

1884

T. C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HEMATOLOJİ - İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

HAFİF VE AĞIR GİDİŞLİ SICKLE-CELL ANEMİLİ HASTALARDA
İMMÜN FONKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI

MASTER TEZİ

Salih ÇETİNER
BİYOLOG

ADANA — 1987

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa No.

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
ARAÇ GEREÇ YÖNTEM.....	33
BULGULAR.....	43
TARTIŞMA.....	52
ÖZET.....	58
KAYNAKLAR.....	60

G İ R İ Ő

Hemoglobinin β zincirindeki bir nokta mutasyonu sonucu (Adenin'in Timin'e değişmesi ile) oluşan orak-hücre anemisi belli bir coğrafik alana dağılmıştır ve özellikle bazı populasyonlarda yaygın olarak bulunur. Bu hastalığın homozigot(HbSS) olduğu halde klinik ve hematolojik bulgular bakımından bazı kişilerde farklı seyreden Őekilleri vardır. Bu nedenle artık sickle-cell aneminin "Hafif" ve "Ağır" olmak üzere iki varyasyonu olduğu kabul edilmektedir.

Hafif gidişli olanlarda; klinik ve hematolojik bulguların daha hafif oluşuna ek olarak enfeksiyonlara karşı da daha dirençli oldukları gözlenmiştir(5,6,21,23,25).

Ağır gidişliler ise; klinik ve hematolojik bulgular daha ağırdır ve bu kişilerde enfeksiyonlara duyarlılık artmıştır.

Orak hücre anemili hastaların enfeksiyonlara duyarlılıklarının ise immün fonksiyon bozukluklarına bağlı olduğu ileri sürülmektedir.Örneğin bu hastalarda opsonin bozukluğu olduğu ileri sürülmüştür(9,10,14).Ancak bu çalışmalar ağır seyirli homozigot orak hücre anemili hastalarda yapılmıştır ve hafif seyirli hastalardaki immün fonksuyonların durumu bilinmemektedir.

Bu çalışmadaki amacımız, bu iki farklı şeklin immunolojik fonksiyonlarını normalerle karşılaştırmak ve aralarında anlamlı bir farkın olup olmadığını göstermektedir.



GENEL BİLGİLER

Sickle-Cell anemi: Hemoglobin β zincirindeki glutamik asidin valin ile yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkan hereditör bir hemoglobin hastalığıdır. Farklı yapıdaki bu hemoglobin düşük oksijen ve pH'da eritrositlerin oraklaşmasına ve bunun sonucu olarakta hemolizine yol açar. Hemolizin neden olduğu kansızlık ve oraklaşan hücrenin küçük damarlarda oluşturduğu mikrotrombuslar hastalığın klinik ve laboratuvar bulgularının ortaya çıkmasına neden olur.

Hastalık heterozigot ve homozigot olmasına bağlı olarak klinik ve laboratuvar bulguları yönünden önemli farklar gösterir(2,13,25).

Heterozigot olanlar hem normal A hemde normal S hemoglobini taşırlar(% 35 oranında S hemoglobini). Eritrositlerindeki hbs fizyolojik koşullarda oraklaşmaya izin vermiyecek ölçüde azdır ve bunun oluşabilmesi için önce bu hücrelerin oldukça ciddi bir anoksiye maruz kalmaları gerekmektedir. Bu durumda ancak şu 3 koşulda gerçekteşebilir;

- 1- Yüksek irtifada basınçsız uçaklarda uçmak
- 2- Ara sıra rastlanan şiddetli pnömoni
- 3- Anestezi sırasında istenmeden anoksi oluştuğu durumlarda.

Bu hastalar genellikle taşıyıcıdırlar ve fenotipik olarak çok önemli bir bozuklukları yoktur.

Homozigot olanlar ise, hem genotipik hemde fenotipik olarak hastalık bulgularını gösterirler. Bu şahıslarda anemi ile birlikte hastalığın klinik, hematolojik ve patolojik belirtileri görülür. Homozigot sickle-cell aneminin klinik şiddeti sadece hastadan hastaya değil dünyanın bir bölgesinden diğerine de farklılık gösterir. Batı Hint adalarında sickle-cell hastalığı olan bir kadının (istisnalar hariç) bu hastalığı çocuklarına geçirmesi nerede ise bir kuraldır. Yani kadınlar erişkin yaşa kadar gelebilir ve doğum yapabilirler. Buna karşın Orta Afrika'da son zamanlara kadar sickle-cell anemili bir çocuğun birkaç yıldan fazla yaşayabilmesi çok nadirdi. Afrika'da yapılan toplum taramaları, yetişkinler arasında yapıldığı için başlangıçta sickle-cell anemiye hiç rastlanmamıştı. Daha sonra Kongo'da bu tip anemisi olan hastalar çok genç yaşta öldükleri için yapılan taramalara dahil olmadıkları anlaşılmıştır (2, 3, 13, 25).

Bu gözlemlere dayanarak bazı araştırmacılar sickle-cell hastalığının birden fazla varyasyonu olduğunu savunmaktadır (5, 6, 22). İlişkili (Linked) veya ilişkisiz (unlinked) genlerin bulunuşu ile açıklanmaya çalışılan bu farklılık başlıca "ağır" ve "hafif" seyirli sickle-cell hastalığı olarak ortaya çıkmaktadır.

Weatheral DJ. ve arkadaşları, 1972 yılında homozigot orak hücre anemisi olan Suudi Arabistan'lı 18 kişide yaptıkları çalışmada bu hastaların klasik orak hücre anemisi durumunda görülen komplikasyonların çok azını gösterdiklerini ve hafif

bir iskelet kası ağrısı dışında hiç bir şikayetleri olmadığını bildirmişlerdir ve hastalığın bu kişilerde hafif bir şekilde seyrettiğini ve bunun bu şahıslarda yüksek miktarda üretilen fetal hemoglobine bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir(34).

Yine 1973 yılında Armond ve arkadaşları bir çalışmada Homozigot orak hücre anemisi olan bir grup Eti Türkünü Afrika'daki tipik orak hücre anemisinin şiddetli şeklini gösteren hastalarla karşılaştırmışlardır. Eti Türklerindeki aneminin derecesinin genellikle ılımlı olduğunu, abdominal ağrı nöbetlerinin sık olmadığını ve bireylerin çoğunda fetal hemoglobin seviyesinin % 20 nin üzerinde olduğunu ve bunlarda hastalığın daha hafif bir şekilde seyrettiğini rapor etmişler. Daha sonra benzer raporlar Kuveyt ve Suudi Arabistan-da bildirilmiştir.

Hafif seyirli sickle-cell hastalığı durumunda; Hastalar homozigot oldukları halde orta derecede anemileri ve buna uygun hemoglobin ve hematokrit değerlerini gösterirler. Hastaların fetal hemoglobinleri genellikle ve değişik derecelerde yüksektir. Klinik olarak hastalık nisbeten daha hafif gidişlidir(5,22,23). HbF, HbS'nin polimerizasyonunu inhibe ettiği için F'den zengin hücrelerde oraklaşma olmaz. F'den fakir hücrelerde ise irreversibl oraklaşma olur. Bu rigid hücreler dolaşımdan toplanır ve yok edilirler.

Ağır seyirli sickle-cell hastalığında ise; Hastaların fetal hemoglobinleri genellikle düşük, beyaz hücre ve trombositleri artmış, hafif varianta göre hemoliz şiddeti ve buna

bağlı olarak hematopoetik aktivitelir yüksektir. Klinik olarak sickle-cell hastalığının klasik belirtilerini gösterirler(3,13,22,23,25,26).

Orak hücre anemili hastaların hematolojik bulguları: Hemoglobin miktarı çeşitli derecelerde genellikle ağır anemi olduğunu gösterir(5-9 gr/100 ml.dir).

Periferik kan yaymalarında parsiyel olarak oraklaşmış hücreler muz veya uzay gemilerine benzer bir görünümde dirler.Bazen target hücreleri de görülür. Hastalar oraklaşma krizine girmedikleri sürece in-vitro ortamda elde edilen hücre preparasyonlarında olduğu kadar tam bir oraklaşma göstermezler. Penjenli kanda genellikle çekirdekli eritrositler mevcuttur. Komplike olmayan bir orak hücre taşıyıcısının kan yayması ise genellikle normal veya normale yakındır. Lökosit sayımı oldukça yüksek olabilir(Bk= 30.000) Trombositler normal sayıdadırlar. Dr.Mac Gibbon orak hücre anemili hastaların takibinde, kriz sırasında trombosit sayısının genellikle geçici olarak düştüğü, iyileşme döneminde de her zamanki seviyesinin üzerine çıktığını göstermiştir(13,25).

Hemolitik süreçle beraber indirekt bilirubin düzeyi artar. İdrarda ürobilinojen artmıştır.

Orak hücre anemili hastaların elektroforezinde; hemoglobinin büyük bir kısmı HbS tipindedir(25).

Sickle-cell anemi kronik hemolitik bir anemidir. Diğer anemilerde olduğu gibi hastalığın gidiş süresince aplastik krizler olabilir. Bu durumda kemik iliği tükenmiş, kan yapımı durmuş, retikülositler periferik kanda kaybolmuşlardır. Nedeni sıklıkla tesadüfi bir enfeksiyondur(Özellikle de virüs enfeksiyonları). Bu enfeksiyon aynı anda orak hücre

anemili bir ailenin birden fazla ferdini etkileyebilir(25). Ayrıca enfeksiyon esnasında soğuk aglutininlerin ortaya çıkışı eritrosit stazını artırarak enfarktik elementin artmasına ve dolayısıyla klinik durumun dahada kötüleşmesine neden olur.

Önceleri, sarılık ve artan retikülosit sayısının eşlik ettiği akut hemolitik atakların orak-hücre anemisinin yaygın ve tehlikeli bir özelliği olduğu sanılırdı. Oysa günümüzde kemik iliği yetmezliğinin daha ciddi bir komplikasyon olduğu anlaşılmıştır(13,25).

Eritrosit yaşam süresinin bu kişilerde kısa olması (yaklaşık 17 gün) nedeniyle eritropoezisteki kısa bir duraklama bile hemoglobinin konsantrasyonunda hızlı bir düşüşe neden olur ve kişi bir kaç gün içinde kansız kalabilir.

Orak hücre anemili hastalarda yukarıda kısaca açıklanan klinik ve hematolojik bozukluklara ek olarak enfeksiyona eğilimin artmış olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak immün fonksiyonlarda önemli bozukluk olduğu düşünülmüş ve gerçekten aşağıda özetlenen bozuklukların varlığı saptanmıştır.

- Winkestein JA ve arkadaşları, homozigot sickle-cell hastalığı olanlarda otosplenektomiye bağlı olarak opsonizasyon bozukluğu olduğunu ileri sürmüşler ve bu konuda sickle-cell anemili çocuklarda pnömokoklara karşı opsonin yetersizliği olduğu saptanmıştır(35). Normalde serumda bulunan ve pnömokok fagositozunu sağlayan bir faktörün bu hastalarda olmadığı veya serumda bunun fonksiyonunu inhibe eden bir başka maddenin olabileceği ileri sürülmektedir.

Ayrıca otosplenektomiye bağlı Tuftsin eksikliği olduğuda bildirilmiştir(Tuftsin-lökosit fagositozunu kolaylaştıran ve dalak yardımıyla ortaya çıkan bir faktördür)

Briyas.G.(1983); Orak hücre anemi(AS ve SS lerin normal kontrollerle kıyaslanmasıyla) ve β talassemisi olan hastalarda RES'in temizleme yeteneğinin bozulduğunu gözlemiş ve bunun kronik doku iskemisi, kronik hemoliz, karaciğerdeki Kupffer hücrelerinin yetersizliği, fonksiyonel hiposplenizm gibi bozukluklara bağlı olabileceğini ileri sürmüştür.

Ades ve arkadaşları, IgG ye karşı Fc reseptörlerini taşıyan T hücreleri(Tg)nin bu hastalarda % 50 azaldığını, supressör-T-hücresi yüzdesinin ise arttığını gözlemişlerdir. Yine aynı araştırmacı grubu hastaların total T.hücre sayısında azalma olduğunu göstermişlerdir. IgM'e karşı Fc reseptörü taşıyan T.hücreleri(Tm) (helper T-hücresi) oranını kontrollerle aynı düzeyde bulmuşlardır. B-hücresinde ise sayıca herhangi bir anormallik saptanamamıştır(1).

Hernandez ve arkadaşları(1980); orak-hücre anemisi olan hastalarda enfeksiyona eğilimin arttığını gözlemişlerdir ve bu hastalarda fitohemoglutinin(pH) uyarısına karşı lenfosit transformasyonunun azaldığını, deri anerjisinin sık görüldüğünü bildirmişlerdir. Hastalarda T-rozet yüzdesinde ve lenfosit sayısında herhangi bir değişiklik gözliyenememişlerdir. Böylece bu hastalarda T- lenfosit yüzdesinin değişmediğini, yalnızca fonksiyonlarında değişikliğin olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yine aynı araştırmacı grubu çocuk hastalarının serum Immünglobulin'lerinde önemli bir anormallik

gözleyememişler. Ancak sickle-cell anemili erişkinlerde IgA'nın arttığını bildirmişlerdir(20).

Kılınç ve arkadaşları(1986) orak hücre anemisinin siklik klinik belirtileri ve seyrek enfeksiyonla karakterize hafif gidişli formunu gösteren 16 olguda ve yine hastalığın sık krizler ve enfeksiyonlarla karakterize ve kan transfüzyonunu gerektiren şiddetli gidişli formunu gösteren 16 olguda ve kontrol grubu olarakta aynı yaş grubunda olan 16 sağlıklı çocukta serum Ig düzeylerini ve kompleman C₃ düzeylerini radial immüno diffüzyon yöntemiyle ölçmüşlerdir.

Serum IgG ve IgA düzeyleri açısından her iki hastalık grubu arasında fark istatistiksel yönden önemsizken kontrol grubuna göre her iki grup IgG ve IgA düzeylerini istatistiksel yönden çok önemli derecede yüksek bulmuşlardır($p < 0.001$).

Yine aynı araştırmacı grubu serum IgM yönünden hafif ve şiddetli gruplar arasındaki farkı çok az önemli bulmalarına rağmen her iki grubun ortalamaları ile kontrol grubu ortalaması arasında çok önemli fark olduğunu($p < 0.001$) ve hastalarda IgM düzeyinin düşük olduğunu göstermişlerdir.

