

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

0-6 YAŞ GRUBU SAĞLIKLI TÜRK ÇOCUKLARINDA
TİMOPOEZİN İZLENMESİ

Dr. Akif KAVGACI

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Tıpta Uzmanlık Tezi

ANKARA

2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

0-6 YAŞ GRUBU SAĞLIKLI TÜRK ÇOCUKLARINDA
TİMOPOEZİN İZLENMESİ

Dr. Akif KAVGACI

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Tıpta Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. K. Aydan İKİNCİOĞULLARI

Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından
17H0230004 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2018

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Dr. Akif Kavgacı	Sınav tarihi: 18/09/ 2018
Anabilim/Bilim Dalı	: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Kamile Aydan İkinciçoğulları	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER		
Tezin Başlığı:	0-6 yaş grubu sağlıklı Türk çocuklarında Timopoezin İkmesi	
Tezin Niteliği:	<input checked="" type="checkbox"/> Ana Dal Uzmanlık Tezi	<input type="checkbox"/> Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	<input type="checkbox"/> 1	<input checked="" type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3

III. KARAR		
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak		
<input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne		
<input type="checkbox"/> Reddine		
<input type="checkbox"/> Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine		
<input checked="" type="checkbox"/> Oy birliği	<input type="checkbox"/> Oy çokluğu	ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız



Jüri Başkanı

Unvanı, Adı, Soyadı
Prof. Dr. Semra Atalay
Anabilim Dalı Başkanı



Jüri Üyesi

Unvanı, Adı, Soyadı

Prof. Dr. Kamile Aydan İkinciçoğulları
Pediatrik İmmünoloji – Allerji Bilim Dalı

Jüri Üyesi

Unvanı, Adı, Soyadı

Doç. Dr. Caner Aytekin

Dr. Sami Ulus Çocuk Hastanesi
Pediatrik İmmünoloji – Allerji Bilim Dalı



ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan, çalışma ahlakı ve disiplini adına çok şey öğreten en başta sevgili anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Semra Atalay ve tüm öğretim üyelerine,

Asistanlık eğitimim ve tez süresi boyunca bana büyük bir sabır ve anlayışla destek veren, deneyimlerinden, bilgisinden ve titiz çalışmasından çok şey öğrendiğim, tez öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. K. Aydan İkinciogulları'na,

Tez süresince yardımlarını esirgemeyen Uz. Dr. Zehra Şule Haskoğlu ve Uzm. Dr. Ayşe Sevgi Bal'a,

Tüm yardımları ve destekleri için Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'ndan Deniz Güloğlu, Meltem Arıkan ve Senem Koçak'a,

Uzmanlık eğitimi boyunca yıllarımı paylaştığım ve birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma, bize her zaman destek olan uzmanlara, hemşirelerimiz, sekreterlerimiz ve yardımcı personellerimize,

Anlayışı, desteği ve sevgisi ile hep yanımda olan canım eşim Dr. Gözde Kavgacı'ya,

Bugünlere gelmemi sağlayan, üzerimde büyük emekleri olan, her zaman bana destek olan, başta meslek ahlakı olmak üzere her konuda örnek aldığım sevgili annem Ayşe Kavgacı ve babam Prof. Dr. Halil Kavgacı'ya, kardeşlerim Dr. Umay Kavgacı ve Nur Kavgacı'ya ve biricik oğlum Metehan'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Akif Kavgacı

Ankara, 2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İmmün Sistem Hücreleri ve Lenfopoez.....	3
2.2. Timus ve T Hücre Matürasyonu.....	4
2.2.1. Timus	4
2.2.2. T Hücre Gelişimi ve Farklılaşması	5
2.3. T Hücre Reseptörleri, VDJ Rekombinasyonu ve TREC Oluşumu	7
2.3.1. T Hücre Reseptörleri.....	7
2.3.2. VDJ Rekombinasyonu ve TREC oluşumu	8
2.4. Akım Sitometri ile Yeni Timik Göçmenlerin (YTG) Ölçümü	10
2.5. Primer İmmün Yetmezlik	12
2.5.1. Tanım, Sıklık ve Sınıflandırma.....	12
2.5.2. Primer İmmün Yetmezlikte Klinik Bulgular ve 10 Uyarıcı İşaret.....	13
2.5.3. Tanı	15
2.5.4. Tedavi	16
2.6. Ağır Kombine İmmün Yetmezlik.....	17
2.6.1. Tanım, Sıklık ve Doğal Seyir	17
2.6.2. Sınıflama.....	20
2.6.3. Klinik Özellikler ve Tanı	21
2.6.4. Tedavi	21
2.6.5. Tarama	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Çalışma Grubunun Seçimi.....	25
3.2. Laboratuvar İncelemeleri	26

3.3. Yöntem	26
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	27
4. BULGULAR	28
4.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri	28
4.2. Yaşa Göre Periferik Kanda YTG, BK, ALS sayıları ve yüzde değerleri	29
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇLAR	40
ÖZET	42
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	46



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADA	: Adenozin Deaminaz
AKİY	: Ağır kombine immün yetmezlik
ALS	: Absolü lenfosit sayısı
BCG	: Bacille Calmette-Guérin
BK	: Beyaz Küre
BTK	: Bruton tirozin kinaz
DHR	: Dihidrorodamin
DOCK2	: Deducator of cytokinesis protein 2
ESID	: European Society for Immunodeficiencies
HAART	: Yüksek Aktif Antiretroviral tedavi
HKHN	: Hematopoetik kök hücre nakli
Ig	: İmmünglobulin
IUIS	: International Union of Immunological Societies
IVIG	: İntravenöz İmmünglobulin
JAK3	: Janus kinaz 3
JMF	: Jeffrey Modell Vakfı
KİY	: Kombine immün yetmezlik
MHC	: Major histocompatibility complex
NBT	: Nitro blue Tetrazolium
NK	: Doğal öldürücü hücreler
OR	: Otozomal Resesif
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PİY	: Primer İmmün Yetmezlik
RAG1	: Rekombinasyon aktive edici gen 1
RAG2	: Rekombinasyon aktive edici gen 2
RTE	: Recent Thymic Emigrants
TCR	: T-cell reseptör
TREC	: T cell Receptor Excision Circle
YTG	: Yeni Timik Göçmenler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1.	Hematopoietik kök hücreden lenfoid ve myeloid farklılaşma	3
Şekil 2.	Yaş ile timus dokusundaki değişiklikler	5
Şekil 3.	Timusta T hücre gelişimi ve farklılaşması	6
Şekil 4.	T hücre pozitif ve negatif seleksiyonu	7
Şekil 5.	T hücre reseptör yapısı: T hücre reseptör $\alpha\beta$, $\gamma\delta$ zincirleri	8
Şekil 6.	TREC Oluşumu	9
Şekil 7.	Periferik naif T hücre homeostazisi modeli	11
Şekil 8.	Lenfosit gelişimini etkileyen genler	17
Şekil 9.	Kombine immün yetmezlik spektrumu	18
Şekil 10.	AKİY'in doğal seyri.....	19
Şekil 11.	Akım sitometri ile CD45/SS kapısı içindeki CD4+ hücre popülasyonunda CD45RA+CD31+ hücre düzeyleri ölçümü	27
Şekil 12.	Beyaz küre sayılarının yaşa göre değişimi	30
Şekil 13.	Absolü lenfosit sayılarının yaşa göre değişimi.....	31
Şekil 14.	YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin yaşa göre değişimi	32
Şekil 15.	YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücrelerin absolü sayılarının yaşa göre değişimi	33

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No:
Tablo 1. PİY hastalıklarının sınıflandırılması	13
Tablo 2. Primer immün yetmezliğin 10 uyarıcı işareti (JMF)	14
Tablo 3. AKİY'den sorumlu mekanizmalar, ortaya çıkan defektler, kalıtım şekli ve immünfenotipik özellikler	19
Tablo 4. AKİY tanı kriterleri	21
Tablo 5. TREC yöntemiyle yapılan taramada saptanabilen hastalıklar	24
Tablo 6. Sağlıklı bebek ve çocuk gruplarının yaş ve cinsiyet Dağılımı	28
Tablo 7. Yaşa göre periferik kanda YTG, BK, ALS sayıları ve yüzde değerleri.....	29
Tablo 8. Sağlıklı Türk çocuklarında beyaz küre sayılarının median ve %5-95 aralıkları.....	30
Tablo 9. Sağlıklı Türk çocuklarında absolü lenfosit sayılarının median ve %5-95 aralıkları.....	31
Tablo 10. Sağlıklı Türk çocuklarında YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin median ve %5-95 aralıkları	32
Tablo 11. Sağlıklı Türk çocuklarında YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin absolü sayılarının median ve %5-95 aralıkları	33

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Primer immün yetmezlikler (PİY), immün sistemi oluşturan komponentleri kodlayan genlerdeki mutasyon sonucu ortaya çıkan bir grup hastalıktır. Tekrarlayan enfeksiyonların yanı sıra otoimmünite, enflamasyon, alerjiler, lenfoproliferasyon ve maligniteler primer immün yetmezlikler için önemli işaretlerdir. 2015'te yenilenen International Union of Immunological Societies (IUIS) sınıflamasına göre immün yetmezlikler 9 alt gruba ayrılmaktadır (1). Nitekim 2018 yılında yayınlanan yeni sınıflamada da bu ayırım sürmektedir (2). Ülkemizde akraba evliliği oranının yüksek olması nedeniyle çoğu otozomal resesif geçişli olan kombine immün yetmezlikler (KİY) daha sık görülmektedir. Önemli bir halk sağlığı sorunu olan PİY'lerde erken tanı ve etkin tedavi hayat kurtarıcıdır. PİY hastalıkları arasında ağır kombine immün yetmezlikler (AKİY) erken tanı almadığı ve uygun tedavi edilmediği takdirde ölümlerle sonuçlanan bir pediatrik acildir. AKİY temel olarak T hücre gelişim bozukluğudur. Bu hastalığa yol açan 20 kadar genetik defekt tanımlanmıştır (3). AKİY'lerde yetersiz timopoez nedeniyle deneyimsiz (naif) T hücre sayılarında düşüklük saptanmaktadır. Hastaların asemptomatik oldukları dönemde taranması erken tanı ve tedavi olanağı sağlayacaktır.

