

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANDA LEMFOSİT VE LÖKOSİT MİKTAR TAYİNİ**

**Kimya Mühendisi Eda ERYILMAZ**

**F.B.E Kimya Ana Bilim Dalı Analitik Kimya Programında Hazırlanan**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Huriye KARŞILAYAN KUZU**

*Huriye*  
Doç. Dr. Huriye Kuzu Karşıl原因  
Doç. Dr. Ayşe OĞAN *Ayşe*  
Yrd. Doç. Dr. Nüket ÖCAL *Nüket*

**İSTANBUL, 1999**

## İÇİNDEKİLER

<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	i
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	ii
<b>ÖNSÖZ</b> .....	iii
<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. TEORİK KISIM</b> .....	2
2.1. İmmun Sistem .....	2
2.2. İmmun Sistemde Yer Alan Hücreler .....	4
2.3. Lemfositlerin Önemi .....	8
2.4. Enzimler .....	16
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	18
3.1. Mikroskop Yöntemi ile Lemfosit Sayısı Tayini .....	18

3.1.1.	Mikroskop ile Lenfosit Sayısı Tayininde	
	Örnek Alımı ve Hazırlanması .....	18
3.1.2.	Mikroskop Kullanarak Lenfosit Sayısı Tayini .....	19
3.2.	Elektronik Hücre Sayıcı ile Lenfosit Tayini .....	21
3.3	Enzimatik Yöntemlerle Lökosit Sayısı Tayini .....	21
<b>4.</b>	<b>DENEYSEL ÇALIŞMA .....</b>	<b>23</b>
4.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	23
4.2.	Örnek Alınması ve Hazırlanması .....	23
4.3.	Hücre Parçalanması .....	24
4.4.	TNBS Yöntemi .....	27
4.5.	Lowry Yöntemi .....	33
4.6	Enzimatik Yöntem .....	38
4.6.1	Kan örneklerinin alınması ve lökosit hücrelerinin ayrılması .....	38
4.6.1.1	Amonyum klorür lizis çözeltisi hazırlanması .....	38
4.6.2	Enzimatik yöntemde hücre parçalama işlemi .....	39
4.6.3	Peroksidaz enzimlerinin o-dianisidin ile etkileşmesi .....	39
4.6.3.1	o-dianisidin reaktifi hazırlanması .....	39
4.6.3.2	Enzimatik yöntemin uygulanışı .....	39
<b>5.</b>	<b>SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>52</b>
	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>58</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	İmmün sistem hücreleri .....	9
Şekil 3.1	Neubauer sayma kamerası .....	20
Şekil 3.2	Sayma alanı .....	20
Şekil 4.1	Proteinlerin primer amino grupları ile TNBS'in reaksiyonu .....	29
Şekil 4.2	BSA (a) ve L-lizinin (b) TNBS ile verdiği reaksiyon ürünlerinin absorpsiyon spektrumları.....	30
Şekil 4.3	TNBS yöntemi ile 350 nm'de okunan absorpsiyon değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi .....	31
Şekil 4.4	TNBS yöntemi ile 420 nm'de okunan absorpsiyon değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi .....	32
Şekil 4.5	Lowry yöntemi ile 630 nm'de okunan absorpsiyon değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi .....	34
Şekil 4.6	Lowry yöntemi ile 750 nm'de okunan absorpsiyon değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi .....	35
Şekil 4.7	TNBS ve mikroskop ile sayım sonuçlarının kıyaslanması.....	36
Şekil 4.8	Lowry ve mikroskop ile sayım sonuçlarının kıyaslanması.....	37
Şekil 4.9	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeren ve içermeyen sulu çözeltide o-dianisidin absorpsiyon spektrumları .....	42
Şekil 4.10	Triton x-100 çözeltisinin absorpsiyon spektrumu .....	43
Şekil 4.11	Triton x-100 ile parçalanma sonucu elde edilen hücre içeriğinin absorpsiyon spektrumu .....	44
Şekil 4.12	Reaksiyon ürünü (1)ve hücre içeriğinin (2) absorpsiyon spektrumları .....	45

Şekil 4.13	Oda sıcaklığında meydana gelen reaksiyon ürününün zamana bağlı olarak alınan absorpsiyon spektrumları .....	46
Şekil 4.14	Nötral pH'da enzimatik reaksiyon ürününün zamana bağlı olarak artması .....	47
Şekil 4.15	10. dakika sonunda reaksiyon ürününün asidli (1) ve nötral (2) ortamda absorpsiyon spektrumları .....	48
Şekil 4.16	Kalibrasyon eğrisi çiziminde yararlanılan absorpsiyon spektrumları .....	49
Şekil 4.17	Enzimatik yöntemde elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	50
Şekil 4.18	Kan örneklerinde Enzimatik yöntem ve otomatik hücre sayıcı ile elde edilen lökosit sayılarının kıyaslanması .....	51

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1	Kandaki lökosit tablosu .....	12
Çizelge 4.1	pH: 9.5’da hücre parçalanması işleminin zamana bağlı olarak izlenmesi.....	25
Çizelge 4.2.	Hücre parçalanması işleminin oda sıcaklığında ortamın pH değerine bağlı olarak izlenmesi.....	26



## ÖNSÖZ

Bu çalışmanın özünü kuran Sayın Hocam Doç. Dr. Huriye Kuzu (Karşıl原因) a bana verdiği sonsuz destek ve ilgiden dolayı minnettarım.

Bize laboratuvar olanaklarını sunan DETAM İmmünoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Günnur Deniz'e ve bana bıkmadan usanmadan örnek hazırlayan Dr. Gaye Yıllar'a, Pakize Terzi Laboratuvarı "Flow Cytometri" Bölümü yöneticisi Sayın Gülderen Yanıkkaya'ya ve ayrıca arkadaşlarım Araştırma Görevlisi Günay Bağ ve Uzman Neşe Atacı'ya teşekkürü borç bilirim.



## ÖZET

Kan örneklerinde lenfosit sayımı genellikle mikroskop kullanarak, kısa sürede çok sayıda sonuç vermek durumunda olan büyük laboratuvarlarda otomatik hücre sayım aletleri ile yapılmaktadır. Mikroskop ile hücre sayımı zahmetli ve çalışan kişilere bağlı olarak sistematik hatalara fazla rastlanan bir yöntemdir. Otomatik hücre sayım aletleri ise oldukça pahalıdır. Bu konuda, klinik laboratuvar pratiğine faydalı olmak düşüncesiyle, yapılan çalışmada kan örneklerinde lenfosit tayini için kolay, duyarlı ve güvenilir spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi incelendi. Bu çalışmada, alınan kan örneklerinde lenfositler dansite gradient yöntemi ile ayrıldı. Lenfosit hücreleri pH 9.5 olan karbonat tampon çözeltisinde 42 ° C'da yarım saat ısıtılarak tümüyle parçalandı. Elde edilen hücre içeriği trinitrobenzen sülfonik asid ile pH 9.5 olan karbonat tamponunda 42 ° C'da 1 saat reaksiyona maruz bırakıldı. Oluşan renkli ürünün absorpsiyon spektrumunda 350 nm ve 420 nm'de yer alan pikler dikkate alınarak kalibrasyon eğrileri çizildi. İkinci olarak, lenfosit miktar tayini için Lowry yönteminden yararlanıldı. Bu yöntemde 650 nm ve 750 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri ile kalibrasyon eğrileri çizildi. Bu iki yöntem ve mikroskopta sayım ile alınan sonuçlar kıyaslandı. Klinik değerlendirmelerde kanda lökosit sayısının değeri genellikle lenfosit sayısına göre daha fazla önem taşımaktadır. Kanda lökosit sayısı da mikroskop ya da otomatik hücre sayım aletleri ile yapılmaktadır. Bu nedenle, çalışmada ek olarak kan örnekleri için spektrofotometrik lökosit tayin yöntemi geliştirilmesi incelendi. Belirtilen yöntemde peroksidaz enziminin o-dianisidin ile reaksiyonu dikkate alındı. 400 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Sonuçlar otomatik hücre sayım aletinde elde edilen değerler ile kıyaslandı.

Anahtar sözcükler: Lenfosit, lökosit, peroksidaz, spektrofotometri, TNBS, Lowry method, o-dianisidin



## ABSTRACT

The lymphocyte cell counting in blood samples are made usually by using light microscope. Automatic cell counters are used also for the quantitation of lymphocyte in blood if many samples need to measure in a short time. The enumeration of lymphocyte by using light microscope is difficult and personal systematic errors that are widely encountered and varies considerably from person to person. But, automatic cell counters are very expensive instruments. Hoping to be useful for the clinical laboratory works, the development of easy, precise and reliable spectrophotometric method for the determination of lymphocyte in blood samples was studied. In this work, lymphocytes were separated from blood samples with density gradient centrifugation method. These cells were digested completely by heating in carbonate buffer (pH 9.5), at 42 ° C for half an hour. The reaction of the obtained cell content solutions with trinitrobenzene sulphonic acid were performed in carbonate buffer (pH 9.5) at 42 ° C again for one hour. The calibration graphs were generated from the absorbances at 350 nm and 420 nm of the absorption spectra of the obtained coloured product solution. Secondly, Lowry method were applied for the quantitation of lymphocytes in blood samples. The calibration graphs were obtained with the absorbancies at 650 nm and 750 nm of the absorption spectra. However leukocyte counts is more important than the lymphocyte counts in blood for clinicians. Hence, in addition, the development of a spectrophotometric method for the determination of leukocyte counts in blood were studied. The reaction of peroxidase enzyme with o-dianisidine was performed. The calibration graph was obtained with the absorbancies at 400 nm of the spectra. The results obtained with this method and using automatic cell counter were compared.

Key words: Lymphocyte, Leukocyte, Spectrophotometric determination, Trinitrobenzen Sulfonik Asid, Lowry method, o-dianisidine, myeloperoxidase

## 1. GİRİŞ

Hastalıklara sebep olan mikro organizmalara karşı vücut savunmasının önemli bir kısmını, farklı özellikleri ve görevleri olan lökositler üstlenmektedir. Çeşitli hastalıklarda lökositlerin vücuttaki toplam sayısı ya da kan sıvısının birim hacmindeki miktarında değişme meydana gelmektedir. Bazı hastalıklarda ise idrarda lökositlere rastlanmakta ve bunların miktarı durumun göstergesi olabilmektedir. Benzer şekilde, lenfosit sayıları hastalıklar hakkında bilgi vermektedir.

Günümüzde çok sayıda maddenin tayin edildiği klinik laboratuvarları tıbbi açıdan teşhis ve hasta takibinde önemli yere sahiptirler. Bu laboratuvarlarda yapılan analizlerde duyarlılık, kısa sürede sonuç alma gibi özellikler aranmaktadır. Bu yüzden genellikle düşük konsantrasyonda bulunan birçok biyolojik maddenin, sahip olduğu özelliklerden yararlanarak çeşitli analiz yöntemlerinin geliştirilmesi için yapılan araştırma çalışmaları devam etmektedir.

Yapılan çalışmada, klinik laboratuvarlarında kullanılmak üzere spektrofotometrik yöntemle lenfosit sayısı tayini için yöntem geliştirilmesi incelendi. Kullanılan reaktifler, absorpsiyon ölçümleri ile hücre sayısı arasında lineer kalibrasyon eğrilerinin eldesine olanak sağladı.

Bu yeni yöntemler ile farklı örnekler için lenfosit ve lökosit sayıları tayin edildi. Alınan sonuçlar mikroskop veya otomatik hücre sayıcıda elde edilen değerler ile kıyaslandı.

## 2. TEORİK KISIM

### 2.1. İmmun Sistem

Lenfoid organlar ve immün yanıtta görevli hücrelerin tümüne immün sistemi denir. Kemik iliği, dalak, karaciğer, lenf düğümleri ve bu organlarda bulunan lenfositler, tek çekirdekli veya polimorf fagosit hücreler, bağ dokusu histiositleri (bağ dokusunda bulunan bir makrofaj) v.b. immün sistemi oluşturmaktadır.

İmmün sistemi vücudu, öncelikle enfeksiyonlara karşı koruma görevi üstlenmiştir. Yetersiz bir immün sistemle doğan çocuk, enfeksiyona sebep olan “ bakteri, virüs, mantar ve parazitlere” karşı olağandışı koruma koşulları sağlanmadıkça yaşayamaz. İmmünolojik olarak yetersiz herhangi omurgalı canlı da aynı risk ile karşılaşmaktadır.

Bütün omurgalılarda immün sistemi vardır. Omurgasızlarda ise başlıca fagosit hücrelerin faaliyetine dayanan bir koruma sistemi bulunmaktadır. Fagosit hücreler (başlıca makrofaj ve nötrofil) omurgalıların koruma sisteminde de önemli bir yere sahiptir ancak çok daha karmaşık savunma sisteminin yalnızca bir parçasını oluşturmaktadırlar.

İmmün sistemi, vücuda girerek hastalanmaya neden olan organizmaları ya da bunların ürettiği toksik madde moleküllerini parçalama ve yok etme görevini üstlenmektedir. İmmün sistem yabancı molekülleri vücudun kendi moleküllerinden ayırt edebilmektedir. Bazen immün sistemi bu ayrımı yapamaz ve vücudun kendi

moleküllerine karşı yokedici saldırıya geçer. Bu tür oto immün hastalıklar öldürücü olabilmektedir.

Bugün immün sistem hakkında mevcut bilgilerin çoğu, laboratuvar hayvanlarına enfeksiyona neden olmayan yabancı protein veya polisakkaritlerin enjeksiyonunu esas alan çalışmalardan sağlanmıştır. Vücuda alındığında immune yanıt oluşmasını sağlayan maddelere antijen denir. İmmün sistem birbirine çok benzeyen farklı antijenleri, örneğin yalnızca bir amino asidi farklı iki proteini ya da yalnızca optikçe izomerliği farklı iki molekülü ayırabilmektedir.

İmmune sistemin yanıtı iki temel guruba ayrılmaktadır.

- 1- Antikor vasıtasıyla gerçekleştirilen immün yanıt (Antibody responses)
- 2- Hücre vasıtasıyla gerçekleştirilen immün yanıt (Cell-mediated immune responses)

1. tür immün yanıtın oluşması için vücutta antikorların üretilmesi gerekir. Antikorlar immunoglobulinler olarak adlandırılan proteinlerdir. Kan sıvısı vasıtasıyla bütün vücudu dolaşan antikorlar diğer vücut sıvılarına geçerler ve yabancı antijenleri tanıyıp spesifik olarak bağlanırlar. Antikorların bağlandığı virüs ya da bakteri toksini hedef hücre (target cells) üzerinde bulunan reseptörlere bağlanma yeteneğini kaybeder ve böylece aktivitesini yitirmiş olur. İstilacı mikro organizmalara antikor bağlanması, sanki onların parçalanması, yokedilmesi için işaretlenmesi demektir. Bu durum mikroorganizmaların fagosit hücreler tarafından sindirilerek yok edilmesini kolaylaştırmakta veya istilacıları öldüren bir grup kan proteininden oluşan komplement sistemini aktifleştirmektedir.

2. tür immün yanıtın oluşması için istilacıyı kabul eden hücrelerin (host cells) yüzeyinde oluşan antijenler ile reaksiyon veren özel hücrelerin vücutta üretilmesi gerekir. Belirtilen bu savunma hücreleri, virüsün yerleştiği hücreler (infected cells) üzerinde oluşan viral proteinleri tanırlar. Virüsün yerleştiği hücreleri virüs replikasyonuna başlamadan önce yok ederler (Alberts vd., 1989).

## 2.2 İmmün Sisteminde Yer Alan Hücreler

Bağışıklık sistemde yer alan beyaz kan hücreleri kemik iliğinde meydana gelmekte, gelişmelerini tamamlayarak kan sıvısı ile bütün vücudu dolaşmakta ve dokulara ulaşarak savunma görevlerini yerine getirmektedirler. Lökositler kimyasal olarak % 82 su, fosfolipidler, nükleoproteinler, glikojen, laktik asid, alkali fosfataz ve diğer enzimler ile birlikte eser miktarda sodyum, potasyum, çinko, magnezyum, kalsiyum, klor, fosfor ve karbonat iyonlarından oluşmaktadırlar. Lökositlerin glikoliz metabolizması baskın olarak aerobiktir. Genç lökosit hücrelerinin çekirdeklerinde ve sitoplazmalarında fazla miktarda nükleik asid yer almaktadır. Bu hücreler granülositler, monosit, dentritik hücreler, lemfositler ve N.K ( Natural Killer) hücreleri olarak sınıflandırılmaktadırlar (Platt,1969;Alberts vd., 1989; Pekman vd.,1997; Roit, 1998) (Şekil 2.1).

## Granülositler

Bu hücreler kemik iliğinde olgunlaştıktan sonra kan sıvısına bırakılmaktadırlar. Kanda bulunan granülosit türleri Eozinofil, Nötrofil ve Bazofil adını almaktadırlar. Dokularda yerleşmiş olan granülositlere ise ‘‘Mast Cell’’ denilmektedir. Granülositler çok sayıda lobtan oluşan çekirdeklere sahiptirler. Beyaz hücreler toplamının %65’ini oluşturan granülositler kan sıvısında dolaşmakta, özellikle iltihap meydana geldiğinde dokulara yerleşmektedirler.

