

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SAĞLIKLI ÇOCUKLARDA İN VİTRO LENFOSİT
FONKSİYONUNUN İKİ FARKLI YÖNTEMLE
ARAŞTIRILIP KARŞILAŞTIRILMASI**

Aybike EKİNCİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Emel BABACAN

ANKARA

2006

Sağlıklı Çocuklarda *İn vitro* Lenfosit Fonksiyonunun İki Farklı Yöntemle Araştırılıp Karşılaştırılması

ÖZET

Bu çalışma sağlıklı Türk çocuklarında ki in-vitro lenfoproliferatif yanıtın normal düzeyini belirlemek ve in-vitro lenfosit fonksiyonlarını iki farklı yöntem kullanılarak değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Çalışma materyalini Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Sosyal Pediatri Bölümü genel polikliniğine başvuran sağlıklı bebek ve çocuklar oluşturmuştur. Bu çalışma Haziran 2005 – Haziran 2006 tarihleri arasında 0-2, 2-6, 6-10 olmak üzere 3 yaş grubundaki toplam 22 sağlıklı çocukta yapılmıştır. Araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Pediatrik İmmunoloji-Allerji Bilim Dalı araştırma laboratuvarında yürütülmüş ve tüm çalışmalar burada yapılmıştır.

Alınan kan örneklerinden, T lenfositler PHA ile uyarıldıktan 24 ve 48 saat sonra, akım sitometrisi ile aktivasyon belirleyicilerinin (CD25+, CD69+) ekspresyonlarının ve 72. saat sonunda ışık mikroskobu ile lenfoproliferatif yanıtının ölçümleri yapılmıştır. Aktivasyon belirleyicilerinin zamana bağlı değişimleri tespit edilmiştir. Daha sonra iki yöntemden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yüzey belirleyicilerinin ekspresyonlarının ölçümü, Coulter EPICS-XL-MCL model akım sitometrisi cihazında, double-colour direkt immünfloresan yöntemi uygulanarak yapılmıştır.

Lenfoproliferatif yanıtın değerlendirilmesinde, 0-10 yaş arası 22 olgu 3 yaş grubuna ayrılarak incelendiğinde, tüm parametrelerin her çocuğa göre farklılık gösterdiği, zamanla ve yaşla birlikte değiştiği görülmüştür.

Çalışmamızda aktivasyon belirleyicilerinin 24. ve 48. saatlerde kendi aralarında korelasyon gösterdiği saptanmıştır. 24. saatte CD69+, 48. saatte CD25+ ekspresyonunun max. düzeye ulaştığı gözlenmiştir. Bunun yanında T lenfosit yüzey antijenlerinin ekspresyonlarının yaş arttıkça azaldığı tespit edilmiştir.

T lenfosit aktivasyon çalışmasında, değerler yaşla birlikte değişim gösterdiğinden çocuklarda hücrel immünitinin sayısal parametreleri ancak kendi yaş grubunun normalleri ile karşılaştırıldığında objektif ve sağlıklı olabilmektedir.

Çalışılan örnek sayısının az olmasından dolayı, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiş ve sağlıklı çocuk yaş gruplarının normal değerleri belirlenememiştir. Akım sitometrisi ile morfolojik yöntem arasında da anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır. Sonuçta her iki yöntemde kullanılabileceği, akım sitometrik yöntemin daha hızlı sonuç verdiği belirlenmiştir. Ancak daha anlamlı sonuçlara ulaşılabilmesi ve bu çalışmanın standardize edilebilmesi için daha fazla örnekle yapılan daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler : CD25+, CD69+, Lenfosit aktivasyonu, Lenfoproliferatif Yanıt,

Evaluation and Comparison of Peripherale Blood Lymphocyte Functions in Healty Children by Using Two Different Methods

ABSTRACT

The aim of this study is to determine normal levels of *in vitro* lymphoproliferative response in Turkish infants and to study *in vitro* functions of lymphocytes by using two different methods.

Study material was composed of healty babies and infants who applied to Ankara University Medical School Department of Pediatrics Division of Social Pediatrics. This study including 22 healty infants with three different age groups which are 2, 2-6 and 6-10 was perfomed between June 2005- June 2006.

After 24 and 48 hours of T lymphocytes induction by PHA, expression of activation markers (CD25+, CD69+) was measured by flow cytometry and at the end of 72nd hour, lymphoproliferative response was measured by light microscope. The changes in activation markers were measured by time, then, the results of the two methods were compared. Double colour direct immunofluorescence method was used to measure expression of surface markers by Coulter EPICS-XL-MCL flow cytometry. When the 22 cases in 0-10 age group, were divided into three sub-goups, it was observed that all parameters differed with respect to every infant and changed with age.

In our study, it was shown that the activation markers were in correlation with each others at the 24th and 28th hours. It was observed that the expression levels of CD69+ and CD25+ reached to maximum levels at 24th and 28th hours, respectively. Moreover, the expression of T lymphocyte surface antigens were decreasing as the age increased.

In the T lymphocyte activation study, since the values were changing with respect to age, the numerical parameters of cellular immunity in infants were objective and reliable only when compared with the normal levels of their age group.

However, no statistically significant result was found due to small population size of our samples and the normal values of healthy infant age groups were not determined. Furthermore, no significant correlation between flow cytometry and morphological method was found. As a result, it was found that both methods are applicable, and flow cytometry methods give faster results. However, more comprehensive studies with larger sample size were required in order to reach significant results and standardise this method.

Key Words : CD25+, CD69+, Lymphocyte activation, Lymphoproliferative response

İÇİNDEKİLER

Özet	i
Abstract	iii
Teşekkür	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Genel Bilgi	1
1.1.1. Doğal immünite	3
1.1.2. Kazanılmış immünite	3
1.2. İmmün sistemde görevli organlar	6
1.3. İmmün sistemde görevli hücreler	7
1.4. Lenfositler	8
1.4.1. Lenfositlerin gelişim aşamaları	9
1.4.2. Lenfosit olgunlaşması	11
1.5. B lenfositler	12
1.6. T lenfositler	13
1.6.1. Yardımcı ve baskılayıcı T lenfositler	14
1.6.2. Sitolitik T lenfositler	17
1.7. T Hücre Reseptörü	17
1.8. Antijen İşlenmesi ve Sunulması	18
1.9. T Lenfositlerin Aksesuar Molekülleri	19
1.10. CD4+/CD8+	20
1.11. T lenfositler tarafından antijen tanınması	20
1.12. Lenfosit aktivasyonu	21
1.12.1. T lenfositlerin aktivasyonu	22
1.12.2. Sitokin sekresyonu	23
1.12.3. Çoğalma	26

1.12.4. Efektör hücrelere farklılaşma	26
1.12.5. T lenfosit yanıtının azalması	27
1.12.6. Bellek hücrelere farklılaşma	28
1.12.7. T lenfosit aktivasyonunda yardımcı uyaranların rolü	28
1.12.8. T lenfosit reseptör kompleksi tarafından sinyal iletimi	29
2. MATERYAL VE METODLAR	33
2.1. Materyal	33
2.1. Çalışma Gruplarının seçimi	33
2.1.2. Kan örneklerinin toplanması	33
2.1.3. Kullanılan malzeme ve cihazlar	34
2.2. Metod	34
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	37
3.1. CD3+25+ T lenfositlerin 24. ve 48. saatlerdeki % ve Mnx Median,alt-üst sınır değerleri	44
3.2. CD3+69+ T lenfositlerin 24. ve 48. saatlerdeki % ve Mnx Median,alt-üst sınır değerleri	45
3.3. CD25+ T lenfositlerin 24. ve 48. saatlerdeki % ve Mnx Median,alt-üst sınır değerleri	46
3.4. CD69+ T lenfositlerin 24. ve 48. saatlerdeki % ve Mnx Median,alt-üst sınır değerleri	47
3.5. CD3+ T lenfositlerin 24. saatte % ve Mnx Median,alt-üst sınır değerleri	48
3.6. PHA ile uyarılmış T lenfositlerin 72. saatte % Median, alt-üst sınır değerleri	49
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR	58

TEŞEKKÜR

Sağlıklı çocuklarda in-vitro lenfosit fonksiyonlarının farklı yöntemler kullanılarak değerlendirilmesini ve Türk çocuklarındaki in-vitro lenfoproliferatif yanıtın normal düzeyinin belirlenmesini amaçlayan bu çalışma Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından.2005-189 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Tez çalışmam sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen, araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında bana bilimsel katkılarıyla destek olan, laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan A.Ü. Tıp Fak. Pediatrik İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Emel Babacan, Prof. Dr. Aydan İkinciogulları ve Doç. Dr. Figen Doğu'ya, emeği geçen laboratuvar çalışanları ve doktorlara, ayrıca çalışmalarım sırasında büyük sabır gösteren, bana destek olan arkadaşlarıma ve aileme teşekkür ederim.

Biyolog Aybike Ekinci

Ankara, Eylül 2006

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	Antijen Presenting Cell (Antijen Sunan Hücre)
CD	Clauster of Differentiation
Con A	Concavalin A
CTL	Sitolitik T lenfositleri
CSF	Koloni Stimülasyon Faktörler
IFN	Interferon
IL	İnterlökin
ITAM	Immunoreseptor tyrosine-based activation motif
LFA	Lymphocyte Function Associated Antigen (Lenfosit Fonksiyonu ile İlişkili Antijen)
LAK	Lymphokine activated Killer
MHC	Majör Histokompatibility Complex (Büyük doku uygunluk kompleksi)
MoAb	Monoklonal Antikor
NK	Natural Killer (Doğal Öldürücü) Hücreler
PCK	Protein Kinaz C
PHA	Phytohemaglutinin
PNL	Polimorfonükleer lökositler
PTK	Protein Tirozin Kinazların
PWM	Pokeweed Mitojen
Th	Yardımcı T Lenfosit
Tc	Sitotoksik T Lenfosit
TCR	T Hücre Reseptörü
TNF	Tümör Nekroz Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Humoral ve hücresele immünite

Şekil 1.2. İmmün sistem organları

Şekil1.3.Kemik iliğinde lenfositlerin farklılaşması

Şekil 1.4. Lenfositlerin farklılaşma ve olgunlaşmaları

Şekil 1.5. Th lenfositler

Şekil 1.6. T lenfosit aktivasyonu

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1 Humoral ve hücresele immünite arasındaki farklar

Çizelge 2.1 Çalışmayı oluşturan bebek ve çocukların yaş grupları

Çizelge 3.1 Sağlıklı bebek ve çocuk gruplarının yaş ve cinsiyet dağılımları

Çizelge 3.2 0-2 yaş grubu çocuklarda aktivasyon belirleyicilerinin 24. ve 48. saatlerdeki ekspresyonlarının değerleri

Çizelge 3.3 2-6 yaş grubu çocuklarda aktivasyon belirleyicilerinin 24. ve 48. saatlerdeki ekspresyonlarının değerleri

Çizelge 3.4 6-10 yaş grubu çocuklarda aktivasyon belirleyicilerinin 24. ve 48. saatlerdeki ekspresyonlarının değerleri

Çizelge 3.5 0-2 yaş grubunun median ve alt-üst sınır değerleri

Çizelge 3.6 2-6 yaş grubunun median ve alt-üst sınır değerleri

Çizelge 3.7 6-10 yaş grubu ve total median, alt-üst sınır değerleri

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İmmünite canlı organizmanın kendine yabancı olan maddeleri (mikroorganizma, antijen vb) tanıyarak etkisiz hale getirebilme ve/veya yok edebilme yeteneğidir. Organizma bu işlevini immün sistemi ile gerçekleştirir. T lenfositler immün yanıtın en önemli hücresel kompartmanını oluşturup spesifik immün yanıt gelişiminde rol oynayan hücrelerdir.

Lenfositler sadece özgün sinyallere yanıt vererek prolifer olurlar. Proliferasyon T lenfosit antijen reseptörlerine, antijen sunan hücre yüzeyindeki MHC sınıf I ve sınıf II ile sunulan yabancı peptitlerin bağlanması ile başlar. T lenfosit antijen reseptörleri sinyalleri nükleusa iletir. Sonuçta gen transkripsiyonu, sitokin üretimi ve hücre bölünmesi başlar. Bu şekildeki proliferasyon yanıtı lenfositlerin immünolojik fonksiyonlarının temeli olup, normal immün yanıtın pek çok aşamasını içermektedir. Bu nedenle proliferasyon (veya blastogenezis) ölçümü klinik immünolojide yaygın kullanım alanı bulmuştur. T lenfositlerin aktivasyonu değişik mitojen, antijen veya monoklonal antikorlar ile stimülasyon sonrasında değerlendirilebilir. (1,12,29,46,61)

T lenfosit aktivasyonu immün yanıtın gelişmesinde önemli bir basamaktır ve klinik olarak immün kompetensin değerlendirilmesinde kullanılır.(18)

T lenfosit aktivasyonu yönteminde antijen, mitojen ya da monoklonal antikorlar ile uyarılmış T lenfositlerin in-vitro fonksiyonel kapasitesi değerlendirilir. Bunun için genel olarak stimülasyon sonrası eksprese olan yüzey proteinleri ve reseptörlerinin yoğunluğunun belirlenmesi ya da T lenfositlerin proliferatif yanıtının ölçümü kullanılır.(34)

Hücrelerin morfolojik özellikleri ışık mikroskopları kullanılarak belirlenebilir. Ancak ışık mikroskobu bu çok sayıdaki hücrenin hızlı bir şekilde değerlendirilmesi için uygun değildir. Kaldı ki yorucu olması ve sonuçların subjektif olabilmesi şeklinde dezavantajlara sahiptir.(23,58)

Günümüzde akım sitometrilerinin tıpta kullanım alanına girmesiyle çok sayıda hücrenin fiziksel ve biyolojik özelliklerinin kantitatif ve kalitatif ölçümlerinin hızlı, doğru ve hassas olarak yapılabilmesi mümkün olmuştur. Bu yöntem ile çok sayıda hücrede aynı anda birçok parametre objektif olarak değerlendirilebilmektedir. Bu sistem, süspansiyon halindeki hücrelerde yüzey antijenlerinin belirlenmesi, B hücreleri ile T lenfosit alt gruplarının tayini, lösemi ve lenfoma tipleni, DNA analizi, fagositoz, otoantikör tayini ve kromozom analizi gibi birçok konuda kullanılmaktadır.(23,58)

Bu çalışmada amaç; yaşları (0-2), (2-6), (6-10) arası değişen sağlıklı çocuklarda,

- T lenfositlerin fitohemaglutinin (PHA) ile uyarılarak 24. ve 48. saatlerdeki CD25+ve CD69+ ekspresyonları ile 72. saat sonunda lenfoproliferatif yanıtının ışık mikroskopuyla ölçülmesi,
- CD25+, CD69+ gibi aktivasyon markerlarının zamana bağlı 24. ve 48. saatlerde ekspresyonlarının akım sitometrisi cihazı ile tespit edilmesi,
- Elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıdır.

Böylece sağlıklı çocuklarda in-vitro lenfosit fonksiyonları farklı yöntemler kullanılarak değerlendirilmiş olacaktır. Ayrıca bu çalışma ile Türk çocuklarındaki in-vitro lenfoproliferatif yanıtın normal düzeyinin belirlenmesine katkıda bulunulacaktır.

1.1. GENEL BİLGİ

İmmünite organizmanın kendisine yabancı olan çevresel ajanlara karşı kendisini korumak amacı ile geliştirdiği ve kullandığı mekanizmaların tümüdür. İmmünite immün sistemde oluşan immün yanıt sayesinde şekillenir. İmmün yanıt, kendisine yabancı molekülleri-antijenleri kusursuz ve spesifik olarak tanıyıp tepki verme, yani yok etme yeteneği; immün sistem ise, bu yanıtı oluşturma ile görevli organ ve hücre serilerinden oluşmuş yapı olarak tanımlanır.