Kombine immün yetmezliklerde yetersiz timopoez nedeniyle naif T hücre sayılarında düşüklük saptanmaktadır. Başta ağır kombine ve kombine immün yetmezlikler olmak üzere T hücre gelişim defekti gösteren tüm PİY'lerin tanısında günümüzde kullanılan en güvenilir ve uygun yöntem TREC ölçümüdür. TREC timopoezin göstergesidir ve 2008'den beri yenidoğan bebeklerden alınan topuk kanlarında AKİY'in taranmasında ve böylece erken tanısında kullanılmaya başlanmıştır (4).

Günümüzde timopoez; bir başka deyişle timus bezinin fonksiyonu; timustan periferik kana geçen naif (deneyimsiz) T hücre gelişiminin "*Recent Thymic Emigrants*"-YTG (yeni timik göçmenler)- gösterilmesi sayesinde ölçülebilmektedir. YTG 2 yöntem ile değerlendirilmektedir. Birincisi yukarıda da sözü edilen TREC; yani moleküler olarak T hücre reseptörünün gelişimi sırasında gerçekleşen VDJ

genlerinin rekombinasyonundan arta kalan sirküler yapılı DNA artıklarının ölçümüdür. Diğeri ise CD4, CD45RA ve CD31 monoklonal antikolarını yüzeyinde taşıyan timustan yeni olarak periferik kana geçen T lenfositlerinin akım sitometrisi ile (flow cytometry) tanımlanması esasına dayalı ölçümüdür. Bu hücrelerin TREC içeriği yüksektir.

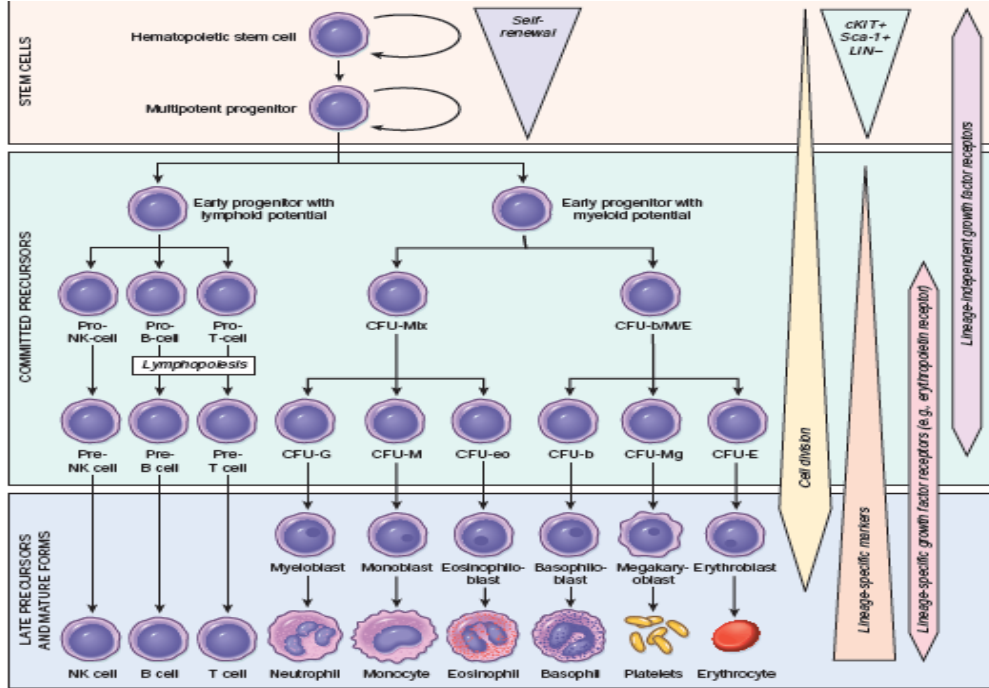
Bu çalışmanın amacı, TREC miktarını temsil ettiği kanıtlanmış CD4, CD45RA, CD31 belirteçlerini yüzeyinde taşıyan T lenfositlerini akım sitometri ile ölçerek 0-6 yaş grubundaki sağlıklı Türk çocukları için YTG (CD4+CD45RA+CD31+) normal (referans) değerlerini elde etmek ve doğumdan itibaren 6 yaşa kadar timopoezi incelenmektir.

Sağlıklı çocuklarda farklı yaş gruplarında YTG (CD4+CD45RA+CD31+) normal düzeyleri bilinmemektedir. Çalışmamızın başta ağır kombine (AKİY) ve kombine immün yetmezlikler olmak üzere T hücre gelişim defekti şüphesi taşıyan tüm PİY hastalarının tanı ve izlemine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem Hücreleri ve Lenfopöz

İmmünite, organizmanın kendine yabancı olan maddeleri (mikroorganizma, antijen) tanınması, etkisiz hale getirebilmesi ve/veya yok edebilmesidir. Yabancı olarak algılanan bir maddeye, mikroorganizmalara veya tümör antijenlerine karşı savunmayı sağlayan dokular, hücreler ve moleküllerin toplamına İmmün Sistem adı verilir. İmmün sistem, doğal ve edinsel (adaptif) immünite olmak üzere 2 ana alt başlıkta incelenmektedir. Doğal immünite Enfeksiyon etkeninin vücuda girmesini engellemek amaçlı çalışan anatomik ve fizyolojik bariyerler, fagositer sistem, kompleman sistemi ve doğal öldürücü hücrelerden meydana gelmektedir. Edinsel immünite ise antikor ve T hücre aracılı immün yanıtta oluşmaktadır (5). Lenfositler edinsel immünitenin temel hücreleri olup kemik iliğindeki hematopoietik kök hücreden köken alırlar. Hematopoietik kök hücre, lenfoid ve myeloid kök hücre olmak üzere 2 şekilde farklılaşma gösterir. Şekil 1'de hematopoietik kök hücreden lenfoid ve myeloid farklılaşma gösterilmektedir (6).



Şekil 1. Hematopoietik kök hücreden lenfoid ve myeloid farklılaşma (6)

Vücuttaki lenfositlerin tümü lenfoid progenitor kök hücreden geliŖse de, bu kök hücreler kendi başlarına aktif T lenfositleri veya antikorları oluŖturma yeteneğine sahip değildir. Bu yeteneği kazanabilmeleri için uygun iŖlenme alanlarında farklılaŖmalarını sürdürmeleri gerekmektedir (7). B lenfositler geliŖimlerinin kemik iliğinde tamamlarlar ve lenf nodunda olgunlaŖırlar. İmmatür T lenfositler ise kemik iliğinden ayrılıp, geliŖim, çoğalma ve matürasyonlarını tamamladıkları timusa göç ederler.

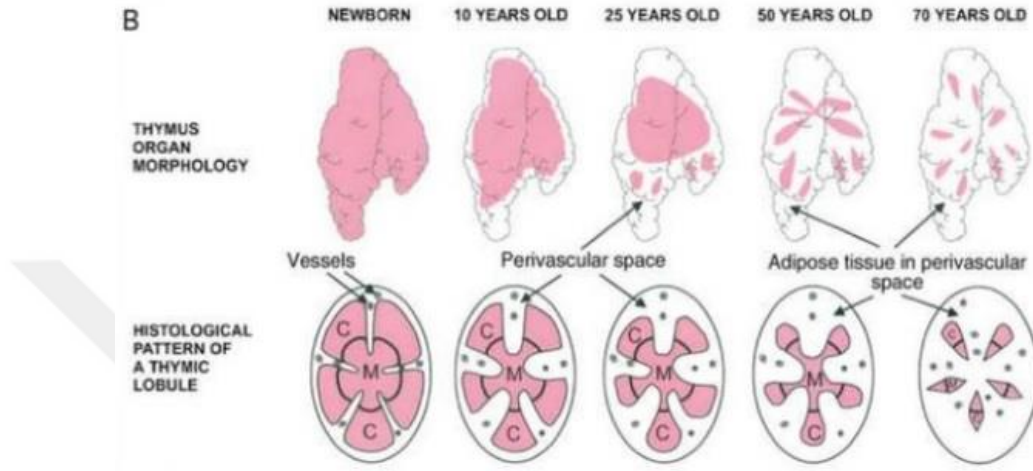
2.2. Timus ve T Hücre Matürasyonu

2.2.1. Timus

Timus, embriyogeneizde üçüncü ve dördüncü faringeal keselerin içini kaplayan epitel hücrelerinden oluŖur. Bu özel yapıdaki epitelyal hücreler, timus loblarını yapmak için boyun bölgesinden, ön-üst mediastene göç ederler. Timus gebeliğin 6-8. haftalarında ön mediastende iki loblu bir organ olarak yerini alır. Bu iki lob fibröz bölmelerle birçok lobüllere ayrılmıŖtır (8). Her bir lobülün, periferde korteks olarak adlandırılan koyu ve merkezde medulla denen soluk bölgesi vardır. Korteks yoğun bir öncü T lenfosit popülasyonundan, epitelyal retiküler hücreler ve makrofajlardan oluŖur. Korteks medullaya göre küçük lenfositlerden zengin olduğu için daha koyu boyanır. Epitelyal retiküler hücreler soluk boyanan oval çekirdekleri olan yıldızsı hücrelerdir. Sitoplazmalarında ara keratin iplikçiklerinden oluŖan demetler (tonofibriller) bu hücrelerin epitelyal kökenli olduklarını kanıtlamaktadır. Medulla epitelyal retiküler hücrelerden oluŖmakta, farklılaŖmıŖ T lenfositler ve bu bölge için tipik olan ancak iŖlevi bilinmeyen Hassal cisimcikleri denilen yapılar içermektedir. Bu cisimcikler üst üste yerleŖmiŖ ve keratin iplikçikleri içeren yassı epitelyal retiküler hücrelerden oluŖur (9, 10).