Yukarıdaki araştırmaların çoğu genel olarak homozigot sickle-cell anemili hastalarda yapılmıştır. Literatürde sickle-cell variantlarının karşılaştırılması şeklindeki çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Çalışma kapsamımız içerisinde yer alan kemotaksisin bu hastalarda çalışıldığına dair herhangi kaynağa rastlamadık. Ancak enfeksiyona eğilimde koruyucu hücrelerin(fago-sitik ve sitotoksik hücrelerin) enfeksiyonun meydana geldiği

bölgeye doğru hareket hızlarının önemli olduğu ve bu hücrelerin inoküle edilen bakterinin bulunduğu bölgeye 2-4 saat geç gelmeleri halinde enfeksiyon riskinin 100.000 kez artacağı (Milles'in çalışmaları) gösterilmiştir (37). Yine enfeksiyonlara eğilim ile kemotaksis arasındaki ilişkileri gösteren birçok araştırma mevcuttur.

Bağışık Yanıtın Oluşması:

Bir antijen vücuda girdiğinde ona karşı ya humoral antikorlar oluşturulur. Yada özel duyarlı T.hücreleri veya bellek hücreler oluşturularak cevap verilir. Önce makrofajlar tarafından tutulan ve antijenik özelliği yükseltelen antijen artık bağışık yanıt için hazırdır. Makrofajdan antijenik uyarımı olan T-helper(T_H) hücreleri olumlu yönde B hücrelerini uyararak antikor yapan plazma hücrelerinin farklılaşmasına yol açar. Plazma hücrelerinde antikor oluşması ile humoral (sıvısal) bağışık yanıt oluşur.

Benzer şekilde antijenler makrofajlarında katkısı ile T.hücrelerini etkileyerek hücre sel bağışıklığın aktif hücresi olan sitotoksik-T hücresi farklılaşmasına yol açar. Bu farklılaşma sonrasında hedef hücreyi öldüren veya hücreye zarar veren öldürücü(killer) T-lenfositleri yada sitotoksik (Cytotoxic) Tcy-lenfositleri oluşmaktadır.

Bir antijene karşı hücre sel bağışık yanıtın olduğu in-vivo olarak deri testleri ile araştırılır. Deride yapılan geç tip aşırı duyarlılık testi hücre sel bağışıklığın belirtisidir. Humoral bağışık yanıt ise, in-vitro olarak antijen+ antikor birleşmesiyle ortaya konulabilir.

Hücresel bağışık yanıt bir çok enfeksiyon hastalıklarında oluşmaktadır. Genellikle hücre içi enfeksiyonu oluşturan bakteri enfeksiyonlarında (örneğin; Tüberküloz, Brusella, Listeria, v.b.) ve virüs enfeksiyonlarının tümü hücre içi enfeksiyonu olduğundan genelde hücresel bağışık yanıt oluşmaktadır. Bunun yanısıra, mantar, protozoa ve helmint enfeksiyonlarında da hücresel bağışık yanıtta oluşmaktadır.

İmmün sistemin düzenlenmesinde yardımcı T (T_H) hücreleri ve supressör- T hücreleri (T_S) fonksiyon görürler. Bu hücreler hücresel ve humoral immünitede çeşitli durumlarda farklı etkide bulunarak immüno regülâtör sistemi oluştururlar.

Özetle açıklamaya çalıştığımız immün yanıt mekanizmasındaki işlergelerin herhangi birindeki bozulma enfeksiyonlara ve diğer yabancı maddelere verilecek yanıtında bozulmasına neden olur ve sonuçta enfeksiyonlara eğilim artar.

Özetle organizmanın enfeksiyonlardan korunması immün sistem aracılığıyla sağlanmaktadır. Vücuda giren zararlı etkenin immün cevapla yok edilmesi genel olarak dört evreye ayrılır:

- 1 - Antijenin tanınması (hücresel ve humoral)
- 2 - Tanınan bu antijene karşı etkin molekülün sentezi veya aktive edilmesi (lenfokinler, antikorlar, kompleman sistemi v.s.).
- 3 - Fagositik ve sitotoksik hücrelerin antijenin bulunduğu bölgeye toplanmaları
- 4 - Antijenin aktif moleküllerin yardımı ile sito-

toksik etki veya fagositoz sonucu yok edilmesi.

Antijenin tanınmasına kadar geçen süre içerisinde veya antijen tanındıktan sonra enfeksiyonun ^{kontrol altına} alınmasındaki en etkin görevi fagositik hücreler üstlenmektedir. Bu nedenle fagositik veya sitotoksik hücrelerin enfeksiyonun meydana geldiği bölgeye doğru hareket etmesi gerekir. Bu olay genel anlamıyla KEMOTAKSIS olarak bilinmektedir. Bu hareket yani enfeksiyonun meydana geldiği bölgeye doğru fagositik ve sitotoksik hücrelerin hareket hızı enfeksiyonun sınırlandırılması veya kontrol altına alınması yönünden oldukça büyük önem taşır. Milles'in yaptığı deneysel çalışmalar nötrofillerin inoküle edilen bakterilerin bulunduğu bölgeye 2-4 saatlik kısa bir süre geç gelmeleri halinde enfeksiyon riskinin 100.000 kez arttığını göstermiştir(37).

Azalmış kemotaksis cevapla enfeksiyonlara eğilim arasındaki ilişkiler çeşitli klinik gözlemlerde desteklenmiştir. Yani normal bir iltihabi cevabın gelişmesi veya non-spesifik immünitinin etkin olabilmesi için kemotaksisin normal olması gerekmektedir(7,31,37). Nötrofil ve monosit kemotaksisin in-vitro olarak incelenmesine olanak veren yeni yöntemlerin son yıllarda yaygın olarak kullanılması sonucu normal ve anormal kemotaksis hakkında bilgilerimizde önemli derecede artmıştır. Kemotaksis bozukluğu durumunun son yıllarda C vitamini, Levamisole, simetidine ve lityum karbonat gibi ilaçlarla tedavi etme imkanlarının olduğunu gösterilmesi kemotaksis defektlerinin tanınmasındaki önemini artırmıştır (37).

FAGOSİTER SİSTEM:

Mechnikoff 1960 yıllarında yaptığı deneysel araştırmalarda fagositik sistemin enfeksiyonlara karşı direncteki rolünü incelemiş ve bu sistemi 5 evrede özetlemiştir. Bu evrelerin herhangi birinde meydana gelebilecek bozukluk sonuçta enfeksiyonlara direncin azalması şeklinde kendini gösterir(18,37). Bu evreler şunlardır:

1 - Yeterli sayıda fagositik hücrenin kemik iliğinde yapımı.

2 - Bu hücrelerin dolaşıma normal sayıda geçmeleri

3 - Dolaşımdaki fagositlerin damar duvarına yapışmaları ve damar dışında dokulara doğru hareketi.

4 - Fagositik hücre ile mikroorganizma arasında temasın sağlanması

5 - Fagositoz ve öldürme

Günümüzde kemotaksis, fagositozu izleyen morfolojik metabolik olayla ve bakterinin öldürülmesini sağlayan mekanizmalar hakkında oldukça daha fazla bilgi sahibimiz olmamıza rağmen, temelde bu araştırmacının görüşlerinde önemli bir değişiklik olmamıştır.

KEMOTAKSİS

Kemotaksis; yukarıda açıklandığı gibi fagositik sistemin üçüncü evresini oluşturmaktadır. Hücrenin kemotaktik faktöre doğru artmış hareketidir. Bu hareket o faktörün farklı yoğunluklarının algılanması ve yoğunluğun en yüksek olduğu bölgeye yöneliktir. Hareket kemotaktik faktörün en yoğun olduğu bölgede sona ermektedir.

Bu konuda çok sık kullanılan terimlerin anlamları aşağıda verilmiştir:

Random migrasyon: Hücrenin hiç bir uyarının etkisi altında kalmaksızın spontan hareketidir.

Kemokinesis: Uyarıcı faktörün etkisi ile hareketinin artmasıdır. Bu artış o faktöre yönelik değildir. En yüksek düzeye o faktörün en yoğun olduğu bölgede ulaşmaktadır.

Kemotaksis ve kemokinesis arasında şu farklar vardır:

Kemotaksis olayındaki amaç hücrelerin belirli bir bölgede toplanmasıdır.

Kemokinesis'te ise; hareket arttığı için hücre uyarıcı faktörün en yüksek olduğu bölgeye hızla gelmekte ve oradan hızla ulaşmaktadır. Bu ise kemotaksisin amacına ters düşer.

Kemotaksisin değerlendirilmesinde güvenilir bir in-vivo yöntemi henüz bulunamamıştır. Genellikle bu amaçla Rubeck'in tanımladığı deri pencere(skin window) testi ve bunun modifikasyonları kullanılmaktadır(37). Test sırasında lamelle yapışan hücrelerin hangi kemotaktik faktörün etkisi ile geldiği ve olayın mekanizması bilinmediğinden, ayrıca sonuçlar hastanın beyaz küre sayısına bağlı olarak önemli derecede değiştiğinden genellikle güvenilir olarak kabul edilmemektedir. Normal ve anormal kemotaksis hakkındaki bilgilerimiz ise genellikle in-vitro çalışmalar sonucu elde edilmiştir.

In-vivo kemotaksiste iki önemli evre tanımlanabilir:

1. Fagositik hücrenin kemotaktik faktörün etkisi ile kapiler endotele yapışması

2. Hücrenin dolaşımı terk ederek enfeksiyon bölgesine doğru hareketi.

Kemotaksisin başlaması ve sürmesindeki en önemli etken kemotaktik faktörlerdir. Bu faktörler vücuda giren yabancı maddelerin ve mikroorganizmaların fagositler tarafından yok edilmesinde görev alan makrofaj ve polimorfonükleer lökositleri uyarırlar. Hücrenin maddeye yönelik hareketi maddenin yoğunluk gradientine bağlı olarak artar(7,32,33).

Lökositler; yabancı organizmalardan, doku harabiyeti sonucu ortaya çıkan ürünlerden veya immünolojik reaksiyonlardan etkilenirler. Örneğin; antijen ve antikor bileşmesi ile C_3 kemotaktik parçalanma ürünleri ortaya çıkar. Lökositlerde bundan etkilenerek olay yerine doğru hareket ederler. Ayrıca mitojen veya antijen T veya B lenfositlerini aktive ederek kemotaktik etki yapabilen lenfokinleri ortaya çıkarırlar (4,18,33).Bu lenfosit kökenli kemotaktik faktörler(lenfokinler) diğer lökositleride etkilerler.

Lenfosit kökenli kemotaktik faktörlerin 1969 yılında Word ve arkadaşları tarafından tarif edilen migrasyon inhibisyon faktörü(MIF) ile aynı şey olduğu düşünülmektedir.

KEMOTAKTİK FAKTÖRLERİN SINIFLANDIRILMASI:

Kemotaktik faktörler iki büyük gruba ayrılarak incelenebilir.

1. Kendisi doğrudan hücreyi etkileyerek kemotaktik etki gösterenler.

2. Kendisi kemotaktik olmayıp serum veya plazma ile karşılaştıktan sonra genellikle kompleman sistemini aktive ederek kemotaktik faktörlerin ortaya çıkmasına neden olanlar.

1. Doğrudan kemotaktik etki gösterenler:

A- Endojen kemotaktik faktörler

- a) Kompleman aktivasyonu sonucu ortaya çıkar ara ürünler(C_3b , C_5a , C_5 , C_7).
- b) Bazı lipid molekülleri
- c) Aktive nötrofillerden açığa çıkan kemotaktik faktörler.
- d) Lenfositlerden salınan kemotaktik faktörler (Lenfokinler).
- e) Hücre harabiyeti ürünleri, denatüre, aggregate veya parçalanmış proteinler.

B- Eksojen Kemotaktik Faktörler:

- a) Bakteriyel kemotaktik faktörler(E.Coli, Stafilokok, streptokok v.b.).
- b) Kazein, formyl-methion peptitler.

2. Kemotaktik faktörler oluşmasına yol açanlar:

A- Endojenler

- a) Hageman faktörü, prekallikrein
- b) Tripsin
- c) Plasmin
- d) Doku proteazları
- e) Fagositoz sırasında nötrofillerden salınan proteazlar
- f) Antijen-antikor kompleksi
- g) Aggregate immünoglobulinler

h) Endotoksik lipopolisakkaridler

B- Eksogen:

a) Zimozan

b) Nişasta, glikozlu agar

c) Kobra venom faktör

d) Bakteriel faktörler.

Kemotaksisin azlığı gibi kontrolsuz aktivasyonda hastalıklara neden olur(Gut hastalığı, bazı artritler, pyoderma, gangrenozum vakalarında olduğu gibi). Bu nedenle kemotaksis olayı sürekli olarak inhibitör aktivatörler tarafından dengede tutulur. Bu dengenin bozulması(kemotaksisi artırma veya azaltma yönünden) durumunda kemotaksis hastalıkları oluşmaktadır(17, 31, 32).

İki tip kemotaksis inhibitörü tanımlanmıştır:

1- Hücreye yönelik kemotaksis inhibitörü

2- Kemotaktik faktör inhibitörü

1- Hücreye yönelik kemotaksis inhibitörü: Normalde serumda düşük düzeyde bir kemotaksis inhibitörü birde bunun antagonisti tanımlanmıştır(37). Hücreye yönelik kemotaksis inhibitörünün fazlalığına dayanan kemotaksis defekti olan vakalar yayınlanmıştır. Bazı tümörler ve IgA myeloması olan vakalarda bu inhibitörün varlığı saptanmıştır(37).

2- Kemotaktik faktör inhibitörü: Kanda düşük düzeyde böyle bir inhibitör bulunmakta ve kemotaktik faktörü enzimatik yolla parçalıyarak aktive etmektedir. Hodgkin hastalığı, sarkoidoz, alkolik siroz ve lepramatöz leprada kemotaktik faktör inhibitörünün yüksek düzeyde bulunmasına bağlı

kemotaksis defektine rastlanmıştır(37).

Buraya kadar anlatılanlar kemotaksisin humoral komponentini oluşturmakta ve kemotaksisin bir dengede tutulduğunu göstermektedir. Birde kemotaksisin hücrel mekanizması vardır. Ancak bu konudaki bilgiler oldukça eksiktir.

Kemotaksisin hücrel mekanizması 3 evrede oluşmaktadır.

