

3005

T.C.  
Marmara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biyokimya Anabilim Dalı

İNSAN PERİFERİK LENFOSİTLERİNDE  
AMİNO ASİT VE GLUKOZ TRANSPORTUNUN  
HIZ VE KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Kimya Müh. Gülây Hergenç

Danışman  
Prof. Dr. Kaya Emerk  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

**Y. G.**  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

İstanbul - 1987



## TEŐEKKÜR

Çalıőmalarıma değerli bilgileri ile katkıda bulunan ve sabırlı rehberliği ile beni yönlendiren hocam Sayın Prof.Dr.Kaya Emerk'e, ayrıca yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Nejat Dalay'a ve Doç.Dr.Tuncay Altuę'a, tezimin yazılması ve grafik çizimlerinin gerçekteőmesinde emeği geçen Sunay Arat ve Didem Çetinkaya'ya en içten teőekkürlerimi sunarım.

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

|           |  |
|-----------|--|
| 2AIB      | 2 Amino izobütirik asit                                    |
| 2AIB*     | 2 Amino ( $1^{14}$ ) izobütirik asit                       |
| cAMP      | Siklik adenzin monofosfat                                  |
| BCH       | 2-Amino 2-karboksi bisiklo(2,2,1)heptan 2 karboksilik asit |
| BPB       | Bromofenasil bromür  |
| Con A     | Konkanavalin A   |
| cpm       | Counts per minute (dakikadaki sayım)                       |
| $C^{14}$  | Karbon 14  |
| 2 DOG     | 2 Deoksiglukoz   |
| 2 DOG*    | 2 Deoksi-D ( $1^3H$ ) glukoz                               |
| 2,4 DNF   | 2,4 Dinitrofenol   |
| EDTA      | Etilen diamin tetra asetik asit                            |
| EGTA      | Etilen glikol tetra asetik asit                            |
| $H^3$     | Trityum  |
| Km        | Michaelis Menten Sabiti                                    |
| $\mu M$   | $10^{-6}$ Molar  |
| MIX       | Metil izobutil ksantin                                     |
| $NaN_3$   | Sodyum azid  |
| NEM       | N-etil maleimid  |
| 3 OMG     | 3-orto metil glukoz  |
| PBS       | Phosphate Buffered Saline                                  |
| PMN       | polimorfo nükleer  |
| PHA       | fitohemaglutinin   |
| PPO       | 2,5 difeniloksazole  |
| POPOP     | Toluen 1,4 bis [2(5 fenil oksazoyl)] benzen                |
| TPA       | 12-0-tetra dekanoyl forbol asetat                          |
| $V_{max}$ | Maximum hız  |

## İÇİNDEKİLER

|   | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| <b>I. GİRİŞ - AMAÇ</b>  | 1            |
| <b>II. GENEL BİLGİLER</b>   | 3            |
| II.1. LENFOSİTLER   | 3            |
| II.2. PLAZMA ZAR YAPISI   | 5            |
| II.3. LENFOSİT ZARI   | 7            |
| II.4. PLAZMA ZARINDA TRANSPORT  | 8            |
| II.5. HAYVAN HÜCRELERİNDE AMİNO ASİT TRANSPORTU                                   | 12           |
| II.6. GLUKOZ TRANSPORTUNA ETKİ EDEN FAKTÖRLER<br>VE HAYVANLARDA GLUKOZ TRANSPORTU | 17           |
| <b>III. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>  | 20           |
| III.1. ARAÇ VE GEREÇLER   | 20           |
| A. KİMYASAL MADDELER  | 20           |
| B. ARAÇLAR VE GEREÇLER  | 20           |
| C. KİMYASAL MADDELERLE İLGİLİ BİLGİLER  | 20           |
| D. KULLANILAN MADDELERİN SERUM<br>KONSANTRASYONU                                  | 20           |
| III.2. YÖNTEMLER  | 20           |
| III.2.1. LENFOSİT AYIRIMI   | 20           |
| III.2.2. TRANSPORT HIZININ ÖLÇÜLMESİ  | 21           |
| III.2.3. İNHİBİSYON DENEYLERİ   | 21           |
| III.2.4. TİMÖSİT AYIRIMI  | 22           |
| III.2.5. İNSULİNİN TRANSPORTA ETKİSİ  | 23           |
| III.2.6. EFFLUX DENEYİ  | 23           |
| III.2.7. PROTEİN TAYİNİ   | 23           |
| III.2.8. TRİPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ   | 23           |
| <b>IV. BULGULAR</b>   | 24           |
| IV.1. AMİNO ASİT TRANSPORT HIZ VE KİNETİĞİ  | 24           |
| IV.2. GLUKOZ TRANSPORT HIZ VE KİNETİĞİ  | 31           |

|                 | <u>Sayfa</u> |
|-----------------|--------------|
| V. TARTIŞMA     | 40           |
| VI. ÖZET        | 46           |
| VII. SUMMARY    | 48           |
| VIII. KAYNAKLAR | 50           |
| IX. EKLER       | 60           |



## I. GİRİŞ VE AMAÇ

Plazma zarı hücre yaşamı için en önemli organeldir. Hücreler plazma zarı sayesinde düzenli dış çevreye açık kontrollü bir termodinamik sistem oluştururlar. Plazma zarı hücreyi koruyan pasif bir engel değil, özgül bir filtredir. Hücresel atıkların, iyonların ve besin maddelerinin giriş çıkışları bu organel sayesinde denetlenir.

Çalışmamızda hücre zarının en önemli fonksiyonu olan transport mekanizmasını incelemeyi amaçladık. Bu nedenle de gerek sayıları yüksek gerekse izolasyonları nispeten kolay olan periferik lenfositleri seçtik, bu hücrelerde in vivo şartlara en yakın bir ortamda şeker ve amino asit transport hız ve mekanizmasını incelemeyi amaçladık.

Literatürde bugüne kadar konuyla ilgili yapılan tüm çalışmaların incelenmesinde ortaya çıkan önemli bir bulgu da bu çalışmaların sürekli olarak mitojenlerle uyarılmış lenfosit kültürlerinde gerçekleştirilmiş olduğudur. Blastik transformasyona uğrayan bu hücrelerde gerek hücre zarında gerek hücre metabolizmasında önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Bundan dolayı bu kültürlerin normal periferik lenfositleri temsil edemeyeceği düşüncesi ile bu çalışmayı durağan lenfosit hücrelerinde yapmayı amaçladık.

Transport hız ve kinetiklerinin incelenmesi süresinde güvenilir, basit ve laboratuvarımız şartlarında kolay uygula-

nabilir bir yöntem kurmayı da amaçladık. Radyoaktif analoglar aracılığı ile ve basit bir santrifugasyon yöntemi ile gerçekleştirilen transport deney sistemi birçok değişik hücre tipinde transporta etki eden pekçok değişik faktörün incelenmesine olanak verecek, kullanılabilirliği yüksek bir sistem olarak bu tezde sunulmuştur.



## II. GENEL BİLGİLER

### II.1. LENFOSİTLER

Lenfositler granülosit ve agranülosit olarak sınıflandırılan akyuvarların agranülosit grubundadır. Çapları 6-8  $\mu\text{m}$  olan küresel lenfositlere küçük lenfositler denir ve kandaki lenfositlerin % 90'ından fazlasını oluştururlar. Bu hücrelerin yoğun bir kromatinden oluşan girintili çıkıntılı çekirdekleri vardır ve koyu bir şekilde boyanırlar. Nükleolusları ise ancak elektron mikroskobu veya özel boya teknikleri ile gözlenebilir.

Lenfosit sitoplazması çekirdeği ince bir yay gibi sarar ve hafif bazofiliktir. Bol miktarda serbest ribozom ve poliribozom taşımaya rağmen diğer organeller yönünden fakirdir(1).

Kan dolaşımında az miktarda orta ve büyük lenfositler de vardır. Büyük lenfositler sitoplazma miktarı ve poliribozomlarının fazlalıkları, kromatin kümelerinin azlığı, mitokondri sayılarının fazlalığı, daha büyük Golgi cisimcikleri ile küçük lenfositlerden ayrılırlar. Lenfositler büyüklük farklılıkları dışında elektroforetik mobilite, yüzey yapıları, mitojenlere cevapları yönünden incelendiğinde heterojen bir grup oluştururlar. Bazı lenfositler birkaç gün yaşarlarken bazıları dolaşımda yıllarca kalabilirler.

Sözü edilen bu farklılıklar immunolojik fonksiyonların da farklı olduğu düşüncesini uyandırır. Fonksiyon farklılıklarını araştırmada bazı hücre yüzeyi markerları bulunmuştur. Bu yöntemle lenfositler T, B ve Null olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. T lenfositleri yüzeylerinde koyun eritrositlerine karşı reseptör ve bir takım yüzey antijeni bulundurlar. B lenfositleri yüzeylerinde yüzey immunoglobulinleri, kompleman reseptörleri, Fc reseptörleri, 5' nükleotidaz ve bazı özel eritrosit reseptörleri bulundurlar. Null lenfositleri ise hem T hem B hücrelerinin bazı özelliklerini yüzeylerinde taşıdıklarından bu yöntemlerle sınıflandırılmazlar. Ancak T ve B olmayan lenfositleri Null lenfosit olarak belirtmek alışılmış pratik bir yöntemdir(2).

B lenfositleri kemik iliğindeki ana kök hücrelerden (stem cell) kaynaklanırlar. Timus ve Bursa of Fabricius'un insandaki karşılığı olan lenfoid dokularda olgunlaşarak immunoglobulin üreten plazma hücreleri haline gelirler.

Aynı kaynaktan doğan ve timusta özel değişikliklere uğrayarak hücrel bağışıklıkta rol oynamak üzere hazırlanan lenfositlere de T lenfositleri denir. Lenfositlerin çoğunu bir grup oluşturur.

Bir B lenfositini uygun antijenle aktive olur ve birçok kere bölünerek sonunda antikor oluşturan plazma hücresi haline gelir. Bu farklılaşma zarda bulunan ve 160.000 Dalton ağırlığında olan immunoglobulin yapısında bir reseptör tarafından yönlendirilir(2,3). B lenfositlerinden aynı zamanda hatırlama mekanizmasını oluşturan memory hücreleri de üretilir. Bunlar daha önceden uygun antijenle karşılaşmış olmasına rağmen plazma hücresine dönüşmemiş lenfositlerdir. Bu hücreler aynı antijenle tekrar karşılaştıklarında mitozla bölünüp antikor sentez eden plazma hücreleri haline gelirler.

T lenfositleri hücresele reaksiyonlarda rol oynarlar; bunlar baskılayıcı (süpressor) ve yardımcı (helper) olmak üzere iki alt sınıfa ayrılırlar. T hücrelerinden de memory hücreleri üretilebilir.

## II.2. PLAZMA ZAR YAPISI

Plazma zarı biyolojik homeostasis yaratan bir organel-dir(4). Hücre zarı hücre içinin çevresinden farklı olmasını sağlar. Enerjiye bağımlı olsun ya da olmasın transport olayları da yaşayan sistemlerin kimyasal homeostasisi için vazgeçilmez unsurlarıdır.

Hücreler arası haberleşmeyi ve uyumu sağlayan plazma zarı 4-5 nm kalınlığındaki lipid çift tabakası ve içine gömülü proteinlerden oluşmuştur. Fosfolipid çift tabakası zarın ana yapısını oluşturur ve zar proteinleri için bir çözücü durumundadır. Lipidler plazma zarı ağırlığının % 50'sini oluşturur, bir hayvan hücresinin 1 mm<sup>2</sup> lipid çift tabakasında 10<sup>8</sup> lipid molekülü bulunur. En çok fosfolipidler olmak üzere kolesterol ve glikolipidler zarda bulunan üç ana lipid tipidir.

Sulu ortamda fosfolipidler ve glikolipidler hidrofobik kısımları içe bakacak şekilde kendiliklerinden çift tabaka oluştururlar. Bu özellik zarların kendilerini kolay tamir etmelerini sağlar.

Elektron spin rezonans çalışmaları lipid moleküllerinin kendi tabakalarında saniyede 10<sup>7</sup> kere yer değiştirirken karşı tabakayla iki haftada bir gibi çok nadir yer değiştirdiğini "flip flop" göstermiştir(5).

Singer ve Nicholson'un "sıvı mozaik modeli" diye adlandırdıkları zar modelinde zar proteinleri çift tabakasında

hidrofobik interaksiyonlarla tutulur. Zar akışkanlığına hidrokarbon zincirlerinin uzunlukları çift bağlar ve kolesterol tesir eder. Kolesterol akışkanlığı regule etmekten başka zara mekanik stabilite verir(5).

Değişik hücrelerde oranları değişmekle beraber fosfolipidler: fosfatidil kolin, fosfatidil ethanolamin, fosfatidil serin, sfingomiyelin ve fosfadidil inozitoldur. Fosfatidil serin net negatif yük taşır.

Lipid çift tabakasının asimetrik olduğu yapılan çalışmalarla gözlenmiştir. Örneğin insan eritrositlerinde sfingomiyelin ve fosfatidil kolin (kolin taşıyan lipidler) dış tabakada bulunur. Negatif yüklü fosfatidil serin iç yüzeyde yer alır. İki tabaka arasında bariz bir yük farkı göze çarpar.

En büyük asimetri glikolipidlerde görülür, glikolipidler sadece dış tabakada bulunurlar ve hücreler arası haberleşmede rol aldıkları düşünülmektedir(5).

Galaktoserebrosid en basit, gangliosidler de en kompleks glikolipidlerdir. Gangliosidler birden fazla sialik asit (N-asetil nöraminik asit = NANA) artıkları taşırlar ve net negatif yüklüdürler. Lipid ağırlığının % 6'sını oluştururlar. Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte gangliosid  $G_{M1}$  in kolera ve tetanoz gibi bakteri eksotoksinleri için reseptör görevi yaptıkları sanılmaktadır.

Biyolojik zarların temel yapısını lipid çift tabakası oluştururken fonksiyonlarını yürüten en önemli unsur proteinlerdir. Ortalama ağırlığının % 50'sini proteinler oluşturur. Bu oran mitokondri iç zarında % 75'e kadar çıkar. Lipid molekülleri gibi amfipatik olan proteinler hidrofobik kısımları ile lipid çift tabakası içine bağlanırlar, hidrofilik kısımlar zar dışında kalır.

Zar proteinleri yerleşim tiplerine bağlı olmak üzere çevresel, integral, transmembran gibi sınıflandırılmalarına tâbidirler. Bu proteinlerin solubilizasyonu yüksek iyon şiddeti, iyonik ve noniyonik deterjanlar gibi yöntemlerle mümkündür(6).

### II.3. LENFOSİT ZARI

Lenfosit zarının 1 µm boyunda karakteristik mikropapiller uzantıları olduğu ultrastrüktürel çalışmalarda görülmüştür. PHA ile stimulyasyonda bu tip hücreler çoğalmış ve üzerindeki uzantılar artmıştır(7,8).

1973'de Polliack scanning elektron mikroskopu ile timositlerin uzantılarının olmadığı fakat B hücrelerinin uzun ve çok sayıda zar mikrovillusine sahip olduğunu göstermiştir(9).

1972'de Scott ve Marchesi "freeze fracture" tekniği ile lenfositlerin plazma zarında makromoleküllerin seyrek olduğunu, diğer çeşitli araştırmacılar da ve immunglobulin ve histokompatibilite antijenlerinin seyrek ve küçük kümeler halinde olduğunu göstermişlerdir. Yüzey immunglobulinler anti immunglobulin antikorları ile çok hızlı yer değişimine uğrarlar(10).

Gliserol de zar proteinlerinin dağılımını etkiler ve onları kümeleştirir. Zar immunglobulinlerin ve histokompatibilite antijenlerinin dağılım değişikliği ya antijen antikor kompleksin endositozu ile ya da bu kompleksin hücre yüzeyinden ayrılması ile sonuçlanır(11,12).

Birçok araştırmalar lenfosit plazma zarının çok akışkan olduğunu ve komponentlerinin devamlı değiştiğini göstermişlerdir. Hücre yüzeyindeki olaylar hücrenin metabolizmasını

da etkilemektedir.

Sıçan timusundan ve dalağından elde edilen plazma zarları poliakrilamid elektroforez sonucu molekül ağırlıkları 10.000-300.000 D arasında en az 25 bant gösterirler.

Zar lipidleri en çok fosfolipidler ve kolesteroldür. Fosfolipid: Protein ağırlık oranı 0.5, kolesterol: fosfolipid molar oranı 0.6-1.0'dır. Diğer memeli hücrelerine göre kolesterol oranının oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Bu veri diğer hücre içi membranlardan ayırdetmede kullanılabilir bir kriterdir.

Glikosfingolipid ve glikoprotein formunda olan karbonhidratlar hücre zarı ağırlığının % 3-5 oluşturur. Karbonhidrat taşıyan komponentler lenfositlerin antijen ve mitojenlerle ilişkilerinde önem kazanır, antijenik ve reseptör bölgelerini meydana getirir(13).

İnsan lenfosit zarında bulunan enzimler: 5' nükleotidaz, Na-K ATPaz, adenilsiklaz, fosfodiesteraz, asit B gliserofosfataz, glukoz 6 fosfataz, asit nitrofenil fosfataz, sukcinik dehidrogenazdır. Diğer memeli lenfosit zarlarında ise alkalın p-nitrofenil fosfataz, NADH oksidoredüktaz, izolesitin asit transferaz, laktat dehidrogenaz ve  $Mg^{++}$  ATPaz'dır(14).

#### II.4. PLAZMA ZARINDA TRANSPORT

Moleküllerin biyolojik sistemlerde bir yerden bir yere taşınma olayına transport olayları denir.

