

**ÇOCUKLARI PNOMONİLİ ANNELERİN EĞİTİMİNDE KULLANILAN  
EĞİTİM KARTLARININ ETKİLİLİĞİ**

Sağlık Eğitimi Programı  
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

GÖNÜL DEMİR

ANKARA - 1981

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ENSTİTÜSÜ

HAPTENLERE KARŞI OLUŞAN  
HÜCRESEL VE HUMORAL İMMÜN CEVABIN İNCELENMESİ

Doktora Tezi  
Hazırlayan  
Mohammed S. El-Khateeb

ANKARA-1973

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında ve tezin yazılması esnasında büyük yardımlarını gördüğüm Dr. Őefik Ő.Alkan'a teőekkürü borç bilirim.

Yetiőmemde emeği geçen sayın hocalarım Prof. Dr. Muvaffak Akman'a, Prof. Dr. Ekrem Gülmezoğlu'na ve Doğ. Dr. Melahat Okuyan'a Őükranlarımı arzederim.

Ayrıca haptelik moleküllerin çoğunu bađıőlayan Dr. Volker Schirmacher'a (Karolinska Inst. Stockholm) ve M. tuberkülozis bakterisini hazırlamak lütfunda bulunan Dr. Nuri Yücel'e (Etlik Vet. Enst. Ankara) teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİ	3
MATERYAL ve METOT	10
Hapten-protein hazırlanması	11
Hapten-mikobakteriyum hazırlanması	14
Makrofaj Yayılım-Önlenim testi	15
İndirekt hemoliz deneyi	19
BULGULAR	22
A- Hapten-Mikobakteriyum'a karşı bağışıklık cevabı	22
B- Hapten-sığır serumu albuminine karşı bağışıklık cevabı	31
TARTIŞMA	38
ÖZET ve SONUÇ	46
KAYNAKLAR	49

## ŞEKİLLER

<u>NO</u>	<u>Sayfa</u>
1- Hapten-taşıyıcı ilişkileri	5
2- Diazonyum reaksiyonunun şematik açıklaması	11
3- MT kutusu	16
4- Kobaylarda kapalı sistemle periton hücresi toplanması	17
5- Benzoik asit izomerlerine karşı T-hücresi cevabı	23
6- PABA'ya karşı alınan hücre sel cevabın özgüllüğünün MT ile ıspatlanması	26
7- Sulfonilik asit grubuna karşı T-hücresi cevabı	27
8- Benzoik ve sulfonilik asit grupları arasında T-hücresi seviyesindeki çapraz reaksiyonlar	30
9- İndirekt hemoliz deneyinin mikrotitrasyon aletinde görünümü	32
10- Benzoik asit izomerlerine karşı B-hücresi cevabı	33
11- Sulfonilik asit izomerlerine karşı B-hücresi cevabı	35
12- Benzoik ve sulfonilik asit grupları arasında B-hücresi seviyesinde çapraz reaksiyonlar	37

## TABLÖLAR

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
1	Haptenlerin kimyasal yapıları ve adları	12
2	Kobayların Hapten-Mb'ye karşı verdikleri (in vivo) hücreşel cevap	24



B hücrelerinin karşılıklı etkileşimlerinin araştırmasında da kullanılmaya başlanmıştır. Fakat haptenler salt B-hücresi cevabı uyandırıp, T-hücresini etkilemediklerinden, bunlarla T-hücresi üzerinde çalışmak olanak dışı kalmıştır. Ancak son zamanlarda geliştirilen yeni bir yöntem haptenlere karşı T-hücresi cevabı uyandırma olanağını sağlamış bulunmaktadır. Buna göre mikobakteriyum hücre duvarına bağlanarak canlıya verilen haptenlere karşı, hemen salt T-hücresi cevabı meydana gelmektedir. Bu çalışmada yukarıdaki yöntemden yararlanarak birbirine çok benzeyen bir kaç haptene karşı T-hücresi cevabı uyandırıldı.

**Amacımız:**

- 1- Haptenlere karşı T-hücresi cevabı uyandırılabilirdiğini (in vitro) deneylerle doğrulamak,
- 2- T-hücresinin özgüllüğünü ve antijen ayırım gücünü tayin etmek,
- 3- Tek bir haptene karşı, hem T ve hem B cevapları uyandırmak ve bunları karşılaştırmaktır.

Günümüzde T-hücresinin otoimmün hastalıklarda, transplantasyon ve kanser immünolojisindeki aktif rolü kesinlikle ortaya konulmuştur. Böyle bir dönemde Türkiye'de ilk defa başlatılan ve T-hücresinin çeşitli özelliklerini tanımaya yönelik bu çalışmanın immünokimya ve immünobiyolojinin temel ve uygulamalı alanlarına yeni bilgiler sağlayacağı kanısındayız.



## G E N E L B İ L G İ

Bir molekülün antijen olabilmesi için kimyasal yapısının, zerk edildiği konakçının makromoleküllerinden farklı olması gerekmektedir. Çünkü immün sistem bir canlının kendi moleküllerini yabancılarından ayırtma yeteneğine üzerinde kurulmuştur. Fakat bir canlı için yabancı bütün maddeler antijenik değildir. O halde antijeniteyi yaratan etmenler nelerdir? Bilindiği gibi bunları sıralamak sanıldığı kadar kolay değildir. En başta antijen veya immünojen sözcüğü ~~izafi~~ bir kavramdır. Çünkü bir antijenin hazırlanışına, veriş yoluna, ve uygulanan serolojik testin duyarlılığına göre sonuçlar değişebilmektedir. Bütün bunlara rağmen immünojeniteyi belirleyen etmenler konusunda bir genelleme yapmak mümkündür. Moleküllerin; ağırlıkları, sertlikleri, verildiği konakçıya yabancı olmaları, çözünürlük derecesi yada vücuttan atılış hızı bunlar arasında sayılabilir.

Bir antijen yüzeyindeki özel bölgelere, "determinant grup" adı verilir. Bir molekülün immünojen olabilmesi için üzerinde mevcut bütün determinantların gerekli olmadığı gösterilmiştir (4). Üzerinde çok sayıda determinant bulunan bir moleküle karşı deney hayvanları çok değişik miktarda ve özgüllükte antikor yapmaktadır. Bu determinantlardan bazıları immünolojik olarak "etkin" (immünodominant) olup, kendilerine karşı yüksek seviyede antikor oluşur. Diğerleri ise "sesiz" determinant adını alırlar ve kendilerine karşı ya çok az yada hiç antikor meydana gelmez (4,5).

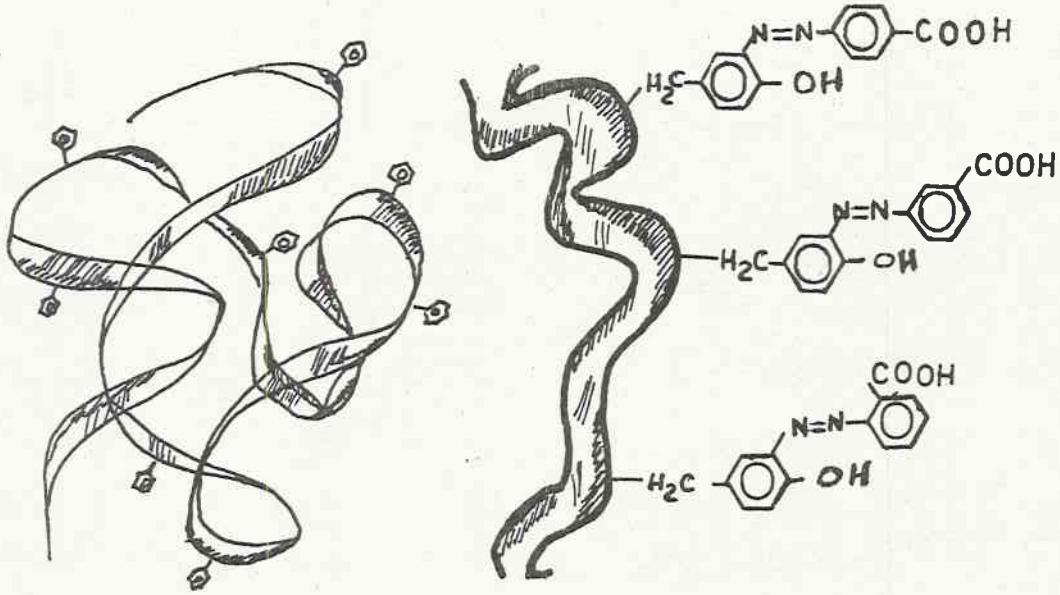
Mikroorganizmaların dışında, bazı maddelere karşı bağışıklık cevabı alınabileceği ilk kez Ehrlich tarafından gösterilmiştir (6). O günden bu yana belki sayamayacağımız kadar molekülün antijen olabileceği saptanmıştır.

Mevcut antijenleri; doğal, suni ve sentetik antijenler olmak üzere üç grupta toplamak mümkündür. Doğal antijenler grubuna bir çok biyolojik makromolekül girebilir. Fakat proteinler bunlar arasında en etkin-immünojenlerdir. Son yıllarda geliştirilen sentetik antijenler üzerinde burada fazla durulmayacaktır (7.8). Konumuza yakınlığı nedeni ile burada suni antijenlere geniş yer vermeyi uygun bulduk.

Yapısı bilinen kimyasal bileşikleri proteine bağliyerek onlara karşı antikor elde etme fikri Landsteiner ve arkadaşları tarafından büyük bir başarıyla geliştirilmiştir (9). Landsteiner ilk deneylerinde arsenilik ve benzoik asit gibi maddeleri kovalant olarak proteinlere bağlamış ve bunların immünojenitesini araştırmıştır. Örneğin: para aminoarsenilik asidi, globuline bağlayıp tavşanlara zerk ettiğinde bu hayvanların serumunda hem bu bileşikle hemde paraaminoarsenilik asit grubunu taşıyan başka proteinlerle presipitasyon veren antikorlar meydana geldiğini göstermiştir. Halbuki para aminoarsenilik asit kendi başına antikor teşekkülüne yol açmamaktadır. Landsteiner, öyle immünojenik olmayan, fakat teşekkül etmiş antikorlarla, özgül olarak bileşebilen maddelere "hapten", bunların bağlandıkları doğal proteinlere de "taşıyıcı" adını vermiştir. Günümüzde hapten ve onun proteine bağlandığı yeri içine alan bölgeye "determinent grup"denilmektedir (10). Hapten-taşıyıcı ilişkilerine bir örnek

olarak benzoik asit (Şekil 1) de sunulmuştur.

Uzun yıllar haptten denilince küçük moleküller akla gelmiştir. Fakat sonradan molekül ağırlığının önemli olmadığı anlaşılmıştır. Bugün birçok makromolekülün haptten olabileceği saptanmış bulunmaktadır (8,11).



Şekil 1- Haptten-taşıyıcı ilişkileri. Para, meta ve orto benzoik asitler protein içindeki tirzine bağlanmıştır.

Hapttenleri proteinlere bağlamak için ilk defa diazonium reaksiyonlarından yararlanılmıştır. Günümüzde bu yöntem yaygın olarak kullanılmakla beraber, iyodinasyon, karbodiimidler ve dinitrofenil türevleri v.b. gibi birçok yöntem geliştirilmiştir. Bugün haptten olarak aromatik aminlerin yanında dinitrofenil grupları (12,13) polisakkaritler, peptidler pürinler, pirimidin-

ler, penisilin v.b. gibi bir çok maddeler kullanılmaktadır (9,14,15). Hapten-taşıyıcı sisteminin keşfinden sonra hem anti-jen hemde antikor molekülünün kimyasal yapıları aydınlanmağa başlamıştır. Belirli haptenlere karşı antikor meydana getiril-miş ve bunlar saflaştırılarak antikorun kimyasal yapısı, bağlan-ma yüzeyi ve antijen-antikor birleşmesinin özgüllüğü gibi konu-larda, geniş bilgi edinilmiştir. Son zamanlarda immün cevapta rol alan hücre tiplerin tanımlanması üzerine hapten-taşıyıcı sistemleri yeniden önem kazanmıştır. Bu konuya aşağıda özetleye-ceğimiz immünobiyojik çalışmalardan sonra tekrar değinilecek-tir.

Zerk edilen bir antijenin vücutta önce makrofajlar tarafın-dan alınması, fakat antikorun plazmasitlerde sentezlenmesi; ba-ğışıklık cevabında, birden fazla hücre tipinin rol oynadığı dü-şüncesine yol açmıştır. Bu nedenle immünobiyojik çalışmalar daha çok makrofaj üzerinde olmuştur. Önceleri makrofajın anti-jeni içine alıp "işlediği", sonradan da antijenik molekülleri yüzeyinde toplayıp antikor yapan hücreye "sunduğu" fikri ileri sürülmüştür (16,17,18). Bir başka grup araştırmacılar ise makro-fajdan lenfositte bilgi aktarıldığını ve bunun RNA aracılığıyla gerçekleştiğini savunmuşlardır (19).

Makrofajların özgül immün cevapta ne gibi bir rolü olduğu kesinlikle bilinmemektedir. Bununla beraber immünolojik cevap esnasında makrofajın diğer lenfosit hücrelerle ilişki kurduğu hakkında bir görüş birliği vardır (20,21). Bu konuda yapılan çalışmalar yukardaki soruna çözüm getirmemekle beraber son 10 yıl içinde immünolojide "hücrelerin karşılıklı ilişkileri"

konusunda yeni bir çığır açmıştır. Günümüzde hücreler arasında işbirliği çalışmaları büyük bir hızla devam etmektedir.

İki değişik lenfoid hücrenin birbirleriyle ilişki kurdukları ilk defa 1966 yılında Claman ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (22). Araştırmacılar ışınlanmış farelere değişik organlardan hücreler aktararak kemik iliği ve timus hücrelerinin humoral immünitede karşılıklı işbirliği yaptıklarını ortaya koymuşlardır. Daha sonra Miller ve Mitchel tarafından 1968 de başlatılan bir seri çalışmada timusu çıkarılmış ve ışınlanmış fareler kullanılarak humoral cevapta iki ayrı tip hücrenin rol aldığı ve bunların kaynağı saptanmıştır (23,24). Buna göre timus sadece "antijen reaktif hücre" adı verilen ve antikor yapamayan hücreler, ihtiva etmektedir. Kemik iliğinde ise antikor yapmaktan sorumlu hücrelerin öncülleri bulunmaktadır. Sadece antijeni tanımak ve diğer hücrelere yardım etmekle görevli timus hücrelerine "timusa tabi hücre" anlamına gelmek üzere "T-hücresi" denilmektedir. Kemik iliğindeki öncül hücreler ise tek başına birçok antijene cevap vermemektedir ve T-hücresinin yardımına ihtiyaç göstermektedir. Kuşlarda "bursa fabrikusa" tabi olduğu için bu hücreler de "B-hücresi" adı verilmiştir (1,25).

Günümüzde üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı konulardan birisi hiç kuşkusuz immün hücrelerinin reseptörleridir. Hücrelerin antijenleri özgül olarak tanıyabilmeleri için yüzeylelerinde özel reseptörler taşımaları gerektiği eskidenberi düşünülmüştür. Bugün üzerinde durulan soru; bu reseptörlerin özellikleridir. Örneğin T ve B hücre reseptörlerinin aynı olup olmadığı ilginç bir konudur. B-hücresi yüzeyindeki reseptörlerin klâsik



immünoglobulin yapısındaki olduğu son yıllarda açığa kavuşturulmuş bulunmaktadır (26-29). Fakat T-hücresinin reseptörlerinin yapısı hakkında yukarıdaki kadar kesinlikle konuşmak mümkün değildir. Hapten taşıyıcı bileşikleri ile yapılan çalışmalar bu hücre reseptörlerinin B-hücresininkinden farklı yönleri bulunduğunu akla getirmiştir. Bilindiği gibi bir hapten-taşıyıcı bileşiği ile immünize edilen hayvanda iki türlü immün cevap meydana gelir: Haptene karşı yalnız antikor (B-hücresi cevabı) taşıyıcıya karşı ise hem antikor hem de T-hücresi cevabı oluşur (30). Fakat bu hayvanlarda en kuvvetli hücre sel immün cevap homolog antijenle, yani hapten-protein bileşiğiyle uyandırabilir (31,32). Yukarıdaki deneyde aynı hapten başka bir protein üzerinde, hücre sel cevap çıkarmaz. Hatırlanacağı gibi aynı durum haptene karşı ikincil humöral cevap alabilmek için de söz konusudur (32,33). Anti-hapten cevabı çoğu kez taşıyıcısı için yüksek bir özgüllük gösterir. Yani bir haptene karşı ikincil cevap alınabilmesi için, taşıyıcının her iki zerkte de aynı olması zorunludur. Bu durum haptene karşı B-hücresi cevabı alınabilmesinde T-hücresinin rolünü açıkça ortaya koymaktadır. Halbuki B-hücresinin sadece haptene cevap verdiği, dolayısıyla reseptörlerin yalnız haptene tanıdığı bilinmektedir (33,34). T ve B hücrelerinin hapten-taşıyıcı sistemlerinde daima belirli determinantlara cevap vermeleri, hücre reseptörleri arasındaki farktan ileri gelebilir. Öte yandan T-hücresi yüzeyinde immünoglobulin gösterilebilmenin güçlüğü, bu iki hücre reseptörleri arasında mutlak ayrılıklar olduğu fikrini desteklemektedir (35-38).