1- Hücrenin kemotaktik faktör ve gradiyentini (yoğunluk farkını) algılaması

2- Bu uyarıyı algılayan hücrenin yön tayını

3- Hücre hareketini sağlayan kontraktıl (kasılabilir) mekanizmanın aktivasyonu

Fagositik hücrenin kemotaktik faktör yoğunluğu farkını nasıl algıladığına bu günkü bilgilerimizle cevap vermek mümkün değildir. Ancak değişik kemotaktik maddelerle yapılan in-vitro çalışmalarda; örneğin nötrofil ve monosit yüzeyinde N-formül peptidlere özgül reseptörlerin varlığı gösterilmiştir (18,36). Benzer şekilde C5a ve lenfositlerden salınan kemotaktik faktör gradientleri ile nötrofillerin (in-vitro) kendi boyutları içinde kemotaktik faktör yoğunluğunu yönünü tayin edebileceği sonucuna varılmıştır.

-Kemotaktik faktörün hücre membran reseptörlerine bağlanmasını izleyen olaylar şu şekilde özetlenebilir:

1. Muhtemelen Ca^{++} ve Na^+ un hücre icine alınmasına bağlı hızlı fakat kısa süren bir depolarizasyon ve daha sonra K^+ a geçirgenliğin artmasına bağlı hiperpolarizasyon.

2. Siklik-guanosin monofosfat(cGMP) düzeyinde yükselme.

3. Lizozomal enzim salınması

4. Glikolizis ve heksoz-monofosfat şantı aktivitesinin artması

5. Hücrenin oriyantasyonu(yani hücrenin yönünü tayin etmek için yaptığı değişiklikler)

6. Kontraktil proteinlerin aktivasyonu

Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda bu esnada hücrenin iç yapısında da bazı değişikliklerin meydana geldiği gözlenmiştir. Hücre nükleusunun kemotaktik gradien-tin aksi yönüne hücre ucuna çekildiği görülmekte ve sentriol ve radial mikrotübül demetleri yer almaktadır(37). Mikrotübüllerin hücrenin yönünü tayin etmesinde önemli rol oynadığı sanılmaktadır. Çünkü mikrotübüllerin düzenini bozan kolşisin ile yapılan çalışmalarda hücrenin yön bulma yeteneğinin bozulduğu gözlenmiştir(37).

Hücre hareket mekanizması hakkındaki bilgilerimiz çok yetersizdir. Bu konuda bilinenler aşağıdaki şekilde özetlenebilir

Hücrenin hareket etmesi için önce bir yüzeye yapışması gerekmektedir. Hücreler sürünmekte ancak yüzmemektedirler. Yapışma daha sonra yayılma(spreading) oluşmakta daha sonra yayılan hücre Pseudopod (yalancı ayak çıkarmakta ve kendisinde fusiform bir şekil almakta ve daha sonra polarize olmaktadır. Bunu izleyen hareket olayında en önemli rolü kontraktil proteinler oynamaktadır.

Bunlar arasında en önemlisi aktindir(Aktin nötrofil proteinlerinin % 10 unu oluşturur) ve aktini bağlayan proteinide içerdikleri gösterilmiştir .

Fagositik hücrenin hareketi iki şekilde açıklanmaktadır:

Bir hipoteze göre aktivatör proteinlerinin hareketli olduğu düşünülmekte, asıl hareketi sağlayanın aktin olduğu, aktin aktivasyonunun ise aktini bağlayan protein ve myosin tarafından sağlandığı kabul edilmektedir(37)

Hareket halindeki hücrenin gövdesi ve uzantılarındaki kimyasal analizlerde aktin molekülünün hem gövdede hemde uzantılarda eşit olduğu gözlenmiştir ki bu teoriyi desteklemektedir.

Diğer bir teoride aktivatör proteinlerin hareketli olmadığı, ancak kemotaktik faktörlerinin etkisi ile asimetric olarak aktive edildiği ve belirli bir yönde hareketin sağlandığı ileri sürülmektedir. Bu gün birinci hipotez daha fazla taraftar bulmaktadır.

Kemotaksis olayının humoral aktivatör ve inhibitörlerle düzenli bir şekilde kontrol edildiği bilinmektedir(31,37). Fagositik hücrelerin kendileride ya kemotaktik faktör salarak veya salgıladıkları enzimlerle kompleman sisteminin kemotaktik faktörlerinin(özellikle C5a'yı) oluşumunu sağlayarak kemotaktik faktörleri inaktive ederek kemotaksisin bir noktada durmasını sağlayabilmektedirler(17,33,37).

Böylece karşılıklı etkileşim sonucunda denge organizmanın lehine kurulmaktadır. Bu anlatılanlara dayanarak kemotak-

sis hastalıkları 3 büyük gruba ayrılabilir:

- 1- Hücresel nedenlere bağlı olanlar
- 2- İnhibitörlere bağlı olanlar.
- 3- Kemotaktik faktör eksikliğine bağlı olanlar.

Kemotaktik hastalıklarında klinik Bulgular:

Genellikle nötropenili hastalıklarda gözlenen semptom ve bulgulara benzemektedirler.

1- Sıkça tekrarlanan enfeksiyonlar. Bu enfeksiyonlar genellikle üst solunum yolu, orta kulak, akciğer, karaciğer ve böbreği tutmaktadır. Pyoderma, apse, adenit, otitis media, pnömoni en sık rastlanan hastalıklardandır. Sepsis, menenjit gibi sistemik bakteriyel enfeksiyonlara nadir rastlanmaktadır.

2- Kemotaksis yetersizliğinde enfeksiyonlar uzamakta ve antibiyotiklere cevap yetersiz olmaktadır.

3- En sık rastlanan mikroorganizma *Stafilococcus aureus* tur. Ancak gram negatif enterik bakteriler ve mantarlar da enfeksiyona neden olabilmektedir.

Kemotaksisin değerlendirilmesinde kullanılan Yöntemler:

1. Görsel Yöntemler: Hücrenin kemotaktik faktör varlığı nedeniyle hareketlerinin direkt olarak mikroskop altında incelenmesine dayanır. Tek tek hücrelerin davranışlarının izlenebilmesi yönünden büyük önem taşıyan bu yöntem belirli bir kemotaktik gradientin oluşturulması ve testin standardize edilmesi göçükleri nedeniyle yaygın klinik uygulamaya girememiştir.

2. Filtre Yöntemi: Boyden'in tanımlanmasından bu yana bir çok değişikliklerle yaygın olarak klinik uygulamaya girmiş bir yöntemdir. Test bir millipor filtre ile ayrılan iki bölümden oluşan Boyden kameralarında uygulanır. Filtre alt bölümüne konulan kemotaktik faktör belirli bir kemotaktik gradient oluşturmaktadır. Test filtrenin üst kısmındaki hücrelerin kemotaktik faktöre doğru filtre içinden aktif olarak hareketinin ölçülmesine dayanır. Bu yöntemde genellikle nötrofiller için 3 μ m, monositler için 5-8 μ m.lik porları olan ve 150 μ m derinliğindeki filtreler kullanılmaktadır. Bu yöntem özellikle maddelerin kemotaktik aktivitelerinin gösterilmesi açısından diğer yöntemlerden üstündür.

3. Agarozda Kemotaksis Yöntemi: Diğer yöntemlerden sonra tanımlanmasına rağmen klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Agarozda kemotaktik gradient oluşturup, fagositik hücrelerin bu gradienti algılayarak, kemotaktik faktöre doğru hareket etmesi ilkesine dayanır. Kemotaksis değerlendirilmesinde kullanılan her iki yöntemin bir biri ile ilişkisi henüz bilinmemektedir. Sonuçların değerlendirilmesinde araştırmacılar arasında fikir birliği yoktur. Örneğin filtre sisteminde yaygın olarak kullanılan iki değerlendirme yöntemi vardır.

a) Uzun bir inkübasyon süresi sonunda filtre boyunu katedip alt düzeye gelen hücrelerin sayımı

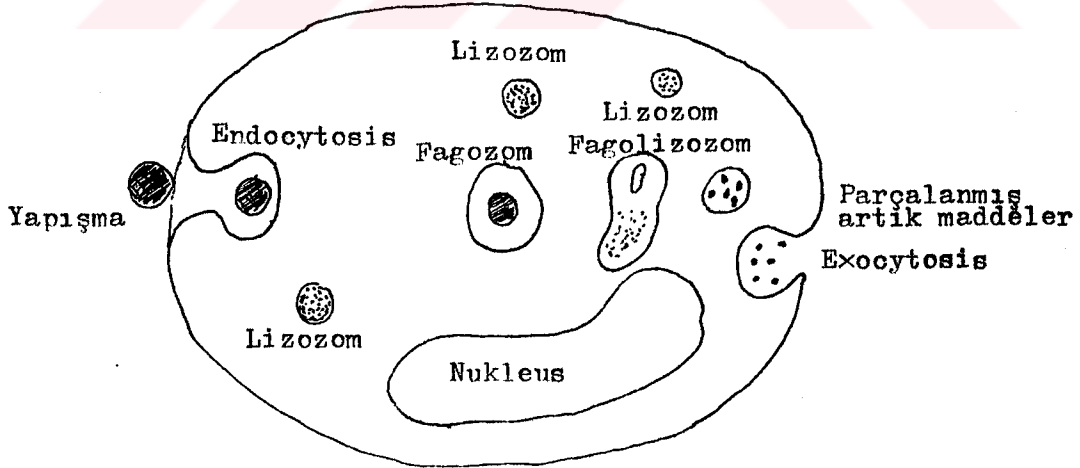
b) Kısa bir inkübasyon süresi sonunda filtre boynunu katedip alt düzeye gelen en uzun yolu kateden 1 veya 2 lider hücrenin aldıkları yolun ölçülmesi.

Agaroz yönteminde ise en sık kullanılan değerlendirme şekli;

- a) Filtre yönteminde olduğu gibi başlangıç noktasından belli bir uzaklığa gitmiş olan 1 veya 2 önder hücrenin kat ettikleri yolun ölçülmesi,
- b) Hareket eden tüm hücrelerin kapladığı alanın ölçülmesi,
- c) Hareket eden tüm hücrelerin sayısı,
- d) Başlangıç noktasından belirli uzaklıktaki bir düzlemdeki hücrelerin sayısı

FAGOSİTOZ

Fagositoz; endositoz ile bir maddenin hücre içine alınmasıdır. 1 milimikron'dan küçük maddelerin hücre içine alınmasına ise pinositoz denir.



Şekil 1: Fagositoz olayının evreleri.

Fagositozun ilk aşaması fagosite edilecek maddelerin fagositer hücre yüzey membranına yapışmasıdır. Bu yapışmanın

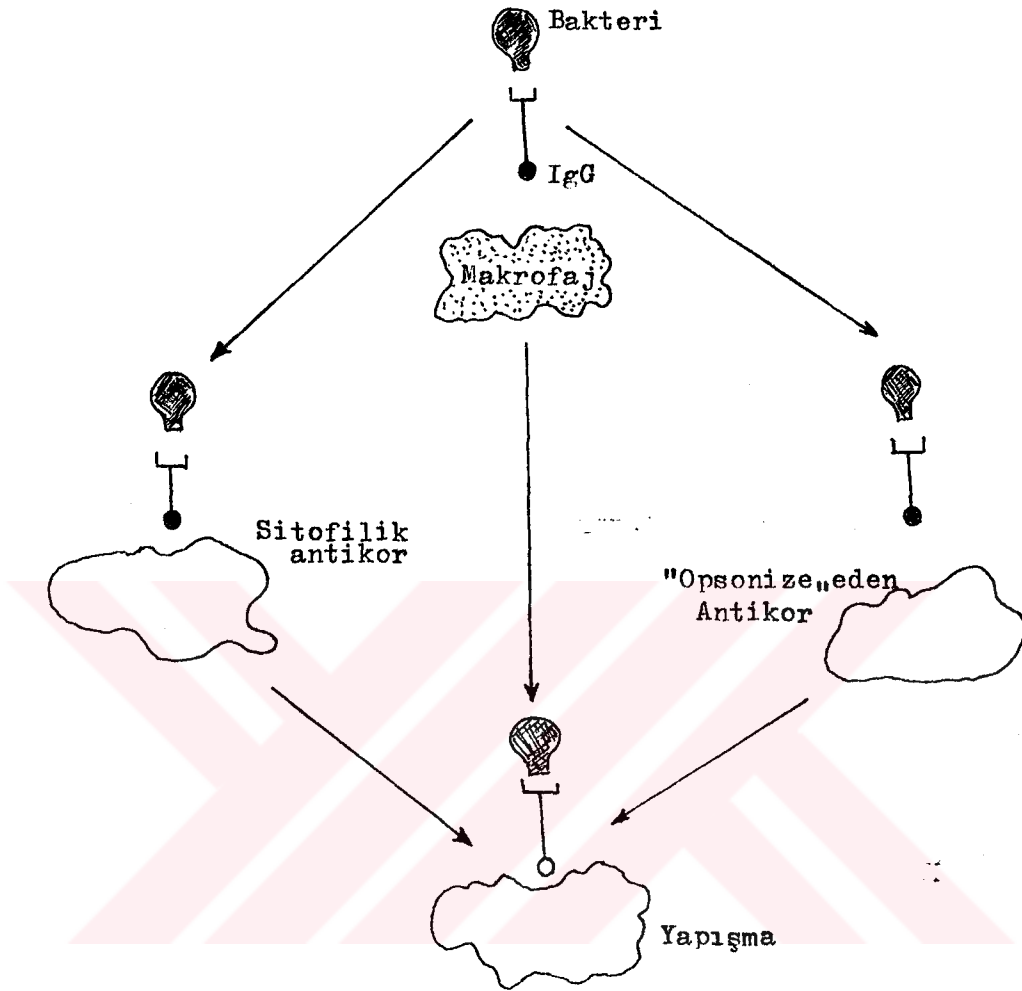
mekanizması kesin olarak bilinmiyor. Ancak zar yüzeyinin elektrik yükü veya hidrofobik özellikleri rol alabilir. Ortamdaki çift yüklü katyonlar ve ortamın osmolaritesi fagositozu etkiler(18).

OPSONİZASYON

Mikroorganizmaların "opsonin" dediğimiz özgül antikorlar ile kaplanması ve komplemanı aktive etmesi fagositozu arttırır. Bu olaya opsinazasyon denir. Opsonizasyonda en etkili immunglobulin IgG ve IgG₃ alt sınıflarıdır. Fab kısmı ile bakterilere bağlanan antikorların Fc parçaları komplemanı aktive eder ve fagositer hücre yüzeyindeki Fc reseptörlerine bağlanır.