Lipid çift tabakası hidrofobik iç yapısından dolayı birçok polar molekülün girip çıkmasını engelleyerek hücre içinde çözünabilir moleküllerin hücreden kaçmasını önler. An-

cak hücrelerin beslenmeleri için almaları gereken kimyasal maddeler vardır. Bu nedenle gerekli polar moleküllerin geçirilmesi için hücre zarları birtakım aşamalardan geçmiştir.

Proteini olmayan lipid çift tabakası iyonlara geçirgen değildir, ama suyu rahatça geçirir. Bir molekül ne kadar küçükse ve hidrofobik ise lipid çift tabakasından geçmesi o kadar kolaydır. Örnek olarak  $O_2$ ,  $N_2$ , benzeni verebiliriz. Polar olup da yüksüz küçük moleküllere de hücre zarı geçirgendir;  $H_2O$ , üre, gliserol ve  $CO_2$  gibi. Ne kadar küçük olursa olsun iyonlara geçirgen değildir. İyonların yükleri ve etraflarındaki su kılıfı çift tabakanın hidrokarbon fazından geçmelerini önler(15).

Transport olaylarını şu şekilde sınıflandırabiliriz:

- I. Difüzyon
- II. Aracılı Transport
  - A. Kolaylaştırılmış pasif transport
  - B. Aktif transport
- III. Reseptör aracılığı ile endositoz
- IV. Osmos
- V. Elektrodifüzyon

## I. DİFÜZYON

Molekül ve atomların yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona hareket etmelerine denir. Difüzyon olayı atom ve moleküllerin termik hareketleri ile olur, dinamik denge her iki tarafta konsantrasyon eşit olunca sağlanır. Diffüzyonda kanal proteinleri rol oynar.

## II. ARACILI TRANSOPRT

Hücre zarı iyonlar, şekerler, amino asitler ve nükleotidler gibi polar molekülleri de birtakım özgül taşıyıcı pro-

teinler vasıtasıyla içeri alırlar. Bazı taşıyıcı proteinler tek bir substrat taşır (uniport), bazıları aynı anda birden çok taşır (simport), bazıları ise ters yönde taşır (antiport).

#### A. KOLAYLAŞTIRILMIŞ PASİF TRANSPORT

Eğer solüt net yük taşıyorsa hem konsantrasyon gradyanını hem zar potansiyeli taşınımı etkiler. Toplam gradyana elektrokimyasal gradyan denir. Kolaylaştırılmış pasif diffüzyonda "taşıyıcı proteinler" rol oynar. Enerji metabolizması ile bir ilgisi yoktur. Örneğin monosakkaritler genellikle kolaylaştırılmış transport ile taşınır.

#### B. AKTİF TRANSPORT

Taşınım solütün elektrokimyasal gradyanına karşı yokuş yukarıdır, taşıyıcı proteinler birer pompa görevi yapar ve metabolik enerji kaynağına bağımlıdırlar. Bu genellikle taşıyıcı proteinin ATP'yi hidrolize etmesi veya  $\text{Na}^+$  veya  $\text{H}^+$  iyonlarının aynı anda yokuş aşağı taşınması ile elde edilir.

Taşıyıcı proteinler sanki zara bağlı enzimler gibi hareket ederler. Taşıyıcı proteinlerin substratları için karakteristik bir  $K_m$  değerleri vardır.  $K_m$  transport maksimal hızının yarısına karşı gelen substrat konsantrasyonudur. Taşıyıcıya bağlanan substrat kompetitif veya nonkompetitif olarak engellenebilir.

$\text{Na}^+-\text{K}^+$  pompası ve  $\text{K}^+$  sızdıran proteini zar potansiyeli yaratan ve devamını sağlayan önemli iki transport proteini-dir.  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPaz hücre içi solüt konsantrasyonunu kontrol ederek hücre hacmini de kontrol etmiş olur.

Aşağıda basitleştirilmiş şeması görülen Na-K pompasının işleyişi şöyledir.

| <u>Hücre Dışı</u> | <u>Membran</u> |   | <u>Sitoplazma</u> |                 |
|-------------------|----------------|---|-------------------|-----------------|
|                   | K.E            | → | K.E →             | K <sup>+</sup>  |
| K <sup>+</sup>    | ↑              |   | ↓                 |                 |
|                   | E              |   | E                 | ATP             |
|                   | ↑              |   | ↓                 |                 |
|                   | NaE            |   | E~P               |                 |
|                   | ↑              |   | ↓                 | Na <sup>+</sup> |
| Pi                | Na.E~P         |   | Na.E~P            |                 |

Hücre zarı içindeki taşıyıcı (E) ATP ile fosforile olunca K<sup>+</sup> tercih eden konformasyondan Na<sup>+</sup> tercih eden konformasyona geçer. Hücre dışındaki K<sup>+</sup> ön bağlanması fosfoprotein fosfataz sayesinde E~P'in hidrolizinden sonra olur. Fosforun kompleksten ayrılması onu tekrar K<sup>+</sup> tercih eden E konformasyonuna geçirir. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pompasına ATP'den P<sub>i</sub> kopardığı için Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz denir. Pompadaki bu değişiklikler sonucu içeri alınan her iki K<sup>+</sup> için 3 Na<sup>+</sup> iyonu dışarı atılır(15).

Alaninin barsak epitel hücrelerindeki transportunda olduğu gibi aktif transportun Na<sup>+</sup> gradyanına bağlı olup ATP ye direkt olarak bağlı olmaması duruma "sekonder aktif transport" denir.

Ökaryotik hücrelerde sitozolik Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonu 10<sup>-7</sup> M iken hücre dışı Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonu 10<sup>-3</sup> M'dir. Bu gradyanı saptayan protein de Ca<sup>+2</sup> pompalayan ATPaz'dır.

Aracılığı transportunun özelliklerini özetlersek:

- 1- Aynı molekül ağırlığındaki ve lipid çözünürlüğündeki moleküller basit diffüzyona göre daha hızlı taşınırlar,
- 2- Transport hızı doyuma ulaşır: Taşınan maddenin konsantrasyonu arttıkça artık transport hızının artmadığı bir noktaya varılır,
- 3- Taşıyıcı veya kanal kimyasal bir spesifisiteye sahiptir, ama bu enzimlerden daha geniş bir spesifi-

sitedir. Belli bir miktar stereospesifisite de vardır. Örneğin eritrositler D-glukoza taşır ama L glukoza taşımaz,

- 4- Yapıca benzer bileşikler taşıyıcı proteinde bağlanma yerine bağlanmak için rekabete girerler,
- 5- Transport taşıyıcıya bağlanan bir bileşikle inhibe edilebilir. Örneğin floretin yapıca şekere benzemediği halde şeker transportunu inhibe eder.

Hidrofobik molekül olan iyonoforlar lipid çift tabakasında çözünerek çift tabakanın iyon geçirgenliğini arttırmaları. Birçoğu mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak kullanılır. Mobil iyon taşıyıcıları ve kanal meydana getirenler diye ikiye ayrılırlar.

## II.5. HAYVAN HÜCRELERİNDE AMİNO ASİT TRANSPORTU

Memeli hücrelerinde amino asitlerin transportu değişik araştırmacılar tarafından yapılmış çok değişik yöntemlerin kullanıldığı deneylerle sınıflandırılmaya çalışılmıştır. 1965-1975 yıllarında yoğunluk kazanmış bu çalışmalar(17,18,19, 20,21,22) sonucunda üç ana sınıf ortaya konmuştur. Bunlar:

- I. Zwitteriyonik amino asit transportu
- II. Anyonik amino asit transportu
- III. Katyonik amino asit transportu(23)

Zwitteriyonik amino asitlerin transportu sodyum bağımlı ve sodyumdan bağımsız olmak üzere iki alt grupta toplanır. Na bağımlı zwitteriyonik amino asitlerin transportu değişik doku ve hücre kültürü hücrelerinde yapılan deneyler sonucunda birkaç alt sisteme daha ayrılmıştır. Bunlar; kısa polar veya lineer yan zincirli nötral amino asitleri taşıyan A sistemi, glisin ve sarkozine özgü Gly sistemi, glutamin, histidin asparajin taşıyan N sistemi, Alanin serin sistein taşıyan ASC

TABLO I

| Sistem     | Taşıdıkları Substrat  | Na Bağımlılık | pH Etkisi                         | Sistemi Karakterize Eden Sentetik Substratlar | Inhibitörler                                 |
|------------|---|---------------|-----------------------------------|---|--|
| Sistem A   | Kısa polar veya lineer yan zincirli nötral amino asitler  | Bağımlı       | Düşük pH'da aktivitesini kaybeder | 2 metil amino izo bütirik asit                |  |
| Sistem Gly | Glisin-sarkozin immoglisin  |               |                                   |   |  |
| Sistem N   | Glutamin-histidin asparajin   |               | Sistem A gibi                     |   |  |
| Sistem ASC | Alanin, serin sistein   | Bağımlı       | Opt. pH = 6                       |   |  |
| Sistem L   | Fenilalanin, lösin gibi dallı zincirli aromatik amino asitler   |               | Düşük pH sistemi stimüle eder     | BCH (2 karboksi bisiklo (2,2,1) heptan)       |  |
| Sistem T   | Benzen halkası olan naturel amino asitler, bisiklik amino asitler, D,L-triptofan L tirozin, fenilalanin |               |                                   |   | 4 azido fenil alanin<br>Metil maleimid (NEW) |
| asc        | alanin serin sistein  | Bağımsız      | Opt. pH = 7.5                     |   | NEW  |

sistemidir(19,24).

Bu sistemlerin transport mekanizmasını karakterize etmek üzere sentetik amino asit türevleri kullanılmıştır(25, 26). 2 metil amino izobutirik asit A sistemini karakterize eder(27).

$Na^+$ 'dan bağımsız sistemler ise L sistemi, fenil alanin, lösin ve benzeri amino asitleri taşır. T sistemi benzen halkası bulunduran tabii amino asitlere özgüdür. asc sistemi  $Na^+$  bağımlı sistemin taşıdığı substratlara özgüdür ancak  $Na^+$  gradyanına bağımlı değildir(28). Sodyuma bağımlı ASC sistemi le  $Na^+$ 'dan bağımsız asc sistemlerinin benzerliklerini şöyle özetleyebiliriz(29):

- a) Treonin, serin, alanin ve sisteini taşırlar,
- b) Bu substratlar her iki sistemde de birbirlerini inhibe etmezler,
- c) Aynı noktada olmasa da pH düşürülmesi ile aktivite-leri azalır.

Farklılıkları ise:

- a) asc'nin opt. pH = 7.5  
ASC'nin opt. pH = 6.0
- b) ASC'nin tersine asc lizin, ornitin ve 2,4 diamino butirat gibi dibazik amino asitleri taşımaz,
- c) ASC'nin hidroksiprolin afinitesi fazladır, asc prolini hiç taşımaz,
- d) pH 7-5 arasında ASC treonin taşır(15).

Bazı araştırmacıların iddia ettiği gibi asc sistemi ASC sisteminin eritrositlerin olgunlaşması sırasında  $Na^+$  bağımlılığını kaybederek meydana gelmiş olabileceğinin aksine

Christensen asc'nin kendi başına bir sistem olduğu görüşündedir.

#### ANYONİK AMİNO ASİTLERİN TRANSPORTU

Sodyuma bağımlı sistemler  $X^-$ ,  $Na^+$ dan bağımsız olanlar  $x^-$  diye adlandırılırlar. Aspartat ve onunla aynı uzunlukta olan anyonik analogları taşıyan sistemler  $X_A^-$ ,  $x_A^-$ , glutamata özgü olanlar  $X_G^-$ ,  $x_G^-$ , ne aspartata ne de glutamata karşı fazla seçiciliği olan sodyuma bağımlı sistem ise  $X_{AG}^-$  olarak adlandırılırlar.

#### KATYONİK AMİNO ASİTLERİN TRANSPORTU

Katyonik amino asitlerin transportu  $y^+$  sistemi olarak tarif edilir, çift yönlü bir transport olup, oldukça yaygın kullanılan bu transport sistemleri birbirinden bazı spesifik inhibitörlerle ayrılır (Bakınız Tablo I).

Her ne kadar ayrı ayrı amino asitler için ayrı taşıyıcı sistemler tanımlanmışsa da, aynı amino asidin birden fazla sistem tarafından taşınması da söz konusudur. Hücreler arası farklılıklara bağlı olarak amino asit taşıyan sistemlerin değişmesi yanında aynı hücre türünde çevresel farklılıklara bağlı olarak bir amino asit farklı bir sistemle taşınabilir.

#### AMİNO ASİT TRANSPORTUNA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Amino asit taşınımını etkileyen faktörlerin başında taşınımı yapacak hücrenin hangi evrede olduğu gelir. Değişik hücre türleri gereksinimlerine bağlı olarak  $S_1$ ,  $M$ ,  $G_1$ ,  $G_2$  fazlarında değişik hızlarda amino asit transportunu gerçekleştirirler(30,31,32,33).

Sodyum gradyanı gibi hücre içi sodyum iyonunda optimal aktivite için gerektiği, hücre dışı  $K^+$  konsantrasyonunun ve bazı hücrelerde hücre içi  $K^+$  konsantrasyonunun ve onun yerine geçebilecek katyonlardaki değişikliklerin de amino asit taşınımına etkili olduğu gözlenmiştir(34,35,36).

2,4-Dinitrofenol ve valinomisin mitokondride zar potansiyelini yok ettiği için amino asit transportunu inhibe etmektedir(33).

PHA, Con A gibi bitki lektinleri diğer hücrelerde olduğu gibi amino asit transportunu arttıırırlar(27). Büyüme faktörleri, mitojenler ve malign transformasyonlar memeli hücrelerinde amino asit transportunu değiştirirler(31,37,38, 39,40,41,42,43,44).

Çeşitli hücrelerde yapılan çalışmalarda amino asit transport hızının mitojenler dışında ortamdaki amino asit yokluğunda da adaptasyon mekanizması ile arttığı gözlenmiştir(45,46,47,48).

Quabain, aspirin, klostridium enterotoxin, amilorid transportu  $Na^+$  gradyanını kaldırarak inhibe ederler. Sitrik asit siklusunun bazı ara metabolitleri  $Na^+$  gradyanı enerjisi için rekabete girer veya allosterik olarak inhibe ederler(49).

Deksamethazon, asetil kolin, serulein, kolesistokinin, gastrin ve kolinerjik bir ajan olarak karbakhid, prostaglandinler, nikotin, etanol yapılan çeşitli çalışmalarla amino asit transportunu inhibe ettiği gözlenmiştir(49).

İnsulin amino asit transportunu protein sentezini uyarak stimule eder. Ayrıca insulin de diamid gibi disulfit formasyonuna sebep olarak amino asit transportunu aktive eder(49,50).

Bazı amino asit transportunda sülfidril grupları içeren proteinin önemli olabileceği düşünülmüştür. Zardaki sülfidril grupları disülfid halinde iken enerji barieri düşer, indirgenmiş durumda iken transport için gereken enerji miktarı daha fazladır.

## II.6. GLUKOZ TRANSPORTUNA ETKİ EDEN FAKTÖRLER VE HAYVANLARDA GLUKOZ TRANSPORTU

Yüksek organizmaların barsak ve böbrek epitelinde aktif transportla taşınmasına karşın(51,52), birçok başka hücrede glukoz kolaylaştırılmış difüzyon ile taşınır. Bu da glukozun önce hareket kabiliyeti olan bir taşıyıcı proteine bağlanıp sonra bu kompleksin translokasyon ile içeri alınması demektir. Bu modelin önemli noktası enerji gerektirmemesi ve tek taraflı olmamasıdır. Metabolize olmayan substratların kullanımı ile influx-efflux (giriş-çıkış) ölçümü mümkün olabilir.

Hücreler D-Ksiloz gibi glukoz taşıyıcısı ile taşınan ve metabolize olmayan bir substrat ile yüklenip de sonra işaretsiz 3-OMG ortama konduğunda dengelenene kadar 3-OMG influx ve efflux olur(40,53).

Glukoz analogu olan 2-DOG lenfositlerdeki taşınımın kinetik analizi için uygun bir substrattır, çünkü glukoz ile 2-DOG aynı sistemle alınır. Heksokinaz ile fosforile olduktan sonra 2-DOG daha ileri metabolize olmaz ve hücrede birikmeye başlar(53,54,55).

Glukoz transportunda glukozun hücre içine alındıktan sonra fosforillenmesi transportun mu yoksa fosforilasyonun mu hız kısıtlayıcı kademe olduğunu göstermede bir kriter olur. Hücre içinde bir glukoz poolu meydana gelmiyorsa transport olayının hız kısıtlayıcı olduğu ortaya çıkar(56).

Floretin kolaylaştırılmış diffüzyon ile olan glukoz transportunu, floridzin ise aktif glukoz transportunu inhibe eder(51,57).

Şeker transportunun p-hidroksimerkuri benzoat (p-HMB), sitokalazin B, deksametazon ve floridzin ile inhibe edildiği birçok araştırmalarda gösterilmiştir. Sitokalazın B en kuvvetli inhibitör olup  $10^{-6}$  M da floridzin ise  $10^{-4}$  M da tesirlerini gösterirler.

LG sıçan miyoblastlarında N-ethylmaleimid (NEM) ve parakloromerkuri benzene sulfonik asit (p-CMBS) 2-DOG transportunu inhibe ettiği halde 30 MG transportuna çok az bir inhibisyon yapmaktadır. Bundan da her iki şekerin ayrı sistemlerle transporta edildiği çıkar(58). NEM hücre zarına penetre eden p-CMBS ise penetre etmeyen sulfidril ajanlarıdır ve sulfidril grupları ile reaksiyona girerek transporta etki ederler.

