

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE APLASTİK ANEMİLİ HASTALARIN  
T HÜCRE RESEPTÖR SİNYAL YOLUNDAKİ GEN  
İFADELERİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ**

Esra CAN UÇAR

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
PEDİATRİK HEMATOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI  
Prof. Dr. Yurdanur KILINÇ

ADANA-2019

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE APLASTİK ANEMİLİ HASTALARIN  
T HÜCRE RESEPTÖR SİNYAL YOLUNDAKİ GEN  
İFADELERİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ**

Esra CAN UÇAR

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
PEDIATRİK HEMATOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI  
Prof. Dr. Yurdanur KILINÇ

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TYL-2017-9150 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2019

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince engin bilgilerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, kendisini tanıdığım ilk günden bu yana bana çok değerli akademik bilgiler öğreten ve her zaman yanımda olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Yurdanur KILINÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın uygulama aşamalarında laboratuvarlarının imkanlarını esirgemeyen ve her zaman destek olan Tıbbi Biyokimya AD Başkanı Prof. Dr. Abdullah TULİ ve Dr. Ebru DÜNDAR YENİLMEZ'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince kendilerinden çok kıymetli bilgiler öğrendiğim Prof. Dr. H. İlgen ŞAŞMAZ, Doç. Dr. Göksel LEBLEBİSATAN hocalarıma, yardımlarını esirgemeyen bölümümüz asistan doktorları ve hemşirelerine çok teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım boyunca her daim yanımda olan ve beni destekleyen babam Ramazan CAN, annem Berrin CAN'a ve tüm aileme çok teşekkür ederim.

Her defasında beni yüreklendiren, savaşmayı öğreten, hayata bakış açımı zenginleştiren, bana sevgisini ve saygısını daima hissettiren sevgili eşim Onur UÇAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreçte manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Canan ARIKAN TALAŞ, Ümmühan DURMAZ ve Hazal SAĞ VARKAL'a çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b>	ii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iv
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b>	vii
<b>FOTOĞRAF DİZİNİ</b>	viii
<b>TABLO DİZİNİ</b>	ix
<b>GRAFİK DİZİNİ</b>	x
<b>KISALTMA LİSTESİ</b>	xi
<b>ÖZET</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>1.GİRİŞ</b>	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Lenfositler	3
2.1.1. T Lenfositler	3
2.1.1.1. T lenfositlerin Gelişimi, Fonksiyonları ve Histokimyasal Özellikleri	3
2.1.1.2. İmmünolojik Sinaps	4
2.1.1.3. T hücre gelişimi	5
2.1.1.4. T hücre fonksiyonları	5
2.1.1.5. T hücre aracılı immünitinin olgunlaşması - T hücre hafızası	5
2.1.1.6. T hücre aracılı İmmünitinin Baskılanması - Uygunsuz T hücre cevabının Önlenmesi	5
2.1.1.7. Sitotoksik T Lenfositler	6
2.1.1.8. Yardımcı T Lenfositler	6
2.1.1.9. Baskılayıcı T Lenfositler	7
2.1.1.10 Bellek T Lenfositler	7
2.1.2. B Lenfositler	8
2.1.2.1. B lenfositlerin Gelişimi, Fonksiyonları ve Histokimyasal Özellikleri	8
2.1.2.2. Plazma Hücresi	9

2.1.2.3. Bellek B Hücreleri	9
2.2. Primer ve Sekonder Humoral İmmün Yanıtlar ve Genel Özellikleri	10
2.3. Doğal Öldürücü Hücreler (NK – Natural Killer)	11
2.4. Aplastik Anemi	11
2.4.1. Aplastik Aneminin Epidemiyolojisi	12
2.4.2. Aplastik Aneminin Fizyolojisi	12
2.4.3. Aplastik Aneminin Laboratuvar Bulguları	13
2.4.4. Aplastik Aneminin Şiddeti	13
2.4.5. Aplastik Aneminin Klinik Özellikleri	14
2.4.6. Aplastik Anemiye Neden Olan İlaçlar	16
2.4.7. Aplastik Anemi Tedavisi	17
2.4.8. Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu	18
2.5. Fanconi Anemisi	18
2.5.1. Fanconi Anemisinin Klinik Bulguları ve Semptomları	19
2.5.2. Fanconi Anemisinin Laboratuvar Bulguları	19
2.5.3. Fanconi Anemisinin Terapisi	19
2.6. Aplastik Anemi ile İlişkili Bozukluklar	20
2.6.1. Saf Eritroid Aplazisi	20
2.6.2. Diamond-Blackfan Sendromu	21
2.6.3. Çocukluk Çağı Geçici Eritroblastopenisi	21
2.6.4. Konjenital Diseritropoetik Anemi	21
2.7. Aplastik Anemi ile İlişkili Genler	22
2.7.1. CD28 Geni	22
2.7.2. CTLA-4 Geni	22
2.8. Real Time PCR Teknolojisi	23
<b>3.BİREY VE YÖNTEM</b>	<b>25</b>
3.1. Tam Kanlardan Eritrositlerin Uzaklaştırılması İşlemi	25
3.2. Lökositlerden RNA İzole Etme İşlemi	26
3.3. RNA'lardan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	27
3.4. Real Time PCR Tekniği ile Gen Ekspresyonu Düzey Tespiti	28
3.5. Gen Ekspresyonu Düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Metoduyla Hesaplanması	29
3.6. İstatistiksel Analiz	30

<b>4.BULGULAR</b>	31
<b>5. TARTIŞMA</b>	36
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	40
<b>7. KAYNAKLAR</b>	42
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	48



## ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1.** Şiddetli aplastik anemide kemik iliği.  
Sellülarite belirgin bir şekilde azalır. 14
- Şekil 2.** Aplastik anemi vakasından işaretli hiposelüler ilik parçası.  
Sadece bir kaç kalıntı hematopoietik hücre vardır, parçaların çoğu yağ hücrelerinden oluşmaktadır. 15
- Şekil 3.** CTLA-4 yolculuk mekanizmaları. 23



## FOTOĞRAF DİZİNİ

<b>Fotoğraf 1.</b> FAA'lı hasta. Mikrosefali, mikroftalmi mevcut. 17 yaş, 150 cm, 45 kg, ellerde dört parmak mevcuttur.	15
<b>Fotoğraf 2.</b> Periorbital ekimozlu AA'lı bir hasta.	16
<b>Fotoğraf 3.</b> <i>Pseudomonas septicemia</i> 'li AA'lı bir hastada deri lezyonları.	16
<b>Fotoğraf 4.</b> FAA'lı hasta. 6 yaş, 99 cm, 13 kg, sol elde dört parmak vardır.	17
<b>Fotoğraf 5.</b> 4 yaşında FAA'lı erkek hasta, 54 cm, sağ elde dört parmak vardır.	18





## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> ACTB, CD28 ve CTLA-4 genleri için kullanılan Real Time PCR karışımı.	29
<b>Tablo 2.</b> ACTB, CD28 ve CTLA-4 genlerinin ekspresyon düzeyi tespiti için kullanılan Real Time PCR ısı protokolü.	29
<b>Tablo 3.</b> Kontrol ve Hasta Gruplarının Ortalama, Median ve p Değerleri Tablosu.	33



## GRAFİK DİZİNİ

<b>Grafik 1.</b> Hasta ve kontrol gruplarının “Beta Actin” referans genlerine ait, Real Time PCR metoduyla elde edilmiş gen ekspresyon grafik görüntüsü.	31
<b>Grafik 2.</b> Hasta ve kontrol gruplarının “CD28” hedef genlerine ait, Real Time PCR metoduyla elde edilmiş gen ekspresyon grafik görüntüsü.	32
<b>Grafik 3.</b> Hasta ve kontrol gruplarının “CTLA-4” hedef genlerine ait, Real Time PCR metoduyla elde edilmiş gen ekspresyon grafik görüntüsü.	32
<b>Grafik 4.</b> AA’lı hasta grubu ve kontrol grubunun CD28 gen ekspresyon düzeyi kutu grafiği.	33
<b>Grafik 5.</b> AA’lı hasta grubu ve kontrol grubunun CTLA-4 gen ekspresyon düzeyi kutu grafiği.	34
<b>Grafik 6.</b> AA’lı hasta grubu ve kontrol grubunun CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri Spearman korelasyon grafiği.	35

## KISALTMA LİSTESİ

**AA** Aplastic Anemia

**CDA** Congenital Dyserythropoietic Anemia

**cDNA** Complementary DNA

**CP** Crossing Point

**GM-CSF** Granulocyte-Macrophage Colony–Stimulating Factor

**GVHD** Graft Versus Host Disease

**HLA** Human Leukocyte Antigen

**IL** Interleukin

**MALT** Mucosa Associated Lymphoid Tissue

**MDS** Myelodysplastic Syndrome

**MHC** Major Histocompatibility Complex

**MIF** Macrophage Migration Inhibitory Factor

**MIQE** Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time-PCR

Experiments

**NK** Natural Killer Cell

**NSAA** Non-Severe Aplastic Anemia

**PCR** Polymerase Chain Reaction

**RT** Reverse Transcriptase

**TCR** T Cell Receptor

**TGF-Beta** Transforming Growth Factor Beta

**TNF-Beta** Tumor Necrosis Factor

**HAM Testi** Asit Hemoliz Testi

## ÖZET

**Çukurova bölgesinde aplastik anemili hastaların T hücre reseptör sinyal yolundaki gen ifadelerindeki değişimlerin incelenmesi**

Bu çalışma ile aplastik anemili hastaların T hücre reseptör sinyal yolundaki gen ifadelerindeki değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda CD-28 ve CTLA-4 genlerinin ekspresyon düzeyleri Real Time PCR metoduyla belirlenmiş ve istatistiksel analizleri yapılmıştır.

Çalışmamız Eylül 2017- Ağustos 2018 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalında Aplastik Anemi (AA) tanısı konulmuş 18 yaş altı 31 çocuk hastadan oluşan grup ve aynı yaş grubunda 30 sağlıklı kontrol grubunun tam kan numuneleri kullanılmıştır. Alınan kan numunelerinin kırmızı kan hücrelerinden arındırılması işlemleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır. Ardından Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Roche LightCycler 480 Real Time- PCR Cihazında gen ekspresyon düzeyleri çalışılmıştır. Tüm verilerin istatistiksel analizleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 20.0) programı yardımıyla yapılmıştır.

Çalışma sonunda bölgemizdeki Aplastik Anemili (AA'lı) çocukların CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek tespit edildiği ve istatistiksel analizin anlamlı ( $p$  değeri  $\leq 0.05$ ) olduğu görülmüştür. T hücre reseptör sinyal yolundaki gen ifadeleri ile ilgili elde ettiğimiz verilerin, çocuk hematoloji kliniği hastalarına tanı, takip ve tedavi süreçlerinde fayda sağlayabilir.

**Anahtar Sözcükler: Aplastik Anemi, Real Time- PCR, CD-28, CTLA-4, Gen Ekspresyonu**

## **ABSTRACT**

**Investigation of the gene expression changes in the TCR signaling pathway in patients with aplastic anemia in Çukurova Region**

The purpose of this study was to investigate the changes in gene expression in T cell receptor signaling pathways of aplastic anemia patients. In this context, the expression levels of CD28 and CTLA-4 genes were determined by Real Time PCR and statistical analyses were performed.

Our study was conducted between September 2017- August 2018. The whole blood samples of 31 children with aplastic anemia (AA) and whole blood samples of 30 healthy the controls in the same of groups were included in the study who are in follow-up at Çukurova University Pediatric Hematology Department. Red blood cell removal of blood samples was done in the Laboratory of Pediatric Hematology. Then, gene expression levels were determined in Roche LightCycler 480 Real Time-PCR Device in the Çukurova University Department of Medical Biochemistry. Statistical analysis of all data was performed by the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 20.0) program in the Çukurova University Department of Biostatistics.

At the end of the study, it was seen that CD-28 and CTLA-4 gene expression levels of children with Aplastic Anemia (FAA) in our region were higher than the control group and the importance between two groups were significant ( $p \text{ value} \leq 0.05$ ) with statistical analysis. Our data on gene expression in the T cell receptor signaling pathway could provide significant benefits for the diagnosis, follow-up and the treatment of aplastic anemia patients.

**Key words: Aplastic Anemia, Real Time-PCR, CD-28, CTLA-4, Gen Expression**

# GİRİŞ

Aplastik anemi periferik kanda pansitopeni ve kemik iliğinde normal hematopoietik hücrelerin yerini yağ dokusunun alması sonucu hiposellüler, sonuçta asellüler kemik iliği yetmezliği ile karakterize bir hastalıktır. Aplastik anemi her yaşın hastalığı olmasına rağmen 15-30 yaş civarında ve 60 yaşın üstündekilerde daha fazla görülür. Çocuk yaş grubunda yapılmış çok çalışma yoktur. Kadın ve erkek tutulumu aynı orandadır. Kuzey Amerikalı ve Avrupalılarda, Asyalılardan daha azdır. Batı toplumlarında yılda milyonda 2-3 kişide görülürken Doğu toplumlarında görülme oranı bunun 3 katıdır<sup>1,2</sup>.

Hastalıklara karşı bağışıklığın temelini oluşturan T ve B lenfositlerin gelişimi, yaşam süreleri ve fonksiyonları birbirinden farklıdır. Morfolojik olarak ayırt edilemezler, ancak belirleyici yüzey moleküllerine karşı immüno histokimyasal boyama teknikleri kullanılarak ayırt edilebilirler. Kanda bulunan küçük tip lenfositlerin büyük çoğunluğunu T lenfositler oluşturur. B lenfositler sıvısal, T lenfositler ise hücre sel bağışıklıktan sorumludurlar<sup>3</sup>.

TCR multimoleküler bir komplekstir ve liganda bağlanma ile hücreyi aktifleştirici sinyal üretme yeteneği vardır. T hücresi reseptörüne (TCR) antijenin bağlanması ve sinyal iletimi ile aktifleşir. Çözünür antijenlere reaksiyon veren B hücrelerinin aksine, T hücreleri diğer hücrelerin yüzeylerinde sunulan küçük peptidlerle uyarılır. Bu peptidler major histokompatibilite kompleksinin (MHC) protein oluşuna bağlandığında antijen sunumu gerçekleşebilir<sup>4</sup>.

Aplastik anemili hastaların T hücre reseptör sinyal yolundaki gen ifadelerindeki değişimleri incelemeyi amaçladığımız çalışmamızda CD-28 ve CTLA-4 genlerini ele aldık. Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalında Aplastik Anemi (AA) tanısı konulmuş 31 çocuk hastadan oluşan grubun ve 30 sağlıklı çocuk kontrol grubunun tam kan numuneleri kullanılmıştır. Alınan kan numunelerinin kırmızı kan hücrelerinden arındırılması ve Real Time- PCR cihazında gen ekspresyon düzeyi belirleme işlemleri yapılmıştır. Tüm verilerin istatistiksel analizleri yapılarak anlamlı olup olmadıkları belirlenmiştir.

Çalışmamızın amacı T hücre reseptör sinyal yolundaki gen ifadeleri ile ilgili elde ettiğimiz verilerin, çocuk hematoloji kliniği hastalarına tanı, takip ve tedavi süreçlerinde aplastik anemili çocuklarda yardımcı olabilecek parametreleri sağlayabilmektir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Lenfositler

Lenfositler kemik iliğindeki lenfoid kök hücrelerden ve timustan üretilmektedir. Dokulardaki görevi, lenf nodları, dalak, bademcikler ve mukoza ile ilişkili lenfoid dokularınki gibidir. Lenfositler vücudun bağışıklık yanıtında işlev görür. B lenfositler sıvısal (hümorale), T lenfositler ise hücresele (sellüler) bağışıklıktan sorumludurlar. T ve B lenfositlerin gelişimi, yaşam süreleri ve fonksiyonları birbirinden farklılık gösterir. Morfolojik olarak ayırt edilemezler ancak belirleyici yüzey moleküllerine karşı immüno histokimyasal boyama teknikleri kullanılarak ayırt edilebilirler. Kanda bulunan küçük tip lenfositlerin büyük çoğunluğunu T lenfositler oluşturur. Lenfositlerin B ve T hücrelerinden ayrı 3. bir popülasyonu da doğal öldürücü (NK) hücreleridir<sup>3,5,6</sup>.