Yutma: Opsonize olan bakterinin fagositer hücre yüzeyine bağlanması, yutma işlemi başlatır. Yutmayı aktive eden mekanizmanın ne olduğu henüz bilinmiyor. Ancak çift değerlikli katyonların bu olayda etkili olduğu ileri sürülmektedir(18). Hyalin ektoplazma yalancı ayaklar(pseudopod) yaparak parçacığı sarar ve fagositik vakoul oluşur. Yutma olayı enerji gerektiren aktif bir olaydır(Nötrofillerde glikoliz, makrofajlarda oksidatif fosforilizasyon artar).

Cytochalasin B hücre göçü kadar yutma olayını da önler. Colchisine ise mikrotübüller üzerinde etkilidir ve yutmayı önler. cAMP düzeyinin yutma içindeki rolü bilinmiyor. Glikoliz önleyicileri, ethanol, yüksek dozda hidrokortizon, sulfidril gruplarını bağlayan ilaçlar yutma işlevini bozarlar(18). Yutma sürecinde önemli bir miktarda hücre zarı hücre içine alınır. Pinositoziste bu invaginasyon olmaz.



Şekil 2: Bakterilerin opsonizasyona ve makrofajdaki sitofilik antikorların fagositozdaki rolleri.

İnvaginasyon safhasındaki fagositer hücre bir süre fagositoz yapmaz. Daha sonra yüzey zarda yeniden reseptör sentez ederek tekrar fagositozu başlatır. Yutma hızı nötrofillerde makrofajlardan daha fazladır. Yutma sırasında oluşan vakuole fagozom denir. Sitoplazmik granüller fagozomla birleşerek sitoplazmadan kaybolur. Bu olaya degranülasyon denir. Oluşan vakuole fagolizozom denir(18). Bu enzimler hücre içinden vakuole açıldığı gibi, hücre dışındada salınabilirler.

Bu hücre dışı enzimlerin saçılması ya hücrenin parçalanması veya fagolizozomdan sızma yolu ile olur. Degranülasyon olayında mikrotübül ve mikrofilamanların rolü olduğu sanılmaktadır.

Fagozom sonucu oluşan lizolesitinin'de lizozomların zarına etki ederek fagolizozom oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir(18). Fagositozda yutma döneminde hücrenin oksidatif enzim aktivitesi ve peroksid yapımında artar. H_2O_2 fagozom içinde yükselir. H_2O_2 sitoplazmaya lizozom zarı yoluyla geçebilir. Fagozomda H_2O_2 inaktive eden iki mekanizma vardır(18). 1.Katalaz, 2.Redükte glutation.

Fagosite olan mikroorganizmaların öldürülme ve sindirilme mekanizmaları nötrofil ve makrofejlarda farklıdır.

a) Nötrofillerin fagositik vakuollerinin asid pH'sı birçok bakteri için öldürücüdür. Laktik asit ve CO_2 nedeniyle oluşur. Ayrıca granüllerden vakuole fagositin, lökin, laktoferin, katyonik proteinler ve lizozim gibi antimikrobiale etki gösteren maddeler bogalır. Katyonik proteinlerin streptokok ve stafilokoklar üzerine etkileri vardır. Vakuolde H_2O_2 oluşumu da bakterisid etki gösterir. H_2O_2 halojen iyonların bulunduğu ortamda, myeloperoksidaz enzimi etkisini kuvvetlendirerek etki gösterir. H_2O_2 halojen iyonları ve myeloperoksidaz mekanizmanın etkili olduğu bazı klinik olgular ile gösterilmiştir. Bu hastaların nötrofillerinde H_2O_2 yapılamaz *Stafilokokus aureus*, gram negatif enterik bakterilerden çoğu ve *candida albicans* mikroorganizmaları fagosit olmalarına rağmen öldürülemezler (18). Bu hastaların nötrofillerinde

myeloperoksidaz'ın normal işlevini yapamadığı nitrobleutetrazolium(NBT) testi ile gösterilebilir. Normal nötrofiller fagositoz esnasında NBT maddesini redükte edip siyah-mavi renge dönüştürdüğü halde, myeloperoksidaz bozukluğu olan kronik granüloamatöz hastalıklı kişilerin nötrofilleri NBT maddesini redükte edemezler(4,17,18,33) ve nötrofiller rensiz olarak kalır. Myeloperoksidaz bozukluğu olanlarda infeksiyonlara eğilimin arttığı saptanmıştır. Ancak katalaz ve süperoksit dismutaz enzimi olan mikroorganizmler ile gelişen infeksiyonlar(Pnömokok ve H.influenzae gibi) normallerdeki gibi seyreder(18).

b) Makrofajlarda öldürme mekanizması biraz farklıdır. Asidite, lizozim ve H_2O_2 nötrofillerde olduğu gibi makrofajlarda da etkindir. Fakat bunlarda katyonik proteinler, laktoferrin ve fagositin yoktur (18). Myeloperoksidaz daha az ve hatta bazılarında(alveollar-makrofaj) yoktur. Bunun yanında alveolar makrofajlarda katalaz aktivitesi vardır. Katalaz asit pH'da H_2O_2 bulunduğu takdirde antimikrobik özellik kazanır. Uyarılmış makrofajların bakterisid özelliği, uyarılmamış makrofajlardan daha fazladır. Uyarılmış makrofajların H_2O_2 yapımı daha fazla ve diğer enzim aktiviteleri de artmıştır(18). Makrofajların aktive olmasında T hücrelerinin uyarılmasının yani hücre sel bağışık yanıtında etkisi vardır.

Nötrofiller akut infeksiyonlarda, makrofajlar kronik infeksiyonlarda daha etkindir. Oponin ve polimorfların özellikle etkin olduğu infeksiyonlar şunlardır: Pneumokok, menengokok, H.influenzae, gonokok, streptokok, pyogenes, Kl. pneumoniae, Ps.aeroginase, Y.pestis, B.antracis enfeksiyonları.

OPSONİZASYON DEFEKTLERİ:

Bakterilerin fagositozu tipe özgü antikorlarla uyandırılır. Bu antikorun granülosit zarına komplemanın fiksasyonu- nu sağlaması veya monositlerde taneciklerin zara yapışmasını kolaylaştırması şeklinde olur.

Piyojen ve enterik bakteriler için temel olan serum opsonini C₃ tür. C₃ ün bakteri yüzeyine yapışması için en etkili yol spesifik antikor ve komplemanın C₁,4 ve 2 sırası ile aktive olmasıdır. Bununla beraber spesifik aktivasyon olmadan kompleman bakteriyel endotoksinler ile alternatif yolla aktivasyonda etkili olabilir. Dolayısıyla C₃ veya alternatif yolun noksanlığı fagositoz yetmezliğiyle sonuçlanır(9,34).

Yeni doğmuş bebekler gram negatif enfeksiyonlara duyarlıdır. Bunun başka nedeni kompleman fiksasyonu ve gram negatif fagositozunu uyaran IgM sınıfından spesifik antikorların bulunmamasıdır. Kompleman metabolizmasındaki bozukluklar opsonizasyonu kusurlu hale getirir. Komplemanın komponentlerinden C₃ anomalisi olan bir hasta tanımlanmıştır(37). Bu hastada tekrarlanan piyojenin enfeksiyonlar olmaktadır. Lökositler sayıca ve fonksiyon bakımından normaldi. Ancak serumda spesifik antikorlar bulunmasına rağmen pnömokokların lökosit tarafından fagositozu gerçekleşmiyordu. Diğer kompleman faktörleri C₃ hariç normaldi. C₃ ise normalin % 10'una düşmüştü. C₃ ün geri kalan % 90'ı inaktif bir ürüne çevrilmişti. Bu hastada normal serumda bulunmayan fakat hastanın serumunda bulunan bir pseudoglobülünün C₃ ün stabil olmasından sorumlu olduğu sanılmaktadır. Çünkü normal serum in-vivo defekti düzeltmiştir.

Diğer yandan serum kompleman 5'in eksikliğine bağlı fagositoz defekti bulunan ve birbirleriyle akraba olan 2 aile bildirilmiştir(37). Hasta bebeklerde seboreik dermatit durdurulamayan diare lokal ve sistemik gram negatif enfeksiyonlar ve ileri derecede zayıflama ve distrofi vardı. Bu kusur fagositlerin maya parçacıklarını fagosite edememesi buna karşılık eritrosit, pnömokok ve lateks taneciklerini normal şekilde yutabilmeleri şeklinde ortaya çıkmaktaydı. Maya hücreleri fagositoz için C5'e gereksinim gösteren tek canlıdır. Taze plazma kullanılarak 2 çocuk normal yaşama döndürülebilmıştır.

Orak hücre anemili hastalarda pnömokoklara karşı opsonik aktivitenin yetersiz olduğu bilinmektedir(36). Bu hastaların bazılarının, pnömokokların opsonizasyonu için gerekli termolabil ve kompleman olmayan bir elemanın bulunmadığı ileri sürülmektedir. Ayrıca bu hastaların dalağındaki hücrelerin kolloid tanecikleri iyi fagosite etmeyişi de kısmen pnömokok enfeksiyonunun yüksek olmasına bağlıdır.

İn-vitro Lenfosit Transformasyonu:

1960'ta novell'in insan periferel lenfositlerinin fitohemaglutinine(PhA) yanıt olarak proliferasyon ve transformasyonlarını tanımlamasından bu yana yöntem lenfosit fonksiyonlarını çalışmak için yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmiştir. Lenfositlerin PhA'e yanıtları genellikle mitotik indeks şeklinde değerlendirilir. Böylece sentez edilen DNA'ya radyoaktif timidin katılımının ölçülmesi ve bunun standardizasyonu yanıtın değerlendirilmesini objektif hale

getirir(33)

Periferik kandan uygun yöntem ve koşullarla izole edilen lenfositler kültür ortamında DNA sentezi yapmaksızın günlerce yaşayabilmektedirler. Kültür ortamına antijenik özellikte bazı maddelerin eklenmesi halinde lenfositler metabolik değişiklikler göstererek "blast" haline geçerler ve DNA sentezi yapmaya elverişli duruma gelirler. Bu durumda kültür ortamına radyoaktif işaretli timidin (H^3 -thymidine) eklenerek DNA sentezine giren timidinin radyoaktivitesinin ölçülmesi, lenfositlerin ortama eklenen antijene tepkisini gösterir. Ayrıca bu DNA replikasyon hızını da belirler(18,33)

Lenfosit Transformasyon Testi ve Orak Hücre Anemisindeki Durumu:

Lenfosit uyarımı hücre sel bağışık yeteneğini ölçmede yaygın olarak kullanılan faydalı bir yöntemdir. Özellikle immün yetmezlik hastalıklarının tanısında otoimmünite, kanser ve intrasellüler infeksiyonlarda hücre sel bağışık yeteneğini saptamada uygulanır(18). Test hasta lenfositlerinin in-vitro olarak özgül antijenler veya özgül olmayan antijenlerle uyarılması şeklinde yapılır. Özgül olmayan lenfosit uyarımını sağlamak üzere genellikle bitki lektinlerinden phytohemaglutinin (PHA) kullanılır ki bu başlıca T-lenfositlerini uyarmaktadır. Bundan başka Concavalin-A(Con A) da insan ve fare T-lenfositlerini uyandırır. Pokeweed mitogen(PWM) insanda ve farede B-lenfosit uyarandır. Bakteriyel endotoksinlerde insan B-lenfosit uyararı olarak kullanılır.

Lenfosit uyarımının mekanizması özetli şu şekildedir:

İnaktif, sessiz, istiahatteki küçük lenfositler pha ile uyarılırlarsa lenfoblast şekline dönüşürler. Bunlar geniş, pyroninofilik sitoplazmalı blast görünümünde hücrelerdir. Bu uyarı için uyarıların lenfosit yüzeyindeki uyarıcılarla birleşmesi gerekir. Uyarım sonucu iki değerli katyonların zardan geçişi artar, adenyl cyclase aktive olur ve hücre içi CAMP düzeyi artar. Daha sonra protein, RNA ve en son DNA sentezinde artma olur. DNA artması en son hücre bölünmesiyle sonlanır. Lenfosit aktivasyonu sonucunda yeni yapı göstergesidir ki bu da radyoaktif timidin kullanımı ile ölçülebilir(33).

Daha önce homozigot orak-hücre anemili hastalarda yapılan çalışmaların çoğunda Pha lenfosit uyarımının bozulduğu not edilmiştir(12,20). Ancak hafif variantlardaki durum bilinmemektedir.

Bu konuda Hernandez ve arkadaşlarının 1980 yılında orak-hücre anemili hastalarda yaptıkları çalışmada bu hastalarda enfeksiyonlara eğilimin arttığını ve Pha uyarısına karşı lenfosit transformasyonunun azaldığını gözlemişlerdir. Yine bu hastalarda benzer bir araştırmayı Hendriks ve arkadaşları(1984) yapmışlardır. Bu araştırmacılar lenfosit proliferasyonunu Con A ve Pha ile stimulasyonun sonu ölçmüşler. Pokeweed mitojen stimulasyonunu takiben stimulasyon indeksi normal olmakla beraber SS¹ li hastalarda timidin alınımının anlamlı olarak arttığını ve bu hastaların hücre sel immunitelerinde büyük bir defektin ileri sürülemeyeceğini not etmişlerdir.

Venkataraman ve Westerman adlı araştırıcılarda 1985 yılında orak-hücre anemili hastalarda yaptıkları çalışmada kriz süresince bu hastalarda blastogenik cevabın anlamlı olarak azaldığını not etmişlerdir.

İmmüoglobulinlerin Orak-Hücre Anemisindeki Durumu:

Homozigot orak-hücre anemili hastalarındaki çalışmaların bazılarında IgA'nın ve IgG nin seviyelerinin artmış olduğu ve yine IgM'in ise azaldığını gösteren çalışmaların yanında Ig oranlarının değişmediğini gösteren çalışmalarda vardır.

Bu konuda yapılan araştırmaların bazılarında özetle aşağıdaki sonuçlar çıkarılmıştır.

Hernandez ve arkadaşları(1980) orak-hücre anemili çocuklarda Ig durumunun değişmediğini ancak sickle-cell'li erişkinlerde IgA nın arttığını bildirmişlerdir(20).

De Cealear ve arkadaşları(1986); 2 yaşındaki sickle-cell'li çocuklarda serum IgA seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığını ancak IgG ve IgM de herhangi bir anormalliğin gözlenmediğini rapor etmişlerdir(15).

Kılınç ve arkadaşları(1986) sickle-cell aneminin hafif ve ağır formlarında serum IgG, IgM ve IgA düzeylerini ölçmüşler. IgG ve IgA'nın her iki grupta da kontrollere kıyasla anlamlı olarak yükseldiğini, IgM'in ise yine her iki grupta da kontrollere oranla oldukça düşük olduğunu ve sonucun istatistiksel yönden anlamlı olduğunu gözlemişlerdir(21).

