilmiş hücreler ile yapılan deney sonu-
çları ile karşılaştırıldığında, KLL lenfositlerinde endo-
sitoz kapasitesinin büyük ölçüde arttığı gözlenmiştir.
Bulgularımız, fiksasyon ile endositozun durdurulmasının
daha geçerli bağlanma sonuçları verdiğini göstermektedir.
Diğer taraftan Hairy hücreleri fiksasyondan etkilenmemek-
te ve sigmoid bağlanma özelliklerini korumaktadır.

KLL lenfositlerinde kutuplaşmaya kadar gitmeyen bir
gruplaşmanın olduğu da bir diğer önemli özellik olarak dü-
şünülebilir. Sözü edilen bu çalışmada zar değişiklikleri-
nin normal farklılaşma mekanizmalarında meydana gelebile-
cek bir hata ile ortaya çıkması olasıdır. Bu olasılığın
farklılaşmanın hangi evresinde ortaya çıktığının araştı-
rılması transformasyon mekanizmalarına ışık tutacaktır
kanısındayız.

Ö Z E T

Lenfoproliferatif hastalıklarda hücre zarının özelliklerini açıklığa kavuşturmak amacı ile yapılan bu çalışmada ³H-Con A reseptörleri sayı ve affinite açısından karşılaştırılmıştır. Normal ve KLL B-lenfositlerinde farklı affinitede iki reseptör olduğu saptanmıştır. Yüksek affiniteli reseptörün affinitesi KLL B-lenfositlerinde normale kıyasla 10 kez daha düşüktür. Düşük affiniteli reseptör ise iki grup arasında büyük farklılık göstermemektedir. Reseptör sayıları açısından karşılaştırma yapıldığında ise normal lenfositlerde yüksek affiniteli reseptör daha fazla görünmektedir. Buna karşın lösemik B-lenfositlerde düşük affiniteli reseptör sayıca artmıştır.

ANS aracılığı ile zar hidrofobisitesi açısından karşılaştırma yapıldığında KLL B-lenfositlerinin hidrofobik bölgelerinin normale göre oldukça azaldığı saptanmıştır. Buna karşın bu bölgelerin hidrofobisitesi KLL'de normale göre yükselmiştir.

Lenf nodundan izole edilen B-lenfositleri ise periferik lenfositlere benzerlik göstermektedir.

Diğer bir grubumuzu oluşturan Hairy Cell lösemi hücrelerinde ise hidrofobik bölgelerin sayısı normalin yarısına karşıt gelmektedir. Hidrofobisite açısından Hairy hücreleri lenf nodu lenfositlerine benzerlik göstermektedir.

Bulgular transformasyon farklılaşma mekanizmaları göz önüne alınarak tartışılmıştır.

K A Y N A K L A R

1. Emin Kansu, Aslihan Turhan: Lenfositler ve Immün Cevap. Kanser 9 (1-2): 94-104, 1979
2. Claire M. Payne, Lewis Glasser: Evaluation of Surface Markers on Normal Human Lymphocytes Containing Parallel Tubular Arrays: A Quantitative Ultrastructural Study. Blood 57 (3): 569-73, 1981
3. David T. Rowlands, Ronald P. Daniele: Surface Receptors in the Immune Response. N Engl J Med 293: 26-32, 1975
4. Martin C. Raff: T and B Lymphocytes and Immune Responses. Nature 243: 19-23, 1973
5. Jonathan W. Uhr.: The Membranes of Lymphocytes. Hospital Practise 113-119, 1975
6. Jean-Pierre Despont, Elisabeth Banderet, Carlos A. Abel: Effect of Lectins on the Interactions Between Human Peripheral Blood Lymphocytes and Monocytes. Cell Immunol 57: 145-154, 1981
7. Nathan Sharon, Halina Lis: Lectins Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. Science 177: 949-959, 1972