Lenfositler, çapları ve sitoplazma miktarları temel alınarak büyük, orta ve küçük olmak üzere üç tüpe ayrılır. Küçük tip lenfositleri, T ve B lenfosit alt tipleri oluşturur<sup>3</sup>.

#### 2.1.1. T Lenfositler

##### 2.1.1.1. T lenfositlerin Gelişimi, Fonksiyonları ve Histokimyasal Özellikleri

Yetişkinlerde bütün kan hücreleri kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerinden kök alırlar. T lenfositler dışındaki tüm kan hücreleri kemik iliğinde olgunlaşma gösterirken; T lenfositleri oluşturacak olan progenitör hücrelerin olgunlaşmaları timusta gerçekleşmektedir. Ancak, knock out farelerde yapılan çalışmalarda bağırsak mukozasındaki özelleşmiş yapılarda da T hücre gelişimi bildirilmiştir<sup>7</sup>.

T lenfositler, timusta olgunlaşırken çok önemli bir kabiliyet kazanırlar, o da kendinden olanla olmayan antijenik molekülleri tanımlarıdır. Kendine ait MHC moleküllerini tanıyan ve onlara karşı tepki gösteren hücreler negatif seleksiyona uğrarlar. Negatif seleksiyon sonucunda timusun korteksinde çok sayıda olgunlaşmamış lenfosit ölür (%90). Vücuda ait MHC molekülleri ile bağlanmış olan yabancı protein tabiatındaki antijenleri tanıma kabiliyeti kazanılmasına da pozitif seleksiyonlar sonucunda immün yetenekli T lenfositler medulladan kan dolaşımına katılırlar<sup>3</sup>.



Timustan olgunlaşan immün yetenekli T lenfositler periferel kana geçtikten sonra dalak, peyer plakları, tonsiller, lenf düğümleri, sekonder lenfoid organ görevi gören diğer mukoza ile ilişkili lenfoid dokulara (MALT) giderek, kendilerine ait bölgelere yerleşirler. Dalakta beyaz pulpanın arterleri saran bölgelerine, lenf düğümlerinde korteksin medullaya bakan yarısı ve interfoliküller bölgelere, Peyer plaklarında ise özellikle interfoliküller alanlara ve korona bölgesine yerleşerek buralarda aylarca hatta yıllarca yaşamlarını devam ettirirler<sup>3</sup>.

T hücre immünitelerinin yeterli olabilmesi için ikincil lenfoid organlarda çok sayıda olgun T hücresi yerleşmelidir. Bu hücre topluluğunun hayat boyu karşılaşılabilecek tüm yabancı antijenleri tanıma yeteneğine sahip zengin bir TCR birikimi olmalıdır. Sadece yabancı antijeni tanıyan T hücrelerinin perifere dağılması ve kendi antijenlerine reaksiyon verenlerin gelişimini tamamlamaması önemlidir<sup>4</sup>.

TCR multimoleküler bir komplekstir ve liganda bağlanma ile hücreyi aktifleştirici sinyal üretme yeteneği vardır<sup>4</sup>.

T hücresi, reseptörüne (TCR) antijenin bağlanması ve sinyal iletimi ile aktifleşir. Çözünür antijenlere reaksiyon veren B hücrelerinin aksine, T hücreleri diğer hücrelerin yüzeylerinde sunulan küçük peptidlerle uyarılır. Bu peptidler major histokompatibilite kompleksinin (MHC) protein oluşuna bağlandığında antijen sunumu ortaya çıkabilir<sup>4</sup>.

Doğal immün sistemin profesyonel antijen sunan hücrelerinde, B hücreleri ve timik epitelde Klas II MHC proteinleri bulunur. Profesyonel antijen sunan hücreler, dendritik hücreler ve çeşitli doku makrofajlarını kapsar. MHC Klas II kompleksi tek alfa ve beta zincirinden oluşan bir dimerdir<sup>4</sup>.

#### **2.1.1.2. İmmünolojik Sinaps**

İmmünolojik sinaps oluşmasında ilk adım T hücre yüzeyindeki integrinlerle antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki ligandlar arasında iki hücreyi birbirine yakınlaştıracak etkileşimin kurulmasıdır. İmmünolojik sinaps dinamik bir yapılandır ve TCR ve integrinler dışında birçok sinyal molekülünü de içine kapsar. İlk tanımlandığında immünolojik sinapsın TCR kümelenmesi ve inaktif sinyal moleküllerinin başlatılmasına yol açtığı düşünülürdü ancak TCR sinyali immünolojik sinapstan önce gelişir ve aktif reseptörler internalize edilerek cevap verme kabiliyetleri durduruluyor olabilir<sup>4</sup>.

### **2.1.1.3. T hücre gelişimi**

T hücreleri timusta gelişir. Birçok T hücre alt tipi vardır. Bunların içinde en çok bilineni alfa/beta T hücreleridir. Gama-Delta T hücrelerindeki antijen reseptörü hem NK hem de T hücrelerinin ortak özelliklerini taşıyan ve timusta gelişen doğal öldürücü T hücrelerinde de (NKT) bulunur. Kemik iliği kökenli timik progenitör hücreler kortikomedüller bağlantıdan timusa girer ve bu dönemde TCR, CD3 veya CD4 veya CD8 eksprese etmezler ve çift negatif timositler olarak isimlendirilir. Gelişimin ilk aşamasında diğer hücrelere farklılaşma kapasitelerini kaybederler ve Thy-1, CD44 ve CD25 gibi bazı T hücre markırlarını eksprese etmeye başlarlar. TCR alfa, beta lokuslarında TCR gen rearranjmanı başlatılır. Bu arada korteksten subkapsüler zona geçerler<sup>4</sup>.

### **2.1.1.4. T hücre fonksiyonları**

Timusu terk eden T hücreleri ikincil lenfoid organlarda dolaşır. Antijen ile henüz etkileşime girmemiş bu hücrelere naif T hücreleri denir. Naif T hücresi özgül antijeni ile karşılaşmazsa lenfoid dokuyu terk eder ve tekrar kan dolaşımına katılır<sup>4</sup>.

CD4+ ve CD8+ T hücreleri fonksiyonel olgunluğa ulaşmak için benzer farklılaşma sürecine uğrar ancak enfeksiyona karşı edinsel immün cevapta farklı roller oynarlar<sup>4</sup>.

### **2.1.1.5. T hücre aracılı immünitinin olgunlaşması - T hücre hafızası**

Enfeksiyon kontrol altına alındıktan sonra antijene özgü T hücrelerinin küçük bir kısmı direnir. Bu uzun ömürlü T hücreleri naif ve aktif T hücrelerinden farklıdır ve hemostatik çoğalma ile kendini yenileme ve antijenle tekrar karşılaştığında hızla çoğalarak efektör fonksiyon kazanma yeteneğine sahiptir<sup>4</sup>.

### **2.1.1.6. T hücre aracılı İmmünitinin Baskılanması - Uygunsuz T hücre cevabının Önlenmesi**

Efektör hücrelerin dokulara hasar verme gücü düşünüldüğünde immün sistemin kendine tolerans göstermesinin önemi anlaşılabilir. Timusta merkezi olarak kontrol noktaları bulunmakla beraber yeterli değildir ve periferde T hücrelerinin kendine karşı aktif efektör hücreler haline gelmesini engelleyen iki mekanizma vardır: anergi ile T

hücreleri bazı hücre yüzey reseptörlerine bağlı olarak kendi cevaplılığını kısıtlar; regülatör T hücrelerinin aktivitesi ile efektör hücreler susturulur<sup>4</sup>.

#### **2.1.1.7. Sitotoksik T Lenfositler**

CD8 molekülleri bu hücrelerin yüzeylerinde bulunur. CD4 yüzey moleküllerini ise taşımazlar. Organizmaya giren yabancı hücreleri, organizmada şekillenen tümör hücrelerini, virüsle enfekte hücreleri ve vücuda ait bazı hücreleri öldürme yeteneğine sahip bir direkt saldırı hücresidir. Bunun sonucunda bu hücrelere sıklıkla katil hücreler de denilir. Sitotoksik T lenfositler, ekstraselüler bir mekanizma ile normal olmayan hücreleri kolayca tanıyarak onları öldürür<sup>3</sup>.

#### **2.1.1.8. Yardımcı T Lenfositler**

Yardımcı T lenfositler T lenfositlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Yardımcı T lenfositlerden salınan sitokinler ve fonksiyonları şunlardır:

İnterlökin-2: Önceleri T lenfosit geliştirici faktör olarak bilinen IL-2, bazı aktive olmuş yardımcı T lenfositler tarafından salınan gerçek bir T lenfosit sitokinidir. IL-2 baskılayıcı ve sitotoksik T lenfositlerin proliferasyonuna neden olan güçlü stimülatör bir etkiye sahiptir.

İnterlökin-3: Aktive olmuş yardımcı T lenfositler tarafından üretilirler. Başlıca mast hücreleri olmak üzere birçok hücrenin gelişimini arttıırırlar.

İnterlökin-4: Aktive olmuş yardımcı T lenfositleri tarafından üretilir. IL-3 ile birlikte mast hücrelerinin gelişiminde önemli bir rol oynar.

İnterlökin-5: Aktive olmuş yardımcı T lenfositler tarafından üretilir. Eosinofilik granüositlerin farklılaşmasında, IgA üretiminde ve B lenfosit gelişiminin stimüle edilmesinde sinerjik rol oynar.

İnterlökin-6: Aktive olmuş T lenfositler tarafından üretilir. IL-4 ve IL-5 ile birlikte B lenfosit gelişimde rol oynar.

TNF-  $\beta$  (Tümör Nekrosiz Faktör): Yardımcı T lenfosit ile sitotoksik T lenfositler tarafından üretilir ve sitotoksik bir faktör olarak görev yapar.

GM-CSF (Granüosit monosit-koloni stimule edici faktör): Yardımcı T lenfositlerle birlikte makrofajlar ve monositler tarafından üretilir. Granüositlerin ile eritrosit progenitörlerin gelişmesinde ve makrofajların aktivasyonunda görev alır.

TGF-  $\beta$  (Transforming growth faktör): Yardımcı T lenfositler, baskılayıcı T lenfositler, B lenfositler ve trombositlerde üretilir. T ve B lenfositlerin proliferasyonunu engellerken, fibroblast proliferasyonunu artırır.

Yota- İnterferon: Fagositozda ve yabancı mikroorganizmaların yok edilmesinde daha etkili olabilmeleri için makrofajları çekici ve aktive edici fonksiyonları vardır<sup>3</sup>.

#### **2.1.1.9. Baskılayıcı T Lenfositler**

Bu hücreler de yüzey molekülleri bakımından sitotoksik T lenfositlere benzerler. CD3 ve CD8 taşıırken, CD4'e sahip değildirler. Baskılayıcı T lenfositler, sitotoksik ve yardımcı T lenfosit ile B lenfosit ve plazma hücre aktivitelerinin baskılanması, alerjik reaksiyonlara katılma ve kemik iliğinde eritrosit olgunlaşmasının düzenlenmesi ile ilgili göreve sahiptir<sup>3</sup>.

Baskılayıcı T lenfositlerin, bireyin sahip olduğu dokulara karşı immün sistem yeteneğinin sınırlandırılmasında da önemli görevi vardır. Sentezledikleri lenfokinler vasıtasıyla immün yanıtı kontrol altına alırlar ve regülasyonunu sağlarlar. Bu baskılayıcı etkileri daha çok B lenfositler ve ayrıca MIF (makrofaj inhibisyon faktör) ile makrofajlar üzerine olmaktadır<sup>3</sup>.

#### **2.1.1.10 Bellek T Lenfositler**

Yardımcı T lenfositler gibi bellek T lenfositler de CD3 ve CD4 yüzey moleküllerine sahiptir. Vücuttaki esas fonksiyonları primer antijenik uyarımları hafızaya alarak, ikinci kez aynı antijenik uyarımla karşılaştıklarında bunları çok kısa zamanda algılamak ve immünolojik bir yanıt vermektedir. Uzun ömürlü olan ve küçük lenfositler arasında yer alan bu hücrelerin, bilgileri hafızaya almasının esasını primer uyarımlarda kendilerinde meydana gelen ve sitokin sentezi yönünden gelişen gen düzenlemeleri ve bunlara bağlı olarak yüzeylerinde oluşan spesifik reseptörler oluşturur<sup>3</sup>.

## 2.1.2. B Lenfositler

### 2.1.2.1. B lenfositlerin Gelişimi, Fonksiyonları ve Histokimyasal Özellikleri

B hücre öncülleri embriyogenez sırasında, ilk kez fetal karaciğerde görülürken erişkin yaşam sırasında ana yerleşimleri olan kemik iliğine göç ederler. B hücrelerinin olgunlaşması iki evrede meydana gelir. Antijen bağımsız evrede kök hücrelerinden pre-B hücreleri ve B hücreleri oluşurken; antijene bağımlı evre, antijenin B hücreleriyle daha sonraki etkileşiminden doğan hücreleri, yani etkinleşmiş B hücreleri ve plazma hücrelerinden oluşur<sup>8</sup>.

Lenfoid progenitör hücre, B Lenfosit hematopoetik kök hücrenin bir alt koludur. Lenfoid progenitör hücreden köken alan B lenfositlerin kemik iliğinde gelişmeye başlaması için antijenik bir uyarıya gerek duyulmaz. Lenfoid progenitör hücreler ile kemik iliği stromal hücreleri arasında zayıf bağlantı oluşturan adezyon molekülleri kemik iliğinde bulunur. Erken progenitör hücrelerden olgunlaşmamış B lenfositleri gelişinceye kadar çeşitli farklılaşma dönemleri geçirir. Bu dönemler; (İlkel-B Lenfosit, Olgunlaşmamış B lenfosit, Olgunlaşmış B lenfosit)dir. Kemik iliğinde kendi ile reaksiyona giren olgunlaşmamış lenfositler delesyon, reseptör kurgulama ve reseptör özgülüğünde değişme ile etkisiz hale getirilir. Olgunlaşmamış B lenfositler, yüzey immünglobulin M molekülünü kemik iliğindeyken kazanırlar ve ardından olgun hücreler olarak periferik kana geçerler. Henüz antijenle karşılaşmamış bu hücreler 'naif' hücrelerdir. Periferik dolaşımdan periferik lenfoid dokular olan lenf bezi, dalak ve mukoza ilişkili lenfoid dokulara (MALT) göç ederler ve kendileri için özel ayrılmış bölgeler olan lenfoid folliküller ve dalak beyaz pulpaya yerleşirler. B lenfositler periferde self antijenle reaktivite açısından anerji, delesyon ve folliküler dışlama ile kontrol altında tutulurlar. Ayrıca inhibitör moleküller olan CTLA-4, IL-4, IL-10 ve T regülör hücreler self reaktiviteyi önlemede rol oynarlar<sup>7,9</sup>.

B hücreleri dolaşıma tekrar tekrar giren küçük lenfosit havuzunun %30'unu oluşturur ve bunların yaşam süresi kısa, yani günler veya haftalardır. Hergün yaklaşık  $10^9$  B hücresi üretilir<sup>8,10</sup>.