A R A Ç G E R E Ç Y Ö N T E M

Bu çalışmada Fakültemiz İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı ile Çocuk Hastalıkları Ana Bilim Dalınca daha önce hemoglobin elektroforezi, sickling testi, aile taraması yapılmış. Fötal hemoglobin ve HbA₂ düzeyleri belirlenmiş ve homozigot "ağır" ve "hafif" sickle-cell hastalıkları oldukları bilinen toplam 24 hasta üzerinde yapıldı. Yapılan aile çalışmalarında bütün hastaların anne ve babaları sickle-cell taşıyıcısıydı(SA). Hastaların elektroforez sonuçları homozigot Sickle-cell özellikleri ile uyumluydu. Hemoglobin elektroforezlerinde SS bantları görüldü. Hafif variantların fötal hemoglobin seviyeleri % 38.41 ile % 18.14 arasında idi, ortalama % 29.08 idi. Ağır variantların fötal hemoglobin seviyesi ise % 32 ile % 10.32 arasında idi, ortalama HbF ise % 18.02 idi. Hastaların 12 tanesi hafif variant idi: Bu hastalar homozigot oldukları halde orta derecede anemileri ve buna uygun hemoglobin ve hematokrit değerlerini gösteriyorlardı, fötal hemoglobin düzeyleri genellikle ve değişik derecelerde yüksekti, yaşamlarını normal koşullarda sürdüren ve kan transfüzyonunu gerektirmiyorlardı. Hiç veya en çok bir kez krize girmişlerdi(5,6,22,23).

12 tanesi de; küçük yaştan itibaren sık krize giren, sık kan transfüzyonunu gerektiren, fetal hemoglobinleri genellikle düşük, beyaz küre ve trombositleri artmış, hafif variantlara göre hemoliz şiddeti ve buna bağlı olarak hematopoetik aktiviteleri yüksek ve klinik olarak orak-hücre anemisinin klasik belirtilerine sahip ve hastalığın şiddetli formunu gösteren hastalardı (13,23,24,25).

Kontrol olarakta 12 sağlıklı kişiden alınan kanda aynı çalışmalar yapıldı.

Hastalar mektup yazılarak çağırıldılar ve her birinden 20 ml. prezervatif içermeyen heparinli kan alındı. Kan plazması ayrılarak -85°C de kullanılabileceği kadar saklandı. Kan sedimentinden Buffy coat ayrılarak aynı gün çalışıldı.

1. KEMOTAKSİS

Nötrofillerin elde edilmesi: 10 ml heparinli kan üzerine eritrositlerin sedimentasyonunu sağlamak amacıyla 5 ml dextan ilave edildi. 37°C de yaklaşık 1 saat doğal sedimentasyona bırakıldı. Daha sonra lökositlerden zengin üstteki plazma kısmı (Buffy-coat) başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine % 10 FCS+Penicilline ve streptomycin içeren RPMI-1640 (Difco) ilave edildi. Karışım 1500 rpm de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve bu işlem üç kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra dipte kalan hücre çöktürülmesi RPMI ile süspansiyon haline getirildi ve thoma lamında sayım yapılarak nötrofil sayısı 5×10^6 ml ye ayarlandı.

Kemoatraktan hazırlanması: Çalışmamızda kemokinesis olayından kaçınmak amacıyla üzerinde en çok çalışılmış ve

kemotaktik olduğu kesinlikle bilinen kazein kullanıldı.

Kazein: Sodium kazeinat (Difco Detroit Michigan U.S.A.) 5 mg/ml olacak şekilde RPMI ile sulandırıldı. 1 M NaOH ile pH: 12 ye getirilerek kazeinin erimesi sağlandı ve sonra 1 M NaH_2PO_4 ile pH yavaş yavaş tekrar 7.2 ye ayarlandı. Bu eriyik 1/2 oranında RPMI ile sulandırılarak kullanıldı.

Milipor filtre yöntemi: Boyden'in tanımladığı yöntem bazı değişikliklerle uygulandı (36) ve sonuçlar zigmand ve Hirsch'in tanımladıkları şekilde değerlendirildi (38). Bu yöntemde özel olarak Adana koşullarında döküm demir-bakır alaşımından yaptırılan kameralar kullanıldı. Kameranın kesit şeması Şekil 3'de görülmektedir.



Şekil 3: Milipor filtre yönteminde kullanılan kameranın; a) Boyuna kesiti b) Çekilmiş fotoğrafı.

Filtre olarak 3 μm par genişliği olan sellüloz asetat filtreler (Sartorius GmbH PF.3243) kullanıldı. Alt bölmeye 2 ml kemoatraktan (1/2 kazein) veya kontrol olarak RPMI konuldu. Üst bölmeye ise yaklaşık 1 ml hücre süspansiyonu ilave edildi ve kamera 1 saat % 7 CO_2 li ortamda 37°C lik inkübatörde inkübe edildi. Tipik bir deney şu şekilde

düzenlendi: Her hasta ve kontrol için birinin alt odacığında kazein diğzerinin alt odacığında RPMI içeren iki kamerada üst odacığa eklenen nötrofillerin kemotaksisi incelendi.

İnkübasyon sonunda filtreler üst kısmı üstte olacak şekilde alındı ve aşağıda belirtilen şekilde boyandı:

1. 5 dakika absollü ethanol
2. 2 dakika distile su
3. 1 dakika hematoksilen-eosin
4. 2 dakika distile su
5. 10 dakika çeşme suyu
6. 2 dakika % 70 ethanol
7. 3 dakika % 95 ethanol
8. 5 dakika % 80 ethanol+ % 20 butanol
9. 10 dakika ksilol.

Boyama sonunda filtre üzerine bir damla immersion yağı damlatıldı, lam lamel arasına kondu ve 40x büyütmede mikroskop altında değerlendirildi. Filtre içinde bir mikroskop alanında en ileri giden iki hücrenin kat ettikleri mesafe mikroskobun mikrometresi yardımıyla ölçüldü. Bu ölçüm her filtrede en az beş ayrı alanda yapıldı. Bu ölçümlerin ortalaması sonuç olarak değerlendirildi.

İstatistik değerlendirme student-t testi yardımı ile yapıldı.

2. OPSONİK AKTİVİTENİN GÖSTERİLMESİ:

Normal sağlıklı kişilerden alınan 60-100 ml heparinli venöz kan oda sıcaklığında (veya 37°C'de) doğal sedimentasyona bırakılıp eritrositlerin çökmesi için yaklaşık

olarak 45 dakika bekletilir.

Üst kısımdaki polimorfonuklear hücrelerden zengin (Buffy-coat) başka bir tüpe aktarılır ve daha sonra bu medium-199 (GIBCO) ile sulandırıldı. 1500 rpm de 15 dakika santrifüj edilip süpernatant atılır ve yıkama işlemi 2-3 kez tekrarlanır. Son yıkamadan sonra süpernatant atılır ve dipteki hücre çökeltisi med-199 ile yeniden süspansiyon haline getirilir. ve hücre sayısı 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlanır. Deney için bu süspansiyondan 0.25 ml alınıp kullanılır (36).

Stafilokokların Üretimi ve Konsantrasyonu:

Kanlı ağarda üremiş 24 saatlik stafilokok kolonilerinden sıvı Brain heart infusion(DIFCO) besiyerine pasaj yapılır ve 37°C de besi yeri bulanık hale gelinceye kadar yaklaşık olarak 48 saat bekletilir. Bu karışım 60°C de 20 dakika bekletilerek bakterilerin inaktive olması sağlanır. Daha sonra tüplere alınır ve med-199 ile 1500 rpm de santrifüj edilerek 2-3 kez yıkanır. Son yıkamadan sonra süpernatant atılır ve dipte kalan bakteri çökeltisi yine med-199 ile süspansiyon haline getirilir. Son bakteri konsantrasyonu 0.3 ml de 1×10^8 bakteri olacak şekilde ayarlanır. Deney için bu karışımdan 0.25 ml alınıp kullanılır.

Deneyin Yapılışı:

İki tüple çalışılır. Birinci tüpte; 0.25 ml bakteri süspansiyonundan, 0.25 ml Med-199, 0.25 ml hasta serumu, 0.25 ml polimorfonuklear hücre karışımı ilave edilip 37°C de 30 dakika inkübe edilir(inkübasyon süresince tüpün bir

kaç kez hafifçe karıştırılması gerekir). Daha sonra bu karışımdan lam üzerine yayma yapılır. Giemsa boyası (Giemsa-lösung-MERCK) ile boyanır. Mikroskopun 100'lük objektifi ile yaklaşık 50 polimorfonükleer hücre içine alınan bakteriler sayılır ve hücre başına düşen bakteri miktarı bulunur (36).

İkinci tüpe ise; 0.25 ml bakteri süspansiyonu + 0.25 ml normal insan serumu + 0.25 ml polimorfonükleer hücre karışımı + 0.25 ml med-199 ilave edilip 37°C de yaklaşık 30 dakika inkübe edilir. Hücreler benzer şekilde boyanarak fagosite edilen bakteri sayısı hesaplanır.

Negatif kontrol olarak; bakteri süspansiyonu + med 199 + polimorfonükleer hücreler eşit oranlarda bir tüpte karıştırılır ve 37°C de 30 dakika inkübe edilir. Daha sonra bu karışımdan yukarıda açıklandığı şekilde yayma yapıp benzer işlemler uygulanır.

3. IN-VITRO LENFOBLASTİK TRANSFORMASYON TESTİ:

Yöntemin ilkesi; Lenfositler periferik kandan steril koşullarda elde edildikten sonra fetal dana serumu (FCS) ile desteklenmiş kültür ortamında PhA ile inkübe edilir. İnkübasyon süresi bitiminden önce ortama katılan trityum işaretli timidin, PhA ile uyarılmış lenfositlerin DNA yapısına girer. İnkübasyon sonrası yıkanan lenfositler triklorasetik asit ile çökeltilerek çökeltildeki radyoaktivite likid sintilasyon spektrometresi aracılığı ile değerlendirilir (33). Hücre tarafından alınan timidin DNA sentezi ile doğrudan orantılıdır.

Periferik kandan elde edilen lenfositlerin bir bölümü PhA ile uyarılırken, bir bölümü uyarılmadan inkübe edilir. İnkübasyon sonunda uyarılan ve uyarılmayan lenfositlerin DNA sentez hızları birbirleri ile oranlanarak transformasyon indeksi hesaplanır(33).

Deneyde Kullanılan Çözeltiler:

1. Doku kültür ortamı(RPMI-1640-GIBCO) 100 misli konsantre RPMI-1640 distile su ile sulandırılıp sodyum bikarbonat ve NaOH ile pH 7.2 ye ayarlandı.
2. L-Glutamine çözeltisi(0.59 gr/ml)(GIBCO)
3. Penisillin ve streptomisin (100 micro/ml St.+ 100 ü/ml pen.)
4. Fitohemaglutinin M.(steril)(DIFCO) (toz halindeki PhA 5 ml RPMI çözeltisinde eritilerek stok çözelti hazırlandı. Kullanma çözeltisi içinde Stok 10 kat sulandırıldı).
5. Histopak-1077(100 ml ficoll+9 gr/100 ml Na Diat-roate).
6. Tritiyumla işaretli timidin çözeltisi(Thymidine G-H³ TRK 61, steril çözelti, spesifik aktivite 20.000-30.000 mci/mm(Amersham). 5 ml lik stok çözeltiden (5 mci) alınan 0.1 ml, steril RPMI-1640 ile 100 kez sulandırılarak kullanma çözeltisi hazırlandı)
7. Triklor asetik asit çözeltisi(% 10 ve % 5 lik)
8. Aseton
9. Etil alkol
10. Koruyucusuz heparin(prezervative free heparin)(panheprin-Abbott laboratories).

11. Sintilasyon çözeltilisi

5.075 gr.PPO(2.5 Diphenyl oxozole scintillation grade), 0.360 gr POPOP(P.Bis 2-5 phenoloxozoly) benzene tartıldı. Bir litre toluende eritildi oda ısısında saklandı.

Bütün çalışmalar steril koşullarda yapıldı.

Deneyin Yapılışı:

Her çalışmada iki hasta ile beraber bir kontrol deneye alındı. Denek ve kontrollerden 0.25 ml koruyucusuz heparin içeren plastik enjektör ile 5 ml venöz kan alındı. Kan 1/1 oranında RPMI-1640 ile sulandırıldı. Daha sonra içinde 3 ml.histopak(ficol-metnozal) bulunan steril tüplere ficoll üzerinde tabaka yapacak şekilde yavaş olarak 5 ml hücre süspansiyonu eklendi. Tüpler tabakaların birbirlerine karışmamasına dikkat edilerek 1500 rpm de(400 g'de)30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda tüpte oluşan 4 tabakadan en üstte olan plazma kısmı atılıp bunun altındaki yaklaşık 0.5 ml lik lenfositlerce zengin tabaka posteur pipeti yardımı ile toplandı. Bunun üzerine yaklaşık 5 ml RPMI- 1640 ilave edilip 1500 rpm de yaklaşık 15 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. ve işlemin sonunda tüpün dibinde çöken 0.5 ml lik lenfosit süspansiyonu RPMI-1640 çözeltilisi ile 1 ml ye sulandırıldı. Hücre sayımı yapılarak lenfosit sayısı 5×10^6 ye ayarlandı.

Lenfosit Kültürü:

Lenfosit kültürü steril test tüplerinde her olgu için iki uyarılmış iki uyarılmamış kültür yapabilmek için

4 tüp kullanılarak yapıldı. Uyarımsız kültür tüplerine 0,9 ml RPMI-1640 ve 0.1 ml lenfosit suspansiyonu, uyarımlı kültür tüplerine ise 0.8 ml medyum + 0.1 ml lenfosit suspansiyonu+ 0.1 ml FhA kondu. Tüplerin kapakları içeriye hava girmesine olanak sağlayacak şekilde hafifçe kapatıldı ve 37°C de nemli ortamda ve % 7 CO₂ % 93 atmosferik hava karışımı sağlayan cam inkübatör içinde 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her tüpe 0.1 ml H³-timidin eklendi ve 12 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra kültür sıvıları 2 cm çapında kesilmiş ve numaralandırılmış olan Whatman filtre kağıtlarına emdirildi. Kurutulan filtre kağıtları önce % 10 luk TCA, sonra % 5 lik TCA ve daha sonra da 1/1 oseton ethanol karışımında 30 'ar dakika tutuldu ve daha sonra kurutuldu.