İmmün sistemi vücudun diğer savunma mekanizmalarından ayıran üç önemli özelliği; özgül olması, kendinden olanı ve olmayanı ayırt edebilmesi ve belleğinin olmasıdır. İmmün yanıt immün sistemin değişik kompartmanlarının karşılıklı ve düzenli etkileşimi sonucu ortaya çıkar. İmmün sistem başlıca iki bölümde incelenebilir;

- Doğal immünite
- Kazanılmış immünite

1.1.1. Doğal İmmünite

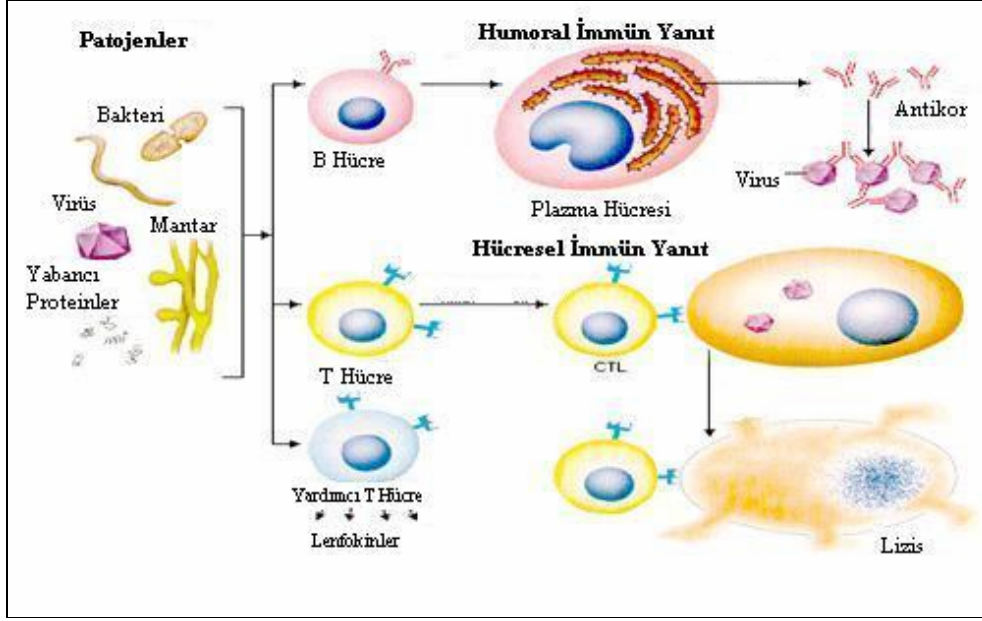
Konakçının daha önce hiç karşılaşmadığı yabancı maddeye (mikroorganizma, antijen , vb) karşı gösterdiği savunma mekanizmalarıdır.Doğum ile birlikte kazanılır, organizmayı yabancı ajanlara karşı korumada en erken ve ilk sırada rol oynayan elemanlardan oluşur. Deri ve mukoz membranların fiziksel ve kimyasal bariyerleri (cilt,mukoz membranlar,mide pH'ı,mukus salgısı ve antimikrobial kimyasal yapılar), kan ve dokulardaki fagositik hücreler (makrofajlar, monositler, nötrofiller , eozinofiller), doğal öldürücü hücreler(Natural killer-NK), akut faz proteinleri ve kompleman sistemi doğal immünitenin başlıca elemanlarıdır .(1,50,52,62,64)

1.1.2. Kazanılmış İmmünite

Başlıca T ve B lenfositler tarafından gerçekleştirilir ve konakçının daha önce karşılaştığı ve onun hakkındaki bilgileri belleğine geçirdiği yabancı bir maddeye karşı özgül olarak geliştirdiği savunma mekanizmasıdır. Doğal immünite ile korunma sağlanamazsa, yani savunma yetersiz kalırsa kazanılmış immünite aktive olur ve devreye girer. Kişinin bir ajanla daha önce karşılaşmış olması kazanılmış immün yanıtın gelişebilmesi için gereklidir. Bu sayede spesifik bellek yerleşir ve aynı ajanla tekrar karşılaşıldığında daha güçlü ve etkili bir yanıt oluşur. (50,51)

Kazanılmış immün yanıtın; başlangıç ve efektör faz olmak üzere iki komponenti vardır. Yabancı antijenin tanınması ve bu antijene yanıt oluşturabilecek lenfosit klonlarının çoğalması başlangıç fazını oluşturur. Tanınan antijenin etkisiz hale getirilip ortadan kaldırılmasını sağlayan sistemlerin aktivasyonu ise efektör fazdır. Kazanılmış immün yanıtın başlangıç fazında T lenfositler, B lenfositler ve makrofajlar; efektör fazında ise polimorfonükleer lökositler (PNL), makrofajlar ve mast hücreleri rol oynarlar ve kazanılmış immünitenin hücrel kolunu oluştururlar. Makrofajlar ve B lenfositler, yabancı antijeni işlemde geçirip T lenfositlerin tanıyabileceği bir duruma getirdikten sonra T lenfositlere sunarlar. T lenfositlerce tanınan yabancı antijen, PNL ve sitotoksik hücreler sayesinde yok edilir. Lenfositlerin antijenleri tekrar karşılaştıklarında hatırlamalarını sağlayan özgünlük ve bellek yetenekleri kazanılmış hücrel immün yanıtın temel taşlarıdır. (50,52,63)

Kazanılmış immünite, humoral ve hücrel immün yanıt olarak ikiye ayrılır.



Şekil 1.1. Humoral ve hücresel immünite

Humoral İmmün Yanıt; B lenfositlerin uyarılması ile başlar, antikor üretimi ile sonuçlanır.

Hücresel İmmün Yanıt; T lenfositlerin uyarılması ile gelişir, çeşitli efektör hücrelerin aktivasyonu ile sonuçlanır. (Şekil 1.1)(Tablo 1.1)(27)

Tablo 1.1. Humoral ve hücresel immünite arasındaki farklar

	Humoral İmmün Yanıt	Hücresel İmmün Yanıt
Uyaran Antijenler	Hücre dışı mikroorganizmalar Hücre dışı antijenik moleküller	Hücre içi mikroorganizmalar Hücre içi antijen molekülleri
Antijen Yapısı	Protein Karbonhidrat	Protein
Yanıt veren Hücre	B Lenfosit	T lenfosit
Efektör Elemanlar	Antikor Kompleman	Sitotoksik T Lenfosit Aktive makrofaj Aktive NK hücreleri
Efektör mekanizma	Nötralizasyon Eliminasyon	Sitotoksite Fagositoz

1.2. İmmün Sistemde Görevli Organlar

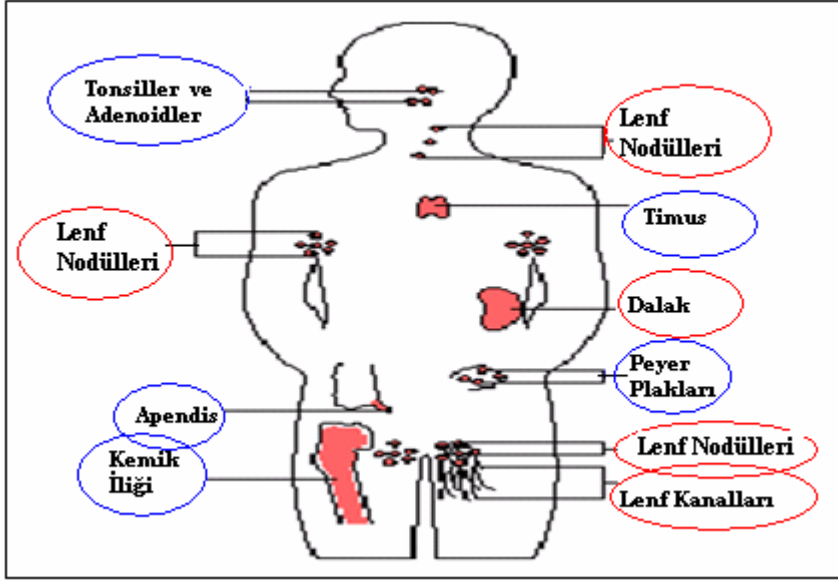
İmmün yanıtın oluşmasından organizmadaki belli başlı bazı sistemler, organlar ve hücreler sorumludur.(13) Lenfoid organlar, immün sistemde görevli organlardır.İmmün yanıtı oluşturan hücrelerin olgunlaştığı organlara primer, immün yanıtın oluştuğu organlara ise sekonder lenfoid organlar denir. (Şekil 1.2)(59)

Primer lenfoid organlar, lenfositlerin ilk olarak antijen reseptörlerinin oluştuğu, fonksiyonel ve fenotipik olgunluk kazandığı organlardır.(7) Lenfositlerin oluşturulmasından, gelişiminden, değişiminden ve immünite ile ilgili temel özelliklerin yüklenmesinden sorumlu olurlar. (25)

Primer lenfoid organlar, yaşam boyu kök hücreden T, B lenfosit farklılaşmasını sağlarlar ve hergün 10^6 lenfosit üreterek dolaşıma gönderirler. Bu organlar başlıca kemik iliği (B lenfositler) ve timustur (T lenfositler). (10,30,31,43)

Sekonder lenfoid organlar, lenfositlerde yabancı antijenlere karşı yanıtın başladığı ve geliştiği organlardır. (7) Bunlar, primer lenfoid dokularda farklılaşarak dolaşıma geçen T ve B tipi lenfositlerin yerleştiği, makrofaj, T ve B lenfositlerin birbirleriyle ilişki kurduğu ve immün yanıtın oluştuğu organlardır.

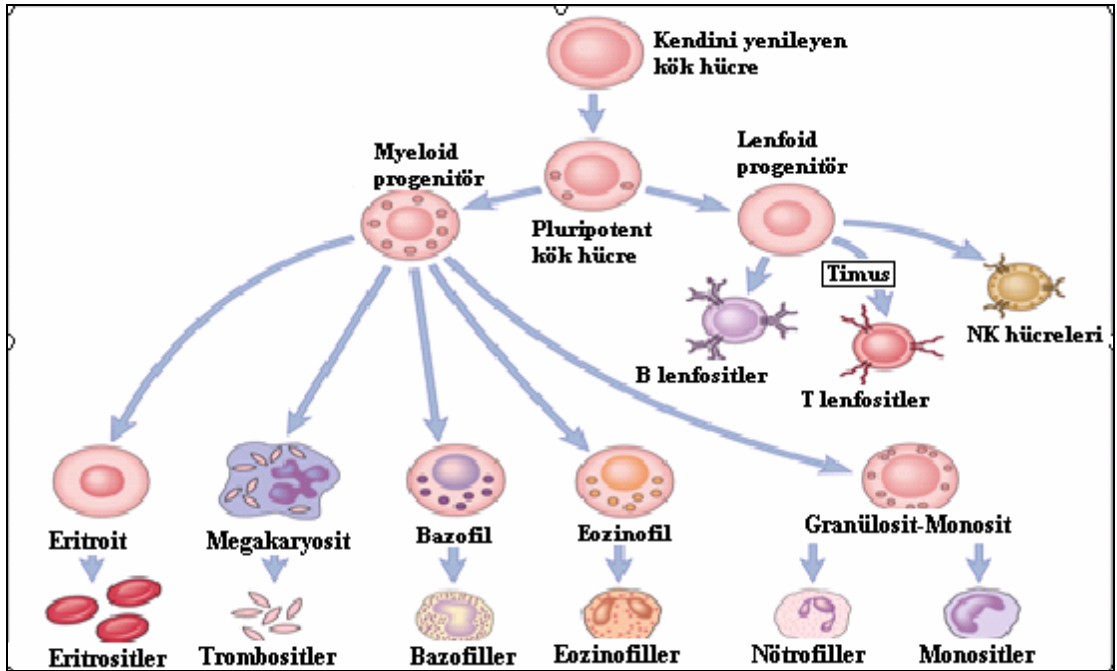
Sekonder Lenfoid Organlar, antijene karşı immün yanıtın geliştirilmesinden sorumlu olup immün yanıt reaksiyonları için uygun ortam sağlarlar. (25) Bu organlar başlıca; dalak, lenf nodülleri, mukozal lenf dokudur.



Şekil1.2. İmmün sistem organları

1.3. İmmün Sistemde Görevli Hücreler

Vücut savunması ile direk veya dolaylı ilişkili hücrelerin tümü “immün sistem hücreleri” olarak nitelendirilir. Kemik iliğinde yapılan hücrelerin lenfoid serisinden lenfositler, myeloid serisinden fagositer hücreler ve diğer hücre tipleri gelişmektedir. (Şekil1.3)(7,25,47)



Şekil 1.3. Kemik iliğinde lenfositlerin farklılaşması

1.4. Lenfositler

Vücutta farklı antijenik determinantları tanıyabilen ve ayırt edebilen tek hücre tipidir. Bu sebeple kazanılmış immün yanıtın iki belirleyici karakteristik özelliği olan spesifite ve bellekten sorumludur.

Lenfositler, primer lenfoid organlarda oluştuktan sonra, bazıları kan sirkülasyonu yoluyla dalak, lenf düğümleri, tonsiller ve mukoza altı lenfoid dokular gibi sekonder lenfoid dokulara göç ederler. Erişkin bir insanda, ortalama olarak 10^{12} lenfoid hücre ve toplam vücut ağırlığının %2'si kadar da lenfoid doku bulunmaktadır. Sirkülasyonda bulunan kan hücreleri içindeki toplam lökositlerin %20' si lenfositlerdir.(7,59)

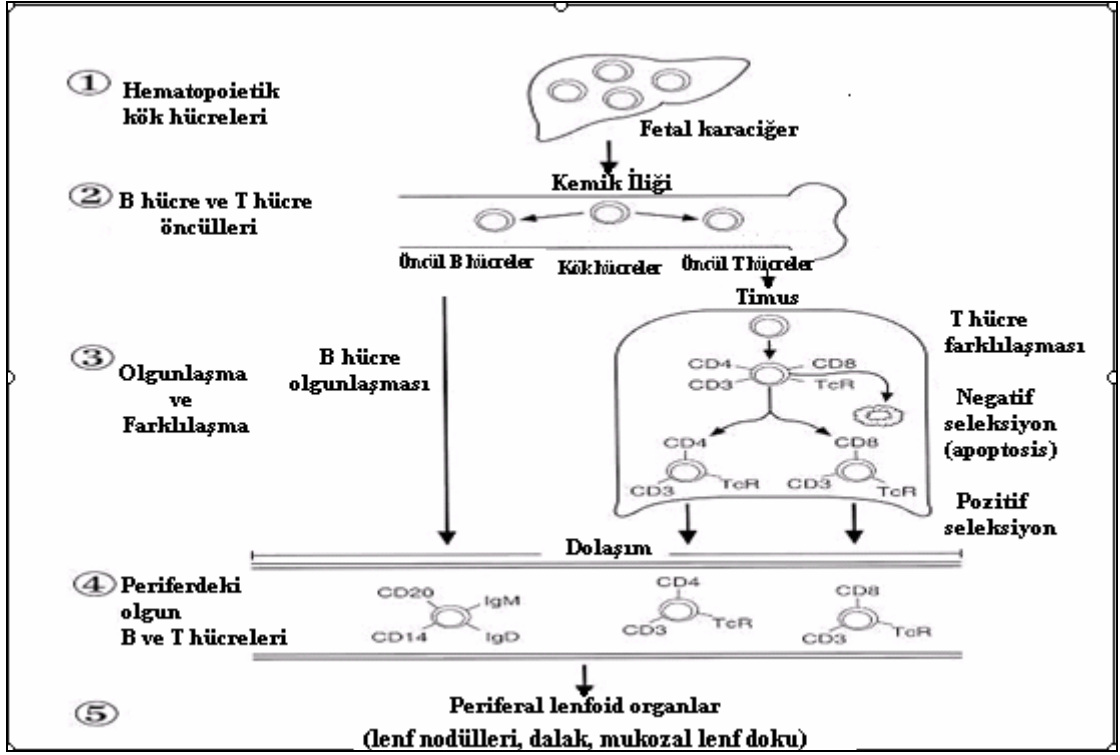
Deneyimsiz lenfositler; antijenle karşılaşmamış lenfositlerdir. 8-10 μm çapında, büyük bir nükleus, dar bir sitoplazma ve yoğun heterokromatine sahiptirler. Birkaç mitokondri, ribozom ve lizozomları vardır. Ancak spesifik organelleri yoktur. Antijenik uyarımdan önce lenfositler dinlenme halinde ya da siklusun G_0 fazındadır. Stimülasyona yanıt olarak G_1 fazına geçerler. Büyürler (10-12 μm). Daha çok sitoplazma, sitoplazmik RNA ve organeler sahip olurlar. Bu lenfositler büyük lenfosit ya da lenfoblast adını alırlar. Lenfositler; T ve B lenfositler olmak üzere fonksiyonları ve protein ürünleri farklı ancak morfolojik olarak ayırt edilmeyen alt gruplara ayrılırlar.

Arter dolaşımıyla dokulara dağılan lenfositler, dokularda lenf damarlarıyla lenf düğümlerine, ductus thoracicus ve oradan venöz dolaşıma geçerler. Lenf düğümlerinin germinal merkezlerinde B, parakortikal bölgede T lenfositler yer almaktadır. B lenfositlerin çoğu ve T lenfositlerden kısa ömürlü olanlar dokularda kalmaktadır. B lenfositlerin az bir kısmı ve T lenfositlerin uzun ömürlü olanları periferik kana geçerler. (59)

Lenfositlerin farklı dokularda kalmaları da yüzey antijenleri ile ilgilidir. Monoklonal antikörlerin rutin olarak kullanıma girmesiyle, lenfositlerin yüzeyinde bulunan antijenlerin tanınması mümkün olmuştur. Bu yüzey antijenleri immün hücrelerde doğal olarak bulunmakta veya hücre aktivasyonundan sonra hücre yüzeyinde eksprese edilmektedir. Önceleri bu antijenler, molekül ağırlıkları ve biyolojik özellikleri göz önüne alınarak farklı şekillerde adlandırılırken son yıllarda geliştirilen CD sistemi (Clusters of Differentiation) sayesinde terminoloji sadeleşmiş ve bu antijenleri tanımada ortak bir dil (CD) kullanılır hale gelmiştir. (15,21,24,36,48,55)

1.4.1. Lenfositlerin Gelişim Aşamaları

Tüm kan hücreleri gibi lenfositlerde kemik iliğindeki kök hücrelerin farklılaşması ile oluşurlar. Bu gelişme sonunda T lenfositler ve B lenfositler ortaya çıkarlar. B lenfositleri kemik iliğinde olgunlaşırlar. T lenfositler henüz olgunlaşmamış T öncül hücreleri iken kemik iliğini terk ederler. Kan yolu ile timüs'e geçerek orada çoğalır ve farklılaşırlar. Burada bazı yüzey antijenlerini kaybedip bazılarını kazanarak olgun T lenfositlerini oluştururlar. Olgunlaşan ve henüz hiçbir immünolojik uyarı almamış deneyimsiz T ve B hücreleri, aktivasyon yapabilecek yabancı maddelerle karşılaşma olasılığı yüksek olan lenf bezleri, dalak gibi sekonder lenfoid organlara yerleşirler. (Şekil 1.4)(10,30,31,37,43)



Şekil 1.4. Lenfositlerin farklılaşma ve olgunlaşmaları

Kazanılmış immün yanıtta; deneyimsiz (naive) lenfositler antijenler tarafından aktive edilirler, çoğalırlar, efektör ve bellek hücrelerine farklılaşırlar. Bu lenfositlerin fonksiyonu antijenleri tanıyıp kazanılmış immün yanıtı başlatmaktır. Deneyimsiz lenfositler, daha önce uyarılmış ve bellek hücrelerinden farklı hücre yüzey antijenleri taşırlar. Deneyimsiz lenfositler antijenle karşılaşmadıklarında apoptosisle yok olurlar.