Naif B hücreleri antijenik uyarıya maruz kalmazlarsa birkaç hafta içinde apoptozisle yok edilirler, antijenle karşılaşanlar ise klonal ekspansiyon adı verilen bir olayla bölünüp çoğalarak, bellek B hücrelerine ve antikor salgılayan plazma hücrelerine

dönüşürler. B hücrelerinin antikor üreten plazma hücrelerine dönüşmesinde T hücre yardımı olmadan bazı antijenler rol alabilirler. T hücrelerinden bağımsız olan bu antijenler iki grupturlar. Birinci grup, B hücre reseptörüne gerek olmadan, B hücrelerinde farklılaşmayı sağlayan ve gram negatif bakterilerin hücre duvarının bileşeni, aynı zamanda TLR-4'ün agonisti olan lipopolisakkaritlerdir. İkinci grup ise dekstran, ficoll, akrilamid gibi bileşiklerdir<sup>7</sup>.

Protein yapısındaki bileşikler T hücrelerine bağımlı yanıt oluştururken; bu antijenlere karşı oluşan yanıt, T hücrelerinden bağımsız olanlara kıyasla daha kuvvetlidir. Her iki antijenle karşılaşmada aynı şekilde IgM üretilirken, ikinci kez karşılaşmada bunlara karşı verilen immün yanıt birbirinden farklıdır<sup>7</sup>.

Hümmoral immün yanıtta sorumlu, kazanılmış bağışıklığın önemli bir unsuru olan B hücreler kemik iliğindeki ortak progenitor hücrelerden köken alan, gelişimlerini ikincil lenfoid organlarda devam ettirerek, bellek B hücrelerine veya plazma hücrelerine dönüşürler<sup>7</sup>.

#### **2.1.2.2. Plazma Hücresi**

Bu hücreler uyarıcı antijene özgü immünoglobulin sentezleyen hücrelerdir. İmmünolojik olarak yanıt verebilen her B hücresi, bir antijen ile tepkime verebilen bir yüzey reseptörüne (IgM veya IgD) sahiptir ve B lenfosit havuzundaki miktar yani  $10^7$  kadar farklı bir özgüllük söz konusudur. Bir antijen, yüzey reseptörüne en iyi uyduğu B lenfosit ile etkileşir. Antijen bağlandıktan sonra, B hücresi üreme yönünden uyarılır ve bir hücre topluluğu oluşur. Bu seçilmiş B hücreleri kısa süre sonra plazma hücreleri haline alarak antijen için özgül olan antikor salgılamaya başlarlar. Plazma hücreleri, seçilmiş B hücresinin taşıdığı ile birebir aynı, aynı antijenik özgüllük gösteren immünoglobulinler üretir<sup>8</sup>.

#### **2.1.2.3. Bellek B Hücreleri**

Plazma hücrelerine farklılaşmayan etkinleşmiş bir grup B-hücresi, özgün antijenik uyarıcıyı tanıyıp saklayan bellek hücrelerine dönüşürler. Bunlar istirahat halinde kalırlar ve aynı antijen ile yeniden karşılaştıklarında hızla etkinleşme yeteneğine sahip olup; süratle çoğalarak immün cevabın daha çabuk oluşmasını sağlar. Bellek T hücreleri,

bellek B hücreleri tarafından yapılan antikor üretimini arttıran interlökinler salgılar. Bu hücreler IgM ve IgD'den başka yüzeylerinde IgG ve IgA da taşırlar<sup>8,11</sup>.

## **2.2. Primer ve Sekonder Humoral İmmün Yanıtlar ve Genel Özellikleri**

Primer ve sekonder immün yanıtlar protein antijenlerine karşı verilirken; hem kalitatif hem de kantitatif olarak farklılık göstermektedir. Primer hümorale immün yanıt olgunlaşmış naif B hücresinin, sekonder hümorale immün yanıt ise bellek B hücresinin aktivasyonu ile oluşmaktadır. Primer cevap yavaştır, birkaç hafta içinde oluşur ve esas olarak çok miktarda antijene karşı az miktarda ve afinitesi düşük IgM üretimi ile belirgindir. Sekonder cevaplar her zaman primer cevaptan daha hızlıdır, daha az antijene karşı bir hafta içinde daha fazla antikor üretimiyle belirgindir. Ayrıca sekonder cevaplarda salınan antikor izotipleri farklıdır (IgA, IgE, IgG) ve bunların antijen afiniteleri de yüksektir. Sekonder cevaplarda bellek B hücrelerinden köken alan plazma hücreleri, primer cevaplarda naif B hücreden köken alan plazma hücrelerine göre daha uzun ömürlüdür. Ağır zincir izotip/ sınıf değişimi ve afinite olgunlaşması tipik olarak protein antijenlerine yönelik T hücre-bağımlı hümorale immün yanıtta gözlenirler. T-hücresi bağımsız antijenlere yönelik immün yanıt ise karakteristik olarak çok az ağır zincir izotip/sınıf değişimi ve afinite olgunlaşmasını barındırır. Yani bu tip antijenlere karşı üretilen antikorlar klasik olarak düşük afiniteli ve daha çok IgM tipi antikorlardır. Ayrıca germinal merkez oluşumu (sekonder lenfoid folikül oluşumu), sekonder immün yanıt veya hafıza gibi özellikler T-bağımsız antijenlere immün yanıtta bulunmazlar. T-bağımsız hümorale immün yanıtta oluşan plazma hücreleri ise T-bağımlı hümorale immün yanıtta oluşanlara göre daha kısa ömürlüdür<sup>12</sup>.

B hücrelerinden salınan antikorlarla hümorale immünite oluşturulur. Antikorlar ekstraselüler antijenlere bağlanarak onları nötralize etme veya elimine etme görevini yaparlar. Hümorale immünite polisakkarid ve lipid antijen barındıran ekstraselüler mikroorganizmalara ve onların toksinlerine yönelik primer immün savunma mekanizmasını oluştururlar<sup>7</sup>.

Kandaki lenfositlerin %5-15 ini B lenfositleri oluşturur. Bu hücreler dalak, lenf bezleri, tonsiller ve mukoza ile ilişkili lenfoid dokuda (MALT) da bulunurlar. Primer fonksiyonları antikor üretimi ve salgılanmasıdır<sup>7</sup>.

Humoral immün yanıt periferik lenfoid dokularda antijene özgü B hücrelerinin antijenle karşılaşması ile başlar. B hücrelerinin doğal immün sistem komponenti olan toll-benzeri reseptörler yolu ile de T hücresinden bağımsız olarak aktivasyonları mümkündür. Bellek B hücrelerinde BCR uyarılması ile TCR ekspresyonu artar. TLR uyarılması bellek B hücrelerinde poliklonal IgM/IgG ve sitokin üretimine yol açar<sup>7</sup>.

B hücreleri protein, polisakkarid, lipid ve nükleik asit gibi birçok ligandı tanıyabilecek TLR'ler eksprese etmektedir ki bunlar arasında en iyi bilinenler TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-7, TLR-9<sup>7</sup>.

### **2.3. Doğal Öldürücü Hücreler (NK – Natural Killer Cells)**

NK hücreleri, interferon ve interlökin-2 gibi aracılara üreten bir efektör lenfosit popülasyonu olarak sınıflandırılır. NK hücreleri TCR genlerini yeniden düzenlemez veya eksprese etmez. Özellikle, sınıf I MHC'yi zayıf bir şekilde eksprese eden ve viral enfeksiyonlu sitotoksik T-hücrelerine daha az sinyal verebilen hedef hücreleri öldürürler. NK hücreleri, öldürme rollerini aktive eden veya inhibe eden iki reseptör sınıfı ifade eder. Aktive edici reseptörler hedef hücre üzerinde çeşitli ligandlara bağlanırken, inhibitör reseptörler genel olarak HLA sınıf I moleküllerine bağlanır. Bu hücreler herhangi bir antikor olmaksızın öldürebilseler de, antikor varlığı bunların etkinliğini artırır ve antikor bağımlı hücresel toksisite (ADCC) adı verilen bu olayda efekte hücrenin yüzeyine bağlı antikor, NK hücrelerin yüzeyinde bulunan IgG için Fc reseptörü tarafından tanınır ve efekte hücre öldürülür. IL12 ve IFN $\gamma$  NK hücrelerin güçlü etkinleştiricisidir<sup>8,13,14,15</sup>.

### **2.4. Aplastik Anemi**

Tüm kan hücreleri kemik iliğindeki kan yapıcı kök hücrelerden türerler. Kemik iliği vücudun en büyük organlarından biridir. Toplam vücut ağırlığının yaklaşık % 3.5 ila 6'sını temsil eder<sup>16,17</sup>.

Aplastik anemi periferik kanda pansitopeni ve kemik iliğinde normal hematopoetik hücrelerin yerini yağ dokusunun almasından kaynaklanan kemik iliği yetmezliği ile karakterize bir hastalıktır<sup>1</sup>.

Aplastik anemi yapısal olabilir, genetik geçişli hastalıklar olan Fanconi anemisi ve Diskeratozis congenita, tipik fizik anomalilerle ve pansitopeninin erken yaşta



gelişimi ile sıklıkla ilişkili olsa da, normal görünen yetişkinlerde kemik iliği yetmezliği olarak da görülebilir. Aplastik anemi, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri ve MDS ile ilişkilidir ve bazı durumlarda bu bozukluklar arasında kesin bir ayırım mümkün olmayabilir<sup>18</sup>.

#### **2.4.1. Aplastik Aneminin Epidemiyolojisi**

Aplastik anemi her yaşın hastalığı olmasına rağmen 15-30 yaş civarında ve 60 yaşın üstündekilerde daha fazla görülür. Kadın ve erkek tutulumu aynı orandadır. Kuzey Amerikalı ve Avrupalılarda, Asyalılardan daha azdır. Batı toplumlarında yılda milyonda 2-3 kişide görülürken Doğu toplumlarında görülme oranı bunun üç katıdır. Tayland ve Çin'de, milyonda beş ila yedi kişide görülmüştür. Doğuda fazla görülmesinin nedeni genetik faktörlerden ziyade çevresel faktörlere bağlanmıştır. Zira, batı Ülkelerine göç eden doğu toplumları bireylerinde tesbit edilen aplastik anemi sıklığı batı toplumlarındakinden farklı bulunmamıştır<sup>1,18</sup>.

Aplazi, immün yetmezliği olan hastalara radyasyon işleminden geçmemiş kan infüzyonu sonrasında ortaya çıkabilecek transfüzyon ilişkili Graft Versus Host hastalığında (GVHD) önemli bir ölüm nedenidir. Aplastik anemi, cilt altı dokuların ağrılı endurasyonu ( deride sertlik) ile karakterize, eozinofilik fasit diye ( ciltte simetrik olarak sertlik ve ağrının başlaması ve sertliğin giderek artması ) adlandırılan nadir kollajen vasküler sendromla güçlü bir şekilde ilişkilidir. Kemik iliği hipoplazisi ile birlikte pansitopeni sistemik lupus eritematozda da görülebilir<sup>19</sup>.

#### **2.4.2. Aplastik Aneminin Fizyolojisi**

Kemik iliği yetmezliğinin patogenezi tamamen kesin değildir. Bir hipoteze göre, bir ilaç veya virüs gibi yabancı bir maddenin vücuda girip kendisini pluripotent hematopoetik kök hücrelerine bağlayabileceği belirtilmektedir. Bu ek, vücudu yabancı bir vücut olarak algıladıklarına karşı kendini savunmaya yönlendirir. Hastanın kendi vücut savunma mekanizması kök hücrelerini yok edebilir. Ek olarak, aplastik anemide, hematopoetik düzenlemedeki hücrel ve hümorale anormallikler ve değişen bir kemik iliği mikro ortamı, olası faktörler olarak ilişkilendirilmiştir<sup>20</sup>.

### 2.4.3. Aplastik Aneminin Laboratuvar Bulguları

Aplastik aneminin en azından kısmen otoimmün bir hastalık olduğu düşünüldüğünde, immünoşüpresif ajanlar 5 yıllık sağ kalımın % 75'inde; % 60-80'inde yanıtlıdırlar ve uzun süreli sağkalım sağlarlar. Genç hastalarda ve şiddetli aplastik anemi olanlarda yanıtlar daha zayıftır. Tüm hücre serileri göz önüne alınırsa, hastanın hemoglobin, hematokrit ve kırmızı küre sayısında azalma, lökosit ve trombosit sayılarının azalmasına neden olur. Eğer sadece kırmızı hücre hattı etkilenirse, yalnızca hemoglobin, Hct ve kırmızı hücre sayısı etkilenir. Bir kemik iliği incelemesi yapılırsa, eritroid hücre dizisi ve belki de lökosit ve trombosit hücre dizileri, maturasyonel aktivite eksikliğini gösterir<sup>20,21</sup>.

### 2.4.4. Aplastik Aneminin Şiddeti

AA, şiddetli olmadığı sürece şiddetli olmayan aplastik anemi (NSAA) olarak tanımlanır. Şiddetli AA üç periferik kan kriterine ihtiyaç duyar;

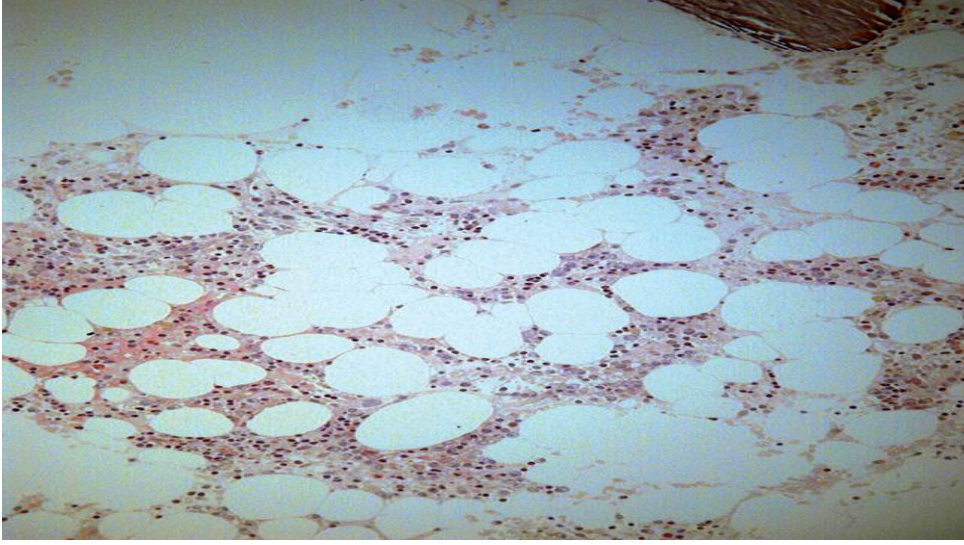
Nötrofil  $0.5 \times 10^9/L$  den daha az

Platelet  $20 \times 10^9/L$  den daha az

Retikülosit  $20 \times 10^9/L$  den daha az

Kemik iliği içinde; % 25'ten az hematopoetik hücre veya % 25-50 hematopoetik hücre ve % 30'dan az hematopoetik hücre vardır.

Hafif ve orta derecede AA, tanımları farklı enstitülerde değişkenlik gösterir. Şiddetli olmayan AA, şiddetli veya çok şiddetli aplastik anemi kriterlerini karşılamayan hastalardır. Hüresellik, normal kontrollerle karşılaştırılarak belirlenmelidir<sup>22</sup>.



**Şekil 1.** Şiddetli aplastik anemide kemik iliği. Sellülarite belirgin bir şekilde azalır.

Genellikle kötü bir prognozu olan şiddetli aplastik anemi, çocuklarda ve genç erişkinlerde, akut olmayan A, B ve C hepatit ataklarından yaklaşık 10 hafta sonra nadiren gelişebilir<sup>21</sup>.