Filtre diskler içlerinde 5 er ml sintilasyon sıvısı bulunan cam sintilasyon şişelerine aktarıldı. Sayımlar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp anabilim dalında yapıldı.

Sonuçlar sayım/dakika(count per minute-cpm) olarak elde edildi.

Stimulasyon indeksinin hesaplanması:

Her olgu için uyarılmış ve uyarılmamış tüplerden alınan sayımların ortalaması bulundu. Bu ortalamalardan, hiç bir örnek kullanılmaksızın diğer disklerle beraber aynı işlemlerden geçirilmiş 3 blank diskin ortalaması çıkarıldı. Uyarılmış kültürler için bulunan ortalama değer, uyarılmamış kültürlerin sayım ortalamasına bölünerek stimülasyon indeksi aşağıdaki şekilde belirlendi(33).

$$S.i.= \frac{\text{Uyarılmış kültür. cpm(sayım/dakika)}}{\text{Uyarımsız kültür. cpm(sayım/dakika)}}$$

4. SERUM IMMUNGLOBULİN VE KÖMPLEMAN C₃ DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ:

Hasta serum immünglobulinleri ve C₃ düzeyleri radial immünodiffüzyon yöntemi ile ve Behring werke standart plakları kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar firmanın düzenlediği standart tablodan değerlendirildi.

İstatistik Değerlendirme:

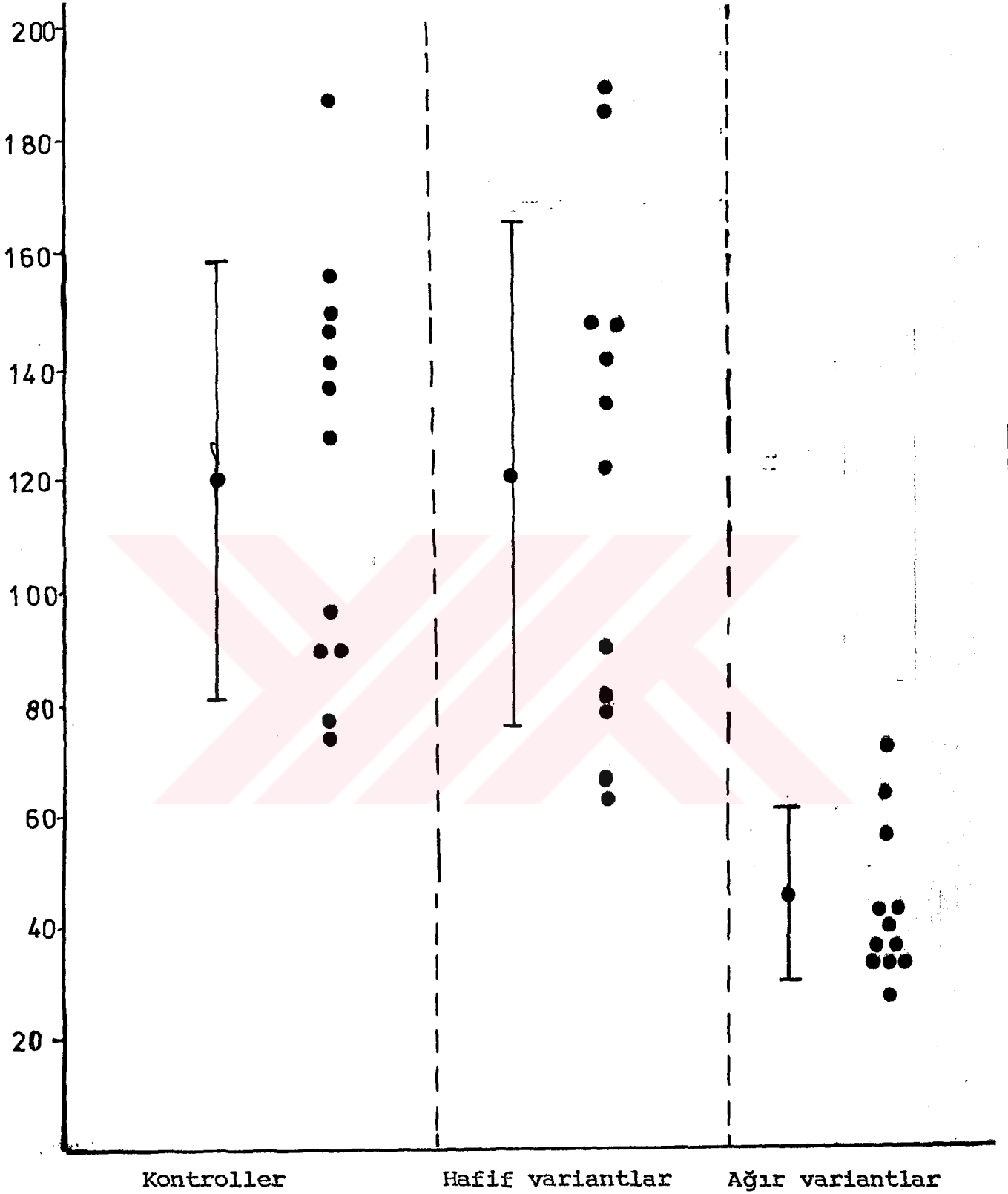
Bu çalışmada sonuçlar P= 0.05 güven sınırında student's t testi uygulanarak değerlendirildi.

B U L G U L A R

Taramaya katılan orak hücre anemisi olan hastalar - dan 12 tanesi yaşamlarını normal koşullarda sürdüren ve kan transfüzyonunu gerektirmeyen, HbF düzeyleri genellikle yüksek(% 20'nin üzerinde) hiç veya en çok bir kez krize girmiş silik klinik belirtileri ve seyrek enfeksiyonlarla karakterize "hafif formu", Diğer 12 si ise küçük yaştan itibaren sık sık krize giren, sık kan transfüzyonu yapılan, anemisi olan ve sık enfeksiyonlarla karakterize "Ağır gi - dişli formunu" gösteren hastalardı(5,6,21,23,24).

KEMOTAKSİS BULGULARI

a) Na-kazeinata karşı nütrofillerin gösterdiği kemotaksis: Her iki hasta grubu ile normal kişilerin Na-kazeinata karşı elde edilen nütrofil kemotaksis değerleri Şekil 4 de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi hafif variantların ortalama kemotaksis değeri 120 ± 44.9 , Kontrollerin ortalama kemotaksis değeri 122.3 ± 36.8 ve ağır variantların ortalama kemotaksis değeri 42.95 ± 13.62 bulundu. Elde edilen değerler açısından her iki grubun karşılaştırılmasında ağır formda hafif forma oranla nütrofil kemotaksisinin önemli derecede azaldığı ve her iki grup arasındaki farkın istatistiksel yönden anlamlı olduğu bulundu($0.01 < p < 0.05$)



Şekil 4: Kontroller ile orak hücre anemisinin "hafif" ve "ağır" formunu gösteren hastaların Na-kazeinata yönelik nötrofil kemotaksis değerleri.

Hafif gidişli grupla normallerin karşılaştırılmasında ise hafif formlarda ortalama kemotaksis değerlerinde hafif bir azalmanın dışında istatistik olarak önemli bir fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$).

Hastalığın şiddetli formu ile kontrollerin karşılaştırılmasında ise, şiddetli formu gösteren şahıslarda polimorfonükleer hücrelerin Na-kazeinata karşı kemotaksis değerlerinin kontrollere kıyasla önemli derecede azaldığı, farkın istatistiksel yönden oldukça anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$).

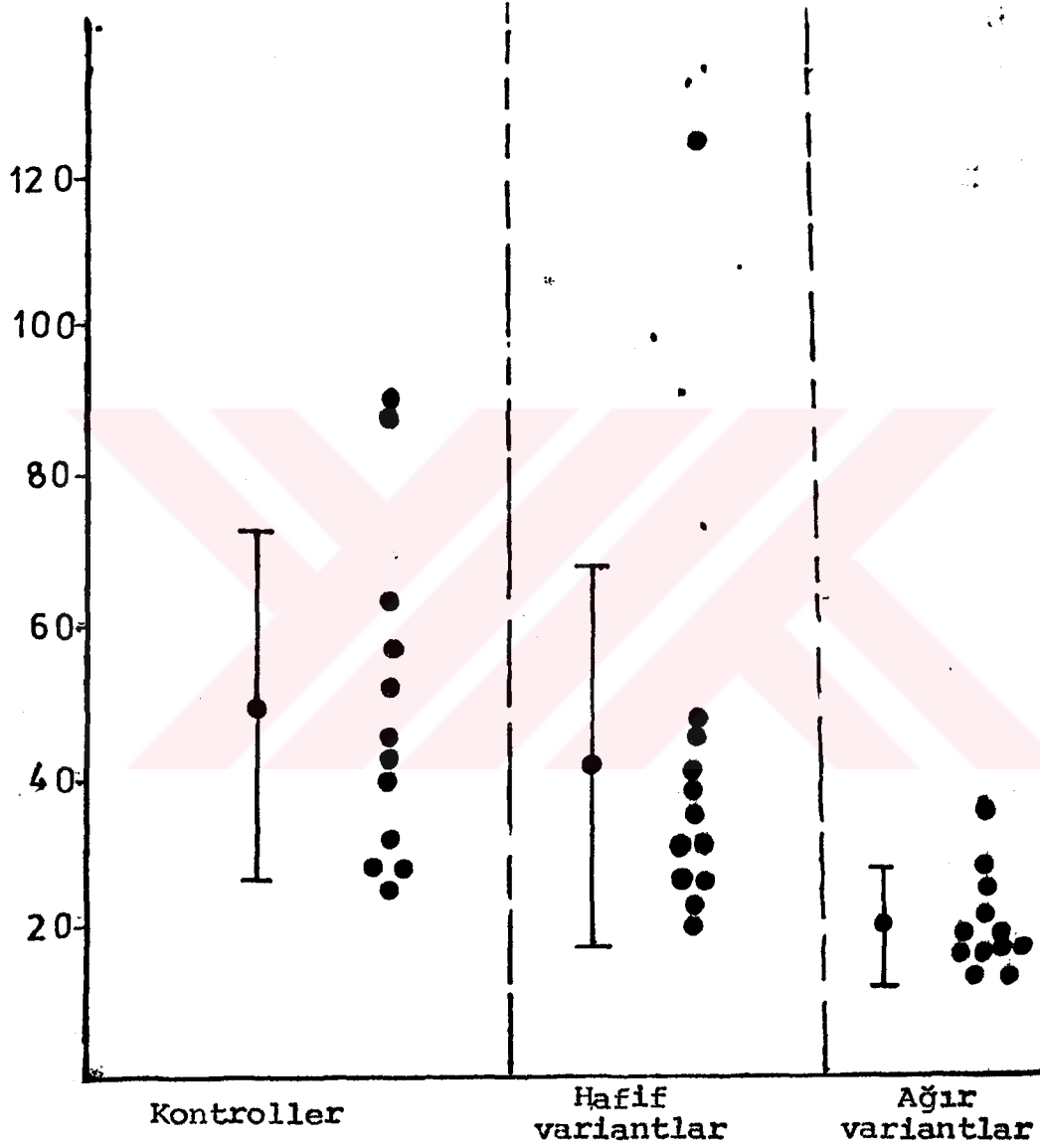
b) Nötrofillerin normal mediumdaki kemotaksis bulguları (Random Migrasyon):

Her iki hasta grubu ile kontrollerin normal mediumdaki polimorfonükleer hücrelerin kemotaksis değerleri Şekil 5 de gösterilmiştir. Hafif variantların ortalaması 423 ± 28.2 , kontrollerin ortalaması 49.6 ± 21.9 ve ağır variantların ortalaması 19.1 ± 6.9 bulundu.

Hafif gidişli hasta grubu ile ağır gidişli hasta grubunun değerleri karşılaştırıldığında, ağır formun yine oldukça anlamlı şekilde düşük kemotaksis değeri gösterdiği bulundu ($p < 0.001$).

Hafif gidişli grup ile kontrollerin kıyaslanmasında ise, hafif gidişlerde çok az bir azalma dışında önemli bir fark görülmedi ($p > 0.05$).

Yine kontrol grubu ile hastalığın şiddetli formunu gösteren şahıslar karşılaştırıldığında, ağır formda nötrofil kemotaksisinin oldukça azaldığı, farkın istatistiksel yönden anlamlı olduğu gözlemlendi ($p > 0.001$).



Şekil 5: Kontroller ile orak hücre anemisinin hafif ve ağır formunu gösteren hastaların Polimorfonükleer hücrelerinin normal mediyumdaki kemotaksis değerleri.