Klâsik haptene taşıyıcı sistemlerindeki haptene karşı, yalnız B-hücresi cevabı alındı bilinmektedir. Fakat Alkan ve arkadaşları bugüne dek kullanılagelmiş üç-klâsik haptene tirozine bağlamak suretiyle kobaylarla T-hücresi cevabı uyandırabildiğini (in vitro) lenfosit transformasyon testiyle ispatlamışlardır (39-41). Örneğin para amino arsanilik asit-tirozin, tek başına kobaylara verildiğinde salt T-hücresi cevabı, fakat proteine bağlı olarak verildiğinde salt B-hücresi cevabı uyandırmıştır. Yukardaki bulgu araştırmacılara şu fikri vermiştir: Bir haptene karşı hangi tip hücrenin cevap vereceğini o haptenin hücrelere sunulmuş şekli belirlemektedir. Parish'in salmonellalardan elde edilen flaajelin antijeni ile yaptığı çalışmalar yukarıdaki fikri destekler mahiyettedir (42). Bu gibi sonuçlara bakılarak "uygun şartlar bulunduğu takdirde, her çeşit antijenik determinanta veya haptene karşı, T-hücresi cevabı uyandırılabilirdiği fikri doğmuştur. Bu noktadan hareket ederek bugüne dek 4 adet klâsik haptene karşı yeni bir yöntemle T-hücresi cevabı uyandırılmış bulunmaktadır. Bu amaçla araştırmacılar haptene, taşıyıcı olarak bir protein yerine M. tuberkülozis bakterisine bağlamışlardır (43). Böylece günümüzde transplantasyon ve kanser immüno-lojisindeki rolü gittikçe önem kazanan T-hücresinin çeşitli özelliklerinin araştırılmasına yeni bir olanak doğmuş bulunmaktadır.

## MATERYAL VE METOT

### 1- Deneý Hayvanları:

Bütün deneylerde ağırlığı 500 - 600 gram (gr) olan, beyaz (Albino) kobaylar kullanılmıştır. Kobaylar Hacettepe Üniversitesi Deneý Hayvan Yetiştirme Laboratuvarından alınmıştır.

### 2- Zerkler:

a)- Hapten - Mikobakteriyum'un (H-Mb) 0.15 M NaCl (Serum Fizyolojik SF) içinde suspansiyonu yapıldı. Eşit hacimde tam olmayan Freund adjuvanı IFA (Incomplete Freund's Adjuvant) (Difco Lab. Detroit Mich.) ile karıştırıldı. Emülsiyon yapıldıktan sonra kobay başına 500 mikrogram (mcg) H-Mb düşecek şekilde zerk edildi. Bütün zerkler, dört ayak tabanının her birine 0.1'er cc olmak üzere dağıtılarak yapıldı.

b)- Hapten - Siğir Serum Albumini (H-BSA) ile immünizasyon yapılacağı zaman, H-BSA pH'sı 7.2 olan SF içinde çözüldü. Yarı yarıya tam Freund adjuvanı CFA (Complete Freund's Adjuvant) ile karıştırıldı. Emülsiyon yapıldıktan sonra her bir kobaya 500 mcg H-BSA zerk edildi. 0.4 cc'lik antijen dört ayak tabanına 0.1'er cc olmak üzere dağıtıldı.

Hayvanlardan kan ve hücre alma zamanları bulgular bölümünde yeri geldikçe belirtilecektir.

### 3- Deri Testi:

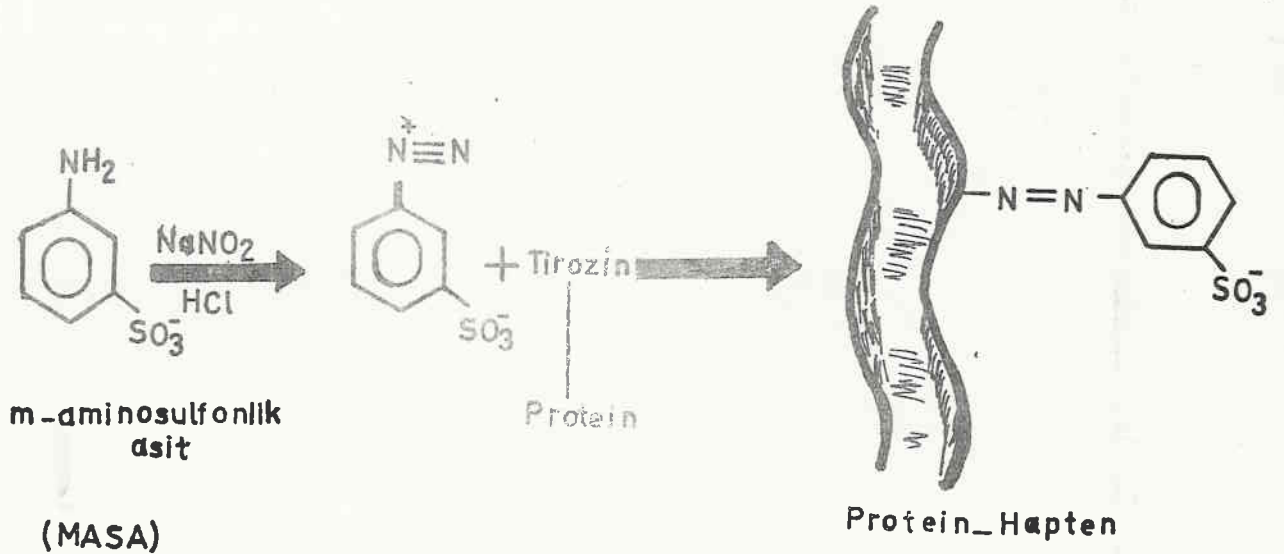
Deri testi yapılacak kobayların sırtları elektrikli traş makinası ile traş edildi. 100 mcg. test antijeni 0.1 cc SF içinde (pH 7.2) deri içine zerk edildi. Zerk yeri 3-4 saat sonra



Arthus (çabuk tip) ve 24-48 saat sonra geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonları için okundu. Kural olarak 5 mm ve daha yüksek reaksiyonlar (kızartı, şişlik ve sertlik) müsbet sayıldı. Sonuçlar milimetre (mm) olarak kaydedildi.

#### 4- Hapten - Protein Hazırlanması:

Amino benzoik asidin izomerleri (para, meta ve orto), sulfonilik asidin ve arsanilik asidin izomerleri (meta hariç) teker teker, BSA ve ovalbumina (OVA) bağlamak suretiyle elde edilen Hapten-protein bileşikleri, bazı yerlerde test antijeni (deri testi ve makrofaj yayılım-önlenim testinde) bazı yerlerde ise immunojen olarak kullanılmıştır. Haptenler proteinlere şekil 1 de görüldüğü gibi diazotize edilerek bağlanmıştır. Bu reaksiyon için esas olarak Tabacknick ve Sobotka'nın yöntemi kullanılmıştır (44).



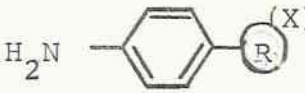
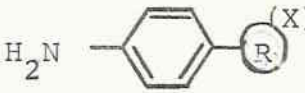
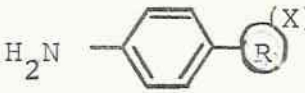
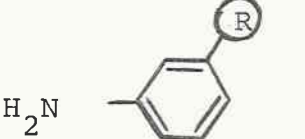
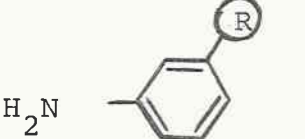
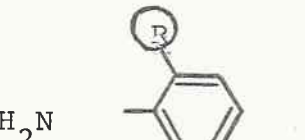
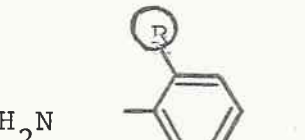
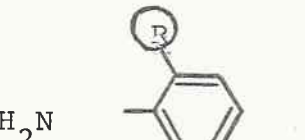
Şekil 2- Diazonyum Reaksiyonun şematik açıklaması

Bilindiği gibi diazotize edilmiş haptent, proteindeki aromatik amino asitlere bağlanmakta ve en yüksek bağlama tirozin ile olmaktadır. Deneylerimizde kullanılan haptentler (Tablo 1) de sunulmuştur. Bağlama işlemi aşağıdaki gibi yapıldı:

280 miligram (mg) para amino benzoik asit (PABA) 40 cc 0.1 N HCl içinde eritildi. Buz banyosuna yerleştirildi ve içine magnetik karıştırıcı kondu. Üzerine 1 cc distile suda eritilen 350 mg NaNO<sub>2</sub> (Sodyum Nitrit) hemen ilave edildi, 30 dakika karıştırıldı. Bu arada 2 gr. BSA, 100 cc 0.1 N NaCO<sub>3</sub> (Sodyum karbonat) içinde eritildi. Buz kabına yerleştirilip, içine pH metrenin elektrodu daldırıldı. Protein solusiyonu karışmakta iken

TABLO 1

HAPTENTLERİN KİMYASAL YAPILARI VE ADLARI

Kimyasal Yapısı	R (X)	ADI	Kısaltma	MA (XX)
	-COOH	p-Aminobenzoic Acid	PABA	137.1
	-SO <sub>3</sub> H	p-Aminosulfonilic Acid	PASA	153.1
	-AsO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	p-Aminoarsenilic Acid	PAAA	167.1
	-COOH	m-Aminobenzoic Acid	MABA	137.1
	-SO <sub>2</sub> H	m-Aminosulfonilic Acid	MASA	153.1
	-COOH	o-Aminobenzoic Acid	OABA	137.1
	-SO <sub>2</sub> H	o-Aminosulfonilic Acid	OASA	153.1
	-AsO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	o-Aminoarsenilic Acid	OAAA	167.1

(X) Radikal

(XX) Molekül ağırlığı

üzerine 15 cc diazotize edilmiş haptten ilave edildi, pH hemen (1 N NaOH) ile 9'a ayarlandı. 5 dakika sonra tekrar 15 cc diazotize haptten ilave edilip pH yine 9'a ayarlandı, 5 dakika sonra geri kalan diazotize haptten ilave edilip pH'nin 9 olması sağlandı. Solusyon en az 4 saat aynı şekilde bekletildikten sonra üzerine glasiel asetik asit damla damla ilave edilerek pH 4'e düşürülmek suretiyle, proteinin çökmesi sağlandı. Bu karışım bir gece soğumta karıştırıldıktan sonra 30 dakika 3500 devirde santrifüj edilerek protein kısmı çöktürüldü. Çökelek bir kez distille suda yıkandıktan sonra 50 cc 0.1 NaOH içinde çözüldü ve pH 8'e ayarlandıktan sonra Sephadex G-50 (Pharmacia) kolonundan (5x100 cm) geçilerek saflaştırıldı.

#### 5- Kolon Kromatografisi ile Antijenlerin Saflaştırılması

Çalışmamızda amacımıza uygun olarak 5 x 100 cm hacminde kolon seçildi (Hacettepe Univ. Cam Atölyesinde özel olarak yaptırıldı). Sephadex olarak antijenlerimizin molekül ağırlığı 60.000 civarında olduğu için Pharmacia Fine Chemical'den temin edilen (G-50 medium) kullanıldı. Kolon şöyle hazırlandı: 115 gr. Sephadex G-50 medium, fosfat tamponu (pH 8) içinde 24 saat bekletilerek şişirildi. Bundan sonra jel, yandan musluklu bir beher glass içine konuldu. Magnetik karıştırıcı ile karıştırılmakta iken negatif basınç tatbik edilerek jel içindeki hava habecikleri çıkarıldı. Kolonun Sephadex ile doldurma işlemi klasik yolla yapıldı (45).

Dibine cam pamuğu yerleştirilen kolon, yarısına kadar fosfat tamponu ile dolduruldu, ve musluğun akışı ayarladıktan sonra, havası alınmış Sephadex, kolonun tepesindeki huni yardımı ile

yavaş yavaş kolona aktarıldı. Bu arada kolonun musluğu tam açık olmalıdır. Kolondan 24 saat tampon geçirildikten sonra, numune geçirilmek üzere kolon hazır duruma geldi. Kullandığımız antijenler renkli (sarı-turuncu) olduğu için antijenin kolonun alt musluğundan ne zaman çıkacağını gözle takip etmek mümkün oldu. Bu yüzden fraşın kolektör kullanılmadı.

Kolondan alınan hapten-protein bileşikleri diyaliz torbasına konup distile suya karşı 2-3 gün diyaliz edildikten sonra liyofilize edildi.

6- Hapten Mikobakteriyum Hazırlanması: (H-Mb)

T-hücreci cevabı uyandırmak için, Alkan ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir yöntem kullanıldı (43). Bu amaçla Mb'nin üç suşu denendi:

- A- Mycobacterium butiricum (Difco Lab.)
- B- " RaH37 ( " " )
- C- " tuberculosis (insan tipi, C) (Etlik Veteriner Enst.)

Değişik suşların neticeleri etkilemediğini saptandıktan sonra çalışma boyunca bizce temini daha kolay olan Mb. tuberculosis C suşu kullanıldı.

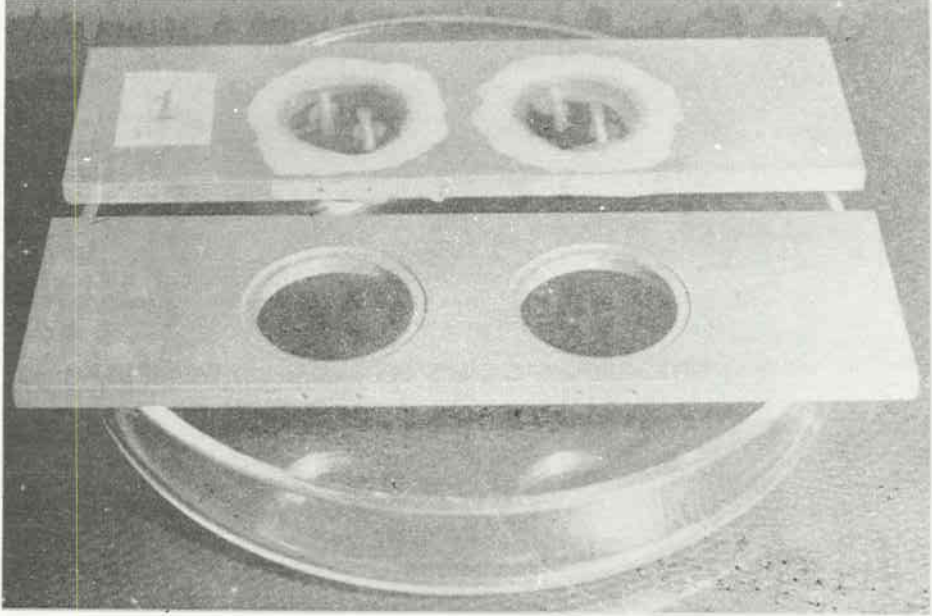
Her hapten için 100 mgr. ölü kurutulmuş Mb kullanıldı. 100 mgr. Mb tartıp, dengeli fosfat tamponunda\* (pH 7,2 - 7,4) Homojenatör (Tissue Grinders Thomas Co.) yardımı ile 5 sefer

\* Çalışmada kullanılan tüm tampon ve çözeltilerin formülleri için (Ek)'e bakınız.

yıkandı. Her seferinde 15 dakika yıkandıktan sonra 2500 devirde 15 dakika santrifüj edilerek, üst sıvı atılıp yeni tampon ilave edildi. Altıncı yıkama borat tamponuyla (pH - 8.5-9) yapıldı. Tüm yıkama boyunca Mb'nin yaklaşık olarak %50'si kaybolmaktadır. Bu arada haptenler şu şekilde diazotize edildi. 70 mg. hapten 10 ml 0,1 N HCl'de eritildi, karıştırıcı üzerinde buz banyosuna yerleştirilip, soğutulduktan sonra üzerine 1 cc suda eritilmiş 90 mg NaNO<sub>2</sub> hemen ilave edildi. Yarım saat karıştırıldı. Bu esnada yıkanmış Mb. 8 cc borat tamponuyla karıştırılıp, buz banyosuna yerleştirildi. Hazırlanmış diazotize hapten karışmakta olan Mb. suspansiyonuna 5 dakika ara ile ilâve edildi, her seferinde NaOH ile pH 9'a ayarlandı. Bu vaziyette hafif çalkalanarak bir gece bekletilen suspansiyon 2500 devirde santrifüj edilerek çöktürüldü. Hank's dengeli tuz tamponunda (BSS) 5 sefer yıkandıktan sonra 4°C saklandı. Kirli beyaz renkte olan Mb. bağlanan haptene göre kirli sarıdan kahverengiye kadar varan renklem almaktadır.