Timusun anteriorda yüzeyelden derine; sternumun manubrium ve gövde kısmı, sternohyoid ve sternothyroid köŖesi, pretrakeal fasya, anterolateralde kostal kartilajlar ve mediyastinal plevra kenarı, lateralde mediyastinal plevra, frenik sinir, posteriorda süperiordan inferiora trakea, arkus aorta dalları, sol brakiosefalik ven, fibroz perikardın arkus aorta komŖuluđu bulunmaktadır (11, 12).

Timus, doğumda büyük ve oldukça aktif bir organdır, ortalama 22 gr ağırlığındadır. Birkaç yıl büyümeye devam eder. Pubertede maksimum ağırlığına (35 gr civarında) erişir. Puberte sonrası dönemde küçülmeye başlar ve yerini yağ dokusuna bırakır. Erişkinde çoğu epitel hücrelerinden meydana gelen yaklaşık 6 gr ağırlığında timik doku bulunur (8). Şekil 2'de yaşla timik dokudaki değişim gösterilmiştir (13).



Şekil 2. Yaş ile timus dokusundaki değişiklikler (13)

Timus, T lenfositlerin farklılaşmasının ve fonksiyonel bütünlüğünün tamamlandığı primer lenfoid organdır. T lenfositlerin yaşamlarının devamında kullanacakları becerileri edindiği bir okul, adeta bir üniversitedir. Bu eğitim sonucunda timustan perifere çıkan sağlıklı, genç ve deneyimsiz T lenfositler yabancı antijene yanıt vererek yok etme; kendi dokularına ise hoşgörü gösterip tolerans oluşturma donanımı kazanırlar.

2.2.2. T Hücre Gelişimi ve Farklılaşması

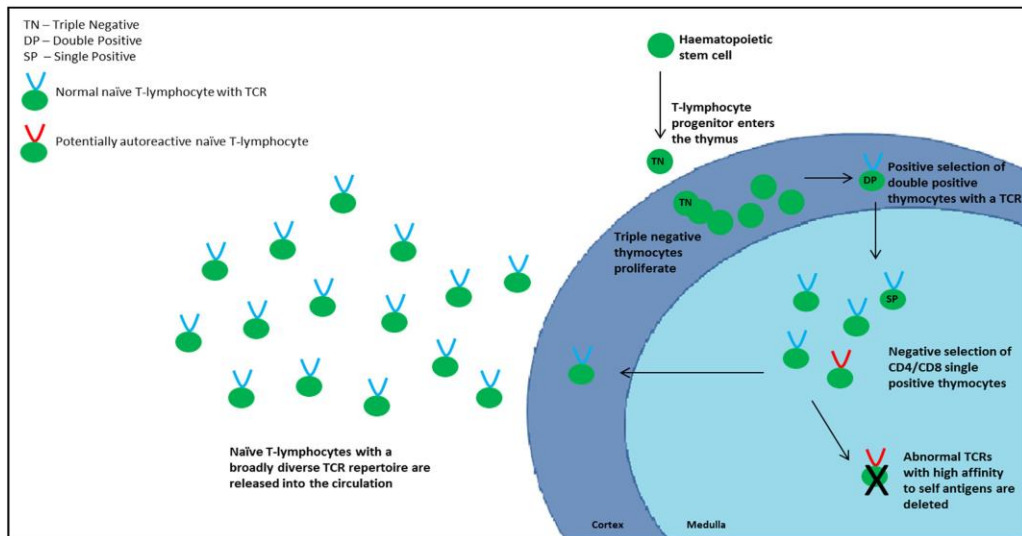
T lenfosit progenitör hücreleri kemik iliğinden timusa doğru göç ederler ve T hücreleri gelişimini timusta tamamlar. Burada çok hızlı çoğalır ve çok sayıda farklı antijene karşı yanıt geliştirebilecek şekilde çeşitlendirilirler. Bu gelişim, timustaki bir lenfositin bir antijene karşı özgül yanıt verecek şekilde gelişmesi ile olur. Bir sonraki lenfosit başka bir antijene özgüllük geliştirir. Bu şekilde işlenmiş çok sayıda farklı T lenfosit timusu terkeder ve vücut lenfoid dokularında konaklamak üzere dağılır.

Timusta T lenfositlerinin ön-işlenmesi büyük oranda doğumdan hemen önce ve doğumu izleyen birkaç ayda gerçekleşir (7).

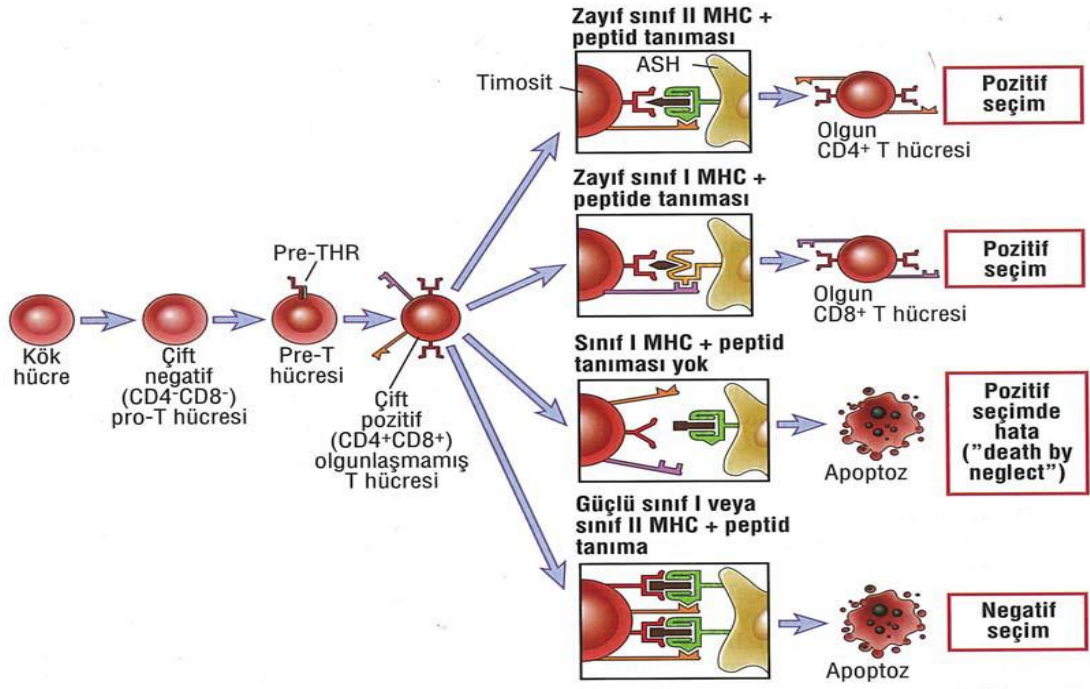
Timusta T hücre gelişimi pozitif seçim ve negatif seçim olmak üzere 2 aşamada gerçekleşir. Pozitif seçim kortekste gerçekleşir. T hücre reseptörü geliştiren, hem CD4 hem de CD8 moleküllerini taşıyan immatür timositler ile timik epitelial hücrelerdeki MHC I/II arasındaki ilişkinin derecesi ile ilintili olarak MHC+peptid kompleksini tanıyabilen T hücreler seçilirken tanıyamayanlar elimine olur ve böylece fonksiyonel timositlerin gelişimi sağlanır.

Negatif seçim ise kortikomeduller bileşkede gerçekleşir. Timustaki dendritik hücre ve makrofajlardaki MHC ile birlikte immatür timosite sunulan antijenik epitopu güçlü tanıyanlar elimine olur. Böylece kendinden olanı zayıf tanıyarak reaktif değil hoşgörü gösteren (tolerans) ve yüzeyinde sadece CD4 veya CD8 taşıyan az sayıdaki efektör ve doğal regulatuar T lenfositler medullaya ve oradan da periferer geçerler. Bu işlemler sonucunda olgun T hücre repertuarı ortaya çıkmaktadır. Timusa giren T hücrelerin ancak <math><5\%</math>'i olgun T lenfosit olarak dolaşıma girer. Medüller timositler, helper ve sitotoksik olarak fonksiyonel kapasitelerini kazandıktan sonra periferik lenfoid dokulara göç ederler (8).

Şekil 3'de Timusta T hücre gelişimi ve farklılaşması (14), Şekil 4'te T hücre pozitif ve negatif seleksiyonu gösterilmektedir (5).