Malign hücrelerin kontrolsüz bölünmelerine bir neden olarak glukoz ve amino asit gibi kritik besinlerin hücre zarında olan transformasyonlarla hücre içine daha çok alınmaları gösterilmiştir. Virüsle transforme olmuş fibroblastların normalden 3-5 kat hızlı glukoz taşıdıkları bildirilmiştir(59).

2-DOG'un artmış transportu özellikle transformasyonun biyolojik bir belirtisidir(60). TPA'nın stimülasyonunun aktinomisin ve sikloheximid ile kaldırılmaması bu stimülasyonda da de Novo protein sentezi veya RNA rolü olmadığını gösterir. PHA'nın etkisinin de protein sentezine bağlı olmaması önceden var olan taşıyıcı proteinlerin harekete geçmesi şeklinde olabilir(40).

Con A ve TPA'nın glukoz transportuna pozitif etkisi değişik kimyasal maddelerle engellenir. Con A'nın etkisi me-

til izobutil ksantin, dibutiril cAMP, etilen glikol tetra - asetik asit, bromofenasil bromür (fosfolipaz A<sub>2</sub> inhibitörü) Ca<sup>+2</sup> iyonlarının azalması ile inhibe edilir. Bütün bu faktörler hep fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin aktivitesini inhibe ederler. BPB enzimin aktif yerine bağlanır. MIX hücre içi cAMP seviyesini yükseltir, EGTA Ca<sup>+2</sup> iyonlarını çöktürerek fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivitesini azaltır.

Sitokolazin B hem Con A hem TPA ile olan stimülasyonu önler. Deksametazon ise bazal alınımına tesir eder(62).

Forbol esterleri ve ilgili makrosiklik diterpenlerin tümör yaratıcı etkisi vardır. Bunlar forbol, mezereyn, gnidimakrin, gnilatimakrin, gnidilatindir(63). TPA'nın sıçan adipositlerinde bazal glukoz alınımını arttırdığı halde insulin stimülasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir(64).

Düz kaslarda ve yağ hücrelerinde heksoz transportu klasik stimulatörü olan insulin insan polimormonükleer hücrelerinde stimülasyon yapmamaktadır.

C5A, kemotaktik digopeptid, FMLP (N Formil metihionil lösil fenilalanin), iyonofor A23187, arakidonik asit ve onun katabolizma ürünlerinin hepsi PMN hücrelerde 2-DOG taşınımını stimüle eder(65).

37°C'de lenfositlerde yaptıkları çalışmalarda 3-0 MG taşınımını çok hızlı bulan araştırmacılar 15°C gibi daha düşük ısıda çalışmalarını sürdürdüklerinde sabit transport hızına ilk iki dakika ulaşıldığını gözlemişlerdir(40).

Na<sup>+</sup> iyonofor monensin de fare timositlerinde glukoz alınımını arttırır(66).

### III. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### III.1. ARAÇ VE GEREÇLER

- A. Kimyasal maddeler (Bakınız EK 1)
- B. Araç ve gereçler (Bakınız EK 2)
- C. Kullanılan bazı maddelerle ilgili bilgiler (Bakınız EK 3)
- D. Kullanılan bazı maddelerin serum konsantrasyonları (Bakınız EK 4)

#### III.2. YÖNTEMLER

##### III.2.1. LENFOSİT AYIRIMI

Toplam akyuvar populasyonunun yaklaşık % 30'unu oluşturan lenfositleri ayırmak için aşağıda özet olarak bildirilen yöntem kullanılmıştır(67,68).

1:10 oranında EDTA ile karıştırılan taze insan kanı eş miktarda Hank's solüsyonu ile sulandırıldı ve bu karışım hacminin 1:3 kadar Histopaque üzerine dikkatlice yayıldı. Meydana gelen iki fazlı sistem 850 g'de 4°C'de 30 dakika süre ile santrifuj edildi. Su: Histopaque ara fazında biriken hücreler dikkatlice alındı, soğuk (4°C) Hank's ile 400 g'de 10 dakika santrifuj edilerek 3 kez yıkandı. % 1 Tripan mavisi kullanılarak canlılık testi yapıldı, canlılığı % 95 üzerinde olan preparatlar kullanıldı(69).

Bu yöntemle elde edilen lenfositler Thoma camında sayıldı ve 1 ml kandan  $1 \times 10^6$ - $1.5 \times 10^6$  adet lenfosit elde edildi.

### III.2.2. TRANSPORT HIZININ ÖLÇÜLMESİ

Gerek amino asit gerek glukoz transportunu ölçmek için hücre içine taşındığı bilinen fakat kullanılmayan substratlar seçildi ve transport deneyleri  $37^{\circ}\text{C}$ 'de yürütüldü.

İnkubasyon ortamı 1 ml'de  $0.1$ - $1 \mu\text{Ci}$  işaretli substrat, glukozsuz Hank's ve  $6$ - $10 \times 10^6$  adet lenfositten oluşturuldu. Transport hızının ölçüldüğü deneylerde inkubasyon lenfosit ilavesi ile başlatıldı. Belirli zaman aralıklarında ortamda alınan örnekler  $0^{\circ}\text{C}$ 'de tutulan PBS ile 10 kez sulandırılarak transport durduruldu. 0 örnekler  $10:3$  oranında karıştırılmış dibutilphtlat: mısır yağı üzerine yayıldı ve  $2600 \text{ g}$ 'de 6 dakika santrifuj edilerek hücreler çöktürüldü. Supernatandan  $0.1 \text{ ml}$  örnek ayrıldı ve üst faz mikropipetle çekilerek alındı. Phtalat tüpün ters çevrilmesi ile boşaltıldı. Tüp duvarları dipteki pelete dokunmadan filtre kağıdı ile kurutuldu. Radyoaktif madde içeren hücrelerden oluşmuş pellet  $0.1 \text{ ml}$   $\% 0.1$  Triton x 100 ile çözüldü ve tüpün dibi bir kez daha aynı miktar Triton x 100 ile yıkandı(27).

Süpernatant ve çökeltideki radyoaktivite  $5 \text{ ml}$  Bray solüsyonu ile bir dakika süre ile Beta sayacında sayıldı. Çökeltideki radyoaktivitenin toplam radyoaktiviteye oranı  $\%$  alınım olarak hesaplandı.

### III.2.3. İNHİBİSYON DENEYLERİ

Metabolik enerji bağımlılığının ölçüldüğü deneylerde Hank's solüsyonundaki NaCl yerine aynı stoykiyometrik miktarda Kolin Klorür kullanıldı.

Gerek glukoz gerekse amino asit transportunun inhibisyonu bildirilen miktarlarda floretin, glukoz ve lösinin önceden transport ortamına katılması ile ölçüldü.

#### III.2.4. TİMOSİT AYIRIMI

T lenfositlerinin transport işlemlerindeki katkısını ölçmek üzere sıçanlardan timus T lenfositleri elde edildi. Bu işlem için 4-10 haftalık sıçanlar kullanıldı (sıçanlar Çapa Tıp Fakültesi Tecrübi Araştırmalar Bölümünden temin edildi). Eter anestezisi ile bayıltılan sıçanlarda, sternumdan başlamak üzere tracheaya doğru göğüs kafesi açıldı, timus çıkartıldı ve derhal soğuk Hank's ile yıkandı. Sıçan henüz canlı iken 5 ml enjektörle kalbinden toplam kan boşaltıldı. Hayvanın ölmesine meydan vermeden volüm Hank's ile düzeltildi ve Hank'sli kan karışımı tekrar toplanarak hayvan öldürüldü. Böylelikle aynı sıçanın periferik lenfositleri ve timus T lenfositlerini ayırmak mümkün oldu. Çıkarılan timus Hank's ile yıkanarak ince gözenekli plastik bir süzgeçten geçirilerek ezildi, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi, 1500 g'de 3 dakika santrifuj edildi. Pellet 0.167 M NH<sub>4</sub> Cl (pH 7.4) ile eski hacmine süspanse edildi. Bu suspansiyon eritrositlerden temizlenmiş hücreleri elde etmek üzere tekrar 1500 g'de 3 dakika santrifuj edildi. Beyaz renkli hücre peleti 2 kez de soğuk Hank's ile yıkandı(70).

Tripan mavisi ile canlılık testi yapıldıktan sonra sayıma alındı. Bir sıçan timusundan yaklaşık 170 milyon timosit elde edildi. Hank's içinde saklandığında bu hücrelerin % 95 canlılığını 8 saat koruduğu saptandı. Aynı hayvanın kanından periferik lenfositler III.2.1'de anlatılan yöntemle ayrıldı.

### III.2.5. İNSULİNİN TRANSPORTA ETKİSİ

Transport hızına insulinin etkisinin ölçüldüğü deneylerde hücreler nihai insulin konsantrasyonu 250  $\mu$  IU/ml olacak şekilde sığır insulini ile 37°C'da 60 dakika ön inhibisyona uğratıldı.

### III.2.6. EFFLUX DENEYİ

Transport edilmiş materyalin hücre içinden geri kaçıışı (efflux) ölçülen deneylerde transport deneyi şartlarında hücreler radyoaktif substrat ile yüklendi. Bunun için 10-20 milyon hücre/ml, 0.5  $\mu$  Ci radyoaktif substrat ile inkübe edildi. Bu süre sonunda phtalat gradyanından santrifuj edilen hücreler soğuk Hank's ile yıkanarak 10 ml substratsız ortama alındılar ve değişik zaman aralıklarında inkübasyon ortamından alınan örnekler yine phtalat gradyanı üzerinden santrifüj edilerek süpernatantlarında radyoaktivite sayımı yapıldı. Böylelikle radyoaktif substratla yüklenmiş hücreden ortama kaçış (efflux) ölçüldü.

### III.2.7. PROTEİN TAYİNİ

Her deneyde kullanılan lenfositlerdeki protein miktarı inkübasyon ortamının bir miktarı buzlukta dondurularak daha sonra Lowry metodu ile bakıldı. Örnekler 650 nm dalga boyunda okundu.

Hücre peletindeki radyoaktivite miktarı (cpm) mg protein değerine bölünerek normalize edildi(71).

### III.2.8. TRİPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ

37°C'da belli bir miktar lenfosit aynı hacimde Tripan mavisi ile inkübe edildikten sonra mikroskopta yüz hücrede kaç hücrenin boyandığı sayıldı(69).

## IV. BULGULAR

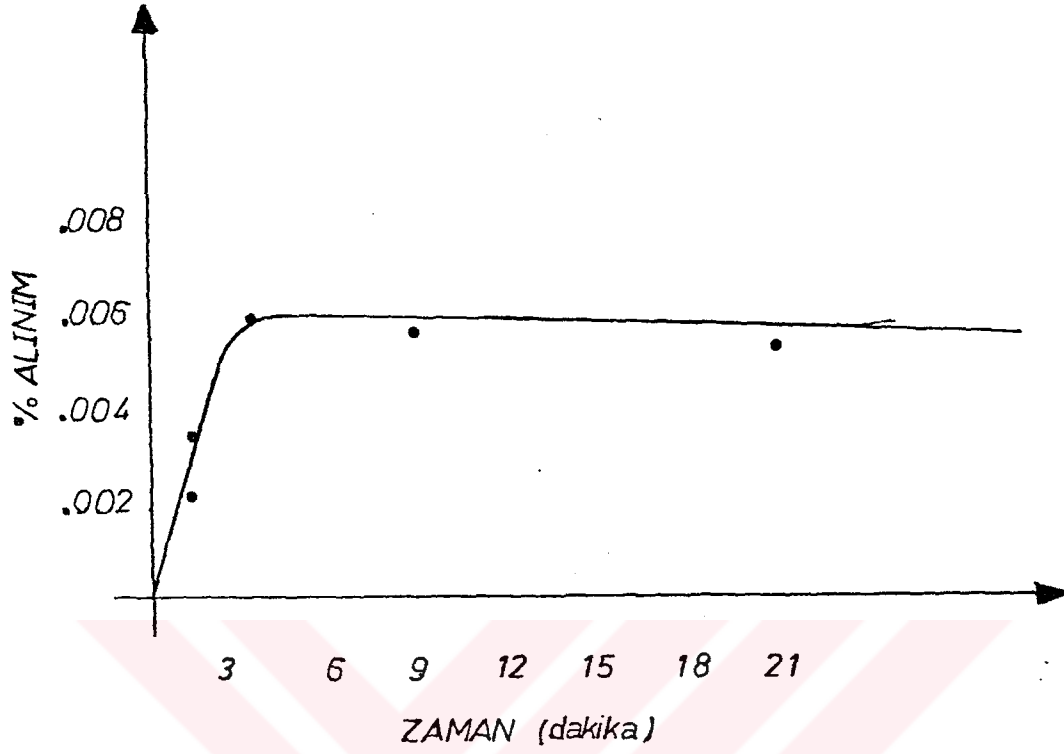
### IV.1. AMİNO ASİT TRANSPORT HIZ VE KİNETİĞİ

Lenfositlerde amino asit transportunun substrat bağımlılığını ölçebilmek için transportun doğrusal olduğu bölge seçilmek üzere değişik zaman aralıklarında transport hızı ölçüldü. Bu işlem 0.1-20 mM 2-AIB konsantrasyonları için 1, 3, 5, 10, 20 dakikalarda transport hızı % alınımlık olarak izlendi. Şekil 1'de 5 mM AIB konsantrasyonunda % alınımlık zaman bağımlılığı, Şekil 2'de ise aynı bağımlılığın 10 mM konsantrasyondaki durumu görülmektedir.

Çizilen regresyon doğruları transportun en az üç dakika süre ile doğrusal devam ettiğini göstermektedir. Bir dakikalık süre sonunda 2-AIB transportunun konsantrasyon bağımlılığı incelendiğinde Şekil 3'te görülen hiperbolik saturasyon kinetiği elde edildi.

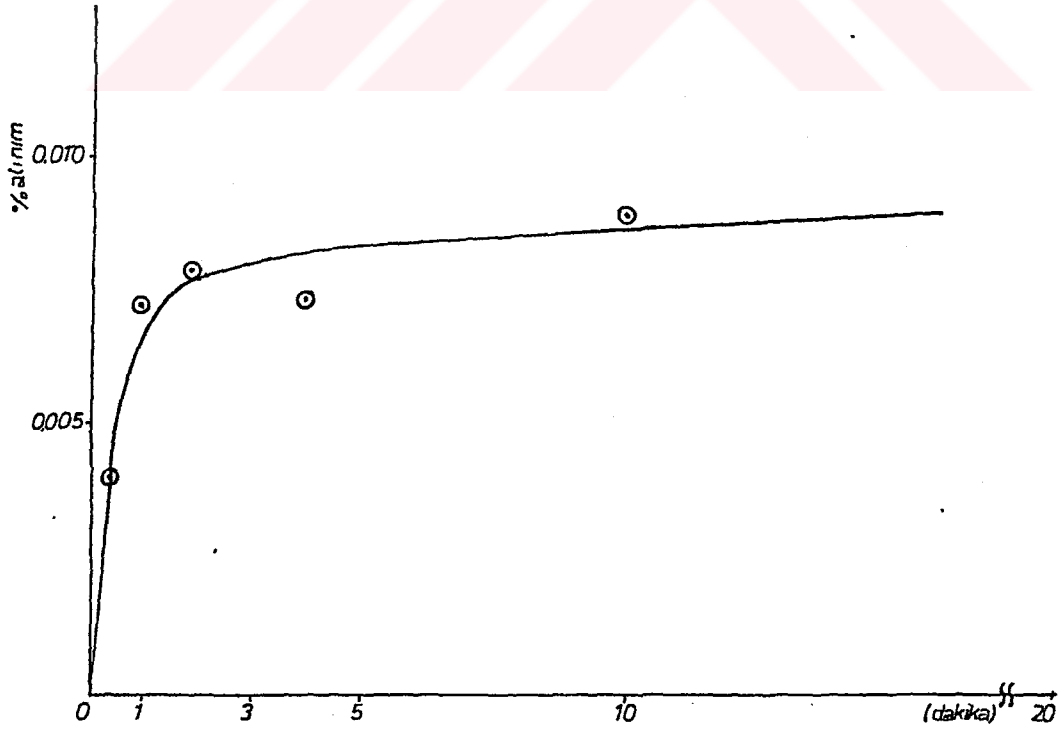
Elde edilen eğrinin Lineweaver-Burk eğrileri ile irdelenmesi insan periferik lenfositlerinin 2 AIB'i 0.38 mM'lık bir  $K_m$  ile ve saturasyon kinetiğine uygun olarak taşıdığını gösterdi (Şekil 4).