Deneyimsiz lenfositler üzerindeki reseptörler, antijenin tanınması ve bu yolla efektör hücreye farklılaşmadan sorumlu olmanın yanında antijenle karşılaşmayan hücrenin hayatta kalmasından da sorumludur.(7)

Deneyimsiz lenfositler antijeni spesifik olarak tanıyabilir ve ikinci bir uyarım aldıklarında (periferel lenfoid organlarda) çoğalarak efektör hücrelere farklılaşabilirler. Farklılaşmış yardımcı T lenfositlerinin (Th) yüzey antijenleri diğer hücreler üzerindeki ligandlarla etkileşir ve salgıladıkları sitokinlerle bunları aktive ederler. Sitolitik T lenfositleri (Tc); içinde proteinlerin yer aldığı granüller taşırlar. Bunlar virus infekte ve tümör hücrelerini lizise uğrattırlar.(7,13,59)

Bellek hücreleri, deneyimsiz lenfositlerin antijenle uyarımı sonucu oluşurlar. Antijen eliminasyonunda yıllar sonra bile sessiz formda hayatta kalabilirler. Bu hücreler deneyimsiz T lenfositleri ve antijenle aktivasyon ile farklılaşmış efektör hücrelerin taşıdığı yüzey antijenlerinden farklı antijenler taşırlar.

Bellek T lenfositler deneyimsiz formlarıyla karşılaştırıldığında daha fazla adhezyon molekülü (ör; integrinler, CD44) taşırlar. Bunlar, bellek hücrelerinin, vücuttaki infeksiyon bölgesine göçünü indüklerler.

İnsanlarda deneyimsiz T lenfositlerin çoğu; CD45 yüzey molekülünün 200 kD'luk izoformunu taşırlar (CD45RA). Bu izoform A ekzonu tarafından kodlanan bir segment içerir.

Birçok aktive ve bellek T lenfosit ise, CD45'in 180-kD'luk izoformunu taşır (CD45RO). Bu izoformda A ekzonu splicing işlemi ile çıkarılmıştır.

Lenfositler, farklı reseptörler taşımaları nedeniyle grup ve alt gruplara ayrılmaktadır. bunlar fonksiyonları ve protein ürünleri farklı ancak morfolojik olarak ayırt edilemeyen alt gruplardır.(7,59)

1.4.3. Lenfosit Olgunlaşması

Kemik iliği kökenli lenfosit öncüllerinin, periferel lenfoid dokularda yer alan olgun lenfositlere dönüşümüne "lenfosit olgunlaşması" adı verilir.

Lenfositler, yüzeylerinde oldukça farklı antijen reseptörleri taşırlar. Bu farklılık öncül hücrelerden olgun B ve T lenfositlerinin gelişimi boyunca oluşur. B ve T lenfosit yüzeyindeki farklı spesifiteye sahip antijen reseptörlerinin tümü "lenfosit repertuarını" oluşturur. (5,7,59)

Fonksiyonel antijen reseptör genlerinin oluşturulması kemik iliğinde olgunlaşmamış B hücrelerinde ve timusta gelişen T lenfositlerde olur. Fonksiyonel Ig genleri yalnız B lenfositlerde fonksiyonel TCR genleri ise yalnız T lenfositlerde oluşturulur.

Antijen reseptörleri antijen ile karşılaşmadan eksprese edilir. Bu reseptörler olgunlaşmanın farklı safhalarındaki lenfositlere sinyalleri iletirler. Bu sinyaller hücrelerin hayatta kalmasını indükler, hücrelerin proliferasyonunu ve olgunlaşmaya devamını stimüle eder. (5)

Lenfositler; T lenfositler ve B lenfositler olmak üzere iki gruba ayrılırlar

1.5. B Lenfositler

B lenfositler antikor üretebilen lenfositlerdir. B lenfositlerinin sebebi bunların ilk defa kuşlarda “bursa of fabricius” adlı organda olgun hale geldiklerinin keşfedilmesidir. Memelilerde bu organın karşılığı yoktur. B hücre olgunlaşmasının erken safhaları kemik iliğinde gerçekleşir.(7)

İnsan ve memeli hayvanlarda B lenfositlerinin olgunlaştığı organların başında kemik iliğindeki hematopoetik adacıkları ve fetal karaciğer gibi organlar gelir. Bu şekilde olgunlaşan B lenfositleri hem bu oluştukları organlarda hem de periferik kandaki, lenf dokusundaki foliküllerin germinal merkezinde ve dalakta bulunurlar. Çevre kanındaki küçük lenfositlerin % 20'si, dalaktakilerin % 35'i B lenfositlerdir. B lenfositlerin yaşamı birkaç gün veya birkaç hafta sürece kadar kısadır. En önemli özellikleri yüzeylerinde çok sayıda (hücre başına 1.5×10^5) immünoglobulin (çoğu IgM) molekülleri taşımalarıdır. Bu yüzden elektron mikroskopta yüzey görünimleri T lenfositlerinin aksine düzgün değil pürüklüdür. Genellikle bir lenfositte bir sınıfa ait (IgM, IgG, IgA vb.) immünoglobulin bulunursa da bazen birkaçı bir arada bulunabilir. B lenfositler yüzeyindeki immünoglobulin molekülleri aynı zamanda antijenlere karşı özgül reseptörlerdir. B lenfositleri yaşamları boyunca yalnız bir tek antijene veya benzer nitelikteki bir grup antijenlere karşı özgül işlev yapan

reseptörler taşırlar. Olgunlaşan B lenfositleri ileride karşılaşma olasılığı olan binlerce antijene karşı özgül reseptörler taşıyan binlerce lenfosit grubu meydana getirecek şekilde olgunlaşırlar. İmmünoglobulin yapısındaki bu reseptörlerin her ayrı antijen için ayrı yapıda olmaları T lenfositlerindeki heterodimer reseptörlerin oluşturulmasına benzer bir genetik düzen ile sağlanır. Antijenlere özgül bu reseptörlerden başka B lenfositlerde çeşitli yüzey antijenleri bulunur. Bunlardan HLA-DR molekülleri B lenfosit yüzeyinde eksprese edilir ve APC ile Th lenfositler arasındaki ilişkide rol oynar. (13,27)

B lenfositleri antijen uyarımı karşısında lenfoblastlara ve plazma hücrelerine dönüşerek çoğalırlar. Aynı zamanda uzun ömürlü bellek B lenfositleri oluşur. Plazma hücreleri, antikorların (immünoglobulinlerin) oluşmasında görev alan hücrelerdir. B lenfositlerinin antikor oluşturmak dışında iki önemli görevi daha vardır. Bunlardan birisi T lenfositlerine antijen sunma görevi, diğeri de saldıkları lenfokinlerle başka immünolojik hücreleri etkilemektir. (27)

1.6. T Lenfositler

T lenfositler, protein antijenlere karşı gelişen kazanılmış immün yanıtta anahtar rol oynayan hücrelerdir. Fetal karaciğer ve yetişkin kemik iliğinden gelen hematopoetik kök hücre öncüllerinden köken alır, daha sonra timusa göç ederler. İnsanlarda olgunlaşmamış lenfositler timusta ilk olarak hamileliğin yaklaşık 7 yada 8. haftalarında görülür. (5,7,59)

Timusa gelen öncü T hücreleri, timusun kontrolünde olgunlaşmaktadır. Timus içerisinde iken T hücrelere timosit adı verilir. Timositler, timusun subkapsüler boşluğunda ve dış kortikal bölgede yer alır, buradan kortekse doğru göç ederler. Korteks; olgunlaşma işlemlerinin çoğunun gerçekleştiği bölgedir. (15)

Olgunlaşmamış T hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması timusta olmakta ve hücre yüzeyinde pekçok reseptör kazanmaktadır. Olgunlaşmamış timositlerin çoğu

TCR yada CD4+, CD8+ koreseptörleri taşımaz. Kortekste timositler ilk olarak TCR ekspresyon ederler ve CD4+ MHC sınıf II sınırlı, CD8+ MHC sınıf I sınırlı T lenfositlere dönüşürler.(5)

Timositlerin ancak %2'si reseptör kazanarak perifere salınmakta diğerleri ölmektedir. Timositler olgunlaşmanın son safhasına giderken, korteksten medullaya göç ederler ve timusu lenfatikler ya da venler yoluyla terk ederler.(7)

T lenfositlerin yanıtı olgunlaşmanın evresine ve hücrelerin aktivasyonuna göre değişiklik gösterir. Olgunlaşmamış timositler tarafından antijen tanınması negatif seleksiyon (hücre ölümüne) ve pozitif seleksiyona (hücre yaşamına) da neden olur. Bellek ve efektör T lenfositler, deneyimsiz T lenfositlerle karşılaştırıldığında aktivasyon için düşük eşik değerine sahiptir ve olgun dendritik hücreler dışındaki APC'ler tarafından sunulan antijenlere de yanıt verirler. Böylece, bellek ve efektör T lenfositler lenfoid organlar dışındaki periferik dokularda da aktifleştirilebilir. Eğer yakın zamanda aktifleşen T lenfositler antijenle tekrar uyarılırsa, bazı hücreler apoptoza uğrar. Bu olay aktivasyonun sebep olduğu hücre ölümü olarak adlandırılır ve self-toleransı sağlamada önemlidir. (8)

Timik çevre; timositlerin proliferasyonu ve olgunlaşması için gerekli olan stimülasyonu sağlar. Bu stimülasyonun bazıları timusta bulunan timositlerin dışındaki hücrelerden gelir. Bunlar timik epitelial hücreler, kemik iliği kökenli makrofajlar ve dendritik hücrelerdir.(4,5)

T lenfositlerin alt grupları; yardımcı T lenfositler (Th), baskılayıcı T lenfositler (Ts), sitolitik T lenfositler (Tc) dir.

1.6.1. Yardımcı ve Baskılayıcı T Lenfositler

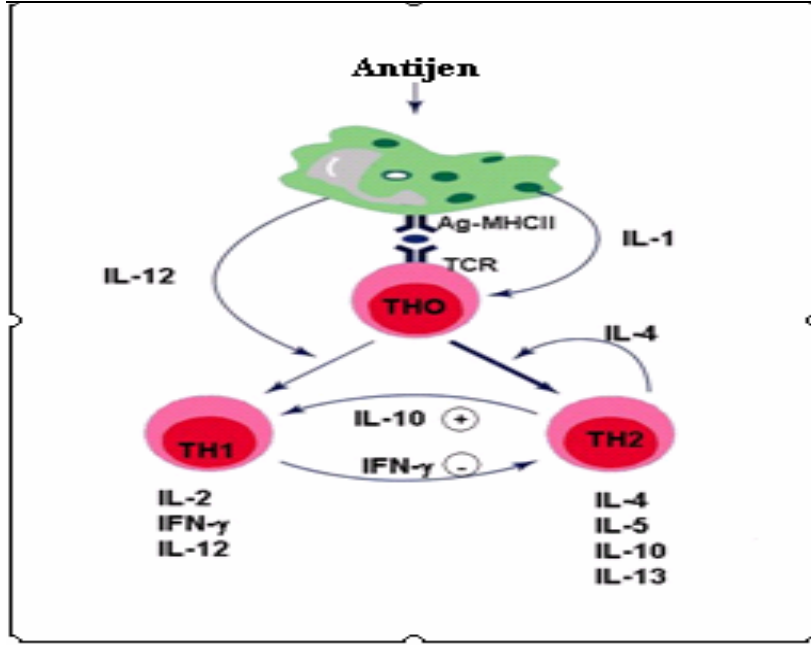
T lenfositlerinden bir kısmı aktivatör, diğer bir kısmı ise baskılayıcı etki göstererek immün yanıtı düzenlerler. Yardımcı T lenfositler (Th) aktivatör, baskılayıcı T

lenfositler (Ts) ise Th ve B lenfositlerin fonksiyonlarını baskılayan lenfositlerdir. (13,59)

Th lenfositlerinin görevi; timusa bağımlı antijenlerin uyarımı karşısında B lenfositlerine yardım ederek, onların plazma hücrelerine dönüşmesini ve immün yanıt ürünü olan antikor sentezlemelerini sağlamak, sitolitik T lenfositleri (Tc) ile Ts lenfositlerini uyarmaktır. Aktivatör etkili T lenfositler, öncül T lenfositlerden fonksiyonel T lenfositler haline gelinceye kadar farklılaşmaları başlatmaktadır. Th lenfositlerin hücre membranında CD4+ reseptörü bulunur. Th lenfositlerin CD4+ reseptörleri ile APC yüzeyindeki MHC sınıf II molekülleri arasında ilişki kurulur. Bazı T lenfositleri bir antijen molekülünün uyarımı karşısında, sekonder immün yanıtta rol oynayan bellek T lenfositler haline dönüşürler. Vücuda ikinci kez giren bir homolog antijen bu bellek T lenfositlerini aktive etmektedir. CD4+ reseptörü bulunduran T lenfositleri T lenfositleri timus medullasında, kanda, intestinal lamina propriada ve tonsillerin parakorteksinde bulunmaktadır. (13,59)

Aktive olan CD4+ T lenfositleri proliferer olur ve olgun Th0 lenfosit halini alır. Th1 lenfositleri, IL-2 α (CD25+) ve gamma interferon (INF- γ) salgılar, IL-4 ve IL-5 salgılamaz; Th2 lenfositler ise IL-4 ve IL-5 salgıladığı halde INF- γ salgılamazlar.

Uyarılmamış Th lenfositlerinde TCR/CD3, CD2+, CD4+, CD11a/18 (LFA-1), CD28+, CD45RA reseptörleri bulunmaktadır. Aktive olan Th lenfositlerine bunlara ilaveten IL-2, CD40L, CD45RO, CD69+ gibi yeni reseptörler eklenmektedir.(Şekil 1.5.)(9,10,11)



Şekil 1.5. Th Lenfositler

Ts lenfositleri, çoğunlukla kemik iliğinde bulunmaktadır. B lenfositlerin olgunlaşmasını baskılar. Ts lenfositlerin membranında CD8+ reseptörleri bulunmaktadır. İmmün sistemin düzenli çalışması için Th/Ts lenfositleri arasındaki oranın dengede bulunması gerekmektedir. Ts lenfosit oranı azalırsa Th lenfositleri B lenfositlerini sürekli uyaracak, Ts lenfosit oranı artar veya Th lenfosit oranı azalırsa Ts lenfositleri B lenfositlerini sürekli baskılayacaktır. (13,59)

1.6.2. Sitolitik T Lenfositler (Tc)

Sitolitik lenfositler, direkt olarak kendileri veya salgıladıkları lenfokinler aracılığıyla hücresel immün yanıtta etkili lenfositlerdir. Çoğunlukla kemik iliğinde bulunmaktadır. Tc lenfositleri vücut savunmasında doğrudan yer alan tek lenfosit çeşitidir. Etkileri sonucunda, içlerinde virüs taşıyan hücreler ve tümör hücreleri öldürülür. Tc lenfositlerin çoğu, hücre membranında CD8+ reseptörleri taşırlar. Bu reseptörler aracılığı ile hedef hücrelerde bulunan MHC sınıf I yönetimindeki moleküllerle ilişki kurarlar. (13,59)

1.7. T Hücre Reseptörü (TCR)

T lenfositlerin temel göstergesi, hücre membranında bulunan T hücre resptörleridir (TCR). Bunlar T lenfositlerin yüzeyinde bulunan; antijenin tanınmasında, adhezyonda ve hücreye gelen sinyalin iletiminde görevli proteinlerdir. TCR, MHC molekülleriyle kompleks halde sunulan antijenin tanınmasında görev alır. (6)

TCR reseptörleri γ , δ ve α , β polipeptidlerinin disülfid (s-s) bağlarıyla bağlanarak oluşturduğu heterodimerlerdir. TCR $\gamma \delta$ ve TCR $\alpha \beta$ olmak üzere iki tipi vardır. Öncül T lenfositler, gelişim sürecinde ya $\gamma \delta$ veya $\alpha \beta$ zincirli reseptör kazanarak olgunlaşmaktadır. Bu reseptörler, CD3+ kompleks reseptör molekülünün tamamlayıcısı olan polipeptidlerdir. T lenfositlerde bulunan CD3+ $\alpha \beta$ veya CD3+ $\gamma \delta$ polipeptidleri, antijen tanıyan reseptörlerdir. CD3+ ve zeta zincirleriyle birlikte CR/CD3 kompleksi oluşturarak antijen tanıma ve sinyal iletimi işi gerçekleştirir. TCR/CD3 reseptör kompleksi ayrıca, lenfositlerin aktivasyonunu, Th lenfositleri tarafından sentezlenen interlökin-2 (IL-2) salınmasının düzenlenmesini, fosforilasyonu, Ca^{++} iyonlarının ve protein kinaz aktivasyonunu sağlamaktadır. (40,63)

Periferik kanda bulunan T lenfositlerin % 95'i TCR $\alpha\beta$ ve % 5'i TCR $\gamma\delta$ içeren lenfositlerdir. TCR $\alpha\beta$ taşıyan lenfositlerin bir kısmında CD4+, diğer bir kısmında CD8+ reseptör molekülleri bulunmaktadır. CD4+ T lenfositler, immün yanıt ürünlerin oluşumundan sorumlu hücrelerdir. CD8+ T lenfositler, immün yanıt baskılayıcı veya sitolitik etkiye sahiptirler.(59)

Antijen, mitojen, sitokin veya lenfokinlerle aktive olan T lenfosit yüzeyinde önce HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, transferrin, IL-2 α (CD25+), CD69+ reseptörleri; daha sonra CD40L, CD45RO ve CD70+ reseptörleri ekspres edilir.

T lenfositler phytohemaglutinin (PHA), concavalin A (Con-A), pokeweed mitojen (PWM) gibi bitki proteinleriyle uyartılarak blast şekillerine farklılaşırlar. Lenfositler,

insan f3tal d3neminin 7-8. haftalarında g3sterilmiştir. T lenfositlerin h3crenel imm3n yanıtta başka, geç tip aşırduyarlılık ve doku atılım reaksiyonlarında ve t3m3r imm3nolojisinde 3nemli g3revleri vardır.(29,59)

1.8. Antijen İşlenmesi ve Sunulması

V3cuda giren antijenlerin imm3n yanıtı uyarabilmeleri için antijen sunan h3creler tarafından alınıp, T lenfositlere sunulmak 3zere hazırlanmaları gerekir. Protein yapısındaki antijenler k33k peptid parçalarına ayrıldıktan sonra MHC molek3lleri ile birlikte T lenfositlere sunulurlar. Bu proteinleri tanıyan yani T h3crelerine peptid fragmanı sunan h3creler “antijen sunan h3creler” (APC -antijen presenting cells) olarak isimlendirilir.(4)

Proteinlerin APC’ler tarafından MHC assosiye peptid fragmanlarına d3n3řt3r3lmesine “antijen işlenmesi” denir.