Şekil 3. Timusta T hücre gelişimi ve farklılaşması (14)



Şekil 4. T hücre pozitif ve negatif seleksiyonu (5)

2.3. T Hücre Reseptörleri, VDJ Rekombinasyonu ve TREC Oluşumu

2.3.1. T Hücre Reseptörleri

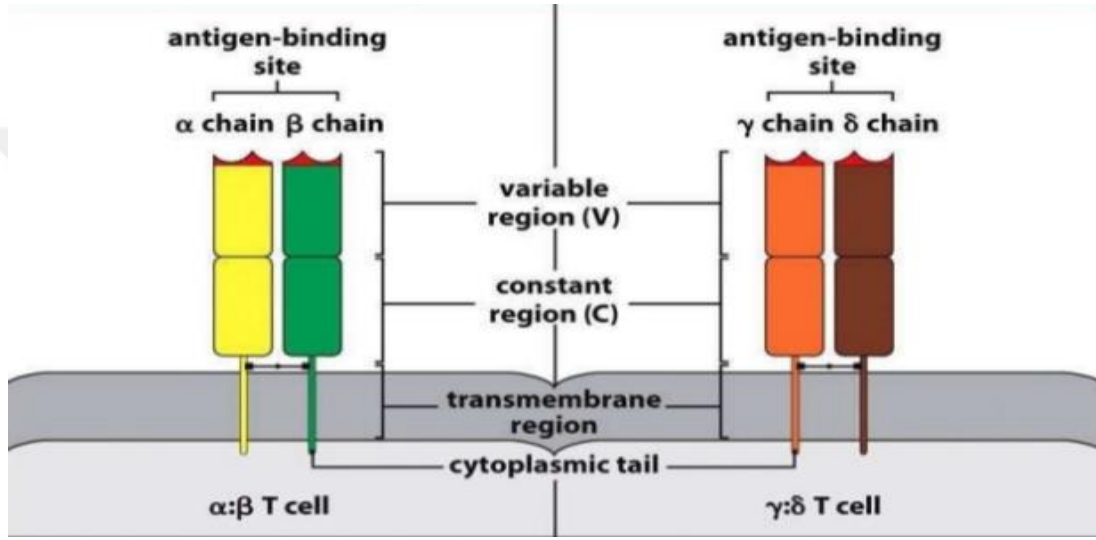
T lenfositler, MHC molekülleri ile sunulan peptid antijenleri tanır. Peptid yapıda antijenler ve MHC molekülleri antijen sunan hücreler üzerinde kompleksler oluşturmaktadır. Bu peptid-MHC komplekslerini tanıyan reseptörlere T hücre reseptörü (TCR) denmektedir.

T hücre klonları farklı T hücre reseptörleri eksprese ederler. Antijen tanınması sonucu ortaya çıkan sinyaller CD3 ve epsilon proteinleriyle iletilir. Epsilon proteini, CD3 ve T hücre reseptörü non-kovalent olarak bağlanarak T hücre reseptör (TCR) kompleksini oluşturmaktadır. T hücre reseptörlerinin iki tipi vardır:

α - β T hücre reseptörü: Hem CD4 + hem de CD8 + hücrelerde eksprese olur. α ve β zincirleri antijen bağlayıcı kısım, variable (v) kısım ve sabit (c) kısım içerir. T hücre reseptör kompleksi ve MHC-peptid antijeni bağlanması gerçekleşir ve sinyal

iletimini başlar. α ve β zincirleri tek bir heterodimerik reseptör oluşturarak T hücrenin MHC restriksiyonunu ve antijen (peptid) spesifitesini sağlar.

γ - δ T hücre reseptörü: Bu reseptörü taşıyan T hücrelerinin çoğu CD4 ya da CD8 eksprese etmez. T hücrelerinin %5'ten azı bu reseptörü eksprese etmektedir. Çoğunlukla epitelyal dokularda bulunur. MHC restriksiyonu yoktur ve MHC ilişkili antijenleri tanımazlar (15). Şekil 5'de T Hücre Reseptör yapısı, T Hücre Reseptör $\alpha\beta$, $\gamma\delta$ zincirleri gösterilmiştir (16).



Şekil 5. T hücre reseptör yapısı: T hücre reseptör $\alpha\beta$, $\gamma\delta$ zincirleri (16).

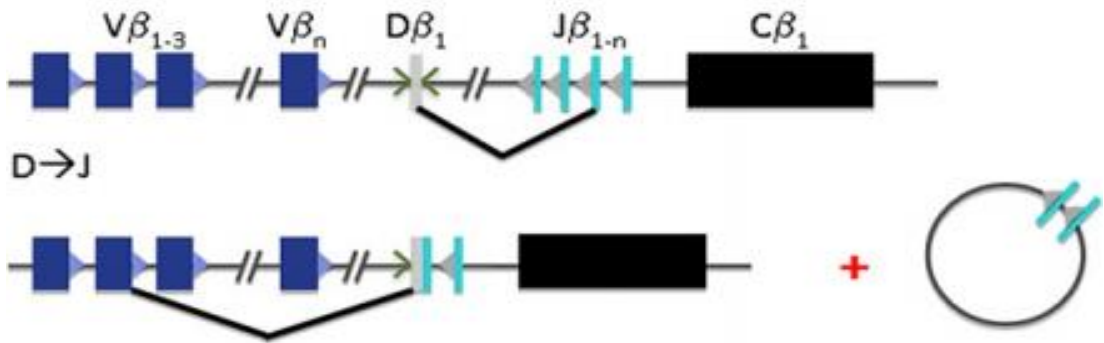
2.3.2. VDJ Rekombinasyonu ve TREC oluşumu

TCR çeşitliliğinin sağlanması için TCR gen bölgelerinin yeniden düzenlenmesi gereklidir. TCR gen bölgesi V (variable: değişken), D (diversity: çeşitlilik) ve J (joining: birleşme) segment dizilerine sahiptir. V ve J segmentleri tüm TCR bölgesinde bulunurken, D segmentine ise sadece β ve δ TCR bölgesi sahiptir. Timusta pro-T hücreler, V(D)J yeniden düzenleme işlemine tabi tutulmaktadır. Bu işlemin amacı antijenik çeşitliliğin sağlanmasıdır.

Bu çeşitlilik V, D ve J gen segmentlerinin birleştirilmesinde kullanılan nükleotid zincirlerindeki değişikliklerle daha da artırılır. Bu işlem rekombinaz aktive edici gen 1 ve 2 (RAG1 ve RAG2) tarafından kodlanan iki proteinden oluşan V(D)J

rekombinaz enzim kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir. RAG1 ve RAG2 rekombinaz sinyali oluşturmak için V(D)J segmentlerine bağlanır. Rekombinaz sinyali, DNA'da uçlarında saç tokasına benzer özel yapılar içeren çift zincirli kırıklara neden olur. Daha sonraki birleştirme ve tamir işleminin başlaması için saç tokasına benzer yapıların bir endonükleaz olan Artemis enzimi tarafından açılması ve ortadan kaldırılması gereklidir. Çift zincirli kırık uçlarının bir araya getirilmesi ve bağlanması için tamir mekanizması çalışmaya başlar. Ku70 ve Ku80 proteinleri DNA kırık uçlarına bağlanır ve çift zincirli DNA tamir enzimi olan DNA bağımlı protein kinazın katalitik alt biriminin bu bölgede toplanmasını sağlar. Kırık uçların bağlanma işlemi ise DNA ligaz IV ve XRCC4 tarafından gerçekleştirilir. Sağlanan bu çeşitlilik, V(D)J gen segmentlerinin bileşkelerindeki nükleotid dizilerinden endonükleazlar tarafından nükleotid çıkararak ve TdT enzimiyle nükleotid ekleyerek daha da artırılır (17-19).

T hücre reseptör gen bölgelerinin düzenlenmesinde TREC olarak adlandırılan D β ve J β n bölgelerinden oluşan, daire şeklinde ve protein kodlamayan DNA parçaları ayrılır. Periferik kanda PCR yöntemi ile TREC ölçümü timopoez, yani genç ve deneyimsiz yeni T hücre gelişimini gösteren en önemli veridir (17, 20-22). TREC oluşumu Şekil 6'da gösterilmektedir (17).



Şekil 6. TREC Oluşumu (17)

TCR V β 1 lokusunu belirten şekil, C β 1'in yukarıdaki V β , D β ve J β bölümlerinin yerlerini gösterir. V(D)J rekombinaz, birçok J β parçasından birinin yukarıdaki sinyal dizilerini (üçgenler) tanır ve DNA kırılmaları meydana getirir. Aynı işlem yukarı yönde D β segmentinde de gerçekleşir. Çift zincirli DNA kırıkları üretilir ve 2 kırık DNA ucu, bir araya getirilip hücresel DNA onarım mekanizmaları (nonhomolog "end-joining") vasıtasıyla bağlanır. Kesilen DNA (D β ve J β n arasındaki parça) daireselleşir ve TREC olarak bilinen bir halka olarak çekirdekte kalır.

TREC kopyalarının sayısı timusta deneyimsiz (naif) T hücrelerinin üretiminin göstergesidir. Nitekim düşük sayıda TREC kopyası üretimi yetersiz T hücre üretiminin belirteçidir (23).