#### **2.4.5. Aplastik Aneminin Klinik Özellikleri**

Kemik iliği yetmezliği olan hastalar, anemi, nadiren sık veya ciddi enfeksiyonlar nötropeninin neden olduğu ve trombositopeninin neden olduğu hemorajik bir eğilim ile birlikte görülür. Başlangıç genellikle sinsidir fakat akut olabilir<sup>23</sup>.

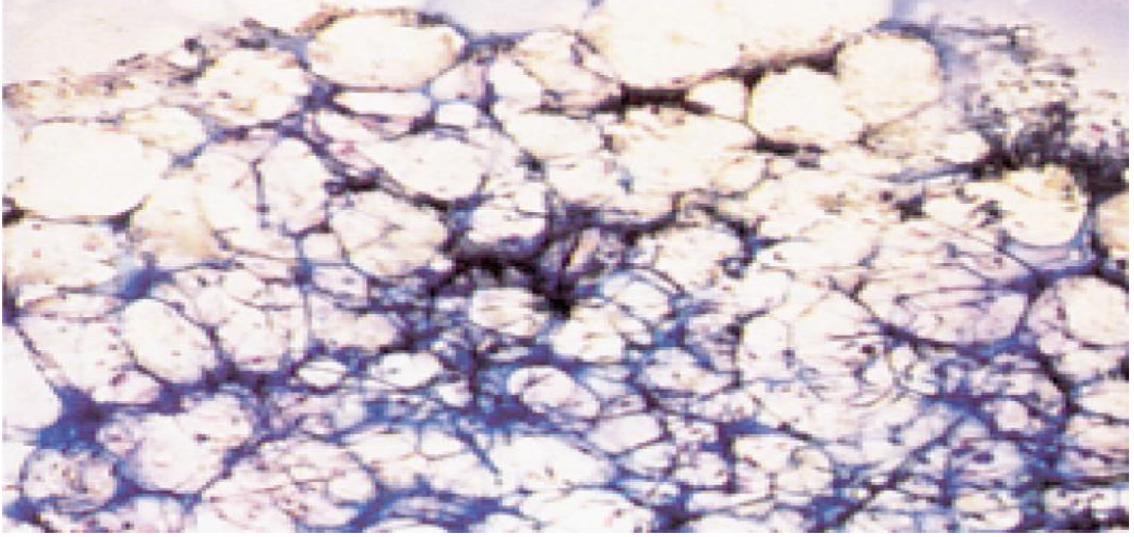
Semptomlar şunları içerir:

- anemi nedeniyle halsizlik ve nefes darlığı,
- trombositopeniden kaynaklanan hemorajik bulgular,
- nötropeni sonucu ateş ve tekrarlayan enfeksiyonlar<sup>24</sup>.

Megakaryositler de dahil olmak üzere tüm tiplerdeki hematopoetik hücreler azalır ya da yoktur ve şiddetli aplastik anemide görülen hücrelerin çoğunluğu plazma hücreleri, lenfositler ve makrofajlardır<sup>24</sup>.

Hemorajik belirtiler arasında, epistaksis, dişetlerinden kanama, menoraji, gastrointestinal ve idrar yollarına kanama ve ekimozlar ve peteşiler sayılabilir<sup>24</sup>.

İşaretili hiposelüler ilik parçaları genellikle kemik iliği bezlerinde bulunur, ilik parçalarının hacminin çoğu yağ hücrelerinden oluşur<sup>24</sup>.



**Şekil 2.** Aplastik anemi vakasından işaretili hiposelüler ilik parçası. Sadece bir kaç kalıntı hematopoetik hücre vardır, parçaların çoğu yağ hücrelerinden oluşmaktadır.

Şiddetli aplastik anemisi olan hastalarda bile, ilik aspirasyonu bazen normoselüler veya hiper hüresel fragmanlara neden olabilir<sup>24</sup>.



**Fotoğraf 1.** FAA'lı hasta. Mikrosefali, mikroftalmi mevcut. 17 yaş, 150 cm, 45 kg, ellerde dört parmak mevcuttur.



**Fotoğraf 2.** Periorbital ekimozlu AA'lı bir hasta.

Bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarında;



**Fotoğraf 3.** *Pseudomonas septicemia*'li AA'lı bir hastada deri lezyonları.

#### **2.4.6. Aplastik Anemiye Neden Olan İlaçlar**

İlaçlar aplastik anemi ile ilişkilendirilmiştir. Yeterli dozda düzenli olarak kemik iliği aplazisine neden olan antikanser ajanlar ve benzerden farklı olarak, ilaçlara karşı kendine has reaksiyonlar seyrek olarak görülür. Bununla birlikte, bir antibiyotik olan kloramfenikol, ilaç kullanımına bağlı olarak ortalama yılda bir aplastik anemi vakasına sebep olur<sup>25</sup>.



Aplastik anemi oluşturabilen diğer ilaçlar, dozaj ve tüketim süresine bağlı olarak, tetrasiklinler, organik arsenikler, fenilbutazon, trimetadion ve metil feniletil hidantoindir<sup>25</sup>.

#### 2.4.7. Aplastik Anemi Tedavisi

şiddetli edinsel aplastik anemi, eksik olan hematopoetik bağışıklık sistemi hücrelerinin kök hücre nakli ile tamamlanması yoluyla tedavi edilebilir. Hastanın rezidüel kemik iliği fonksiyonunun düzelmesini sağlamak için bağışıklık sistemi baskılanabilir. Aplastik anemi hastalarının prognozu kötü, mortalite oranı yüksektir. Komplikasyonlar arasında enfeksiyon, kanama ve tekrarlanan transfüzyonlar sonucu aşırı demir yüklenmesi problemleri bulunur, oral şelatör kullanımını gerektirebilir<sup>26</sup>.

Tedavi stratejileri, hastanın yaşına ve aynı ailesel vericinin bulunabilirliğine bağlıdır. Allojeneik kemik iliği transplantasyonu, uygun bir verici varsa, 40 yaşın altındaki hastalarda endikedir. İkiz veya HLA uyumlu bir donörü olan genç hastalarda kemik iliği transplantasyonu önerilir. Bir donör yokluğunda ve yaşlı hastalarda tercih edilen tedavi şekli immünsüpresyondur. Birinci basamakta standart immünsüpresif terapi başarısız olan aplastik anemi hastalarında mikofenolat mofetil terapisi denenmiştir<sup>27</sup>.



**Fotoğraf 4.** FAA'lı hasta. 6 yaş, 99 cm, 13 kg, sol elde dört parmak vardır.

#### 2.4.8. Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu

Genç hastalar için doku uyumlu bir kardeş donör varlığı en iyi tedavi seçeneğidir. Aplastik anemi tanısı konan bir çocuk ya da genç bir yetişkinde, insan lökosit antijeni (HLA) tipi belirlenmelidir. Transplantasyon adaylarında, doku uyumu antijenlerine duyarlılığı önlemek için aile üyelerinden kan transfüzyonundan kaçınılmalıdır. Genel olarak transfüzyon sayısı en aza indirilmelidir, sınırlı sayıda kan ürünü verilmesi muhtemelen sonucu ciddi şekilde etkilememektedir<sup>26</sup>.

Çoğu hasta için uygun bir kardeş donör bulunmamaktadır. Bazen, ailede tam fenotipik bir eşleşme varlığı işe yarar. Alternatif vericiler kullanarak hayatta kalma, geleneksel kardeş nakillerinin yaklaşık yarısı kadardır ve daha yüksek çözünürlüklü HLA eşleştirmesi ve daha etkili iyileştirme rejimleri beraberinde GVHD profilaksisi ile sonuçları daha iyi düzeye çıkarılmaktadır. Hastalar geç komplikasyonlar için risk altındadır, özellikle radyasyonun iyileştirmenin bir parçası olarak kullanılması halinde, kanser oranı yüksektir<sup>26</sup>.

#### 2.5. Fanconi Anemisi

Fanconi anemisi, aplastik aneminin konjenital formudur. Çocukluk çağında aplastik anemi seyrek görülmesine karşın fanconi anemisi çok sık görülür<sup>27</sup>.

Fanconi anemisi, otozomal resesif kalıtmıdır. Fanconi genleri, 9q ve 20q kromozomlarına lokalizedir. Kromozom analizi genellikle kromatid kırıklarını, boşlukları, yeniden düzenlemeleri, iki misline çıkarmayı ve değişik tokuşları ortaya koyar<sup>27</sup>.



**Fotoğraf 5.** 4 yaşında FAA'lı erkek hasta, 54 cm, sağ elde dört parmak vardır.

### **2.5.1. Fanconi Anemisinin Klinik Bulguları ve Semptomları**

Fanconi anemisinin klinik bulguları ve belirtilerinde yaygın olarak düşük doğum ağırlığı (2500 gr dan düşük) , ciltte hiperpigmentasyon ve boy kısalığı görülmektedir. Diğer bulgular; iskelet bozuklukları, böbrek malformasyonları, mikrosefali, hipogonadizm, mental retardasyon ve şaşılıktır<sup>27</sup>.

### **2.5.2. Fanconi Anemisinin Laboratuvar Bulguları**

Konjenital malformasyonlu hastalar arasında hematolojik bulguların başlamasından önce sadece % 28 oranında Fanconi aplastik anemisi teşhisi konulmuştur. Progresif pansitopeni genellikle 5 yaşına kadar belirginleşir<sup>27</sup>.

Diepoksibutan gibi DNA çapraz bağlayıcı ajanların klastojenik etkisine karşı aşırı duyarlılık, prenatal ve postnatal olarak Fanconi anemisinin genotipinin tanısal bir göstergesi olarak işlev görür<sup>27</sup>.

Prenatal HLA yazımı, bir fetüsün, etkilenen bir kardeşle HLA-özdeş olup olmadığını tespit etmeyi mümkün kılmıştır<sup>27</sup>.

### **2.5.3. Fanconi Anemisinin Tedavisi**

Geleneksel terapi, hemorajiyi ve enfeksiyonu önlemeye yönelik kemik iliği transplantasyonunu, ayrıca steroidlerin ve androjenlerin uygulanmasını içerir. Kemik iliği transplantasyonunda, HLA uygun akraba dışı nakillerin yapıldığı diğer bağışçılardan alınan kök hücre nakillerinin sonuçları daha sorunlu seyretmektedir. Preimplantasyon genetik tanı ile karyotipi normal, hasta olmadığı saptanan HLA uygun verici olabilecek bir kardeşin doğumu esnasında alınan kord kanının kriyoprezervasyonu ile alternatif kök hücre nakli imkanı sağlanmaktadır. Kordon kanı, küme belirleme terminolojisi (CD) ile kök hücre işaretleyicisi olarak bilinen yüksek oranda CD34+ hücresi içerir. CD34 / CD38 gibi kök hücreler, kültürde daha fazla çoğalma kapasitesine sahip daha ilkel bir hücreyi temsil eder. Bir diğer tedavi stratejisi, rekombinant granülosit koloni uyarıcı faktörü kullanmaktır<sup>27</sup>.

Bu tedavi, nötropeniye düzeltmede (G-CSF) veya (G-CSE) başarılı olmuştur, ancak eritrosit veya trombositik hücre dizilerinin uyarılmasında etkisizdir. Ailesel aplastik anemi, Fanconi anemisinin bir alt kümesidir ve konjenital anormalliklerin görülme sıklığı düşüktür. Bazı hastalar klasik Fanconi anemisi hastasıyla akraba



olabilir. Birkaç çocuk trombositopeniye sekonder kanama bulguları ile başvurulabilir. Hastalıkları ilerledikçe pansitopeni ve hiposellüler kemik iliği gelişir. Hastalar, önemli gelişme anomalileri olmaksızın pansitopeni ve hiposellüler iliği gelişebilir. Bazı durumlarda, ciltte çoğul transfüzyona sekonder hiperpigmentasyon veya büyüme geriliği olabilir<sup>27</sup>.

## **2.6. Aplastik Anemi ile İlişkili Bozukluklar**

Diğer hücre serilerinde azalmalar olmaksızın eritroid elementlerin hipoproliferasyonu, saf kırmızı hücre aplazisinin karakteristik özelliğidir. Saf kırmızı hücre aplazisi üç biçimde bulunur; ancak, bir dizi çeşit ve ara form tanınmıştır.

Bu nedenler ve kırmızı hücre aplazisi örnekleri;

- Doğuştan → Diamond-Blackfan Sendromu,
- Edinsel → İdiyopatik, timoma ve lenfoma ile ilişkili,
- Şiddetli → Parvovirüs, diğer enfeksiyonlar, ilaçlarla ilişkilidir<sup>27</sup>.

### **2.6.1. Saf Eritroid Aplazisi**

Saf eritroid aplazi eritropoezin yetersiz olduğu bir hastalıktır. Eritropoezin immün baskılanmasının bu tür eritroid aplazisinde rol aldığı düşünülmektedir. Bağışıklık sistemi etyolojisi, bazı hastaların steroid tedavisine yanıt vermesi ile desteklenmektedir. Saf eritroid aplazisine sahip hastalar, eritropoezi inhibe edebilen eritroid öncü hücrelere ve lenfositlere karşı antikorlara sahiptirler<sup>27</sup>.

Edinilmiş saf eritroid aplazisi, kırmızı kan hücresi üretiminin selektif yetersizliği ile karakterizedir; nadiren orta yaşlı erişkinlerde görülür. Retikülositopeni vardır ve kemik iliği, en erken eritroid seri öncül hücrelerini içermeyebilir<sup>27</sup>.

Kronik olarak edinilmiş kırmızı hücre aplazisi, ilaçlar, kollajen vasküler bozukluklar ve lenfoproliferatif bozukluklar gibi diğer durumlarla ilişkilendirilmiştir. Bu anemilerin çoğu, hedef hücrelerin ya eritroid kök hücreler ya da normoblastlar olduğu bir otoimmün sitopeni spektrumunun bir parçası gibi gözükmektedir<sup>27</sup>.

### **2.6.2. Diamond-Blackfan Sendromu**

Konjenital hipoplastik anemi olarak da bilinen Blackfan- Diamond sendromu, nadir görülen konjenital kırmızı hücre aplazisidir. Bu bozukluğun muhtemelen işlenmiş eritroid kök hücresi BFU-E olan bozuk kök hücresinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Bozukluk yavaş ilerleyen ve refrakter anemi ile karakterizedir, eşzamanlı lökopeni veya trombositopeni yoktur. Erken bebeklik çağında kendini belli eder<sup>27</sup>.

Kalıtım muhtemelen baskındır. Kromozomal karyotip normal olmasına rağmen, hastalar konjenital bozukluk gösterebilir. Spontan remisyon hastaların yaklaşık % 25'inde görülür<sup>27</sup>.

### **2.6.3. Çocukluğun Geçici Eritroblastopenisi**

Çocukluğun geçici eritroblastopenisi, genellikle sağlıklı 8 yaşından küçük çocuklarda görülür ve çoğu olgu 1 ila 3 yaş arasında görülür. Aplazik ataklarda son 3 ay içinde viral enfeksiyon öyküsü sıklıktadır. İyileşme tedavisiz olmadan 1 veya 2 ay içinde gerçekleşir. Patogenez, eritropoezin hümorale olarak inhibe edildiğini veya incelenen birçok hastada kök hücre sayısını azaldığını göstermektedir ancak parvovirüs tek neden değildir. Eritroid kemik iliği iyileşmesi genellikle atak başlangıcından 1-2 hafta sonra gerçekleşir<sup>27</sup>.

### **2.6.4. Konjenital Diseritropoetik Anemi**

Konjenital diseritropoetik aneminin (CDA) dört tipi tanımlanmıştır. Dolaylı hiperbilirubinemi, inefektif eritropoez ve olağandışı şekillenmiş çok çekirdekli eritroblastlarla karakterizedirler. Tip 1, belirgin anisositoz ve poikilositoz ile hafifçe makrositer bir anemi tablosu gösterir. Bu form doğumda belirgindir ve hayata tehdit etmez. Tip 2 CDA ( CDA'nın en yaygın olan tipi) hastalarında Asit HAM Testi pozitifdir<sup>27</sup>.