APC’ler antijeni yakalayıp T lenfositlere sunarlar. APC’lerin lenfosit aktivasyonunda ki 3nemli fonksiyonları ;

- 1) Endositoz yoluyla h3cre içine alınmış antijenleri işleme 3zelliğine sahiptir.
- 2) Protein antijenleri peptidlere çevirirler. Bu peptidleri MHC kompleksleriyle T lenfositlere sunarlar.
- 3) MHC sınıf II gen 3r3nlerini eksprese ederler.
- 4) T h3cre antijen resept3r3 tarafından peptid MHC kompleksinin tanınmasının başlaması için stim3lasyon sağlarlar. Bu uyarılar kostimulat3rler olarak isimlendirilir.(4,6)

Aslında memeli h3crelerinin çoğu endositoz yoluyla protein antijenleri h3cre içine alıp, bunları proteolitik olarak parçalayabilir; ancak yalnız 3zelleşmiş h3cre populasyonları MHC sınıf II molek3lleri taşırlar.

Antijen işlenmesinde hangi h3cre tipinin çalışacağı; antijen tipine, v3cuda giriş yoluna ve antijenin kaçıncı kez girdiğine bağlıdır.(25)

Yardımcı T lenfositler için en iyi tanımlanmış APC'ler; dendritik hücreler, mononükleer fagositler ve B lenfositlerdir. Dendritik hücreler, kemik iliğinden köken alırlar ve mononükleer fagositik soydan gelirler. Hem CD4+, CD8+ hücrelere, hem de deneyimsiz T lenfositlere antijen sunarlar. (7)

Makrofajlar; büyük partikülleri aktif olarak fagosite eden hücrelerdir. Bu sebeple bakteri ve parazitler gibi fagosite edilmiş infeksiyöz organizmalardan köken alan antijenlerin sunumunda rol oynarlar. Makrofajların çoğu düşük oranda MHC sınıf II molekülleri taşırlar. IFN- γ daha yüksek oranda MHC sınıf II molekülleri eksprese edilmesini sağlar.

B lenfositler; antijen reseptörleriyle, soluble protein antijenlere bağlanır ve hücre içine alırlar. Ayrıca işlenmiş peptidleri T lenfositlere sunarlar.

Vasküler endotelial hücreler; insanlarda, MHC sınıf II molekülleri taşırlar ve antijenlerin T lenfositlere sunarlar. Çeşitli epitelial ve mezenşimal hücrelerde IFN- γ ya yanıt olarak MHC sınıf II molekülleri eksprese ederler. (4)

1.9. T Lenfositlerin Aksesuar Molekülleri

T lenfositleri, yüzeylerinde antijene karşı yanıtın oluşmasında önemli rolleri olan integral membran proteinleri taşırlar. Bunlara aksesuar moleküller (proteinler) denir. Ortak özelliklere sahiptirler;

- 1) T lenfositler üzerindeki aksesuar moleküller, diğer hücrelerin yüzeylerinde (ör; APC'ler, vasküler endotel hücreler) bulunan moleküllere bağlanırlar.
- 2) Bu moleküller nonpolimorfik ve invarianttır.
- 3) Bazı aksesuar moleküller, biyokimyasal sinyalleri T lenfositlerin iç kısmına iletirler.
- 4) Bunların diğer hücrelerdeki ligandları ile bağlanması T lenfositlerin APC'lere adhezyonunu kuvvetlendirir.

5) T lenfositler aksesuar molekülleri T lenfositlerin normal dokulardaki ve patolojik lezyonlarda (Ör; T hücre tümörlerinden) tanınmasını sağlayan hücre yüzey antijenleridir.(6)

1.10. CD4+/CD8+

Bu moleküller, antijen tanınmasında TCR ile birlikte hareket ederler ve koreseptörler olarak isimlendirilirler. CD4+ ve CD8+; transmembran glikoproteinleridir.

CD4+ yardımcı T lenfositleri hücrel immünitinin efektör hücreleridir. Hücrel immünitede, APC tarafından sunulan antijeni tanıyan ve uyarılan CD4+ T lenfositler (yardımcı T lenfositler) makrofajları aktive ederler, CD8+ T lenfositler ise infekte hücreleri öldürür. Humoral immünitede ise CD4+ T lenfositler sitokinler salgılayarak B lenfositlerle etkileşime girip bu hücrelerin ve Tc lerin çoğalmasını ve farklılaşmasını stimüle eder.(4,6)

T lenfosit sinyal iletiminde çok sayıda molekül rol alır. CD4+ ve CD8+'de T lenfositlerde gerçekleşen erken sinyal iletiminde rol alırlar. Burada T lenfosit spesifik Src ailesi tirozin kinaz (lak) da rol alır. Bu protein CD4+ ve CD8+ in sitoplazmik ucuna bağlanır ve T lenfosit olgunlaşması ve aktivasyonu için gereklidir. Ayrıca CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin APC'lere adhezyonunu artırır.(6)

1.11. T Lenfositler Tarafından Antijen Tanınması

MHC gen kompleksi tarafından kodlanan glikoprotein yapısındaki moleküller yabancı antijenleri tanımada önemlidir. MHC genlerinin kodladığı reseptörlere MHC molekülleri denilmektedir. MHC sınıf I (MHC-I) antijenleri olarak adlandırılan polipeptidler, MHC gen lokusunun A, B, ve C bölgelerindeki genler tarafından kodlanmaktadır. MHC sınıf II (MHC-II) molekülleri, MHC gen lokusunun D bölgesindeki gen tarafından kodlanmaktadır. (4)Sitolitik T (Tc) ve baskılayıcı T (Ts) lenfositlerinde bulunan CD8+ reseptörleri, T lenfositlerde, makrofajlarda, foliküler dentritik hücrelerde ve polimorfonükleer hücrelerde bulunan MHC-I peptidleri ile

ilişki kurar. Th lenfositlerinin CD4+ reseptörleri ise dentritik hücre, makrofaj ve B lenfositlerinde bulunan MHC-II molekülleri ile birleşir. Organizmaya giren yabancı antijenler, antijen sunucu hücrelerde işlendikten sonra, bağlanan bu MHC II-CD4+, MHC I-CD8+ reseptörleri üzerinden tanıtılır. Ayrıca antijenin tanınmasında TCR ve CD3+ reseptörleride görev alır.

T lenfositler, timusta olgunlaşması sırasında ilerde karşılaşacakları antijenleri tanımaları için hücre mebranına bağlı glikoprotein yapısında değişik reseptörler kazanırlar ve seleksiyona uğrarlar. Doğal olarak bulunan bazı reseptörlerini de kaybederler.(59)

Olgunlaşmaları boyunca selektif olarak elenen T lenfositlerden, kendi MHC si ile assosiyasyon peptidleri için spesifik reseptör taşıyanlar hayatta kalır, kendi MHC sini tanımayanlar veya yüksek afinite ile tanıyanlar ise ölür. Böylece elimine edilmiş olur.

CD4+ T lenfositler; APC'ler tarafından veziküller içine alınan hücre dışı proteinlerden köken alan peptidleri tanır. CD8+ T lenfositler ise genellikle endojenik olarak sentezlenmiş, sitosolden köken alan peptidleri tanır.(4,63)

1.12. Lenfosit Aktivasyonu

İmmün sistemin uyarılması; konak organizmaya giren yabancı bir antijenin, antijen sunucu hücreler tarafından tanınarak lenfositlere sunulması ve bu lenfositlerin antijeni tanımasıyla başlar. Antijenlerin bir kısmı organizmaya mukozalardan girerek ilgili lenfoid dokuya, deriden girerek bölgesel lenf düğümlerine ve kan yoluyla girerek dalağa ulaşırlar. Lenf düğümlerinde, lenfatik dokularda ve dalakta bol miktarda makrofaj, T ve B lenfositler bulunur. Bu hücrelerin ilişkileri sonucu aktive olan lenfositler, immün yanıt ürünlerini çıkarır.(13,59)

1.12.1. T Lenfositlerin Aktivasyonu

T lenfositlerin immün yanıtının aktivasyon ve efektör fazları bu hücreler tarafından spesifik antijenlerin tanınmasıyla tetiklenir. T lenfositler MHC moleküllerine bağlı bulunan peptid fragmanlarına karşı spesifiktir. T lenfositler, antijenler ve APC'ler tarafından sağlanan sinyallerle aktive edilmektedir. (8)

Deneyimsiz T lenfositler tarafından antijen tanınması T hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını başlatır. Efektör T lenfositler tarafından antijen tanınması, antijenlerin ortadan kaldırılmasını sağlayan efektör fonksiyonları tetikler. Protein yapıdaki antijenler vücuda girdikleri bölgelerden periferik lenfoid organlara özellikle de bölge ile ilişkili lenf nodlarına taşınır. Antijenler burada APC'ler tarafından işlenir ve MHC ilişkili peptid formunu alırlar. Henüz hiçbir immünolojik uyarı almamış deneyimsiz T lenfositleri yerleştikleri periferik lenfoid organlarda işlenmiş antijenle karşılaşır. Öncül T lenfosit yanıtı lenf nodlarındaki APC'ler üzerindeki peptid-MHC komplekslerinin tanınmasıyla uyarılır. Deneyimsiz T lenfositlerin aktivasyonunun ilk sonucu antijene spesifik klonun çoğalmasıdır. Bu olaya klonal genişleme, efektör ve bellek hücrelerine farklılaşma da denir. Efektör T lenfositler dolaşıma girer, periferik dokularda antijenleri tespit eder (lenfoid organlarla sınırlı değildir), ve antijenlerin tanınmasıyla tekrar uyarılır; ikinci uyarının amacı efektör fonksiyonları yerine getirmektir. Antijen tanınmasıyla, CD4+ alt kümesinin efektör hücreleri sitokin sentezler ve CD8+ sitolitik T lenfositleri MHC sınıf I ile bağlı yabancı antijen bulunduran hücreleri öldürür. Deneyimsiz ve efektör T lenfositlerin işlevsel yanıtlarındaki bu farklılara rağmen, antijenle indüklenerek uyarılmanın biyokimyasal yolları her ikisinde de temel olarak aynıdır.(8,13,59,65)

T lenfositlerin aktivasyonu TCR tarafından peptid-MHC komplekslerinin tanınmasını ve T lenfositlerin aksesuar moleküllerinin APC'lerin üzerindeki ligandlarla etkileşimini gerektirir. TCR tarafından peptid-MHC komplekslerinin tanınması ile T lenfosit immün yanıtının spesifikliği sağlanır. Değişik aksesuar moleküller değişik görevler yaparlar. CD4+ ve CD8+'in yardımcı reseptörleri T lenfositlere aktive edici sinyaller iletir. T lenfositler üzerindeki adezyon molekülleri, özellikle integrinler, T

lenfositlerin APC'lere stabil bir şekilde bağlanmasını ve bu hücrenin işlevsel yanıtı verebilecek kadar uzun zaman burada kalmasını sağlar. APC'ler üzerindeki yardımcı uyarılar için özelleşmiş TCR ler, T lenfosit aktivasyonu için ikinci bir sinyal oluşumuna neden olur.(8,13,59,65)

T lenfositlerin üzerindeki antijen reseptörleri antijen taşıyıcı APC'lere zayıf şekilde ve kısa süre bağlanabilir. Bir T lenfositlerin aktivasyonu APC'lerin üzerindeki peptid-MHC kompleksleri tarafından hücrenin antijen reseptörlerinin birden fazla sıralı eşleşmesiyle gerçekleşir. (8)

T lenfositlerin oluşturduğu immün yanıt, T lenfositlere peptid-MHC moleküllerini sunan APC'lerin yapısından etkilenir. Olgun dendritik hücreler deneyimsiz T lenfositleri uyarır ve immün yanıtı başlatan en etkili APC'lerdir. Bunun sebebi olgun dendritik hücrelerin peptidleri sunan MHC moleküllerini ve T lenfositler için ikinci sinyali sağlayan yardımcı uyarıları yüksek seviyede ekspresye etmesidir. T lenfositleri uyarır diğer APC'ler ise makrofajlar ve B hücreleridir. Bunların ikisi de, deneyimsiz T lenfositlerden çok farklılaşmış efektör hücrelerini uyarmada daha etkilidir.(8,67)

1.12.2. Sitokin Sekresyonu

T lenfositlerin antijen tanınmasına yanıtlarından biri de sitokin adı verilen proteinlerin sekresyonudur. Bu proteinler T lenfositlerin birçok yanıtına ve fonksiyonuna katkıda bulunur. Sitokinlerin üretimi yeni genlerin transkripsiyonunu ve protein sentezini tetikler. Deneyimsiz T lenfositler tarafından oluşturulan başlıca sitokin, T lenfositler için büyüme ve farklılaşma faktörü olarak görev yapan interlökin-2'dir (IL-2). Efektör CD4+ hücreler hücreSEL ve humoral immünitinin efektör fazlarında görev alan birçok sitokin salgılar. Ayrıca antijen uyarısıyla, T lenfositler birçok sitokin reseptörünün ekspresyonunu da artırır. Uyarılan T lenfositler çoğu zaman, aktivasyon antijeni adı verilen yeni sentezlenmiş yüzey proteinlerinin ekspresyonu ile tanınırlar; bu proteinler sitokinlerle eş zamanlı olarak

sentezlenir. Böyle bir aktivasyonda yüzey antijeni CD25+, IL-2 reseptörünün α zinciridir.(8,9,14,18)

IL-2, aktive edilmiş T lenfositlerinin kültür süzüntülerinden elde edilmiş, 13. 000 - 16. 000 d. mol ağırlığında bir glikoproteindir. T lenfositlerince oluşturulabilmesi için makrofajlarca bunlara bir antijen sunulması gereklidir. Bu esnada makrofajların oluşturduğu IL-2 in tekrar T lenfositlerini stimüle etmesi onların IL-2 oluşturma özelliklerini artırır. T lenfositlerinden başka büyük granüllü lenfositler (NK hücreler) de IL-2 oluştururlar. (5,13,59)

Olgun T lenfositleri G_0 durumundadır ve IL-2 mRNA'sı eksprese etmezler. Bu hücreler APC tarafından sunulan antijenle uyarıldıktan bir saat sonra IL-2 mRNA'sı kazanırlar. IL-2 mRNA ekspresyonu en yüksek düzeyine 6-8 saat sonra ulaşır. Bu esnada lenfositler G_1 fazına geçerler. Hücre büyüklüğü artar, transkripsiyonel aktivitesi çoğalır ve IL-2 reseptörleri kazanırlar. Aynı zamanda IL-2 salgırlar. Bu ise IL-2 reseptör oluşumunu daha çok artırır, IL-2 ile IL-2 reseptörleri arasındaki ilişki sonucunda lenfositler S fazına geçerler ve hızla çoğalmağa başlarlar. IL-2'nin oluşmasına kadar ortaya çıkan olaylar spesifik olup T lenfositlerinin antijen sunan hücreyi tanımaya bağlıdır. IL-2 nin T lenfositlerinin çoğalmasını uyarması ise nonspesifik olup, IL-2 reseptörü taşıyan her hücre, proliferasyona uğrar.

IL-2, özellikle Th (CD4+) lenfositlerince salınır. Bununla beraber uygun stimülasyonlar karşısında örneğin fitohemaglutininin (PHA) , MHC sınıf-1 antijeninin uyarısı ile Ts ve Tc ler (CD8+) de IL-2 salgılayabilirler.