Enfeksiyon sırasında , nötrofil granülositlerinde alkali fosfotaz oranı artmaktadır. Nötrofillerdeki asit fosfotaz miktarı lenfositlerdekine oranla on kat daha fazladır.  $\beta$ -glukuronidaz ise nötrofil ve eozinofillerde fazla, lenfositlerde az miktarda yer almaktadır. Nötrofiller kemotaksi ile enfeksiyon bölgesine geçerler. Bu bölgede sayıları artan nötrofiller fagositoz ile bakteri ya da yabancı partikülleri yok etme görevini üstlenirler. Bakterinin öldürülmesinden sonra oluşan artıklar nötrofilin granüllerinde bulunan proteolitik enzimler tarafından parçalanırlar. Lökosit hücreleri kendileri öldüklerinde de, bu hücreleri oluşturan parçacıklar yine fagositoz ile yok edilmektedirler.

Eozinofiller periferal kanda ve allerjik reaksiyondan ileri gelen antijenik yangı bölgesinde fazla oranda bulunmaktadırlar. Bazofiller ise histamin içermektedirler. Bununla ilgili olarak Shelley ve Parnes bazofil sayısının  $50/\text{mm}^3$  değerinin üzerinde olması durumunda kişinin allerjik duyarlılığı olduğunu ,  $50 / \text{mm}^3$ ’ün altında allerjik reaksiyon meydana gelmediğini ileri sürmüşlerdir. Bazofiller ayrıca lipoprotein metabolizmasında ve kanamanın durdurulmasında (hemostasis) önemi olan heparin bulundurmaktadır (Platt,1969;Alberts vd., 1989; Pekman vd.,1997; Roit, 1998).

## **Monositler ve dentritrik hücreler**

Vücutta dolaşan beyaz hücrelerin % 5-10'unu oluşturmaktadırlar. Bu hücreler kısa ömürlüdürler. 24 saat kadar kan sıvısında kaldıktan sonra dokulara geçerler. Burada yapıları farklılaşır ve makrofaj adını alırlar. Bugün makrofajın olgunlaşmış monosit hücrelerinin parçalanması ile oluştuğu konusunda deliller bulunmaktadır.

Akciğerlerde bulunan alveolar makrofajlar, karaciğerde yer alan kupffer hücreleri, böbreklerdeki mesangial hücreler, beyinde mikroglial hücreleri ve kemikte osteoklastlar, ek olarak dalak ve lenf düğümlerinde yer alan diğer makrofajlar olgun monositleri oluşturmaktadırlar. Periferal kanda, lenf düğümlerinde, kemik iliğinde ve dokularda yerleşmiş bulunan dentritrik hücreler immun sistem hücrelerinin küçük bir grubunu meydana getirmektedirler. Bu hücreler kemik iliğinden etrafa yayılmakta ve başlıca lenfositlerin aktivasyonunda görev almaktadırlar (Platt,1969;Alberts vd., 1989; Pekman vd.,1997; Roit, 1998).

## **Lenfositler**

Bu hücreler alyuvarlar, akyuvarlar, trombositler gibi diğer kan hücrelerinin oluştuğu "pluripotent" hemopoietik doku tarafından üretilirler. Hemopoietik doku yetişkinlerde kemik iliğinde, fetusta ise karaciğerde yer almaktadır. Lenfositler B ve T hücreleri olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadırlar. Memelilerde B hücreleri oluştukları hemopoietik dokuda gelişimlerini tamamlamaktadırlar. Kuşlarda ise "hemopoietic stem cell" de meydana gelen B lenfositleri, kan vasıtasıyla "bursa of fabricus" a taşınırlar ve burada olgunlaşırlar. Bütün omurgalılarda hemopoietik

dokuda meydana gelen T hücreleri kan aracılığı ile timusa taşınır ve burada olgun hücrelere dönüşürler. Antijen ile ilk defa karşılaşan virjin B hücreleri, hafıza hücreleri ve antikor üreten plazma hücrelerinin oluşmasını sağlamaktadırlar. Antikorlar zararlı yabancı mikroorganizmaları vücudun savunma sistemine tanıtan, immünoglobülin grubu protein molekülleridir. Günümüzde biyoteknoloji alanında önemli bir yer tutan immünolojik kitlerin hazırlanması da antikor-antijen konjugatlarının oluşmasını esas alınmaktadır. Ek olarak Yoffey ve Rebeck'a göre lenfositler yangı bölgesine göç ederek, burada fagosit hücrelere dönüşmekte ve bakterilerin fagositozu özellikle de ölü hücre parçacıklarının yok edilmesi görevine katılmaktadır.

T lenfositlerinin bir kısmı bağışıklık sistemin vücudu savunmasında yardımcı olmakta ya da baskılanmaktadırlar. Bunlara yardımcı (helper) T hücreleri ve baskılayıcı (suppressör) T hücreleri denir. Bunların dışında kalan, sitotoksik T hücreleri şeklinde adlandırılan grup, virüs ile enfekte olmuş hücrenin yok edilmesi görevini üstlenmektedirler ( Platt,1969; Alberts vd., 1989; Pekman vd.,1997; Roit, 1998).

#### **N. K. hücreleri ( Natural killer cells)**

Bu hücreler virüs ile enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini sindirerek yok etme görevini üstlenmektedirler. N.K. hücrelerinin yüzeyleri kendilerinin tanınmasına da olanak sağlayan özel glikoproteinler bulundurmaktadırlar. Büyük granüller (LGL) olarak adlandırılan hücre grubu da öldürme (N.K.) görevi yapmaktadır ( Pekman ve Vergani, 1997; Roit ,1998).

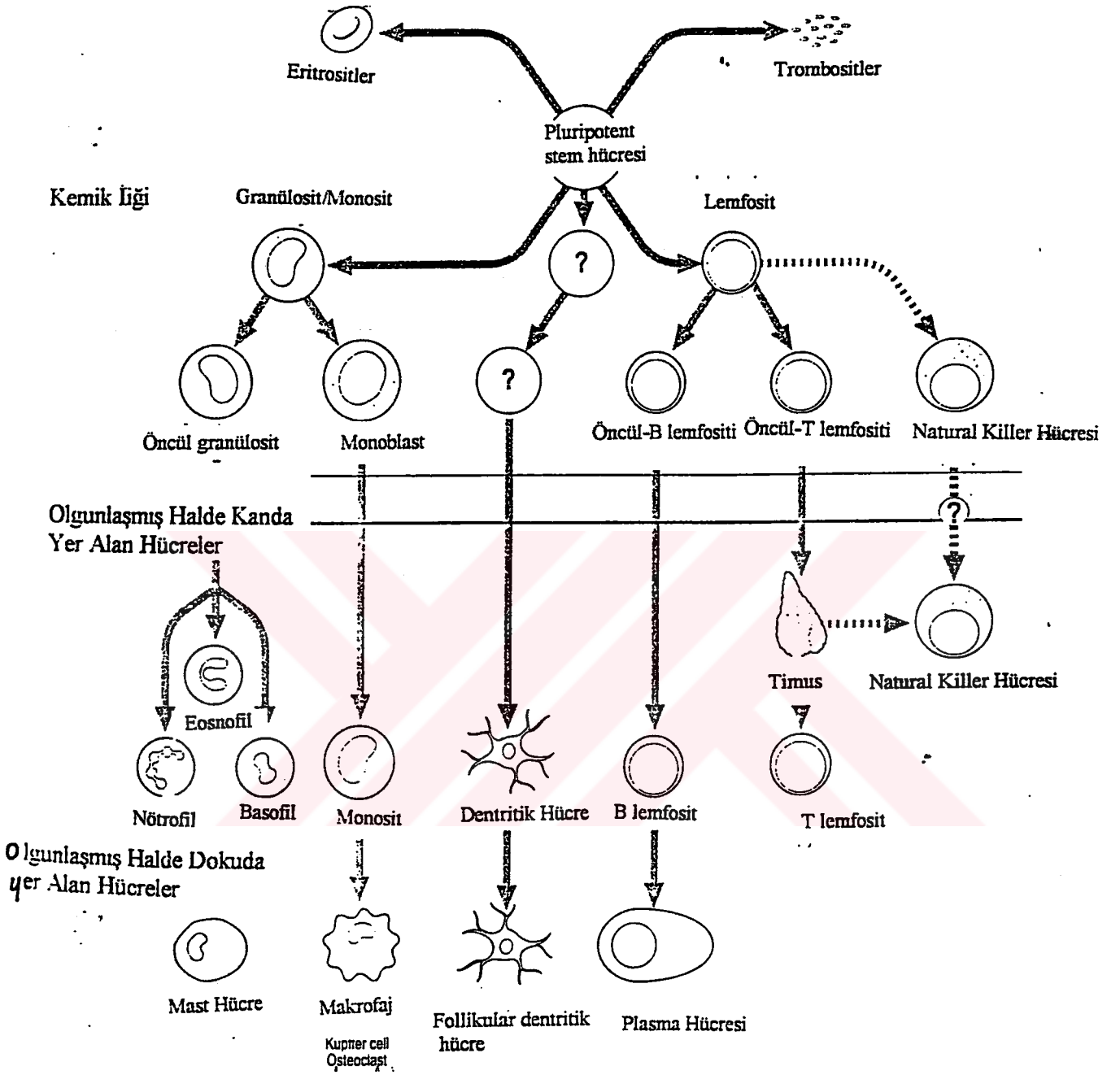


### 2.3. Lemfositlerin Önemi

Vücudumuz, çeşitli enfeksiyöz ve toksik ajanlara karşı savaşılan özel bir sisteme sahiptir. Lökositler vücudun savunma sisteminin hareketli üniteleridir. Akyuvarlar, enflamasyon alanına kemotaksi ile taşınmaktadır. Böylece herhangi bir enfeksiyon ajanına karşı yerinde, hızlı güçlü savunma sağlanmaktadır. Doku zedelenmesi sonucu da , bakteri saldırısında olduğu gibi enflamasyon meydana gelir.

Enflamasyon alanı nötrofil ve makrofajlarla kuşatılır. Böylece dokuları enfeksiyon ve toksik ajanlardan kurtarmak için temizlik fonksiyonu başlar. Farklı hastalıklarda lökositik yanıtın çeşitli şekilleri beklenebilir (Guyton ,1986).





Şekil 2.1 İmmune Sistemin Hücreleri

## **Lökositoz**

Enflamasyon başladıktan bir kaç saat sonra kandaki lökositler 4-5 katına çıkmaktadır.  $1\text{mm}^3$  kanda bulunan lökosit sayısının 10.000 ve üzeri olmasına lökositoz denir. Kanda lökosit hücrelerinden hangisinin çoğalmasıyla lökositoz meydana geldiğinin bilinmesinin önemi vardır (Çizelge 2.1).

Fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki tip lökositoz vardır. Patolojik lökositoz hastalıklar neden olmaktadır. Kanda lökositlerin artışı nadiren bütün türlerin artışı ile birlikte olmaktadır. Oysa lökositoz daha çok lökositlerin bir türünde artış ile birlikte görülmektedir ( İmren, 1985).

## **Nötrofilik Lökositoz**

Nötrofil lökositlerinin artması ise karakteristik bir lökositozdur. Buna üç durum sebep olmaktadır.

- 1- Bakteri enfeksiyonu
- 2- Metabolik hastalıklar ve ilaç zehirlenmeleri
- 3- Doku nekrozları
- 4- Kalpte enfaktüs
- 5- Vücut boşluklarında kanama

**Lemfositoz**

Lemfosit sayısının  $1 \text{ mm}^3$  kanda yeni doğan çocuklarda 9000 'in , büyük çocuklarda 7000'in,yetişkinlerde 4000'in üzerine çıkmasıdır. Genel olarak lenfositoz viral enfeksiyonlar, lenfotik lösemi ve kronik enfeksiyonlara bağlı olarak görülmektedir.

**Lökopeni**

Lökopeni lökosit sayısının  $1 \text{ mm}^3$  kanda 4000 'in altına düşmesidir. Genellikle lökopeni bir tür lökositin azalması ile meydana gelmektedir.

Nötropeni, nötrofil lökositlerinin çocuklarda  $1 \text{ mm}^3$  kanda 1500'in altına yetişkinlerde ise 1800'in altına düşmesidir.

Lenfopeni ise lenfositlerin  $1 \text{ mm}^3$  kanda çocuklarda 1400'ün , yetişkinlerde 1000'in altına düşmesidir.

Eozinopeni, eozinofillerin  $1 \text{ mm}^3$  kanda 200' ün altına düşmesidir. Basofiller küçük konsantrasyonlarda bulunduğundan bunların azalmasını tayin etmek zordur. Bunlar içinde klinik olarak nötropeni daha fazla önem taşımaktadır ( Miale, 1958).

Çizelge 2.1. Kanda Lökosit Tablosu (İmren, 1985)

	YETİŞKİN		ÇOCUK		SÜT ÇOCUĞU	
	% Oran	Hücre Sayısı	%Oran	Hücre Sayısı	% Oran	Hücre Sayısı
1 mm <sup>3</sup> kanda toplam lökosit sayısı		5000-9000		8000-12000		9000-15000
Granülosit	55-60	3000-7000	35-50	3000-6000	35-40	3000-6000
Stab	3-	150-450	0-10	0-1200	0-10	0-1500
Nötrofil	50-70	2500-6300	25-65	2000-7800	25-65	2250-9670
Eozinofil	2-4	100-360	1-5	50-600	1-7	90-1000
Bazofil	0-1	-50	0-1	-140	0-2	-300
Monosit	2-6	100-600	1-6	-1000	7-25	-3000
Lemfosit	20-40	1000-3600	25-50	2000-6000	20-70	1000-1500

## Fagositoz

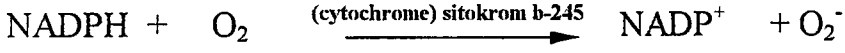
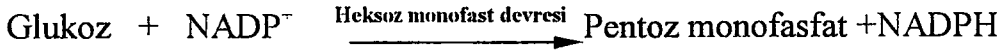
Fagositler tarafından bakterilerin ve nekroz doku parçacıklarının hücre içine alınarak sindirilmesi, parçalanması işlemidir. Fagositozun meydana gelebilmesi için polimorf hücre veya makrofajın zarında mikrobu tanıyan bir mekanizma olmalıdır. Mikrop savunma hücrenin ( polimorf,makrofaj) yüzeyine yapıştığında, hücrenin bu bölgesi aktifleşmektedir. Daha sonra bu bölgeden mikrobun hücre içine alınması sağlanmaktadır. Hücrenin granüllerinde bulunan maddelerin etkisi ile mikrop tümüyle parçalanmakta, sindirilmekte ve daha sonra atıklar dışarı bırakılmaktadırlar.

Fagositoz ile öldürme mekanizması iki türdür.

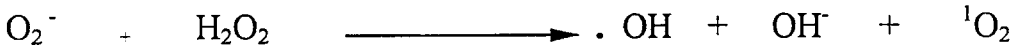
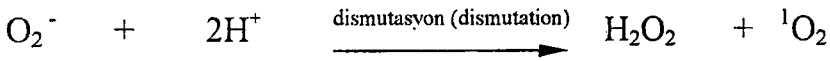
### 1- Oksijen bağımlı mekanizma

Savunma hücrelerinde heksoz monofosfat düzeyi ve buna bağlı olarak NADPH miktarı ani olarak çok yükselmektedir. Bu da plazma membranı "cytochrome" a (cyt b-245) bağlı moleküler oksijeni hızla tüketmektedir. Böylece ani bir oksijen tüketimi gözlenmektedir. Oksijen ; süperoksit anyonuna,  $H_2O_2$  'e, singlet oksijene ve hidroksil radikaline dönüşür ki bunların tamamı güçlü mikrop öldürücülerdir. Peroksid, miyeloperoksidaz ve halojen iyonları, bir halojenlenme sistemi oluşturarak bakteri ve virüslerin ölmesine neden olmaktadır.

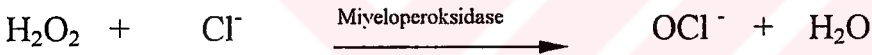
Ani  $O_2$  tüketimi ve aynı anda süperoksit anyonu oluşumu :



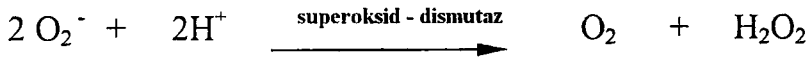
Mikropları parçalayan maddelerin meydana gelmesi



Miyeloperoksidaz vasıtasıyla mikropları parçalayan maddelerin meydana gelmesi



Ek olarak, Host ve bir çok mikrop için ( bunlar tarafından kullanılan) koruma mekanizmasının da bulunmaktadır.



## 2- Oksijen bağımlı olmayan mekanizma

Süperoxid anyonlarının dismütasyonu sırasında  $H^+$  iyonları tüketilmekte ve bunun sonucu pH yavaşça yükselmektedir. Bu ise katyonik proteinlerin fonksiyonunu optimize etmektedir.