Eritrositler PNH'li hastaların eritrositlerine benzerdir, çünkü her iki anormallikteki kırmızı hücreler asidifiye edilmiş normal serumda hemolize duyarlıdır. Tip 3, tip 1'e benzer çünkü hastalar sıklıkla dev çok çekirdekli eritroblastlar gösterirler. Megaloblastik değişiklikler belirgin değildir ve kırmızı hücreler asidifiye edilmiş

normal serum ile lizise duyarlı değildir. Önerilen bir tip 4 sınıflandırma vardır. Tip 2'ye benzemekle birlikte, kısmen serolojik anormalliklerin olmaması nedeniyle farklılık göstermektedir<sup>27</sup>.

## **2.7. Aplastik Anemi ile İlişkili Genler**

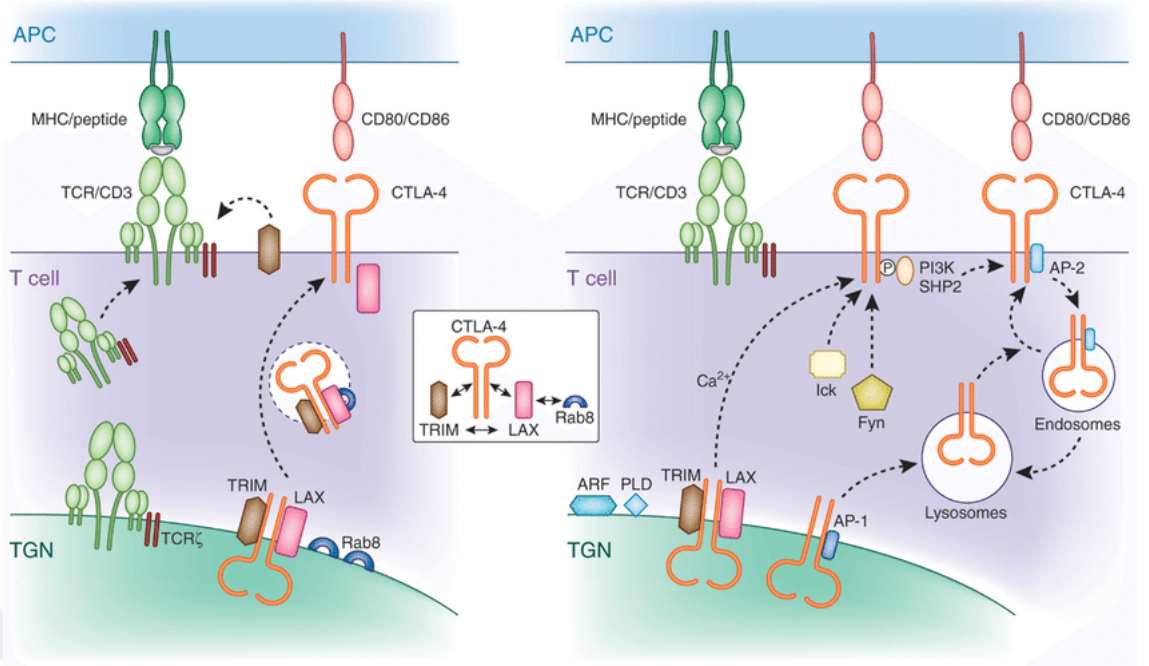
### **2.7.1. CD-28 Geni**

CD28, T hücrelerinin, forbol esterlerin mevcudiyetinde çoğalmasına izin veren, hücre yüzeyi moleküllerinin immünoglobulin süper ailesinin bir üyesidir. CD28, antijen sunan hücreler üzerinde CD80 ve CD86 gibi ko-uyarıcı reseptörlere bağlanan bir homodimer olarak mevcuttur. Ayrıca olgun timositlerde, çoğu T hücresinde, aktive edilmiş B hücrelerinde ve plazma hücrelerinde eksprese edilmiştir<sup>28</sup>.

Bu gen tarafından kodlanan protein, T-hücresi proliferasyonu ve hayatta kalma, sitokin üretimi ve T yardımcı tip-2 hücresi gelişimi için gereklidir. Bu gen için farklı izoformları kodlayan çeşitli alternatif olarak eklenmiş transkript varyantları bulunmuştur<sup>29</sup>. T hücre aktivasyonu ve büyümesi için gerekli eş uyarılar, CD28 ailesi ve tümör nekrosis faktör (TNF) ailesi üyelerine ait olan moleküller tarafından sağlanır. CD28 ailesine ait 4 adet eş uyarıcı molekül tanımlanmıştır. Bunlar CD28, indüklenbilir T hücre ko-stimülatör sistemi, sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4, CD152) ve programlanmış hücre ölümü proteini 1 molekülleridir<sup>30</sup>.

### **2.7.2. CTLA-4 Geni**

CD152 a proteini, aktive olmuş T lenfositlerin yüzeyinde eksprese edilen CTLA4'tür (sitotoksik T hücresi ile ilgili lenfosit antijen 4'tür). Bu gen, immünoglobulin süper ailesinin bir üyesidir ve bir inhibitör sinyali T hücrelerine ileten bir proteini kodlar. Aynı protein bir V alanı, transmembran bölgesi ve sitoplazmik kuyruk içerir. Farklı izoformları kodlayan alternatif transkripsiyonel ekleme varyantları karakterize edilmiştir. Membrana bağlı izoform, bir disülfid bağı ile birbirine bağlı bir homodimer olarak işlev görürken, çözünebilir izoform bir monomer olarak işlev görür. Bu gendeki mutasyonlar insüline bağımlı diabetes mellitus, Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi, çölyak hastalığı, sistemik lupus eritematozus, tiroid ilişkili orbitopati ve diğer otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir<sup>31</sup>.



Şekil 3. CTLA-4 yolculuk mekanizmaları.

## 2.8. Real Time PCR Teknolojisi

1988 yılında “thermus aquaticus” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için (PCR) otomatize termal siklus cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Floresan ışım tekniklerinin de kullanıma girmesiyle kinetik revers transkriptaz-PCR (RT PCR)’da bir devrim yaşanmaktadır. Bu sayede tümör hücrelerinin ilaç dirençlerinden kemoterapi taramalarına ve tümör evrelerinin moleküler saptanmasına kadar uzanan bir çok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır. Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek ‘Real Time’ (eşzamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PCR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Kantitatif RT-PCR, Kantitatif kinetik PCR gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür<sup>32</sup>.

Kantitatif real time PCR yardımıyla çeşitli hastalıklarla bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanması kliniklere büyük katkı sağlayacak potansiyelindedir<sup>39</sup>.

Real-time PCR’da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Çift zincirli DNA’ya bağlanan “SYBR-Green I” floresan boya en basit metoddur. “SYBR-Green I” boya ile belirleme çok iyi işleyen bir metoddur fakat reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ısıma yapabilir. Bu primer-dimer oluşumu da olabilir. Bunda başka güvenilir bir şekilde kullanılan üç adet floresan ısıma yapabilen işaretli prob vardır. Bunlar “TaqMan probe” veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemlerini içeren problemlerdir. Real-time PCR’in kullanımında birçok avantajlar vardır. Real-time PCR’in tipik kullanım alanları patojen saptanması, gen anlatımının analizi, kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizi ve son zamanlarda real-time immüno PCR ile protein belirlemesidir. Ticari olarak satılan birçok real-time cihazı vardır. Birbirleri arasındaki temel farklılıklar eksitasyon ve emisyon dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir. Real-time PCR teknolojisinin, kullanıcılar tarafından tercih edilen çeşitli alanlardaki önemi gittikçe artmaktadır. Gen ekspresyonunda daha hassas, verimli, hızlı ve daha üretken olması tercih edilme nedenidir<sup>33</sup>.

### 3.BİREY VE YÖNTEM

Çalışma için Çukurova Üniversitesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalında Aplastik Anemi (AA) tanısı konulmuş 31 çocuk hastadan oluşan grubun ve 30 sağlıklı çocuk kontrol grubu tam kan numuneleri kullanılmıştır. Toplam 61 kişiye ait tam kan numunesinin her biri 3 ml kapasiteli K<sub>2</sub>EDTA içeren BD-368856 referans numaralı tüplere alınmıştır.

Aplastik Anemili çocuk hastalarda CD28 ve CTLA-4 genlerinin ekspresyon düzeylerini incelediğimiz bu çalışmamızın laboratuvar uygulamaları 4 ana işlemden oluşmaktadır. Sırasıyla bu işlemler; tam kanlardan olgun eritrositlerin uzaklaştırılması, çekirdekli hücreler genelde lökositlerin RNA izole etme, RNA'lerden komplementer DNA (cDNA) sentezi ve son olarakta Real Time PCR tekniği ile gen ekspresyonu düzey tespitidir.

Laboratuvar uygulamalarının 4 ana işlemi sonunda elde edilen ham verilerin işlenmesinde MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) kuralları dikkate alınmıştır. Bu kurallar çerçevesinde yapılan analizler ile bize numuneler arasındaki gen ekspresyon düzeylerini kat farkı cinsinden açıklayan  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri elde edilmiştir.

#### 3.1. Tam Kanlardan Eritrositlerin Uzaklaştırılması İşlemi

Real Time PCR tekniği ile gen ekspresyon düzeyi ölçüm deneylerinin laboratuvar uygulamaları birinci basamağında tam kan numuneleri içerisinden eritrositlerin uzaklaştırılması işlemi yapılmaktadır. Bu sayede çekirdek taşımayan ve RNA içermeyen kırmızı kan hücreleri tam kandan uzaklaştırılarak çekirdek taşıyan ve RNA içeren beyaz kan hücrelerinden oluşan bir numune elde edilmektedir<sup>34</sup>.

Tam kanlardan kırmızı kan hücrelerinin uzaklaştırılması işlemi için aşağıdaki protokol izlenmiştir.

- 1- K<sub>2</sub> EDTA içeren tüplerde bulunan her bir tam kan numunesinden 500 µl alınarak bir eppendorf tüpüne konur.
- 2- Üzerine 1000 µl "Red Blood Cells Lysis Buffer (Roche Diagnostics 11814389001)" eklenir.

- 3- Shaker üzerinde 10 dk. çalkalanır.
- 4- 13.000 rpm'de 30 sn. santrifüj edilir.
- 5- Süpernatant atılır. Pellet tüpün dip kısmında kalır. (Üzerinde az miktarda süpernatant kalabilir.)
- 6- Pellet üzerine 900 µl “Red Blood Cells Lysis Buffer (Roche Diagnostics 11814389001)” eklenir.
- 7- Shaker üzerinde 5 dk. çalkalanır.
- 8- 13.000 rpm'de 30 sn. santrifüj edilir. (Bu aşamada tam ayrışma olmaz ve beyaz pellet net şekilde görünmez ise 6. 7. ve 8. basamaklar tekrarlanır.)
- 9- Süpernatant tamamen atılır. Pellet tüpün dip kısmında yoğun şekilde kalır.(Pelletin beyaza yakın bir renk alması gereklidir.)
- 10- Pellet üzerine 500 µl “ % 0.9'lukNaCl ” eklenir.
- 11- 13.000 rpm'de 30 sn. santrifüj edilir.
- 12- Süpernatant tamamen tüpten atılır.
- 13- Pellet üzerine; High Pure RNA izolasyon (Roche Diagnostics-11828665001) kiti ne ait Lysis Buffer solüsyonundan 400 µl eklenir ve -20 °C'de muhafaza edilir.

### **3.2. Lökositlerden RNA İzole Etme İşlemi**

Real Time PCR tekniği ile gen ekspresyon düzeyi ölçüm deneylerinin laboratuvar uygulamaları ikinci basamağında; çekirdek taşımayan ve RNA içermeyen kırmızı kan hücreleri tam kandan uzaklaştırıldıktan sonra elde ettiğimiz çekirdek taşıyan ve RNA içeren lökositlerden RNA'lar izole edilmelidir. RNA'lar aracılığı ile sırasıyla aminoasitlerin birleştirilmesi ve sonunda kodlanmış olan proteinin üretilmesi süreci için bu moleküller çok büyük bir önem arz etmektedir. RNA'lar gen ekspresyon sürecinin yürütücüleridir diyebiliriz<sup>35</sup>.

Lökositlerden RNA izole etme işlemi için aşağıdaki protokol izlenmiştir.

Filtre Kolon Yöntemi ile çalışan High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics-11828665001) kullanılarak yapılmıştır.

- 1- Kırmızı kan hücreleri uzaklaştırılmış numuneler kolon filtreli tüpler içerisine konur, her bir kolon filtreli tüpün altına ise atık tüpleri yerleştirilir ve tüplerin kapakları kapatılır.
- 2- 8000 g'de 15 sn. santrifüj edilir.
- 3- Kolondan geçerek atık tüplerine biriken sıvılar boşaltılır. Atık tüpleri tekrar kolon filtreli tüplerin altına konur, her bir numunenin üzerine **90 µl DNase Incubation Buffer + 10 µl DNase I** kolon filtreli tüpün üzerinden eklenir. 15 dk süre ile +15°C/+25°C arası oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- 4- Kolon filtreli tüplerin üzerine **0,5 ml Wash Buffer I** eklenip, 8000 g'de 15 sn. santrifüj edilir, atık tüplerine biriken sıvılar boşaltılır. Atık tüpleri tekrar kolon filtreli tüplerin altına konur.
- 5- Kolon filtreli tüplerin üzerine **0,5 ml Wash Buffer II** eklenip, 8000 g'de 15 sn. santrifüj edilir, atık tüplerine biriken sıvılar boşaltılır. Atık tüpleri tekrar kolon filtreli tüplerin altına konur.
- 6- Kolon filtreli tüplerin üzerine **0,2 ml Wash Buffer II** eklenip, 13000 g'de 2 dk. santrifüj edilir. Atık tüpleri atılır.
- 7- Kolon filtreli tüpler kapaklı 1,5 ml lik ependorf tüplere aktarılır.
- 8- Her örnek için kolon filtreli tüplere **75 µl Elution Buffer** eklenir. 8000 g'de 1 dk. santrifüj edilir.
- 9- Ependorf tüplerin içerisine biriken RNA'lar (-80)°C 'de muhafaza edilir veya cDNA sentez işlemine geçilir.

### **3.3. RNA'lardan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi**

Real Time PCR tekniği ile gen ekspresyon düzeyi ölçüm deneylerinin laboratuvar uygulamaları üçüncü basamağında; tek iplikli RNA yapıları çift iplikli ve daha dayanıklı olan komplementer DNA'ya (cDNA'ya) dönüştürülmektedir. Bu dönüşüm için Reverse Transcriptase adlı enzime ihtiyaç duyulmaktadır. Elde edilen cDNA sayesinde genlerin ekspresyonu RNA ve protein seviyesinde daha ayrıntılı incelenebilmektedir.

RNA'lardan Komplementer DNA (cDNA) sentezi işlemi için aşağıdaki protokol izlenmiştir.



Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics-04896866001) ile yapılmıştır. RNA'lerden cDNA Sentezi yapılması işlemi 2 aşamalıdır.

1. Aşamada her bir numuneden elde edilmiş 9 µl Total RNA, 2 µl Random Hexamer Primer ve 2 µl Su (PCR Grade) bir araya getirilerek toplam 13 µl'lik bir karışım hazırlanır, bu karışım Thermal Cycler cihazında 65°C' de 10 dk. bekletilir.
2. Aşamada 13 ul'lik karışım üzerine 4ul Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor, 2 µl Deoxynucleotide Mix, 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase eklenerek toplam 20 µl Final Volume oluşturulur. Bu karışım da Thermal Cycler cihazında 25°C'de 10 dk., 50°C'de 60 dk. ve son olarak 85°C'de 5 dk. bekletildi. Süre sonunda cDNA'lar elde edildi.