#### 7- Makrofaj Yayılım-Önlenim Testi (MT) (Macrophage Migration Inhibition)

Deri testi ile % 100 e yakın paralellik gösterdiği bilinen bu yöntemin ana ilkesi şudur: Bir kılcal tüp içine çoğu makrofaj olan akyuvar suspansiyonu doldurulur, bir ucu kapatılıp santrifüj edilir. Hücre çöküntüsüyle-besiyerinin kesiştiği noktadan tüp kesilir. Elde edilen kısa tüp (Şekil 3) te görülen özel MT kutusundaki (Chamber) deney oyuklarına yerleştirilir. Deney oyuklarına antijen ihtiva eden besiyeri ilave edilir.

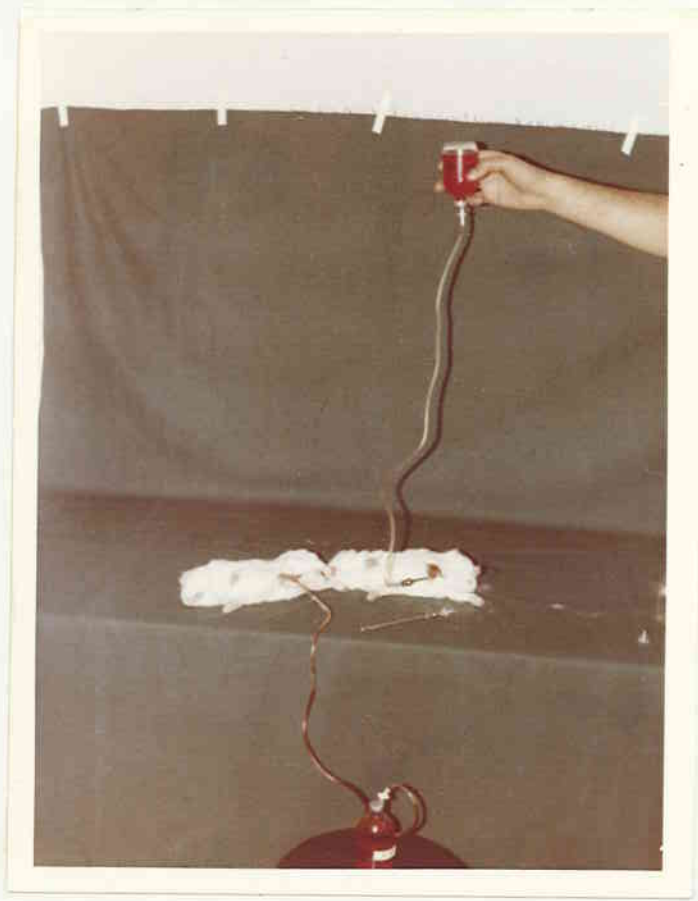


Şekil 3- Makrofaj yayılım-önlenim yapıldığı özel alet (MT kutusu)

Kontrol oyuklarına ise yalnız besiyeri konur. 37°C de 24 saat inkübasyondan sonra, kontrol kutularında makrofajlar kısa tübün dışına, cam üzerinde yayılırlar. Antijen ihtiva eden deney kutularında ise (eğer lenfositler antijene duyarlı ise) duyarlılık derecesine göre yayılım az veya yoktur.

Çalışmamızda uygulanan yöntemin temeli David (46) ve arkadaşlardan alınmış olup, bazı değişiklikler yapılmıştır. Antijen zerk edilen kobaylar 2-4 hafta sonra bu deneye sokuldu. Kobayların karın altı traş edildi ve periton boşluğuna 25 cc steril hafif mineral yağı zerk edildi. 3 gün sonra hayvanlar başlarına sert bir cisimle vurulmak suretiyle öldürüldü. Periton sıvısı steril olarak kapalı bir sifon sistemiyle Şekil (4) görüldüğü gibi toplandı.





Şekil 4- Kobaylarda kapalı sistemle periton hücresi toplanması

Bunun için 100 cc steril BSS kullanıldı. Sıvı peritona boşaltıldıktan sonra periton hafifçe çalkalanarak tekrar şişeye toplandı. 100 cc'lik şişede toplanan yağ ve hücre karışımı, 1500 devirde 15 dakika santrifüj edilip üstteki yağ tabakası emme tulumba sistemiyle dikkatlice dışarı alındı. Hücreler BSS ile sulandırılıp 12 cc lik dereceli santrifüj tübüne aktarıldı. En az iki defa BSA ve son defa besiyeri ile yıkandı. Besiyeri olarak (Minimal Essential Medium, Difco lab. Detroit Mich.) MEM kullanıldı. Deney yapılacağı gün MEM şöyle hazırlandı: (100 cc için)

10.000 ünite penisilin

10.000 mcg. streptomisin

%1 oranında L-glutamin

%15 oranında Milipor filtrasyonu ile sterilize edilmiş normal kobay serumu

Bu hücre miktarı cc de  $30-50 \times 10^6$  olacak şekilde hazırlandı. Bunun bir pratik yolu, 1000 devirde 10 dakika çöktürülmüş hücre paketi üzerine hacminin (cc olarak) 7,5 katı besiyeri eklenmektedir. Bu hücre suspansiyonun kılcal tüplere doldurulup (Microhematocrit tubes/plain no: 121, Clay Adams) doldurup bir uçları Seal Ease (Clay - Adams) denen bir madde ile kapatıldı. Dibi pamuklu steril serolojik tüpü içinde 900 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Alkolle ıslatılmış gazlı bezle silip steril başka bir gazlı bez ile kurutulduktan sonra kılcal tüpler üst sıvı-hücre kesişiminden cam testeresiyle kesildi. Kısa tüpler Machaness tipi kutulara (Chamber) (San Francisco Tıp Merkezi Atölyesinde özel olarak yapılmıştır) veya %1'lik agar plaklarında açılan oyuklara yerleştirildi. Her antijen dilusyonu için 4 adet kılcal tüp hazırlandı. Önce kutuların bir yüzeyi yuvarlık lamelle (Corning glass, no: 2) kapatıldı, etrafı sıcak parafinle çevrildikten sonra parafinin donması beklendi. Sonra kutu çevrildi. Bu lamel üzerine her ince tüp için bir damla özel bir yağ (Dow Corning Stopcoco Grease Thomas Co.) sürüldü. Küçük tüp bu noktaya değdirilerek, kayması önlenecek şekilde kapatıldıktan sonra, bir şırınga ile yan deliklerden, besiyerleriyle doldurulup, deliklerde parafinle kapatıldı. (Agarda ise açılan oyuklara aynı şekilde kısa kılcal tüpler yerleştirildikten sonra oyuklar dik-



dörtgen lamelle kapatıp, oyuğun bir tarafı açık bırakıldı. Bu açıklıktan besiyeri ile oyuk dolduruldu. Açık kalan yer lamel kaydırılarak kapatıldı) 24 saat 37°C'de yatay olarak bekletildikten sonra kontrol ve deney tüplerinin ucundaki yayılım alanı projeksiyonlu bir mikroskopla kağıda yansıtılarak çizildi. Bu kısımlar makasla kesilip hassas terazide tartıldı.

Antijenin sebep olduğu önlenim şu formülle hesaplandı:

$$\% \text{ önlenim} = 100 - \left( \frac{\text{Antijenli ortamdaki yayılım}}{\text{Antijensiz ortamdaki yayılım}} \times 100 \right)$$

%10 ve daha fazla önlenim, önemli sayıldı.

#### 8- Antikor Cevabının Tayini:

Deneylelerimizde kobayların antikor cevabını ölçmek amacıyla, duyarlı bir test olan indirekt hemoliz deneyi (IHD) kullanıldı. İlk kez Ingraham tarafından geliştirilen ve tüpte yapılan bu yöntem, (47) tarafımızdan mikrotitrasyon aletinde yapılacak şekilde değiştirildi. Haptenler diazonium reaksiyonu ile koyun alyuvarına bağlandı. Anti-hapten antikorü ile karşılaştırıldı. Sonra ortama kompleman ilave edilince hemoliz görüldü. Bu yöntemi klasik kompleman birleşmesi deneyinden ayırmak için (burada ikinci bir hemolitik sisteme ihtiyaç yoktur) bu deneye "indirekt" hemoliz deneyi (IHD) demeyi uygun bulduk.

#### Testin Yapılışı:

Steril koyun kanı yarı yarıya Alsever solosyunu ile karıştırıldıktan sonra 2000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Çöken alyuvarlar (KA) fosfat tamponu ile 4 kez yıkandı. Daha önce hazırlanan ve -20°C'de saklanan diazotize hapten eritildi. 0.25 cc

alınıp 9 cc fosfat tamponuyla MFT karıştırıldı. Bu karışım üzerine 0.5 cc alyuvar çöküntüsü ilave edildi. Karıştırılıp oda derecesinde 10 dakika bekletildi. 2000 devirde 10 dakika çevrildi ve yine MFT ile en az 4 kez yıkandı. (Son yıkamada üst sıvı berrak olmalıdır). Hapten-bağlı olan bu alyuvarların MFT ile % 0.5'lik suspansiyonu hazırlandı. Kontrol için aynı şekilde normal alyuvar suspansiyonu yapıldı.

Deney mikrotitrasyon aletinin U plaklarında yapıldı. Önce oyuklara 1 damla (50  $\lambda$ ) MFT damlatıldı. Her serum için iki sıra kullanıldı. KA ile absorbe serumun 1/20 sulandırımından lupla 50  $\lambda$  alınıp birinci sıradaki serumun iki kat sulandırımı yapıldı. Sonra birinci sıraya bir damla (50  $\lambda$ ) % 0.5'lik bağlı-alyuvar suspansiyonundan, ikinci sıraya ise %0.5'lik normal alyuvar suspansiyonu damlatıldı, hafifçe karıştırılıp 37°C'de 10 dakika bekletildi. Sonra her iki sıranın oyuklarına 50'şer lamda kompleman (4 ünite) ilave edilip 2-3 saat 37°C'de bekletildi. Hemoliz titresi tayin edildi. Absorpsiyon ve deneydeki sulandırım hesaplanınca ilk oyuktaki serum sulandırımı 1/40 olmaktadır.

Her deney için aşağıdaki kontroller yapılmıştır:

- 1- Tampon - hapten - alyuvar
- 2- Tampon - normal alyuvar
- 3- Kompleman - hapten-alyuvar
- 4- Kompleman - normal alyuvar
- 5- Kompleman - normal kobay serumu - hapten-alyuvar
- 6- Kompleman - normal kobay serumu - normal alyuvar

7- Deney serumu - hapten - alyuvar

8- Deney serumu - normal alyuvar

Bu kontrollerin hepsi doğru netice verdiği takdirde deney sonucu doğru olarak kabul edildi. Makrosistemle paralel deneyler yapıldı ve paralel sonuçlar elde edildi. Çapraz reaksiyonlar için yapılan deneylere bulgular bölümünde değinilecektir.

Bu testin yapılışında önemli bulduğumuz noktalar aşağıda sıralanmıştır:

1. Bütün serumlar  $56^{\circ}\text{C}$ de 30 dakika inaktive edilmelidir.
2. Tüm serumlar normal koyun alyuvarları ile absorbe edilmelidir. Bunun için 1 cc serum 1 cc % 50'lik yıkanmış alyuvar suspansiyonu ile karıştırıldı, 1 saat  $37^{\circ}\text{C}$  de ve 8 saat oda derecesinde bekletildi. 2000 devirde 10 dakika çevrilip alyuvar çöktürüldükten sonra üst sıvı  $-20^{\circ}\text{C}$  saklandı.
3. Deneyde kullanılacak tüm cam malzeme en az birgün asitte (bikromik) bekletilmeli, sonra yıkanmalıdır.
4. Diazonium reaksiyonunun önceden hazırlanıp  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklanması bu deney için çok elverişli bir yoldur. Bu amaç için 70 mg hapten 10 cc 0.1 N HCl'de çözüldü. Buz kabında eritildikten sonra üzerine 1 cc distile suda eritilen 350 mg  $\text{NaNO}_2$  ilave edildi. 30 dakika karıştırıldıktan sonra tüplere 1'er cc dağıtılıp  $-20^{\circ}\text{C}$ 'ye konuldu.
5. Orijinal yöntemde(47) her kademedede değişik tamponlar kullanılmaktadır. Biz tüm deney boyunca ek'te sunulan fosfat tampununu kullandık ve aynı sonuçları aldık. Bu değişiklik deneyde büyük kolaylık sağladı.

## B U L G U L A R

Elde edilen bulgulara geçmeden bir noktanın belirtilmesinde yarar görüyoruz. Deneyler yapılmadan önce hazırladığımız antijenlere karşı normal hayvanlarda antikor bulunup bulunmadığı veya antijenlerin normal kobay hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkileri olup olmadığı araştırılmıştır. Antijenlerimizin hiç birine karşı antikor tesbit edilemediği gibi deri testinde veya makrofaj yayılım-önlenim deneylerinde normal kobay hücreleri ile "yalancı müsbet" netice vermedikleri saptanmıştır.

### A - HAPTEN-MİKOBAKTERİYUM'A KARŞI BAĞIŞIKLIK CEVABI

#### I- Benzoik Asit Grubu-

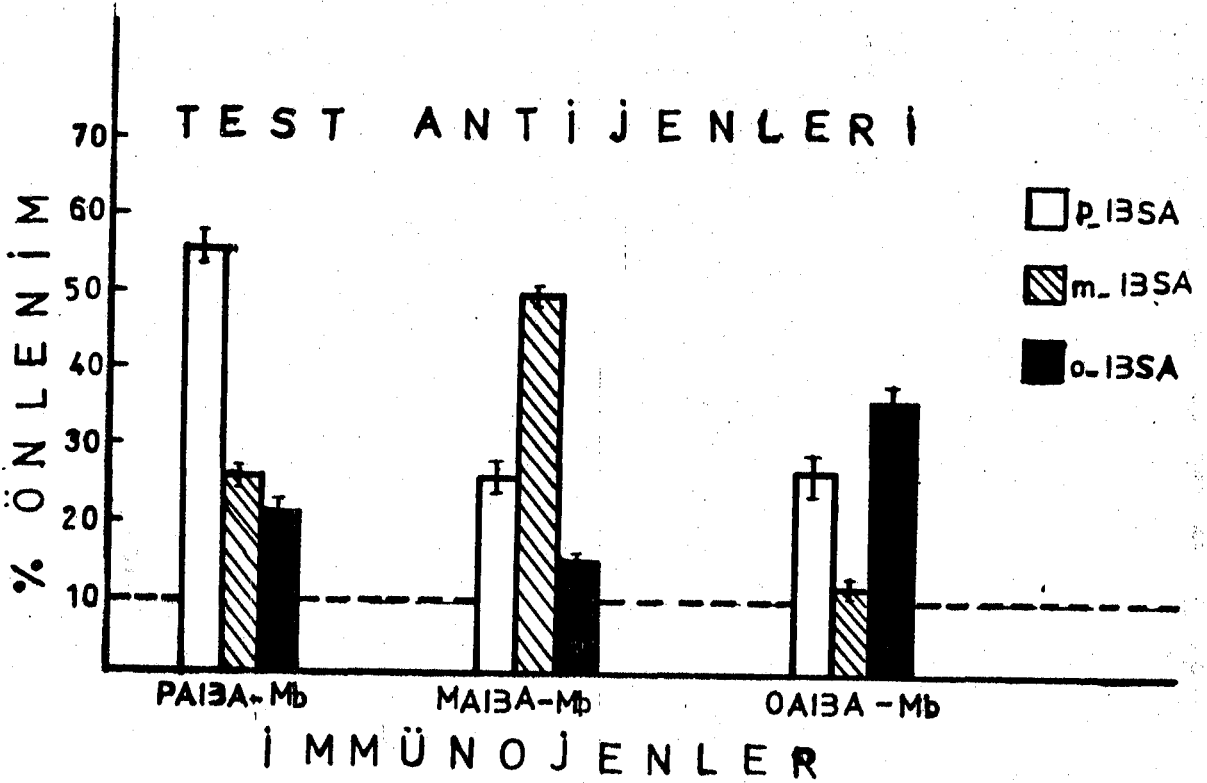
Benzoik asidin üç izomeri (para, meta ve orto) mikobakteriyum'a bağlandıktan sonra her bir izomer, 5 kobaya zerk edildi. Hapten mikobakteriyum verilen kobaylardan 15 gün sonra kan alındı ve hemen ardından 11 değişik test antijeni ile deri testi yapıldı. Deri testi okunduktan sonra periton içine mineral yağı zerk edilerek hayvanlar üç gün sonraki makrofaj yayılım-önlenim testine hazırlandı.

1. PABA-Mb, MABA-Mb ve OABA-Mb ile immünize edilmiş üç gruptan hiçbir kobay indirekt hemoliz deneyi (İHD) ile tesbit edilebilecek miktarda antikor bulunamadı.