Tam olarak karakterize edilmemişse de katyonik proteinlerin ve ayrıca nötral proteinaz (cathepsin G) etkisinin mikrop yüzeyine doğrudan transfer ve mikrop hücre zarını tahrip etme şeklinde olduğu bilinmektedir. Düşük pH'da lizozim ve laktoferin bakteri tahribatında etkilidir. Öldürülen zararlı organizmaların sindirilmesi işleminde ise hidrolitik enzimler görev yapmaktadır (Alberts vd., 1989).



## 2.4. Enzimler

Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Metabolizma olarak adlandırdığımız organizmamızda kimyasal dönüşümlerin tümü enzim adı verilen bu katalizörlerin etkisiyle mümkün olmaktadır. Enzim tarafından dönüşüme uğratılan maddelere substrat denir. Bilinen tüm enzimler kimyasal bakımdan protein veya proteidlerdir. Katalitik aktiviteden, polipeptid zincirinin belirli bölgesinde yer alan aktif merkez sorumludur.

Bir enzimin aktivitesi, enzim ile katalizlenen reaksiyonda ürün oluşum veya substrat tüketim hızı ile ölçülür. Konformasyon değişikliği enzim aktivitesini etkilemektedir. Örneğin denatürasyonda amino asit dizisinin aynı kalmasına karşın konformasyon bozulduğundan enzimin katalizör etkisi kaybolmaktadır.

Enzim aktivite birimi " katal" dır.

1 katal ( 1 kat), belirli koşullarda 1 saniyede 1 mol substratın dönüşümüne sebep olan enzim miktarına denir. Pratikte bu birim çok büyük olduğundan, mikrokatal ( $\mu$ kat) veya nanokatal (nkat) kullanılır.

En çok kullanılan birim ise İnternasyonal Ünite (IU) veya Enzim Ünitesidir. Bir ünite, 100 mol sustratı 1 dakikada dönüşüme uğratan enzim miktar olarak tanımlanır.

Bazı enzimlerin katalitik etki gösterebilmeleri için proteinden başka metal iyonuna veya protein olmayan organik bir bileşiğe, bazılarında ise her ikisine ihtiyaç vardır. Bu iyon veya organik bileşiğe kofaktör denir. Organik bileşik enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmişse ve dissosiyeye olmuyorsa prostetik grup, sıkı birleşmemiş ve dissosiyeye oluyorsa koenzim adını alır. Bir enzimin aktif olmayan protein kısmına apoenzim denir. Kofaktörü içeren aktif enzime holoenzim denir.

Uluslararası Biokimya Birliđi Enzim Komisyonu enzimleri katalizledikleri reaksiyon türünün sonuna ‘‘az’’ eki getirerek adlandırılıp sınıflandırılmıştır.

1- Oksidoredüktazlar

2- Transferazlar

3- Hidrolazlar

4- Liyazlar

5- İzomerazlar

6- Ligazlar

Bu komisyon enzimleri, birbirinden nokta ile ayrılan dört sayı ile numaralandırılmıştır.

_____ .	_____ .	_____ .	_____ .
Enzim Sınıfı	Enzim Alt Sınıfı	Enzim Alt Alt Sınıfı	Özel ad

### 3. MATERYEL VE YÖNTEM

#### 3.1 Mikroskop Yöntemi ile Lemfosit Sayısı Tayini

Oldukça eski olan bu zahmetli yöntem laboratuvarlarda halen kullanılmaktadır. Bu yöntemde kan veya idrar örneklerinde sayımı yapılacak hücrelerin belirli işlemlerle diğer hücrelerden ayrılması gereklidir (Platt, 1969).

##### 3.1.1 Mikroskop ile Lemfosit Sayısı Tayininde Örnek Alımı ve Hazırlaması

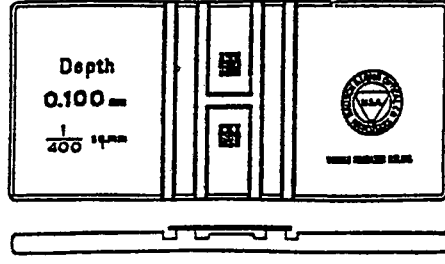
Heparinli tüpe hastadan yaklaşık 5 ml kan alınır. Diğer bir tüpe 1 ml Lymphoprep™ (Nycomed Pharma A.Ş.) pipetlenir ve 3 ml kan tüpün kenarından sızdırılarak, tabaka oluşturacak şekilde eklenir. Bu tüp 1800 rpm'de 25 dakika santrifüjlenir. İşlem tamamlandığında tüpte üstten alta doğru sırayla plazma, bafigot, Lymphoprep™ ve pellet tabakaları oluşmaktadır. Pastör pipet ile bafigot denilen buğulu tabaka ve Lymphoprep™ tabakası bir tüpe alınır. Bu alınan örneğe yıkama amacıyla uygun miktar PBS tamponu eklendi ve 1800 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir. Belirtilen

### 3.1.2. Mikroskop ile Lemfosit Sayısı Tayini

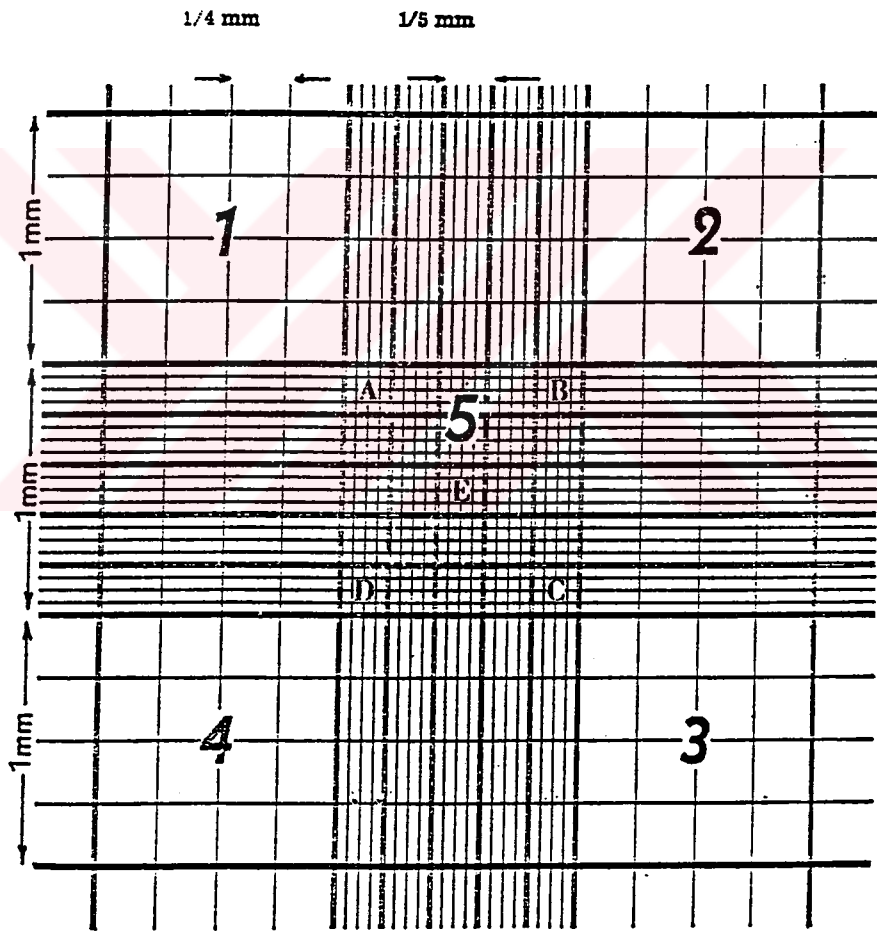
Bu yöntemde çeşitli sayma kameralarından yararlanılmaktadır. Bunlardan biri olan Neubauer sayma kamerası ( Şekil 3.1) birbirini dik açı ile kesen çizgilerin meydana getirdiği bölümleri içeren bir camdan oluşmaktadır.

İşlemden önce hazırlanan örneklerden pipetle alınarak, bir yüzeyini sayım kamerasının oluşturduğu hücre tümüyle doldurulmaktadır. Lemfosit hücreleri Şekil 3.2’de verilen 5 no’lu alandaki A, B, C, D, E büyük karelerinde sayılmakta ve elde edilen değer 10.000 ile çarpılarak sayı/ml cinsinden sonuç elde edilmektedir.

Uygulanan yöntemin hata oranı yüksektir. Ard arda yapılan sayımlarda farklı sonuçlar elde edilmektedir. Lemfosit sayısı çok düşük ya da çok yüksek olan örneklerde hata oranı daha da artmaktadır (İmren,1985)



Şekil 3.1 Neubauer sayma kamerası



Şekil 3.2 Sayma alanı

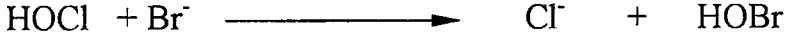
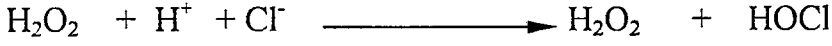
### 3.2 Elektronik Hücre Sayıcı ile Lemfosit Sayısı Tayini

Çok sayıda örnek ile çalışan klinik laboratuvarlarında genellikle bu yöntem kullanılmaktadır. Yöntem toplam lökosit sayısının otomatik olarak hızlı tayinine olanak tanımaktadır. Ayrıca çeşitli beyaz kan hücresi türlerinin sayımı ve oranlarının hesaplanması da, farklı özellikte maddeler içeren çözeltilerin kullanılması ile mümkün olmaktadır. Ek olarak farklı hücre türleri sayımında, bunların farklı boyutta olması gibi özelliklerinden yararlanılmaktadır ( Biobak cihaz kataloğu, 1995, Platt 1969).

### 3.3 Enzimatik Yöntemle Lökosit Sayısı Tayini

Lökositler, peroksidaz, esteraz v.b. enzim içerikleri dikkate alınarak miktarca belirlenebilmektedir. Bu yöntemlerde hücre parçalanması gerçekleştirildikten sonra uygun substratın ortama eklenmesi ile reaksiyon gerçekleşmektedir. Oluşan ürün spektrofotometrik ölçümlere olanak sağlamaktadır. Sonuç olarak elde edilen spektrumların uygun noktalarında yapılan absorbans ölçümlerini kullanarak kalibrasyon eğrileri çizilmektedir. Spektrofotometrik ölçümleri esas alan bu uygulamalar pratiktir, kolaydır ve duyarlıdır (Beno ve Mathews, 1993; Thomas vd., 1995; Xia ve Zweir, 1997).

Beyaz kan hücrelerinin içerdiği enzimler dikkate alınarak, çeşitli biyolojik sıvılarda ya da doku örneklerinde bu hücrelerin miktar tayini için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu hücrelerde bulunan, mikro organizmaların öldürülmesinde ve virüslerin aktivitesinin yok edilmesinde etkili olan miyeloperoksidaz ve eozinofilperoksidaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vasıtasıyla halojen iyonlarının oksidasyonunu katalizlemektedir.



Miyeloperoksidaz ve eozinofil peroksidaz enzimlerinin  $\text{H}_2\text{O}_2$  vasıtasıyla  $\text{Br}^-$  iyonlarının oksidasyonunu katalizlemesi sonucu, bileşiklerde bulunan amino gruplarının bromlanmasıyla bromaminler oluşmaktadır. Bromaminler kovalent azot-brom bağı bulunduran uzun ömürlü yükseltgen maddelerdir.

“EC 1.11.1.7” enzim numarası ile peroksidaz enzimlerinin bazı substratlar ile verdiği reaksiyon ürünlerinin absorpsiyon spektrumları, miktar tayinine uygun pikler vermektedirler. Konu edilen pikler dikkate alınarak ve reaksiyon koşulları optimize edilerek, beyaz kan hücreleri için, incelenenlerden başka örnekler için tayin yöntemi geliştirilmesi düşünülebilir.

Yapılan çalışmalarda ikinci grup olarak esteraz enzimleri dikkate alınmıştır. Uygun substratlar seçilerek reaksiyon ürünleri ve spektrofotometrik özellikleri incelenmiştir (Junger vd.,1993;Kettele vd.,1995 ; Thomas vd., 1995 ; Schneid vd.,1996; Xia vd.,1997 ; Johnson vd: 1997;Toda vd., US Pat No:5250437; Meiatini, US Pat No: 5128265; Noffsiger, US Pat No:5663044).

## 4. DENEYSEL ÇALIŞMA

### 4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Lizin ve BSA Sigma, Trinitrobenzen sülfonik asid , o-dianisidin ve Triton-x 100 Fulka firmasından sağlandı. Tampon hazırlamada kullanılan sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, hidroklorik asid ve ek olarak sodyum dodesil sülfat Merk firmasından satın alındı. Biüret reaktifi hazırlamasında kullanılan bakır sülfat, sodyum potasyum tartarat, sodyum karbonat ve sodyum hidroksit Merk firmasından sağlandı. Hücre parçalanma işlemi ve trinitrobenzen sülfonik asidin hücre içeriği ile reaksiyonu ‘‘Clifton’’ Marka su banyosunda gerçekleştirildi. Absorbsiyon değerleri ‘‘Unicam UV/Visible’’ spektrofotometrede ölçüldü.

### 4.2 Örnek Alınması ve Hazırlanması

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde bulunan İmmünoloji laboratuvarından yaklaşık 5 ml olarak alınan kan örneklerinde ‘‘dansite gradient yöntemi’’ ile lenfositlerin ayrılması işlemi yapıldı. Hazırlanan lenfosit örnekleri fakültemiz laboratuvarında daha önce açıklanmış olan spektrofotometrik yöntemle lenfosit sayısı belirleme çalışmasında kullanıldı.



### 4.3 Hücree Parçalanması

Lemfositler bazik çözeltilerde kolayca parçalanmaktadırlar ( Meiattini, 1992). Bu özelliğinden yararlanarak bazik pH'daki karbonat tamponunda lemfositler parçalandı. Ancak sıcaklığın artırılmasının (42<sup>0</sup>C ) işlemi hızlandıracağı düşünöldü. Spektrofotometrik yöntem geliştirme çalışmalarına başlamadan önce, lemfositlerin parçalanmasına sürenin ve ortamın pH değerinin etkisi de incelendi.

1- Bazik ortamda 42<sup>0</sup>C'da hücre parçalama işlemine zamanın etkisi:

50µl örnek üzerine 1 ml karbonat tamponu (pH=9.5) ilave edilerek 42<sup>0</sup>C'da 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika bekletildi. Farklı bekletme süreleri sona erdiğinde hücre içeriğinin absorpsiyon spektrumu alındı ve elde edilen tek pikin 237 nm'deki maksimum noktasında absorpsiyon değeri ölçöldü. Bu pH değeri için 30 dakika parçalanma süresinin uygun olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. pH: 9.5'da Hücre Parçalanması İşleminin Zamana Bağlı Olarak İzlenmesi

ZAMAN (dakika)	ABSORBSİYON (237 nm)
5	0.517
10	0.524
15	0.509
20	0.538
25	0.547
30	0.549

2- Bazik ortamda, oda sıcaklığında hücre parçalama işlemine çözelti pH değeri değişmesinin etkisi

Hazırlanan lemfosit örneğinden kristal küvete 50 µl alındı. Bunun üzerine pH değeri 10, 10.5 ve 11 olan karbonat tamponlarından 1 ml konuldu. 90 dakika süreyle 10 dakikada bir absorban ölçüldü. Çözeltinin pH değerinin artmasının parçalanmayı hızlandırdığı gözlemlendi. Ancak uygulanacak TNBS yöntemi için tercih edildiğinden çalışmalara pH 9.5 tamponu ile devam edildi (Çizelge 4.2)

Çizelge 4.2. Hücre Parçalanması İşleminin Oda Sıcaklığında Ortamın pH Değerine Bağlı Olarak İzlenmesi

ZAMAN (dakika)	ABS pH:10	ABS pH:10.5	ABS pH:11
10	1.469	1.465	1.476
20	1.433	1.410	1.480
30	1.474	1.434	1.518
40	1.470	1.468	1.501
50	1.453	1.452	1.519
60	1.481	1.432	1.496
70	1.481	1.463	1.471
80	1.482	1.435	1.486
90	1.447	1.450	1.415

#### 4.4 Trinitrobenzen Sülfonik Asid (TNBS) Yöntemi

Trinitrobenzen sülfonik asid (TNBS) bazik ortamda proteinlerde bulunan primer amino grupları ile reaksiyon vermekte, sonuçta kovalent bağ oluşumu ile bu maddelerin trinitrobenzen (TNPS) türevleri elde edilmektedir (Şekil 4.1.). Bu reaksiyon ortamın sıcaklık ve PH değerlerinden etkilenmektedir. Reaksiyon ürünü olan protein-trinitrobenzen türevleri 350 nm ve 420 nm'de maksimum absorpsiyon veren iki pik (Şekil 4.2) içeren absorpsiyon spektrumu vermektedir ( Habeeb,1966; Sashidhar vd., 1994).