2-AIB'in hangi amino asitlerle ortak transport sistemi kullandığını araştırmak amacıyla 2-AIB'e yapısal benzerlik gösteren L-Lösin kullanıldı. Bu amino asit varlığında transport sisteminde rekabet sonucu 2-AIB transoprtunda inhibisyon



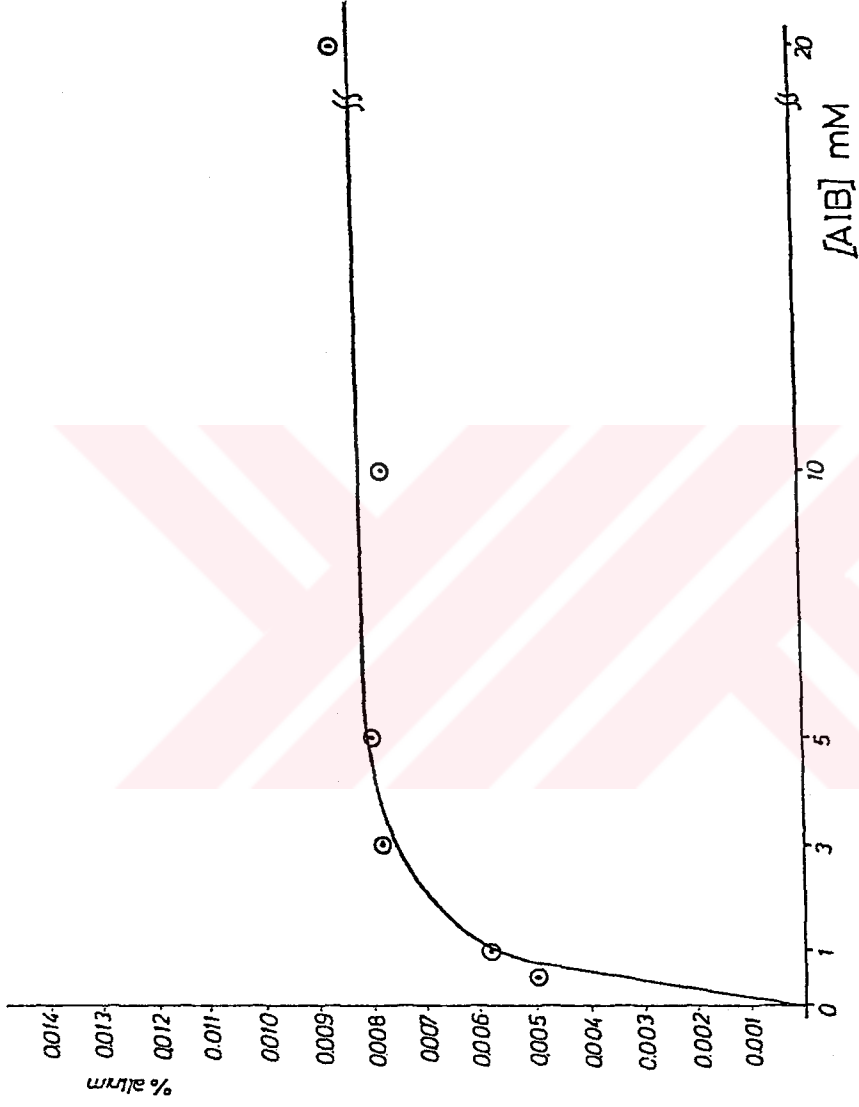
Şekil 1

AIB asidin zamana karşı insan lenfositlerine alınımı  
Substrat konsantrasyonu: 5 mM AIB



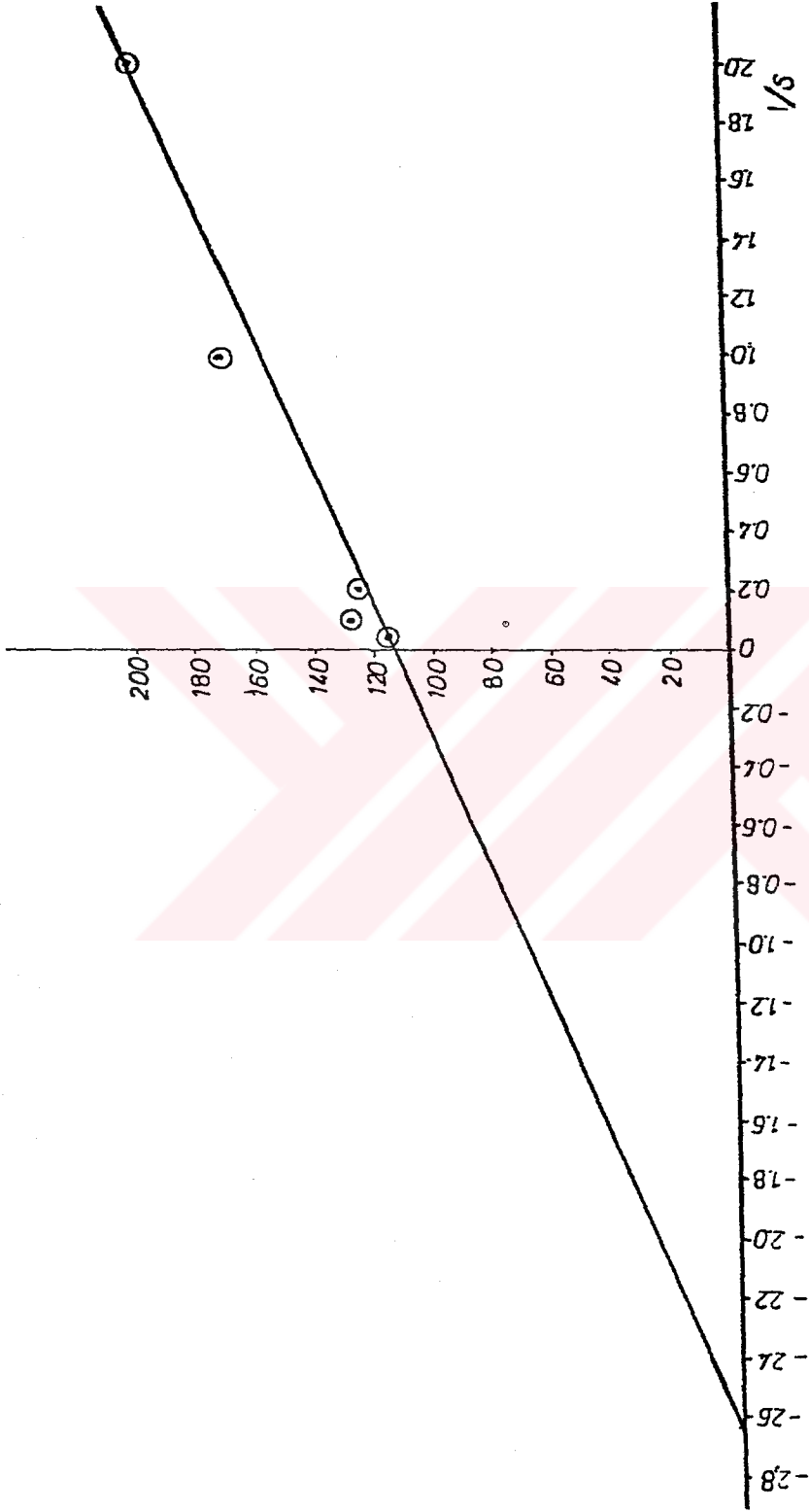
Şekil 2

İnsan lenfositlerinde AIB asidin zamana karşı alınımı  
Substrat konsantrasyonu: 10 mM AIB



Şekil 3

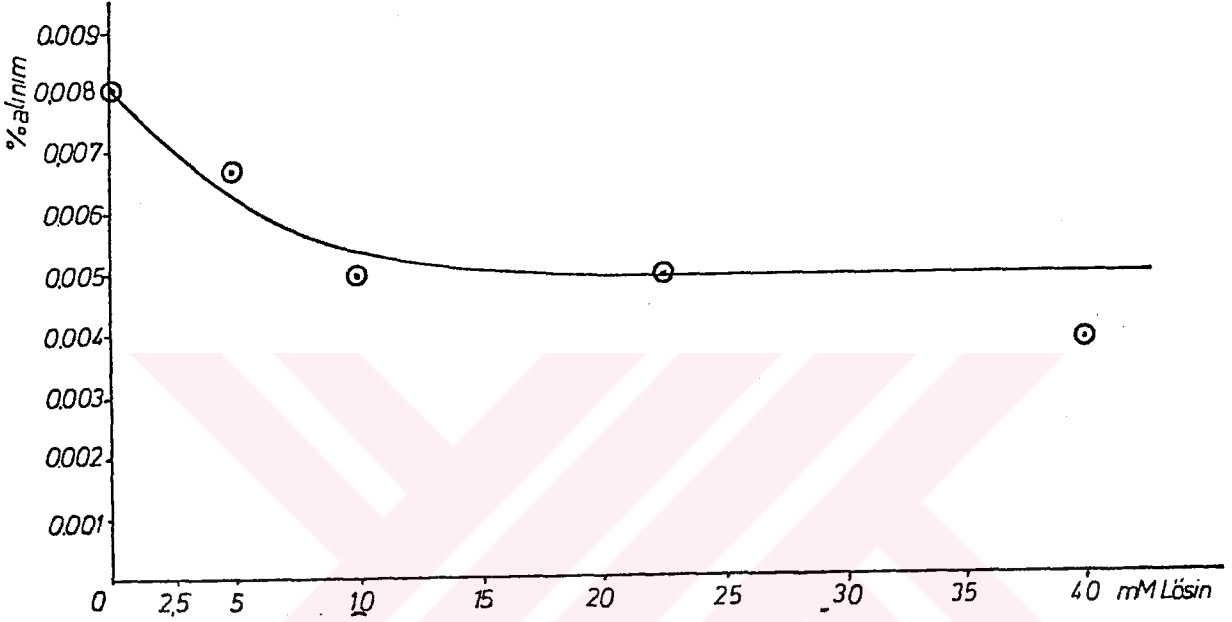
İnsan lenfositlerinde AIB asidin konsantrasyona bağlı alınımı  
t:1 dakika



Şekil 4

AIB asit için Lineavever-Burk grafiği  
t:1 dakika - Km: 0.38 mM

gözlenmiştir. 5 mM AIB konsantrasyonlarında değişik konsantrasyonlarda Lösin kullanılarak yapılan çalışmalar sonunda Lösinin AIB alınımına etkisi araştırılmış,  $K_{0.5} = 4$  mM Lösin olarak bulunmuştur (Şekil 5).

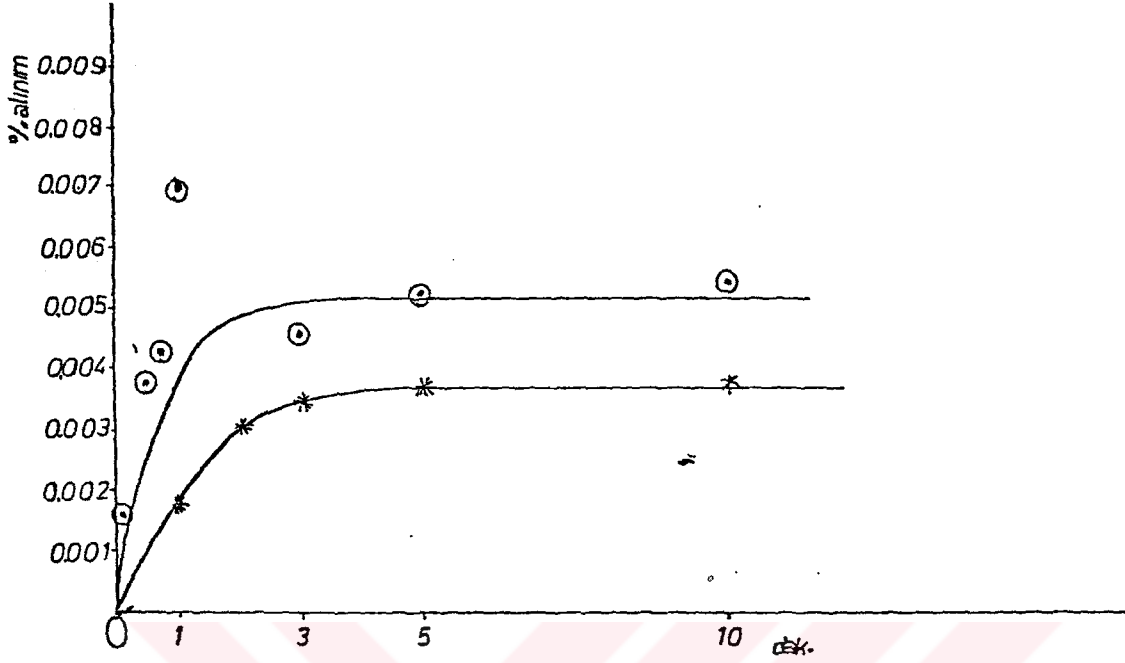


Şekil 5

Lösin'in AIB asit alınımını inhibisyonu  
t:1 dakika -  $K_{0.5}$  4 mM

Lösin ile elde edilen inhibisyonun % 100'e varmaması AIB'nin bir miktar da başka sistemlerle taşındığına işaret edebilir.

Periferik insan lenfositlerinde amino asit transportunun metabolik enerjiye bağımlılığını araştırmak üzere 2,4 Dinitrofenol ve sodyum azid kullanıldı (Yöntemlere bakınız)  $\text{NaN}_3$  ve 2,4 Dinitrofenolle ön inkubasyona tabi tutulan hücreler ile transport gerçekleştirildiğinde transport hızının inhibe edildiği gözlenmiştir. Şekil 6'da gösterilen eğrilerin ilk hızları karşılaştırıldığında metabolik enerji blokörlerinin AIB transportunu yaklaşık % 55 oranında inhibe ettiği hesaplanmıştır.



Şekil 6

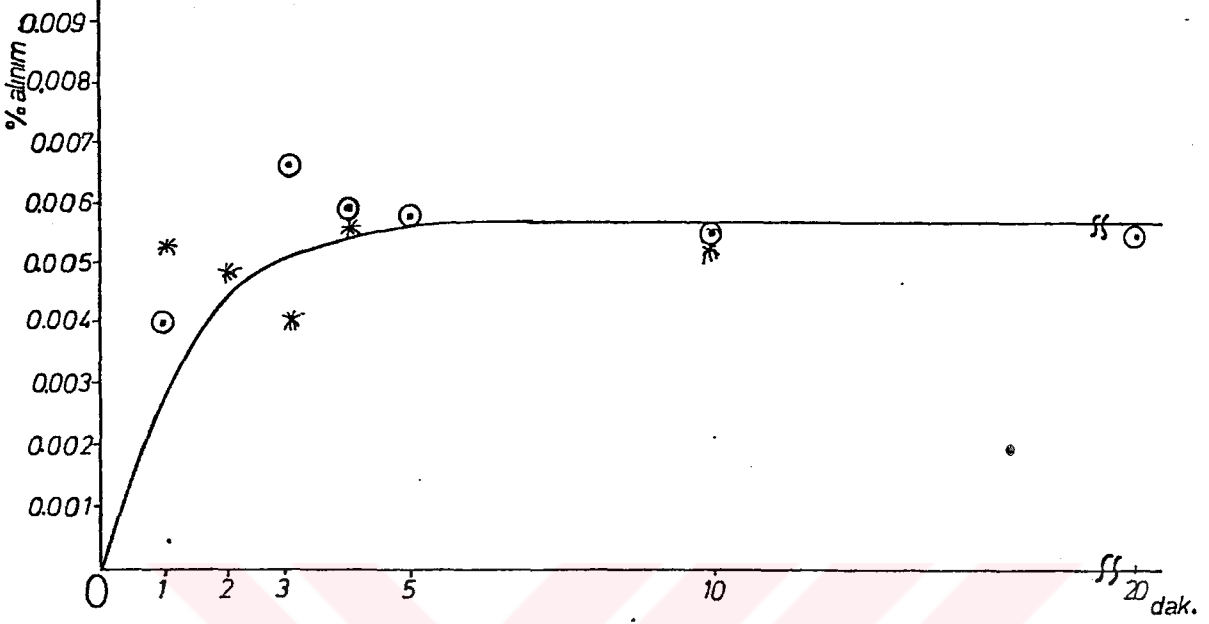
AIB asit transportunun insan lenfositlerinde aktif transport ile olup olmadığını incelemek amacıyla 2,4 Dinitrofenol ve  $\text{NaN}_3$  ile yapılan çalışma

⊙ 5 mM AIB

\* 5 mM AIB + 0,1 mM 2,4 DNF + 0,1 mM  $\text{NaN}_3$

Bir amino asit türevi olan ve hücre içinde amino asit sistemleri kullanılarak taşınan AIB transportunun  $\text{Na}^+$  gradyanına bağımlılığını ölçmek için inkübasyon ortamlarından sodyum uzaklaştırılmış ve yerine katyonik dengeyi ve klorür konsantrasyonunu korumak üzere kolin klorür kullanılmıştır. Kolin klorürlü ortamda yapılan deneylerden örnek bir tanesinin sonuçları Şekil 7'de gösterilmiştir.

6 mM AIB konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiş olan bu deneylerde ortamdaki sodyum yerine kolin kullanılmasının transport hızını etkilemediği görülmektedir.