2. Haptenlerin BSA'ya bağlanmış şekilleri deri testinde test antijeni olarak kullanıldı. Hapten-BSA'ya karşı alınan deri testi neticeleri (Tablo II) de özetlenmiştir. PABA-BSA' ile 14 mm. MABA-BSA ile 10 mm ve OABA-BSA ile 9 mm reaksiyon alındı. Her

haptten kendisine karşı en yüksek reaksiyon uyandırmakla beraber bu testle para, meta ve orto izomerleri arasında çapraz reaksiyonlar tesbit edilebilmiştir.

3. Hücresel immün cevabın ölçümünde makrofaj yayılım-önlenim testi kullanıldı. PABA-Mb, MABA-Mb ve OABA-Mb zerk edilen hayvanların hücresel cevabı, haptten-BSA veya Haptten-OVA bileşiği kullanılarak tayin edildi. Her üç grubun verdiği in vitro bağışıklık cevapları (Şekil 5) de özetlenmiştir. Şekilden görüleceği gibi PABA-Mb ile immünize edilmiş hayvanlar en yüksek cevap PABA-BSA ile vermişlerdir (% 56 önlenim). Aynı grubun hücreleri MABA-BSA ile % 26, OABA-BSA ile % 21 önlenim verdiler.



Şekil 5- Benzoik asidin para, meta ve orto şekilleri ile duyarlaştırılmış üç ayrı grup hayvanın, BSA'ya bağlı üç izomere karşı T-hücresi cevabı. Hücresel cevap (MT ile ölçülmüş olup, neticeler % makrofaj yayılım-önlenimi olarak verilmiştir.

T A B L O 2.

Kobayların Haptten-Mb'ye Karşı Verdikleri (in vivo) Hücresel Cevap (a)

		T E S T A N T İ J E N L E R İ									
		PABA-BSA	MABA-BSA	OABA-BSA	PASA-BSA	MASA-BSA	OASA-BSA	PAAA-BSA	OAAA-BSA	PPD	BSA
MABA-Mb	14 <sup>b</sup> (13)	6 (4)	5 (8)	7 (8)	4 (4)	3 (4)	9 (4)	3 (4)	14 (13)	0 (13)	
MABA-Mb	5 (4)	10 (4)	5 (4)	4 (4)	0 (4)	4 (4)	2 (4)	4 (4)	17 (4)	4 (4)	
OABA-Mb	5 (6)	5 (4)	9 (4)	4 (6)	3 (4)	4 (4)	0 (4)	4 (4)	14 (6)	2 (6)	
PASA-Mb	9 (5)	4 (4)	3 (4)	13 (6) <sup>d</sup>	5 (4)	5 (4)	8 (4)	0 (4)	14 (6)	0 (6)	
MASA-Mb	3 (4)	6 (4)	0 (4)	6 (4)	9 (4)	4 (4)	3 (4)	2 (4)	19 (4)	3 (4)	
OASA-Mb	3 (4)	4 (4)	5 (4)	6 (4)	3 (4)	8 (4)	5 (4)	4 (4)	19 (4)	2 (4)	
PAAA-Mb	6 (4)	3 (4)	3 (4)	5 (4)	2 (4)	0 (4)	12 (4)	4 (4)	17 (4)	0 (4)	
OAAA-Mb	0 (4)	3 (4)	5 (4)	0 (4)	3 (4)	5 (4)	5 (4)	6 (4)	20 (4)	0 (4)	

(a) - Haptten-Mb zerk edilen kobaylara 2,4 hafta sonra haptten-BSA ile deri testi yapıldı

(b) - Hayvanların ortalama deri reaksiyonları (mm) olarak belirtilmiştir

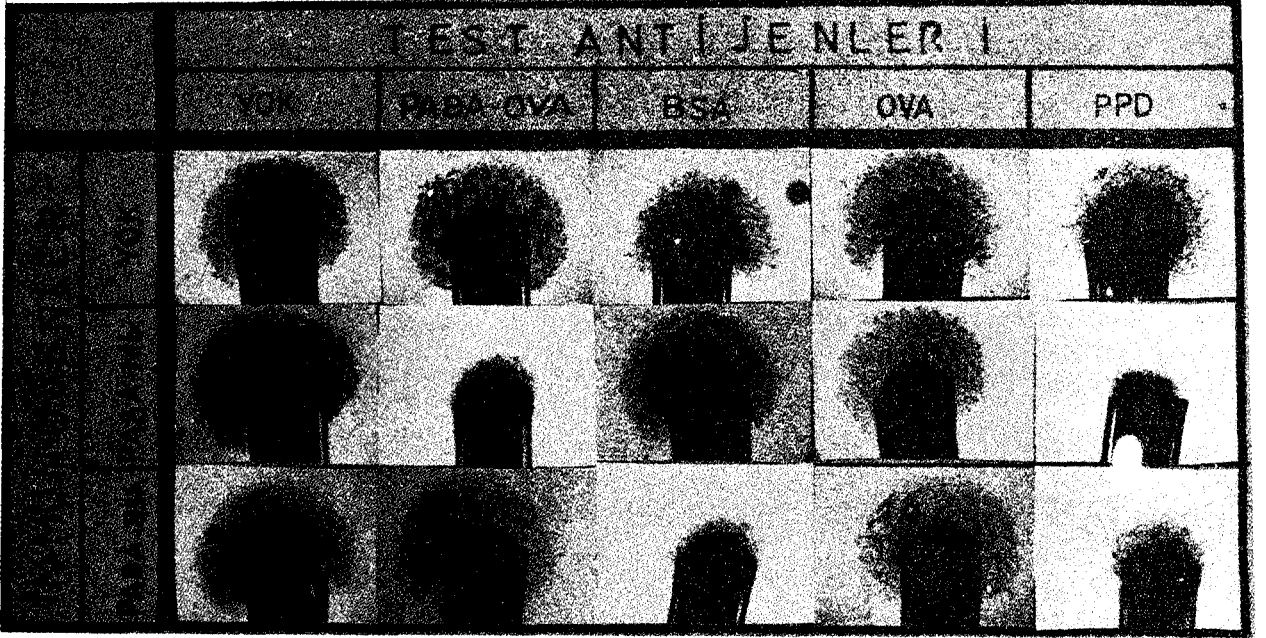
(c) - Parantez içindeki rakamlar deneye sokulan hayvan sayısı

(d) - Arthus Reaksiyonu

MABA-Mb ile immünize edilmiş hayvanlar ise en yüksek cevabı MABA-BSA'ya karşı verdiler. (% 50 önlenim). Aynı grup PABA-BSA ile % 26, OABA-BSA ile % 15 önlenim gösterdi. OABA-Mb zerk edilmiş hayvanların hücreleri OABA-BSA ile % 35, PABA-BSA ile % 27 MABA-BSA ile % 12 önlenim verdiler. Yukarıdaki neticeler en yüksek hücresel cevabın homolog antijenle alındığını gösterdi. Çapraz reaksiyonlar incelenince şu sonuca varıldı: İmmünojen ister para, ister meta ister orto olsun her durumda en yüksek cevap, para aminobenzoik asit ile alınmaktadır. Bu deneylerde kontrol antijen olarak BSA (300 mcg/cc) kullanıldı ve hiçbir hayvanda % 5 in üstünde önlenim göstermedi. Müsbet kontrol olarak PPD'ye (100 mcg/cc) karşı meydana gelen önlenim derecesi % 66-77 arasında değişti (Ayrıntılı bilgi için ekteki Tablo ya bakınız).

4. Haptenlere karşı uyandırılan T-hücresi cevabının özgüllüğünü göstermek için yaptığımız tipik bir deneyin sonuçları (Şekil 6) da sunulmuştur. PABA-OVA normal kobay hücrelerin yayılımını hiç etkilememekte, fakat duyarlı hayvanlardan alınan hücreleri % 58 oranında önlemektedir. Öte yandan PABA-Mb'ye karşı duyarlı hücreler ortamda hiç antijen yokken veya BSA ve OVA gibi özgül olmayan antijenlerin varlığında hiçbir engel görmeden yayılabilmektedirler. PABA-BSA ile immünize edilmiş hayvanların hücreleri ise yalnız BSA ile önlenim göstermektedir.

Tüm antijenlerimiz hayvanlara tam Freund adjuvanı ile (CFA) birlikte verildiğine ve adjuvan da mikobakteriyum ihtiva ettiğine göre, deney hayvanlarımızın PPD'ye karşı müsbet cevap vermesi beklenirdi. Gerçekten yukarıdaki deneyde üç kobayın hücreleri PPD ile ortalama % 78 önlenim vermişlerdir.



Şekil 6- Para aminobenzoik aside (PABA) karşı meydana getirilen bağışıklığın haptene özgül olduğunun, makro-faj yayılım-önlenim testiyle gösterilmesi. Rakamlar 4 kobaydan alınan neticelerin ortalamasıdır.

## II- Sulfonilik Asit Grubu-

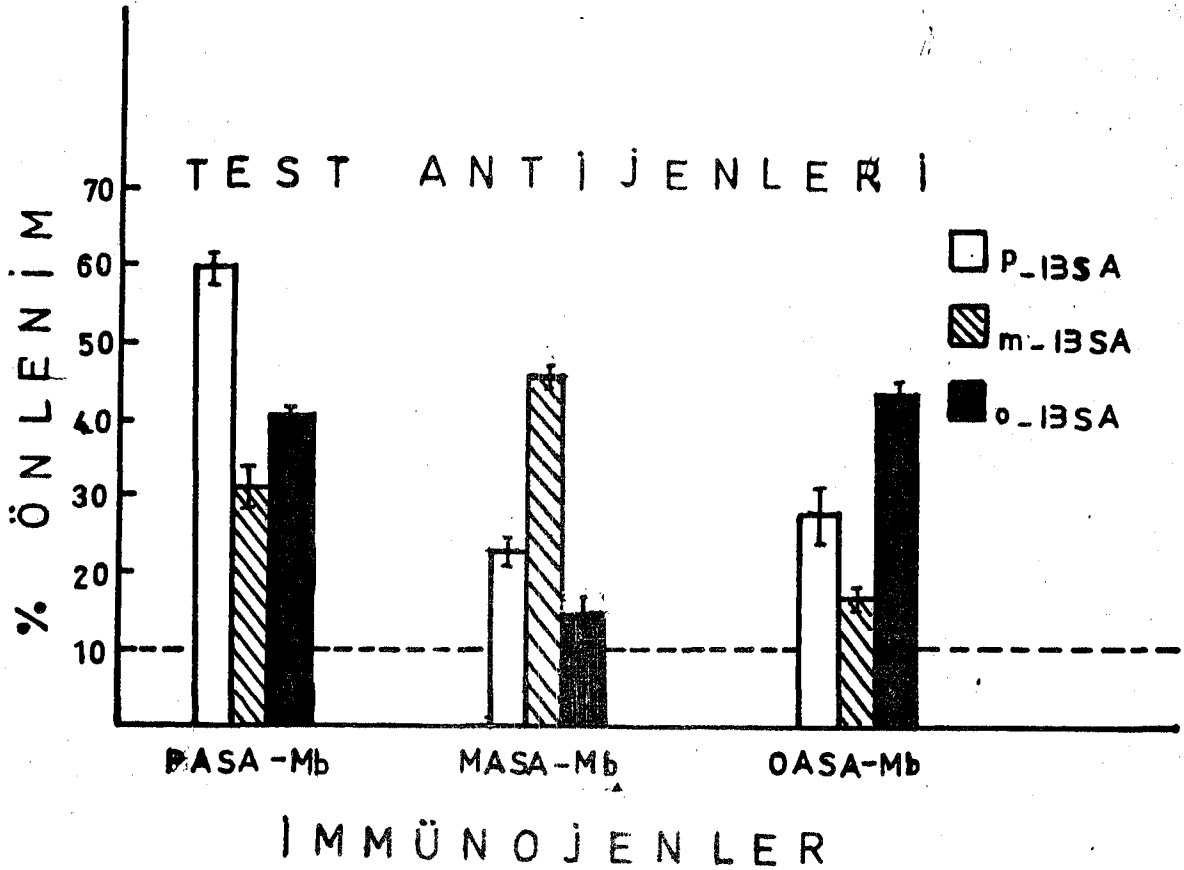
1. Para, meta ve orto sulfonilik asitlerin mikobakteriyum'a bağlı şekilleri ile immünize edilmiş hayvanlardan iki, üç ve dördüncü haftalarda kan alındı ve ilgili haptene karşı antikor arandı. Hiçbir grupta indirekt hemoliz deneyi ile tesbit edilebilir antikor bulunamadı.

2. Yukarıdaki bildirilen üç gruptaki bazı hayvanlara zerkten 2 hafta, diğerleri 4 hafta sonra, önceden bildirilen antijenlerle deri testi yapıldı. (Tablo II) de görüldüğü gibi, PASA-BSA ile 13 mm, MASA-BSA ile 9 ve OASA-BSA ile 8 mm lik geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonları meydana geldi.



Çapraz reaksiyonlar incelendiğinde PASA'ya karşı duyarlı hayvanlar MASA ve OASA ile 5 mm müsbet reaksiyon verdiler, MASA izomerine duyarlı veya OASA'ya duyarlı hayvanlar ise daha çok PASA ile müsbet reaksiyon verdiler (6mm). PASA-Mb zerk edilmiş iki hayvanda Arthus reaksiyonu gözlemlendi.

3. PASA-Mb, MASA-Mb ve OASA-Mb zerk edilen üç grup hayvan hücrelerinin haptenlere karşı hücresel cevaplarını ölçmek için makrofaj yayılım-önlenim testinde antijen olarak hapten-BSA kullanıldı. Her üç grup hayvanın in vitro hücresel bağışıklık cevapları PASA-Mb ile immünize edilmiş hayvanlar en yüksek cevabı



Şekil 7- Sulfonilik asidin para, meta ve orto şekilleri ile duyarlaştırılmış üç ayrı grup hayvanın, BSA'ya bağlı üç izomere karşı T-hücreleri cevabı.

(% 60 önlenim) PASA-BSA'ya karşı verdi. Aynı hayvanların hücreleri MASA-BSA ile % 31, OASA-BSA ile % 41, önlenim gösterdi. İmmünojen olarak MASA-Mb kullanıldığı zaman en yüksek cevap MASA-BSA'ya karşı bulundu, (% 46 önlenim). Aynı grubun hücreleri PASA-BSA ile % 23 OASA-BSA ile % 14 önlenim verdiler. OASA-Mb ile immünize edilen üçüncü grup hayvanların hücreleri yine en yüksek önlenimi homolog antijen ile vermişlerdir. OASA-MBSA ile elde edilen % 43 lük önlenime karşı PASA-BSA % 24, MASA-BSA'ya karşı % 14 önlenim gözlenmiştir.

### III - Arsenilik Asit Grubu-

Arsenilik asidin sadece para ve orto izomerleri mikobakteriyum'a bağlanmış ve hayvanlarda uyandırdığı bağışıklık cevabı bundan önceki haptenlerde olduğu gibi incelenmiştir. Deri testi neticeleri (Tablo II) de sunulmuştur. Bu haptenlere karşı da antikor bulunamamıştır. Hücresel bağışıklık cevabı incelendiğinde tüm bulguların şekil 5 ve 7 de özetlenen benzoik ve sulfonilik asit cevaplarına paralel olduğu görülmüştür.

Yukarıdaki bulgular özetlenecek olursa, benzoik asit, sulfonilik asit ve arsenilik asit haptenleri mikobakteriyum'a bağlı olarak hayvanlara verildiklerinde kendilerine karşı antikor cevabı elde edilememiştir. Hücresel cevaba bakıldığında gerek (in vivo) deri testi gerekse (in vitro) MT testleri paralel olarak şu sonucu vermişlerdir. Her üç hapten sisteminde de immünojen olarak kullanılan izomere karşı en yüksek cevap alınmıştır. Yine her üç grupta da immünojen olarak hangi izomer kullanılırsa kullanılsın, en yüksek çapraz reaksiyon, para izomerlerine verilmiştir. Ayrıntılar (Ek) teki tablodan incelenebilir.