OPSONİZASYON DEĞERLERİ

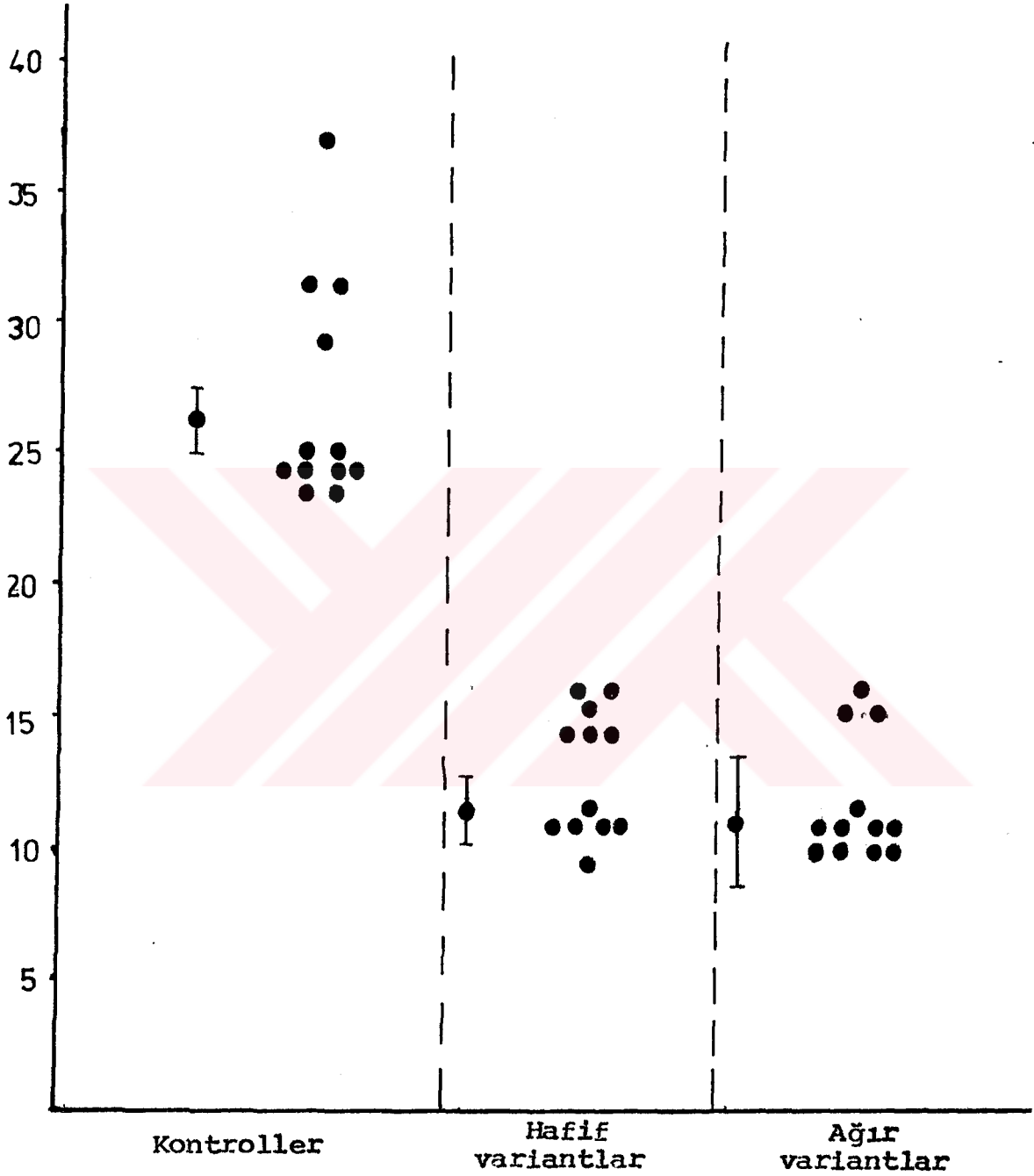
Sağlıklı ve orak hücre anemisi olan "hafif ve "ağır" variantların opsonizasyon değerleri Şekil 6 da gösterilmiştir. Hafif gidişli grubun ortalaması 13.27 ± 2.53 , ağır gidişli grubun ortalaması, 12.05 ± 2.23 ve kontrollerin ortalaması 27.37 ± 5.07 bulundu.

Hastalığın hafif formunu gösteren kişiler ile hastalığın şiddetli formunu gösteren kişilerin opsonizasyon değerleri karşılaştırıldığında ağır gidişlilerdeki değerlerin hafif gidişlilere kıyasla biraz düşük olduğu, ancak aralarındaki farkın istatistiksel yönden anlam taşımadığı bulundu ($p > 0.05$).

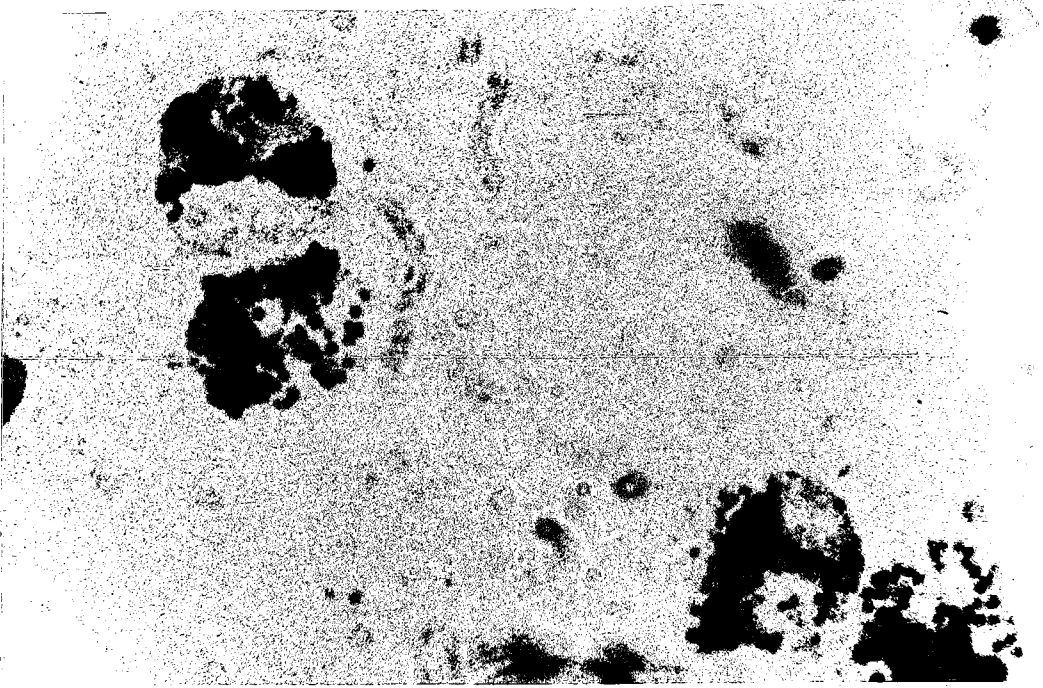
Hastalığın her iki formunun kontrollerle karşılaştırılmasında ise, opsonizasyon değerleri kontrollere kıyasla oldukça düşük bulundu ve aralarındaki fark istatistiksel açıdan çok anlamlıydı.

LENFOSİT TRANSFORMASYON BULGULARI

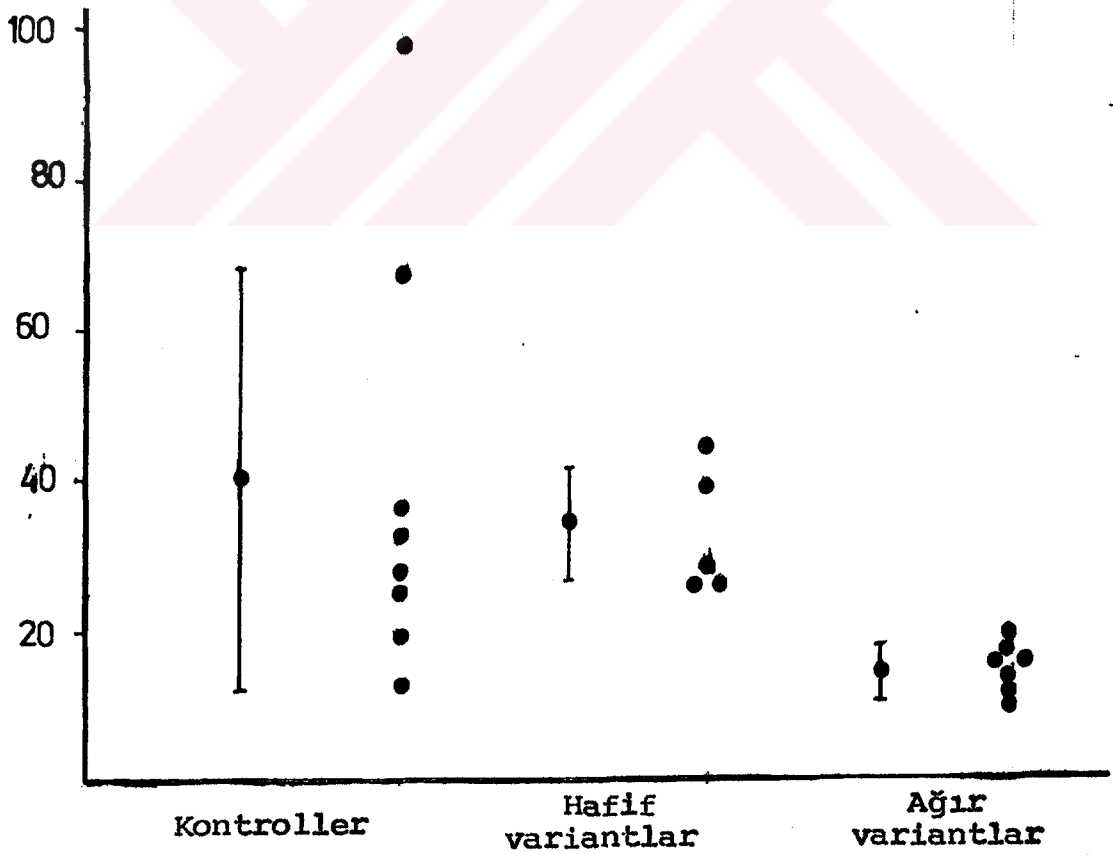
Orak hücre anemisinin hafif ve şiddetli formunu gösteren hastalarla normal kişilere ait lenfosit transformasyon endeksi değerleri Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 6: Kontroller ile orak hücre anemisinin "hafif" ve "ağır" formunu gösteren hastaların opsonik aktivite değerleri.



Şekil 7: Nötrofillerde fagosite edilmiş bakteriler görülmektedir.



Şekil 8: Orak hücre anemisinin hafif ve şiddetli formunu gösteren hastalar ile normal kişilere ait lenfosit transformasyon endeksi değerleri.

Şekilde görüldüğü gibi hafif ve ağır formlar arasında önemli bir fark vardı ve bu istatistiksel yönde anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Hafif variantı gösteren şahıslarda lenfosit PhA uyarımı normallerle karşılaştırıldığında ise normalden düşük olduğu, ancak istatistiksel yönden fark olmadığı saptandı.

Orak hücre anemisinin şiddetli formu ile kontrol grubu lenfosit PhA uyarımı yönünden karşılaştırıldığında şiddetli formda PhA uyarımının çok belirgin şekilde düştüğü ve farkın istatistiksel yönden anlamlı olduğu bulundu ($0.01 < p < 0.05$).

SERUM IMMUNGLOBULİN DÜZEYLERİ:

Orak hücre anemisinin hafif gidişli formunu gösteren hastalar ile şiddetli gidişli formunu gösteren hastalar ve sağlıklı kişilerin radial immün difüzyon yöntemi ile ölçülen serum immunglobulin (Ig) düzeyleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Kontroller ile orak hücre anemisinin hafif ve ağır formunu gösteren hastaların serum immunglobulin düzeyleri

	IgG + \bar{x} gr/lt	IgA + \bar{x} gr/lt	IgM + \bar{x} gr/lt
Hafif Variantlar	10.61 ± 4.84	2.27 ± 1.39	2.49 ± 1.39
Ağır variantlar	17.72 ± 9.03	1.83 ± 0.64	1.57 ± 0.80
Kontroller	10.74 ± 2.32	1.92 ± 0.99	2.62 ± 1.02

Hafif gidişliler ile kontrollerin, IgG, IgM ve IgA değerleri birbirine çok yakın bulunurken IgA'nın hafif variantlarda biraz yüksek olduğu, ancak aralarında istatistik-

sel yönden önemli bir fark olmadığı görüldü.

Ağır gidişli hastalık formu gösteren grupta IgG hafifçe artmıştı. IgA ve IgM değerleri normal sınırlarda idi. Özetle her iki hasta grubuna ait serum immünglobulin düzeylerinin genel olarak normal sınırlarda veya normale çok yakın olduğu bulundu.

KOMPLEMAN (C₃) DÜZEYLERİ

Kompleman düzeylerinin ölçümü radial immün diffüzyon yöntemi ile yapıldı. Elde edilen serum kompleman C₃ düzeyleri (Tablo 2'de gösterilmiştir) hafif ve şiddetli gruplarda normal sınırlarda bulundu. Gruplar ortalamaları arası fark istatistiksel açıdan önemsizken, her iki gruba kontrol grubu arasındada istatistiksel yönden fark görülmedi.

Tablo 2: Orak hücre anemisinin hafif ve şiddetli formunu gösteren hastalar ve normal kişilere ait serum C₃ düzeyleri.

	C ₃ \bar{x} gr/lit
Hafif variantlar	1.36 ± 1.73
Ağır Varyantlar	0.821 ± 0.22
Kontroller	1.04 ± 0.19

T A R T I Ő M A

Bu çalışmada homozigot orak hücre anemisinin hafif ve ağır formunu gösteren hastaların immün fonksiyonları çalışıldı. Hastalığın hafif formunu gösteren kişiler; homozi- got oldukları halde orta derecede anemileri ve buna uygun hemoglobin ve hematokrit değerlerini gösteriyorlardı. F- tal hemoglobin düzeyleri genellikle ve değişik derecelerde yüksek, yaşamlarını normal koşullarda sürdüren ve kan trans- füzyonu gerektirmeyen hiç veya en çok bir kez krize girmiş- lerdı (5, 6, 21, 23, 24).

Ağır formunu gösteren kişiler ise kik kaştan itiba- ren sık krize giren sık kan transfüzyonu gerektiren ftal hemoglobinleri genellikle düşük, beyaz küre ve trombositle- ri artmış hafif varyanta göre hemoliz şiddeti ve buna bağlı olarak hemopoetik aktiviteleri yüksek ve klinik olarak da orak hücre anemisinin klasik belirtilerine sahiptiler (13, 22, 23, 25).

Her iki hasta grubu ntrofil kemotaksis düzeyleri açısından hem kendi aralarında hem de kontrollerle karşılaş- tırıldı. Nötrofillerin sodyum kazeinata doğru gösterdikleri kemotaksis değerleri ile random migrasyonları (ntrofille- rin normal medyumdaki hareketleri) açısından her iki grup karşılaştırıldığında sickle cell hastalığının şiddetli

formunu gösteren şahıslarda nötrofil kemotaksisinin her iki durumda da hafif formlara ve normal kontrollere göre oldukça azalmış olduğu görüldü. Her iki grup arasındaki fark istatistiksel yönden anlamlıydı ($p < 0.001$). Ancak hastalığın hafif formunu gösteren şahıslarla normal kontrol grubu nötrofil kemotaksisinin ortalama değerleri birbirlerine oldukça yakın bulundu. Aralarında pek önemli bir fark görülmedi (Şekil 4).

Orak hücre anemili hastalarda kemotaksisin çalışıldığına dair herhangi bir kaynağa rastlamadık. Ancak 1985 yılında yapılan bir çalışmada orak hücre anemili hastalarda filtre içinde nötrofillerin migrasyonu oranlarının hafifçe azaldığı yine aynı araştırmacı grubu monositlerin skin window testi ile migrasyon oranlarının azaldığını göstermişlerdir (11).

Bu hastalığın şiddetli formunu gösteren şahıslarda elde ettiğimiz değerler doğrultusunda nötrofil kemotaksisinin azaldığını söylemek mümkündür. Ancak nötrofillerin bu yeteneğinin hafif varyantlarda pek değişmediği, dolayısıyla bu hastalarda enfeksiyonların daha az ağır seyretmesi nötrofil kemotaksis yeteneklerinin normal olmasıyla ilişkili olabilir. Öte yandan kemotaksis bozukluğu ile enfeksiyonlara eğilim arasındaki ilişkili birçok çalışmada gösterilmiştir (31, 32, 38).