Şekil 7

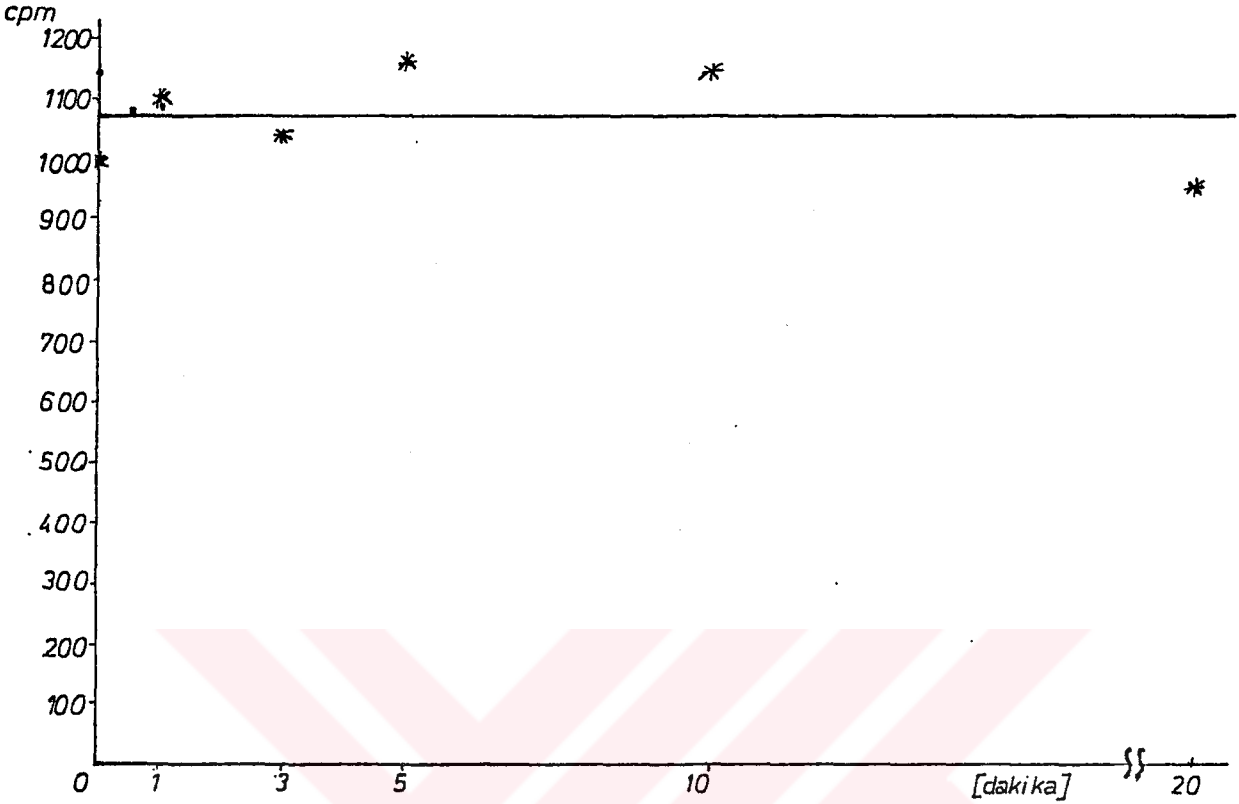
AIB asit transportunun  $\text{Na}^+$  gradyanına bağımlılığını incelemek amacıyla ortama  $\text{NaCl}$  yerine Choline  $\text{Cl}$  kullanıldığında

⊙ 6 mM AIB

\* 6 mM AIB + Choline  $\text{Cl}$

Hücreler tarafından alınan ve kullanılmayan amino asit türevi AIB'nin hücrelerden geri kaçmasının doğuracağı komplikasyonları gidermek üzere radyoaktif AIB yüklü hücrelerden AIB efflux'ı ölçüldü. Hücre içi radyoaktivitenin takibi ile 20 dakika süre ile hücre içindeki radyoaktiviteden hücre dışı süpernatana kaçış olmadığı saptandı (Şekil 8).

AIB asidin hücre içinde kullanılmayışı ve hücreden dışarı verilmeyişi % alınımın zamana karşı doygunluğa ulaşmasını ve belirli bir miktar dışında AIB'nin transportunun gerçekleşmeyişi de izah eden bir bulgudur.



Şekil 8

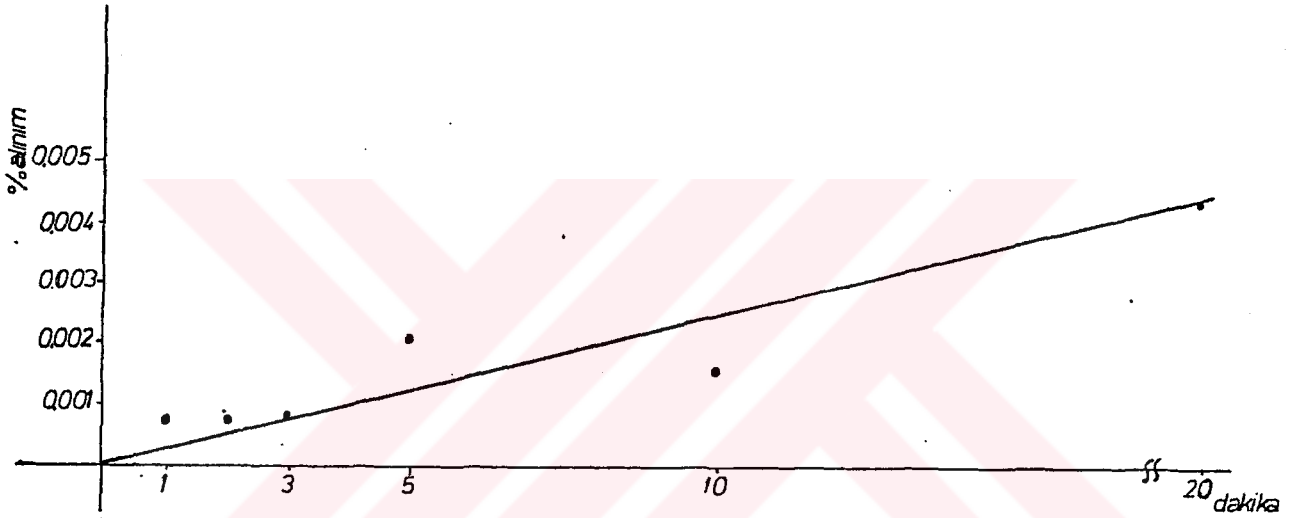
İnsan lenfositlerinde AIB Efflux  
AIB Konsantrasyonu: 5 mM

Amino asit türevlerinin transportunda basit diffüzyonun etkisi  $4^{\circ}\text{C}$  yapılan deneylerle saptanabilir.  $+4^{\circ}\text{C}$  düşük değerlerde kalması diffüzyonun ihmal edilebilir olduğunu gösterir. Her ne kadar diffüzyon da sıcaktan etkilenmekte ise, aracılı taşınım sistemlerinin sıcaklık bağımlılığı diffüzyon katsayısının sıcaklık bağımlılığından en az 20 kez fazla oluşu, soğukta duran transportların genellikle aracılı transportlar olduğuna işaret eder.

#### IV.2. GLUKOZ TRANSPORT HIZ VE KİNETİĞİ

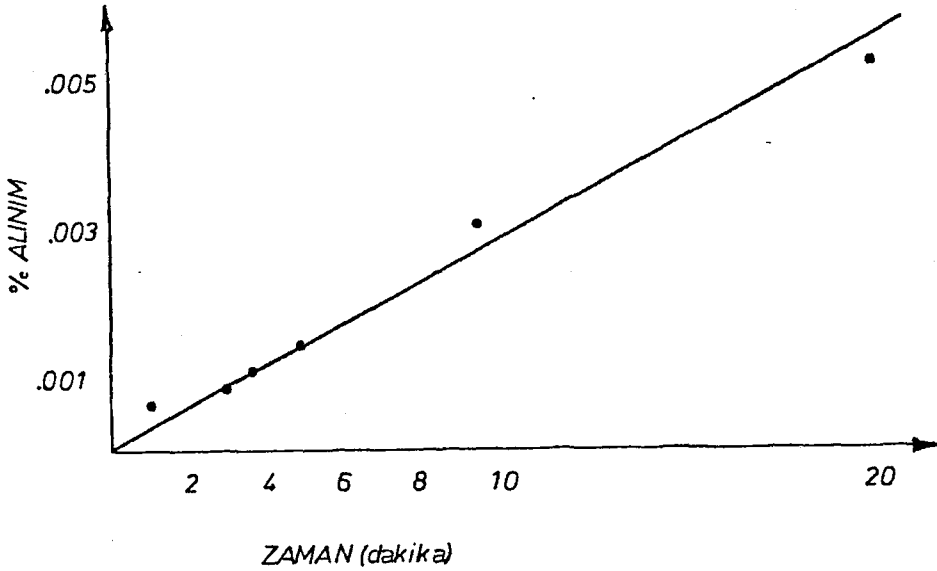
İnsan periferik lenfositlerinde şeker transportunun hız ve kinetiği bu hücrelerce fosforile edilebilen ve dolayısıyla hücre dışına çıkışı büyük ölçüde engellenen fakat daha

ileri metabolik kademelerde kullanılmayan bir şeker türevidir. 2DOG bu amaç için uygun bir türevidir. Yüksek radyoaktivitede ticari olarak bulunması da bu şekerin tercihinde ayrı bir sebeptir. Tritiyumla işaretli 2DOG'da trityum exchange'ı yok denecek kadar azdır. 1 mM ve 5 mM 2DOG konsantrasyonlarında zamana karşı alınım grafiklendiğinde yavaş bir alınım hızı tesbit edilmiştir. 37°C de yapılan bu deneylerde glukozun amino asitlerin aksine 20 dakika süre içinde sürekli taşındığı gözlenmiştir (Şekil 9 ve 10).



Şekil 9

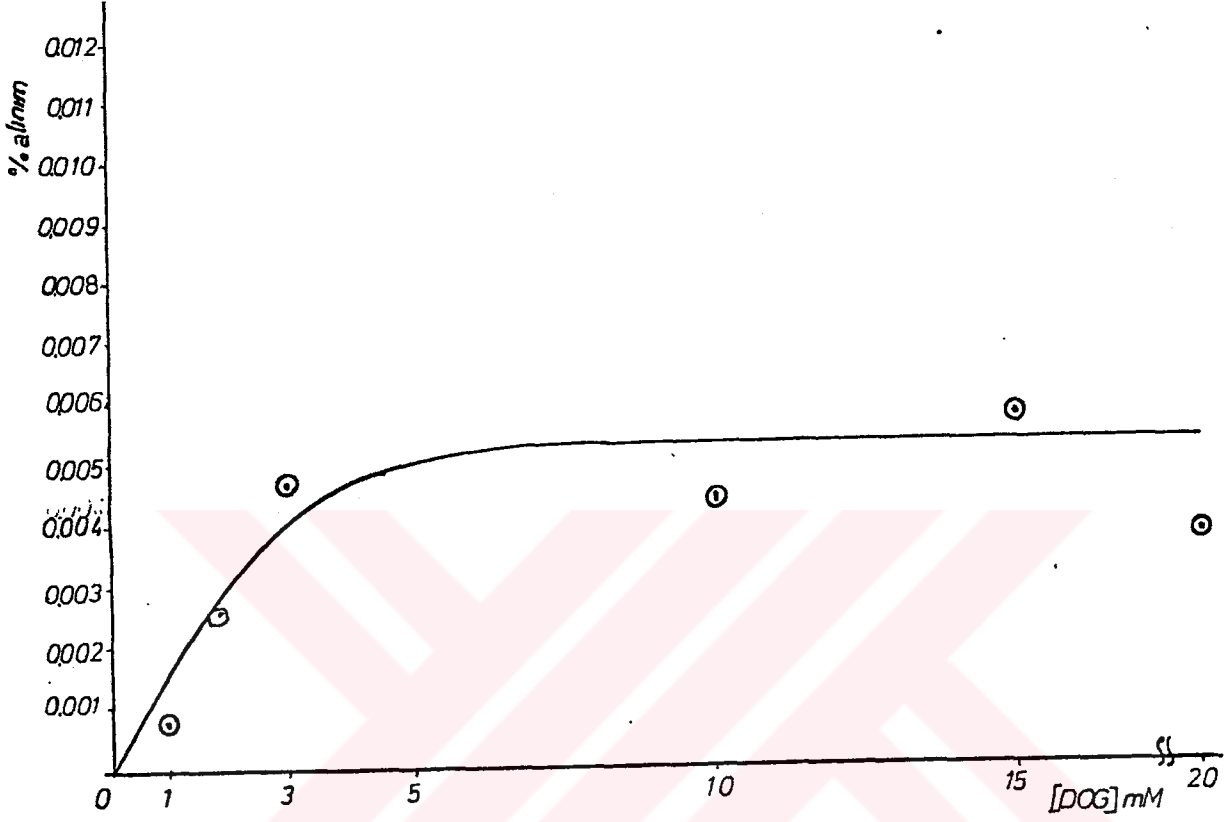
İnsan lenfositlerinde 2DOG'un zamana karşı alınımı  
2DOG konsantrasyonu: 1 mM



Şekil 10

İnsan lenfositlerinde 2DOG'un zamana karşı alınımı  
2DOG konsantrasyonu: 5 mM

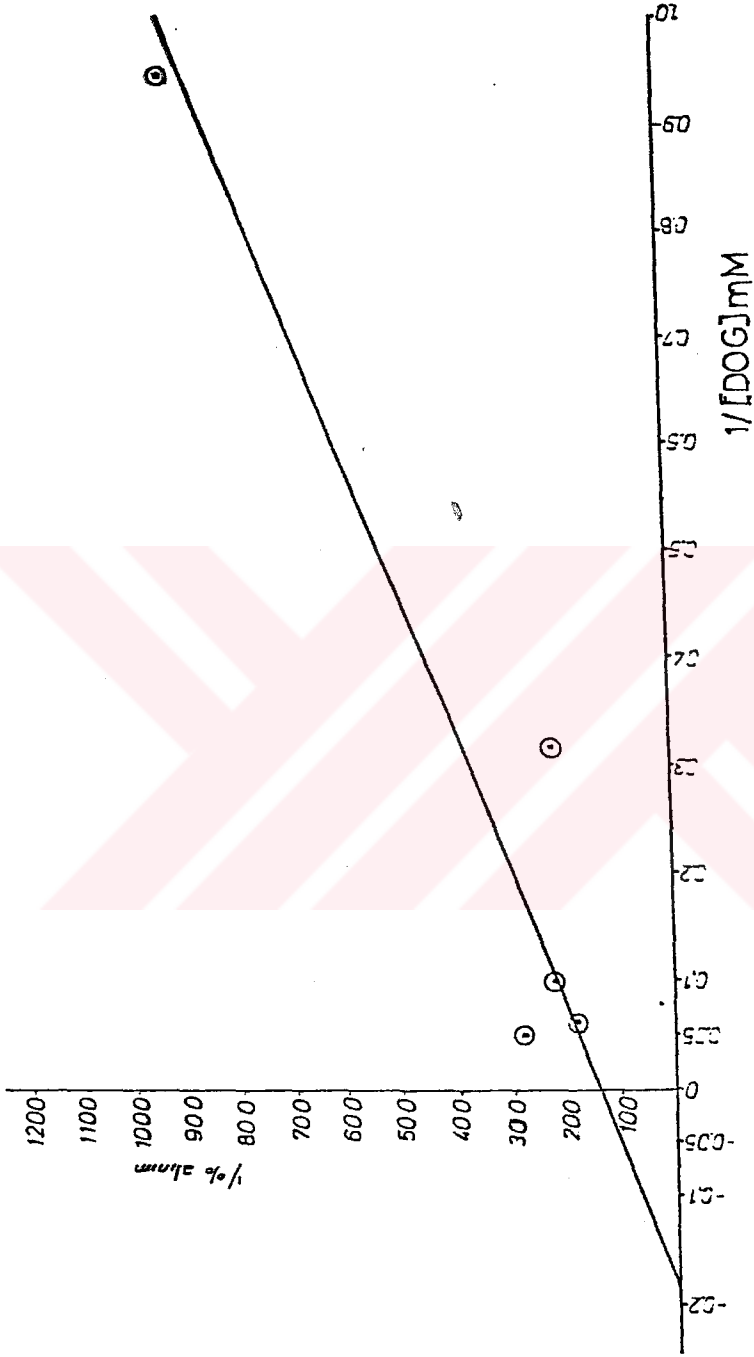
Glukoz taşınımınının 3.dakikası için konsantrasyon bağımlılığı Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11

İnsan lenfositlerinde 2DOG'un konsantrasyon bağımlı alınımlı t: 3 dakika

Şekil 11'deki saturasyon eğrisinin Lineweaver Burk ir- delenmesinde 5.26 mM'lık bir Km değeri elde edildi (Şekil 12).

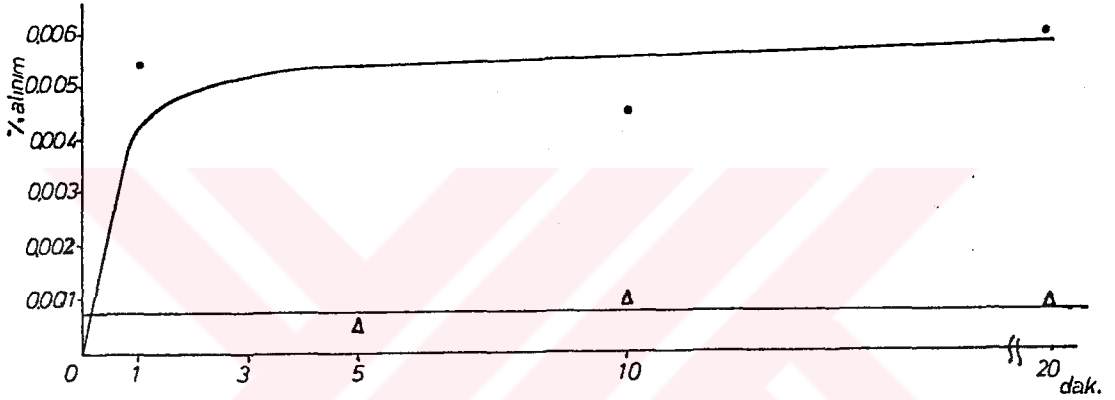


Şekil 12

2DOG için Lineaveaver-Burk grafiği

t: 3 dakika - Km: 5.26 mM

Basit difüzyonun deney parametreleri üzerindeki etkisini incelemek üzere 0.1 mM konsantrasyonda floretin kullanıldı. Glukoz transportunu bloke eden floretin varlığında basit difüzyona bağlı taşınım ölçüldü. Şekil 13'de görüldüğü gibi bu hücreler 37°C de basit difüzyonla 20 dakikalık sürede 2DOG taşımamaktadır. Eğriden elde edilen bazal glukoz seviyesi ile düzeltilen transport kinetiği eğrisinde glukoz içi bildirilen Km de önemli bir fark gözlenmedi.(Şekil 13).