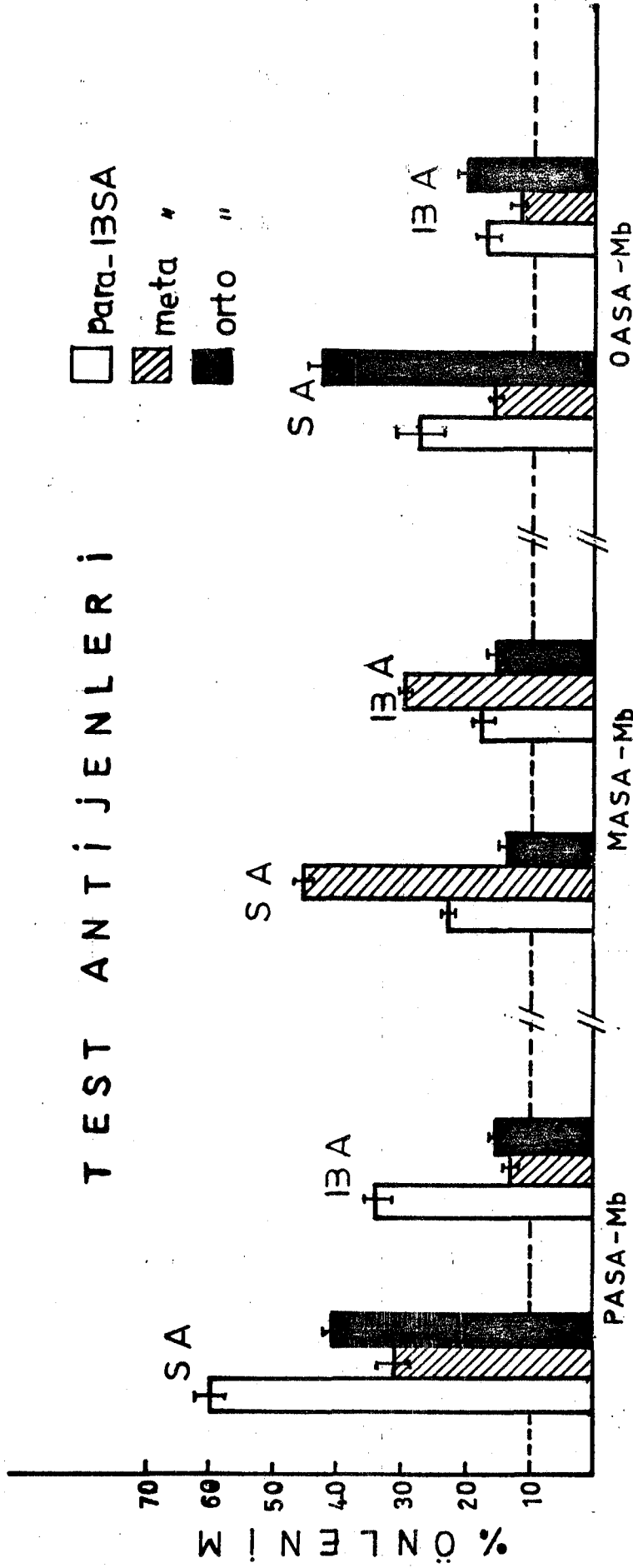
#### IV - Benzoik ve sulfonilik Asit Grupları Arasında T-hücreleri Seviyesindeki Çapraz Reaksiyonlar:

Deneylerimizde kullandığımız aminobenzoik, amino sulfonilik ve amino arsenilik asit haptenlerinin para, meta ve orto şekilleri arasında T-hücreleri seviyesindeki çapraz reaksiyonlar karşılaştırılmış ve bir örnek olarak sulfonilik asidin üç izomerine karşı alınan karşılaştırmalı cevaplar (Şekil 8) de sunulmuştur.

Üç grup hayvandan birincisi PASA-Mb, ikincisi MASA-Mb üçüncüsü ise OASA-Mb ile immünize edildi. 2-4 hafta sonra her bir grubun hücresel cevabı sulfonilik ve benzoik asidin üç değişik izomeri ile araştırıldı. (Şekil 9)un birinci bölümünde görüldüğü gibi PASA-Mb ile immünize edilmiş hayvan hücreleri en yüksek cevabı, PASA-BSA'ye, ondan sonra PABA-BSA'ye vermiştir (% 60 ve % 34 önlenim). Dikkat edilirse sulfonilik asidin meta ve orto izomerlerine verilen cevap, benzoik asidin meta ve orto izomerlerine karşı verilen cevaptan kabaca iki kat fazladır.

İmmünojen olarak MASA-Mb kullanıldığında, MASA-BSA ile elde edilen önlenim (% 50) iken, MABA-BSA ile (% 30) dur, ve aradaki fark önemlidir. Bununla beraber her iki grubun meta izomerleri arasında çapraz reaksiyon varlığı açıkça görülmektedir. Bu grupta diğer izomerler arasında önemli fark yoktur.

OASA-Mb zerk edilmiş hayvanların hücreleri en yüksek cevabı doğal olarak OASA-BSA'ye karşı vermişlerdir. Buna karşılık benzoik asidin üç izomeri arasında en yüksek çapraz reaksiyon, orto izomerleri ile alınmıştır (% 20 önlenim). Bu grupta meta



**İ M M Ü N O J E N L E R**

Şekil 8- Benzoik ve sulfonilik asit grupları arasında T-hücre si seviyesindeki çapraz reaksiyonlar

izomerleri arasında fark olmamakla beraber para izomerleri arasında önemli çapraz reaksiyon görülmüştür. (% 28'e karşı % 18 önlenim).

Üç değişik haptenin izomerleri arasındaki çapraz reaksiyonlar incelendiği taktirde şu sonuç çıkmaktadır: İmmünojen olarak para izomerleri kullanıldığı zaman diğer iki grubun yalnız para izomerleri önemli çapraz reaksiyon vermektedir. Meta izomerleri immünojen olduğu taktirde diğer iki grubun meta şekilleri ile en yüksek çapraz reaksiyon alınmakla beraber para şekilleri de önemli çapraz reaksiyonlar vermektedir. Orto izomerleri immünojen olarak kullanılıncaya yine diğer iki grubun orto şekilleri ile birlikte para şekilleri de hemen hemen aynı şiddette çapraz reaksiyon vermektedir. Meta izomerlerine karşı ise yok denecek kadar düşük çapraz cevap alınmaktadır. İmmünojen olarak, yukardaki haptenlerden hangi izomer kullanılırsa kullanılsın, izomerler arası ilişki aynı kalmaktadır (Benzoik asit grubu neticeleri için (Ek)te Şekil 1'e bakınız).

## B) HAPTEN - SIĞIR SERUM ALBUMİNİNE KARŞI BAĞIŞIKLIK CEVABI

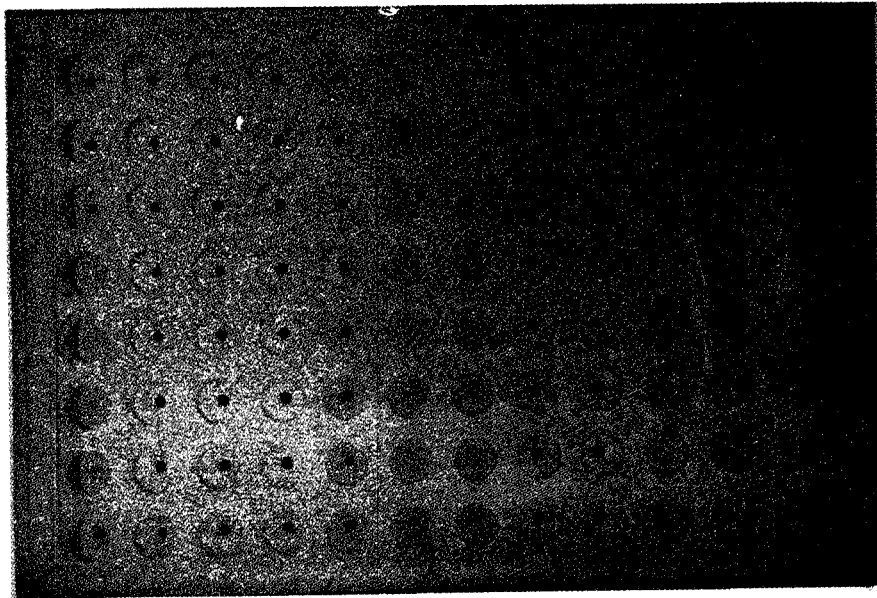
### I. Benzoik Asit Grubu:

Amino benzoik asidin para, meta ve orto izomerleri ayrı ayrı sığır serum albuminine (BSA) kovalant olarak bağlandı. PABA-BSA, MABA-BSA ve OABA-BSA'den oluşan herbir haptен-protein bileşiği üçer kobaya CFA içinde zerk edildi. Kobaylardan 20 ve 30 gün sonra kan alındı.

1. Yukarıdaki üç grup hayvanın 35. günde periton hücreleri toplanıp, makrofaj yayılım-önlenim testi yapıldı. Bu amaç için

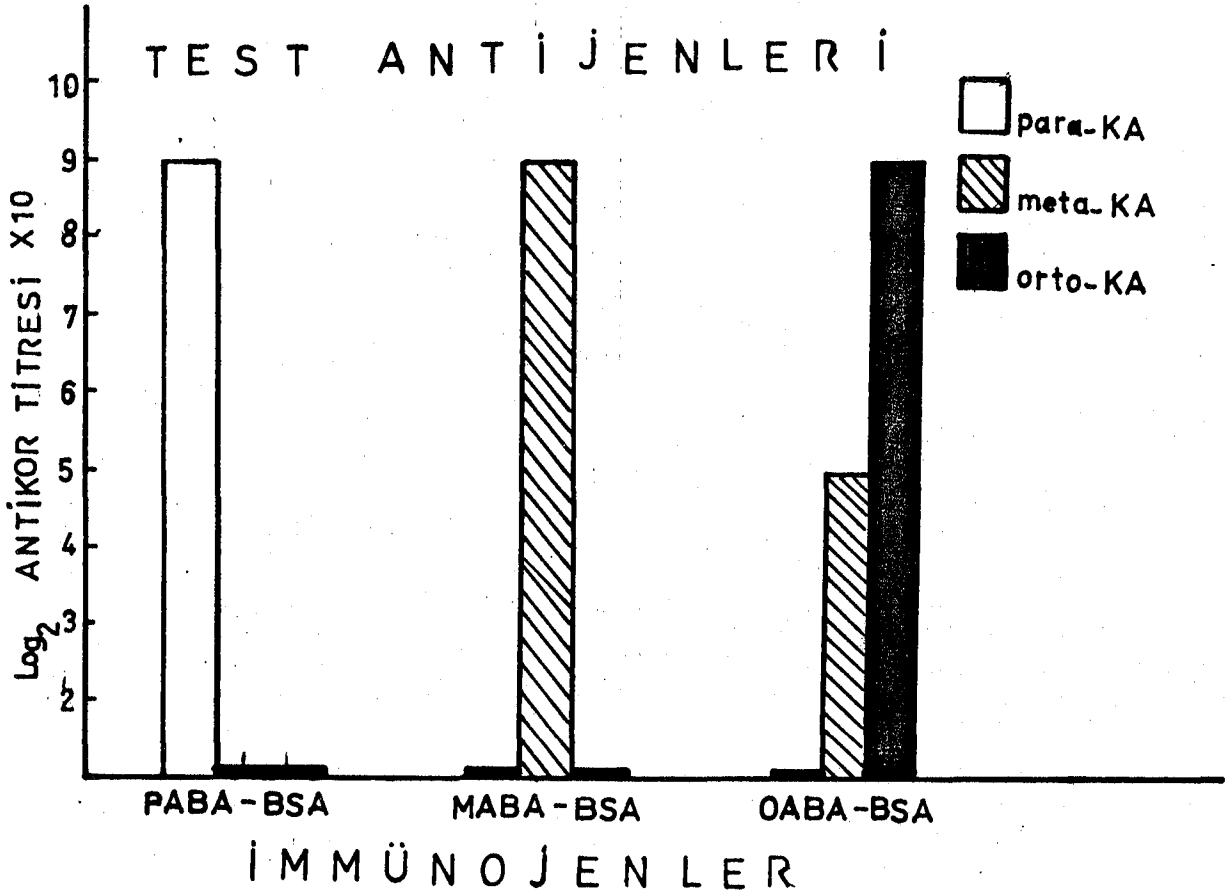
hapteler BSA ile çapraz reaksiyon vermeyen bir protein olan ovalbumine (OVA) bağlandı. Hiçbir kobayın hücresi özgül hapteler-OVA ile bile % 10'dan fazla önlenim göstermedi. Fakat BSA ile % 60 önlenim kaydedildi. Orijinal immünojen olan hapteler-BSA test antijeni olarak kullanılınca yayılım-önlenim oranı % 60-70 arasında değişti. Menfi kontrol olarak OVA tek başına hiçbir hayvanda % 8 den fazla nlenime yol açmadı.

2. Hapteler-BSA zerkinden sonra oluşan antikorlardan sadece hapteler'e özgül olanlar tayin edildi. Bu amaçla her bir izomer koyun alyuvarını (KA) bağlandı. Deney hayvanlarının serumlarında, kompleman varlığında, indirekt hemoliz deneyi ile antikor arandı. Mikrotitrasyon aletinde yapılan tipik bir deneyin resmi (şekil 9)'da sunulmuştur. Okla işaretli sıralarda hemoliz, diğerlerinde okme görülmektedir.



şekil 9- İndirekt hemoliz deneyinin mikrotitrasyon aletinde görünüşü

Üç grubun neticeleri (Şekil 10) 'da özetlenmiştir.



Şekil 10- Benzoik asit izomerlerine karşı B-hücreci cevabı

Her grup için 3. ve 4. haftada olmak üzere iki kez antikör tayini yapıldı. Arada önemli fark olmadığı için (Şekil 10) 'da sadece 4. hafta neticeleri sunulmuştur. Değerler log 2 tabanına göre antikör titrelerini vermektedir (1/40-1/10.240).

PABA-BSA zerk edilen hayvanlarda haptene (PABA-KA) karşı antikör titresi 1/5120 iken, meta ve orto izomerlerine karşı 1/40'ın altında bir değer bulunmuştur. MABA-BSA ile immünize kobaylar ise yine yalnız MABA ya karşı yüksek antikör cevabı

vermiş (1/5120), para (PABA) ve orto (OABA) izomerlerine karşı antikor yapmamışlardır. OABA-BSA zerk edilen hayvanlarda durum farklıdır. OABA'ya karşı 1/5120 titrede antikor yapan bu hayvanlarda aynı zamanda MABA ya karşı 1/320 titrede antikor bulunmuştur. Aynı hayvanlarda PABA'ya karşı antikor tesbit edilemedi.

## II. Sulfonilik Asit Grubu:

Sulfonilik asit izomerleri bir önceki deneyde olduğu gibi BSA'ya bağlandı, CFA içinde kobaylar verilip, hayvanlar hücresel ve humoral immün cevaplarına bakıldı.

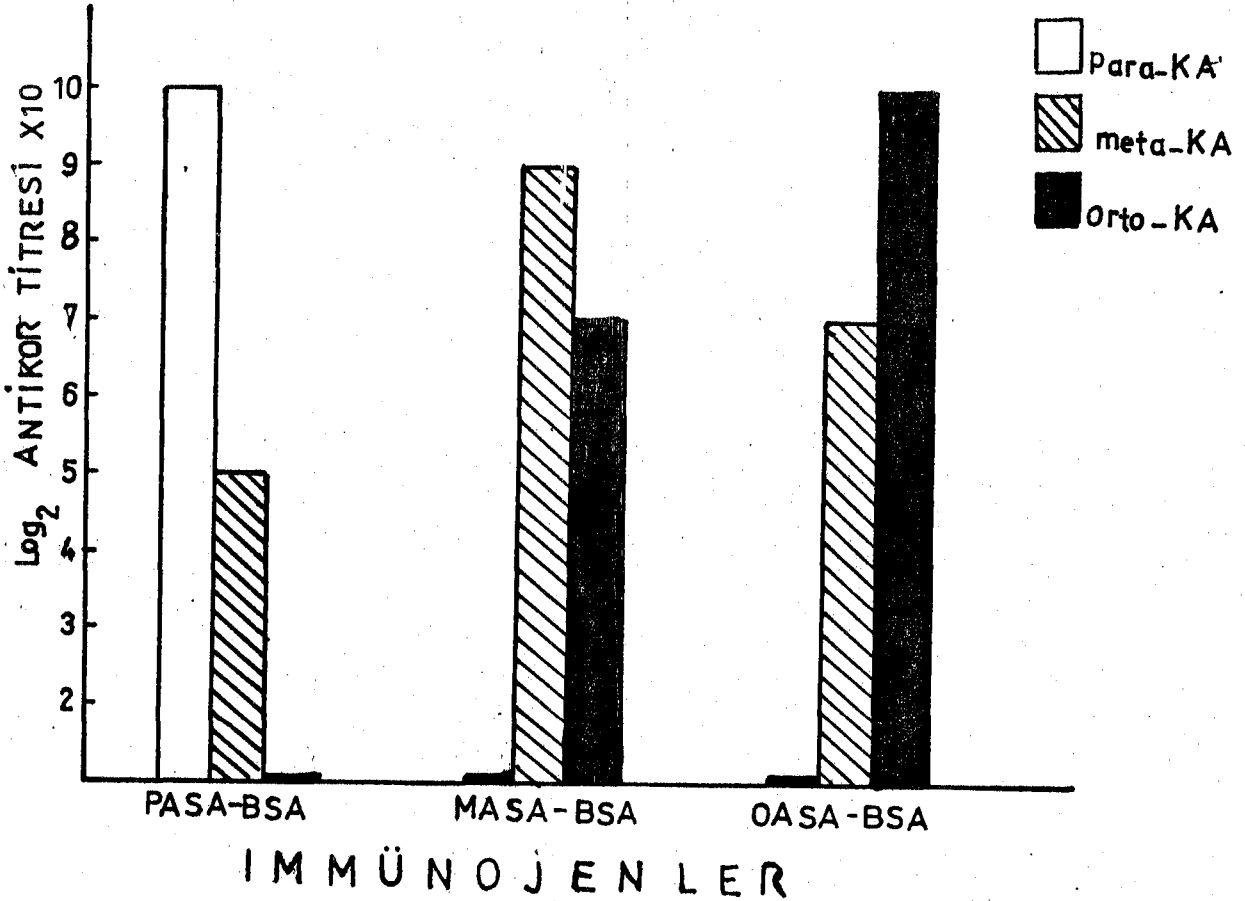
1. Hayvanlarda 35. günde MT yapıldığında hiçbir izomere karşı hücresel cevap vermedikleri görüldü. Hücreler hapten-OVA ile % 8'in üstünde önlenim göstermedi. BSA ile ortalama % 65, hapten-BSA ile ortalama % 75 ve menfi kontrol OVA ile % 7 civarında önlenim kaydedildi. Müsbet kontrol antijeni PPD ile % 80 önlenim sağlandı.