### **3.4. Real Time PCR Tekniği ile Gen Ekspresyonu Düzey Tespiti**

Real Time PCR tekniği ile gen ekspresyon düzeyi ölçüm deneylerinin laboratuvar uygulamaları dördüncü ve son basamağında; bir Real Time PCR cihazı ve karışımı yardımıyla cDNA'ların çoğaltılması ve mutlak miktar tayini analizleri izlenerek gen ekspresyon düzeyi tespitleri yapılmaktadır.

Real Time PCR tekniği ile gen ekspresyon düzeyi tespiti işlemi için aşağıdaki protokol izlenmiştir.

ACBT (Beta Actin) referans geni ile CD28 ve CTLA-4 hedef genlerinin ekspresyon düzeyi tespit kitleri Real Time Ready Catalog Assay (Roche Diagnostics-05532957001) olarak dizayn ettirilmiştir. Bu genlerin ekspresyon düzeyi tespitinde Real Time PCR enzimi olarak LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics-04707494001) kullanılmıştır.

Çalışma Roche LightCycler 480 II adlı Real Time PCR Sisteminde, 96 kuyucuklu Plate'ler üzerinde yapılmıştır. Her bir numune ACTB, CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri ölçümü için işleme alınmıştır.

ACTB, CD28 ve CTLA-4 genleri için kuyucuklara yüklenen Real Time PCR Karışımı içeriği şu şekildedir; 1 ul Real Time Ready Assay (20x) , 10 ul LightCycler 480 Probe Master (2x) ve 4 ul Su (PCR Grade) . Real Time PCR ana karışımı 15 ul olmaktadır ve üzerine 5 ul cDNA eklenmiştir.

**Tablo 1.** ACTB, CD28 ve CTLA-4 genleri için kullanılan Real Time PCR karışımı

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim</b>
Real Time Ready Assay (20 x)	1 ul
LightCycler 480 Probe Master	10 ul
PCR Grade Su	4 ul
Cdna	5 ul
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 ul</b>

ACTB, CD28 ve CTLA-4 genlerinin ekspresyon düzeyi tespiti için oluşturulan Real Time PCR karışımı LightCycler 480 II Sisteminde ısı protokolü uygulamasına alınmıştır. Kullanılan ısı protokolü şu şekildedir;

95°C'de 10 dk. ön inkübasyon (1 siklus), 95°C'de 10 sn. 60°C'de 30 sn. ve 72°C'de 1 sn. olmak üzere 3 aşamalı çoğaltma işlemi (45 siklus ve 72°C'de sinyal toplama), 40°C'de 30 sn. soğutma işlemi yapılır. Süreler sonunda 465-510 Filtre Kombinasyonu ile ışına ölçümleri toplanmıştır.

**Tablo 2.** ACTB, CD28 ve CTLA-4 genlerinin ekspresyon düzeyi tespiti için kullanılan Real Time PCR ısı protokolü.

<b>Aşamalar</b>	<b>Siklus Sayısı</b>	<b>Analiz Modu</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>
<b>Ön İnkübasyon</b>	1	Yok	95°C	10 dk
<b>Çoğaltma</b>	45	Kantifikasyon	95°C	10 sn
			60 °C	30 sn
			72°C	1 sn*sinyal toplama
<b>Soğutma</b>	1	Yok	40°C	1 dk

Elde edilen ACTB, CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyonu düzey sonuçları LightCycler 480 II sistem 1.5.0 software programında Absolute Quantification (Mutlak Miktar Tayini) metoduyla analiz edilmiştir. Analiz sonucunda sistem numunelerin ilgili genlere ait CP (Crossing Point) değerlerini bir tablo halinde hazırlanmıştır.

### **3.5. Gen Ekspresyonu Düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Metoduyla Hesaplanması**

LightCycler 480 II Sistem 1.5.0. software ile elde edilen CP değerleri ham veri olarak kabul edilmektedir, bu nedenle hedef genler olan CD28 ve CTLA-4'ün gen

ekspresyon düzeyleri ACTB referans geni baz alınarak  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metoduyla hesaplanmaktadır.  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metoduyla yapılan hesaplamalarda MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) kuralları dikkate alınmıştır<sup>36</sup>.

Bu hesaplamada öncelikle her bir hedef genin CP değeri aynı numuneye ait referans gen CP değerinden çıkartılır ve  $\Delta CT$  bulunur. Ardından  $\Delta CT$  değeri en büyük olan numune “kalibratör” olarak tayin edilir ve tüm numunelerin  $\Delta CT$  değerlerinden kalibratörün  $\Delta CT$  değeri çıkartılır ve  $\Delta\Delta CT$  değerine ulaşılır. Son olarakta elde edilen  $\Delta\Delta CT$  değerleri 2 sayısı üzerine eksi üs ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) şeklinde yazılarak değerlendirmeye alınır ve tüm numunelerin CD28 ve CTLA-4 genleri için ekspresyon düzeyleri bulunmuş olur. Buradaki 2 sayısı Efficiency'nin sabit sayısıdır, Real Time PCR'da numuneler çoğaltılırken her cycle'da 2 kat çoğaldığı için sabit olarak kabul edilir. Gen ekspresyon düzeyinin belirli bir ölçüm birimi yoktur,  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri arasındaki matematiksel kat farkları bize istatistik analiz yapılması için gerekli ham verileri sunar<sup>36</sup>.

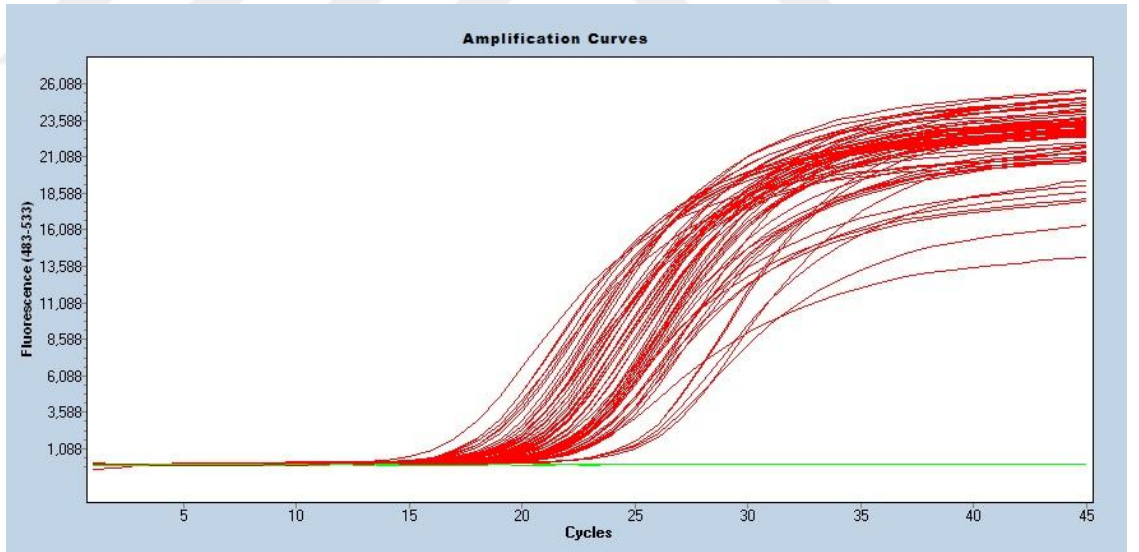
### 3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümler ise ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Sayısal ölçümlerin normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamadığı Kolmogorov Smirnov testi ile test edildi. Normal dağılım göstermeyen sayısal ölçümlerin iki grup arasında karşılaştırmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Bazı sayısal ölçümlerin normal dağılım varsayımını sağlamaması nedeniyle bu sürekli ölçümler arasındaki korelasyon Spearman Korelasyon katsayısı ile incelendi. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı<sup>37</sup>.

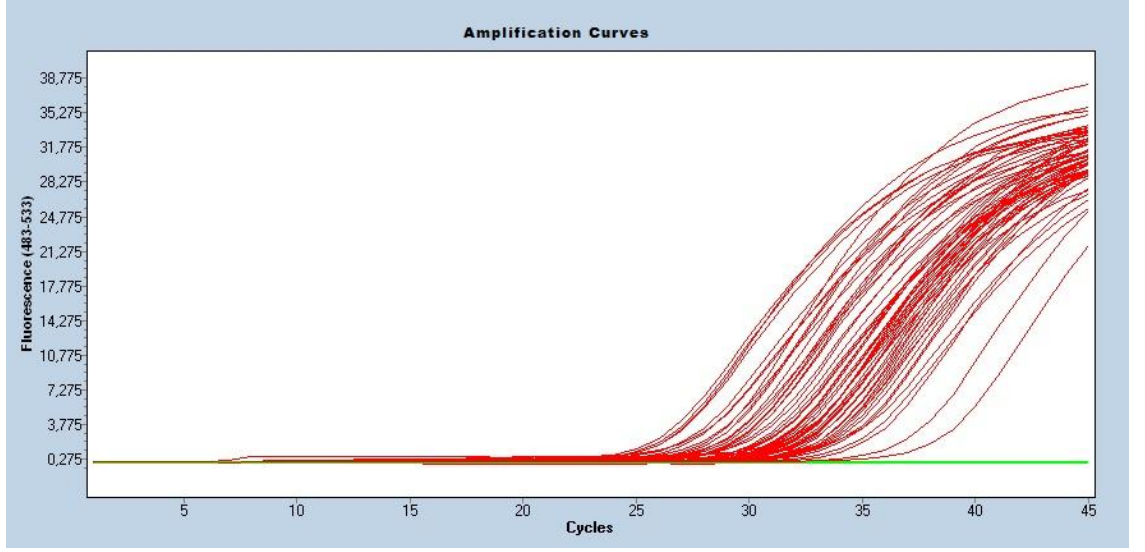
## 4.BULGULAR

Çalışmamızda Ç.Ü.T.F. Çocuk Hematoloji Bilim Dalında tanısı konulmuş 31 Aplastik Fanconi Anemili çocuk hasta grubu olarak ve Çocuk Acil Bölümüne başvurmuş ancak daha önce herhangi bir genetik bir hastalık tanısı konulmamış hematolojik bulgusu olmayan 30 sağlıklı çocuk ise kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamız için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 14 Nisan 2017 tarihli ve 18 numaralı karar ile onay alınmıştır.

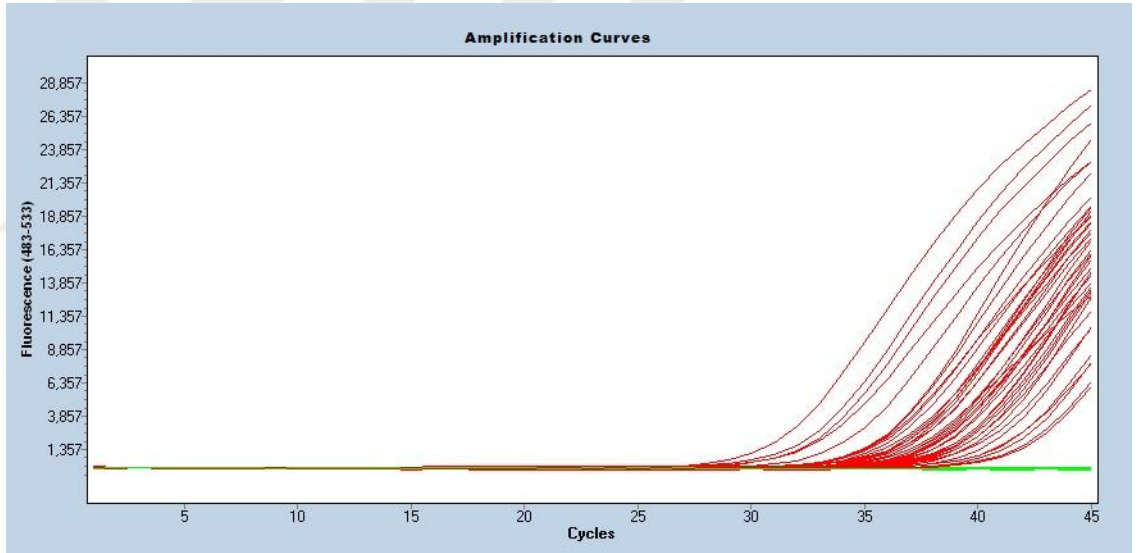
Hasta ve Kontrol grubundan alınan kan örneklerinin lökosit ayırma işlemleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı laboratuvarlarında; nükleik asit izolasyonları, cDNA sentezleri ve Real Time PCR çalışmaları Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında, istatistiksel analizleri ise Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapılmıştır.



**Grafik 1.** Hasta ve kontrol gruplarının “Beta Actin” referans genlerine ait, Real Time PCR metoduyla elde edilmiş gen ekspresyon grafik görüntüsü.



**Grafik 2.** Hasta ve kontrol gruplarının “CD28” hedef genlerine ait, Real Time PCR metoduyla elde edilmiş gen ekspresyon grafik görüntüsü.



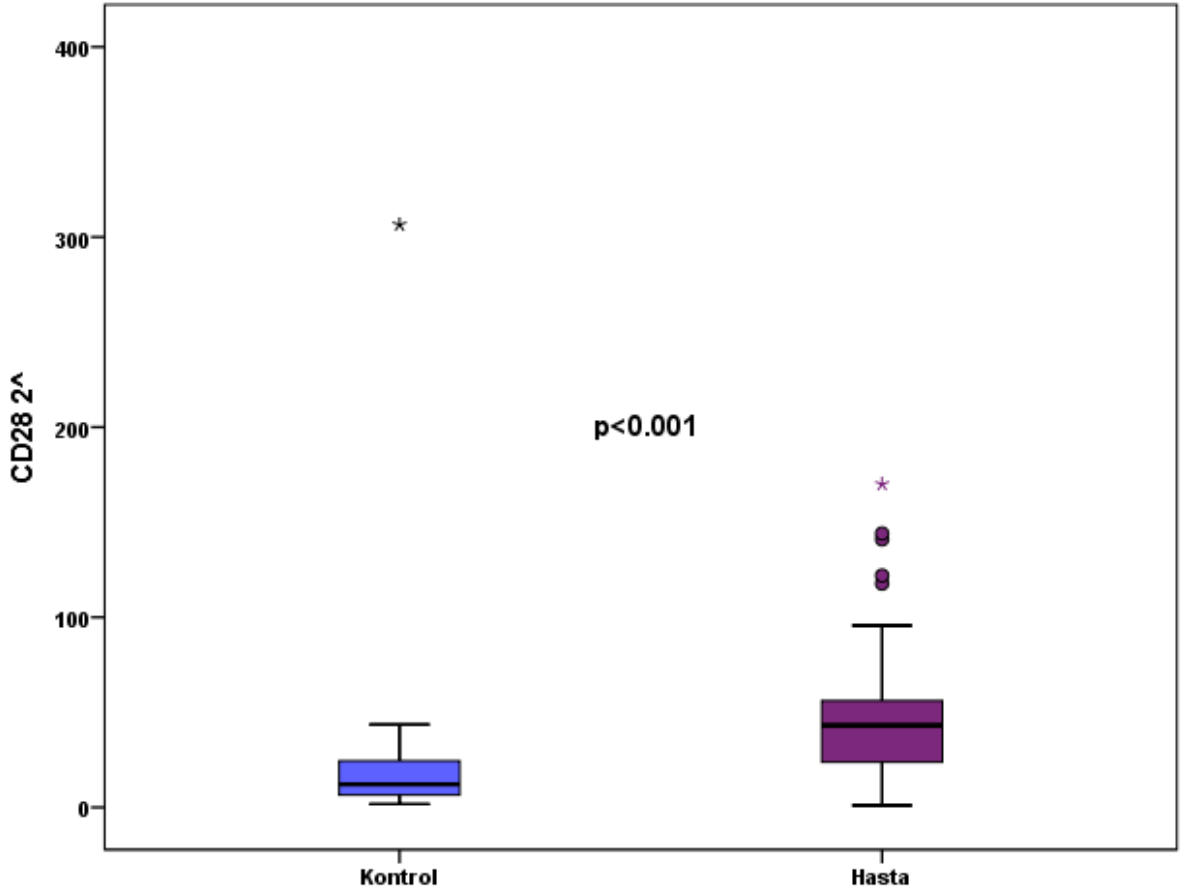
**Grafik 3.** Hasta ve kontrol gruplarının “CTLA-4” hedef genlerine ait, Real Time PCR metoduyla elde edilmiş gen ekspresyon grafik görüntüsü.