8. Halina Lis, Nathan Sharon: Plant Lectins. *Ann Rev Biochem* 42: 541-574, 1973
9. Carl Borrebaeck, Bo Mattiasson: Lectin Carbohydrate Interactions Studied by a Competitive Enzyme Inhibition Assay. *Anal Biochem* 107: 446-450, 1980
10. C.J. Louis, R.G. Wyllie. Fluorescein-Concanavalin A Conjugates Distinguish Between normal and Malignant Human Cells: A Preliminary Report. *Experientia* 37 (5): 508-9, 1981
11. Kenneth D. Noonan, Max M. Bürger: The Relationship of Concanavalin A Binding to Lectin-Initiated Cell Agglutination. *J Cell Biol* 59: 134-142, 1973
12. P.G. Phillips, P. Furmanski, M. Lubin: Cell Surface Interactions with Concanavalin A. *Exp Cell Res* 86: 301-308, 1974
13. Maria Dani, Fabrizio Manca, Giovanni Rialdi: Calorimetric Study of Con A Binding to Saccharides. *Biochim Biophys Acta* 667: 108-117, 1981
14. Menahem Shoham, A. Joseph Kalb, Israel Pecht: Specificity of Metal Ion Interaction with Concanavalin A. *Biochemistry* 12: 1914-1917, 1973

15. Mark S. Bretscher: Membrane Structure: Some General Principles. *Science* 181, 622-629, 1973
16. Mark S. Bretscher, Martin C. Raff: Mammalian Plasma Membranes. *Nature* 258 (6): 43-49, 1975
17. Jos A.F. Op den Kamp: Lipid Asymmetry in Membranes. *Ann Rev Biochem* 48: 47-71, 1979
18. R.L. O'Brien, J.W. Parker, J.F.P. Dixon: Mechanisms of Lymphocyte Transformation. *Prog Mol Subcell Biol* 6: 201-270, 1978
19. Klaus Resch, Theodore Wood, Hinnak Northoff, Herbert L. Cooper: Microtubules: Are They Involved in the Initiation of Lymphocyte Activation. *Eur J Biochem* 115: 659-664, 1981
20. T. Pozzan, A.N. Corps, T.R. Hesketh, J.C. Metcalfe: Mitogenic Stimulation and the Redistribution of Concanavalin A Receptors on Lymphocytes. *Exp Cell Res* 134: 399-408, 1981
21. Kurt H. Stenzel, Albert L. Rubin, Abraham Novogrodsky: Lymphocyte Commitment to DNA Replication Induced by Concanavalin A. *Exp Cell Res* 115: 285-291, 1978

22. Hinnak Northhoff, Herbert Jungfer, Klaus Resch: The Effect of Anti-Con A on the Binding of Con A to Lymphocytes. *Exp Cell Res* 115: 151-158, 1978
23. Janet M. Oliver, Erwin W. Gelfand, Christine B. Pearson, Janet R. Pfeiffer, Hans-Michael Dosch: Microtubule Assembly and Concanavalin A Capping in Lymphocytes: Using Normal and Abnormal Human Peripheral Blood Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (6): 3499-3503, 1980
24. Sarah Spiegel, Meir Wilchek: Membrane Sialoglycolipids Emerging as Possible Signal Transducers for Lymphocyte Stimulation. *J Immunol* 127 (2): 572-575, 1981
25. Ira Pastan: Cell Transformation. *Methods Enzymol* 58: 368-370, 1979
26. Gordon Parry, Susan P. Hawkes: Detection of an Early Surface Change During Oncogenic Transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 (8): 3703-3707, 1978
27. Adolfo Martinez-Palomo: The Nature of Neoplastic Cell Membranes. *Exp Mol Pathol* 31 (1): 219-225, 1979
28. K.G. Sundquist, P. Otteskog, L. Wanger, R. Thorstensson, G. Utter: Morphology and Microfilament Organization in Human Blood Lymphocytes. *Exp Cell Res* 130 (2): 327-337, 1980