2. Sulfonilik asidin para, meta ve orto izomerlerine karşı antikor cevabı bu izomerleri alyuvarlara bağliyerek yapılan (İHD) ile ölçüldü. Üç gruptan alınan sonuçlar (Şekil 11) de özetlenmiştir. Burada da üç ve dördüncü haftadaki antikor seviyeleri arasında önemsiz farklar çıktığı için Şekil 11'de sadece 4. hafta sonuçları verilmiştir.

PASA-BSA ile immünize hayvanlarda PASA-KA ile 1/10240 titrede, MASA-KA ile 1/320 titrede ve OASA-KA ile 1/40'ın altında antikor tesbit edildi. MASA-BSA zerk edilen grupta MASA'ya karşı 1/5120, OASA'ya karşı 1/1280 titrede antikora karşılık, para izomerine (PASA) karşı yok denecek kadar az antikor bulundu.



## TEST ANTİJENLERİ



Şekil 11- Sulfonilik asit izomerlerine karşı B-hücreleri cevabı

İmmünojen olarak OASA-BSA kullanıldığında en yüksek antikör cevabı OASA ile (1/10240), sonra MASA ile (1/1280) tesbit edildi. Bu grupta da PASA'ya karşı antikör yoktu.

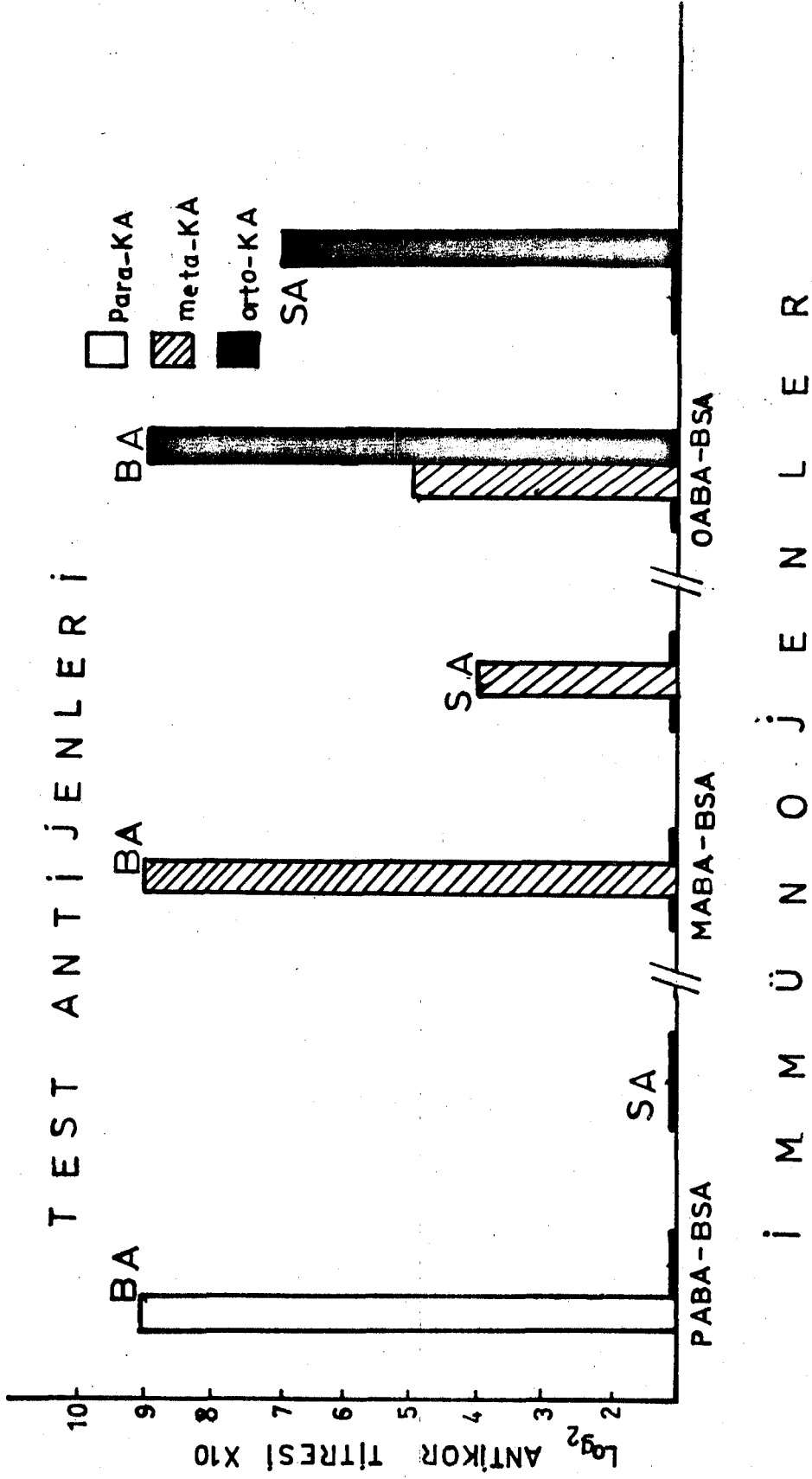
(Şekil 11) de sunulan bulgular özetlenecek olursa daha önce benzoik asitte olduğu gibi her üç izomerin de kendisine karşı en yüksek antikör cevabı uyandırdığı görülür. Sulfonilik asidin üç izomeri arasındaki çapraz reaksiyonlar ise benzoik asidinkilerden farklı olup şu şekildedir:

Para izomeri immünojen olduğu zaman yalnız meta ile, halbuki meta

izomeri immünojen olduğu zaman yalnız orto ile çapraz reaksiyon alınmaktadır. Hayvanlara OASA-BSA zerk edildiğinde çapraz reaksiyon yalnız meta izomeri ile (MASA) meydana gelmektedir. Üç izomer birden göz önünde tutulunca neticede para ile meta izomerleri arasında tek yönlü, meta ile orto izomerleri arasında ise çift yönlü bir çapraz reaksiyonun varlığı meydana çıkmıştır.

### III. Benzoik ve Sulfonilik Asit Grupları Arasında, B-hücresi Seviyesindeki Çapraz Reaksiyonlar:

Toplam altı çeşit izomerden herbiri immünojen olduğu zaman diğerlerine karşı meydana gelen antikor miktarı tayin edildi. Bir örnek olarak benzoik asit grubu immünojen olarak kullanıldığında elde edilen neticeler (Şekil 12) de sunulmuştur. Sulfonilik asit grup titreleri aynı olup bunun neticeleri (Ek) te verilmiştir. Her iki grupta para izomerleri ile immünize edilen hayvanların serumunda, diğerinin para izomeri ile çapraz reaksiyon veren antikor bulunamadı. Halbuki meta izomerleri kendi aralarında çapraz reaksiyon vermekteler. Orto izomerleri de aynı durumdadır.



Şekil 12- Benzoik ve sulfonilik asit grupları arasında B-hücre si seviyesinde çapraz reaksiyonlar

T A R T I Ş M A

İmmünolojinin en aktif araştırma alanlarından birisi hiç kuşkusuz T ve B hücrelerinin ilişkileri ve bunların reseptörlerinin özellikleridir. Son yıllarda B-hücresi ve onun ürünü olan antikor molekülü üzerinde geniş araştırmalar yapılmıştır. Bunun sonucu olarak B-hücresi yüzeyindeki "antijen tanıyıcı" birimlerin (reseptör) yapısının o hücrenin salgılamakta olduğu antikor molekülünden farksız olduğu saptanmış bulunmaktadır (3,48). İki değişik immünolojik cevaptan sorumlu olmalarına rağmen T ve B hücrelerinin reseptörlerinin aynı özellikte olması beklenir. Çünkü tek bir antijenik determinanta cevap veren her hücrenin (T-B ve makrofajlar) antijeni farklı mekanizmalarla tanımaları, organizma için elverişli değildir. Bu yüzden T-hücresinin de immünoglobulin tabiatında bir reseptöre sahip olması gerektiği savunulmaktadır. Fakat deneylerde T-hücresi reseptörlerinin antikor'a benzediğini gösteren deneysel deliller bulunamamış- (49,50) ve iki tip reseptör arasında bazı farklar bulunduğu ileri sürülmüştür (1,51). T-hücresinin özelliklerinin araştırılmasını güçleştiren nedenlerden birisi bu hücrenin her antijenik moleküle cevap vermemesidir. Günümüzde kimyasal yapıları basit, küçük molekül ağırlıklı sentetik antijenlerin, immünolojik olayların hücresel düzeyde incelenmesinde sağladığı yarar açıkça ortaya konulmuştur (8,40,41,52). Ancak T-hücresinin çeşitli özelliklerinin araştırılmasında bu tip moleküller kullanılmamıştır. Çünkü bugüne dek çoğu hapten tabiatında olan bu maddelere karşı T-hücresi cevabı çıkarmak için tutarlı bir yöntem geliştirilememiştir. Türk ve arkadaşları tarafından teklif edilen eski bir

yönteme göre, kimyasal bakımından aktif küçük moleküller, kazınmış deri üzerine aseton ve yağla karıştırılarak sürülmektedir (53). Bu yolla aktif kimyasal gruplara karşı hücre sel bağışıklık meydana geldiği deri testiyle gösterilmiştir. Tahmin edildiğine göre bu maddeler çeşitli vücut proteinleriyle birleşmekte ve böylece immünite kazandırmaktadırlar. Fakat bu yöntemin bir çok sakıncaları vardır. Kullanılan maddenin kimyasal bakımından aktif olması zorunluluğu vardır. İkincisi haptenlerin vücutta çok çeşitli proteinlerle birleşmesi ve değişik taşıyıcıların işin içine girmesi durumu karıştırmaktadır. Son olarak bu yöntemle haptenlere karşı yalnız hücre sel değil humoral cevap ta meydana gelmektedir.

Alkan ve arkadaşlarının son zamanlarda geliştirdikleri bir yöntem sözünü ettiğimiz eksikliği giderecek nitelikte gözükmektedir. Araştırmacılar denedikleri 4 değişik hapteni ayrı ayrı mikobakteriyum hücre duvarına bağlayarak, kobaylarda haptenlere karşı T-hücresi cevabı uyardılar. Bu hücre sel cevabın özgül lüğünü in vitro lenfosit transformasyonu deneyleriyle kanıtlamışlardır. Bu yöntemde, haptenlere karşı yalnız T-hücresi cevabı oluşmakta, humoral cevap yok denecek kadar az bulunmaktadır. Bu çalışmada benzoik ve arsenilik asitlere ilaveten amino sulfonilik asit kullanılmış ve yukarıdaki teknikle bunlara karşı T-hücresi alınabileceği çok duyarlı bir (in vitro) yöntem olan, makrofaj yayılım-önlenim deneyi ile gösterilmiştir. Bundan sonra T-hücresinin, antijen üzerindeki değişiklikleri ne dereceye kadar tanıyıp, ayırt edebildiğini anlamak amacıyla yukarıdaki haptenlerin para, meta, orto izomerine karşı çıkartılan hücre sel cevaplar karşılaştırılmış ve aşağıda sıralanan ilginç sonuç-

lar alınmıştır:

1- T-hücresi de B-hücresi gibi, benzer halkasının üzerindeki bir kimyasal grubun yer değiştirmesini fark edebilmektedir. Örneğin PABA ile immünize edilen bir hayvan, en yüksek cevabı PABA'ya vermekte, immünojen olarak MABA kullanılınca, en yüksek hücresel cevap PABA ve OABA'ya değil MABA'ya karşı alınmaktadır.

2- Çapraz reaksiyonlara gelince durum değişmektedir: Örneğin OABA ile immünize bir hayvanın hücrelerinin pozisyon daha yakın olduğu için MABA ile daha yüksek çapraz reaksiyon vermesi beklenirken, PABA ile yüksek çapraz reaksiyon vermiştir. Bunun nedeni şu olabilir. Bilindiği gibi hapten para pozisyonundayken, halkanın en ucundadır. Bu durumdaki bir (COOH) grubu ile hücre reseptörlerinin birbirine yaklaşması meta ve özellikle orto pozisyonlarına oranla çok daha kolay olması beklenir. Ayrıca değişik pozisyondaki karboksil gruplarının halka üzerindeki diğer grupları farklı şekilde etkileyip, yeni özellikler doğurma olasılığı vardır.

3- Yukarıdaki bulguya rağmen immünojen olarak hangi izomer kullanılırsa kullanılsın, diğer iki izomerle T-hücresi seviyesinde mutlaka çapraz reaksiyon alınmaktadır. Örneğin para ile orto pozisyonları birbirine uzak olduğu halde T-hücresi bu iki izomeri de ayrı ayrı tanımakla beraber, çapraz reaksiyon da vermektedir.

Yukarıda sıraladığımız bulgularda benzoik asit grubu örnek olarak verilmiştir. Aynı deneyler sulfonilik asidin üç ve ar-

sanilik asidin iki izomeri ile tekrarlandığında, aynı sonuçlar elde edildi. Toplam 8 çeşit izomerin neticeleri birbirleriyle gelişmediğine göre kullandığımız yöntemlere güvenle bakılabilir.

Mikobakteriyum hücre duvarına bağlı haptene karşı salt T-hücresi cevabı almamız, hiç antikor teşekkür etmediği anlamına gelmektedir. Az da olsa anti-hapten cevabı meydana gelebilir ve bunu kullandığımız teknikle gösteremiyor olabiliriz. Fakat Moorhead ve arkadaşları da yeni geliştirdikleri bir başka yöntemle (NIP)<sup>x</sup> haptene karşı T-hücresi cevabı uyandırmışlar ve hayvanlarda birinci cevapta anti-NIP antikor oluştuğunu Jerne'nin plak tekniğiyle göstermişlerdir. Adı geçen yöntemde hapten otolog gama globuline bağlanarak farelere verilmektedir (54).

Hapten olarak kullandığımız organik asitler Mb'yerine BSA gibi basit bir proteine bağlanarak hayvana verildiğinde bu sefer yalnız B-hücresi cevabı alınmaktadır. Bir haptenin değişik şekilde hücrelere sunulmasıyla, farklı immün cevaplar alınması demek olan bu durumun, azobenzen-arsonat-tirozin gibi haptenlerle de meydana geldiği daha önce bildirilmiştir (40,55). Parish'in çalışması da yukarıdaki görüşü desteklemektedir (56).

(Şekil 11,12) de özetlenen B-hücresi (antikor) cevapları incelenecek olursa, bu hücrenin de para, meta ve orto pozisyonlarını ayırt ettiği anlaşılır. Bu durum birçok haptelik sistem için doğrudur. Örneğin Landsteiner 1936 yılındaki klasik çalış-

-----  
<sup>x</sup>(NIP), 4-hydroxy-3-iodo-5-ntirophenylacetic Acid

malarıyla meta-amino sulfonilik aside karşı oluşan antikorun, en kuvvetli reaksiyonu meta izomeri ile verdiğini ve fakat, para-amino sulfonilik asitle hemen hiç reaksiyon vermediğini göstermişti (57). Antikor tayini için çok daha duyarlı bir yöntem (IHD) kullanılarak elde ettiğimiz bulgular Landsteiner'in bulgularına aynen uymaktadır. B-hücresi seviyesindeki izomerler arası çapraz reaksiyonlar yakından incelenecek olursa, meta ile orto pozisyonlarının daima yüksek derecede çapraz reaksiyon verdikleri fakat para pozisyonunun hiçbirleriyle önemli derecede çapraz reaksiyon vermediği görülür. Fakat denebilirki B-hücresi birbirine yakın pozisyonlara karşı daha yüksek çapraz reaksiyon vermektedir. Ancak MASA-BSA örneğinde olduğu gibi ( $SO_3$ ) grubu orta yerde olunca çapraz reaksiyon para yerine orto'ya karşı verilmektedir. Test antijeni olarak alyuvara bağlı haptten kullanıldığına göre, hapttenin alyuvar üzerinde aldığı pozisyon burada etkili olabilir. Ancak sebep ne olursa olsun, B-hücresinin aynı izomerlere karşı cevabı, T-hücresininkinden farklıdır. (Şekil 7 ve 11 i karşılaştırınız). Bu durumda T-hücresinin uyarılmasında etkin (dominant) bir rol oynayan para pozisyonu, B-hücresi için tersini yapmaktadır, denebilir.