DETAM'da kan örneklerinden ayrılan lemfositlerin 5 ml'ye tamamlanmasıyla elde edilen çalışma örneğinden 25 µl ile 900µl arasında belirli miktarlar alınarak çalışma tüplerine konuldu ve üzerlerine 1 ml karbonat tamponu (pH=9.5) ilave edildi. Vortex kullanarak örneklerde karışma sağlandı ve çalışma tüplerinin tamamı 42°C'da bulunan su banyosunda yarım saat bekletildi. Isıtma sona erdiğinde tüplere taze hazırlanmış 10 mM 500µl Trinitrobenzen sülfonik asid çözeltisi eklendi ve tekrar vortex kullanarak karışma sağlandı. TNBS'in lemfosit hücreleri içeriği ile reaksiyonunun tamamlanması için hazırlanan örnekleri bulunduran tüpler aynı su banyosunda 42°C'da 2 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda tüplere 500µl 1 N HCL ve sonra 1 ml % 10 SDS eklendi ve çözelti spektrofotometrede incelendi.

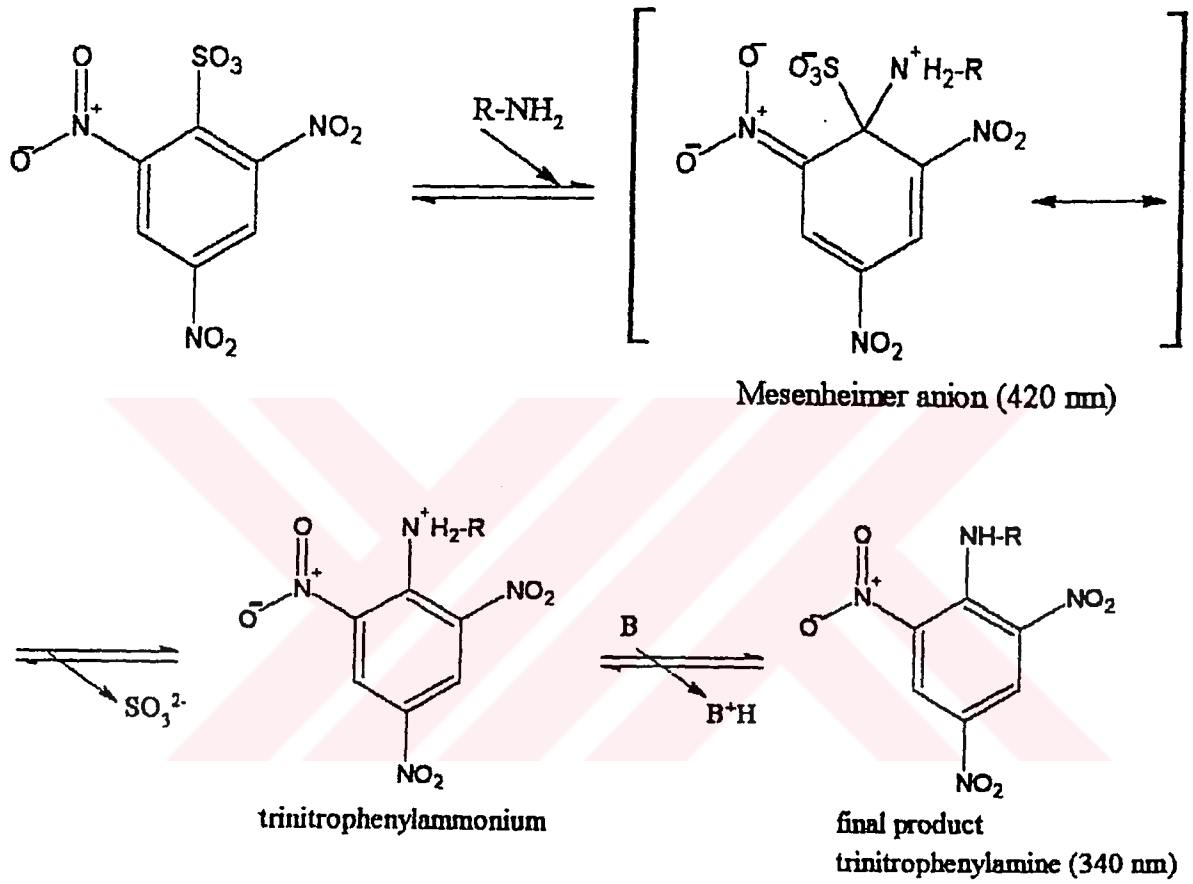
Spektrofotometrede 350 nm ve 420 nm'de okunan absorbans değerlerinden yararlanarak kalibrasyon eğrisi çizildi .

350nm'de ölçülen absorbans değerlerinin kullanılması ile elde edilen eğrinin denklemi :

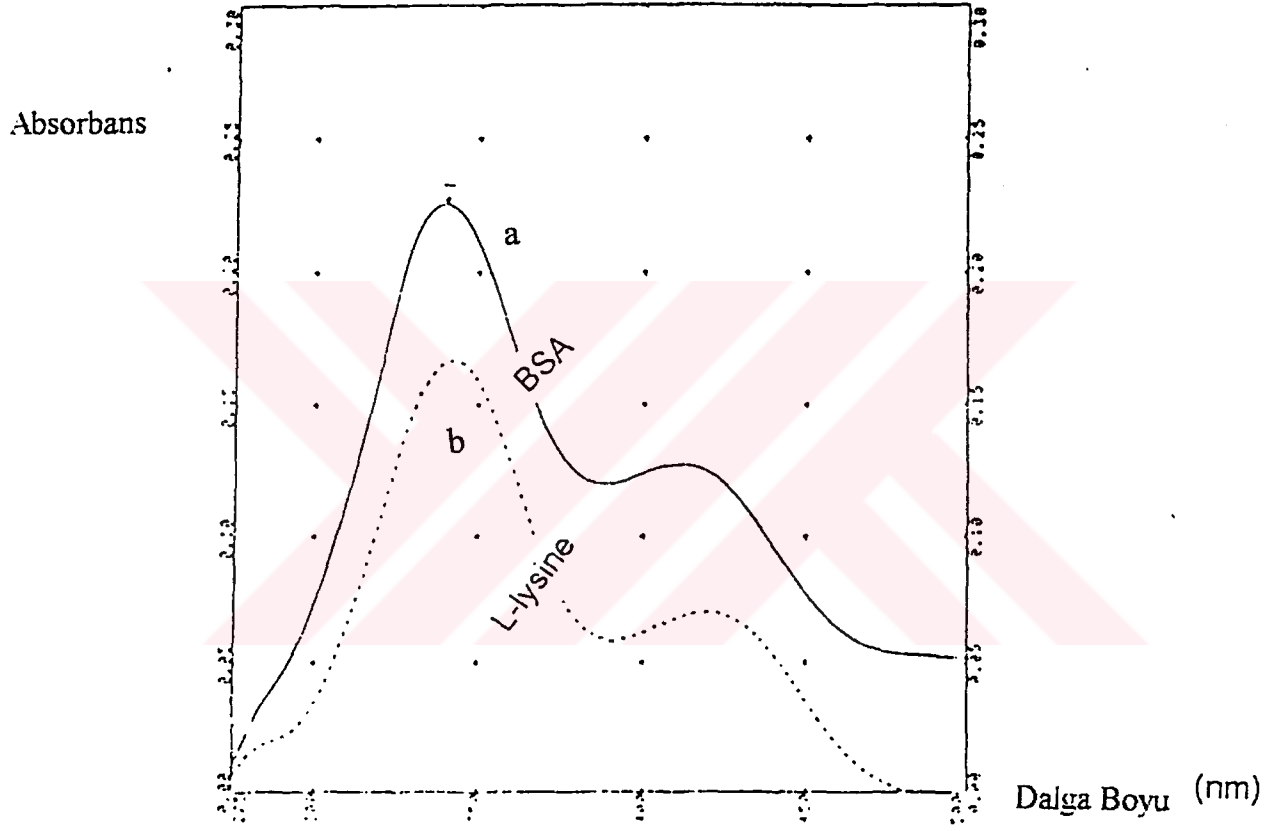
$y = 0.0010265 x + 0.659151$  ve  $r = 0.970$  elde edildi (Şekil 4.3). Uygulanan yöntemin standart sapması  $s = 713$  ( $n = 12$ ) olarak hesaplandı.

420 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin kullanılması ile elde edilen eğrinin denklemi :

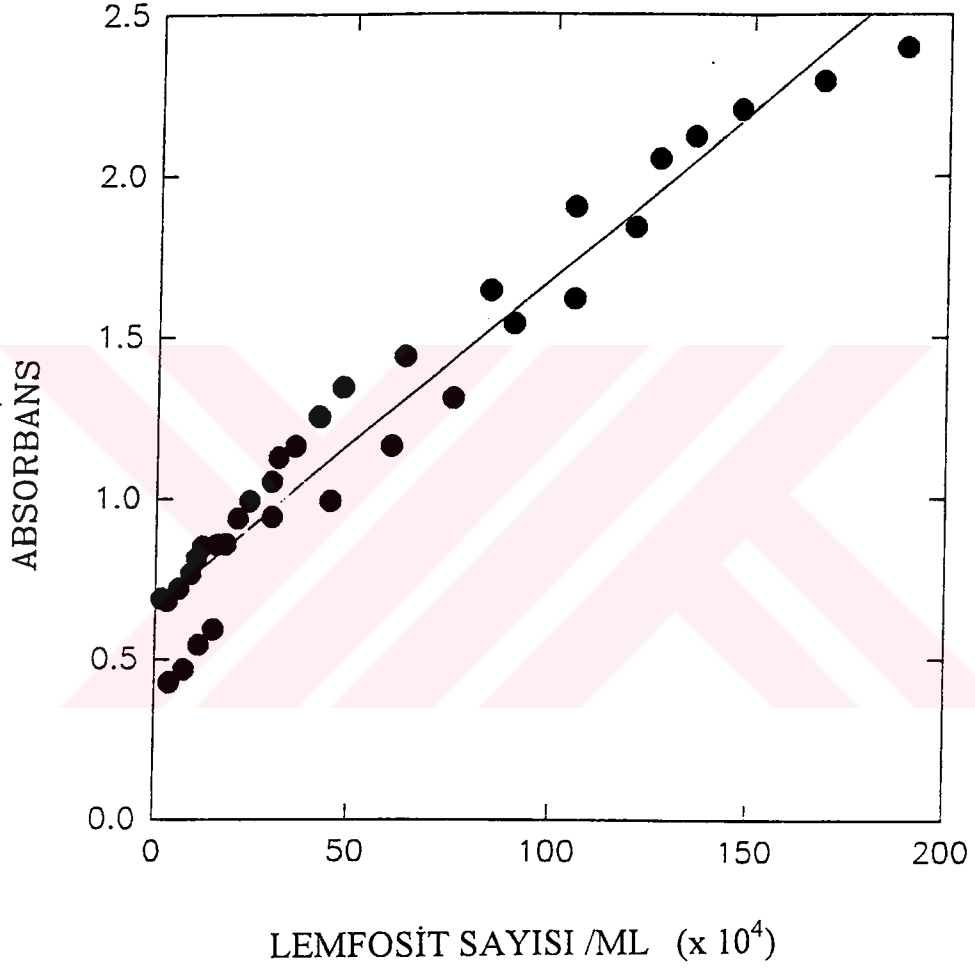
$y = 0.005374 x + 0.27698$  ve  $R = 0.974$  elde edildi (Şekil 4.4). Uygulanan yöntemin standart sapması  $s = 37.2$  ( $n = 12$ ) olarak hesaplandı.



Şekil 4.1 Proteinlerin primer amino grupları ile TNBS'in reaksiyonu

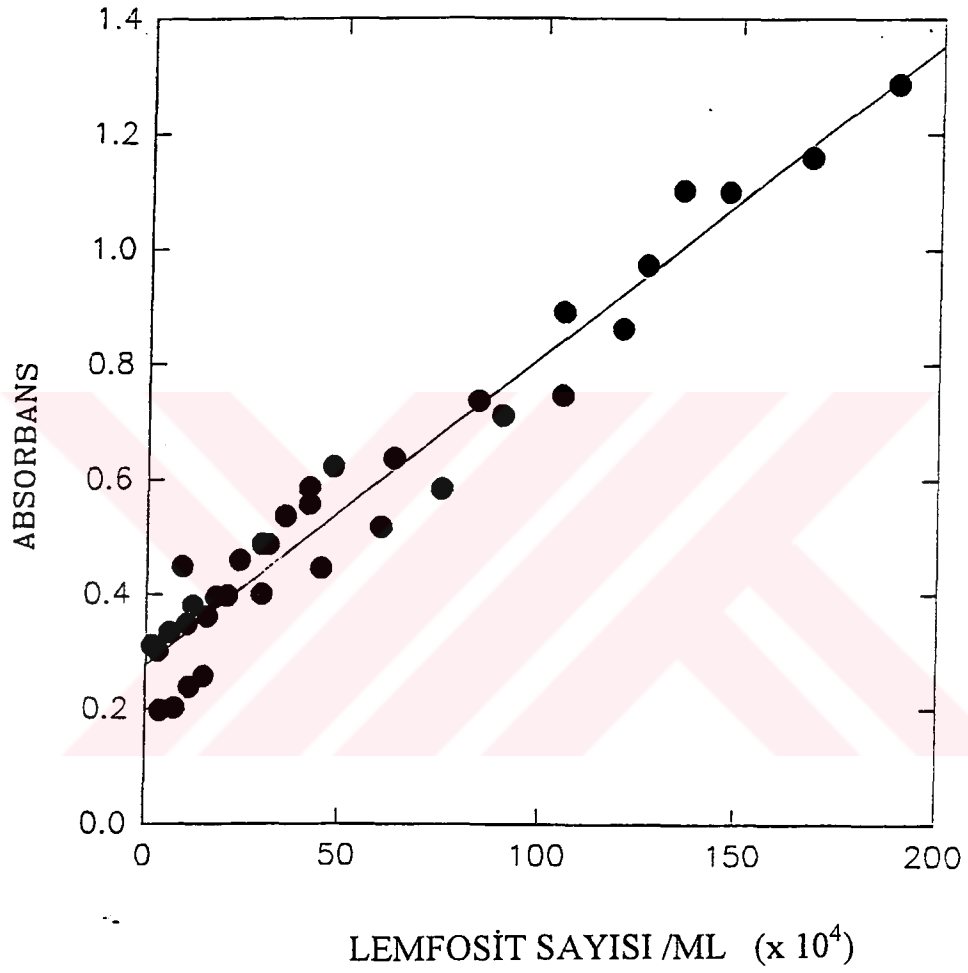


Şekil 4.2 BSA(a) ve L-Lizinin (b) ,TNBS ile verdiği reaksiyon ürünlerinin absorpsiyon spektrumları



**Şekil 4.3 TNBS yöntemi ile 350nm'de okunan absorpsans değerleri elde edilen kalibrasyon eğrisi**





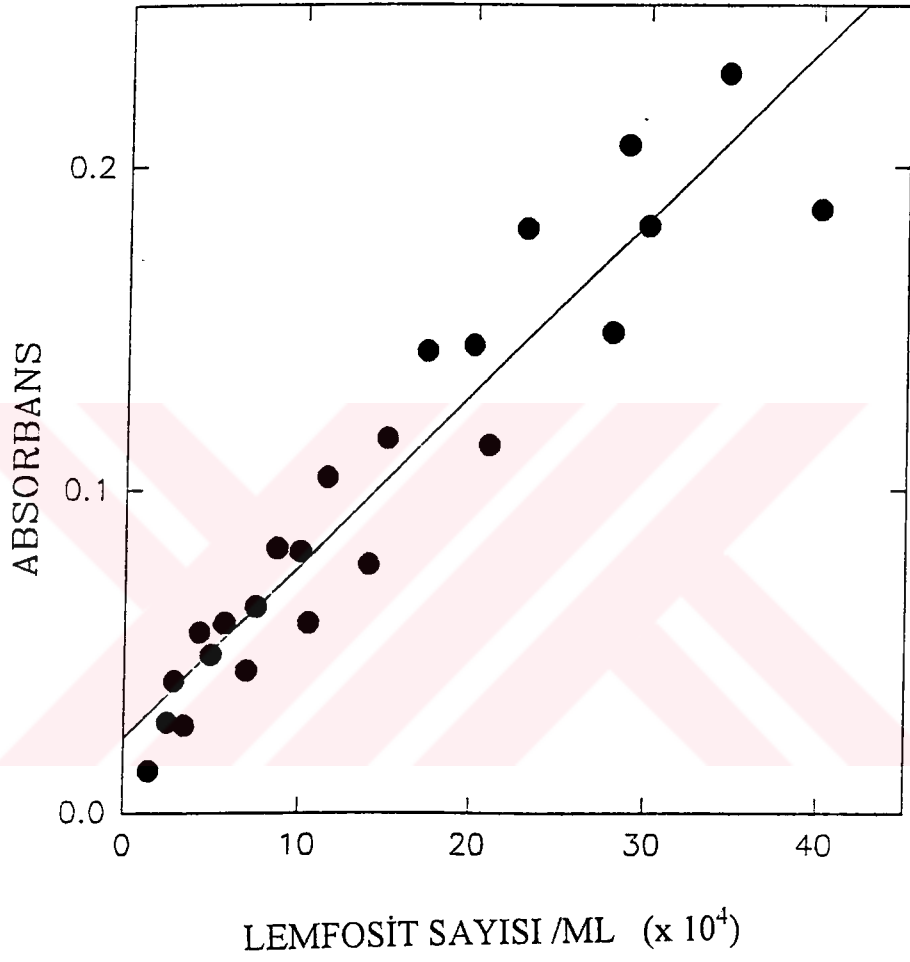
Şekil 4.4 TNBS yöntemi ile 420 nm'de okunan absorbans değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