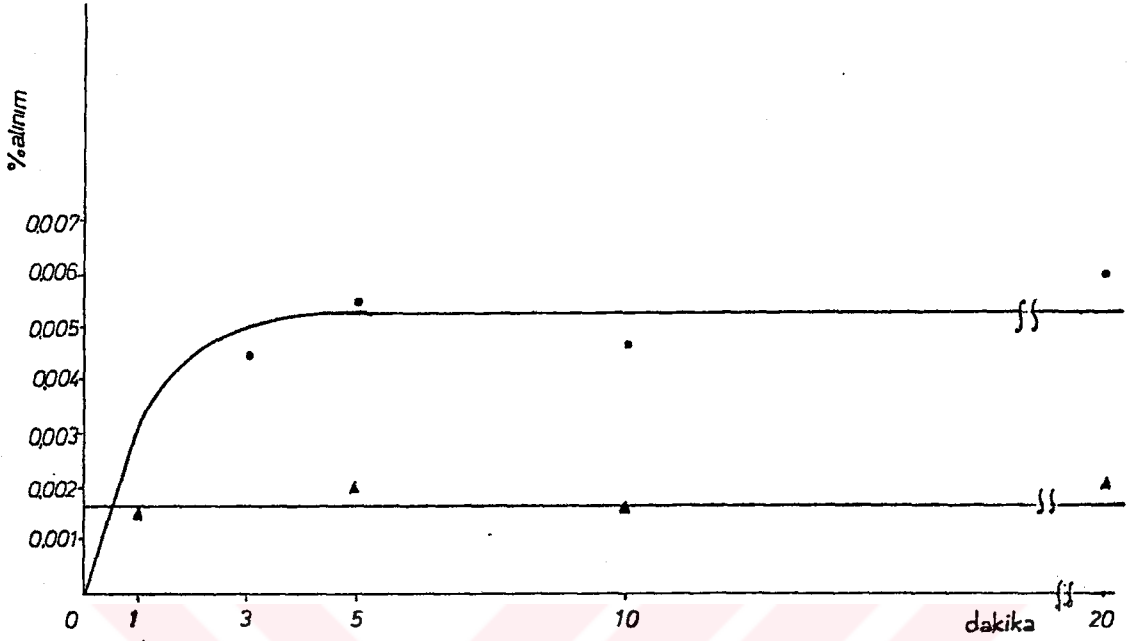
Şekil 13

İnsan lenfositlerinde floretinin 2DOG transportunun inhibisyonu

• 10 mM DOG

Δ 10 mM DOG + 0,1 mM floretin

2DOG taşınımının glukozla bloke edilebilmesi bu şeker türevinin glukoz taşıyıcısını kullandığının en bariz delilidir (Şekil 14).

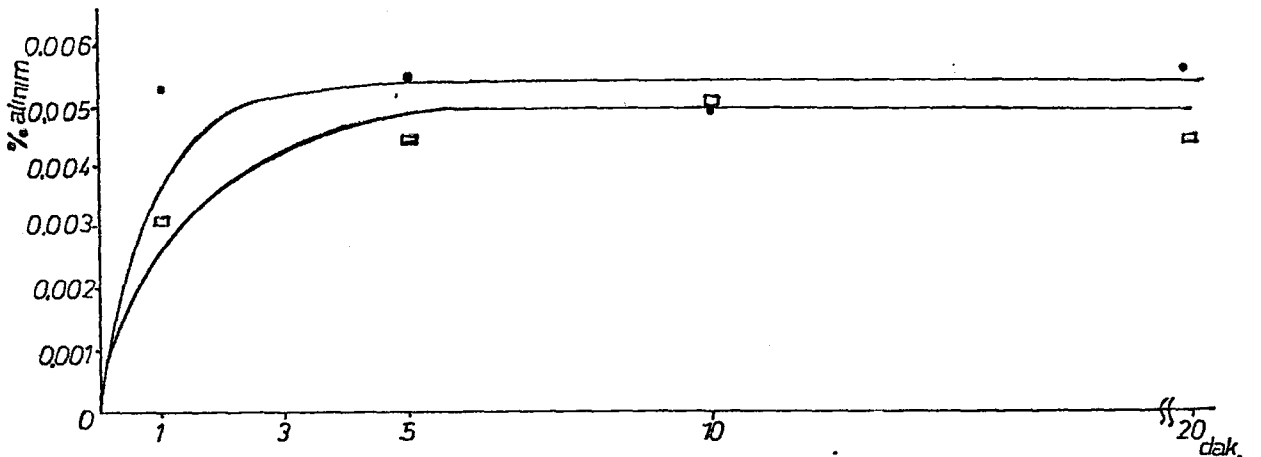


Şekil 14

İnsan lenfositlerinde glukozun 2DOG transportunun inhibisyonu

- 10 mM 2DOG
- ▲ 10 mM 2DOG + 40 mM Glukoz

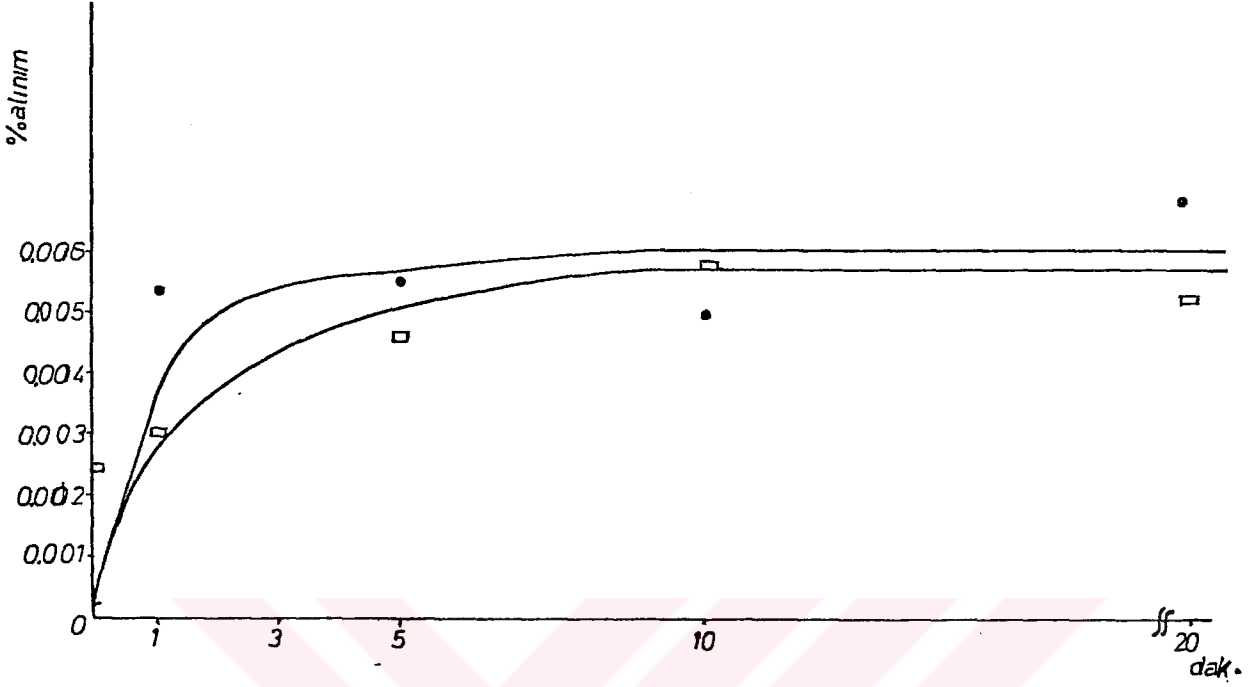
Gerek  $\text{Na}^+$  gradyanının değişikliği gerekse metabolik blokörlerle enerji pompalarının kapatılması toplam transport hızına incelenen zaman aralıklarında etki etmedi, ancak her iki durumda da bu ajanların varlığında taşıyıcının affinitelerinde farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 15,16).



Şekil 15

2DOG transportunun lenfositlerde  $\text{Na}^+$  gradyanına bağımlılığı

- 10 mM 2DOG
- 10 mM 2DOG + Cholin Cl-Hank's



Şekil 16

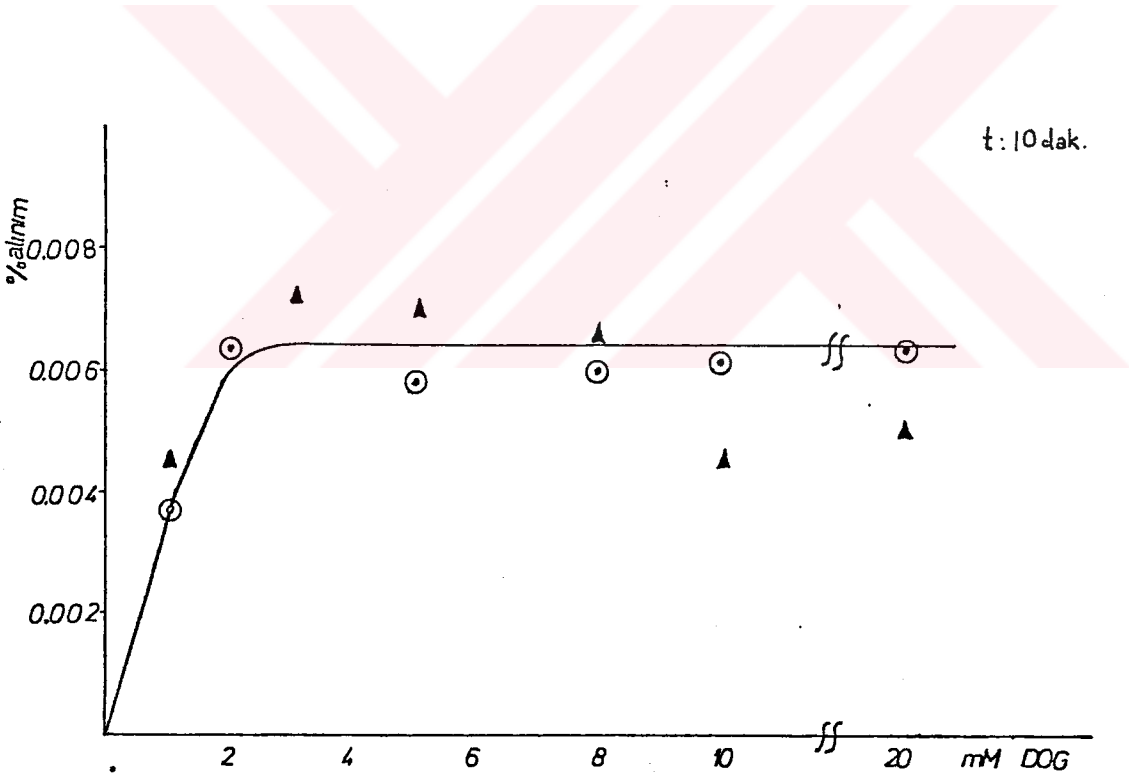
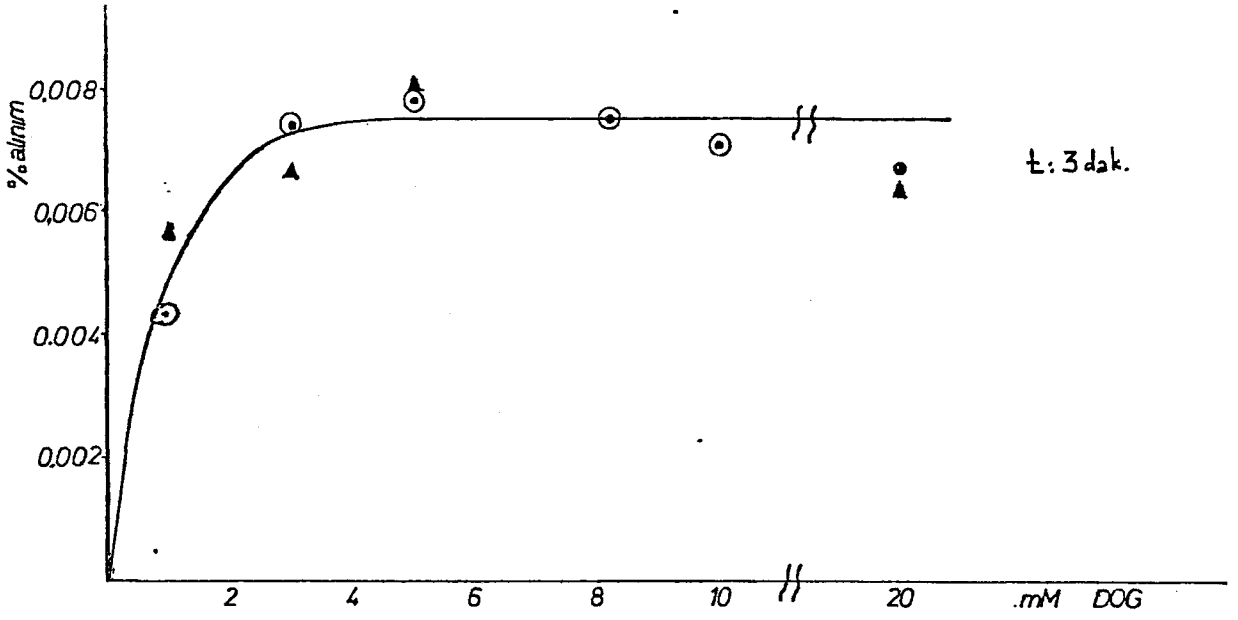
2DOG transportuna 2,4 DNF ve NaN<sub>3</sub> etkisi

• 10 mM 2DOG

□ 10 mM 2DOG + 0,1 mM 2,4 DNF + 0,1 mM NaN<sub>3</sub>

Glukoz transportuna insülinin etkisini inceleyen deneylerde 250  $\mu$ IU/ml insülin ile inkübe edilmiş hücrelerde 2DOG taşınımının değişmediği ve sistemin insülininden etkilenmediği gözlemlendi (Şekil 17).

Taşınmış 2DOG'un deney süresince hücreden geri kaçmasını (efflux) ölçmek üzere önceden radyoaktif türevle yüklenmiş hücreler inkübasyon ortamlarında bekletilerek, ortama çıkan radyoaktivite ölçüldü. İnsülinli ve insülinli ortamlarda 2DOG'un lenfositlerden efflux'ı arasındaki fark Şekil 18'de gösterilmiştir. İki değişik konsantrasyonda da insülinin geri kaçıışı tümüyle durdurduğu gözlemlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 17

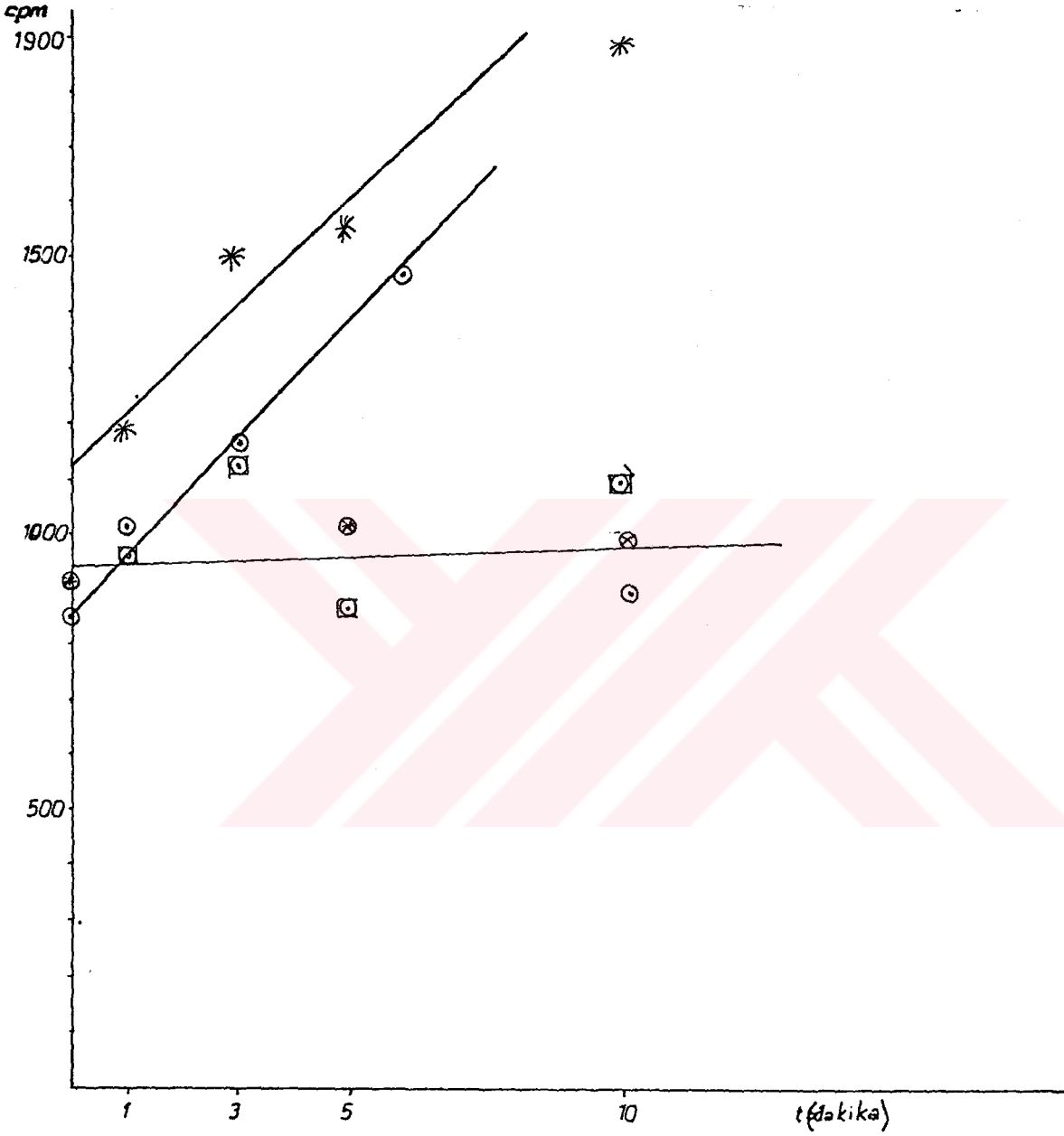
İnsan lenfositlerinde insülinin 2DOG transportuna etkisi

t = 3 dak.

t = 10 dak.