Aktive olmuş T lenfositlerine, IL-2'nin etkisiyle çeşitli hücre fonksiyonları ortaya çıkar:

- Lenfositler ve özellikle Th lenfositleri çok sayıda lenfokin salgırlar. İnterferonlar, CSF, IL-3, lenfotoksin (LT) , IL-4 ve IL-6 bunlardandır.
- IL-2 ayrıca NK hücrelerini de uyararak çoğalmalarına yol açar ve öldürücü özellikleri artar. Ayrıca B lenfositlerini geliştirici faktör olarak da etkili olur. (13,59,66)

Akım sitometrisinde T lenfosit çalışmalarında özellikle CD25, CD69,CD38,CD71 gibi yüzey antijenlerinin ekspresyonu gözlemlenir.T lenfosit aktivasyonu hücrelerin değişik mitojen, antijen ve monoklonal antikorlar ile uyarımı sonrasında değerlendirilir. (34,41,68)

Lenfositler için önemli mitojenler;

Fitohemaglutinin (PHA), Concavalin A (Con A) ve pokeweedmitogen (PWM) gibi bitki mitojenleri ve bakteri ürünlerinden elde edilen SAC mitojenidir.PHA ve Con A T lenfositler için, SAC B lenfositler için, PWM ise T ve B lenfositler için kuvvetli bir uyarandır.(28) T lenfositler PHA'ya yüksek mitojenik yanıt verir.(60) Yapılan çalışmalarda hücrelerin genellikle PHA ve Con A ile 72 saat, PWM ile 3-6 gün inkübe edildiği belirtilmiştir. (12,28,54,71)

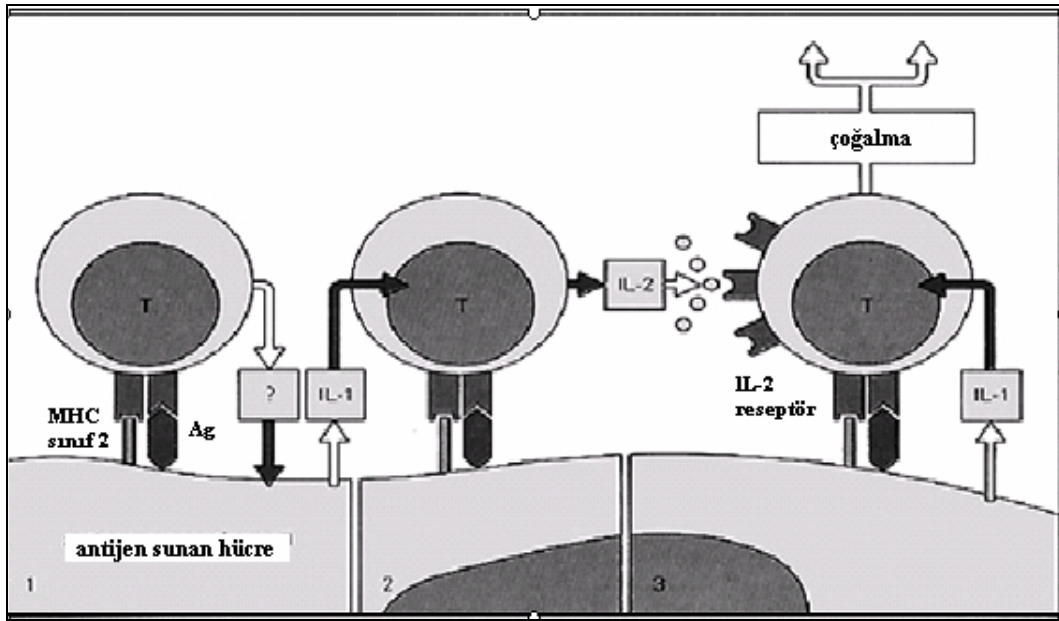
Mitojenlerle uyarımdan sonra aktive olan T lenfositler CD25+, CD69+ gibi yüzey antijenlerini eksprese ederler. Normalde uyarılmamış T lenfosit yüzeyinde eksprese edilmeyen bu moleküller, T lenfosit aktivasyonu ile zamana bağlı olarak indüklenir. Bunlar akım sitometrisi ile yapılan çalışmalarda, T lenfosit aktivasyonunu belirlerken hızlı, hassas ve güvenilir sonuçların alınmasını sağlayan önemli aktivasyon belirleyicileridir.(16,20,33,34,44,69,70)

PHA ile stimülyondan 30 dk. sonra hücre yüzeyinde ilk olarak CD69 eksprese edilir.(53) CD69+, PHA ile uyarıldıktan sonra mitojenik yanıtın aynı gün içinde ölçülebileceği bir aktivasyon belirleyicisidir.(49,53) PHA ile uyarıldıktan sonra CD69+ hızla eksprese edilerek maksimum düzeyine 24. saatte ulaşır. Ancak CD25+ daha yavaş bir artış göstererek, 48. saatte maksimum ekspresyon seviyesine ulaşır. (34,35)

1.12.3. Çoğalma

Antijen tanınmasına yanıt olarak T lenfositlerin çoğalması temel olarak otokrin büyüme yoluyla sağlanır. Bu yolda, yanıt veren T lenfositler kendi büyüme sitokinini

salgılar ve hücre yüzeyi reseptörlerini eksprese eder. Çoğu T lenfosit için başlıca otokrin büyüme faktörü IL-2'dir. Hem IL-2 üretimi hem de IL-2 reseptör ekspresyonu özgül T lenfositler tarafından antijen tanınmasını gerektirdiği için, antijeni tanıyan hücreler aynı zamanda antijene yanıt olarak çoğalırlar. Deneyimsiz T lenfositlerin çoğalmasının sonucu klonal genişleme meydana gelir. Bu durum antijeni ortadan kaldırmak için gerekli olan antijene özgü hücrelerin fazla miktarda oluşmasını sağlar. (şekil 1.6)(8,13,60,66)



Şekil 1.6. T Lenfosit aktivasyonu

1.12.4. Efektör Hücrelere Farklılaşma

Olgun T lenfosit farklılaşması, deneyimsiz T lenfositlerinin, çeşitli fonksiyonları olan efektör hücrelere dönüşümünü sağlayan bir süreçtir. Bu süreç hem T lenfositlerin antijenin indüksiyonu ile aktivasyonuna, hem de başta antijen tanınma bölgesinde üretilen sitokinler olmak üzere diğer uyarılara bağlıdır. Antijenle uyarılmış CD4+ T lenfositleri efektör hücrelere farklılaşarak sitokin üretirler. T lenfosit farklılaşması efektör molekülleri kodlayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu efektör moleküllerin bazıları, sitokinler ve Tc granül proteinleri gibi, T lenfositlerden salınır; kalanları ise CD40 ligandı (CD40L) ve Fas ligandı gibi, hücre yüzeyi molekülü olarak efektör fonksiyonlarda görev yapar.(8)

CD4+ Th lerin majör efektör fonksiyonu, temel olarak sitokin salgılayarak fagositleri ve çeşitli lenfositleri uyarmak, CD8+ Tc lerin majör efektör fonksiyonu ise antijen taşıyan hedef hücreleri öldürmektir. T lenfositlerin efektör fonksiyonları, farklılaşmış efektör hücrelerin antijen uyarıları ile başlar. Bu fonksiyonların yerine getirilmesi T lenfositlerin yabancı antijenlere karşı koruyucu immün yanıt vermesini sağlar. CD4+ T lenfositler tarafından üretilen sitokinler T lenfositlere ve diğer hücre tiplerine (B lenfositleri, makrofajlar, granülositler ve damar endoteli olmak üzere) etki eder. Bu sitokinler humoral ve hücrel immün yanıtı ve inflamasyonu başlatan ve kontrol eden çeşitli etkilere sahiptir. Antijenin uyardığı Th ler ayrıca CD40L de eksprese eder. CD40 ligandı, B lenfositler ve makrofajlar üzerindeki CD40'a bağlanıp bu hücreleri uyarır. Th lerin efektör fonksiyonunun önemli bir özelliği; T lenfositlere antijeni sunan hücrelerin aynı zamanda T lenfositlere yanıt veren hücreler de olmasıdır. Bu nedenle, hücrel ve humoral immünitede makrofajlar ve B lenfositleri sırasıyla Th lere antijenleri sunar ve Th ler tarafından aktive edilir. Tc ler antijeni eksprese eden hücreleri (örneğin virüs taşıyan) öldürür ve ayrıca bazı sitokinleri salgılar. (8,13,59)

1.12.5. T Lenfosit Yanıtının Azalması

T lenfosit yanıtı efektör hücreler tarafından antijenin yok edilmesinden sonra azalır. Bu durum, immün sistemin dinlenme pozisyonuna geri dönmesi ve homeostazi için önemlidir. T lenfosit yanıtının azalması antijenle aktive olmuş T lenfositlerin çoğunun apoptoz ile ölmesidir. Bunun sebebi, antijen yok edildikten sonra, antijene karşı gerçekleşen reaksiyon sırasında yardımcı uyarılar ve sitokinler tarafından üretilen ve lenfositlerin hayatta kalması için gerekli uyarıların ortadan kalkmasıdır. (8)

1.12.6. Bellek Hücrelere Farklılaşma

Antijenle uyarılmış T lenfositlerin bazıları antijene spesifik bellek hücrelerine dönüşürler. T lenfositlerin antijen uyarısına işlevsel ve mitotik yanıtının birkaç gün ya da hafta sürmesine rağmen, antijen temizlenir temizlenmez yanıt azalır. Antijenle tekrar karşılaşmaya kadar bellek T lenfositler uzun süre yaşamaya devam ederler.

Bellek T lenfositler, aynı antijenle daha sonraki karşılaşmalarında, artmış ve hızlanmış ikincil yanıtın verilmesinden sorumludur. Bellek hücrelerinin hayatta kalma mekanizmaları bilinmemektedir. Bellek hücreler, antijenlerle karşılaşma miktarını yansıtacak şekilde yaşla orantılı olarak artar. Örneğin, yeni doğan bebeklerde periferik kandaki T lenfositlerin hemen hemen tamamının deneyimsiz olduğu düşünülmektedir. Fakat gerçekte T lenfositlerin yarısı veya daha fazlası bellek hücrelerdir.(8)

Birçok yüzey antijeni, bellek hücrelerini ve yakın zamanda uyarılmış efektör T lenfositleri ayırmak için kullanılmıştır. Bellek T lenfositler, efektör T lenfositler gibi, bazı yüzey antijenlerini yüksek seviyelerde eksprese eder. Bunlardan en göze çarpanları, periferik enfeksiyon bölgesine göçlerini destekleyen ve bu bölgelerde kalmalarını sağlayan integrinler ve CD44'tür. Bu özellik bellek yanıtının hızlıca antijenin yerini belirlemesini ve inflamasyon bölgesinde antijenin temizlenmesini sağlar. Buna rağmen, bellek hücreleri, IL-2 reseptörlerinin α zinciri gibi aktivasyon antijenlerini eksprese etmezler. Bu hücreler işlevsel olarak sessizdir. Antijenle tekrar karşılaşana kadar aktif olarak çoğalırlar ve efektör görev görmezler. Antijenle uyarılmış T lenfositlerin işlevsel olarak aktif, kısa ömürlü efektör hücrelere ya da işlevsel olarak sessiz, uzun ömürlü bellek hücrelerine farklılaşmasını belirleyen mekanizmalar bilinmemektedir.(8)

1.12.7. T Lenfosit Aktivasyonunda Yardımcı Uyarıların Rolü

T lenfositlerin çoğalması ve farklılaşması için gerekli olan sinyaller, antijen tarafından indüklenen sinyallere ek olarak APC'ler üzerindeki yardımcı uyarımlar adı verilen moleküller tarafından sağlanır. Deneyimsiz T ve B lenfositlerin, çoğalması ve efektör hücrelere farklılaşmasını indüklemek için iki ayrı hücre dışı sinyale ihtiyacı vardır. İlk sinyal antijenin, antijen reseptörüne bağlanmasıyla oluşur. T lenfositler düşünüldüğünde, peptid-MHC komplekslerinin TCR'ne (ve CD4+ ya da CD8+ yardımcı reseptörüne) bağlanması birinci sinyali oluşturur. T lenfosit aktivasyonu için gerekli ikinci sinyal APC'ler üzerinde yardımcı uyarımlar adı verilen moleküller tarafından sağlanır. Bu moleküller antijenle birlikte T lenfositleri uyardıkları için bu

adı almıştır. Yardımcı uyarıların yokluğunda, antijenlerle karşılaşan T lenfositler yanıt veremezler ve apoptozla ölümler ya da anergi adı verilen sessiz evreye girerler. (8,13)

T lenfosit aktivasyonunda en iyi tanımlanmış yol, aktif APC'ler üzerinde eksprese edilen kostimülatör B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) moleküllerinin T lenfosit yüzey molekülü CD28 e bağlanmasıdır. CD28 birçok T lenfositin antijene yanıtını artıran sinyaller gönderir. Bu yanıtlar hücrelerin hayatta kalmasını, IL-2 gibi sitokinlerin üretimini ve deneyimsiz T lenfositlerin efektör hücrelere farklılaşmasını içerir. B7-1 ve B7-2 yapısal olarak aynı olan tek zincirli glikoproteinlerdir. Her ikisi de iki hücre dışı Ig benzeri domain, bir transmembran segmenti ve bir sitoplazmik kuyruk içerir. B7 molekülleri temel olarak dendritik hücreler, makrofajlar ve B lenfositleri olmak üzere "profesyonel" APC'lerin üzerinde eksprese edilir. Bu moleküller dinlenme halindeki APC'ler üzerinde ya hiç yoktur ya da düşük seviyelerde bulunur; fakat çeşitli uyarımlarla indüklenir. Bu uyarımlar endotoksin gibi mikroplara özgü ürünler, interferon- γ gibi sitokinler ve T lenfositlerdeki CD40L'nin APC'ler üzerindeki CD40'a bağlanmasıdır. B lenfositlerinde antijen reseptörünün çapraz bağlanması da B7 ekspresyonunu artırır. B7-1 ve B7-2'nin indüksiyon kinetiği farklıdır, B7-2 uyarıdan 6 saat sonra, B7-1 ise 24 saat sonra meydana çıkar. Aktif T lenfositler CTLA-4 adı verilen başka bir yüzey antijeninde eksprese eder. Bu antijen CD28 analogudur ve B7-1 ve B7-2'ye bağlanır; fakat CD28'in aksine T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder. CTLA-4 T lenfosit yanıtının sona ermesine neden olabilir. CD28 analogu olarak tanımlanan başka bir membran proteinine ise ICOS adı verilmiştir. TCR ile aktivasyonda bu proteinin T lenfositler üzerindeki sayısı artmaktadır. Bu proteinin antikorlarla çapraz bağlanması belirli sitokinlerin üretimini uyarır. Çeşitli APC'ler tarafından sunulan antijenlere karşı T lenfosit yanıtını düzenleyen, prototipi CD28 olan bir protein ailesi bulunmaktadır.(8,73)

Yardımcı uyarımların ekspresyonu T lenfositlerinin doğru zamanda ve yerde yanıt vermesini sağlayacak şekilde kontrol edilir. Yukarıda da bahsedildiği üzere, B7 yardımcı uyarımları dendritik hücreler, makrofajlar ve aktif lenfositler olmak üzere "profesyonel" APC'lerin üzerinde eksprese edilir ve bunların ekspresyonu mikroplara

özgü ürünler ve immün reaksiyonlarda üretilen sitokinler ile artar. Bütün potansiyel APC'ler içinde olgun dendritik hücreler en yüksek seviyede yardımcı uyarıcı ekspresyon eden hücrelerdir, bunun sonucu olarak da, deneyimsiz T lenfositlerin en potent uyarıcılarıdır. Mikroplara özgü ürünler ve immün reaksiyonlarda üretilen sitokinler tarafından yardımcı uyarıcıların indüklenmesi, mikropların antijenlerine karşı T lenfosit yanıtını destekler. Normal dokulardaki aktif olmayan veya "dinlenen" APC'ler üzerinde yardımcı uyarıcıların yokluğu kişinin kendi antijenlerine tolerans göstermesini sağlar. Doku APC'leri kendi antijenlerini T lenfositlere sunma yeteneğine sahip oldukları için, yardımcı uyarıcı yokluğu potansiyel olarak self-reaktif T lenfositlerin aktifleşmemesini ve anerjik kalmasını sağlar.(8)

CD28, APC'ler üzerindeki LFA-3 (CD58) ligandını tanıyan T lenfosit yüzey antijenidir ve CD28 gibi antijenlere karşı T lenfosit yanıtını artırır. CD28, CD28 eksikliğini kompanse edebilir.

T lenfositler üzerindeki CD40L ve APC'ler üzerindeki CD40'un etkileşimi T lenfosit aktivasyonunu artırır. Bu etkinin olası mekanizması APC'ler üzerindeki CD40'ın bağlanmasıyla APC'leri uyarıp B7 moleküllerinin ekspresyonunu artırması ve T lenfosit farklılaşmasını destekleyen IL-2 gibi sitokinlerin salgılanmasının sağlanmasıdır. Bu nedenle, CD40 yolu dolaylı olarak T lenfosit yanıtını amplifiye eder ve muhtemelen kendisi yardımcı uyarıcı yolu olarak görev yapmaz. Yardımcı uyarıcılarla yapılan deneysel çalışmaların temelinde, B7, CD40 ve CD28 moleküllerinin antagonistleri organ allograftlarının rejeksiyonunu ve diğer patolojik immün yanıtları engellemek için klinik olarak denenmektedir.(8,66)

CD28-B7 etkileşiminin ve diğer yardımcı uyarıcı sinyallerinin T lenfosit aktivasyonundaki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ve muhtemelen birçok mekanizmayı içermektedir. CD28 ve CD28 sinyalleri, T lenfosit otokrin faktörü IL-2 de dahil olmak üzere sitokin üretimini artırır. Bu durum IL-2 mRNA'nın, artmış transkripsiyon ve stabilizasyon kombinasyonu ile meydana gelir. Buna ek olarak, CD28 sinyalleri apoptoz karşıtı protein Bcl-x ekspresyonunu artırarak T lenfositlerin hayatta kalımını destekler. (8,73)

1.12.8. T Hücre Reseptör Kompleksi Tarafından Sinyal İletimi

TCR tarafından sinyal iletimi antijen tanınmasıyla immün yanıt arasındaki bağlantıyı kurar. Antijenin tanınması T lenfositlerde biyokimyasal sinyaller dizisini başlatır. Bu durum belirli genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna ve hücrelerin hücre siklusuna girişine neden olur. Antijen tanınmasından sonra T lenfositlerde eksprese olan genler, T lenfositlerin biyolojik yanıtında rol alan birçok proteini kodlar. TCR tarafından tetiklenen sinyal kaskadları çoğunlukla antijen reseptörlerine bağlanmayla aktifleşen çeşitli T lenfosit populasyonları ile yapılan in vitro analizlerle tanımlanmıştır. Bu tür çalışmalarla, T hücre sinyal iletiminin genel özellikleri anlaşılmıştır.(8)

T lenfositlerin antijenlere karşı hücreyel yanıtı çeşitli evrelerden oluşur. Bunları antijen tanınmasından sonra saniyeler içinde oluşan membran olayları, dakikalar içinde aktifleşen sitoplazmik sinyal iletim yolları, saatler içinde gerçekleşen yeni gen transkripsiyonudur.(8)

Antijen reseptöründen gelen sinyaller koordine bir şekilde, Ras-MAP kinaz yolu (ve ilişkili Rac-SAP kinaz yolu), protein kinaz C (PKC) yolu ve kalsinörin yolu gibi bazı önemli biyokimyasal yolları aktifleştirirler. Bu yolların herbirinde aktive olan enzimler, T lenfositlerdeki çeşitli genlerin ekspresyonunu uyaran transkripsiyon faktörlerini indükler.(8,65,66)

Antijen tanınması TCR'lerin toplanmasını sağlar ve bu durum TCR ilişkili proteinlerin ve çeşitli sinyal moleküllerini aktifleştiren adaptör proteinlerin tirozin fosforilasyonunu indükler. TCR iç enzim aktivitesine sahip değildir ve görevini, bazıları TCR kompleksi proteinlerinin veya CD4+ ve CD8+ yardımcı reseptörlerinin sitoplazmik kuyruğuna bağlı olan, diğerleri ise plazma membranında ya da sitoplazmada bulunan ilişkili proteinlerin enzimsel aktivitesini indükleyerek yapar. T hücresinin APC'ler üzerindeki MHC ilişkili peptidlere bağlanması TCR komplekslerinin ($\alpha\beta$ TCR, CD3+ molekülü ve δ zinciri) ve CD4+ ve CD8+ yardımcı reseptörlerinin APC ile karşılaştığı noktada toplanmasıyla sonuçlanır. TCR'lerin ve

yardımcı reseptörlerin toplanması T lenfosit yanıtını başlatmak için yeterli bir sinyaldir. Bu durum TCR ve CD3+ moleküllerine çapraz bağlanan antikorların neden antijeni taklit ettiğini açıklar. Bu substratların tirozin fosforilasyonu T lenfosit sinyal iletimi yolunda ki temel olaylardır.(8,65)

2. MATERİYAL VE METODLAR

2.1. Materyal :

Bu çalışmanın materyalini Haziran 2005-Haziran 2006 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Sosyal Pediatri Birimi polikliniğine başvuran yaşları (0-2), (2-6), (6-10) arası değişen sağlıklı çocuklardan Birim Başkanlığının izniyle alınan 5'er cc heparinize (100 IU/ml heparin) kan örnekleri oluşturmuştur.(Tablo 2.1)

Tablo 2.1. Çalışmayı oluşturan bebek ve çocukların yaş grupları

Grup	Yaş	Gruptaki Bebek/Çocuk Sayısı
1	0-2 yaş	5
2	2-6 yaş	7
3	6-10 yaş	10

2.1.1. Çalışma Gruplarının Seçimi :

Çalışma grupları, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Sosyal Pediatri Birimi polikliniğine başvuran, hiçbir kronik hastalığı ve akut enfeksiyonu olmayan, normal gelişimli sağlıklı bebek ve çocuklardan oluşmuştur.