#### 4.5 Lowry Yöntemi

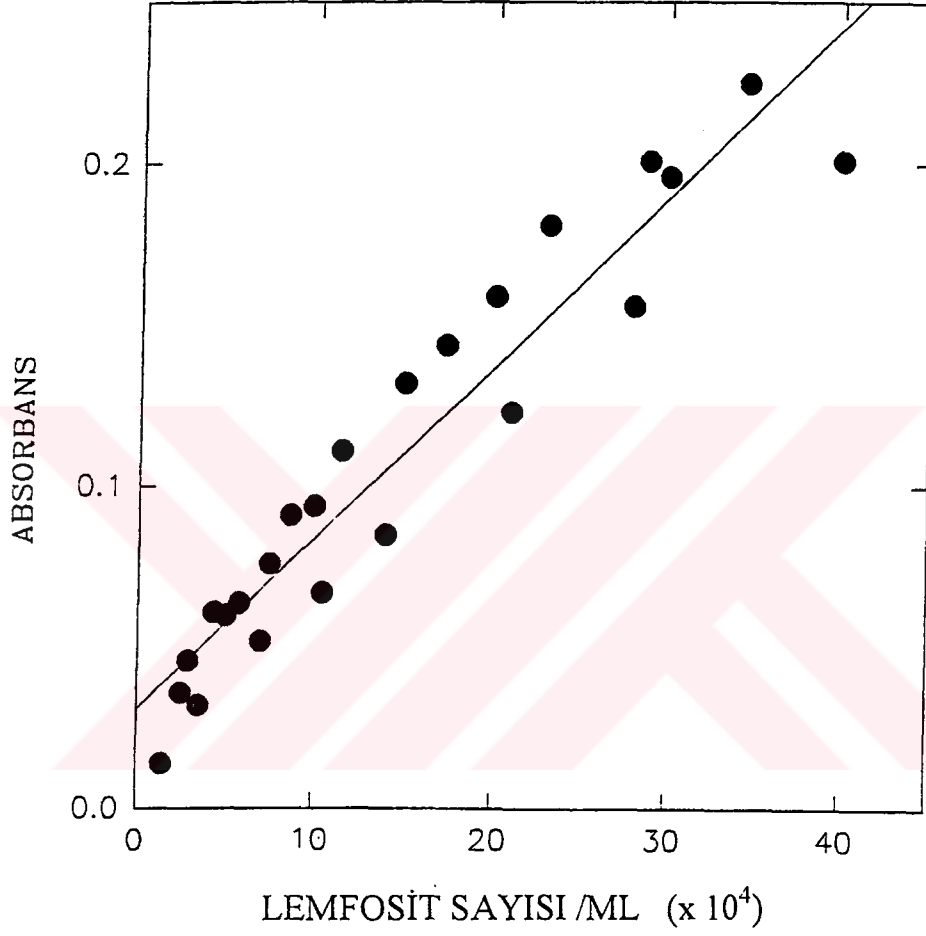
DETAM'da hazırlanan lemfosit örneklerinden 25 µl ile 900 µl arasında belirli miktarlar alınarak çalışma tüplerine konuldu. TNBS yönteminde açıklandığı şekilde 1 ml karbonat tamponu (pH=9.5) eklendikten sonra hücre parçalanması gerçekleştirildi. Bu tüplere 200µl taze hazırlanmış biüret reaktifi eklendi Biüret reaktifi, 0.1 N sodyum hidroksitde hazırlanmış %2 sodyum karbonat 'dan 100 ml , %1 bakır sülfat çözeltisinden 1 ml, %2 sodyum karbonat çözeltisinden 1ml alınarak hazırlandı. Çalışma tüpleri karanlıkta 10 dakika bekletildikten sonra 10µl 1 N Folin çözeltisi katıldı. Tüpler 30 dakika yine karanlıkta tekrar bekletildi. Tüplerde bulunan reaksiyon içeriği 2.5 ml'ye tamamlandıktan sonra spektrofotometrede 630 nm ve 750 nm'de absorbans değerleri okundu ( Lowry vb., 1951; Held ve Absher, 1994). Bu absorbans değerleri ile Şekil 4.5 ve 4.6'da verilen kalibrasyon eğrileri elde edildi. 630 nm'de okunan absorpsiyon değerleri ile  $y=0.00532733 x +0.0233543$   $r=0.945$  ve  $s=17.24$  (n=12) bulundu.

750 nm'de okunan absorsiyon değerleri ile  $y= 0.00528721 x +0.0310264$   $r=0.9528$  ve  $s=13.5$  (n=12) olarak hesaplandı.

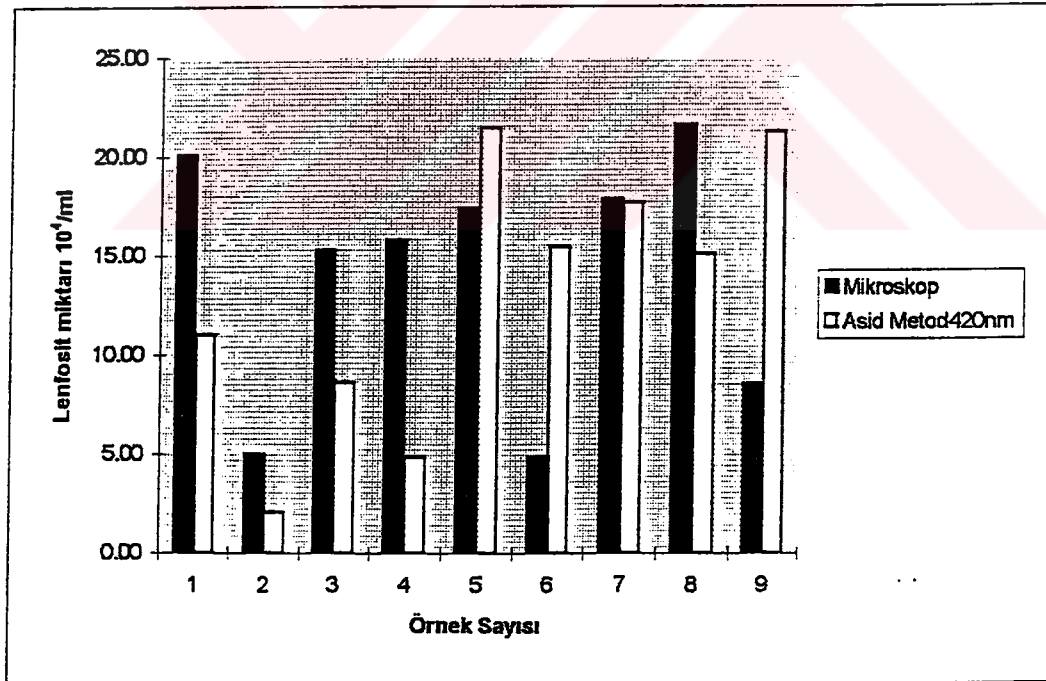
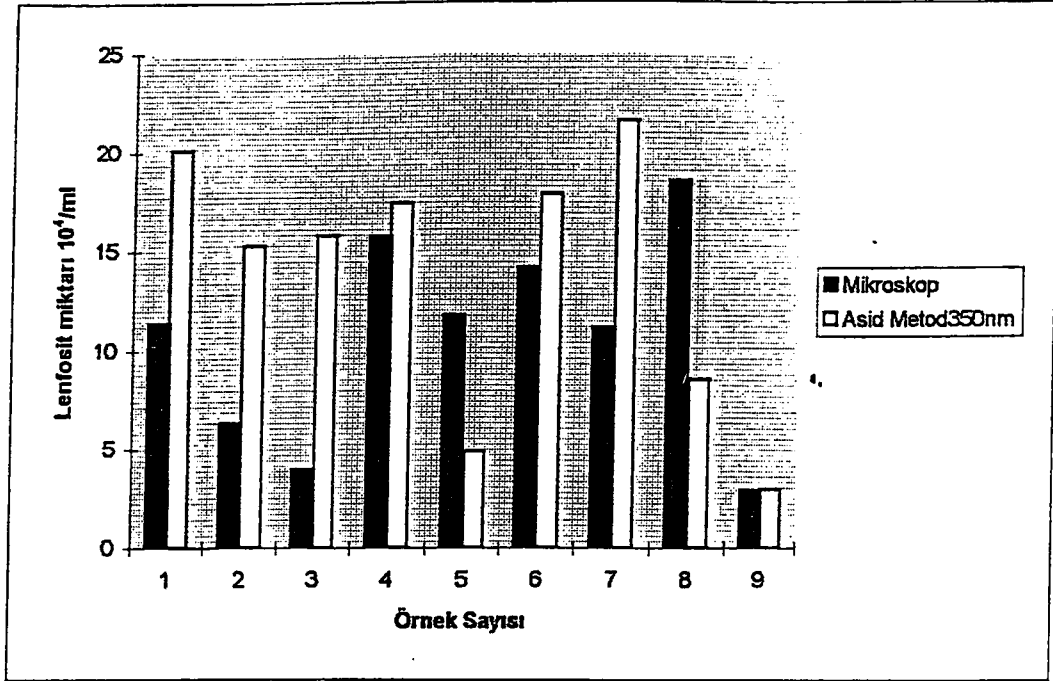
Ek olarak, çeşitli hastalardan alınan kan örneklerinde mikroskop kullanarak, TNBS ve Lowry yöntemleri ile lemfosit sayıları tayin edildi. Bu deneysel bulgular grafiksel değerlendirmelerden yararlanarak birbiriyle kıyaslandı (Şekil 4.7, 4.8).



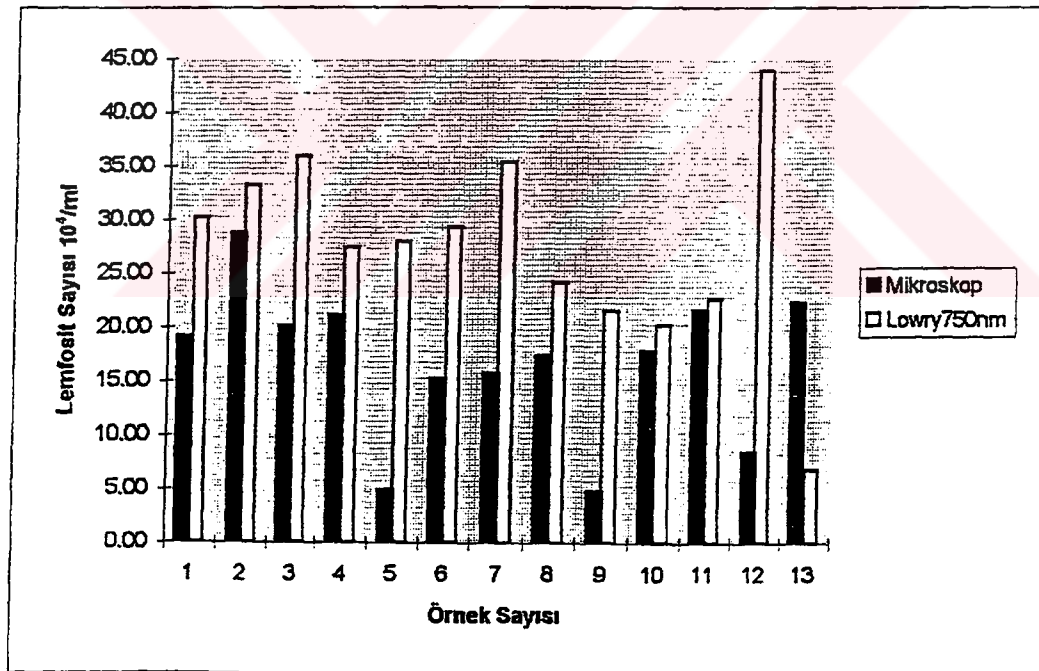
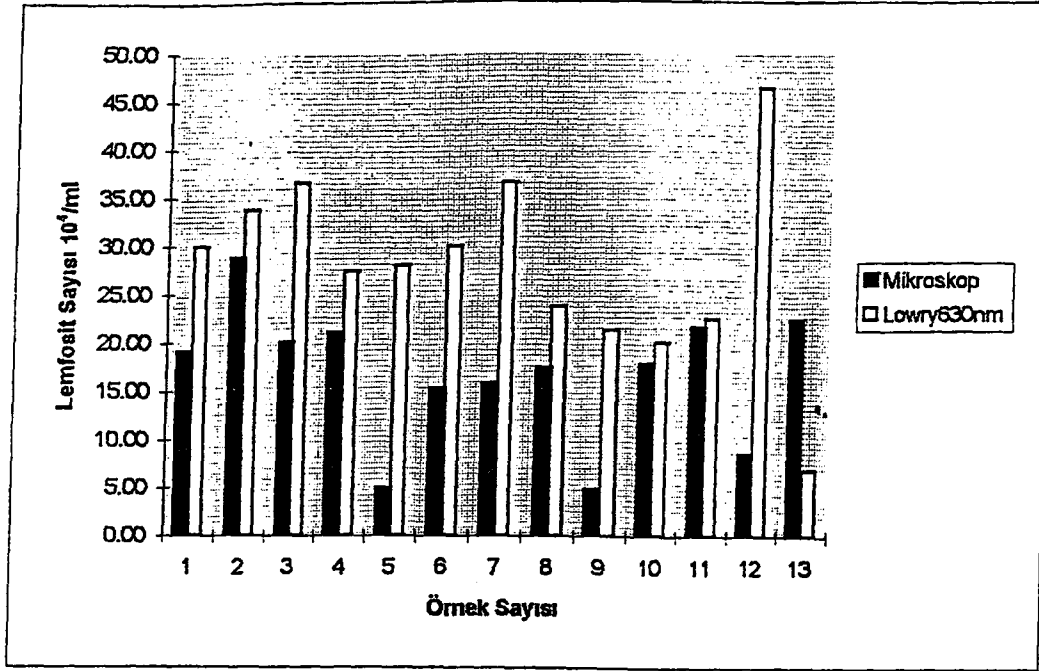
**Şekil 4.5** Lowry yöntemi ile 630 nm'de okunan absorbans değerleri elde edilen kalibrasyon eğrisi



**Şekil 4.6 Lowry yöntemi 750 nm'de okunan absorbans değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi**



Şekil 4.7 TNBS ve mikroskop ile sayım sonuçlarının kıyaslanması



Şekil 4.8 Lowry ve Mikroskop ile sayım sonuçlarının kıyaslanması

## 4.6. Enzimatik Yöntem

### 4.6.1. Kan örneklerinin alınması ve lökosit hücrelerinin ayrılması

Çapa Merkez Biokimya Hematoloji bölümünden alınan kan örneklerindeki lökosit hücreleri amonyum klorür lizis yöntemi ile ayrıldı.

#### 4.6.1.1. Amonyum klorür lizis çözeltisinin hazırlanması ve hücre parçalanması

Bir litresinde 150 milimol  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 milimol  $\text{NaHCO}_3$ , 10 milimol EDTA bulunduran çözeltiden 100 ml hazırlandı ve 0.1 N NaOH ya da 0.1 N HCL ile pH değeri 7.2-7.3 olacak şekilde ayarlandı. Amonyum klorür lizis çözeltisi olarak adlandırılan bu çözelti her hafta yeniden hazırlanıp kullanıldı.

Ayırma işlemi 5ml'lik polistiren tüplerde yapıldı. Bu tüplere 100 $\mu\text{l}$  kan pipetlendi. Üzerine 2 ml amonyum klorür lizis çözeltisinden ilave edilerek vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. " MSE Mistral 2000" Model santüfujde 350 g 'de 5 dakika santüfujlenerek lökosit hücrelerinin çökmesi sağlandı. Santüfujden alınan tüp içeriği dikkatlice lavaboya boşaltıldı. Tüp cidarında toplanan, hücre içermediği düşünülen sıvı kısım süzgeç kağıdına, tüp ters çevrilmeden emdirildi. Aynı tüpe yıkama amaçlı 2 ml PBS ( Fosfat-tuz tamponu 10 mM pH= 7.3-7.4) ilave edildi ve iyice vortekslenerek yine aynı santüfujde 350 g'de 5 dakika santüfujlendi. Tüp içeriği lavabaya dikkatlice boşaltıldı. Tüp cidarında toplanan kısım yine süzgeç kağıdına tüp ters çevrilmeden emdirildi. Üzerine 950 $\mu\text{l}$  PBS ilave edilerek vortekslendi.

Hazırlanan lökosit süspansiyonu denemelerde kullanıldı (Carter vd., 1992).

#### 4.6.2 Enzimatik yöntemde hücre parçalama işlemi

Lökosit süspansiyonunda deneyler için alınan örnekler Triton x-100 ( % 0.2 v/v ) ile parçalamaya tabi tutuldu. Alınan örneklere Triton x-100 çözeltisinden 50µl ilave edilerek 5 dakika beklendi. Bu işlem sonunda tümüyle berrak çözeltiler elde edildi.