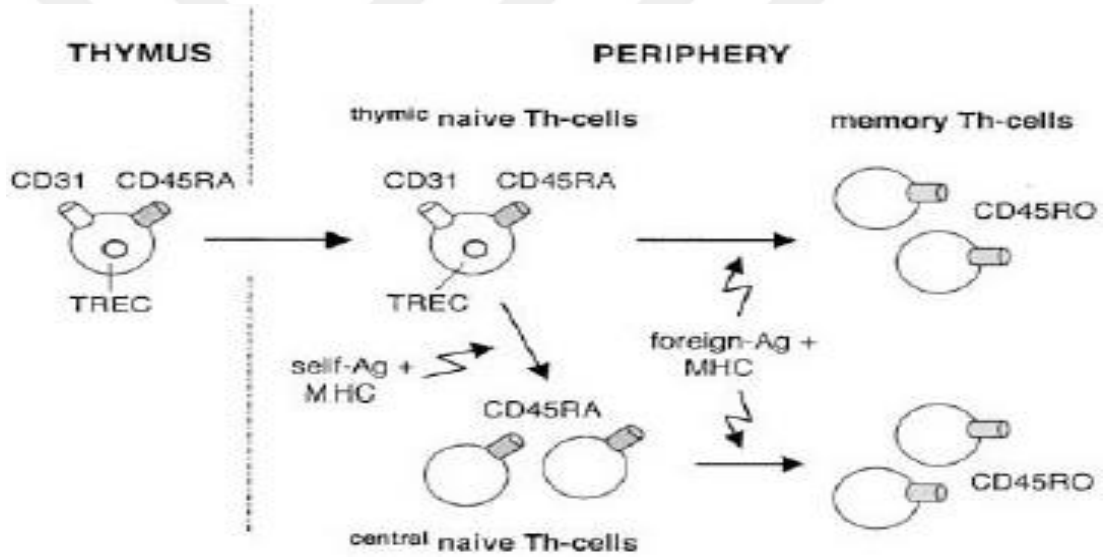
2.4. Akım Sitometri ile Yeni Timik Göçmenlerin (YTG) Ölçümü

Akım sitometri, hücreleri tek tek değerlendirerek çok sayıda hücrenin biyofiziksel ve biyokimyasal yönleri ile hızlı, çok parametrelili ve korele şekilde incelenmesine olanak sağlayan bir tekniktir. İmmünofenotipleme, akım sitometrinin kliniğe yansıyan en önemli kullanım alanlarından birini oluşturmaktadır (24). Akım sitometrisi ile immünofenotipleme, süspansiyon halindeki hücrelerin yüzey veya intraselüler yerleşimli, çok sayıdaki antijenik yapılarının, florokrom işaretli monoklonal antikolar kullanılarak tanımlanması ve ölçülmesi esasına dayanmaktadır (25). Akım sitometri primer immün yetmezliklerin (PİY) tanısı, sınıflandırılması, izlemi ve prenatal tanısı açısından oldukça önemlidir. Periferik kan lökositlerinde, genetik mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan farklı bozuklukların akım sitometri ile saptanması: Lenfosit alt grupları (Fenotipik sitometri), spesifik antijenler (proteine özgü testler) ve fonksiyonel testler (fonksiyonel sitometri) olmak üzere gruplandırılabilir.

Rutin immünofenotipleme, major periferik kan lenfositlerindeki kalitatif ve kantitatif anormalliklerin değerlendirilmesi için tasarlanmış olup, pek çok PİY'in taranmasına olanak sağladığı için oldukça değerlidir. Temel olarak AKİY tanısı, fenotipinin belirlenmesi ve izleminde T/B/NK hücreleri, IPEX sendromunda T regülatuar hücreleri, idiopatik hiper IgE sendromu ve mukokütanöz kandidiaziste Th17 T hücreleri, otoimmün lenfoproliferatif sendromda çift negatif T hücreler, X'e bağlı lenfoproliferatif hastalıkta NKT hücreler ölçülebilmektedir. Ayrıca dolaşımdaki B ve T hücre havuzları ve yeni timik göçmenler (timopoez) de akım sitometri ile kapsamlı olarak değerlendirilebilir (24).

Genç sağlıklı bireylerdeki timus aktivitesi yüksek TREC içeriğine sahip YTG hücreleriyle sürekli olarak yenilenmeyi sağlar. YTG'ler CD45RA+CD31+ hücrelerdir ve CD31'i sekonder lenfoid organlara girmek için transendotelial migrasyon amacıyla

kullandıkları düşünülmektedir. CD31; PECAM molekülünü temsil eden ve trombositler, monositler, nötrofiller ve lenfositlerin yüzeyinde eksprese olan bir antikordur. YTG'lerin yaş ile timus aktivitesindeki azalma neticesinde sayılarında azalma meydana gelmektedir. Periferik kanda yabancı antijenler ile etkileşim sonucunda üzerine YTG'ler timik CD31-CD45RA-CD45RO+ bellek T hücrelerine farklılaşır. MHC ve self-antijenlerle tetiklenen YTG'ler yaş ile azalan timik üretimi kompanse etmek için merkezi naif T hücrelere dönüşürler. Merkezi naif T hücrelerinin TREC içeriği düşüktür ve yüzeyinde CD45 eksprese etmesine karşın CD31 bulundurmazlar (CD45+CD31-hücreler). YTG ve merkezi naif T hücreler CD31-CD45RA-CD45RO+ bellek T hücrelerine farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Şekil 7'de periferik naif T hücre homeostazisi modeli verilmiştir (26).



Şekil 7. Periferik naif T hücre homeostazisi modeli (26)

Kombine immün yetmezliklerde yetersiz timopoez nedeniyle deneyimsiz (naif) T hücre sayılarında düşüş saptanmaktadır. Başta ağır kombine ve kombine immün yetmezlikler olmak üzere T hücre gelişim defekti gösteren tüm PİY'lerin tanısında ve taramasında günümüzde kullanılan en güvenilir ve uygun yöntem yeni timik göçmenlerin ölçümüdür. YTG 2 yöntem ile değerlendirilmektedir. Birincisi TREC olarak adlandırılan moleküler olarak T hücre reseptörünün gelişimi sırasında gerçekleşen VDJ genlerinin rekombinasyonundan arta kalan sirküler yapıları DNA artıklarının ölçümüdür. Diğeri ise CD4, CD45RA ve CD31 monoklonal antikorlarını yüzeyinde

taşıyan, timustan yeni olarak periferik kana geçen ve TREC içeriği yüksek olan YTG'lerin akım sitometrisi ile (flow cytometry) tanımlanması esasına dayalı ölçümüdür.

2.5. Primer İmmün Yetmezlik

2.5.1. Tanım, Sıklık ve Sınıflandırma

Primer immün yetmezlikler, immün sistemin farklı yapıtaşlarının sayı ve/veya işlevinde bozukluğa yol açan genetik hastalıklardır. Klinik, immünolojik ve genetik olarak heterojendirler. Bu hastalıklardan bazılarında enfeksiyonlara yatkınlık doğumdan hemen sonra başlar; immün sistemdeki eksiklik veya defekt giderilmediği takdirde ölümcül seyreder. Bazı primer immün yetmezlik hastalıklarında ise klinik hafif, geçici veya asemptomatik olabilir. Selektif IgA eksikliği ve süt çocuğunun geçici hipogamaglobulinemisi bu konudaki en iyi örneklerdir.

PİY farkındalığının artması ve yeni mutasyonların saptanması ile genişleyen PİY repertuarında ABD'de 1976-1980 yılları arasında 2.4/100000 olarak belirtilen PİY insidansı 2001-2006 yılları arasında 10.3/100000'e yükselmiştir. 2012 yılında yapılan iki merkezli çalışmada Türkiye'de PİY insidansı 30.5/100000 olarak saptanmıştır (27). Türkiye'de, PİY hastalıkları kayıt sistemi tüm ülke verilerini kapsamadığı için PİY sıklığı kesin olarak bilinmemektedir.

2011 yılında Hacettepe Üniversitesi'nde yapılan çalışmada 10 yıl içinde takip edilen 1116 PİY hastasının 156'sının (%14) kombine immün yetmezlik olduğu bildirilmiştir (28). Ankara Üniversitesi'nde 2002-2012 döneminde takip edilen 821 PİY hastasının retrospektif olarak incelendiği çalışmada hastaların %17.3'ünün kombine immün yetmezliklerden oluştuğu gösterilmiştir (29). Bu çalışmalar büyük kısmı otozomal resesif geçişli PİY'lerin ülkemizdeki yüksek akraba evliliği sıklığı nedeniyle ülkemizdeki insidansının yurtdışı verilerine göre daha yüksek olduğunu desteklemektedir.

2018'de yenilenen International Union of Immunological Societies (IUIS) sınıflamasına göre 9 alt gruba ayrılan immün yetmezlikler Tablo1'de verilmektedir (2).

Tablo 1. PİY hastalıklarının sınıflandırılması (2)

1. Kombine İmmün Yetmezlikler (T ve B hücre defektleri)
2. Sendromik durumlarla birlikte/ilişkili kombine immün yetmezlikler
3. Antikor eksiklikleri
4. İmmüdisregülasyon hastalıkları
5. Fagositlerin konjenital sayı ve/veya fonksiyon bozuklukları
6. İntrensek ve doğal immünite bozuklukları
7. Otoinflamatuvar hastalıklar
8. Kompleman eksiklikleri
9. Primer immün yetmezlik fenokopyaları

2.5.2. Primer İmmün Yetmezlikte Klinik Bulgular ve 10 Uyarıcı İşaret

PİY'ler çoğunlukla yaşamın ilk aylarında-yıllarında bulgu verir. Hastalar tekrarlayan enfeksiyonlar ile hekime başvurur. Tekrarlayan enfeksiyon öyküsü olan çocukların yaklaşık %10'unda immün yetmezlik saptanmaktadır. Tekrarlayan enfeksiyon öyküsü dışında fırsatçı mikroorganizmaların neden olduğu tek bir enfeksiyon da PİY'in bulgusu olarak karşımıza çıkabilmektedir. PİY'li hastalarda görülen enfeksiyonların türü ve şiddeti, etkilenen immün sistem komponentine göre değişkenlik göstermektedir (30).