⊙ DOG

▲ DOG + İnsülin (250  $\mu$ IU/ml)



Şekil 18

İnsan lenfositlerinde 2DOG effluxı

- |             |   |                       |
|-------------|---|-----------------------|
| * 1 mM 2DOG | - | ⊗ 1 mM 2DOG + insulin |
| ⊙ 5 mM 2DOG | - | ⊠ 5 mM 2DOG + insulin |

## V. TARTIŞMA

Hücrelerin canlı kalmasında ve temel fonksiyonlarını yürütebilmelerinde en önemli besin maddeleri şüphesiz glukoz ve amino asitlerdir. Bu moleküllerin transport hızı bir çok hücre içi mekanizmada hız kısıtlayıcı kademeyi teşkil eder. Buna bağlı olarak da transport mekanizmalarının incelenmesi normal ve patolojik durumlarda hücre içi ile ilgili önemli bilgiler verir.

Son on yılda hücre membranlarından madde translokasyonunun kimyasal ve kinetik özelliklerinin incelenmesi radyoaktif analoglar sayesinde kolaylaştırılmıştır. Önceleri hücrelerin metabolik hızlarındaki değişikliklerden yararlanarak saptanmaya çalışılan transport hızları, taşınacak maddeye kimyasal olarak benzemesine karşın hücre metabolizmasınca kullanılmayan türevlerin bulunması ve bunların radyoaktif işaretlemeyle transport kinetiği çalışma imkanı doğurmuştur. Bu türevlerde aranacak özelliklerin incelenecek substrata taşıyıcı proteinleri aldatacak ölçüde benzemesi hücre içi metabolik olaylarda rol oynayan proteinleri aldatmayacak ölçüde farklı olması gibi özetlenebilir. Çalışmamızda kullanılan AIB ve 2DOG sözü edilen bu özellikleri taşımakta ve gerek karbon 14 gerekse trityum işaretli şekilleri ticari olarak bulunabilmektedir.

İnsan periferik kanından lenfosit izolasyon 1970'li yılların başlarında yoğunluk gradyanı santrifugasyonunun üni-

versalleşmesi ile pratikleşmiştir. Ficoll-Hypaque gibi yoğunluk gradyanı yaratmada çok kullanılan ayırmaların en önemli mahsuru bunlar üzerinden ayrılan hücrelerin hipertonic-hiperosmotik etkiye maruz kalmalarıdır(2,72). Bu etkilerin hücre zarında yaptığı kalıcı değişiklikler bilinmemekle beraber bu çalışmada sözü edilen yöntemde gerek yüksek canlılık ve stabilite gerekse lenfosit morfolojisinin korunmuş olması kalıcı değişikliklerin minimal olduğuna işaret etmektedir.

Lenfosit kültürleriyle yapılacak çalışmalar(73) bu artefaktları ortadan kaldırmaktaysa da mitojenlerle uyarılma ve spontan transformasyonlar gibi başka mahsurlar doğurmaktadır. Özellikle mitojenlerle uyarılma gerek şeker gerekse amino asit transportunda büyük farklılıklar doğurduğundan normal periferik lenfositleri temsil etme yeteneğini tamamen kaybetmiş bir popülasyonla çalışmayı şart kılmaktır(74,75). Diğer taraftan durağan hücreler olan periferik lenfositlerin transport mekanizmaları bu hücrelerin potansiyellerini göstermesi açısından önemlidir. Literatürde transport deneyleri genellikle uyarılmış, lenfosit kültürlerinde gerçekleştirilmiştir(27,37,40,42,43,61,76). Bundan dolayı çalışmamızda uyarılmamış lenfosit popülasyonlarını kullanmayı tercih ettik.

Lenfosit popülasyonu heterojen bir karışımdır(69). T,B,Null sınıfları ve bunların alt grupları muhtemelen minimal de olsa farklı transport kinetikleri gösterecektir. Bu çalışmada elde edilen transport kinetiklerini heterojen bir popülasyonun ortalama değerlerini verdiği akıldan çıkarılmamalıdır. Diğer taraftan sıçan timositleri ve periferik lenfositleriyle yapılan çalışmalar bu iki popülasyon arasında önemli farklar olmadığını ortaya koymaktadır. Durumun insan lenfositlerine extrapolasyonu çok gerçekçi olmamakla beraber bir fikir vermesi açısından denenmiştir.

Radyoaktif analogların taşınmasında hız tespiti için kullanılan yöntemler santrifugasyon ve ani süzme yöntemleri

olarak iki ayrı sınıf altında toplanabilir(77).

Süzme yöntemleri transportu ani durdurmada en etkili yöntemlerdir(32,77,78). Negatif basınç uygulanarak gerçekleştirilen bu yöntemlerde hücre yüzeyi deformasyonları ve yöntem sonu ölü hücre yüzdeleri yüksek olmaktadır. Özellikle büyük hücreler için geçerli olan bu durum yöntemlerin temel artıfatıdır. Ayrıca bu yöntemlerden kullanılan yıkama işlemlerinin ortam izoosmolaritesini ve iyon konsantrasyonunu değiştirmemesine dikkat etmek gerekir.

Santrifugasyon yöntemleri ise substratlı ortamdan hücrelerin ayrılmasında daha uzun zaman aralıkları kullanan yöntemlerdir(25,27,29,33,39,79). Bu yüzden bu yöntemler, ancak effluxın minimal olduğu durumlarda kullanılabilir. Lenfosit popülasyonlarının soğukta transport gerçekleştirmemeleri, effluxın ihmal edilebilir miktarda olması ile ayrıca 1:10 oranında dilüsyon transport olayının istenilen zaman aralığında kesin durdurulduğuna ve ayırım yönteminden etkilenmediğine işaret eder. Hücrelerin inkübasyon ortamından ayrılmasında phtalat gibi hidrofobik ortamların kullanılması hücre yüzeyine yapışmış inkübasyon ortamını (radyoaktiviteyi) uzaklaştırmada en etkili yöntemdir. Hidrofobik ortamların hücre yüzeyine etkileyerek taşınmış materyali geri kaçmasına imkan vermesi bu çalışmada söz konusu değildir. Yapılan kontrol değerleri phtalat fazından geçen hücrelerin % 99 oranında canlı kaldığını ve dışarıya radyoaktivite bırakmadığını göstermiştir.

Bugüne kadar literatürde rapor edilmiş amino asit transport deneyleri büyük çoğunlukla uyarılmış lenfosit kültürlerinde yapılmıştır. Gerek Con A gerekse PHA ile uyarılmış lenfositlerin transport miktarlarının büyük ölçüde artmış kinetiklerinin ise değişken olması doğaldır(31,37,47). Çalışmamızda elde ettiğimiz kinetik değerler durağan lenfosit popülasyonlarına uygulanabilecek değerler olarak göz önüne alın-

malıdır.

AIB asit transportunun incelenmesi bu türevin tek tip affiniteli ve  $K_m = 0.38$  mM olan bir taşıyıcıyla transporta uğradığını ortaya koymuştur. Erken zamanlarda lineer yürüyen transport 3 dakika sonunda durmakta ve çok az bir pasif difüzyon gözlenmektedir (% 0.0008), ayrıca bu substratla yüklenmiş lenfositlerin substratı hücreden geri bırakmadığı da bulunmuştur.

Çalışmamızda elde edilen bulgulardan AIB transportu lenfositlerde  $Na^+$  gradyanına bağlı olmayıp lösin tarafından % 50 inhibisyonun 4 mM da gerçekleşmesi AIB asidin L taşıyıcısı ile 1:1 oranında interaksiyona girdiğini göstermektedir. Diğer taraftan hücrenin metabolik enerji üretimini durduran inhibitörlerin transport hızını % 55 oranında azaltması AIB asit transportunun taşıyıcı ve enerji bağımlı bir transport olduğuna işaret eder.

Gerek % inhibisyonlar gerekse  $K_m$  ve  $K_{0.5}$  inhibisyon değerleri heterojen bir popülasyonun ortalama değerlerini göstermektedir.

Sonuç olarak periferik insan lenfositlerinde 2 AIB transportunun % 50'sinin L sistemiyle geri kalanının ise  $Na^+$  gradyanından etkilenmeyen modifiye bir A sistemi ile taşındığını söyleyebiliriz.

Glukoz hücrelerin gerek durağan fazda gerekse aktif fazlarında temel enerji kaynağıdır. Glukozun transport kinetiğini etkileyen iki önemli faktör, taşınma hızı ve fosforilasyon hızıdır. Genelde glukoz transportu bu iki parametrenin bir bileşkesi olarak karşımıza çıkar. Her iki parametrenin 2DOG kullanılarak incelenebileceği önceki deneylerde tespit edilmiş bir gerçektir(54). Lenfositlerde yapılan glukoz

transport deneyleri genellikle PHA veya Con A ile uyarılmış lenfosit kültürlerinde yürütülmüştür(60,61,63,64,73,74,75, 80). Bu çalışma da ise uyarılmamış lenfosit popülasyonları kullanılarak periferik lenfositlerin glukoz kullanım kinetiği incelenmek istenmiştir. Yüksek spesifik aktiviteli radyoaktif türevlerin kullanılması AIB deneylerinde olduğu gibi glukoz transportunda da minimal olan transportu ölçmeyi mümkün kılmıştır.

2DOG transportunun gerek sodyuma gerekse enerjiye fazla bağımlı olmadığı tespit edilmiştir. Her ne kadar memeli hücrelerinde glukozun  $Na^+$  simportu ile taşındığı bilinmekte ise de kolin klorürlü deneylerde transport hızında fark gözlenmemesi muhtemelen deney süresince mevcut  $Na^+$  gradyanının transportu yürütebilecek düzeyde olmasına bağlıdır. Diğer taraftan transportun floretin ile tamamen bloke oluşu ve glukozla durdurulabilmesi 2DOG'un saf glukoz taşıyıcısı ile taşındığının en önemli delilleridir. Glukoz taşınımına insülinin etkisi pek çok memeli hücresinde incelenmiştir, hatta memeli hücrelerini insülin bağımlı, insülin bağımsız diye sınıflandırma alışıl gelmiş bir eğilimdir. Literatürde glukoz taşınımına insülinin etkisi ile ilgili hiç bir sonuca rastlanmamıştır. Ders kitaplarının bazılarında lökositler genel olarak insülin bağımsız glukoz taşırlar denilmekte ise de bazılarında tersi doğrudur. Bu çalışmada insan periferik lenfositlerinin glukoz transportuna gerek geç gerek erken zamanlarda insülinin etkisi olmadığı gösterilmiştir. Diğer taraftan 2DOG ile doyurulmuş lenfositlerden şekerin geri kaçıışı izlendiğinde insülin varlığında 2DOG'un hücreden çıkmadığı bulunmuştur.

Normal lenfositlerde insülin reseptörlerinin bulunmadığı, mitojenlerle uyarılmış lenfositlerde ise bu reseptörlerin ortaya çıktığı iddia edilmişse de(39) çalışmamızda fosforilasyonun artması mutlaka normal periferik insan lenfositlerinde insülin mesajını hücre içine taşıyacak bir sistemin bulunması gereğini ortaya koymaktadır.

İnsülinli ortamda belirli bir hızda efflux yapan 2DOG'un insülinli ortamda hücre içinde kalması fosforile olduğunun en önemli işaretidir. O halde insülin her ne kadar transport hız ve kinetiğine etki etmiyorsa da hücre içi fosforilasyonunun hızını arttırarak 2DOG'un mutlak hücre içinde kalmasını sağlamaktadır. Bu bulguya dayanarak da 2DOG efflux'ını normal kinetik incelemelerde düzeltme faktörü olarak kullanılmasına gerek olmadığına karar verilmiştir. O halde bu bulgulara dayanarak lenfositleri karaciğer hücresi gibi taşınım için insülinle bağımsız fakat kullanım için insüline bağımlı glukoz taşıyan hücreler olarak sınıflandırmak mümkündür. Hücre içi fosforilasyonun transport hızını ölçmede ne derece etkili olduğu transport kinetiklerinin fosforilasyon kinetikleri ile çakışmasının miktarının tesbiti mutlaka araştırılması gereken konular olarak ortaya çıkmaktadır.

## VI. ÖZET

Hücrelerin canlı kalmasında ve temel fonksiyonlarını yürütebilmelerinde en önemli besin maddeleri glukoz ve amino asitlerdir. Bu moleküllerin transport hızı bir çok hücre içi mekanizmada hız kısıtlayıcı kademeyi teşkil etmektedir. Bu nedenle, transport mekanizmalarının incelenmesi normal ve patolojik durumlarda hücreyle ilgili önemli bilgiler verir.

Çalışmamızda, insan periferik lenfositlerinde glukoz ve amino asit transport hızını inceleyecek pratik bir yöntem kurmayı amaçladık. Glukoz transport çalışmalarında bir glukoz analogu olan 2-deoksiglukoz (2DOG), amino asit transport çalışmalarında ise bir amino asit türevi olan 2-Amino izobutirik asit (2AIB) kullanıldı.

2DOG alınımı çalışmalarında, transportun 10 dakika süre ile lineer olduğu gözlenmiştir. Yapılan efflux deneyleri 2DOG ile doyurulmuş hücrelerin 10 dakika içinde yaklaşık % 35 2DOG geri verdiğini göstermiştir. Taşınımın glukoz tarafından tamamen inhibisyonu 2DOG'un glukoz taşıyıcısı ile taşındığını, 2DOG taşınımının metabolik enerjiye ve  $Na^+$  gradyanına bağımlı olmaması ve floretin ile bloke olması ise 2DOG'un lenfositlerde kolaylaştırılmış difüzyon ile taşındığını düşündürmektedir.

Zamana karşı AIB'nin transportu incelendiğinde, ilk üç dakikada transportun lineer gittiği daha sonra durduğu

gözlendi. Ayrıca, AIB ile yüklenmiş lenfositlerde yapılan deneyler, bu sübstratın hücreden geri kaçmadığını (efflux), AIB transport sisteminin metabolik enerjiye bağımlı olduğunu, Na<sup>+</sup> gradyanından etkilenmediğini ve L-Lösin ile kısmen inhibisyona uğradığını göstermiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular insan periferik lenfositlerinde 2DOG transportunun kolaylaştırılmış difüzyonla AIB'nin ise aktif transportla taşındığını göstermektedir.



## VII. SUMMARY

Glucose and amino acids are the vital nutrients required for the basic functions of cells. The transport rate of these molecules are the rate limiting steps for many intracellular mechanisms. Therefore, the study of transport mechanisms gives valuable information about the normal and pathological conditions of the cell.

In this study, we have attempted to develop a practical method to investigate glucose and amino acid transport systems in human peripheric lymphocytes. For this reason, 2-Deoxyglucose (2DOG) was used in the glucose transport studies and 2-aminoisobutyric acid was used in the amino acid transport studies.

2DOG transport was observed to be linear for ten minutes. Efflux studies showed that 35% of 2DOG escaped from the previously loaded cells in ten minutes. Complete inhibition of the 2DOG transport by glucose verifies that glucose and 2DOG are carried by the same transport system. The fact that 2DOG transport is independent of both sodium gradient and metabolic energy, and that it is inhibited by phloretin led us to believe that 2DOG is transported by facilitated diffusion.

When AIB transport was investigated, it was found that AIB transport was linear for the first 3 minutes. Efflux

experiments showed that AIB did not escape from the cells. In addition, AIB transport was dependent on metabolic energy, was independent of sodium gradient and was partially inhibited by L-leucine.

In conclusion, our results showed that 2DOG is transported by facilitated diffusion whereas, AIB is transported by active transport in human peripheral lymphocytes.

## VIII. KAYNAKLAR

- 1- Janquiera,L.C., Carneio,J., Basic Histology, s.262-270. Lange Medical Pub., 1983.
- 2- Turhan,A., Normal ve Malign lenfoproliferatif hastalıklarda Con A ve ANS aracılığı ile hücre yüzey özelliklerinin incelenmesi, 1982.
- 3- Janeway,A.C. (1985): Lymphocytes, J. Mol. Cell. Imm. 2:57-59.
- 4- Scriver,C.R., Tennenhouse,H.S., Genetics and Mammalian transport systems. Annals New York, Acad. Sci. 456:384-397.
- 5- Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., Watson,J.D., Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York (1983).
- 6- Özgüç,M., Meningiom hücrelerinde glukoz ve amino asit transportunun hız ve kinetiğinin incelenmesi, Doktora Tezi, 1985.
- 7- Ladoulis,Gill,Chen,Mısra (1975): Structure and metabolism of lymphocyte membrane. Prog. Allergy 18:212-288.