#### 4.6.3 Peroksidaz enzimlerinin o-dianisidin ile etkileşimi

##### 4.6.3.1 o-dianisidin reaktifi hazırlanması

Stok Çözelti: 0.1284 g o-dianisidin tartılıp 15 ml suya ilave edildi. Damla damla derişik HCL ilave edilerek o-dianisidinin çözünmesi sağlandı. Daha sonra çözelti 20 ml'ye tamamlandı. Bu stok çözelti 0.53 mM o-dianisidin bulundurmaktadır.

Ek olarak, 98 ml 50mM fosfat tamponuna ( pH:6 ) o-dianisidin stok çözeltisinden 2 ml. %30 'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · den 1.7 µl ilave edilerek o-dianisidin çalışma çözeltisi hazırlandı.

##### 4.6.3.2 Enzimatik yöntemin uygulanması

Lökosit süspansiyonundan alınan belli hacimdeki örnek yukarıda açıklanan hücre parçalanma işlemine tabi tutuldu. Bu işlem sona erdiğinde 50mM ml fosfat tamponundan eklenerek reaksiyon başlatıldı. 10 dakika sonra 150 µl 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Çözelti hacminin toplamı 3 ml olarak alındı.



Çalışmadaki amaca uygun olarak peroksidaz enzimi ile o-dianisidin sulu çözeltideki reaksiyonu sonunda oluşan ürünün spektrofotometrik özellikleri "Philips PU 8740 UV/Visible" spektrometrede incelendi. Bu maksatla öncelikle o-dianisidinin, deney koşullarına uygun olarak  $H_2O_2$  içeren durumda ve  $H_2O_2$  katılmadan suya karşı spektrumları alındı. Bu iki spektrumun tümüyle çakıştığı görüldü (Şekil 4.9). Ön bilgi olarak Triton x-100 ve bu madde ile parçalama sonuncu elde edilen hücre içeriğinin tampona karşı spektrumları da alındı (Şekil 4.10 ve 4.11).

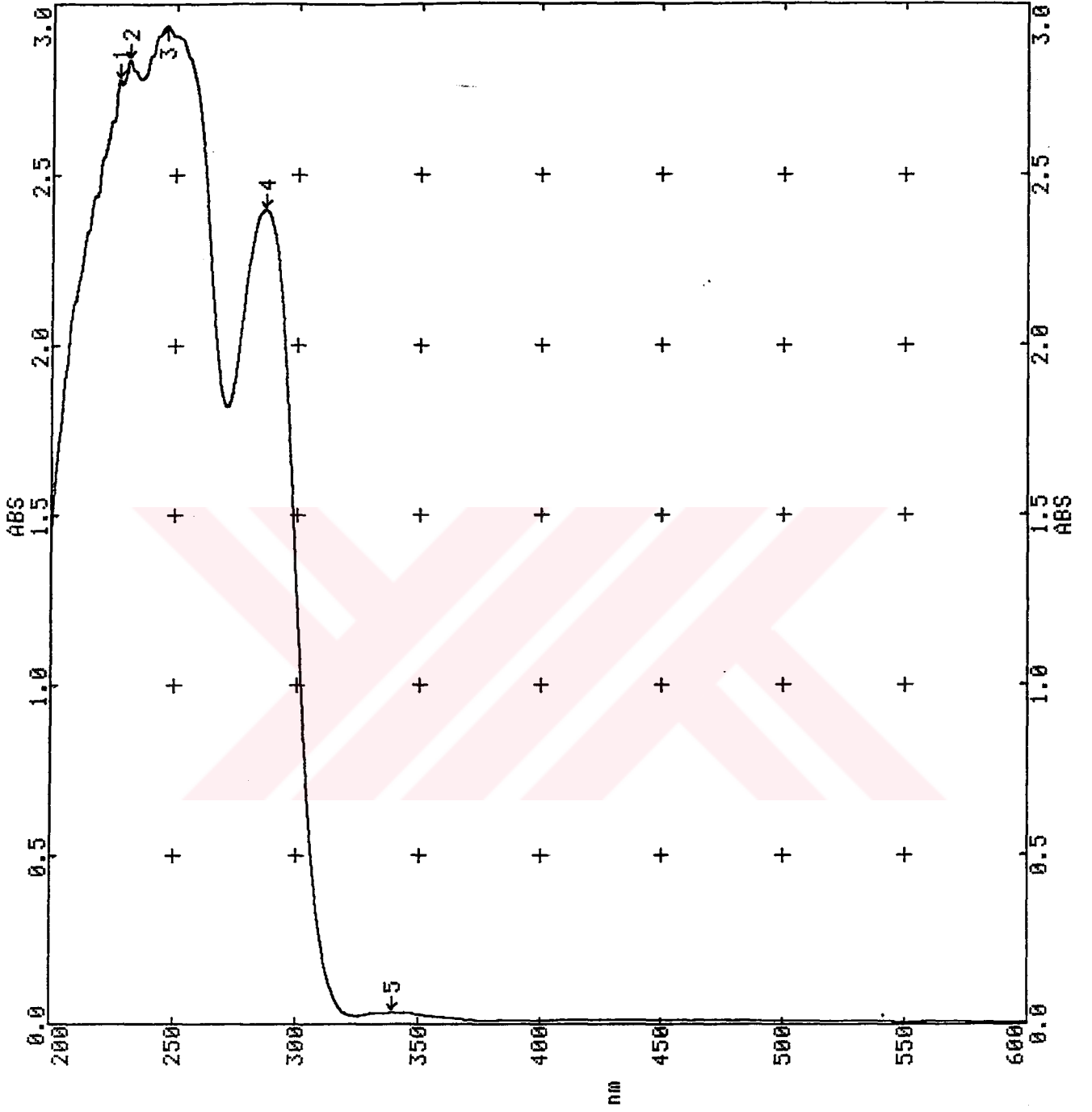
Sulu çözeltide oluşan reaksiyon ürünü bu spektrumda ve çalışmanın devamında hücre içeriğine (Kör) karşı okundu ve belirgin pikler içeren absorpsiyon spektrumunun miktar tayini çalışmasına uygun olacağı gözlemlendi (Şekil 4.12). Oda sıcaklığında gerçekleştirilen reaksiyonun zamana bağlı olduğu görüldü ve bu durum belirli süreler sonunda alınan absorpsiyon spektrumları ile belgelendi (Şekil 4.13). Ayrıca bu durum belirtilen spektrumlarda 400 nm'de okunan absorpsiyon değerleri ile zaman arasında çizilen grafik ile de ifade edildi (Şekil 4.14).

Peroksidaz enzimi ile o-dianisidin reaksiyonu asid ortamda durmaktadır. Bu nedenle çalışmada, reaksiyonun 10. dakikasında çözeltiye 4N  $H_2SO_4$ 'den 150  $\mu$ l eklendi. Asid ortamda ürünün absorpsiyon spektrumu farklı elde edildi ancak bu ortamda reaksiyon ürününün son derece kararlı olduğu görüldü (Şekil 4.15). Bu durum dikkate alınarak farklı miktar lökosit içeren örnekler ile gerçekleştirilen reaksiyonun 10. dakikasında ortama asid ilave edildi ve absorpsiyon spektrumları alındı (Şekil 4.16). Bu spektrumlarda 400 nm'de okunan absorpsiyon değerlerinden yararlanarak kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 4.17).

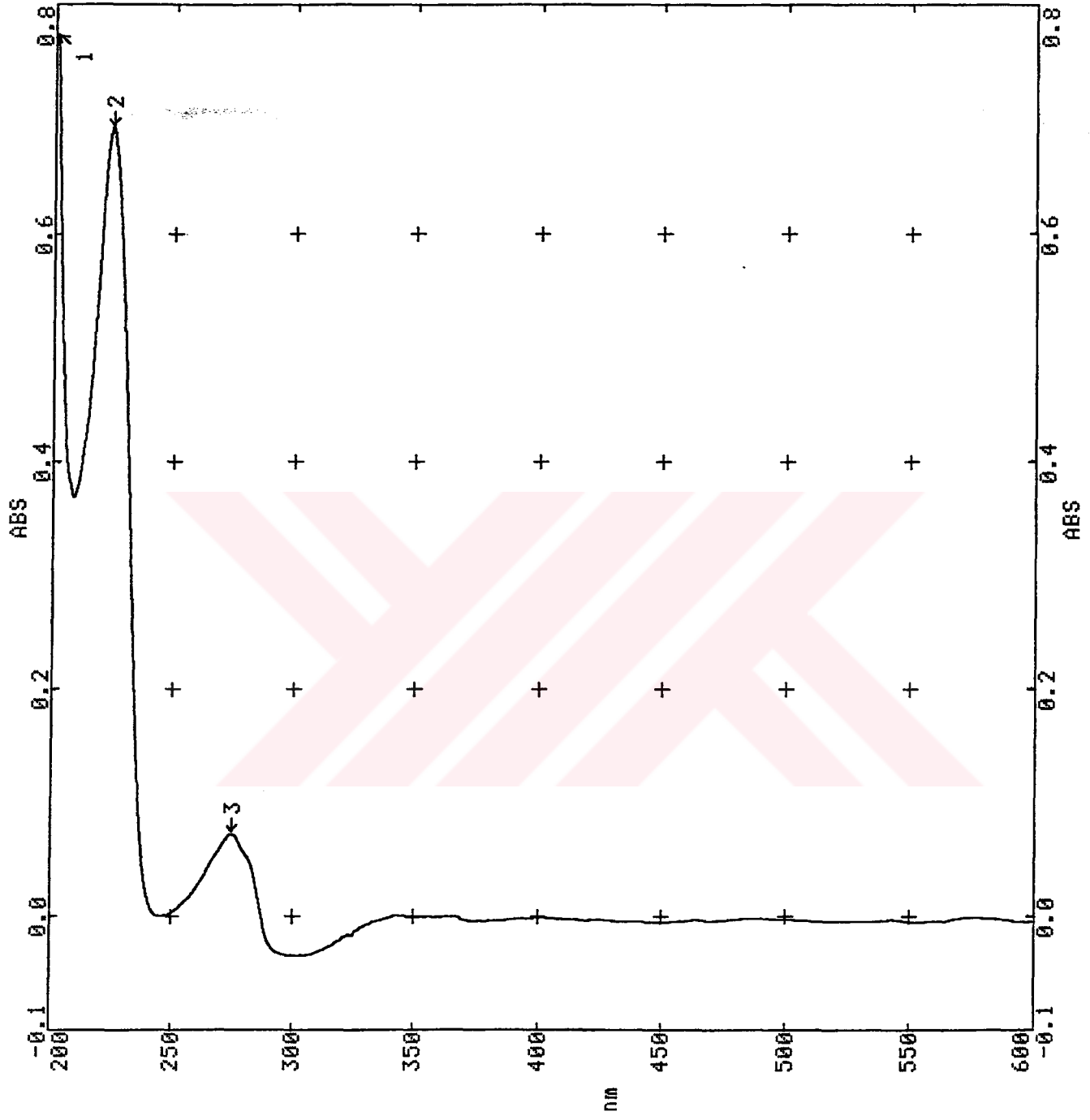
Matematiksel değerlendirme sonucu kalibrasyon eğrisinin denklemi

$y=0.0025689x + 0.19872$  olarak bulundu. Yöntemin standart sapması  $s= 0.017132$  ( $n=9$ ) olarak hesaplandı. Farklı miktarda lökosit bulunduran çeşitli kan örnekleri için alınan sonuçlar otomatik hücre sayıcıda alınan değerler ile kıyaslandı (Şekil 4.18).

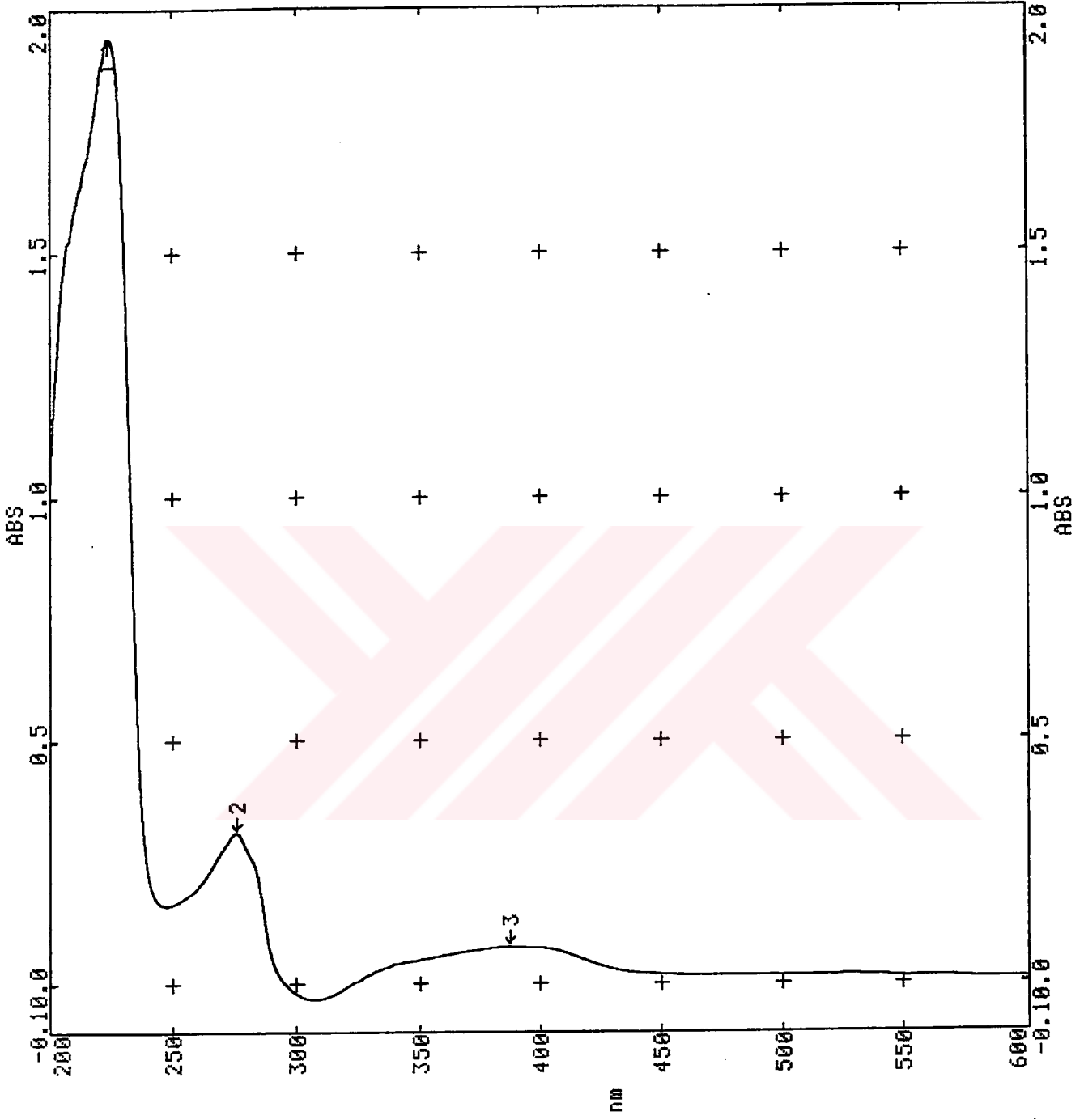




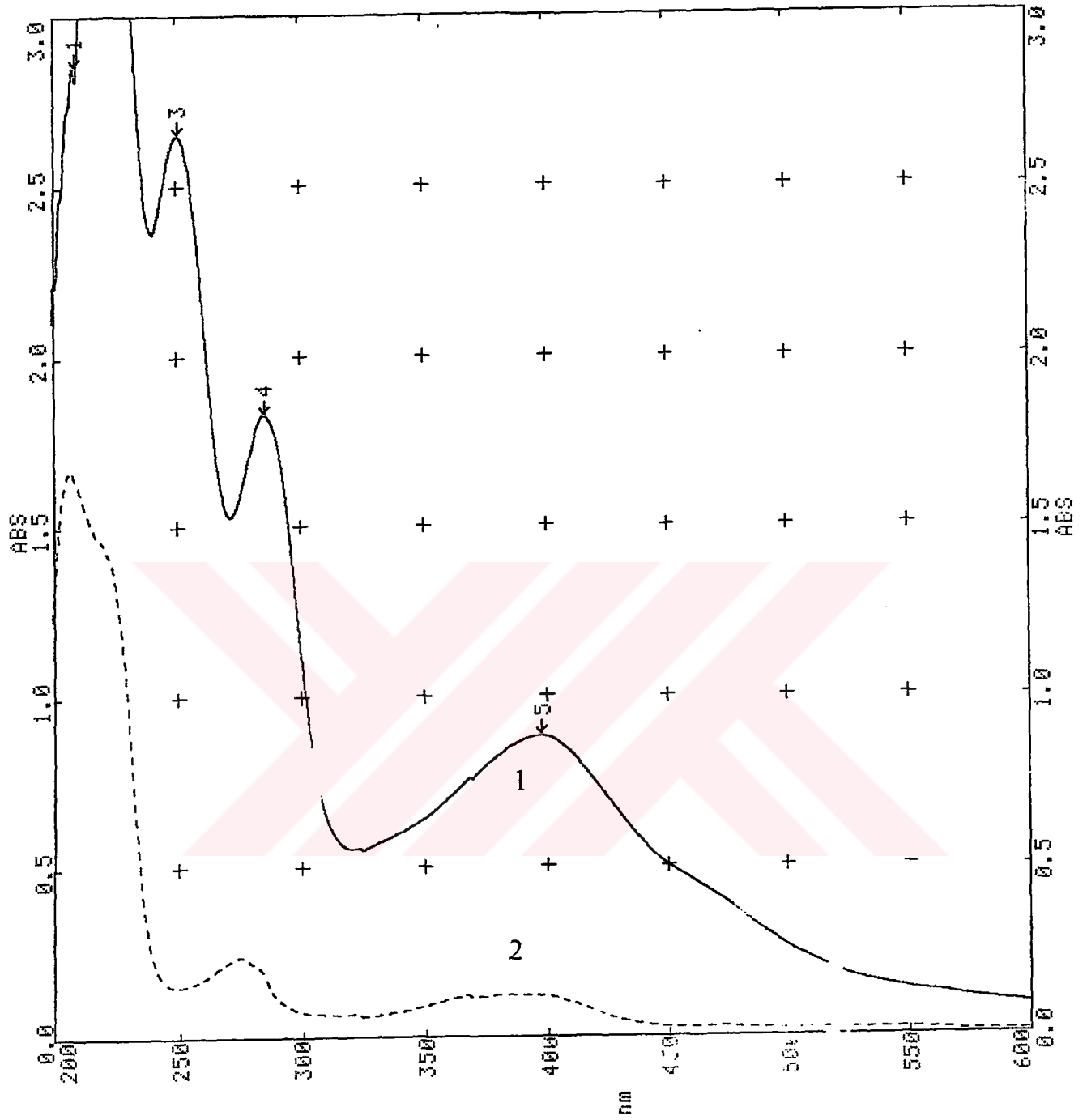
Şekil 4.9  $H_2O_2$  içeren ve içermeyen sulu çözeltide o-dianisidin absorpsiyon spektrumları