Çalışmaya başlamadan önce ailelere bilgi verilip onayları alınmış ve gönüllü olur formları imzalatılmıştır.

2.1.2. Kan Örneklerinin Toplanması :

Etik kurul onayı ile çalışmaya alınan bebek ve çocuklardan tercihen sabah saatlerinde heparinli enjektörlere (100 IU/ml heparin) 5 cc periferik kan alınmıştır.

2.1.3. Kullanılan Malzeme ve cihazlar ;

RPMI 1640	Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA
FCS 100 ml	Biochrom AG, Berlin
Penisilin/Streptomisin 50 ml	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
PHA 5mg	Sigma, St Louis, USA
Histopaq (Ficol) –1077	Biochrom AG, Berlin
Wright Stain	Sigma, St Louis, USA
12x75 mm , polipropilene tüpler	Falcon Labwere, Meylan Cedex, France

Çalışmada Kullanılan MoAb'ler ;

- IgG1-FITC / IgG2a-PE (Immunotecth, Marseille, France)
- CD45-FITC / CD14-PE (Immunotecth, Marseille, France)
- CD3+- FITC / CD25+-PE (Immunotecth, Marseille, France)
- CD3+-FITC (Immunotecth, Marseille, France)
- CD25+-PE (Immunotecth, Marseille, France)
- CD69+-PE (Immunotecth, Marseille, France)
- IgG1-FITC (Immunotecth, Marseille, France)
- MsIgG2b-RD1 (Coulter, Miami, USA)

Kullanılan Cihazlar ;

Akım Sitometrisi EPICS XL-MCL, Y40261S/N, Coulter Corp. Miami, FL, USA

2.2. Metodlar :

Araştırma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Pediatrik İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarında, Lenfoblastik Transformasyon Testi ve Akım Sitometrisi ile aktivasyon belirleyicilerinin ölçümü yapılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. T hücre aktivasyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır;

Heparinize enjektöre alınan periferik kan Ficoll (Histopaq) üzerine yayılarak santrifüj edildi.(30 dk. 2000 rpm.) Yoğunluk farkıyla ortada ayrılan lenfositler toplandı. İzole edilen hücreler 2 kez RPMI solüsyonu ile yıkandı. (10 dk. 2000 rpm) Çöken hücrelerin üzerine Fetal Calf Serum (FCS) ilave edildi ve toma lamında sayıldı. Kültür tüplerine alınan hücreler PHA (2 ml hücreye 20 µl) ile uyarılarak etüvde inkübe edildi. (37 °C % 5 CO2'li etüv)

2.2..2. 24. ve 48. Saatlerde Akım Sitometrisi ile Aktivasyon Belirleyicilerinin Ölçümü;

Çalışma periferik kan hücrelerinin sıvı kültürlerinden yapıldı. Bütün örnekler direk metotla, florokromla bağlı antikorlar kullanılarak boyandı. PHA ile stimülasyondan 24, 48 saat sonra alınan örneklere (100 µl), lenfosit yüzey belirleyicileri spesifik mouse monoklonal antikorlar (MoAb) (10 µl) bağlanarak oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 15 dk. inkübe edildi.Kullanılan monoklonal antikorlar;

CD3+- FITC / CD25+- PE

CD3+- FITC / CD69+- PE

CD45- FITC / CD14- PE

Bu monoklonal antikorlara spesifik izotipik kontroller;

IgG1-FITC / IgG2a- PE

IgG1- FITC / IgG2b- PE

İnkübasyon sonrası eritrositler lizise uğratılarak uzaklaştırıldı. Akım Sitometrisi cihazında analizler 488 nm lazer eksitasyon (argon-ion), yana saçılım (SS), 90° ile saçılım (FS) ve floresan FL1 (530 nm dalga boyunda-yeşil), floresan FL2 (585 nm dalga boyunda-oranj) dedektörleri kullanılarak, işlemler System II software version 3.0 programında yapıldı. SS'e karşı FS dedektörlerinin kullanımı ile hücreler büyüklük ve granül içeriklerine göre bilgisayar ekranına yansıtılıp lenfositler ve

diğer periferik kan hücreleri ve artıklarından karakteristik görünüm ve yerleşim yerleri esas alınarak ayrıldı, total ve aktive lenfosit kapıları belirlenerek lenfositlerin aktivasyon oranları değerlendirildi.

Herbir hücre grubu için 10.000 lenfosit sayıldı. CD45-IgG1-FITC/CD14 IgG2a-PE MoAb çifti kullanılarak lenfosit fraksiyonları üzerindeki kapılar denetlendi. Her çalışmada analiz edilen hücre populasyonlarının en az %95 oranında CD+45 taşıdığı ve monosit karışımının <%2 olduğu belirlendi.

2.2.3. 72. Saatte Işık Mikroskobu İle Mitojene Lenfoproliferatif Yanıtın Değerlendirilmesi

72 saat inkübasyon sonunda kültürler santrifüj edilip (10 dk. 1000 rpm), süpernatant dökülerek çökelti kısmından elde edilen hücreler lamel üzerine yayıldı ve boyandı. Son olarak mikroskopta proliferatif olmuş lenfositler değerlendirilerek sayımı yapıldı. Bu iki yöntemden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

2.3. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapılmıştır. Farklı yaş gruplarına ait aktive lenfositlerin % ve Mnx değerlerinin medianları ve alt-üst sınır değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca ortalamaların karşılaştırmaları yapılmış, zamanlar ve gruplar arası korelasyona bakılmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmaya alınan sağlıklı bebek ve çocuk gruplarının yaş ve cinsiyet özellikleri tablo 3.1. de sunulmuştur.

1. gruptaki yaşları 0-2 arasında değişen 5 bebeğin 3'ü kız, 2'si erkektir. Grup 2 yaşları 2-6 arasında değişen 7 sağlıklı çocuktan oluşmaktadır. Bu grupta ki çocukların 5'i kız 2'si erkektir. Grup 3 ise yaşları 6-10 arası değişen toplam 10 sağlıklı çocuktan oluşmaktadır. Bu gruptaki çocukların 4'ü kız, 6'sı erkektir. Çalışmada ki toplam 22 çocuğun 12'si kız 10'u erkektir.

Tablo 3.1. Sağlıklı bebek ve çocuk gruplarının yaş ve cinsiyet dağılımları

	Yaş	Çocuk Sayısı	Cinsiyeti	
		n	K	E
Grup 1	0-2	5	3	2
Grup 2	2-6	7	5	2
Grup 3	6-10	10	4	6
Toplam : 22			12	10

Gruplarda yer alan her bir bebek/çocukların bireysel sonuçları dahil oldukları yaş gruplarının içerisinde olmak üzere tek tek tablo 3.2, 3.3, 3.4 de verilmektedir.

Ayrıca tüm yaş gruplarında 24. ve 48. saatlerdeki CD3+25+, CD3+69+, CD25+, CD69+, CD3+ % ve Mnx değerlerinin median ve alt-üst sınır değerleri sırasıyla tablo 3.5, 3.6, 3.7 de sunulmaktadır.

Tablo 3.2. 0-2 yaş grubunun aktivasyon belirleyicilerinin 24. ve 48. saatlerdeki ekspresyonlarının değerleri

0-2 Yaş Grubu			24 S PHA*									48 S PHA*								72S PHA**
			CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		CD 3+	CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		Blast
Adı Soyadı		YAŞ (AY)	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%
HŞ	K	23	36.6	3.69	65.6	4.26	67	7.16	89.4	29.9	70.8	52.4	4.86	65.2	5.38	86.9	11.4	91.8	26.8	86
AY	E	12	54.7	5.21	64.9	6.57	95.3	19.6	97.9	51.7	68.6	91.3	5.68	84.3	7.52	99.5	30.7	88.6	22	90
DG	E	6	56.6	5.51	79.2	5.96	98.1	23.8	97.6	50.9	80.7	91.4	6.62	80.7	8.39	99.1	28.6	85.5	25.3	90
FÇ	K	15	53.1	3.18	57.1	3.93	88.8	16.4	91.8	36.3	64	75	4.5	47.9	5.82	95	28.9	61.2	15.4	94
SA	K	6	41.3	3.67	57	3.99	97	20.6	96	41.8	59.1	93.7	4.22	84.8	5.64	99.8	47.2	87.7	22.2	88

* Akım sitometrik yöntem

** Işık mikroskopuyla morfolojik yöntem

Tablo 3.3. 2-6 yaş grubunun aktivasyon belirleyicilerinin 24. ve 48. saatlerdeki ekspresyonlarının değerleri

* Akım sitometrik yöntem

2-6 Yaş Grubu			24 S PHA*									48 S PHA*								72S PHA**
			CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		CD 3+	CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		Blast
Adı Soyadı		YAŞ (YIL)	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%
SY	K	2	81	3.51	91.2	4.44	93.5	12	98.8	50.8	92.2	97.4	48.3	99.6	62.7	97.9	20.42	99.2	22.46	87
BA	E	4	35.8	5.74	45.1	7.03	96.9	30.7	94	61.8	50.1	82.6	6.84	72.1	8.66	97.1	69.5	79.5	23.8	95
İT	K	3	37.2	4.93	48	6.96	74.1	15.9	92.8	49.8	55.8	43.3	4.76	56.7	5.92	89.6	20.7	92.8	40.4	90
SH	K	4.5	35.3	2.76	52.8	3.26	74.2	12.5	89.7	38.3	57.9	66.4	6.06	61	6.79	81.6	27.5	80	22.4	93
MA	E	4	22.5	3.23	48.2	3.63	80.7	18.3	93.7	75.7	50.9	58.7	5.02	44.8	5.84	80.3	41.8	77.3	26.7	91
NA	K	2.5	49.5	2.26	68.1	2.95	87.1	14.5	95.7	57.2	73.6	77.3	4.58	67.6	5.98	89.2	19.1	82	27.4	96
ÖK	K	5	34.1	1.95	50.5	2.65	76.9	10.2	90.9	45.1	55.7	46.7	4.88	68.6	4.98	77.1	30.4	79.6	29	90

** Işık mikroskopuyla morfolojik yöntem

Tablo 3.4. 6-10 yaş grubunun aktivasyon belirleyicilerinin 24. ve 48. saatlerdeki ekspresyonlarının değerleri

6-10 Yaş Grubu			24 S PHA*									48 S PHA*								72S PHA**
			CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		CD 3+	CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		Blast
Adı Soyadı		YAŞ (YIL)	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%
EMD	K	7	37.3	4.50	56	5.27	95	18.4	98	55.8	56.8	88.5	4.73	75.6	6.05	98	21	81.6	19	82
MAT	E	10	22.5	2.94	43.7	3.54	76.1	14.4	87.9	68	49.1	61.7	4.78	61.4	6.31	80.3	31.9	78.7	40.7	94
ZY	E	9	28.1	3.33	43.2	3.83	78.7	17.4	86.2	53.5	50.2	71.8	5.42	61	7.08	91.4	34.8	72.3	29.5	92
MM	E	8	43.2	2.76	69.7	3.06	90.9	19.3	96.3	52.6	74.1	79.4	6.23	69.5	7.47	87.3	26.7	79	26.8	93
E K	E	9	18.7	2.41	44.7	2.54	86.9	11.5	95.9	43.9	47.1	74.4	5.44	69.8	6.22	87.1	21.6	80	26	90
FH	E	7	25.6	3.11	42.5	3.53	70.3	12.5	91.3	12.5	51	47.7	6.52	50.3	7.31	91.5	36.7	77	28.5	94
ÖA	K	7	28.8	2.31	50.6	2.72	59.6	14	74.1	48.8	57.6	65.9	4.96	65.4	5.95	85.2	27.3	81	23.8	88
EK	E	9	18.6	3.80	50.3	3.64	77.8	17.6	90.8	52.3	55	46.3	4.61	57.9	4.81	66.9	28.5	70.6	25.6	90
SG	K	10	28.9	2.52	56.1	2.9	83.7	14.5	92.1	50.5	61.7	62	5.46	60.8	6.39	86.8	35.2	71.6	28	91
DD	K	10	13.6	2.69	36.7	2.92	60.1	10.5	86	37.1	45.4	51.8	5.4	69.5	5.75	80.7	31	83.2	32.7	93

* Akım sitometrik yöntem , ** Işık mikroskopuyla morfolojik yöntem

Tablo 3.5. 0-2 yaş grubunun median ve alt-üst sınır değerleri

0-2 Yaş Grubu n : çocuk sayısı	24 S PHA*									48 S PHA*								72S PHA**
	CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		CD 3+	CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		Blast
n : 5	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%
Median	53.1	3.69	64.9	4.26	95.3	19.6	96	41.8	68.6	91.3	4.86	80.7	5.82	99.1	28.9	87.7	22.2	90
min	36.6	3.18	57	3.93	67	7.16	89.4	29.9	59.1	52.4	4.22	47.9	5.38	86.9	11.4	61.2	15.4	86
Max	56.6	5.51	79.2	6.57	98.1	23.8	97.9	51.7	80.7	93.7	6.62	84.8	8.39	99.8	47.2	91.8	26.8	94

* Akım sitometrik yöntem

** Işık mikroskopuyla morfolojik yöntem

Tablo 3.6. 2-6 yaş grubunun median ve alt-üst sınır değerleri

2-6 Yaş Grubu n : çocuk sayısı	24 S PHA*									48 S PHA*								72S PHA**
	CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		CD 3+	CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		Blast
n : 7	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%
Median	85.8	3.23	50.5	3.63	80.7	14.5	93.7	50.8	55.8	66.4	5.02	67.6	5.98	89.2	27.5	80	26.7	91
min	22.5	1.95	45.1	2.65	74.1	10.2	89.7	38.3	50.10	43.3	4.58	44.8	4.98	77.1	19.1	77.3	22.4	87
Max	81	5.74	91.2	7.03	96.9	30.7	98.8	75.7	92.2	97.4	48.3	99.6	62.7	97.9	69.5	99.2	40.4	96

*Akım sitometrik yöntem

** Işık mikroskopuyla morfolojik yöntem

Tablo 3.7. 6-10 yaş grubu ve total median, alt-üst sınır değerleri

Yaş Grubu n : çocuk sayısı	24 S PHA*										48 S PHA*								72S PHA**
	CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		CD 3+	CD 3+25+		CD 3+69+		CD 25+		CD 69+		Blast	
n : 10	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	MnX	%	
Median	26.85	2.85	47.5	3.295	76.25	14.15	91.05	51.4	53	63.95	5.41	63.4	6.265	86.95	29.75	78.85	27.4	91.5	
min	13.6	2.31	36.7	2.54	59.6	10.50	74.1	12.50	45.4	46.3	4.61	50.3	4.81	66.9	21	70.6	19	82	
Max	43.2	4.50	69.7	5.27	95	19.30	98	68	74.1	88.5	6.52	75.6	7.47	98	36.7	83.2	40.7	94	
Total																			
Median	35.55	3.205	51.7	3.6350	82.2	15.2	92.45	50.65	57.2	69.1	5.21	66.5	6.135	88.25	28.75	80	26.35	90.5	
min	13.6	1.95	36.7	2.54	59.6	7.16	74.1	12.5	45.4	43.3	4.22	44.8	4.81	66.9	11.4	61.2	15.4	82	
Max	81	5.74	91.2	7.03	98.1	30.7	98.8	75.7	92.2	97.4	48.3	99.6	62.7	99.8	69.5	99.2	40.7	96	

*Akım sitometrik yöntem

** Işık mikroskopuyla morfolojik yöntem

CD 3+25+ T Lenfositlerin 24. ve 48. Saatlerdeki % ve Mnx Median , Alt- Üst Sınırları

Grup 1'in T lenfositlerinin CD3+25+ % değerlerinin medianı 24. saatte 53,1 (alt-üst sınır 36,6-56,6), 48. saatte 91,3 (alt-üst sınır 52,4- 93,7), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 3,69 (alt-üst sınır 3,18-5,51), 48. saatte 4,86 (alt-üst sınır 4,22-6,62) dir.

Grup 2'nin T lenfositlerinin CD3+25+ % değerlerinin medianı 24. saatte 85,8 (alt-üst sınır 22,5-81), 48. saatte 66,4 (alt-üst sınır 43,3-97,4), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 3,23 (alt-üst sınır 1,95-5,74), 48. saatte 5,02 (alt-üst sınır 4,58-48,3) dir.

Grup 3'ün T lenfositlerinin CD3+25+ % değerlerinin medianı 24. saatte 26,85 (alt-üst sınır 13,6-43,2), 48. saatte 63,95 (alt-üst sınır 46,3-88,5), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 2,85 (alt-üst sınır 2,31-4,50), 48. saatte 5,41 (alt-üst sınır 4,61-6,52) dir.