Çalışmamızda, bu hastalarda opsonin defektine bağlı fagositoz yetersizliğini de saptadık. Her iki hasta grubunda opsonik aktivitenin normallere göre oldukça azaldığını, her iki grubun ortalama değerleri ile kontrollerin ortalama

değerleri arasındaki farkı oldukça anlamlı bulduk(Şekil 6).

Bulgularımızla Wilkestein J.A. ve arkadaşları(36), Bjornson ve arkadaşları(9), Buchans GR ve arkadaşları (14) nun bulguları ile uyumluydu. Bu bulgular doğrultusunda orak hücre anemili hastalardaki opsonin yetersizliğinin normal hasta serumunda bulunan ve bu hastaların serumunda muhtemelen eksik bir faktöre bağlanabilir. Winkestein J.A. ve arkadaşları da bu hastalarda pnömokok fagositozu için gerekli bir faktörün bulunmadığını rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar bu faktörün ısıya labil bir opsonin gibi davrandığını ileri sürmüşlerdir(36). Yine diğer bir çalışmada da bu hastalarda otosplenektomiye bağlı opsonin yetersizliğinin varlığını bildirmişlerdir(12).

Bjornson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da orak hücre anemili çocuklarda kompleman alternatif yol aracılığıyla opsonizasyonda azalmada hem IgM ve hemde IgG nin düşük seviyeleriyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir(10). Bjornson ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada bu hastalardaki opsonin defektlerinin C_3 düzeyindeki azlık nedeniyle kompleman alternatif ve klasik aktivasyon yolundaki bozulma nedeniyle olabileceğini ileri sürmüşlerdir(9). Ancak biz çalışmamızda bu hastaların C_3 düzeylerinin her iki hasta grubu içinde normal sınırlarda bulduk(radial immünodiffüzyon yöntemiyle). Bizim bulgularımızla yukarıdaki araştırmada elde edilen bulgularla uyuşmamasının nedeninin hastaların farklı yaşlarda oluşundan da kaynaklandığını düşünüyoruz. Çünkü Bjornson ve arkadaşları

tarafından yapılan çalışmada araştırılan hastaların yaşları küçüktü (2-4 yaş). Yapılan çalışmalarda kompleman C₃ düzeyinin yaşa bağlı olarak değiştiği ileri sürülmüştür (15). Yine bu çalışmamızda her iki hasta grubunun serum immüoglobulin düzeylerini radial immüno diffüzyon yöntemiyle ölçtük. Hafif igidişliler ile kontrollerin IgG, IgM ve IgA değerlerini birbirlerine çok yakın bulduk. IgA düzeyi hafif varyantlarda biraz yüksekti. Ancak aralarındaki farkın istatistiksel bir anlamı yoktu. Ağır gidişli hastalık formunu gösteren şahıslarda IgG hafifçe artmıştı. IgA ve IgM değerleri normal sınırlardaydı veya normale çok yakındı (Tablo 1). Bu nedenle hastalığın her iki formunda normal şartlarda immüoglobulin düzeylerinin değişmediğini sadece enfeksiyon durumlarında veyakriz anında bunların seviyelerinin değişebileceği düşünülür. Gerçektende bu konuda yapılan çalışmalar da bununla uyumluluk içindedir. Hernandez ve arkadaşları (1980) orak hücre anemili çocuklarda immün globulin düzeylerinin değişmediğini, ancak sickle cell'li erişkinlerde IgA'nın arttığını bildirmişlerdir (20). Yine De Cealea ve arkadaşları (1986) iki yaşındaki sickle cell'li çocuklarda serum IgA seviyesinin arttığını ancak IgG ve IgM'de herhangi bir anormalliğin gözlenmediğini bildirmişlerdir (15). Wenkatarmen ve arkadaşları da sickle cell'li hastalarda ağırlı vasocclusive krizler süresince B hücre fonksiyonlarında değişikliklerin olduğunu göstermişlerdir (35). Kılınç ve arkadaşları (1986) sickle cell anemi hastalığının hafif ve ağır formlarında IgG ve IgA'nın her iki grupta da kontrollere göre anlamlı

olarak arttığını IgM'lerin ise her iki grupta da kontrole-
re kıyasla oldukça düşük olduğunu göstermişlerdir(21).
Natta ve arkadaşları sekiz orak hücre anemili çocuklarda
yaptıkları çalışmada IgG ve IgA'nın normallere kıyasla an-
lamlı bir şekilde arttığını ve IGG deki bu artışın bu hasta-
larda sıklıkla tekrarlanan enfeksiyonların nedeni olabilece-
ğini ileri sürmüşlerdir.

Yine çalışmamızda lenfosit transformasyonunun hasta-
lığın şiddetli formunu gösteren kişilerde hafif ve kontrol-
lere kıyasla oldukça düşüktü ve aralarındaki fark istatis-
tiksel yönden anlamlı bulundu. Hernandez ve arkadaşları(1980)
orak hücre anemili şahıslarda yaptıkları çalışmada PhA uya-
rısına karşı lenfosit transformasyonunun bu hastalarda bo-
zulduğunu bildirmişlerdir(20). Yine Wenkaterman ve Wles-
terman adlı araştırmacılar(1985) bu hastalarda kriz esna-
sında blastogenik cevabın anlamlı olarak azaldığını bildir-
mişlerdir(35). Bulgularımız her iki çalışmayla da uyum için-
dedir. Yine bu hastalarda benzer bir çalışmayı Hendriks(1984)
ve arkadaşları yapmışlardır. Bu hastalarda PhA ve Con A ya
karşı lenfosit transformasyonunu normal bulmuşlar. Hatta bu
hastalarda timidin alınımının arttığını ve bu hastaların
hücre sel immünitelerinde büyük bir defektin ileri sürüle miye-
ceğini bildirmişlerdir(19).

Bütün bu gözlemlere dayanarak orak hücre anemili has-
taların immün fonksiyon yeteneklerinin bozulduğunu ve bu
fonksiyonel bozulmanın her iki varyanttaki durumlarının fark-
lı olduğu, hafiflerde bu bozulmaların daha hafif bir şekilde

hastalığın gidişine paralel olarak seyrekliği düşünülebilir.

Özetle, bu hastalardaki hücre sel immüniteden sorumlu hücrelerin sayılarında pek fazla bir değişiklik görülmemekte(1,25), sadece fonksiyonlarında bozulma olmaktadır. Yine humoral immün sistemde de sadece hastalığın şiddetli durumlara geçmesi anında hem B hücre sayısında ve hem de serum immünglobulin seviyelerinde değişiklikler meydana gelmektedir(35). Ancak bu hastalarda immünolojik fonksiyonların önemli derecede bozulduğu bir gerçektir.

Ö Z E T

Bu çalışmada orak hücre anemili hastaların "hafif" ve "ağır" formlarında, nötrofil kemotaksis, opsonik aktivitele-ri, lenfosit transformasyonu ve serum IgG, IgM, ve IgA dü-zeyleri ile C₃ düzeyleri araştırıldı. Her iki grup yukarıda-ki parametreler açısından hem kendi aralarında hem de kont-rol grubu ile karşılaştırıldı.

Nötrofil kemotaksis değerleri hastalığın ağır formu-nu gösteren şahıslarda normal ve kontrollere göre düşük bu-lundu ve aralarındaki fark istatistiksel yönden anlamlıydı (p < 0.001).

Serum opsonik aktivite, hastalığın her iki variantın-da da oldukça azaldığı görüldü. Kontrollerle aralarındaki fark anlamlıydı (p < 0.001). Serum IgG, IgM ve IgA ile C₃ dü-zeyleri önemsiz bazı farkların dışında normal sınırlarda bulundu.

Lenfosit transformasyonu ağır variantlarda hem kont-rollere hemde hafif variantlara kıyasla oldukça azalmıştı. Sonuç istatistiksel yönden anlamlıydı (p < 0.001). Hasta-lığın hafif formunu gösteren şahısların nötrofil değerleri serum immunglobulin ve C₃ düzeyleri ile lenfosit transfor-

masyon bulguları kontrollerle hemeh hemen aynı düzeydeydi. Sadece opsonik aktiviteleri normallere oranla anlamlı bir şekilde azalmıştı. Bu çalışmanın orak hücre anemili hastaların her iki grubundaki immün fonksiyonları hakkında bilgi vermesi açısından önemi vardır.



K A Y N A K L A R

- 1..Ades EW, Hinson A, Morgon SK. Immunological Studes in sickle-cell disease. Clinical Immunology and Immunopathology. 17, 456-62,(1980).
2. Aksoy M. Sickle-cell trait in south Turkey. The Lancet 589,(1955).
3. Aksoy M. Anormal hemoglobinler ve talassemik sendromlar. TÜBİTAK Yayınları. 521,68,(1983).
4. Alexander,WJ, Good RA. Fundamentals of Clinical Immunology WB Saunders Company. Philadelphia,(1977).
5. Ali SA, Milder variant of sickle-cell disease in Araps in Kuwait associated with unusaly high level of foetal haemoglobin. British Journal of Haematology. 19,613.(1970).
6. Armond P, et al. Sickle-cell disease and trait in white populations. JAMA.224,5,(1973).
7. Bilgehan H, Genel Mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi. Ege Üniversitesi Yayınları No:84. İzmir,(1981).
8. Bjornson AB, Label JS, Lompkin BC. Humoral components of host defense in sickle-cell disease during painful crissis and asymptomic Periods. The Journal of Pediatrics.96,255,(1980).

9. Bjornson AB, Label JS, Harr KS. Relation between Serum opsonic activity for streptococcus pneumoniae and Complement function in sickle-cell disease. *J. Infect.Dis.* 152(4). p 701-9,(1985).
10. Bjornson AB, Label JS. Direct evidence that decreased serum opsonisation of streptococcus pneumoniae via the alternative complement pathway in sickle-cell disease is related to antibody deficiency. *J.Clin. Invest* UNITED STATES, 79(2),p.388-98,(1987).
11. Boghossian SH, et al. Investigations of defence with sickle-cell disease. *Br.J. Haematol.*59(3),p.523-31,(1985).
12. Brivas G, RES. Phagocytes in B-thalassemia and SS-anemia. *Acta Haemat.* 69, 213,(1983).
13. Bunn FH, Forget BG, Ranny HM; Human hemoglobins. WB Saunders Company Philadelphia,(1977).
14. Buchons GR, Schiffman G. Antibody response to polyvalent pneumococcal vaccine in infants with sickle-cell anemia. *The Journal of Pediatrics.*96:269,(1980).
15. De Ceulear K, Forbes M, Maude GH; Pagliucca A, Serjent GR. Complement and Immunoglobulin Levels in early Childhood in homozygous sickle-cell disease. *J.Clin. Lab. Immunol*(SCOTLAND).21(1),p.37-41, (1986).
16. De Ceulear K, et al. Recurrent infections in sickle-cell disease. *Haematological and immune Studies.Clin. Chim. Acta.*148(3),p. 161-5,(1985).
17. Fudenberg HH, et al. *Basic Clinical Immunology.*Lange. Medical Publications. California(1976).
18. Gülmezoğlu E. Bağışıklığın Temelleri. Hacettepe Üniversitesi yayınları. A/16,ANKARA(1983).

19. Hendriks J, De Ceulaer K, et al. Mononuclear cell in sickle-cell disease subpopulations and in-vitro response to mitogenes. *J.Clin Lab. Immunol.*13(3), p.125-32, (1984).
20. Hernandez P, Cruz C, Sandros MV. Immunologic disfunctions in sickle-cell anemia. *Acta.Haematol.*63. 156,(1980).
21. Kılınç Y, Kümi M, Tanyeli A, Etiz L. Orak hücre anemili ve homozigot B-thalassemiyalı hastada serum immün globulinleri ve kompleman C₃ düzeyleri. *Plastik anemi tedavi yöntemleri, hematolojide yeni gelişmeler. Symposia. S.190-91,İstanbul(1986).*
22. Kılınç Y, Kümi M, Etiz L. The rate of hemolysis during asymptomatic periods in the mild and severe form of sickle-cell disease. *Ç.Ü.Tıp Fak.Der.*8,10, (1983).
23. Kümi M, Kılınç Y, Etiz L. Hematological findings in the milds and severe form of sickle-cell disease. *Ç.Ü. Tıp Fak. Der. 7,(1982).*
24. Kümi M. Çukurova yöresinde orak hücre anemili çocukların hematolojik ve klinik görünümleri. *Ç.Ü.Tıp Fak.Der.*3,11,218(1982).
25. Lehman H, Huntsman RG. *Man's haemoglobins North-Holland Publishing Company. Amsterdam. Oxford(1974)*
26. Nagel RL, et al. Homological and genetically distinct from of sickle-cell anemia in Africa. *The new England Journal of Medicine, 312,880(1985).*
27. Notta EL, Outschorm IM. IgG₂ deficiency in sickle-cell anemia *Scand.J.Haematol.*33(2).p 129-34,(1984).

28. Ozsoylu Ş. Föetal hemoglobin levels and splenic function in sickle-cell disease. Acta Haemat.74:240-41, (1985).
29. Roitt MI, Essantial Immunology. Blackwel Scientific Publications. Second Edition. Newyork, (1974).
30. Roitt MI, Brostoff J, Male DK. Immunology. Gower Medical Publishing Newyork,(1985).
31. Sorkin E, Wilkinson PC, Leucocyte Chemotaxis Progress in Immunology 2, 341, (1974).
32. Saurez Saro JM, et al. Behavior of leucocyte Chemotaxis in various. Clinico-immunological Situations. Allergol, Immunopathol(Madr.) 13(3),p.187-92(1985).
33. Thompson RA, Techniques in clinical Immunology Blackwell Scientific publications. Second edition, London,(1981).
34. Weatheral DJ, et al: Benign Sickle-cell anemia. The Lancet. 2, 1972.
35. Wenkaterman M, Westerman MP :B-cell changes Occur in patients with sickle-cell anemia. Am.J Clin Pathol. 84(2),1985.
36. Winkestein JA and Drachman RH. Deficiency of pneumococcal serum opsonizing activity in sickle-cell disease The New England Journal of Medicine.279, 459(1968).
37. Yeğın O:Çocukluk çağında nötrofil,monosit kemotaksisin ve Random migrasyonunun gelişimi.Doçentlik Tezi(1981).
38. Zigmon SH, Hirsch JG: Leucocyte locomation and Chemotaxis new methods for evaluation and demonstration of a cell derived chemotactic factor. J.exp.Med. 387,(1973).