PİY tanısının geç kalmadan, geri dönüşümsüz organ hasarları ve mortalite oluşmadan konulabilmesi başta birinci basamak sağlık kuruluşlarında çalışan hekimler olmak üzere tüm hekimlerin bu konuda bilgili ve şüpheli olması ile mümkündür. Primer immün yetmezlik tanısının konulması, tarama yapılmadığı, öykü ve muayene bulgularının tipik özellikler göstermediği durumlarda zordur. PİY'lerin, özellikle de KİY'lerin erken tanısı için tarama programları üzerinde çalışılmaktadır.

Kronik ishal, gelişme geriliği, canlı aşılarından sonra kalıcı enfeksiyonların gelişmesi ve kronik oral veya kutanöz moniliyazis, beklenmedik patojenlerle enfeksiyonlar (Pneumocystis jirovecii, Aspergillus, Serratia marcescens, Nocardia, Burkholderia cepacia), sık görülen çocukluk çağı patojenleriyle beklenmedik şiddette enfeksiyonların atipik, kronik seyirli veya tekrarlayan enfeksiyonlar immün

yetmezlik için ipuçlarıdır (31). PİY'li hastalarda BCG aşısı sonrasında dissemine mikobakteriyel enfeksiyonlar görülebilmektedir. Mazzucelli ve arkadaşlarının Brezilya'da yaptığı çalışmada BCG aşısı sonrası oluşan yan etkilerin AKİY'li hastalarda %50 daha fazla görüldüğü ve kronik granülomatöz hastalık olgularında ise %17 daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (32). 2018 yılında kliniğimizde yapılan çalışmada pediatrik KİT ünitesinde 1997-2017 yılları arasında PİY nedeniyle HKHN yapılan 132 hastanın 29'unda (%21) lokal ya da yaygın BCG hastalığı saptanmıştır. Hastalığın kombine immün yetmezliklerde, özellikle de ağır kombine immün yetmezliklerde nakil sonrası morbidite yarattığı belirtilmiştir. BCG aşısı yapılmadan önce tarama programları ile erken tanı konulmasının, bu ciddi morbiditenin önüne geçebilecek tek yaklaşım olduğu vurgulanmıştır (33).

PİY'ler geç tanı alındığında morbiditeler ve komplikasyonlarla seyredip ölüme yol açarlar. Hastaların erken tanınması hayat kurtarıcıdır. Sık enfeksiyon, otoimmünite, enflamasyon, malignite, bronşiektazi, alerji gibi bulgulardan bir veya birden fazlası ile gelen hastalarda PİY'den şüphe edilmelidir. PİY şüphesi duyulan hastalarda "PİY uyarıcı işaretleri" sorgulanmalıdır. Jeffrey Modell Vakfı tarafından yayınlanmış olan ve PİY hastalıkları için uyarıcı olarak kabul edilen 10 işaret Tablo 2'de sunulmaktadır (34).

Tablo 2. Primer immün yetmezliğin 10 uyarıcı işareti (JMF), (34)

1) Bir yılda 4 veya daha fazla yeni kulak enfeksiyonu
2) Bir yılda 2 veya daha fazla yeni sinüs enfeksiyonu
3) İki ay veya daha uzun süren antibiyotik kullanımı
4) Bir yılda 2 veya daha fazla pnömoni
5) Büyüme ve gelişme geriliği
6) Yineleyen cilt, derin doku veya organ abseleri
7) Ağızda veya ciltte uzun süren mantar enfeksiyonu
8) Enfeksiyonu iyileştirmek için damar içi antibiyotik kullanım gereksinimi
9) 2 veya daha fazla derin doku yerleşimli enfeksiyon, fırsatçı mikroorganizmalarla enfeksiyon
10) Ailede immün yetmezlik öyküsü

PİY tanısını kolaylaştıran 10 uyarıcı işaretin erken tanıdaki önemini, yeterliliğini belirlemek ve erken tanı için uyarıcı olabilecek başka işaretlerin varlığını araştırmak amacıyla Dur ve ark.nın yaptığı çalışmada, Ocak 2011-Ocak 2015 döneminde kliniğimiz Pediatrik İmmünoloji ve Allerji Bilim Dalı polikliniğine sık hastalanma yakınmasıyla başvuran, yaşları 0-18 arasında değişen 573 olgu, 10 uyarıcı işareti sorgulayarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada aile öyküsü ve büyüme geriliği tüm PİY'ler bakımından önemli bulunmuştur. Kronik ishal, otoimmünite ve organomegalinin bu 10 uyarıcı işarete eklenebilecek ek uyarıcı işaretler olabileceği gösterilmiştir (35).

2.5.3. Tanı

PİY tanısında detaylı bir öykü, aile akrabalık öyküsü ve fizik muayene çok önemli yer tutar. Klinik olarak PİY düşünülen hastalarda önce tarama testleri, sonrasında da ileri immünolojik incelemeler ile genetik testler yapılmalıdır.

Tam kan sayımının PİY şüphesi olan hastalarda yapılması gerekmektedir. Absolu lenfosit, nötrofil ve eosinofil sayıları incelenmelidir. Eşlik edebilecek olan lökositoz, anemi ve trombositopeni açısından dikkatli olunmalıdır. Hümorale immüniteyi taramak için serum Ig A, G, M, E düzeyleri ve izohemaglutininin titresini değerlendirmek gerekir. Serum immünglobulin düzeyleri mutlaka yaşa göre değerlendirilmelidir. İzohemaglutininler, eritrositlerdeki A ve B grubu polisakkarit antijenlerine karşı oluşan IgM tipindeki antikorları göstermektedir. 1/10 titrenin üzerinde olması anlamlı kabul edilmektedir.

Hücresele immün sistemi taramak için absöle lenfosit sayısı ve ön-arka akciğer grafisinde timus gölgesini değerlendirmek gerekir. Absöle lenfosit sayısı (ALS) özellikle T hücre immün yetmezliklerini tanımda önem taşımaktadır. ALS yaşa göre değişkenlik göstermektedir. Yenidoğan ve erken süt çocukluğu döneminde 3000/mm³'ün altında olan değerler lenfopeni kabul edilirken yetişkin yaşta 1500/mm³'ün altı lenfopeni olarak kabul edilir. Kompleman sistemini taramak için CH50 ve AP50 aktivitesi istenmelidir. Fagositer sistem defektlerini taramak için NBT ve absöle nötrofil sayısı incelenmelidir.

Tarama testleri sonucunda ileri immünolojik incelemeler gerektiren hastalarda; hümorale immün sistemi değerlendirmek için IgG alt grupları, spesifik antikor yanıtları ve BTK ekspresyonu gibi hastalığa özgü tetkikler yapılmalıdır. Hücresele immün sistemin detaylı incelenmesi için periferik kan lenfosit alt grupları, invitro lenfoproliferatif yanıt ve CD40L ekspresyonu, HLA-ABC, HLA-DR ekspresyonu gibi hastalık özelinde analizler planlanmalıdır. İleri inceleme gerektiren fagositer sistem defektli hastalarda DHR, kemotaksis, adezyon molekül ekspresyonu ve fagositoz değerlendirilebilir. Kompleman eksikliği olan hastalarda ise C1-9 kompleman düzeyleri istenmelidir (36).

Akım sitometri primer immün yetmezliklerin (PİY) tanısı, sınıflandırılması, izlemi ve prenatal tanısı açısından oldukça önemlidir. Akım sitometrisi ile yapılan lenfosit alt grupları, hastalığa spesifik antijenlerin eksprese edilip edilmediğinin saptanması ve fonksiyonel testler genetik tanı öncesi yol göstericidir.

Rutin immünofenotipleme, major periferik kan lenfositlerindeki kalitatif ve kantitatif anormalliklerin değerlendirilmesi için tasarlanmış olup, pek çok PİY'in tanısına olanak sağladığı için oldukça değerlidir (24).