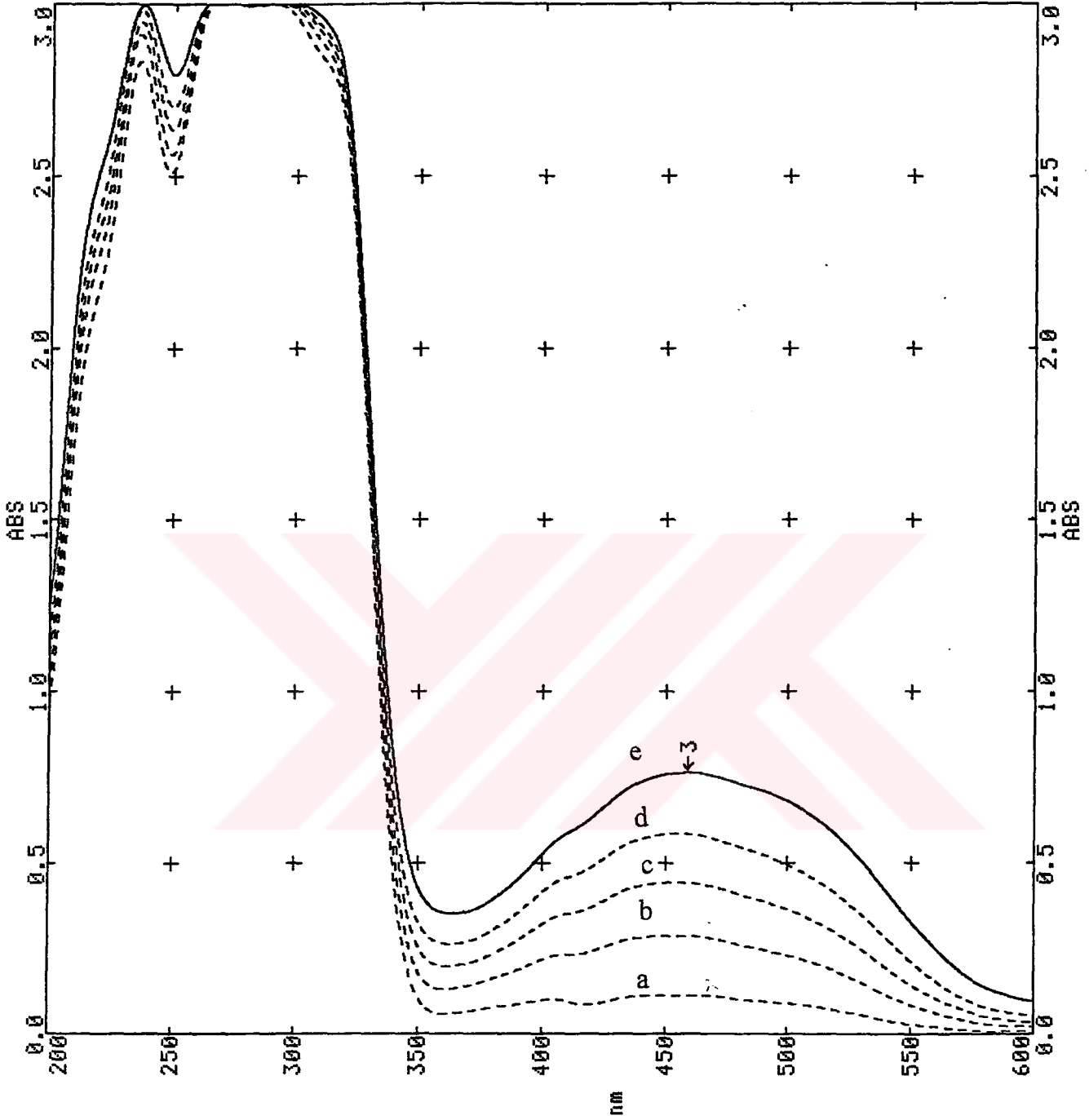
Şekil 4.10 Triton x-100 çözeltisinin absorpsiyon spekturum



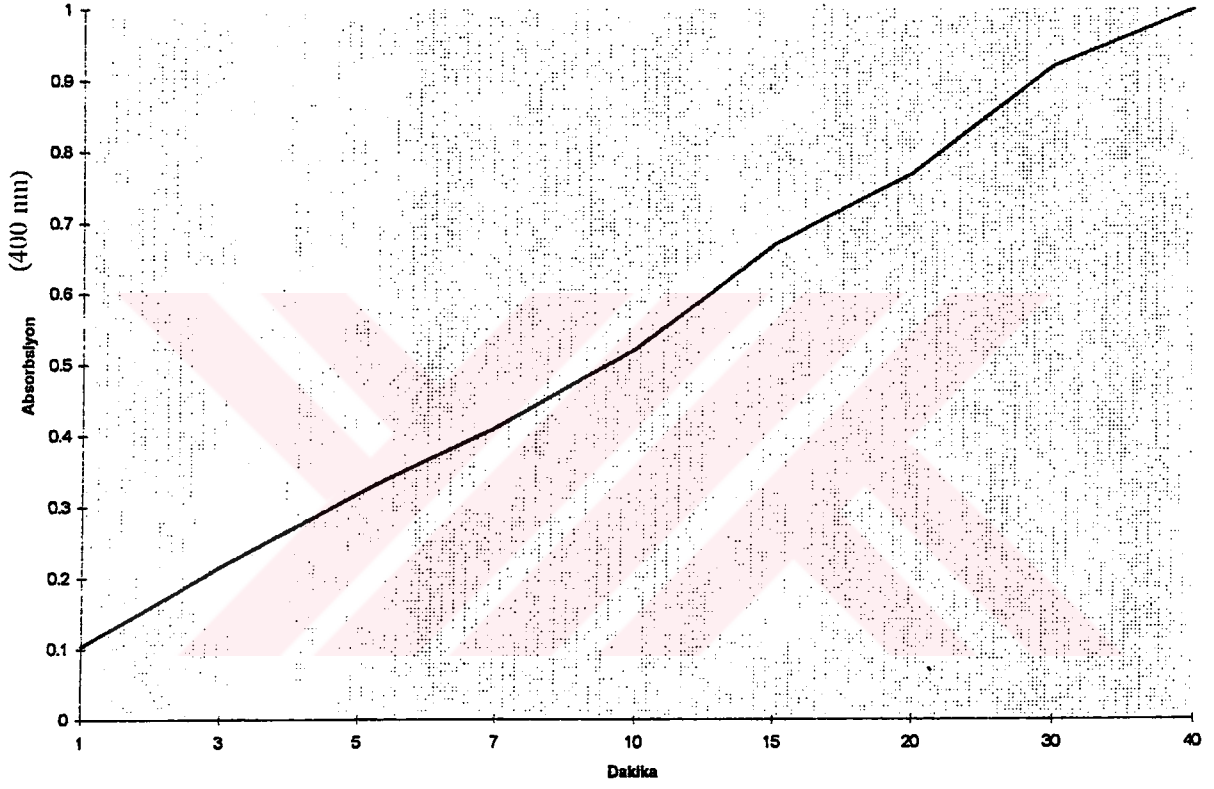
Şekil 4.11 Triton x-100 ile parçalama sonucu elde elde hücre içeriğinin absorpsiyon spektrumu



Şekil 4.12 Reaksiyon ürünü (1) ve hücre içeriğinin (2) absorpsiyon spektrumları



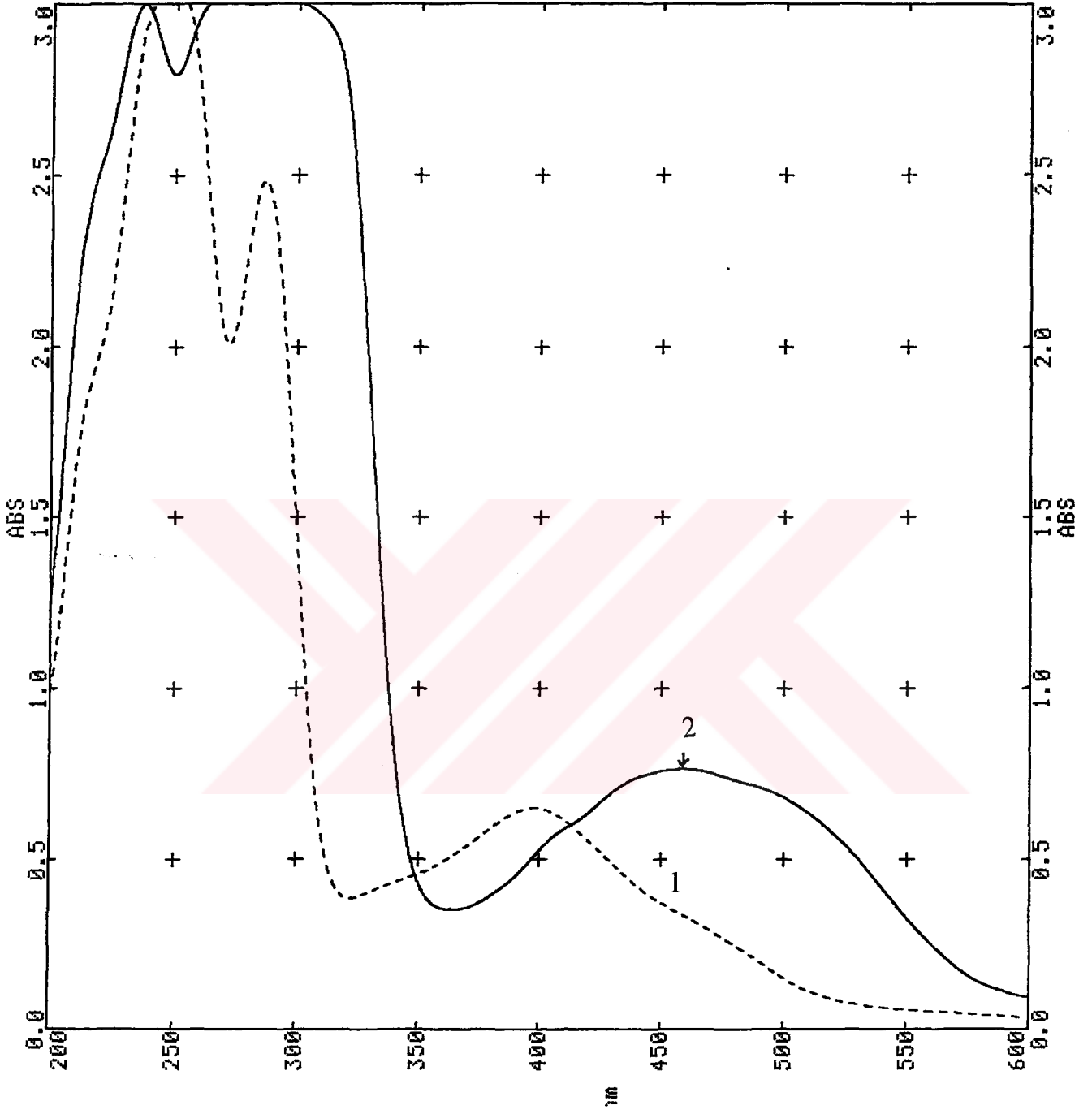
Şekil 4.13 Oda sıcaklığında meydana gelen reaksiyon ürününün zamana bağlı olarak alınan absorpsiyon spektrumları (a:1dak b:3 dak c:5 dak d: 10 dak e:20 dak)



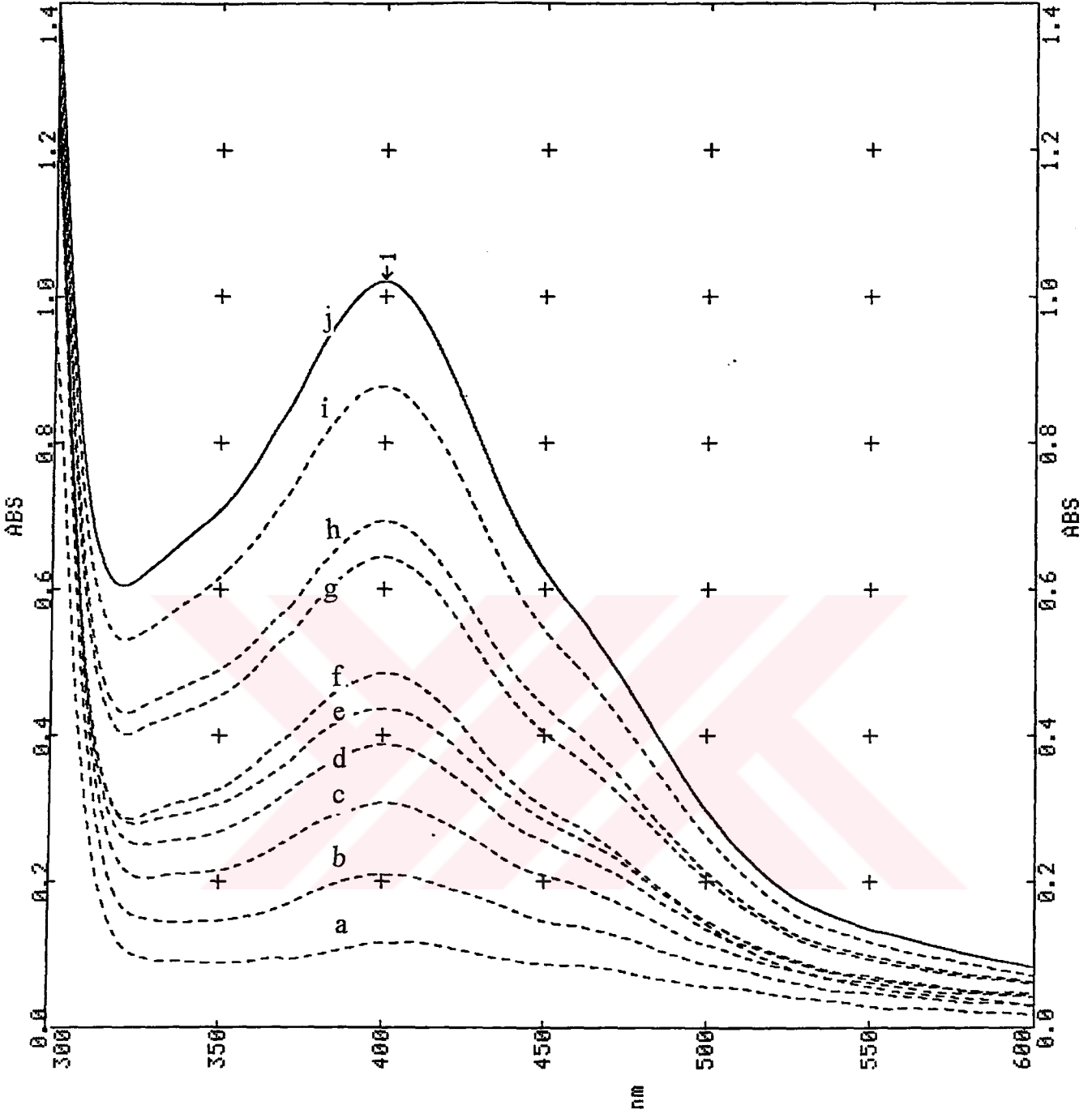
4.14 Nötral pH'da enzimatik reaksiyon ürününün zamana bağlı olarak artması