**Tablo 3.** Kontrol ve Hasta Gruplarının Ortalama, Median ve P Değerleri Tablosu.

GENLER	KONTROL GRUBU $\bar{x}$ (Ort.) $\pm$ Sd Median (Min-Max)	HASTA GRUBU $\bar{x}$ (Ort.) $\pm$ Sd Median (Min-Max)	p DEĞERİ
CD28	24,11 $\pm$ 54,40 12,13 (1,9-306,56)	53,80 $\pm$ 44,22 43,11 (1-170,07)	<0,001*
CTLA-4	7,04 $\pm$ 10,20 1,90 (0-38,05)	38,79 $\pm$ 45,30 27,1 (0-188,71)	<0,001*

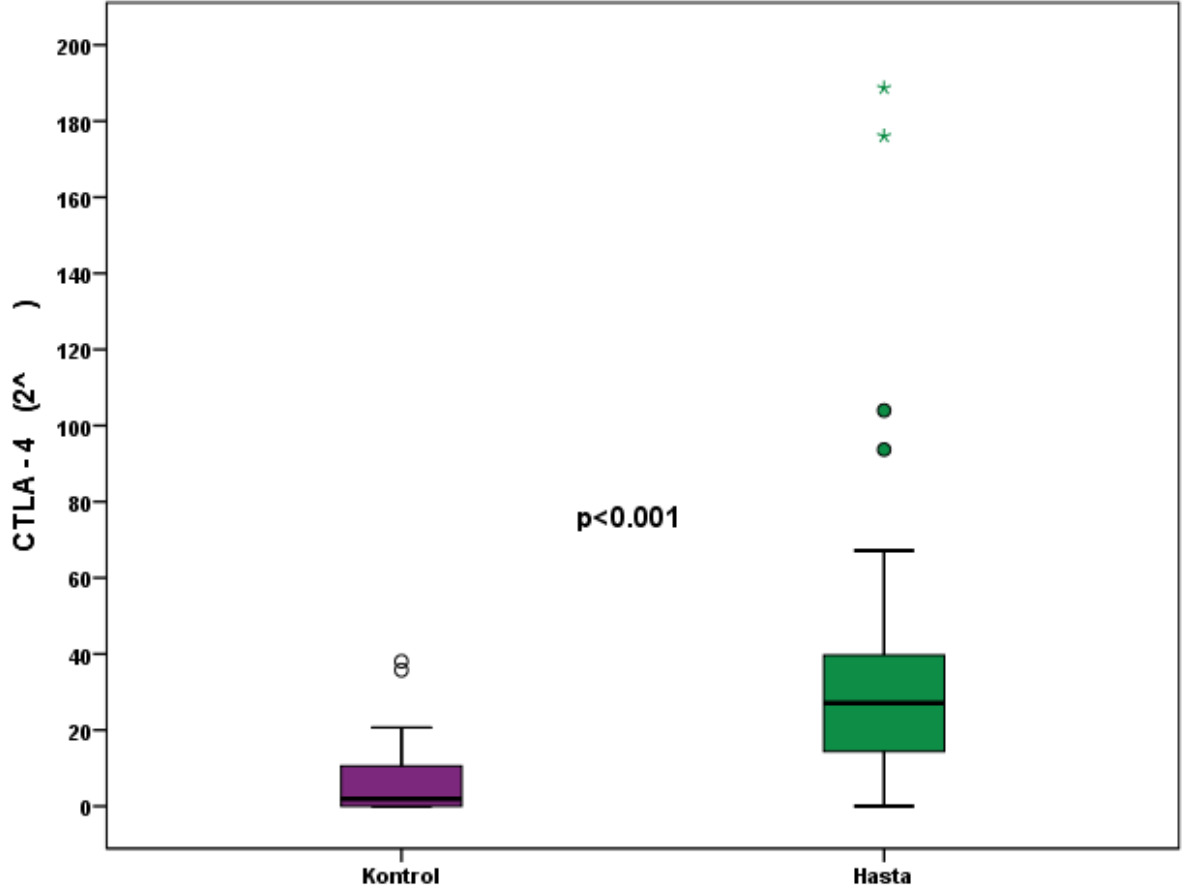
\*p değeri  $\leq$  0.05 ise anlamlı kabul edilmiştir.

İstatistiki bulgulara göre CD-28 ve CTLA-4 genlerine ait ekspresyon düzeyleri hasta ve kontrol grupları kıyaslandığında anlamlı bulunmuştur.



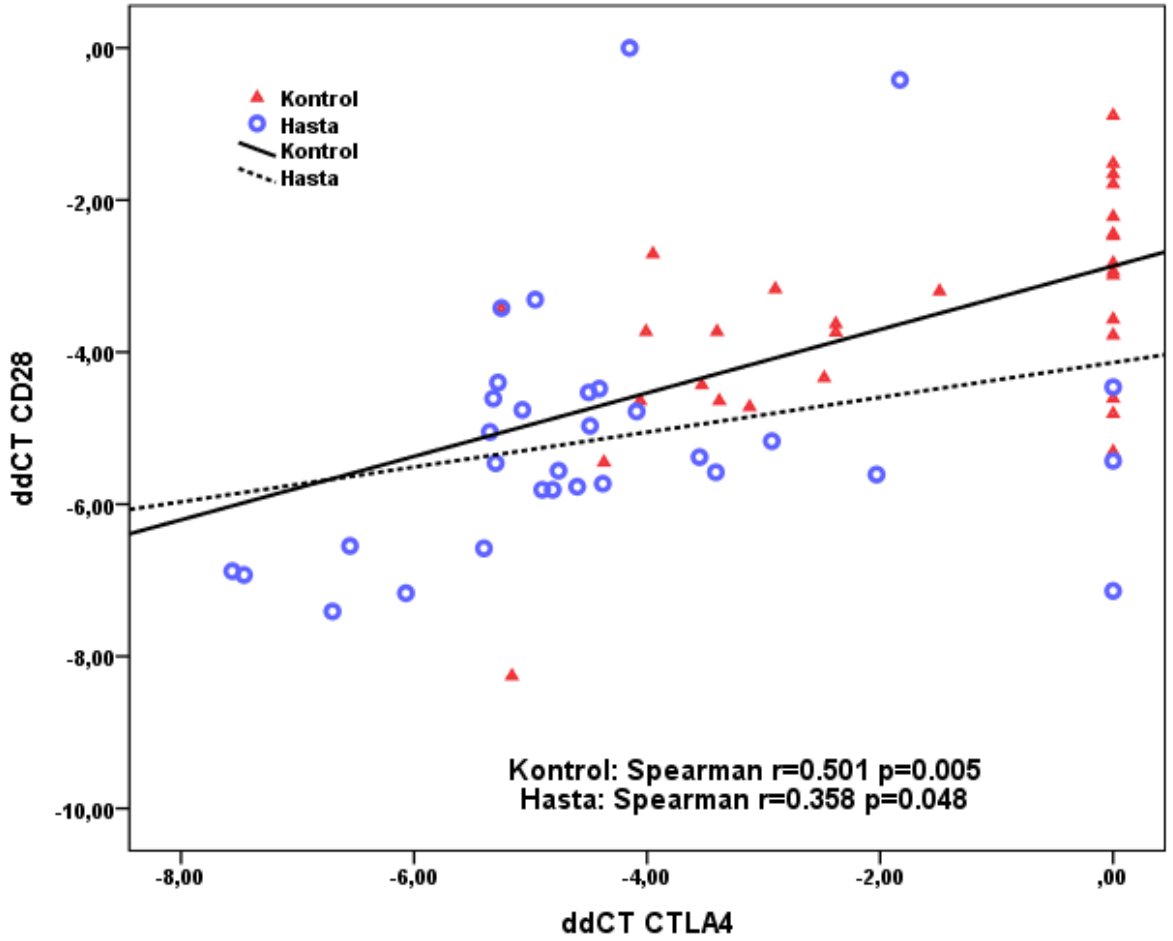
**Grafik 4.** AA'lı hasta grubu ve kontrol grubunun CD28 gen ekspresyon düzeyi kutu grafiği.

Yukardaki kutu grafiğinde CD28 gen ekspresyon düzeyleri açısından AA'lı hasta grubu ve kontrol grubunun aralarında anlamlı fark bulunduğu görülmektedir (P değeri  $\leq 0.05$ )



**Grafik 5.** AA'lı hasta grubu ve kontrol grubunun CTLA-4 gen ekspresyon düzeyi kutu grafiği.

Yukardaki kutu grafiğinde CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri açısından AA'lı hasta grubu ve kontrol grubunun aralarında anlamlı fark bulunduğu görülmektedir (P değeri  $\leq 0.05$ )



**Grafik 6.** AA'lı hasta grubu ve kontrol grubunun CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri Spearman korelasyon grafiği.

Yukarıdaki Spearman grafiğine göre AA'lı hasta grubunda CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ( $p=0.005$ ). Aynı grafikte kontrol grubunda da CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ( $p=0.048$ ). Ayrıca her iki grupta da CD28 gen ekspresyon düzeylerinin CTLA-4 gen ekspresyon düzeylerine göre daha yüksek çıktığı görülmüştür.



## 5.TARTIŞMA

Lenfositler vücudun bağışıklık yanıtında işlev görür. B lenfositler sıvısal (humoral), T lenfositler ise hücrel (sellüler) bağışıklıktan sorumludurlar. T ve B lenfositlerin gelişimi, yaşam süreleri ve fonksiyonları birbirinden farklılık gösterir<sup>3,5,6</sup>.

T hücresi aktivasyonu 2 uyarana gerektirir. T hücresi reseptörü ile etkileşecek major histokompatibilite kompleksi yapısı içinde peptid bağı varlığı ve ko-stimülatör uyarır<sup>47</sup>.

Aplastik Anemili hastaların T hücre reseptör sinyali yolundaki gen ifadelerindeki değişimlerin moleküler yöntemlerle incelenmesi konusunda karşımıza sayıca kısıtlı literatür çıkmaktadır. Bu literatürlerde CD28 ve CTLA-4 genlerinin ekspresyon düzeylerine ait önemli bilgiler yer almaktadır.

T hücresi aktivasyonu adaptif immün sistem fonksiyonlarının başarılmasında kilit bir olaydır. Ayrıca koruyucu hücrel ve humoral immünitinin oluşumunda hayati öneme sahiptir. CD4 efektör T hücresi tepkileri oluşturmak için aktivasyon gerektiği gibi B hücresi ve sitotoksik T hücre yanıtına destek sağlamak için de aktivasyon gereklidir. T hücre aktivasyonunun normalde nasıl düzenlendiğini anlamak, terapötik müdahale için kritiktir ve CD28/CTLA-4 yolu, moleküler terimlerle başlangıç aktivasyon kontrol noktasını temsil eder. Özellikle, CTLA-4 yolu öz-reaktivitenin temel bir düzenleyicisi olarak iyi bir şekilde kurulurken, etki mekanizması hala belirsizdir<sup>38</sup>.

CD28'in bağların CD80/CD86'ya tutunması, efektif T hücresi poliferasyonu ve farklanmasını çökerten transkripsiyonel programı başlatır. CD28 uyarılarının yokluğu T hücrelerinin yanıtını durdurur ve hücreler anerjik duruma gelirler<sup>48</sup>.

Kısıtlı literatürün ilk örneklerinden biri Li D. ve arkadaşlarının Amerika'da yaptığı çalışmadır. Bu çalışmaya göre CTLA-4 bağlantısının T hücre yanıtları için eşiği artırdığı ileri sürülmüştür. CD28 ve CTLA-4, bağışıklık tepkilerinin ayarlanmasında karşıt rollere sahiptir. CD28 azalmakta ve CTLA-4, T hücresi aktivasyonu için eşiği artırmaktadır<sup>39</sup>.

Gardner D. ve arkadaşlarının çalışmasında ağırlıklı olarak agonistik anti CTLA-4 antikoru kullanılarak yapılan çalışmalara dayanarak, CTLA-4 fonksiyonuna ilişkin fikirler, T hücresi aktivasyonunu önleyen bir inhibitör sinyali kavramına odaklanmıştır. Bu yüzden, CTLA-4 fonksiyonu için çok sayıda hücre-işsel kavram önerilmiş ve in vivo

olarak CTLA-4 fonksiyonundaki bu tür sinyallerin rolü araştırılmıştır. CD28 ve CTLA-4 arasındaki ligandların paylaşımı, CD28 ve CTLA-4 fonksiyonların yakından iç içe geçtiği ana prensibini vurgular. Önemli olarak, CTLA-4 eksikliğinin neden olduğu ölümcül fenotipin, CD28 bağımlı ve ligand odaklı T hücre aktivasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıktığı açıktır<sup>38</sup>.

Ville S. ve arkadaşları belatasept ile çalışma yapmışlar. Allo-immün tepki bağlamında, hücreler CTLA-4'ün aracılık ettiği ve belatasepte direnç kazandıran kurtarıcı bir inhibitör sinyalinin ciddi şekilde reddedilmesine neden olabilir. Belatasept, spesifik bir T hücre aktivasyon bloke edicidir. Hücrel rejeksiyon, CTLA-4 sinyallerini engellemeksizin, CD28 aracılı sinyalleri bloke edecek olan, klinik geliştirmede bulunan CD28 spesifik antagonistlerin kullanımıyla hafifletilebilir<sup>40</sup>.

Yardımcı T hücresi yanıtı ve enfeksiyonlara karşı koruyucu immünite gelişimi için T hücresi uyarısını başlattıktan sonra CD28 ekspresyonu gerekir. T yardımcı hücrelerinin aktivasyonu için ko-stimülatör molekül CD28 esansiyeldir. Aktivasyonu izleyerek T hücre yanıtlarının devam ettirilmesinde CD28'in görev alıp almadığı bilinmektedir<sup>46</sup>.

Linterman A. M. ve arkadaşlarının yaptığı çalışma CD28 ekspresyonunun, enfeksiyon sonrası efektör CD4+ T hücreleri için önemli olduğunu göstermiştir. CD28, T yardımcı tip 1 hücrelerinin genişlemesi ve viral enfeksiyon sırasında T foliküler yardımcı hücrelerin farklılaşması ve korunması için gereklidir. Aynı zamanda veriler, aktif T hücrelerinde CD28 kaybının, yabancı antijene karşı immün tepkiye zarar verebileceğini göstermektedir. Bunun, yaşla birlikte, HIV enfeksiyonu sırasında ve çoklu immün bozukluklarda CD28-negatif CD4+ T hücrelerinin birikimi için etkileri gösterilmiştir<sup>41</sup>.