29. Leonard Warren, Clayton A. Buck, George P. Tuszynski:
Glycopeptide Changes and Malignant Transformation:
A Possible Role for Carbohydrate in Malignant Behavior.
Biochim Biophys Acta 516 (1): 97-127, 1978
30. G.L. Nicolson: Trans-Membrane Control of the Receptors
on Normal and Tumor Cells. Biochim Biophys Acta 458:
1-71, 1976
31. S.J. Singer, Garth L. Nicolson: The Fluid Mosaic Model
of the Structure of Cell Membranes. Science 175:
720-731, 1972
32. Antti Vaheri, Deane F. Mosher: High Molecular Weight
Cell Surface Associated Glycoprotein (Fibronectin)
Lost in Malignant Transformation. Biochim Biophys Acta
516 (1): 1-25, 1978
33. Richard O. Hynes: Cell Surface Proteins and Malignant
Transformation. Biochim Biophys Acta 458: 73-107, 1976
34. Tingchung Wang, John E. Foker, Alvin M. Malkinson:
Protein Phosphorylation in Intact Lymphocytes Stimula-
ted by Concanavalin A. Exp Cell Res 134: 409-415, 1981
35. M. Necati Küçüksoy: Lenfoproliferatif Hastalıklar. Türk
Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları 1982, s:193,
205

36. Stephen F. Speckart, David H. Boldt, Richard P. MacDermott: Chronic Lymphatic Leukemia (CLL): Cell Surface Changes Detected by Lectin Binding and Their Relation to Altered Glycosyltransferase Activity. *Blood* 52 (4): 681-695, 1978
37. T.S. Zimmerman, H.A. Godwin, S. Perry: Studies of Leukocyte Kinetics in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 31 (3): 277-291, 1968
38. S.M. Fu, R.S. Winchester, T. Feizi, P.D. Walzer, H.D. Kunkel: Idiotypic Specificity of Surface Immunoglobulin and the Maturation of Leukemic Bone Marrow Derived Lymphocytes. *Proc. Natl Acad Sci* 71 (11): 4487-4490, 1974
39. Hester P.M. Pratt, Andrew Saxon, Melissa L. Graham: Membrane Lipid Changes Associated With Malignant Transformation and Normal Maturation of Human Lymphocytes. *Leuk Research* 2 (1): 1-10, 1978
40. Hannah Ben-Bassat: Changes in the Surface Membrane of Lymphocytes From Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia and Malignant Lymphomas. *Israel J Med Sci* 13 (8): 758-766, 1977

41. Uri Mintz, Leo Sachs: Changes in the Surface Membrane of Lymphocytes From Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia and Hodgkin's Disease. *Int J Cancer* 15:253-259, 1975
42. M.S. Pollack, G.H. Slimp, J.E. Sokal: The Serological Detection of Leukemia Associated Antigens in Chronic Leukemia. *Am J Heam* 3: 93-103, 1977
43. Robert W. Schroff, Kenneth A. Foon, Ronald J. Billing, John L. Fahey: Immunologic Classification of Lymphocytic Leukemias Based on Monoclonal Antibody-Defined Cell Surface Antigens. *Blood* 59 (2): 207-215, 1982
44. Faramarz Naeim: Cytoskeletal Control of Redistribution of Surface Membrane Receptors in Hairy Cell. *Am J Clin Pathol* 74: 660-663, 1980
45. A. Boyum: Isolation of Mononuclear Cells and and Granulocytes from Human Blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21 (Suppl. 97): 77, 1968
46. Yavuz Taga, Kaya Emerk: Periferik İnsan Kanından T ve B Lenfositlerin ve Diğer Hücrelerin İzolasyonunda Yeni Uyarlamalar. *Biokimya Dergisi* 4: 11, 1980