İki hücre cevabı arasındaki diğer önemli bir fark ise pozisyonlar arası farkları tanımadadır. Örneğin PASA ile duyarlaştırılmış bir T-hücresi PASA'dan başka diğer ikisiyle de (MASA ve OASA) çapraz reaksiyon vermektedir. Aynı durum MASA ve OASA ya duyarlı hücreler için de geçerlidir. Halbuki B-hücresi cevabında pozisyonlar arası çapraz reaksiyon çok daha azdır. Örneğin PASA'ya karşı duyarlı hücreler, OASA ile hiç çapraz reaksiyon vermemiştir. Aynı şekilde MASA ile immünize edilmiş bir



hayvanın serumunda PASA'ya karşı hiç antikor bulunamamıştır. Bu durumda iki hücrenin antijenleri tanımaya yarayan reseptörleri arasında nitelik ve nicelik farklarından bahsedilebilir. Örneğin yukarıdaki durum, T-hücresinin daha geniş, B-hücresininse çok dar bir antijenik yüzeyi taşıyan reseptörlere sahip olmalarıyla açıklanabilir. Nitekim indirekt bulgular bazı araştırmacıları daha önce bu düşünceye itmiştir (11,35,58).

İki hücre reseptörü arasındaki farkın bir genişlik-darlık meselesi olduğunu kabul etmeden önce şu noktaya dikkat edilmelidir. T-hücresinin reseptörü, hücreye bağlıdır, Bu hücre antijenle birleşince makrofaj yayılım-önlenim faktörü salgılamakta ve biz MT ile bu faktörün miktarını ölçmekteyiz. Halbuki B-hücresi cevabını, o hücrenin ortama saldığı serbest antikorlara bakarak tayin etmekteyiz. Her iki hücrenin de reseptörlerinin antikor tabiatında olduğunu kabul etsek bile, T-hücresinde hücreye bağlı olan, B-hücresinde ise serbest bulunan reseptörlerin aktivitesini ölçmekteyiz. Aradaki fark bundan ötürü olabilir. Çünkü özgüllükleri ve diğer özellikleri aynı olsa dahi serbest antikorun bir ucundan bir hücreye bağlı olandan daha esnek olması beklenir. Denebilir ki B-hücresi de ilk uyarım sırasında hücre yüzeyine bağlı reseptörler aracılığıyla uyarılmaktadır. Bu doğru olabilir, fakat iki hücre aynı mekanizmayla uyarılsa dahi, eğer serbest reseptör (antikor), bağımlıdan farklı hareket ediyorsa yine de cevaplar arasında bir fark beklenir.

Bu çalışmanın ilginç sonuçlarından birisi de benzoik, sulfonilik ve arsanlık asit gibi gruplar arasında hem T (Şekil 8) hem de B (Şekil 12) hücresi seviyesinde çapraz reaksiyon alınmasıdır. Bu kimyasal gruplar birbirine benzemedikleri halde, bir benzer halkasının aynı pozisyonunda buldukları zaman çapraz reaksiyon vermektedirler. Örneğin MABA'ya duyarlı hücreler MASA ile reaksiyon verebilmektedir. Bu durum hücrenin uyarımında haptenin kimyasal yapısından çok, halka üzerindeki pozisyonunun daha önemli olduğuna işaret etmektedir. Dikkat edilirse kullandığımız tüm haptenler (COOH) (SO<sub>3</sub>) (AsO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) menfi elektrik yüküne sahiptir. Söz konusu çapraz reaksiyonlarda elektrik yükünün aynı olmasının rolü olabilir. Bu tezin yazıldığı sırada Deutsch ve arkadaşları sadece MABA ve MASA izomerini proteinlere bağlayarak farelere vermişler ve ikisi arasında çift yönlü çapraz reaksiyon olduğunu Jenne'nin plak tekniğiyle göstermişlerdir (59). Bizim deneylerimizde/farklı bir yöntem (indirekt hemoliz deneyi) kullanıldığı halde aynı neticeler bulundu ve ilaveten bu durum önce de bahsedildiği gibi sistematik olarak araştırılmıştır.

Bu çalışmada T-hücresi cevabı uyandırmak için mikobakteriyum kullanmamızın nedeni, bu bakterinin ister canlı ister ölü olsun, zerk edildiği yerde hücresel trafiği artırmasıdır. Bu arada çoğunluğu teşkil eden makrofajların, T-hücrelerinin uyarımını kolaylaştırdığı söylenebilir (60,61). Kanımızca haptene karşı T-cevabı alınabilmesi, mikobakteriyumun makrofaj içinde, uzun

süre kalabilmesi ve bu arada etraftaki T-hücreleriyle bol temas olanağı bulmasından ileri gelebilir. Nitekim Katz ve arkadaşları antijeni direkt olarak makrofaja bağladıklarında antijene karşı T-hücreleri cevabının arttığını göstermişlerdir (62).

### ÖZET VE SONUÇ

Bu çalışmada haptenlere karşı iki ayrı yöntemle salt hücre- sel (T-hücresi) ve salt humoral (B-hücresi) cevapları uyandırıl- dı. Haptene özgül hücre sel bağışıklık uyandırmak için benzoik asitin (BA), para (PABA), meta (MABA) ve orto(OABA) izomerleri mikobakteriyum hücre duvarına kovalant olarak bağlandı. Her bir izomerin kendisine karşı salt T-hücresi cevabı uyandırdığı sap- tandı. Bu cevabın özgül olduğu ( in vitro), makrofaj yayılım-ön- lenim testiyle (MT) ıspatlandı. Örneğin PABA-Mb kobaylara veril- diğinde en yüksek lenfosit cevabı PABA izomerine karşı uyandırıl- dı. Aynı durumun her üç izomer için de geçerli olduğu saptandı. PABA-Mb, MABA-Mb ve OABA-Mb zerk edilmiş hayvanlarda, verilen izomerlere karşı antikor (B-hücresi) cevabı arandı. Bu amaçla haptenler koyun alyuvarlarına yapıştırılarak, indirekt hemoliz deneyi (IHD) yapıldı. Hiçbir hayvanda tesbit edilebilir miktarda antikor bulunamadı. Yukarıdaki deneyler sulfonilik asidin (SA) üç ve arsenilik asidin iki izomeriyle tekrarlandı. Gerek T, ge- gerekse B-hücresi için her seferinde benzoik asit örneğine paralel sonuçlar bulundu.

Çalışmanın ikinci bölümünde benzoik asidin üç izomeri bu sefer sığır serum albuminine, diazonyum bağı ile bağlandı. Hap- ten-protein bileşiği tam Freund adjuvanı ile kobaylara verildi. (In vitro) MT ve IHD deneyleriyle hücre sel ve humoral cevap ölçüldü. Hayvanların zerk edilen haptene karşı salt antikor (B-hücresi) cevabı verdikleri, bu yolla haptene özgül T-hücresi cevabı vermedikleri gösterildi. Bu cevabın da, izomerlere özgül

olduğu saptandı. Humoral cevapta meta ve orto (MABA ve OABA) pozisyonları arasında çapraz reaksiyon bulunmasına rağmen, para (PABA) izomeriyle çapraz reaksiyon gösterilemedi. Halbuki aynı amaçla hapten olarak sulfonilik asit kullanıldığında, para izomeri (PASA) ile meta izomeri arasında (MASA) tek yönlü çapraz reaksiyon görüldü.

Bu çalışmada ayrıca benzoik ve sulfonilik asitler arasında hem T hem de B-hücresi seviyesinde çapraz reaksiyonlar bulunduğu saptandı. PABA ile PASA, MABA ile MASA ve OABA ile OASA, T-hücresi seviyesinde çapraz reaksiyon verdi. B-hücresi için para izomeri hariç diğer bulgular aynı idi.

Yukarıdaki bulgulardan şu sonuçlara varıldı:

1. T-hücresi de, B-hücresi gibi antijenik determinant üzerindeki çok küçük farkları ayırt edebilmektedir. Örneğin para, meta ve orto gibi çok yakın pozisyonları ayrı ayrı tanıyabilmektedir.

2. Aynı haptenin üç izomerine karşı, iki hücrenin cevapları arasında nicelik bakımından fark vardır. İzomerler arası çapraz reaksiyonun derecesi, T-hücresi cevabında daha yüksektir. O halde T-hücresinin ayırım gücü, B-hücresininkinden daha zayıf görülmektedir.

3. Bir önceki bulgu T-hücresinin, antijen molekülü üzerinde, B-hücresinden daha geniş bir alanı tanıdığını ve giderek reseptörlerinin daha geniş olduğunu önermektedir.

4. Üç değişik organik asit arasındaki çapraz reaksiyonun da-  
ima izomere özgül olması, gerek T ve gerekse B-hücresinin uya-  
rımında, haptenin kimyasal yapısından çok, benzen halkasındaki  
"pozisyon" ve "elektrik yükünün" önemine işaret etmektedir.

K A Y N A K L A R

1. MILLER, J.F.A., Basten, A., Sprent, J. and Cheers, C.:  
*Interaction Between Lymphocytes in the Immune Responses,*  
*Cell. Immunol.* 2: 469, 1971.
2. WIGZELL, H. and Makela, O.:  
*Specific Fractionation of Immunocompetent Cells,*  
*Transplant. Rev.*, 5: 76, 1970.
3. SELL, S.:  
*Development of Restrictions in the Expression of*  
*Immunoglobulin Specificities by Lymphoid Cells,*  
*Transplant. Rev.*, 5: 19, 1970.
4. SELA, M.:  
*Antigenicity: Some Molecular Aspects, Science*, 166:  
1365, 1969.
5. SELA, M.:  
*Antigens and Antigenicity Naturwissenschaften*, 56:  
206, 1969.
6. DAVIS, B.D., Dalbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S.,  
Wood, N.B.:  
*Microbiology: Hoeber Medical Division Hoeber and Rou,*  
*Pub. New York. 6. Edition 1970 p.p. 454 - 458.*
7. MAURER, P.:  
*Use of Synthetic Polymers of Amino Acids to Study the*  
*Basis of Antigenicity, Prog. Allergy*, 8: 1, 1964.

8. SELA, M.:  
*Immunological Studies with Synthetic Polypeptides*,  
*Advance Immunol.* 5: 29, 1966.
9. LANDSTEINER, K.:  
*"The Specificity of Serological Reactions"* Rev. ed.  
Harvard Uni. press. Cambridge, Mass. 1945.
10. KABAT, E.A.:  
*Antigenic Determinants and the Size of the Antigen  
Combining Site.* in *"Structural Concept in Immunology  
and Immunochemistry"*. Holt, Rinehart and Winston, Inc.  
N.Y. 1968 p.p. 82-111.
11. BENACERRAF, B., Paul, W.E., and Green, I.:  
*Hapten - Carrier Relationships*, Ann, N.Y. Acad. Scie.  
196-93-1970.
12. SCHLOSSMAN, S.F., Ben-Efraim, S., Yaron, A., Sober, H.A.:  
*Immunochemical Studies on the Antigenic Determinants  
Required to Elicit Delayed and Immediate Hypersensitivity  
Reactions*, *J. Exp. Med.* 123: 1083, 1966.
13. SCHLOSSMAN, S.F., Herman, J., Yaron, A.:  
*Antigen Recognition: In vitro Studies on the Specificity  
of the Cellulos Immune Response*, *J. Exp. Med.* 130: 1031,  
1969.
14. ABRAMOFF, P., La Via, M.:  
*Antigens and Antigenicity in "Biology of Immune Respon-  
se"* McGraw-Hill Book Company New York 1970 p.p. 13 - 34.
15. KABAT, E.A.:  
*Antigens*, in *"Structural Concepts in Immunology and  
Immunochemistry"*, 1968 p.p. 9-26.



16. NOSSAL, G.J.V., Abbot, A., Mitchell, J., and Lumus, Z.:  
*Antigens in Immunity: XV. Ultrastructural Features of Antigens Capture in Primary and Secondary Lymphoid Follicles, J. Exp. Med.* 127: 277, 1968.
17. UNAUNE, E.R., and Askonas, B.A.:  
*Persistence of Immunogenicity of Antigen After Uptake by Macrophages, J. Exp. Med.* 127: 915, 1968.
18. SPITZAGEL, J.K., and Allison, A.C.:  
*Mode of Action of Adjuvants: Effects of Antibody Response to Macrophage Associated Bovine Serum Albumin, J. Immunol.* 104: 128, 1970.
19. ASKONAS, B.A., and Rhodes, J.M.:  
*Immunogenicity of Antigen-Containing RNA Preparation From Macrophages, Nature,* 205: 471, 1965.
20. SCHOENBERG, M.D., Mumaw, V.R., Moore, R.D., and Weisbergen, A.S.:  
*Cytoplasmic Interactions Between Macrophages and Lymphocytic Cells in Antigen Synthesis, Science* 143: 964, 1964.
21. McFARLAND, W., Herlman, D.H., Moorhead, J.F.,  
*Functional Anatomoy of the Lymphocyte in Immunological Reaction in Vitro, J.E.M.* 124: 851, 1966.
22. CLAMAN, H.A., Chaperon, E.A., and Trplett, E.F.:  
*Thymus-Marrow Cell Combinations-Synaegism in Antibody Production, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122: 1167, 1966.
23. MILLER, J.F.A.P., and Mitchell, G.F.:  
*Cell to Cell Interaction in the Immune Response I. Hemolysin-forming Cells in Neonatally Thymuctomized Mice Reconstituted with Thymus or Thoracic Duct Lymphocytes, J. Exp. Med.* 128: 801, 1968.

24. MITCHELL, G.F., and Miller, J.F.A.P.:

*Cell to Cell Interaction in the Immune Response*

II. The Source of Hemolysin-forming Cells in Irradiated Mice Given Bone Marrow and Thymus or Thoracic Duct Lymphocytes, *J. Exp. Med.* 128: 821, 1968.

25. DAVIS, A.J.S.:

*The Thymus and The Cellular Basis of Immunity*, *Transplant. Rev.* 1: 43, 1969.

26. SELL, S.J.:

*Studies on Rabbit Lymphocytes in Vitro V. The Induction of Blast Transformation with Sheep Antisera to Rabbit IgG subunit*, *J. Exp. Med.* 125: 289, 1967.

27. MAKELA, O., Kostianen, E. Kaponen, T., Kuoslahti, E.:

*The Timing and Quality of IgA, IgG and IgM Responses in Rabbits Immunized with a Hapten*, *Nobel Symp.* 3: 505, 1967.

28. WALTERS, C.S., and Wigzell, H.:

*Demonstration of Heavy and Light Chain Antigenic Determinants on the Cell Bound Receptor for Antigen*, *J. Exp. Med.* 132: 1233, 1970.

29. PERNIS, B., Forni, L., and Amante. L.:

*Immunoglobulin Spots on the Surface of Rabbit Lymphocytes*, *J. Exp. Med.* 132: 1001, 1970.

30. MITCHINSON, N.A.:

*Cell Population Involved in Immune Responses. In "Immunological Tolerance" 1969, W. Braun and M. Landy, Editors Acad. press. Inc. N.Y. p.p. 149.*

31. OVARY, Z., and Benacerraf, B.:

*Immunological Specificity of the Secondary Response with Dinitrophenylated Proteins, Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 114: 72, 1963.*

32. KATZ, D.H., Paul, W.E., Goidl, E.D. and Benacerraf, B.:

*Carrier Function in Anti-hapten Immune Response I. Enhancement of Primary and Secondary Anti-hapten Antibody Response by Carrier Preimmunization, J. Exp. Med. 132: 261, 1970.*

33. MITCHISON, N.A.:

*Antigen Recognition Responsible for the Induction in Vitro of the Secondary Response, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32: 431, 1967.*

34. RAJEWSKY, K., Schirmacher, V., Nase, S., and Jerne, N.K.:

*The Requirement of More Than One Antigenic Determinant for Immunogenicity, J. Exp. Med. 129: 1131, 1969.*

35. METZGER, H.:

*The Antigen Receptor Problem, Ann, Rev. Biochem. 39: 889, 1970.*

36. DAVIE, J.M. and Paul, W.E.:

*Receptors on Immunocompetent Cells I. Receptor Specificity of Cells Participating in a Cellular Immune Response, Cell. Immunol. 1: 404, 1970.*

37. WIGZELL, H., and Anderson, B.:

*Cell Separation on Antigen-coated Columns, J. Exp. Med. 129: 23, 1969.*

38. CRONE, M., Koch, C., and Simonsen, M.:

*The Elusive T Cell Receptor*, *Transplant. Rev.* 10:  
36, 1972.

39. ALKAN, Ş.Ş., and Nitecki, D., and Goodman, J.W.:

*Antigen Recognition and the Immune Response:*  
*The Capacity of L-tyrosine-azobenzenarsonate to Serve*  
*As a Carrier for a Macromolecular Hapten*, *J. Immunol.*  
107: 353, 1971.

40. ALKAN, Ş.Ş., Williams, E.B., Nitecki, D.E., and Goodman,  
J.W.:

*Antigen Recognition and the Immune Response. Humoral and*  
*Cellular Immune Responses to Small Mono and Bifunctional*  
*Antigen Molecules*, *J. Exp. Med.* 135: 1228, 1972.