Total T lenfositlerinin CD3+25+ % değerlerinin medianı 24. saatte 35,55 (alt-üst sınır 13,6-81), 48. saatte 69,1 (alt-üst sınır 43,3-97,4), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 3,20 (alt-üst sınır 1,95-5,74), 48. saatte 5,21 (alt-üst sınır 4,22-48,3) dir.

CD 3+69+ T Lenfositlerin 24. ve 48. Saatlerdeki % ve Mnx Median , Alt- Üst Sınırları

Grup 1'in T lenfositlerinin CD3+69+ % değerlerinin medianı 24. saatte 64,9 (alt-üst sınır 57-79,2), 48. saatte 80,7 (alt-üst sınır 47,9-84,8), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 4,26 (alt-üst sınır 3,93-6,57), 48. saatte 5,82 (alt-üst sınır 5,38-8,39) dir.

Grup 2'nin T lenfositlerinin CD3+69+ % değerlerinin medianı 24. saatte 50,5 (alt-üst sınır 45,1-91,2), 48. saatte 67,6 (alt-üst sınır 44,8-99,6), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 3,63 (alt-üst sınır 2,65-7,03), 48. saatte 5,98 (alt-üst sınır 4,98-62,7) dir.

Grup 3'ün T lenfositlerinin CD3+69+ % değerlerinin medianı 24. saatte 47,5 (alt-üst sınır 36,7-69,7), 48. saatte 63,4 (alt-üst sınır 50,3-75,6), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 3,29 (alt-üst sınır 2,54-5,27), 48. saatte 6,26 (alt-üst sınır 4,81-7,47) dir.

Total T lenfositlerinin CD3+69+ % değerlerinin medianı 24. saatte 51,7 (alt-üst sınır 36,7-91,2), 48. saatte 66,5 (alt-üst sınır 44,8-99,6), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 3,63 (alt-üst sınır 2,54- 7,03), 48. saatte 6,13 (alt-üst sınır 4,81-62,7) dir.

CD 25+ T Lenfositlerin 24. ve 48. Saatlerdeki % ve Mnx Median , Alt- Üst Sınırları

Grup 1'in T lenfositlerinin CD25+ % değerlerinin medianı 24. saatte 95,3 (alt-üst sınır 67-98,1), 48. saatte 99,1 (alt-üst sınır 86,9-99,8), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 19,6 (alt-üst sınır 7,16- 23,8), 48. saatte 28,9 (alt-üst sınır 11,4-47,2) dir.

Grup 2'nin T lenfositlerinin CD25+ % değerlerinin medianı 24. saatte 80,7 (alt-üst sınır 74,1-96,9), 48. saatte 89,2 (alt-üst sınır 77,1-97,9), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 14,5 (alt-üst sınır 10,2- 30,7), 48. saatte 27,5 (alt-üst sınır 19,1-69,5) dir.

Grup 3'ün T lenfositlerinin CD25+ % değerlerinin medianı 24. saatte 76,25 (alt-üst sınır 59,6-95), 48. saatte 86,95 (alt-üst sınır 66,9-98), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 14,5 (alt-üst sınır 10,5-19,3), 48. saatte 29,7 (alt-üst sınır 21-36,7) dir.

Total T lenfositlerinin CD25+ % değerlerinin medianı 24. saatte 82,2 (alt-üst sınır 59,6-98,1), 48. saatte 88,25 (alt-üst sınır 66,9-99,8), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 15,2 (alt-üst sınır 7,16- 30,7), 48. saatte 28,75 (alt-üst sınır 11,4-69,5) dir.

CD 69+ T Lenfositlerin 24. ve 48. Saatlerdeki % ve Mnx Median , Alt- Üst Sınırları

Grup 1'in T lenfositlerinin CD69+ % değerlerinin medianı 24. saatte 96 (alt-üst sınır 89,4-97,9), 48. saatte 87,7 (alt-üst sınır 61,2-91,8), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 41,8 (alt-üst sınır 29,9-51,7), 48. saatte 22,2 (alt-üst sınır 15,4-26,8) dir.

Grup 2'nin T lenfositlerinin CD69+ % değerlerinin medianı 24. saatte 93,7 (alt-üst sınır 89,7-98,8), 48. saatte 80 (alt-üst sınır 77,3-99,2), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 50,8 (alt-üst sınır 38,3-75,7), 48. saatte 26,7 (alt-üst sınır 22,4-40,4) dir.

Grup 3'ün T lenfositlerinin CD69+ % değerlerinin medianı 24. saatte 91,05 (alt-üst sınır 74,1-98), 48. saatte 78,85 (alt-üst sınır 70,6-83,2), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 51,4 (alt-üst sınır 12,5-68), 48. saatte 27,4 (alt-üst sınır 19-40,7) dir.

Total T lenfositlerinin CD69+ % değerlerinin medianı 24. saatte 92,45 (alt-üst sınır 74,1-98,8), 48. saatte 80 (alt-üst sınır 61,2-99,2), Mnx değerlerinin medianı 24. saatte 50,65 (alt-üst sınır 12,5-75,7), 48. saatte 26,35 (alt-üst sınır 15,4-40,7) dir.

CD 3+ T Lenfositlerin 24. Saatte % ve Mnx Median , Alt- Üst Sınırları

Grup 1'in T lenfositlerinin 24. saatte CD3+ % değerlerinin medianı 68,6 (alt-üst sınır 59,1-80,7) dir.

Grup 2'nin T lenfositlerinin 24. saatte CD3+ % değerlerinin medianı 55,8 (alt-üst sınır 50,1-92,2) dir.

Grup 3'ün T lenfositlerinin 24. saatte CD3+ % değerlerinin medianı 53 (alt-üst sınır 45,4-74,1) dir.

Total T lenfositlerinin 24. saatte CD3+ % değerlerinin medianı 57,2 (alt-üst sınır 45,4-92,2) dir.

PHA ile Uyarılmış T Lenfositlerin 72. Saatte % Medianları

Grup 1'in PHA ile uyarılmış T lenfositlerinin 72. saatte ki % değerlerinin medianı 90 (alt-üst sınır 86-94) dır.

Grup 2'nin PHA ile uyarılmış T lenfositlerinin 72. saatte ki % değerlerinin medianı 91 (alt-üst sınır 87-96) dır.

Grup 3'ün PHA ile uyarılmış T lenfositlerinin 72. saatte ki % değerlerinin medianı 91,5 (alt-üst sınır 82-94) dır.

PHA ile uyarılmış total T lenfositlerinin 72. saatte ki % değerlerinin medianı 90,5 (alt-üst sınır 82-96) dır.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

4.1. Tartışma

İmmünolojik araştırmalarda lenfosit proliferasyonunun belirlenmesi çok sık kullanılan bir yöntemdir. Hücresel immüitenin önemli bir parçasını oluşturan T lenfositler ve alt gruplarının sayısal değerlendirilmesi özellikle primer ve sekonder immün yetmezlik hastalıklarının, lenfoproliferatif ve otoimmün hastalıkların tanısında ve hastaların izleminde yaygın olarak kullanılmaktadır. (12,19,32,74,)

İmmün sistemin olgunlaşma sürecinde bir çok faktör etkin rol oynamaktadır. Bunlar içinde ırka ait genetik özellikler ile sosyoekonomik düzey, enfeksiyon sıklığı, beslenme gibi çevresel etkenler başta gelmektedir.(19,26,32,38,42,45)

Literatürde çocukluk çağında periferik kan lenfosit grup ve altgruplarının doğumdan başlayarak yaşla birlikte fizyolojik olarak kantitatif ve kalitatif değişiklikler gösterdiğini bildiren çalışmalar yer almaktadır.(38,45) Bu değişikliğin yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde immün sistemin başta hücresel immünite olmak üzere tüm komponentlerinin olgunlaşmamış ve deneyimsiz oluşundan kaynaklandığı belirtilmiştir.Yapılan araştırmalarda total olgun T hücre belirleyicisi olan CD3 ün 0-2 yaş arası artış gösterdiği ve sonra yaşla birlikte azaldığı bulunmuştur. CD3+ olgun T lenfositlerin yaşla birlikte gösterdiği bu tipik değişimin, özellikle ilk 2 yaşta sık geçirilen viral enfeksiyonlara bağlı olduğu düşünölmektedir. Bu artış antijenik uyarılarla immün sistemin deneyim kazanıp hızla olgunlaşmasına bağlanmaktadır. (19,31,42,45)

Yaş ilerledikçe ve yabancı antijenik yapılar immün sistemi uyardıkça, hücresel immünite de tüm immün sistem gibi olgun ve eksiksiz yanıt oluşturma yeteneği kazanmaktadır. İşte bu farklılık nedeniyle çocukluk döneminde immün sistemin erişkinlerle kıyaslanması doğru bir yaklaşım olmamakta ve bu dönemde hücresel immüitenin temel elemanları olan T lenfositlerin (CD3+) sayısal değerlendirilmesinden elde edilen sonuçların aynı yaştaki sağlıklı çocuklardan elde edilen ölçümlerle karşılaştırılması gerekliliği doğmaktadır. (19,22,31,32,45,56)

T lenfosit aktivasyonu immün yanıtın gelişiminde önemli bir basamaktır ve immün yeterliliğin değerlendirilmesinde kullanılır. (34)

Bunun için lenfositler, değişik mitojen,antijen veya monoklonal antikolar ile stimüle edilerek ölçümler yapılır.(34)

PHA ve Con A T lenfositleri için önemli mitojenlerdir. PWM ise T ve B lenfosit uyarandır. (28,35)

Fletcher ve ark. ile Özerol ve ark. nın yaptığı çalışmalarda, periferik kan hücre ürünlerinin PHA 'ya 72. saatte yüksek mitojenik yanıt verdiği gösterilmiştir. (28,60)

Yapılan T lenfosit aktivasyon çalışmalarında lenfosit proliferatif yanıtı, vücut sıvılarında ki aktivasyon belirleyicilerinin yoğunluklarının ve sitokin salgılarının ölçümü ile belirlenir.(34,57)

Dolaşımda ki uyarılmamış T lenfositler normal koşullarda aktive değildirler. T lenfositlerin PHA ile stimülasyonu sonrası aktivasyon belirleyicileri (CD25+, CD69+) eksprese edilir ve zamana bağlı olarak indüklenir. (39)

Literatürde, akım sitometrisi ile yapılan çalışmaların, diğer yöntemlere göre (radyoaktif-BrdU,morfolojik) daha basit, kolay, güvenilir, hassas, hızlı yapıldığı belirtilmiştir. Ayrıca birçok yüzey antijeninin ekspresyonlarının hücre düzeyinde aynı anda kısa sürede ölçülebilmesi ve sonuçları istenen in-vivo çevreyi yansıtarak vermesinin akım sitometrisi çalışmalarının avantajlarından olduğu da belirtilmiştir.(34)

Hassett ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar sonucunda aktivasyon belirleyicilerinin ekspresyonu ve artışının birbiri ile direk ilişkili olmasa da, uyumlu bir gelişim gösterdiği tespit edilmiştir.(34)

Nitekim Mardiney ve ark. tarafından T lenfositlerin PHA ile uyarılmasından 30 dk sonra hücre yüzeyinde ilk olarak CD69+ eksprese edildiği saptanmıştır. Ayrıca CD69+ un uyarıldıktan sonra lenfositlere mitojenik yanıtın aynı gün içerisinde ölçülebileceği tek aktivasyon belirleyicisi olduğu bildirilmiştir.(35,53)

Hassett J. tarafından yapılan araştırmalarda CD69+ aktivasyon belirleyicisinin 24. saatte, CD25+in ise 48. saatte ölçülen değerlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Buna göre CD69+ un daha hızlı eksprese olduğu, CD25+ in ise daha yavaş bir artış ile daha geç eksprese edildiği düşünülmektedir. (34,35)

Heitger ve ark. tarafından stimülasyon sonrası CD69+ ekspresyon sonuçlarının lenfoproliferatif yanıt ile korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. (35)

Tüm bu bilgiler ışığında, bu ön çalışmada 0-10 yaş arasında 3 ayrı grup olmak üzere toplam 22 sağlıklı bebek ve çocukta periferik kan invitro lenfosit fonksiyonu, lenfosit aktivasyonu akım sitometrik ve ışık mikroskopunda morfolojik yöntemle incelenmiştir.

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak periferik kan hücreleri PHA ile uyarılarak 72 saat inkübe edilmiştir.(28,60) Bu işlem sırasında stimüle, edilen T lenfositlerin fonksiyonlarını ve proliferatif yanıtlarını belirlemek amacıyla, CD3+, CD25+, CD69+ gibi yüzey ve aktivasyon belirleyicilerinin 24.ve 48. saatlerde akım sitometrisinde ekspresyonlarının ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca 72. saatte ışık mikroskopuyla morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

Hasset J. nin sonuçlarına benzer olarak, stimülasyon sonrası CD69+ için 24. saatte, CD25+ için 48. saatte en yüksek aktivasyon değerleri gözlenmiştir.(34)

Çalışmamızda 24. ve 48. saatlerde ki % ve Mnx değerleri karşılaştırıldığında, 48. saatte özellikle 6-10 yaş grubu çocuklarda T lenfositlerde ki CD25+ yüzey belirleyicilerinin daha fazla eksprese oldukları belirlenmiştir. Bu durumda 48. saatte ki aktivasyon değerleri daha anlamlı bulunmuştur.

Ayrıca 24. ve 48.saatlerde gruplar arası ortalamaların karşılaştırılması yapılmış 0-2 ve 2-6 yaş gruplarında ($p > 0,017$) anlamlı bir farka rastlanmaz iken 6-10 yaş grubunda CD3+25+ ($0,005 < 0,01$), CD3+69+ ($0,007 < 0,017$), CD69+ ($0,005 < 0,017$), CD25+ ($0,005 < 0,017$) median, alt-üst sınır değerlerinde anlamlı bir fark görülmüştür. ($p < 0,017$) Bununla birlikte 24. ve 48. saatlerdeki değerlerle 72. saatte elde edilen değerler arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir.

Çalışmamızda 22 sağlıklı Türk bebek ve çocuğunda gruplar arası karşılaştırmada T lenfosit median değerlerinin yaşla birlikte genel olarak azalma gösterdiğini, özellikle CD3+25+ değeri için 0-2/6-10 ve 2-6/6-10 yaş gruplarının yüzde değişimleri arasında belirgin bir fark olduğunu saptanmıştır. ($p < 0,025$)

0-2, 2-6 yaş grupları arasında ki değerler birbirine oldukça yakınken 6-10 yaş grubunun CD3+25+ değerinde belirgin bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre yaş arttıkça T lenfosit yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve aktivasyonunun azaldığı düşünülebilir.

Ayrıca yine zamanlar arası % değişimlerin karşılaştırılmasında 48. saatte ki değerlerin 24. saate göre % değişimleri gözlenmiş burada da iki zaman arasında 6-10 yaş grubunda CD3+25+ değeri yüzde değişimlerinin 2-6 ve 0-2 yaş grubuna göre farkı ortaya çıkmıştır. ($p < 0,05$) 0-2, 2-6 yaşta artış oranı birbirine oldukça yakınken, 6-10 yaş grubunda ki oranın daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bunlarla birlikte tüm değerlerin her yaş grubu için 24. ve 48. saatlerde kendi içinde ve karşılaştırmalı olarak korelasyonuna bakıldığında beklendiği üzere ;

0-2 yaş grubunda 48.saatte CD3+69+ ve CD25+ arasında ($p < 0,05$),

2-6 yaş grubunda 24.saatte CD69+ ve CD25+ arasında ($p < 0,05$),

6-10 yaş grubunda 24.saatte CD3+25+ ve CD3+69+, CD25+ ve CD69+ ve 48.saatte CD3+25+ ve CD3+69+ arasında kuvvetli bir ilişki ortaya çıktığı görülmüştür. ($p < 0,05$) 6-10 yaş grubunda çocuk sayısı diğer gruplara göre daha fazla olduğu için bu grupta daha anlamlı farklar ve sonuçlar elde edilmiştir.

Yine gruplara ayırmadan 24. ve 48. saatlerde bütün değerlerin yüzde değişimlerinin kendi aralarında ki korelasyonuna baktığımızda CD3+25+/CD3+69 ve CD25+/CD69+ arasında korelasyonun varlığı gözlenmiştir. (p<0,05)

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlarda literatürde verilen bilgilerle uyum göstermektedir.(34) Bu saptanan ilişkilerle aynı saat içindeki T hücreleri üzerinde CD3+25+, CD3+69+ ve ayrı ayrı CD25+, CD69+ olarak farklı yüzey antijenlerinin arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir. 24. saat içerisinde her iki aktivasyon belirleyicisi de artış göstererek CD69 max değerlerine ulaşırken, 48. saatte CD69+ azalmış CD25+ artarak max düzeyine ulaşmıştır.

Çalışılan sağlıklı çocuk sayısının az olmasına rağmen elde edilen farklar değerlendirildiğinde literatürde belirtildiği gibi kullanılan iki aktivasyon belirleyicisinin de birbirleriyle oldukça uyumlu olduğu, korelasyon gösterdiği ve benzer şekilde hücrelerin stimüle edildiği saptanmıştır. (34)

Yine yapılan çalışmalarla benzer olarak, T lenfosit aktivasyon belirleyicilerinin ekspresyonlarının yaşla birlikte değiştiği saptanmıştır.(19,32,38,45) Çalışmamızın sonucunda sağlıklı çocuklarda farklı aktivasyon belirleyicilerinin (CD25+, CD69+) kendi aralarında uyumlu olduğu, yaşla ve saatle birlikte değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir. Temel olarak CD25+ aktivasyon belirleyicisi T lenfositler üzerinde yada tek başına (CD3+25+, CD25+) artış gösterirken CD69+ da bununla korele olarak aktive olmaktadır.