2.5.4. Tedavi

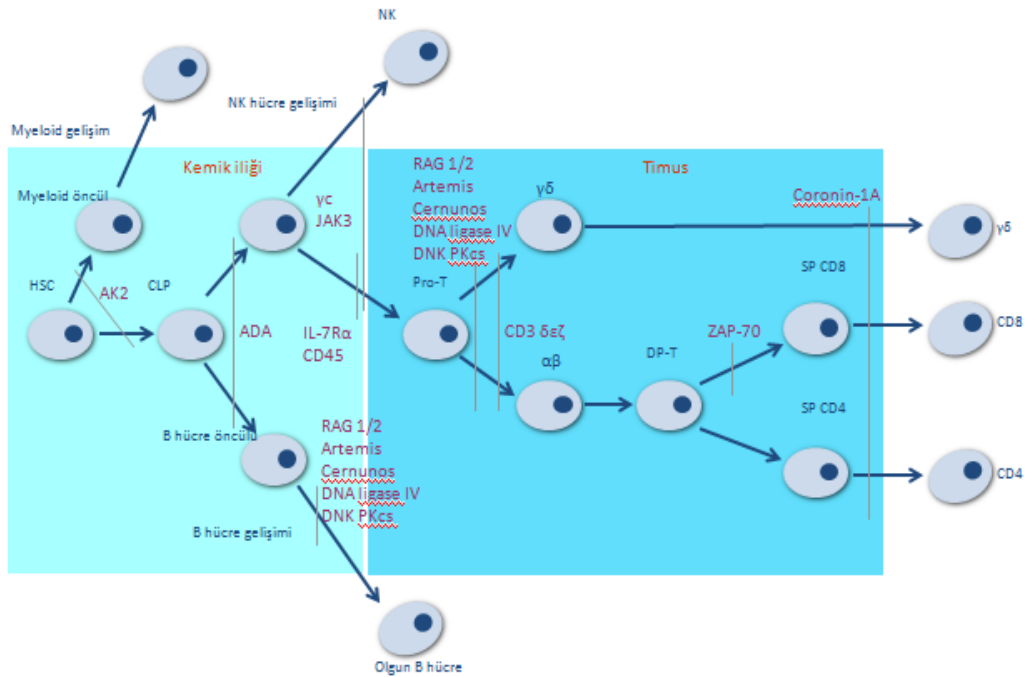
Primer immün yetmezliklerde hedefimiz erken tanı ve etkin tedavi olmalıdır. Yüksek şüphe indeksi ile hastaya yaklaşmak ve primer immün yetmezlik tanısını akla getirmek ve pediatrik immünoloji kliniklerine danışım ve yönlendirmek tanı ve tedavinin ilk basamağını oluşturmaktadır. PİY hastalarının tedavisinde ana amaç hastanın normal ya da normale yakın şekilde yaşam sürmesini sağlamak ve öğretebilmektir. Tedavide ana prensipler infeksiyonların önlenmesi, erken tanınması ve hızlı ve agresif tedavisi, organ hasarlarının engellenmesi, malnütrisyonun önlenmesi ve büyüme ve gelişmenin iyileştirilmesidir. Genel tedavi yaklaşımları spesifik ve/veya küratif tedaviler, destekleyici tedaviler ve koruyucu yaklaşımlar olmak üzere 3 ana başlıkta değerlendirilmektedir.

Spesifik ve/veya küratif tedaviler; İVİG, hematopoetik büyüme faktörleri (G-CSF, GM-CSF), sitokinler (IFN- γ , IL-2), enzim replasmanı (PEG-ADA), granülosit transfüzyonları, hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) ve gen tedavisi tedavisinden oluşmaktadır. Destekleyici Tedaviler; Beslenme (anne sütü, protein ve kalori ihtiyacının karşılanması, gerekirse TPN), kan ve kan ürünleri (eritrosit, trombosit süspansiyonları, plazma, albümin gibi), antimikrobiyal ajanlardır. Koruyucu tedavi yaklaşımları ise kan ürünlerinin ışınlanması, özel aşılama takvimi, profilaktik antimikrobiyal ajanların kullanımınıdır (36). Canlı aşılarda özellikle kombine ve ağır kombine immün yetmezliklerde kontrendikedir.

2.6. Ağır Kombine İmmün Yetmezlik

2.6.1. Tanım, Sıklık ve Doğal Seyir

Kombine immün yetmezlikler, T, B ve bazen de NK hücre gelişim ve/veya fonksiyonunda rol oynayan genlerdeki kalıtsal hataların yol açtığı, immün sistemde ciddi fonksiyon bozukluğu yaratan heterojen bir grup hastalık olarak tanımlanmaktadır (37). Lenfosit gelişimini etkileyen genler Şekil 8'de sunulmuştur (38).



Şekil 8. Lenfosit Gelişimini Etkileyen Genler (38)

KİY'lerde periferik kanda T hücreler sayı ve/veya fonksiyon olarak düşük düzeydedir. Kombine immün yetmezlikler, akım sitometrik incelemede CD3+ T hücre oranının <%20 veya absolü T hücre sayısının <300 /mL ve invitro T lenfosit fonksiyonlarının ileri derecede bozuk olması (<%10) ile seyreden AKİY'den (39, 40), klinik olarak AKİY'i akla getiren ancak laboratuvar bulgularında silik lenfopeni, otolog T hücre varlığı (300-1500/μL) ve invitro T lenfosit fonksiyonlarının düşük (%10-50) olmasıyla karakterize olan T+ AKİY veya "leaky" AKİY olarak tanımlanan gruba uzanan geniş bir spektrumu içermektedir (41). Kombine immün yetmezlik spektrumu Şekil 9'da sunulmuştur (42, 43).



Şekil 9. Kombine immün yetmezlik spektrumu (42, 43)

Ağır kombine immün yetmezlik, yaşamın ilk yılında erken tanı ve etkin tedavi olmaksızın ölümcül olması nedeniyle prognozu en ciddi primer immün yetmezliklerin başında yer alır. Ülkemizde AKİY sıklığı 1:10000'dir (44). ABD'de yenidoğan taraması uygulanmadan önce AKİY insidansı 1/100000 olarak bilinirken tarama başladıktan sonra insidans 1/58000 olarak saptanmıştır (20). Yenidoğan taramasının uygulandığı diğer ülkelerden biri olan İsrail'de AKİY insidansı 1:22500 (45) olarak saptanmıştır.

AKİY pediyatrik bir acildir. AKİY'li bebekler sıklıkla doğumda normal görünürler, ilk hafta ve aylarda asemptomatik olabilirler. Ailede immün yetmezlik

öyküsü olmayabilir (46). Hastaların asemptomatik olduğu dönemde, ağır ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlar ve ciddi komplikasyonlara yol açan canlı aşılardan yapılmadan ve organ hasarı gelişmeden tanı almaları tedaviye (hematopoietik kök hücre nakli, enzim replasman tedavisi veya gen tedavisi) olanak sağlar (46-48). AKİY'in doğal seyri Şekil 10'da gösterilmiştir (49).



Şekil 10. AKİY'in doğal seyri (49)

AKİY'in farklı tiplerinin oluşumundan sorumlu 6 ayrı mekanizma vardır. Bu mekanizmalar Hematopoetik öncüllerin yaşamında bozukluk, toksik metabolit birikimi, sitokin sinyal bozuklukları, V(D)J rekombinasyon ve TCR bozuklukları, TCR bozuklukları ve timusla ilgili bozukluklardır. Tablo 3'de bu mekanizmalara yol açan defektler, gösterdikleri fenotipler ve kalıtım şekilleri verilmektedir (50).

Tablo 3. AKİY'den sorumlu mekanizmalar, ortaya çıkan defektler, kalıtım şekli ve immünofenotipik özellikler (50)

	Defekt	Fenotip	Kalıtım
Hematopoetik öncüllerin yaşamında bozukluk	AK2	T-B-NK-	AR
Toksik metabolit birikimi	ADA PNP	T-B-NK- T-B+NK-	AR AR
Sitokin sinyal bozuklukları	IL-2RG JAK3 IL-7RA	T-B+NK- T-B+NK- T-B+NK+	XL AR AR
V(D)J rekombinasyon ve TCR bozuklukları	RAG1/RAG2, Artemis, DNA-PKcs, Cernunnos, LIG4	T-B-NK+	AR
TCR bozuklukları	CD45 CD3ε, γ, ζ CORO1A	T-B+NK+ T-B+NK+ T-B-NK+	AR AR AR
Timusla ilgili bozukluklar	FOXN1 DiGeorge send.	T-/düşükB+NK+ T-B+NK+	AR De novo / AD

2.6.2. Sınıflama

AKİY lenfosit alt gruplarına ve sorumlu mekanizmanın tipine göre farklı formlara ayrılmaktadır. T hücreleri olguların tamamında bulunmazken, NK ve B hücrelerinin olup olmasına göre akım sitometri ile immünolojik sınıflama yapılabilir.

X-linked AKİY, IL-2 reseptörünün ortak gamma zincirindeki mutasyonlardan kaynaklanır ve dünya geneline bakıldığında tüm AKİY vakalarının %50'sini oluşturur. Bu AKİY formu, bir T-B +NK- fenotipi ile sonuçlanır, çünkü bozulmuş sinyalleme, T hücresi ve NK hücre gelişimini bozar, fakat B hücresi gelişimini etkilemez. OR geçişli JAK3 eksikliği de (tüm vakaların %10'u) aynı fenotipe yol açmaktadır. Adenozin deaminaz (ADA) eksikliği tüm AKİY vakalarının %20'sini oluşturur ve T-B-NK-AKİY fenotipindedir. ADA eksikliği, her tip lenfosit için toksik olan metabolit birikimi ile sonuçlanır.

T-hücre sayıları, maternal T hücre engraftmanı olması veya hipomorfik "*leaky*" AKİY mutasyonunun (Omenn sendromu) varlığında cilt, dalak, lenf nodu veya karaciğer gibi dokularda dar repertuarlı klonal T hücre gelişimi sonucu normal olabilir. Her iki durumda da dolaşımdaki T-hücrelerinin ağırlıklı olarak bellek fenotipi (CD45RO) vardır ve mitojenlere yanıt olarak proliferasyon çok düşüktür (51).

Ülkemizde ise akraba evliliği oranlarının yüksek olması nedeniyle otozomal resesif geçişli formlar daha yaygın görülmektedir. 2011 yılında Sanal ve Tezcan'ın çalışmasında Türkiye'den 51 ve ABD'den 174 AKİY hastasındaki genetik defektler karşılaştırılmış ve ABD grubunda X'e bağlı geçişli olan genetik defektler daha sık görülürken, Türkiye grubunda ise RAG1/2, Artemis ve JAK3 defektlerinin AKİY vakalarının çoğunluğunu oluşturduğu gösterilmiştir (28). Bu veri aynı zamanda ülkemizde T-B-NK+ immünofenotipteki AKİY sıklığının fazlalığına da işaret etmektedir.