41. ALKAN, Ş.Ş., Bush, M., Nitecki, D., and Goodman, J.W.:

*Antigen Recognition and the Immune Response:*  
*Structural Requirements in the Side Chain of Tyrosine*  
*for Immunogenicity of L-tyrosine-azobenzenarsonate*,  
*J. Exp. Med.* 136: 387, 1972.

42. PARISH, C.R.:

*Immune Response to Chemically Modified Flagellin*  
*II. Evidence for a Fundamental Relationship Between*  
*Humoral and Cell Mediated Immunity*, *J. Exp. Med.*  
134: 21, 1971.

43. ALKAN, Ş.Ş., ve Trefts, P.:

*Mikobakteriyum Duvarına Bağlı Çeşitli Haptenlere Karşı*  
*Hücreyel Immün Cevap Çıkarılması*, 15. Türk Mikrobioloji  
Kongresinde Sunulmuştur. (Ankara 28/30 Eylül, 1972).  
(Makale baskıda)

44. TABACHINICK, M., Sobotka, H.:  
*Azo Proteins, I. Spectrophotometric Studies of Amino Acids Azo Derivatives, J. Biol. Chem. 234: 1726, 1959.*
45. CAMPBELL, D.H., Garvey, J.S., Cremer, M.E., Susdorff, D.H.:  
*"Methods in Immunology" p.p. 104-110 (Colon Chromatography) Second Edition, W.A. Benjamin, Inc. N.Y. 1970.*
46. DAVID, J.R., Al-Askeri, S., Lawrence, H.S., Thomas, L.:  
*Delayed Hypersensitivity in Vitro I. the Specificity of Inhibition of Cell Migration by Antigens, J. Immunol. 93: 264, 1964.*
47. INGRAHAM, I.:  
*Specific, Complement-Dependent Hemolysis of Sheep Erythrocytes by Antiserum to Azo Hapten Groups, J. Inf. Dis. 91: 268, 1952.*
48. PAUL, W.E.,  
*Functional Specificity of Antigen-Binding Receptors of Lymphocytes, Transplant. Rev. 5: 130, 1970.*
49. GREAVS, M.F.:  
*Biological Effects of Anti-Immunoglobulins: Evidence for Immunoglobulin Receptors on T and B Lymphocytes, Transplant. Rev. 5: 45, 1970.*
50. MILLER, J.F.A.P., Sprent, J., and Basten, A.:  
*Cell-to-Cell Interaction in the Immune Response VIII. Requirement for Differentiation of Thymus-derived Cells, J. Exp. Med. 134: 1266, 1971.*

51. CHEERS, C., Breither, J.C.S., Little, M., and Miller, J.F.A.P.:  
Co-operation Between Carrier-Reactive and Hapten-sensitive Cells in Vitro, *Nat. New. Biol.* 232: 248, 1971.
52. SELA, M.:  
Structure and Specificity of Synthetic Polypeptide, Antigenes *Ann. New York Acad. Sci.* 169: 23, 1970.
53. TURK, J.L.:  
The Nature of Immune Response in "Immunology in Clinical Medicine", 1969. Appleton - Century-Crofts, Educational Division Meredith Corporation N.Y. p.p. 1-21.
54. Moorhead, J.W. Walterz, C.S. and Claman, H.H.:  
Immunologic Reactions to Haptens on Autologous Carriers, I. Participation of Both Thymus Derived and Bone Marrow-derived Cells in the Secondary in Vitro Response, *J. Exp. Med.* 137: 411, 1973.
55. LESKOWITZ, S.:  
Immunochemical Study of Antigenic Specificity in Delayed Hypersensitivity to Polytyrosine-azobenzenarsonate and its Suppression by Haptens, *J. Exp. Med.* 117: 909, 1963.
56. PARISH, C.R.:  
The Relationship Between Humoral and Cell-Mediated Immunity, *Transplant. Rev.* 13: 35, 1972.
57. LANDSTEINER, K., and Scheer, V.D.J.:  
On Cross Recognitions of Immune Sera to Azoprotein, *J. Exp. Med.* 63: 325, 1936.

58. BECKER, M.J., Levin, H., and Sela, M.:

*The Specificity of Cellular Immunity: Studies in Guinea Pig Using Defined Tetrapeptides Containing p-azobenzen-  
arsonate L-tyrosine, Eur. J. Immunology 3: 131, 1973.*

59. DEUTSCH, S., Vinit, M.A., and Bussard, A.E.:

*Original Antigenic Sin at Cellular Level  
II. Specificity of the Antibodies Produced by Individual  
Cells, Eur. J. Immunol. 3: 235, 1973.*

60. UNAUNE, E.R. and Feldman, J.D.:

*Role of Macrophages in Delayed Hypersensitivity  
I. Induction with Macrophage Bound Antigen Cell.  
Immunol. 2: 269, 1971.*

61. MITCHELL, M.S., Kirkpatrick, D., Mokyr, M.B., and Gesy, I.:

*On the Mode of Action of BCG, Nat. New. Biol. 243:  
216, 1973.*

62. KATZ, D.H., and Unanue, E.R.:

*Critical role of Determinant Presentation in the  
Induction of Specific Responses in Immunocompetent  
Lymphocytes, J. Exp. Med. 137: 967, 1973.*

## TAMPONLAR

### 1. ALSEVER SOLUSYONU

20.50 gram ..... Dextrose

8.00 gram ..... Sodium Citrate (Dehydrate) ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

0.55 gram ..... Citric Acid (Monohydrate) ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

4.20 gram ..... Sodium Chloride ( $\text{NaCl}$ )

1000 ml. .... Distile Su

115°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, PH'sı 6.1'e ayarlanır. Kan alındığı zaman 1 hacim kan, bir hacim Alsever Solusyonu ile karıştırılır. Taze solusyon en az bir hafta 4°C'de bekletildikten sonra kullanılmalıdır.

### 2. BORAT TAMPONU

6.184 gram ..... Boric Acid

9.536 gram ..... Borax (Sodium Tetraborate) ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ )

4.384 gram ..... Sodium Chloride

1000 ml. .... Distile Su

600 - 800 ml suda eritilir. Tamamen eridikten sonra 1 litreye tamamlanır. PH - 8,5 - 9'a ayarlanır. Otoklavda 115°C'de 15 dakika sterilize edilir.

### 3. DENGELİ FOSFAT TUZ SOLUSYONU (PBS)

A- Solusyonu

8 gram ..... Sodium Chloride ( $\text{NaCl}$ )

0.2 gram ... Potasium " (KCl)

0.132 gram.. Calcium " ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

0.1 gram ... Magnesium " ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

800 ml. .... Distile Su



B- Solusyonu

1.15 gram .... Sodium Hydrophosphate(dihydrate) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0.2 gram ..... Potasium dihydrophosphate (dihydrate) ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

200 ml. .... Distile Su

Her iki solusyonu ayrı ayrı demineralize suda eritildikten sonra otoklavda  $115^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika ayrı ayrı sterilize edilir. Soğuduktan sonra, B Solusyonu A Solusyonuna ilave edilerek karıştırılır. Gerekli ise PH.7.2'ye ayarlanır.

4. MODİFİYE FOSFAT TAMPONU (MFT)

50 ml. .... %17'lik Sodium Chloride (NaCl)

50 ml. .... 0.1 M Sodium Hydrophosphate ( $\text{NaHPO}_4$ )

10 gram .... Dextrose

Distile su ile bir litreye tamamlanır.

PH.7.3-7.4'e ayarlanır.

5. FOSFAT TAMPONU

7.2 gram .... Sodium Chloride (NaCl)

1.8 gram .... Sodium Hydrophosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

0.43 gram .... Potasium Dihydrophosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

1000 ml. .... Demirenalize Su

PH - 8'e ayarlanır.

6. HANKS DENGELİ TUZ SOLUSYONU (BSS)

A- Stok I (10X)

10 gram ..... Dextrose

3.58 gram.... Sodium Hidrophosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

0.6 gram .... Potasium Dihydrophosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

20 ml. .... % 0.5 Phenol Red Solusyonu

Demineralize su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

B- Stok II (10X)

1.86 gram .... Calcium Chloride ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

4.00 gram .... Potassium Chloride (KCl)

80.00 gram ... Sodium Chloride (NaCl)

1.04 gram .... Magnesium Chloride ( $\text{MgCl}_2$ )

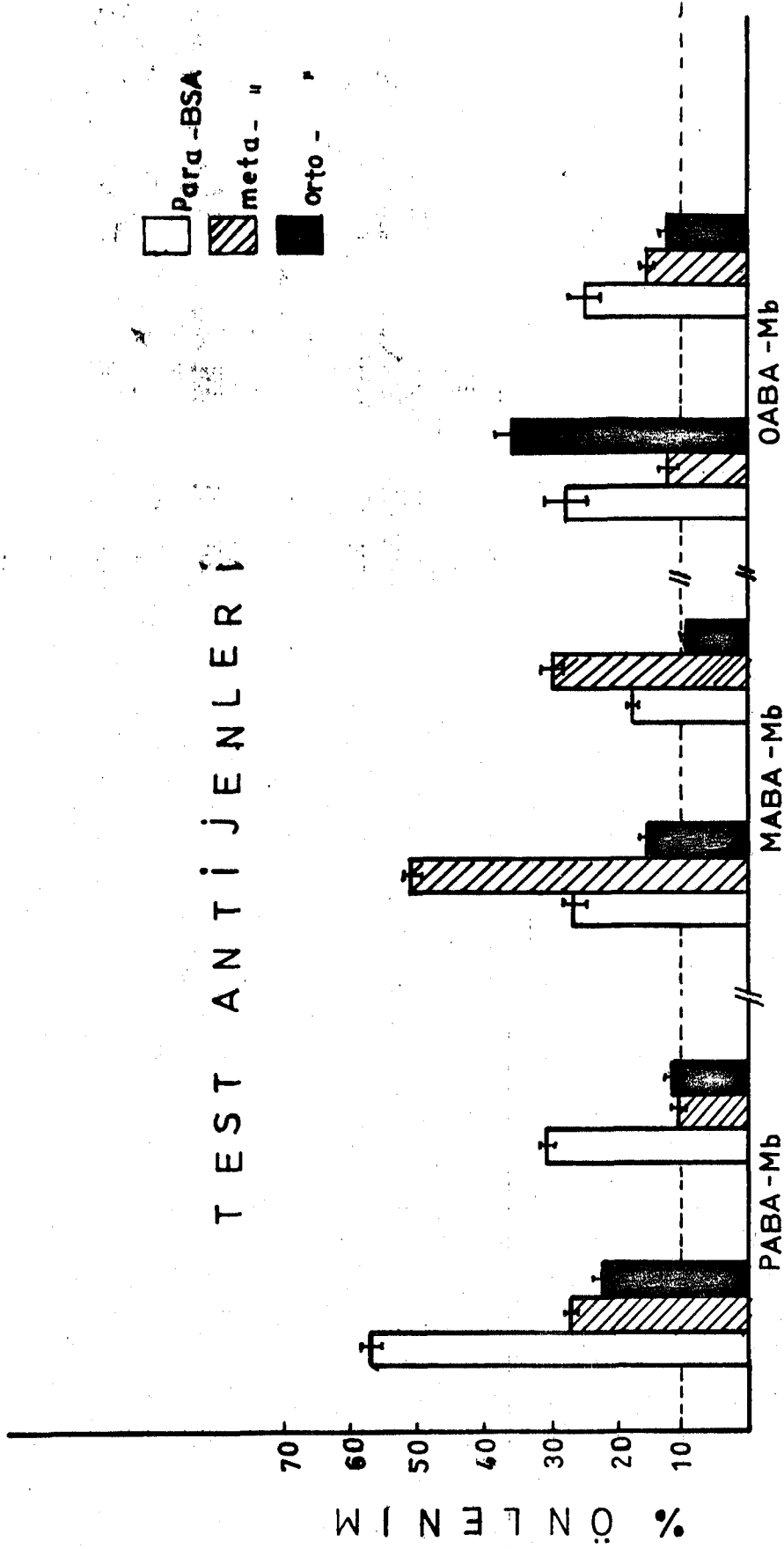
2.00 gram .... Magnesium Sulfate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Demineralize su ile bir litreye tamamlanır.

C- ÇALIŞMA SOLUSYONU (1X)

800 ml. demineralize distile suya 100 ml. A stokundan ve 10 ml. B Stokundan ilave edilir, karıştırılır sonra 1 litreye tamamlanır. Gerekirse 1 cc'ye 100 Ünite penicillin ve 100 mikrogram streptomycin düşecek şekilde streptomycin penicillin (SP) karışımından ilave edilir. PH 0.1 M  $\text{NaCO}_3$  ile 7.2'ye ayarlanır. Seitz filtresinden süzülerek sterilize edilir.

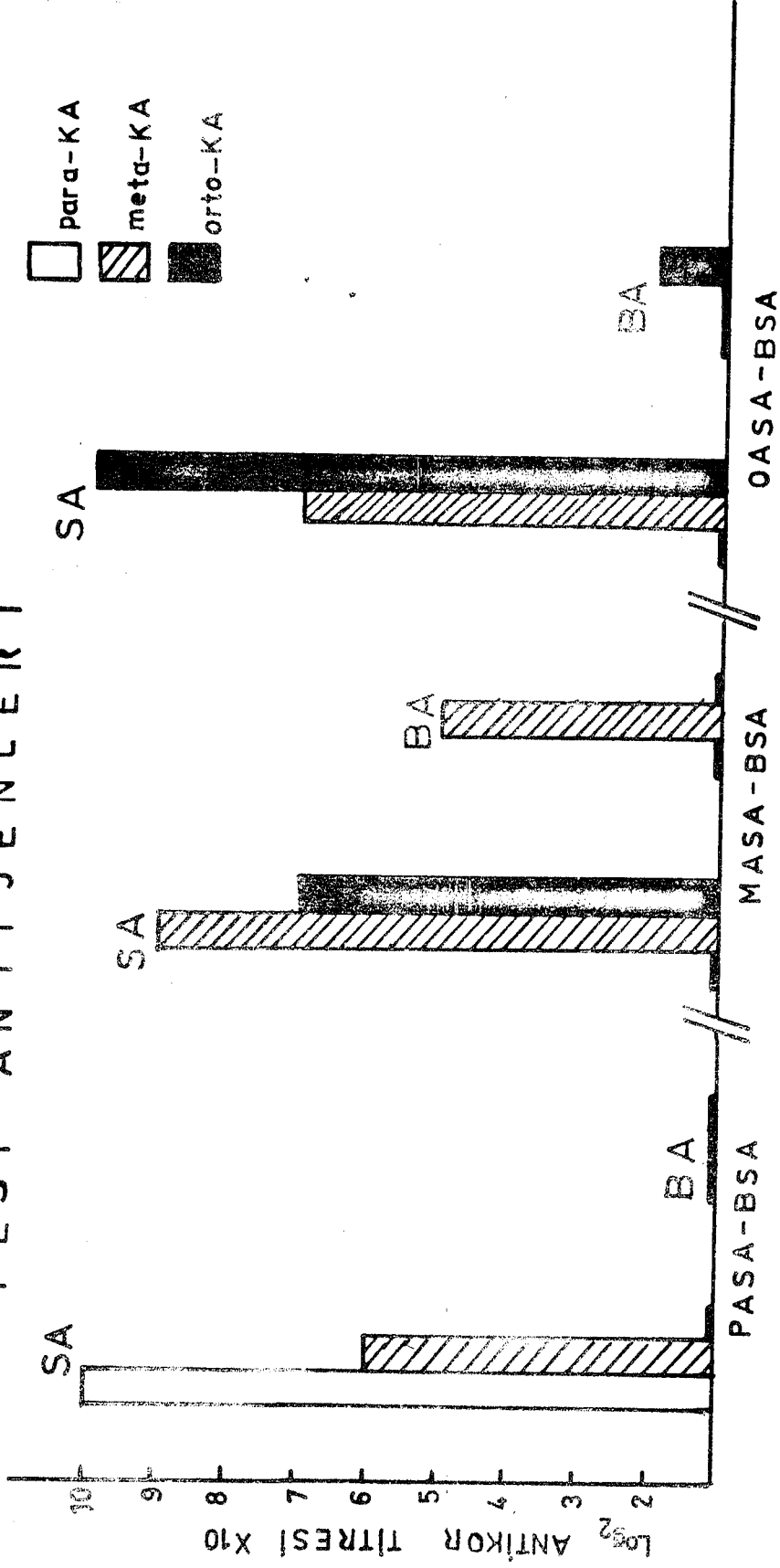
# TEST ANTİJENLERİ



i M M Ü N O J E N L E R

Şekil 1- Benzoik ve sulfonilik asit grupları arasında T-hücreleri seviyesindeki çapraz reaksiyonlar

# TEST ANTİJENLERİ



# İ M M Ü N O J E N L E R

Şekil 2- Benzoik ve sulfonilik asit grupları arasında B-hücre si seviyesinde çapraz reaksiyonlar