- 8- Clawson,C.C., Good,R.A. (1971): Micropapillaea a surface specialization of human leucocytes. J. Cell. Biol. 48:207-211.
- 9- Polliack,A., Lampell,N., Clarkson,B.D., Harven,E., Bentwich,H.B., Siegal,F.P., Kunkel,H.C. (1973). Identification of human B and T lmyphocytes by scanning electron microscopy. J. Exp. Med. 138:607.
- 10- Scott,R.E., Marcheshi,V.T. (1972): Structural changes in membranes of transformed lymphocytes demonstrated by freeze etching. Cell. Immun. 3:301.
- 11- Mc Intrye,J.A., Karnovsky,J.J., Gilula,N.B. (1973):Intra-membranous particle aggragates in lymphoid cells. Nature New Biol. 245:147.
- 12- Raff,M.C., Petris,S.De (1973): The movement of lymphocyte surface antifens and receptors Fed. Proc. 32:48.
- 13- Winzler,R.J. (1970): Carbohydrates in cell surfaces. Int. Rev. Ctol. 29:77.
- 14- Blitterswijk,W.J.Van, Emmelot,P., Feltkamp,C.A. (1973): Studies of plasma membranes Biochim. Biophys. Acta. 298:577.
- 15- Flickinger,C.J., Brown,J.C., Kutchai,M.C., Ogilivie,J.W., Medical Cell Biology. W.B.Saunders Company (1981), s.385-399.
- 16- Wilson,B.d. (1978): Cellular Transport Mechanisms. Ann. Rev. Biochem. 47:933-965.

- 17- Christensen, H.N. (1985): On the strategy of kinetic discrimination of amino acid transport systems. *J. Membrane Biol.* 84:97-103.
- 18- Oxender, L.D., Christensen, H.N. (1963): Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich Cell. *Jour. Biol. Chem.* 238:3686-3698.
- 19- Christensen, H.N. (1973): On the development of amino acid transport systems. *Fed. Proc.* 32:19-28.
- 20- Christensen, H.N., Antoniolli, J.A. (1968): Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. *Jour. Biol. Chem.* 244:1497-1504.
- 21- Vadgama, V.J., Christensen, H.N. (1984): Discrimination of the Na<sup>+</sup> independent transport systems L, T, and asc in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 26:2912-2912.
- 22- Christensen, H.N., Handlogten, M.E., Lam, I., Tager, H.S., Zand, R. (1969): A bicyclic amino acid to improve discriminations among transport systems. *J. Biol. Chem.* 244:1510-1520.
- 23- Segel, G.B., Tametsko, A.M., Lichtman, M.A. (1985): Y<sup>+</sup> and L system amino acid transport in normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 242:347-354.
- 24- Finkelstein, M.C., Adelberg, E.A. (1977): Neutral amino acid transport in an established mouse lymphocytic cell line. *J. Biol. Chem.* 252:7101-7108.

- 25- Christensen,H.N., Cullen,A.M. (1969): Behavior in the rat of a transport specific bicyclic amino acid. J. Biol. Chem. 244:1521-1526.
- 26- Segel,G.B., Simon,W., Lichtman,M.A. (1983): A multicomponent analysis of amino acid transport systems in human lymphocytes. J. Cell. Physiol. 116:372-378.
- 27- Segel,G.B., Lichtman,M.A. (1981): Amino acid transport in human lymphocytes. J. Cell. Physiol. 106:303-308.
- 28- Thomas,E.L., Christensen,H.N. (1971): Nature of the cosubstrate action of  $\text{Na}^+$  and neutral amino acids in a transport system. J. Biol. Chem. 246:1682-1688.
- 29- Vadgama,J.V., Christensen,H.N. (1986): A new  $\text{Na}^+$  independent transport system for dipolar amino acids. Annals New York Acad. Sci. 456:454-456.
- 30- Oxender,D.L., Lee,M., Cecchini,G. (1977): Regulation of amino acid transport activity and growth rate of animal cells in culture, J. Biol. Chem. 252:2680-2683.
- 31- Tate,E.H. (1982): Antigen specific stimulation of amino acid transport in bovine lymphocytes. J. Cell. Physiol. 113:307-313.
- 32- Glassy,C.M., Furlong,C.E. (1981): Neutral amino acid transport during the cell cycle of cultured human lymphocytes. J.Cell. Biol. 107:69-74.
- 33- Tupper,J.J., Mills,B., Zorngiotti,F. (1976): Membrane transport in synchronized Ehrlich Ascites tumor cells. J. Cell. Physiol. 88:77-88.

- 34- Bussolati,O., Laris,C.P., Longo,N., Asta,V.D., Gazzola,G.C. (1986): Effect of extra cellular  $K^+$  on amino acid transport and membrane potential in fetal human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 854:240-250.
- 35- Petronini,P.G.,Gandolfi,S.A., Borghetti,A.F. (1985): The effect of the intra cellular sodium level on the activity of amino acid transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 815:361-368.
- 36- Riggs,T.R., Walker,L.M., Christensen,H.N. (1958):  $K^+$  migration and amino acid transport *J. Biol. Chem.* 233:1479-1484.
- 37- Klip,A.J., Mack,E., Cragoe,E.J., Grinstein,S. (1986): Regulation of amino acid uptake by phorbol esters and hypertonic solutions in rat thymocytes. *J. Cell. Physiol.* 127:244-252.
- 38- Van der Berg,K.J., Betel,I. (1973): Increased transport of 2AIB in rat lymphocytes stimulated with ConA. *Exp. Cell. Res.* 76:63-72.
- 39- Buffington,C.K., El Shiekh,T., Kitabchi,A.E., Matteri,R. (1986): PHA activated human T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 134:412-419.
- 40- Peters,H.J., Hausen,P. (1971): Effect of PHA on lymphocyte membrane transport. *Eur. J. Biochem.* 19:509-513.
- 41- Hirschhorn,R., Hirschhorn,K., Weissmann,G. (1967): Appearance of hydrolase rich granules in human lymphocytes induced by PHA and antigens. *Blood* 30:84-102.

- 42- Borgetti,A.F. (1979): Enhanced transport of natural amino acids after activation of pig lymphocytes. *Biochem. J.* 182:27-32.
- 43- Ardawi,M.S.M., Newsholme,A.E. (1985): The transport of glutamine into rat mesenteric lymphocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 856:415-420.
- 44- Van der Berg, Betel,I. (1973): Selective early activation of Na<sup>+</sup> dependent amino acid transport system in stimulated rat lymphocytes. *Febs. Letters* 29:149-152.
- 45- Bayer,B.M., Almeida,A.P., Beaven,M.A. (1981): Inhibition of the expression of the a system of amino acids transport by the anti inflammatory drugs. *J. Pharm. Exp. Ther.* 219:753-759.
- 46- Peck,W.A., Rockwell,L.H., Lichtman,M.A. (1976): Adaptive enhancement of amino acid uptake and exodus by thymic lymphocytes. *J. Cell. Physiol.* 89:417-428.
- 47- Bannai,S., Kitamura,E. (1982): Adaptive enhancement of cystine and glutamate uptake in human diploid fibroblasts in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 721:1-10.
- 48- Frengley,P.A., Lichtman,M.A., Peck,W.A. (1975): Adaptive enhancement of amino acid transport in human leukemic leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 86:984-997.
- 49- Lerner,J. (1985): Review-Effectors of amino acid transport processes in animal cell membranes. *Comp. Biochem Physiol.* 81A:713-739.
- 50- Guidotti,G.G., Borgetti,A.F., Gazzola,G.G. (1978): The regulation of amino acid transport in animal cells. *Biochim Biophys. Acta* 515:329-366.

- 51- Wright, J.K., Seckler, R., Overath, P. (1986): Molecular aspects of sugar transport. *Ann. Rev. Biochem.* 55:225-248.
- 52- Kasahara, M., Invi, K. (1985): Distinction of three types of D-glucose transport systems in animal cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 132:490-496.
- 53- Whitesell, R.R., Gliemann, J. (1978): Kinetic parameters of transport of 3-OMG and glucose in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 254:5279-5283.
- 54- Leoncini, G., Maresca, M. (1986): Glucose transport across plasma membrane in human platelets. *Ital. J. Biochem.* 35:287-295.
- 55- Salomon, H.M., Gaut, Z.N. (1970): *Biochem. Pharma.* 19:2631-2638.
- 56- D'amore, T. Lo, T.C.Y. (1986): Hexose transport in L6 rat myoblasts. *J. Cell. Physiol.* 127:95-105.
- 57- Walum, E., Edström, A., (1975): Kinetics of 2DOG transport into cultured mouse neuroblastoma cells. *Expt. Cell. Res.* 97:15-22.
- 58- D'amore, T., Lo, C.Y.T. (1986): Hexose transport in L6 rat Myoblasts II. The effects of sulfydryl reagents. *J. Cell. Physiol.* 127:106-113.
- 59- Walim, E., Edström, A., Kanje, M. (1976): Density dependent inhibition of 2DOG uptake into glioma and neuroblastoma cells in culture medium. *Exp. Cell. Res.* 97:6-14.

- 60- Lee,L.S., Weinstein,B.I. (1979): Membrane effects of tumor promoters. J. Cell. Physiol. 99:451-460.
- 61- Nordenberg,J., Stenzel,K.H., Novogrosky,A. (1983): TPA and Con A enhance glucose uptake in thymocytes by different mechanisms. J. Cell. Physiol. 117:183-188.
- 62- Mookerjee,K.B., Cuppoletti,J., Rampell,A.L., Jung,C.Y. (1981): Effects of cytochalasins on lymphocytes. J. Biochem. Chem. 256:1290-1300.
- 63- Farese,U.R., Starndaert,M.L., Barnes,D.E., Davis,J.S., Pollet,R.J. (1985): Phorbol esters provokes insulin like effects on glucose transport. Endocr. 116:2650-2655.
- 64- Kirsch,D., Obermaier,B., Haring,H.U., (1985): Phorbol esters enhance basal D-glucose transport but inhibit insulin stimulation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 128:824-832.
- 65- McCall,C., Schmitt,J., Cousart,S., O'Flaherty,J., Bass,D., Wyke,R. (1985): Stimulation of hexose transport by human polymorphonuclear leucocytes. 126:450-456.
- 66- Nordenberg,J., Stenzel,K.H., Novogrosky,A. (1984): The Na<sup>+</sup> Ionophore monensin enhances glucose uptake in mouse thymocytes. 16:837-840.
- 67- Türel,Ö., Organ transplantasyonları ve cyclosporin A. s.21. (1985): Fatih Gençlik Vakfı Matbaa İşletmesi, İstanbul.
- 68- Terasaki,P.I. et al. Manuel of tissue typing techniques. Bathesde 1972.
- 69- Hudson,L., Hay,F., Practical Immunology Blackwell Scientific Pubc., 1976, s.31.

- 70- Wise,W.C. (1978): Amino acid transport in thymic spleen derived lymphocytes. *J. Cell. Physiol.* 97:161-168.
- 71- Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L., Randoll,R.J. (1951): Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 72- Boyum,A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21(Supp 97):77.
- 73- Rees,D.W., Gliemann,J. (1985): A kinetic analysis of hexose transport in cultured human lymphocytes IM-9. *Biochim. Biophys. Acta* 812:98-106.
- 74- Whitesell,R.R., Johnson,A.A., Tarpley,H.L., Regen,D.M. (1977): Mitogen stimulated glucose transport in thymocytes. *J. Cell. Biol.* 72:456-469.
- 75- Yasmeen,D., Laird,A.J., Hume,D.A., Weidemann,M.J. (1977): Activation of 3OMG transport in rat thymus lymphocytes by Con A. *Biochim. Biophysc. Acta.* 50:89-102.
- 76- Segel,B.G., Simon,W., Lichtman,M.A. (1979): Regulation of sodium and potassium transport in PHA stimulated human blood lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 64:834-841.
- 77- Yardımcı,T., Histidine permease system in *Escherichia coli*, 1970. *Doktora Tezi.*
- 78- Reeves,J.P. (1977): 3OMG transport by rat thymocytes subpopulations. *J. Cell. Physiol* 92:309-318.
- 79- Peck,W.A., Rockwell,L.H., Lichtman,M.A. (1976): Adaptive enhancement of aminoacid uptake and exodus by thymic lymphocytes. *J. Cell. Physiol.* 89:417-428.

80- Hume, D.A., Weidemann, M.J. (1978): On the stimulation of rat thymocyte 3OMG transport by mitogenic stimuli. J. Cell. Physiol. 96:303-308.

IX. EKLER

EK 1

KİMYASAL MADDELER ARAÇ VE GEREÇLER

A. Kimyasal Maddeler

- 2 Deoksiglukoz (Sigma D 8375)  
2 Deoksi D ( $1^3\text{H}$ ) Glukoz (Amersham TRK 383 25 Ci/mmol)  
2 Amino İzobutirik asit (Sigma A 8504)  
2 Amino ( $1^{14}\text{C}$ ) İzobutirik Asit (Amersham FA 203 56 mCi/mmol)  
Bovine Serum Albumin (Sigma A 4503)  
Phloretin (Sigma P 4268)  
Sodyum Azid (Merck 6688)  
2-4 Dinitrophenol (Sigma D 7004)  
L-Lösin (Sigma L 8000)  
Triton X100 (Sigma T 6876)  
Choline Clorür (Sigma C 1879)  
Histopaque (Sigma 1077)  
PPO (Sigma D 4630)  
POPOP (Sigma D 2270)  
Folin and Ciacalteus Rgt (Sigma F 9252)  
Dioxan (Merck 3115)  
Heparin = Liquemin (Roche)  
EDTA (Sigma E 9884)  
İnsulin (Organon)  
Glukoz (Merck 8337)  
Dioctyl phtalat (Fluke CH 9470)  
Dibutyl phtalat (Sigma D 2270)

## BAZI SOLÜSYONLARIN HAZIRLANIŞI

### B. BRAY SAYIM ÇÖZELTİSİ

Naftalin : 80 g  
PPO : 4.0 g  
POPOP : 0.2 g  
Metanol : 100 ml  
Etilen glikol : 21 ml  
Dioksan ile 1 lt.ye tamamlanır.

### PBS (Phosphate Buffered Saline) pH = 7.4

NaCl : 8 g/lt  
KCl : 0.2 g/lt  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O : 2.8652 g/lt (0.008M)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.2 g/lt

### HANK's

NaCl : 8.0 g/lt  
CaCl<sub>2</sub> : 0.2 g/lt  
MgSO<sub>4</sub> : 0.2 g/lt  
KCl : 0.4 g/lt  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.1 g/lt  
NaHCO<sub>3</sub> : 1.27 g/lt

### EDTA

% 0.9 NaCl içinde % 2 lik hazırlanıp pH:7.4 ayarlanır.

### Tripan Mavisi

% 0.2 olarak hazırlandı.

C. ARAÇ VE GEREÇLER

Su Banyosu (Dedeoğlu)  
Santrifüj (Herauş Digifue GL)  
Beta Sayacı (Packard 4530)  
Işık Mikroskobu (Olympus CH3)  
Spektrofotometre (Sequoia-Turner)  
pHmetre (Sesa Mod 1400)  
Manyetik Karıştırıcı (Nel)  
Girdap Karıştırıcı (Elektro Mag)

EK 2

KİMYASAL MADDELERLE İLGİLİ BİLGİLER

1- 2-AMINO İZOBUTİRİK ASİT - 2AIB

$C_4H_9NO_2$  Mol. Ağırlığı: 103

Su metanol ve alkolde kolayca çözülür.

2- 2 DEOKSİ GLUKOZ - 2DOG

$C_6H_{12}O_5$  (2 Deoksi D arabino heksoz)

Mol. Ağırlığı: 164.2

Influenza virüsünün üremesini durdurur ve herpex simplexe antiviral etki eder.

3- L-LÖSİN (2-amino 4-metil valerik asit)

$C_6H_{13}NO_2$  Mol. Ağırlığı: 115

İnsan vücudunda sentez edilmez, organizma için esansiyel bir maddedir.

4- 2,4 DİNİTROFENOL

$C_6H_4N_2O_5$

Mol ağırlığı: 184.72

Elektron transport zincirinde hidrojen akımını durdurmadığı halde ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunu önler.

5- SODYUM AZİD  $NaN_3$

Mol. Ağırlığı: 68.02

Isıtıldığında  $Na+N_2$  ye ayrışır.

Sitokrom oksidaz inhibitörüdür.

6- FLORETİN

$C_{15}H_{15}O_{15}$

Mol ağırlığı: 274

Suda eterde çözünmez, alkol, metanol, aseton, alkali sölüsyonlarda ve sıcak glasiyel asetik asitte çözünür. Benzen ve kloroformda çok az çözünür.

7- DİBUTIL PHTALAT

$C_{16}H_{22}O_4$  Mol ağırlığı: 278.34  
D = 1.04

8- DİOKTİL PHTALAT

$C_{24}H_{38}O_4$  Mol ağırlığı: 390.54

9- BCH (2-amino 2-karboksi bisiklo (2,2,1) heptan)

İdrarla hemen hemen hiç değişime uğramadan çıkar. Plazma-  
dan çok karaciğer ve pankreasta birikir.



EK 3

ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN VE ADI GEÇEN BAZI MADDELERİN  
SERUM KONSANTRASYONLARI

Glukoz

3.89-5.83 m mol/L

Lösin

75-175 m mol/L

(0.98-2.29 mg/dl)

İzolösin

37-98 m mol/L

(0.48-1.28 mg/dl)

Glisin

0.79-3.92 m mol/L

(0.59-2.95 mg/dl)

Hidroksiprolin

0-42 m mol/L

(0-0.55 mg/dl)

Glutamin

0.41-1.1 m mol/L

(6-16 mg/dl)

Fenil alanin

(0.8-1.8 mg/dl)

0.05-0.11 m mol/L

Pirüvik asit

0.03-0.1 m mol/L

0.3-0.9 mg/dl

İnsülin

250 µIU/ml

V. G.  
Yükseköğretim Kurumu  
Dokümantasyon Merkezi