Krummey M. S ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CD28 / CTLA-4 yolunun blokajının, romatoid artrit ve böbrek nakli bağlamında patojenik T hücresi tepkilerinin modülasyonunda etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, Th17 hücrelerinin CD28 / CTLA-4 blokajına göreceli direnci, Th17 hücrelerinin otoimmünite ve GVHD'de rolü olduğu ve böbrek, akciğer ve karaciğer allogreftin kabulünde rol aldığı için bu reaktifin daha da geliştirilmesi için önemli etkileri olduğu gösterilmiştir<sup>42</sup>. Krummey M. S ve arkadaşlarının yaptığı farklı bir çalışmada, organ nakli reddinin önlenmesi için belataseptin klinik kullanımının önemi vurgulamıştır. Sonuç olarak, CD28 / CTLA-4

kostimülasyon bloker belatasept, transplant sonrası immünsupresyonun uzun yıllar içindeki ilk ilerlemesini göstermiştir<sup>43</sup>.

Son yıllarda Li B. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Aplastik Anemili (AA'lı) çocuklarda CD3 $\zeta$  ve CD28 genlerinin ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek tespit edilirken, CTLA-4 ve Cbl-b genlerinin ekspresyon düzeyleri anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir<sup>44</sup>. Biz de çalışmamızda Aplastik Anemili (AA'lı) çocuklarda CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeylerini anlamlı derecede yüksek bulduk. Büyük olasılıkla seçilen yaş gruplarına bağlı farklı sonuçlara ulaşılmıştır.

Çalışmamızda ise bölgemizdeki Aplastik Anemili (AA'lı) çocukların CD28 gen ekspresyon düzeyleri açısından kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark bulunduğu görülmektedir ( $p<0,001$ ). Aynı şekilde Aplastik Anemili (AA'lı) çocukların CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri açısından da kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark bulunduğu görülmektedir ( $p<0,001$ ).

Yine Spearman korelasyon testine göre yapılan analizlerde CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeylerinin Aplastik Anemili (AA'lı) çocuklarda kontrol grubuna göre daha yüksek tespit edildiği ve istatistiksel olarak anlam ifade ettiği görülmüştür. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar da paralellik göstermektedir.

Aplastik anemiler major otoimmün patogenetik komponenti ile birlikte nadir görülen hastalıklardandır. CTLA-4 T lenfosit yüzey molekülünde immün toleransın devamında gereklidir. CTLA-4'ün ekspresyonunun azaldığı durumlarda bazı polimorfizmler birlikte ve bu yüzden otoimmüniteye eğilim artışı ile birlikte çeşitli otoimmün hastalıklar oluşur. CTLA-4 azlığının aplastik anemi gelişme riskini etkilemediği ve immünosupresif yanıtı etkilemediği gösterilmiştir. CTLA-4 aktive T lenfositlerinde eksprese edilen yüzey molekülleridir, T hücrelerinin self toleransını down regüle eder. CTLA-4 (CD165), CD4+ T hücrelerinde eksprese edilen bir yüzey proteini olup; T hücresi aktivitesini azaltmak için B7.1 ve B7.2 ile yansımali bağlanır. CTLA-4 (CD152) T hücresi aktivasyonunda negatif etki gösteren bir ko-stimülatör molekülüdür. Olasılıkla CTLA-4, CD28 ile başlatılan ko-stimülatör hücrelerini baskılar. CTLA-4'ün CD80 ve CD86 ile bağlanması negatif uyarıcı yolu başlatır veya aktive edici yolun fonksiyonunu bozarak T hücre reseptörlerinin down streami aktivasyonunu inhibe eder<sup>45,49</sup>.

T hücrelerinin bir alt grubunda olasılıkla CD4+ CD25+ regülatör T hücrelerinde bulunan CTLA-4'ün ligasyonu, komşu hücrelerin aktivasyon veya proliferasyonunu önler. CTLA-4 hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerinin yüzeyinde hücre aktivasyonundan 24 saat sonra saptanabilir<sup>50,51,52</sup>.

Çalışmamız Spearman korelasyon testine göre analiz edildiğinde; AA'lı hasta grubunda CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde kontrol grubunda da CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır. Ayrıca her iki grupta da CD28 gen ekspresyon düzeylerinin CTLA-4 gen ekspresyon düzeylerine göre daha yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında CTLA-4 ve CD28'in fonksiyonel harmonizasyonunda çok önemli olduğunu gösterir.

Bu çalışma sınırlı sayıda ve yaş grubunda aplastik anemili hastalarda yapıldığından öncül çalışma olarak kabul edilebilir. Daha geniş örneklem ve yaş gruplarıyla yapılacak çalışmalar geleceğe daha fazla ışık tutacaktır.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız Eylül 2017- Ağustos 2018 tarihleri arasında toplanan kan örneklerinde yapılmıştır. Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalında Aplastik Anemi (AA) tanısı konulmuş 31 çocuk hastadan oluşan grubun ve 30 sağlıklı çocuk kontrol grubunun tam kan örnekleri kullanılmıştır. Alınan kan örneklerinin kırmızı kan hücrelerinden arındırılması işlemleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır. Ardından Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Real Time- PCR cihazında gen ekspresyon düzeyi belirleme işlemleri yapılmıştır. Tüm verilerin istatistiksel analizleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 20.0) programı yardımıyla yapılmıştır. Laboratuvar uygulamaları, değerlendirmeler ve istatistiksel analizler sonucunda;

1- Bölgemizdeki Aplastik Anemili (AA'lı) çocukların CD28 gen ekspresyon düzeyleri açısından kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark bulunduğu görülmektedir ( $p < 0,001$ ).

2- Bölgemizdeki Aplastik Anemili (AA'lı) çocukların CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri açısından da kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark bulunduğu görülmektedir ( $p < 0,001$ ).

3- Bölgemizdeki AA'lı hasta grubunda CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir ( $p = 0,048$ ;  $r = 0,358$ ).

4- Bölgemizdeki Kontrol grubunda CD28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ( $p = 0,005$ ;  $r = 0,501$ ).

5- Bölgemizdeki Hem AA'lı hasta hem de kontrol grubunda CD28 gen ekspresyon düzeylerinin CTLA-4 gen ekspresyon düzeylerine göre daha yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür.

6- Çalışma sonunda bölgemizdeki Aplastik Anemili (AA'lı) çocukların CD-28 ve CTLA-4 gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek tespit edildiği ve istatistiksel analizin anlamlı ( $p \text{ değeri} \leq 0,05$ ) olduğu görülmüştür.

T hücre reseptör sinyal yolundaki gen ifadeleri ile ilgili elde ettiğimiz verilerin, çocuk hematoloji kliniği hastalarına tanı, takip ve tedavi süreçlerinde katkı sağlayabilir. Çalışmamız öncül bir çalışma olup, örneklerimizin genişletilmesi veya parametreler arası ilişkilerin daha ileri düzeyde incelenmesi, aplastik anemili hastalarımız için yeni açılımlar sağlayacaktır.



## KAYNAKLAR

1. **Dinçol G.** Aplastik anemi. *Türkiye Klinikleri J Hematol.* **2004;** 2(2):116-22.
2. **Longo L D.** *Harrison's Hematology and Oncology.* **2010;** 128-138.
3. **Beyaz F.** T Lenfositlerin gelişimi, fonksiyonları ve histokimyasal özellikleri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* **2004;** 1(1):61-66.
4. **Bülbül Başkan E.** T hücre immunitesi. *Türkdem.* **2013;** 47: Özel Sayı 1: 18-23.
5. **Turgeon L M.** *Clinical Hematology Theory and Procedures.* **2005;** 221.
6. **Lydyard P, Grossi C.** Cells involved in the immune response, In: Roitt IM, Brossotoff J, Male DK. (eds) *Immunology.* Forth edition, Spain; Mosby Company **1996;** 2.2-2.14.
7. **Özbek M.** B lenfositlerin gelişimi . *MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* **2016;** 4(2): 88-95.
8. **Levinson W, Jawetz E.** *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji.* 5. ed. Çeviri Editörü: İsmail H Dünder. İstanbul: Barış Kitabevi/Appleton ve Lange, **1998;** 327-400.
9. **Düzgün N.** *Romatoloji.* Yeni Şehir Kitabevi, **2011;** 97-122.
10. **Meek B, Speijer D.** The ocular humoral immune response in health and disease. *Prog Retin Eye Res.* **2003;** 22(3): 391-415.
11. **Kılıçturgay K.** *İmmünolojiye giriş.* 2.Baskı. Bursa: Güneş Kitabevi, **1991;** 1-150.

12. **Öztürk Durmaz E.** B hücre aktivasyonu ve antikor üretimi. *Türkdem.* **2013;** 47: Özel Sayı 1: 24-7.
13. **Turgeon L M.** *Clinical Hematology Theory and Procedures.* **2005;** 222.
14. **Howard R Martin, Hamilton J Peter.** *Haematology an Illustrated Colour Text.* **2013;** 9.
15. **Friedlaender MH.** *Allergy and Immunology of the Eye.* 2. ed. New York: Raven Press, **1993;** 1- 325.
16. **Arıkan H, Tosunoğlu M, Gül Ç.** *Genel hematoloji ders notları ve uygulama kılavuzu.* **2012;** 17.
17. **Rodak B F, Fristma A G, Keohane M E.** *Hematology clinical principles and applications.* **2012;** 230.
18. **Longo L D.** *Harrison's Hematology and Oncology.* **2010;** 128-129.
19. **Longo L D.** *Harrison's Hematology and Oncology.* **2010;**131.
20. **Turgeon L M.** *Clinical Hematology Theory and Procedures.* **2005;** 126.
21. **Howard R Martin, Hamilton J Peter.** *Hematology an Illustrated Colour Text.* **2013;** 53.
22. **Saxena R, Pati HP, Mahapatra M.** *Atlas of Hematology.* **2012;** 17.
23. **Howard R Martin, Hamilton J Peter.** *Haematology an Illustrated Colour Text,* 2013; 52.



24. **Hatton R S C, Hughes - Jones C N, Hay D, Keeling D.** *Haematology lecture notes.* **2013;** 111-112.
25. **Turgeon L M.** *Clinical Hematology Theory and Procedures.* **2005;** 121.
26. **Longo L D.** *Harrison's Hematology and Oncology.* **2010;** 134-135.
27. **Turgeon L M.** *Clinical hematology Theory and Procedures.* **2005;** 125-126.
28. **Bain J B, Gupta R.** *A-Z of Hematology.* **2003;** 43.
29. Erişim: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/940>) Erişim Tarihi: 11.08.2018
30. **Karaselek M A, Reisli İ.** T Hücrelerin Eş Uyararı ve İnhibitorleri: CD28 Ailesi. *Asthma Allergy Immunol* **2016;** 14:49-55.
31. Erişim: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1493>) Erişim Tarihi: 11.08.2018
32. **Aydın Sayitoğlu M.** Hematoloji'de Real Time PCR. İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, Temel Moleküler Hematoloji Kursu Erişim: (<http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/mugeaydinsayitoglu.pdf>) **2018** Erişim Tarihi: 19.08.2018
33. **Günel T.** "Quantitative analysis of gene expression "real-time PCR": Scientific letter", Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, **2007;** 27:763-767.
34. **Robert J. Fezor,1 Henry V. Baker.** Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses. *Physiol Genomics*, 2004; 19:247–254.
35. Erişim: (<http://science.sciencemag.org/content/sci/352/6292/1406.full.pdf>) Erişim Tarihi: 19.08.2018

36. **A. Bustin, Vladimir B, Jeremy A.** The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, **2009**; 55:4 611–622.
37. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp., 2011.
38. **Gardner D, Jeffrey E L, Sansom M D.** Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) Pathway and Its Implications for Costimulatory Blockade. *American Journal of Transplantation*, **2014**; 14:1985–1991.
39. **Li D, Gal I, Vermes C, Alegre M L .** Cutting Edge: Cbl-b: One of the Key Molecules Tuning CD28- and CTLA-4-Mediated T Cell Costimulation. *J Immunol*. **2004**; 1-6.
40. **Ville S, Poirier N, Bianco G, Vanhove B.** Co-stimulatory blockade of the CD28/CD80-86/CTLA-4 balance in transplantation: impact on memory T cells, *Front. Immunol*, **2015**; 411:1-11.
41. **Michelle A Linterman, Alice E Denton, Devina P Divekar, Ilona Zvetkova, Leanne Kane.** CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection, **2014**; 3:e03180.
42. **Scott M. Krummey, Tamara L. Floyd, Danya Liu, Maylene E.** Candida-Elicited Murine Th17 Cells Express High CTLA-4 Compared to Th1 Cells and Are Resistant to Costimulation Blockade. *J Immunol*, **2014**; 192(5): 2495–2504.
43. **Scott M. Krummey, Jennifer A. Cheeseman, Jason A. Conger, Peter S. Jang.** High CTLA-4 Expression on Th17 Cells Results in Increased Sensitivity to CTLA-4 Coinhibition and Resistance to Belatacept. *Am J Transplant*, **2014**; 14(3): 607–614.

44. **Li B, Guo L, Zhang Y, Xiao Y.** Molecular alterations in the TCR signaling pathway in patients with aplastic anemia. *Journal of Hematology & Oncology*, **2016**, 9:32.
45. **Swahn J, Capaso M, Lanvotti M, Marrone A, Haupt R, Baugalupo A, Pongiglione C, Boschetto L, Longoni L, Pillon M, Pstonio A, D Michele P, Iori AP, Calvillo M, Locascalli A, Menna G, Riccardo R, Rawungli V, Dufour C and Iobson A.** The polymorphisms- 318 > T in the promote and 49A > G in exon I of CTLA4 and the risk of aplastic anemia in a Caucasion population Bone marrow Transplantation, **2005**; 582-592.
46. **Michelle A Linterman, Alice E Denton, Devina P Divekar<sup>1</sup>, Ilona Zvetkova, Leanne Kane, Cristina Ferreira, Marc Veldhoen, Simon Clare, Gordon Dougan, Marion Espéli, KLaffertenneth GC Smith.** CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection, **2014**; 3:e03180. DOI: 10.7554/eLife.03180.
47. **Lafferty KJ, Cunningham AJ.** A new analysis of allogeneic interactions. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, **1975**; S3:27-42. DOI: 10.1038/icb.2013.77.
48. **Diehn M, Alizadeh A A, Rondo O J, Lin CL, Stankunas K, Botstein D, Crabtree G R, Brown P O.** Genomic expression programs and the integration og the CD28 costimulation signal in the T cell activation. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, **2002**; 99:11796-11801. DOI:101073/pros.092284399.
49. **Jago C B, Yates J, Camara N O S, Lechler R I, Lombardi G.** Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clinical and Experimental Immunology*, **136**; 463-471.

50. **Bachmann M F, Köhler G, Ecabert B, Mak T W, Kopf M.** Cutting Edge: Lymphoproliferative Disease in the Absence of CTLA-4 Is Not T Cell Autonomous. *The Journal of Immunology*, **1999**; 163:1128-1131.
51. **Read S, Malmström V, Powrie F.** Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Regulatory Cells that Control Intestinal Inflammation. *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press, Volume 192, Number 2, July 17, **2000**; 295–302.
52. **Valk E, Leung R, Kang H, Kaneko K, Rudd C E, Schneider H.** T Cell Receptor-Interacting Molecule Acts as a Chaperone to Modulate Surface Expression of the CTLA-4 Coreceptor. *Immunity* 25, **2006**; 807–821. DOI 10.1016/j.immuni.2006.08.024.

## ÖZGEÇMİŞ

10.03.1990 tarihinde Adana'da doğdu. İlk ve orta Öğrenimini Ramazanoğlu İlköğretim Okulunda, Lise öğrenimini Emine Nabi Menemencioğlu Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesinde tamamladı. 2013 yılında Lisans eğitimini Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. Eylül 2010 ile Şubat 2011 arasında University of Naples Federico II (Napoli-İtalya) Biyoloji bölümünde eğitim gördü. 2015 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı. Evli ve iyi derecede İngilizce bilmektedir.