T.C. İÇİŞİ BAKANLIĞI  
DOKÜMANİSTON MERKEZİ

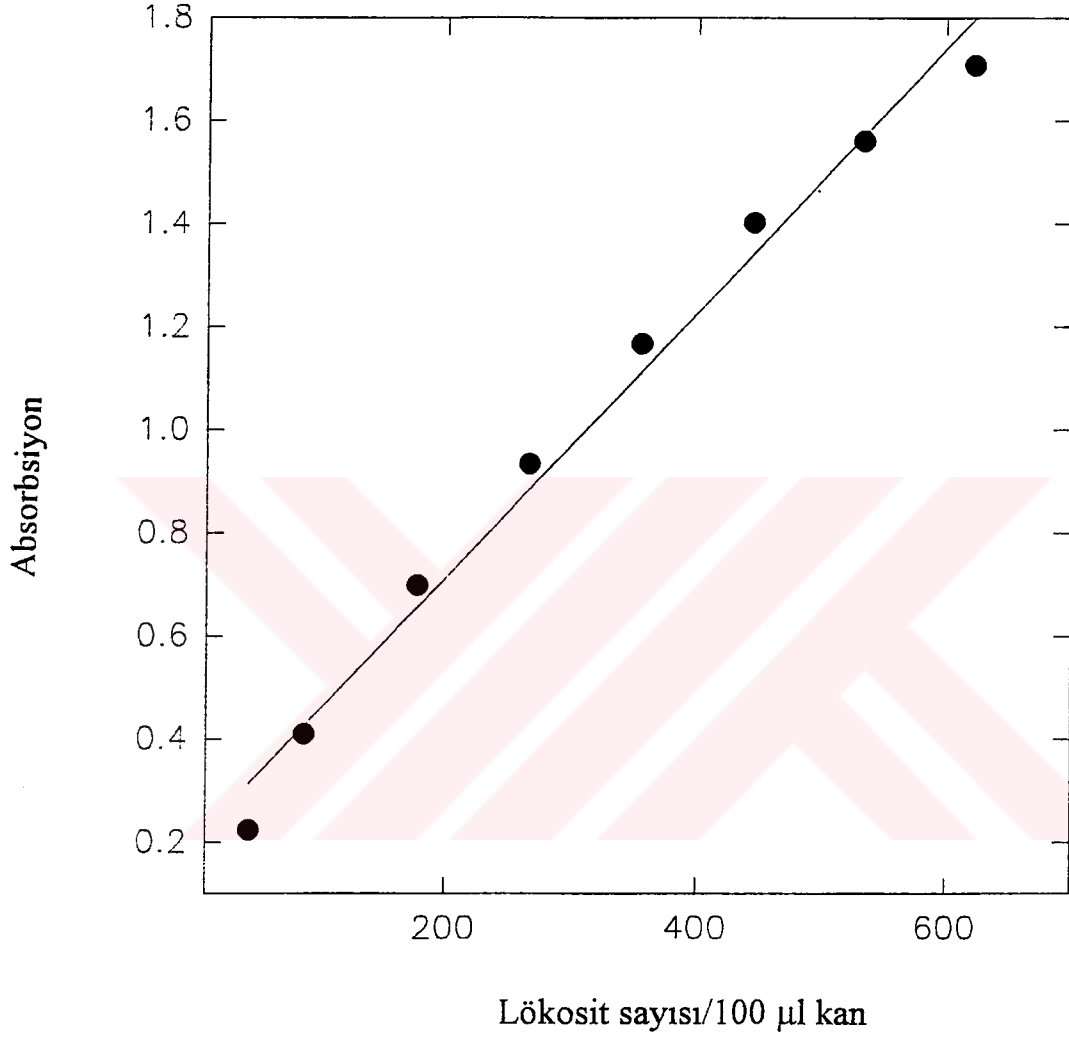




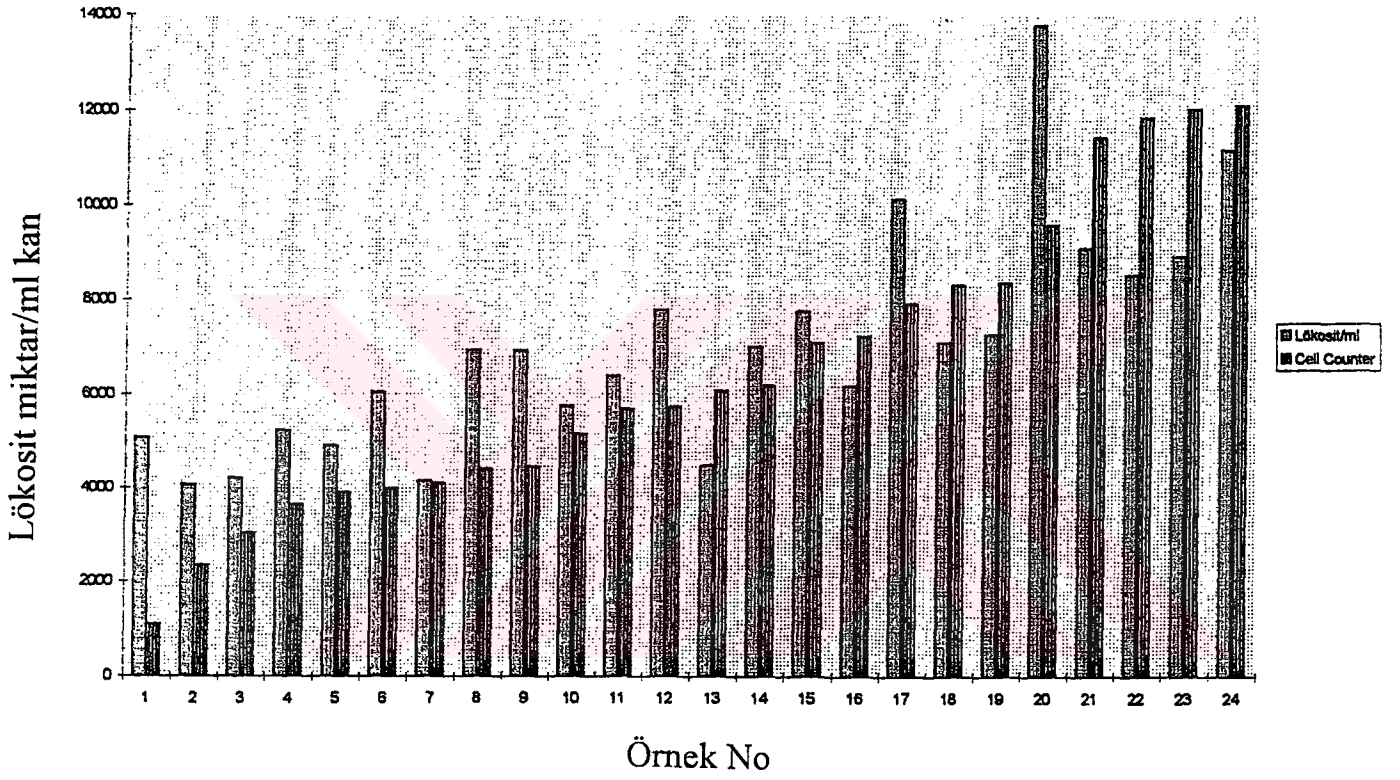
Şekil 4.15 10. dakika sonunda reaksiyon ürününün asidli (1) ve nötral (2) ortamda absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.16 Kalibrasyon eğrisi çiziminde yararlanılan absorpsiyon spektrumları (Hücre sayısı/100µl kan a: 26 b:52 c:78 d:104 e:130 f:156 g:208 h:260 I:312 j:364)



**Şekil 4.17** Enzimatik yöntemde elde edilen kalibrasyon eğrisi



**Şekil 4.18 Kan örneklerinde enzimatik yöntem ve otomatik hücre sayıcı ile elde edilen lökosit sayılarının kıyaslanması**

## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmada kan örneklerinde spektrofotometrik yöntemle lenfosit ve lökosit sayısı tayini için yeni yöntem geliştirmesi konusu incelendi. Lenfosit sayısı tayininde, bu hücrelerin içerdiği protein miktarının, hücre sayısı ile doğru orantılı olabileceği düşünüldü. Kan örneklerinden "dansite gradient" yöntemiyle ayrılan lenfositler bazik ortamda (pH:9.5) , 42 °C'da yarım saat ısıtılarak parçalandı. Çözeltiye alınan hücre içeriği, proteinlerinin primer amino grubuna kovalent olarak bağlanan trinitro benzen sülfonik asid (TNBS) ile, yine pH 9.5'da ve 42 °C'da reaksiyon vermesi sağlandı. 2 saat sonra ortama 1N HCL ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 350 nm ve 460 nm de okunan absorbands değerleri ile kalibrasyon eğrileri çizildi. Yöntemin standart sapması 350 nm ve 420 nm için sırasıyla  $s=713$  ,  $s=37.2$  olarak hesaplandı. Bu yeni yöntem ve mikroskopla sayım yöntemi için 360 nm'de  $t=-1.211939$  bulundu. Çalışılan sayı (n=9) için tabloda p ve t değerleri şöyle verilmiştir (p=0.05 t=2.31, p=0.02 t=2.90, p=0.01 t=3.36 ). 420 nm'deki çalışma için  $t=-0.22143$  bulundu. Çalışılan sayı (n=10) için tabloda p ve t değerleri (p=0.05 t=2.23, p=0.02 t =2.76 p=0.01 t=3.17) şeklinde verilmiştir. Ayrıca örnek için TNBS ve mikroskop yöntemleri ile alınan sonuçlar grafikler ile kıyaslandı (Şekil 4.7 ) (Habeeb,1966; Sashidar vd., 1994).

Kan örneklerinde lenfosit sayısı tayini için ikinci olarak, yine hücrelerin içerdiği protein miktarının tayini esas alınarak Lowry yöntemi uygulandı. Bu yöntemde de hücreler pH 9.5'da, 42 °C'da yarım saat ısıtılarak parçalandı. Protein tayininde kullanılan Lowry yöntemi uygulanarak 630 nm'de ve 750 nm'de absorbands değerleri okunarak kalibrasyon eğrileri çizildi.

Bu yöntem için 630 ve 750 nm'deki çalışma için  $s=17.4$  ,  $s=13.5$  olarak hesaplandı. Ek olarak 630 nm'de  $t=0.373556$  ( $n=14$ ) , 750nm'de ise  $t=0.331061$  ( $n=14$ ) için  $p=0.05$   $t=2.18$  ,  $p=0.02$   $t=2.68$ ,  $p=0.01$   $t=3.05$  değerleri bulundu.

Alınan sonuçların grafikler ile kıyaslaması da yapıldı (Şekil 4.8) (Lowry vb., 1951; Held ve Absher, 1994).

Klinik açıdan kan örneklerinde lökosit sayısı lenfosit sayısından daha fazla önem taşımaktadır. Lökosit sayısı büyük laboratuvarlarda hücre sayıcılar ile tayin edilmektedir. Bazı doku örneklerinde, özellikle iltihap bölgesinde lökosit sayısı, bazı hallerde ise nötrofil sayısı spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bu yöntemlerde hücrelerin içerdiği peroksidaz enziminin substratlar ile verdiği renkli ürünler dikkate alınmıştır (Beno ve Mathews, 1993; Thomas vd., 1995; Xia ve Zweir, 1997). Ancak yapılan literatür çalışmasında kan örneklerinde spektrofotometrik yöntemle lökosit sayısı tayinine rastlanmamıştır.

Bu çalışmada hücrelerin içerdiği peroksidaz enzimlerinin o-dianisidin ile verdiği reaksiyon ve oluşan renkli ürün dikkate alındı. Nötral ortamda meydana gelen reaksiyon 10. dakika sonunda ortama 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilavesi ile durduruldu. Örneklerin hücre içeriği, fosfat tamponu ve sülfat asidi içeren çözeltiye karşı (Kör) spektrumları alındı. Kalibrasyon eğrisinin denklemi  $y= 0.0025689 x + 0.19872$  ve  $r= 0.99318$  ve yöntemin standart sapması  $s= 222$  ( $n=9$ ) elde edildi.  $t=1.32337$  ( $n=24$ )  $p=0.05$ , 0.02, 0.01 için tablodan  $t= 2.10$ , 2.55, 2.88 değerleri bulundu. Matematiksel değerlendirme sonuçları kanda lökosit sayısı için geliştirilen bu spektrofotometrik yöntemin, otomatik hücre sayıcıdan alınan değerler ile uyumlu olduğunu gösterdi. Duyarlı, kısa sürede gerçekleştirilen ve kolay uygulanabilir bu yöntemin klinik laboratuvarlarında kullanıma uygun olduğu görülmektedir. Yöntem özellikle otomatik hücre sayıcı olmayan klinik laboratuvarları için faydalı olacaktır. Yapılan çalışmada, kan örneklerinde lenfosit ve lökosit tayini için geliştirilen

spektrofotometrik yöntemler klinik laboratuvarında uygulanabilir özelliklere sahiptir. Bu durum matematiksel değerlendirmelerde alınan sonuçlar ile ifade edilmektedir. Yeni yöntemlerin sonuçları ile mikroskop ve otomatik hücre sayıcı aletinin değerleri birbirleriyle uyum içindedir.



**KAYNAKLAR**

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, D., (1989), Molecular Biology of the Cell, Newyork,Second Edition,Chapter 1 ,1001-1057

Beno, D., Mathews H., (1993), “ Quantitative Measurement of Lymphocyte Mediated Growth İnhibiton of candida albicans” , Journal of Immunological Methods, 164, 155-164

Biobak Kullanım Rehberi , (1995),Medonic CA 610 Kan Sayım Cihazı

Carter PH,Resto-Ruiz S, Washington GC,(1992) “Flow cytometric analysis of whole blood,Three anticoagulants, and five cell preparations.” Cytometry 13:68-74

Guyton, A., (1986), Tibbi Fizyoloji, İstanbul, Birinci Baskı, Bölüm 5, 73-86

Habeeb, A.F.S.A.,(1966), “Determination of Free Amino Groups in Proteins by Trinitrobenzenesulfonic Acid”, Analitical Biochemistry, Vol:14, 328-336

Held, P., Absher, M., Heintz, N., Hale, P., (1994), “Automated Procedures For the Quantitation of Protein” , Product Application Focus , Vol:17, No.5, 988-991

İmren, H.. (1985), Klinik Tanıda Laboratuvar, 62-83



Junger, W.G., Cardoza, T.A., Lin, F.C., Hoyt, D.B. ve Goodwin, R., (1993), "Improved Rapid Photometric Assay for Quantitative Measurement of PMN Migration", *Journal of Immunological Methods*, 160; 73-79

Johnson, G.M. ve Shaeper, R., (1997) "Chromogenic Lactat- Leukocyte Esterase Substrates" *Bioconjugate Chemistry*, 8; 76-80

Kettele, A.J., Gedye, C. A., Hampton, M.B., ve Winterbourn, C.C, (1995), "Inhibition of Myeloperoxidase by Benzoic Acid Hydrazides", *Biochem.J.*, 308; 559-563

Lowry, H., Rosebrough, N., Farr, L., Randall, R., (1951), "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.*, May 28, 265-275

Miale, J., (1958), *Laboratory Medicine-Hematology*, Florida, Chapter 11, 491-541

Meiattini, US Patent No: 5128265

Noffsinger, J., Pugia, M., US Patent No: 5663044

Pekman, M., Vergani, D., (1997), *Basic and Clinical Immunology*, Newyork, Chapter 1, 1-8

Platt, W.R., (1969), *Hematology*, Chapter 5, J.B. Lipincott Comp., Philadelphia

Roit, I., (1998) Essential Immunology, Blackwell Scientific Publication, London, Chapter1,1-14

Stites, D., (1997) , Basic and Clinical Immunology

Schneider, T., Issekutz, A.C., (1996)“Quantitation of Eosinophil and Neutrophil Infiltration Into Rat Lung by Specific Assays for Eosinophil Peroxidase and Myeloperoxidase” The Journal Immunological Methods 198 ;1-4

Sashidhar , R.B., Cooper ,A.K., Ramanda D.,( 1994), “ Quantitation of - Amino Group Using Amino Acids as Reference Standards by TrinitroBenzen Sulfonic Acid, Journal of Immunological Methods, 167, 121-127

Thomas, E., Boseman, P., Jefferson, M., King, C., (1995), “ Oxidation of Bromide by Human Leukocyte Enzymes Myeloperoxidase and eosinophil Peroxidase”, The Journal of Biology Chemistry, Vol 270, No 7 , Issue of February 17, 2906-2913

Toda,S., Sakata,T., Hemaguchi, Y, US patent no: 5250437

Xia, Y., Zweier ,J., (1997), Analitical Biochemistry , 245, 93-96

## ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	13.06.1962	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1973-1979	Çamlıca Kız Lisesi
Lisans	1979-1983	Yıldız Üniversitesi, Mühendislik Fak. Kimya Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans	1984-1985	İstanbul Üniversitesi, İş İdaresi

## Çalıştığı Kurumlar

1985-1986	Mefar İlaç Sanayi
1986-Devam ediyor	Yöntem Kimya Sanayi ve Ticaret A.Ş.