47. F. Aiuti, J.C. Cerottini, R.A. Coombs, M. Cooper, H.B. Dickler: Identification, Enumeration and Isolation of B and T-Lymphocytes from Human Peripheral Blood. *Scand J Immunol* 3: 521-532, 1974
48. C. Bianco, R. Patrick, V. Nussenzweig: A Population of Lymphocytes Bearing a Membrane Receptor for Antigen-Antibody-Complement Complexes. *J Exp Med* 132: 702-720, 1970
49. M.F. Greaves, G. Brown: Purification of Human T and B-Lymphocytes. *J Immunol* 112: 420-423, 1974
50. B.B.L. Agrawal, I.J. Goldstein: Physical and Chemical Characterization of Concanavalin A, the Hemagglutinin from Jack bean (*Canavalia ensiformis*) *Biochem Biophys Acta* 133: 376-379, 1967
51. "Chemical Notes " Packard Instrument, Co., Inc 1970
52. G.A. Bray: A Simple Efficient Liquid Scintillator for Counting Aqueous Solutions in a Liquid Scintillation Counter. *Anal Biochem* 1; 279-285, 1960
53. Garth L. Nicolson, Monique Locorbiere, Walter Eckhart: Qualitative and Quantitative Interactions of Lectins With Untreated and Neuraminidase-Treated Normal, Wild-Type, and Temperature-Sensitive Polyoma-Transformed Fibroblasts. *Biochemistry* 14: 172-179, 1975

54. H.P. Schnebli, T. Bachi: Reaction of Lectins With Human Erythrocytes. Exp Cell Res 91: 175-183, 1975
55. George Scatchard: The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. Ann N Y Acad Sci 51: 660-672, 1949
56. Angelo Azzi: The Use of Fluorescent Probes for the Study of Membranes. Methods in Enzymology, S.P. Colowick, N.O. Kaplan (derleyenler) Acad Press: New York and London C XXXII s:234, 1974
57. Kaya Emerk, Faruk Sinangil : ^3H -Con A ve Ferritin Con A Türevlerinin Hazırlanmasında Kullanılan Yüksek Verimli İki Yöntem. Biokimya Dergisi: 4: 181, 1979
58. Kenneth D. Noonan, Max M. Burger: Binding of ^3H -Concanavalin A to Normal and Viral Transformed Cells. J Biol Chem 12: 4286-4292, 1973
59. Barbara Pearse: Coated Vesicles. TIBS 5 (5): 131-134, 1980
60. J.L. Robbins, G.L. Nicolson: Surfaces of normal and Transformed Cells. Cancer (Becker F.F., Ed) 4; s:1 Plenum Press
61. Sheena M. Johnson, Mary Kramers: Membrane Microviscosity Differences in Normal and Leukaemic Human Lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun:80 (2):451-457, 1978

62. M. Inbar, M. Shinitzky: Cholesterol As a Bioregulator in the Development and Inhibition of Leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 71 (10): 4229-4231, 1974
63. F. Salsona, A. Afeltra, L. Annino, S. Pisarri-Salsano: The Peculiar Redistribution of Surface-Membrane Immunoglobulins (Sm-Ig) as a Diagnostic Marker of Hairy-Cell Leukemia (HCL). 5th Europ Imm. Meeting Abs. Book p 242: 22/16, 1982
64. Yavuz Taga: Normal Periferik İnsan B ve T Lenfositleri ile, K-562 Hücrelerinin Bazı Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Biokimya Programı Doktora Tezi. Ankara-1981 s: 71

K I S A L T M A L A R

ANS: 1-Anilino-8-naphtalene sulfonat

Con A: Concanavalin A.

E⁺rozet: Koyun eritrositi ile kendiliğinden rozet oluşumu.

EAC⁺rozet: Eritrosit-antikor-kompleman aracılığı ile rozet oluşumu.

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit.

FCS: Fetal Calf Serum.

FITC-a-human Ig: Fluoresceine isothiocyanate ile işaretli anti insan immunoglobulini.

GVB⁺⁺: Gelatin Veronal Tampon.

HCL: Hairy Cell Lösemi.

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi.

α -MM: α -Metilmannopironozid.

PBS: Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik

PHA: Phytohemaglutinin.

POPOP: p-bis- [2-(5-phenyloxazoly)] benzene .

PPO: (2,5-Diphenyloxazole)

SIg: Yüzey immünoglobulin.