24. saatte CD69+, 48.saatte CD25+ daha fazla eksprese edilmektedir. Fakat bu yüzey antijenlerinin artışı 6-10 yaş arasında diğer gruplara göre değişiklik göstermekte ve yaşla birlikte aktivasyon belirleyicilerinin değerleri azalmaktadır. Bu değişikliğin temel nedeninin immün sistem ve onu oluşturan hücrelerin yaşla ilişkili olarak gösterdiği fizyolojik gelişim olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda hem klasik morfolojik yöntem, hem de bu yönteme alternatif olabilecek akım sitometrik yöntem kullanılarak sağlıklı bebek ve çocuklarda lenfosit

aktivasyonları ölçüldü ve iki yöntem birbiriyle karşılaştırıldı. Sonuçta her iki yöntemde kullanılabileceği, akım sitometrik yöntemin daha hızlı sonuç verdiği belirlendi.

Gözden geçirilebildiği kadarı ile literatürde sağlıklı çocuklarda in-vitro lenfosit fonksiyonunun, morfolojik ve akım sitometrisinde aktivasyon belirleyicilerinin yoğunluğunun ölçülüp değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu nedenle çalışmamız değişik yaş gruplarında sağlıklı Türk bebek ve çocuklarında periferik kanda lenfositlerin, in-vitro fonksiyonel kapasitelerinin 2 ayrı şekilde değerlendirildiği ilk çalışma olması yönüyle önem göstermektedir. Ancak daha anlamlı sonuçlar elde edilebilmesi ve standart değerlerin oluşturulabilmesi açısından daha fazla örnekle yapılan daha kapsamlı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

4.2. Sonuç

Sağlıklı Türk çocuklarında in-vitro lenfosit fonksiyonlarının farklı iki yöntem kullanılarak değerlendirilmesi ve in-vitro lenfoproliferatif yanıtın normal düzeyinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışma, yaşları 0-2, 2-6, 6-10 arasında değişen 3 farklı yaş grubundan 22 sağlıklı çocukta gerçekleştirilmiştir. Çalışmada her çocuktan alınan kan örneklerinde, T lenfositlerin PHA ile uyarılmasından sonra, CD3+25+, CD3+69+, CD25+, CD69+, CD3+ yüzey antijenlerinin ekspresyonları double-colour direkt immünfloresan yöntemi kullanılarak akım sitometrisinde ölçülmüştür. 72. saat sonunda da lenfoproliferatif yanıt ışık mikroskopuyla ölçülerek iki yöntemden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu araştırmamızdan şu sonuçlar elde edilmiştir;

- Periferik kandaki lenfositlerin değerleri her bir çocukta farklılık göstermektedir ve yaşla birlikte değişmektedir. Bu nedenle lenfoproliferatif yanıtın sağlıklı olarak değerlendirilebilmesi için çocuk yaş grubunun normallerinin oluşturulması gerekmektedir. Ancak yapılan bu çalışmada örnek sayımız yetersiz olduğu için, istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiş ve referans değerler oluşturulamamıştır.
- PHA ile stimülasyon sonrasında T lenfositlerin aktive oldukları ve aktivasyon belirleyicilerini eksprese ettikleri belirlenmiştir.
- CD69+ aktivasyon belirleyicisinin 24. saatte, CD25+ in ise 48. saatteki değerlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Buna göre CD69+ daha hızlı eksprese olurken, CD25+ ise daha yavaş bir artış ile daha geç eksprese edilmektedir.
- Yaşla birlikte T lenfosit median değerleri azalma göstermektedir ve T lenfosit yüzey antijenlerinin ekspresyonu da yaş arttıkça azalmaktadır.

- 24. saat içerisinde iki aktivasyon belirleyicisi de artarak aktive olurken, 48. saatte CD69+ un aktivasyon deęerleri dūřmūř, CD25+ in ise artmıřtır.
- CD3 yūzey antijeni oranları 0-2 yař arası artış gōsterirken, daha sonra yaşla birlikte azalmıştır.
- Çalışmamızda hem klasik morfolojik yōntem, hem de bu yōnteme alternatif olabilecek akım sitometrik yōntem kullanılarak sağlıklı bebek ve çocuklarda lenfosit aktivasyonları ōlōldū ve iki yōntem birbiriyle karşılaştırıldı. Sonuçta her iki yōnteminde kullanılabileceği, akım sitometrik yōntemin daha hızlı sonuç verdiği belirlendi. Bu çalışmanın standardize edilebilmesi için daha fazla ōrnekle yapılan daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Abbas AK, Lichtman AH. General Properties of immune responses. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 2003:3-16
2. Abbas AK, Lichtman AH. Innate Immunity. In Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. W.B.Saunders Company, 2003:275-298
3. Abbas AK, Lichtman AH. Antibodies and Antigens. In Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. W.B.Saunders Company, 2003:43-65
4. Abbas AK, Lichtman AH. Antigen Processing and Presentation to T Lymphocytes. In Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. W.B.Saunders Company, 2003:81-105
5. Abbas AK, Lichtman AH. Lymphocyte Olgunation and Expression of Antigen Receptor Genes. In Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. W.B.Saunders Company, 2003:129-163
6. Abbas AK, Lichtman AH. Antigen Receptors and Accessory Molecules T Lymphocytes. In Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. W.B.Saunders Company, 2003:105-127
7. Abbas AK, Lichtman AH. Cells and Tissues of the Immun System . In Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. W.B.Saunders Company, 2003:16-41
8. Abbas AK, Lichtman AH. Activation of T Lymphocytes. In Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. W.B.Saunders Company, 2003:163-189
9. Abbas AK, Lichtman AH. Cytokines. In Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. W.B.Saunders Company, 2003:243-275
10. Adedeji M. O. Monoclonal Antibody-Defined Lymphocyte Subsets in Normal Nigerians. *Angiology*. 1989;40:977-981

11. Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol. Today* 1999;2:331-335
12. Ahmed A.S., Gogal R.M., Walsh J.E., A New Rapid and Simple Non-Radioactive Assay to Monitor and Determine the Proliferation of Lymphocytes: an Alternative to H3 Thymidine Incorporation Assay. In *Journal of Immunological Methods*.1994;211-224
13. Bilgehan H., *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*.2005
14. Bingyi S, Ming C, Yeyong Q, Chunbai M, Wenqiang Z. The effect of anti-CD25 monoclonal antibody to the lymphocytes in the peripheral blood of the recipient of kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*.2003;35:243-245
15. Bonifer C, Faust N, Geiger H, Müller A.M. Developmental changes in the differentiation capacity of haematopoietic stem cells. *Immunol. Today*. 1998;19:236-241
16. Cebrian M, Yagüe E, Rincon M, Lopez-Botet M, De Landazuri MO, Sanchez-Madrid E: Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* .1988;168:1621-1637
17. Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cell talk to each other ? *Nature* 1994;367: 425-428
18. Collins D. P., Multi-system Approach to Analysis of T-Lymphocyte Activation by Flow Cytometry : utilization of Intracellular Cytokine Expression, Cytokine Receptor Expression, Cytokine Receptor Expression, and Quantification of Cytokine Secretion as an Indicator of Activation. *Clinical Immunology*.1998; 140-145
19. Comans-Bitter W.M, Groot R, Beemd R, Neijens H.J, Hop W.C.J, Groeneveld K, Hooijkaas H, Dongen J.J.M. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. *J. Pediatr*. 1997;130:338-393
20. Dalakas M.C. Basic aspects of neuroimmunology as they relate to immunotherapeutic targets: Present and future prospects. *Ann Neurol* 1995;37:S1:218-224

21. Dalva K, Özcan M, Beksaç M. Flow Sitometri ve Hematoloji-Onkolojide Kullanım Alanları. Medikal Biyoteknoloji ve Moleküler Tıp Dergisi 1996;1:43-54
22. De Paoli P, Battisiti S, Santini G.F. Age-Related Changes in Human Lymphocyte Subsets: Progressive Reduction of the CD4 CD45R (Suppressor Inducer) Population. Clin. Immunolpath. 1998;48:290-296
23. Deniz G., Yılmaz M. T., Yıllar G. Flow Sitometri ve Tıpta Kullanımı. 2004
24. Deny T, Yogev R, Gelman R, Szuka C, Oleske J, Chadwick E, Cheng SC, Connor E. Lymphocyte Subsets In Healthy Children During the First 5 Years of Life. JAMA. 1992;267:1484-1488
25. Diker S. İmmunoloji. 1998
26. Ferreira C, Barthlott T, Garcia S, Zamoyska R, Stockinger B. Differential Survival of Naive CD4+ and CD8+ T cells. J. Immunol. 2000;165:3689-3694
27. Fleisher T. A., M.D. and Jack J.H. Bleesing, MD. Immune Function . Primary Immune Deficiencies : Presentation, Diagnosis and Management, 2000 : 1197-1202
28. Fletcher MA, Baron GC, Ashman MR, Fischl MA, Klimas NG. Use of whole blood methods in assessment of immune parameters in immunodeficiency states. Diagn Clin Immunol. 1987; 5(2): 69-81
29. Fletcher M.A., Urban R.G., Asthana D., Walling J., Friadlender A., Page J.B. Lymphocyte Proliferation, in ;Ed: Rose N.R., Manarico E.J., Folds J.D., Lane H.C., Namaruka R.M. Manual of clinical lab. immunology. ASM pres. Washington DC. 1997; 313-319
30. Gabriel H, Scmitt B, Kindermann W. Age-related increase of CD45RO⁺ lymphocytes in physically active adults. Eur. J. Immunol. 1993;23:2704-2706
31. Globerson A, Effors R.B. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in aged. Immunol. Today. 2000;21:515-520
32. Hannel I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, Debruyere M. Developmental and oligunational changes in human blood lymphocyte subpopulations. Immunol. Today. 1992;13:215-218

33. Hara T, Jung LKI, Bjorndahl JM, Fu SM: Human T cell activation III. Rapid induction of a phosphorylated 28kD/32kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J Exp Med* ,1986;164:1998-2005
34. Hassett J.M., T- Lymphocyte Activation, in ;Ed: Rose N.R.,ManaricoE.J.,Folds J.D.,Lane H.C.,Namaruka R.M. *Manual of clinical lab.immunology.5th ASM pres. Washington DC. 1997;287-295*
35. Heitger A., Winklehner P., Obexer P., Eder J., Zelle-Reiser C., Kropshofer G., Thurnher M., Holter W., Defective T-Helper cell function after T-cell-depleting therapy affecting deneyimsiz and memory populations.2002; 4053-4062
36. Hicks M.J, Jones J.F, Minnich L.L, Weigle K.A, Thies A.C, Layton J.M. Age-Related Changes in T and B Lymphocyte Subpopulations in the Peripheral Blood: *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993;107:518-523
37. Hoshino T, Yamada A, Honda J, Imai Y, Nakai M, Inouse M, Sagawa K, Yokoyama M.M Oizumi K, Itoh K. Tissue-Specific Distribution and Age-Dependent Increase of Human CD 11b⁺T cells. *J. Immunol.* 1993;153:2237-2246
38. Hulstaert F, Hannel I, Deneys V, Munhyeshuli V, Reichert T, DE Bruyere M, Strauss K. Age-Related Changes in Human Blood Lymphocyte Subpopulations. *Clin. Immunol. Immunopathol.* C1994;70(2):152-158
39. Idiman E., *Nöroimmunolojide Temel Kavramlar.* 1997
40. Imboden J. B. T Lymphocytes and Natural Killer Cells. In Stites D.P, Terr A. I, Parslow T.G (eds). *Medical Immunology* 9th ed. Appleton and Lange, California, 1997 p:130-145
41. Kaşkıır N, Dodurgalı R, Atabay F, Can H, Öztürk S, Yıldız Ü, Poluman A. Bronşial Astım Profilaksisinde İnhalé Budesoninin Etki Değerlerinin Fonksiyonel ve İmmünolojik Parametreler İle Araştırılması
42. Katevas P, Lembesopoulos C, Kamitaki C, Sakellariou D, Douna V. Establishment of normal ranges of lymphocyte subpopulation in cord blood in peripheral blood in infants and in children. *Haema* 1999;2:145-151

43. Kotylo P.K, Sample R.B, redmond N.L, Hibner G.C Reference Ranges for Lymphocyte Subsets. Arch. Pathol. Lab. Med. 1991;115:181-184

44. Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, Ding A, Evans E, Barney C, Philips JH: Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 antigen. J exp Med 1998;167:1572-1585

45. Lee B.W. Yap HK, Chew FT, Quah TC, Prabhakaran K, Chan GSH, Wong SC, Seah CC. Age and Sex-Related Changes in Lymphocyte Subpopulation of Healthy Asian Subjects: From Birth to Adulthood. Cytometry. 1996;26:8-15

46. Leslie Hudson, Frank C. Hay, Mitogenic response in lymphocytes and effector cells; In Ed. Practical immunology, third edition, 1989. Blackwell Scientific Publications, Oxford London.

47. Lewis D.E, Harriman G.R Cells and tissues of the immune system. In Clinical Immunology Principles and Practice 1st ed. Eds. Rich R.R, Fleisher T.A, Schwartz B.D, Shearer W.T, Strober W. St. Louis, Mosby,1992, p:15-25

48. Lowell C. Fundamentals of Blood Cell Biology. In Stites D.P, Terr A. I, Parslow T.G (eds). Medical Immunology. 9th ed. Appleton and lange, California,1997, p: 9-25

49. Maino V.C, Suni M.A, Ruteinberg J.J. Rapid Flow Cytometric Method for Measuring Lymphocyte Subset Activation. Cytometry. 1995;20:127-133

50. Male D., Champion B., Cooke A, Owen M.: The Immune System. In Advanced Immunology. 2nded. Eds. D. Male, B. Champion,A. Cooke , M. Owen. Gower Med. Publ., London., 1991, p:1.1-1.15

51. Male D, Cooke A, Owen M, Champion B. Advanced Immunology. 3rd ed. Mosby, London 1996

52. Male D. Roitt I : Adoptive and Innate Immunity. In Immunology 2nd ed. Eds : Roitt I, Brostoff J. Male D. Churchill and Livingstone, London, 1989 ; 1-1.10

53. Mardiney M, Brown M.R, Fleisher T.A. Measurement of T-cell CD69 Expression: A Rapid and Efficient Means to Assess Mitogen-or Antigen-Induced Proliferative Capacity in Normals. Cytometry. 1996;26:305-310

54. Maurer H.R. Potential pitfall of (H3) thymidine techniques to measure cell proliferation. *Cell Tissue Kinet.*1981;14:111

55. McCloskey tW, Cavaliere T, Bakshi S, Harper R, Fagin J, Kohn N, Pahwa S. Immunophenotyping of Lymphocytes by Three-Color Flow Cytometry in Healty Newborns, Children and Adults. *Clin. Immunol. and Adults. Clin. Immunol. and Immunopathol.* 1997;84:46-55.

56. Miyaji C, Watanable H, Minagawa M, Toma H, Kawamura T, Nohara H, Nozaki H, Sato Y, Abo T. Numerical nad Functional Characteristics of Lymphocyte Subsets in Centenarians. *J. Clin. Immunol.* 1997;17:420-429

57. Nguyen X.D, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Klüter H. Flow Cytometric Analylsis of T Cell Proliferation in a Mixed Lymphocyte Reaction with Dendritic Cells. *Journal of Immunological Methods.*2003;57-68

58. Norman A., *Flow Cytometry.* Med Phys. 7: 609, 1980

59. Özbal Y., *Temel İmmünoloji.* Ankara, Nobel Tıp Kitabevi, 2000

60. Özerol H, Şenol M.,Ageitos A., Talmadge J.E, The Investigation of The Responses to PHA in the ratients of non-Hodgkin's Lymphoma who were Candidates for High Dose Chemotherapy, Autologous Bone Marrow, or Peripheral Stem Cell Transplantation, *T. Ö. Tıp Merkezi Dergis* 3(4):1996

61. Parslow T.G. Lymphocytes and Lymphoid Tissues. In Stites D.P, Terr A. I, Parslow T.G. (eds). *Medical Immunology* 9th ed. Appleton and Lange California, 1987 , 43-62

62. Parslow T.G. The Immune Response. In: Parslow T.G, Stites DP, Terry Al. *Medical Immunology.* New York: McGraw-Hill Companies,2001;61-71

63. Punt J.A, Singer A. T cell development. In Rich R.R, Fleisher T.A, Schwartz B.D, Shearer W.T, Strober W (eds). *Clinical Immunology Principles and Practice* 1sted. St Luis, mosby, 1997, p: 157-176.

64. Rich RR. The Human Immun Response. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Shoeder HW. *Clinical Immunology, Principles and Practice,* 2nd ed:New York, Mosby, 2001;1.1-1.13

65. Roitt I., Roitt's Essential Immunology. 9th Edition. Blackwell Science. 1997.
66. Sitites P.D, Terr A. I, Parslow T. G., Medical Immunology, 9. ed., 10:153-155
67. Steinman R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 1991; 9:271
68. Testa U, Pelosi E, Peschle C. the transferrin receptor.. *crit. Rev. Oncog.* 1993;4:241
69. Testi R, Philips JH, Lanier LL: Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering: Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular (Ca⁺⁺) and stimulation of protein kinase. *J Immunol* 1989;142:1854-1860
70. Testi R, Pulcinelli F, Cifone MG, Botti D, Del Grosso E, Riondine S, Frati L, Gazzaniga PP, Santoni A: Preferential involment of a phospholipase A2-dependent pathway in CD69-mediated platelet activation. *J Immunol* 1992;148:2867-2871
71. Wagner U, Burkhardt E, Failing K. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the H3-thymidine incorporation assay. *Vet. Immunol. and Immunopath.* 1999;70:151-159
72. Wegrzyn AN, Lederman HM. Assesment of Lymphocyte and Monocyte Function. In
 a. ED:Rich RR, Filleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroder HW. *Clinical Immunology Principles and Practice.* 2001. Mosby. England.
73. Weiss A., Cambier J.C., Lymphocyte Activation. *Current Opinion in Immunology* 2004, 16:285-287
74. Zhang S, Lukacs N.W, Lawless V.A, Kunkel S.L, Kaplan M.H. Cutting Edge: Differential expression of chemokins in Th1 and Th2 cells is dependent on Stat6 but not Stat4. *J. Immunol.* 2000;165:10-14

ÖZGEÇMİŞ

Ankara’ da 1979 yılında doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Ankara’da tamamladı. 1998 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2002 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldu. 2002 - 2003 yılları arasında Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Ortaöğretim Alan Öğretmenliği’nde Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2003-2006 yılları arasında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Eğitimi tamamladı.