2.6.3. Klinik Özellikler ve Tanı

Hastalarda erken bebeklik döneminde oral monoliazis, kronik diyare, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, deri enfeksiyonları ve sepsis gibi etkenleri virüs, bakteri, mantar ve parazit olabilen enfeksiyonlar görülür. Enfeksiyonların direngen ve yineleyici olması büyüme gelişme geriliği ve malnutrisyona yol açabilir (52). Ağır kombine immün yetmezliğin tanısı için kullanılan ESID (European Society for Immunodeficiencies) tanı kriterleri Tablo 4'de belirtilmiştir (53).

Tablo 4. AKİY tanı kriterleri (53)

Kesin tanı
2 yaşından küçük kız veya erkek hasta ve; a) Transplental kazanılmış maternal T hücrelerinin engraftmanı veya b) %20 den az sayıda CD3+T hücre sayısı, 3000/mm ³ den az absolü lenfosit sayısı ve aşağıda belirtilenlerden en az biri;
1) γ C mutasyonu
2) JAK3'te mutasyon
3) RAG1 veya RAG2'de mutasyon
4) IL-7R α 'da mutasyon
5) %2'nin altında ADA aktivitesi ya da ADA'nın her iki allelinde mutasyonlar
Olası tanı
2 yaşından küçük kız veya erkek hastanın; <%20 CD3 + T hücreleri olması <3000 /mm ³ absolü lenfosit sayısı olması <%10 mitojenlere proliferatif yanıtı olması veya dolaşımdaki maternal lenfositlerin varlığı

2.6.4. Tedavi

Ağır kombine immün yetmezlik (AKİY), PİY hastalıklarının en şiddetli formudur ve T hücrelerinin eksikliği ile kendini gösterir. B ve NK hücreleri, moleküler defekte bağlı olarak olabilir veya olmayabilir. Bu durum pediatrik bir

acildir. Hızlı tanı ve etkin tedavi gerektirir. HKHN AKİY'de kür sağlayıcı tedavidir. Ağır kombine immün yetmezlikte ilk başarılı allojenik kök hücre nakli Gatti ve Good tarafından 1968 yılında gerçekleştirilmiştir (54).

1997-2017 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı'nda ağır kombine immün yetmezlik tanısı alan olguların klinik ve immünolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla Bayram ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kliniğimize başvuran AKİY tanılı 68 olgu retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 68 hastanın 57'sine HKHN yapılmıştır. Nakil öncesinde aktif enfeksiyonu olan hastalarda (n=43) sağkalım %74,4 saptanmıştır. Nakil öncesinde enfeksiyonu olmayan ya da enfeksiyonu olan ancak tedavi edilen hastalarda (n=14) ise sağkalım %100 olarak saptanmıştır. Çalışma sonuçları nakil öncesi enfeksiyon durumunun sağkalım üzerine önemli etkisi olduğunu göstermiştir ($p<0,05$), (52).

Nakile kadar geçecek süre içerisinde intravenöz immünglobulin (IVIg) replasman tedavisi başlanmalıdır. Trimetoprim-sulfametoksazol, Pneumocystis jirovecii profilaksisi, flukonazol ya da itrakonazol antifungal profilaksi ve asiklovir antiviral profilaksi amacıyla tüm hastalara rutin olarak verilmelidir. AKİY hastalarında BCG, oral polio, rotavirüs ve kızamık gibi canlı aşular kesinlikle yapılmamalıdır. Kontrendikedir (55, 56).

2.6.5. Tarama

PCR tekniğine dayanan ve "Guthrie" kartına alınan TREC miktarını ölçmek T hücre lenfopenisi için uygun bir tarama yöntemidir. TREC, V(D)J rekombinasyonu sırasında ayrılan genomik DNA parçacıklarının birleşerek oluşturduğu dairesel DNA parçacıklarıdır (57).

2005 yılında Kee Chan ve Jennifer Puck, geniş ölçekli popülasyonun AKİY ve diğer T hücre lenfopeni formlarını açısından taraması için TREC testinin uygulanabileceğini tanımladılar (57). Sonrasında TREC testi optimize edildi ve ilk AKİY tarama pilot çalışması, Jack Routes ve James Verbsky liderliğinde

Wisconsin'de 2008'de başlatıldı (58). Aynı yıl içerisinde yenidoğan taraması ile tespit edilen AKİY'li ilk çocuğa başarıyla HKHN uygulandı (4). Daha sonraki yıllarda taramaya katılan eyaletler, 2009 yılında Massachusetts, 2010 yılında California ve New York'tur. Günümüzde ABD'de doğan bebeklerin %94'ü yenidoğan döneminde taranmaktadır (59).

3 milyondan fazla bebeğin tarandığı ABD'de yapılan çalışmalarda, AKİY insidansı 1:58000 ile beklenenden çok daha yüksek bulunmuştur (20). ABD'deki yıllık canlı doğum oranı yaklaşık 4 milyondur. Daha önce AKİY insidansının 1:100000 olduğu tahmin edildiği için tarama, beklenen vakaların sayısını yıllık olarak yaklaşık 40'dan 69'a çıkarmıştır ve her yıl 29 hastanın daha tanımlandığı ve küratif tedaviyle yöneltildiği belirtilmiştir (4, 60).

Yenidoğan tarama programları dünyanın çeşitli bölgelerinde hızla uygulanmaktadır. Birçok AB üye ülkesinde, Fransa, İtalya, İsveç ve İspanya da dahil olmak üzere AKİY yenidoğan taraması konusunda ulusal veya bölgesel pilot çalışmalar bulunmaktadır. Tayvan ve Katar 2012, İsrail 2015 ve Porto Riko ise 2016 yılında ulusal düzeyde yenidoğan taramasına başlamıştır (61).

AKİY ve diğer T hücre lenfopenili bebekleri tanımlamak için Guthrie kartlarından elde edilen DNA örneklerinden TREC ölçümünün yapılması dünya çapında kabul görmüştür. Bu ölçüm başta AKİY olmak üzere T hücre lenfopenisi ile seyreden diğer PİY'lerin ve PİY dışı bazı hastalıkların da tanınmasına olanak sağlamaktadır. TREC yöntemiyle yapılan taramada saptanabilen hastalıklar Tablo 5'de verilmektedir (4).

Ülkemizde de AKİY'e yönelik ilk yenidoğan tarama çalışması kliniğimizde üniversitemiz bilimsel araştırma projeleri biriminin desteğiyle elde edilen proje kapsamında tamamlanmış ve retrospektif olarak değerlendirilen 5000'in üzerinde örnekte TREC yöntemi kurulmuştur. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu işbirliği ve TÜBİTAK-NIH 1003 projesi desteğiyle prospektif pilot çalışmaya başlanmıştır.

Tablo 5. TREC yöntemiyle yapılan taramada saptanabilen hastalıklar (4).

AKİY	Diğer sitogenetik anomaliler
22q delesyon sendromu	• 6p delesyonu
Kombine immün yetmezlikler*	• Halka kromozom 14
Ataksi-Telenjektazi	• Halka kromozom 17
DOCK 2 eksikliği	• Kromozom 17p duplikasyonu
EDA-ID	• 14q mikrodelesyonu
Trizomi 21	Sekonder Sebepler
Trizomi 18	Prematürite
Kabuki sendromu	Konjenital kalp hastalığı
CHARGE sendromu	Şilotoraks
Noonan sendromu	Multipl konjenital anomaliler
Jacobsen sendromu	Gastrointestinal anomaliler
Nijmegen breakage sendromu	• Gastroşizis
Fryns sendromu	Üçüncü boşluğa kayıplar
Schimke immüno-osseöz displazisi	• Vasküler leakage
Kıkırdak-saç hipoplazisi	• Hidrops
CLOVES	Neonatal lösemi
ECC	Maternal otoimmün hastalık
Rac2 defekti	Maternal HIV enfeksiyonu
Renpenning sendromu	Maternal immüno-supresyon
TAR	Diğer maternal medikasyonlar: Ritodrin

56 numaralı referanstan değiştirilerek adapte edilmiştir.

* MHC Klas II eksikliği, Omenn sendromu ve Zap70 eksikliği, geç ADA eksikliği dışında kalan kombine immün yetmezlikler

EDA-ID (immün yetmezlik ilişkili ektodermal displazi), CLOVES (konjenital, lipomatöz, overgrowth, vasküler malformasyonlar, epidermal nevi, spinal/iskelet anomalileri ve/veya skolyoz), ECC (ektodermal displazi, ektrodaktili, and clefting), TAR (Trombositopeni ve radius yokluğu)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Seçimi

Sağlıklı Türk çocuklarında YTG düzeylerini belirlemek ve yaşla birlikte değişimini saptamak amacıyla yapılan bu çalışma kordon kanı, 6 ay, 1 yaş, 2 yaş, 4 yaş ve 6 yaş olarak 6 ayrı yaş döneminde gerçekleştirildi. Her bir yaş grubunda 20 sağlıklı bebek-çocuk olmak üzere toplam 120 sağlıklı bebek ve çocuk çalışmaya alındı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğindeki bebeklerden alınan kordon kan örnekleri ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Sosyal Pediatri Bilim Dalı ve Çocuk Genel Polikliniği takibindeki 0-6 yaş arasındaki bebek ve çocuklar çalışmaya dahil edildi.

Sosyal Pediatri Bilim Dalı ve Çocuk Genel Polikliniği takibindeki 0-6 yaş arasındaki sağlıklı bebek ve çocuklar hiçbir kronik hastalığı ve akut enfeksiyonu olmayan, normal gelişimli sağlıklı bebek ve çocuklardan oluşmuştur. Özgeçmiş veya soygeçmişlerinde kronik hastalığı olanlar, akut enfeksiyonu olanlar, tanımlanmış ya da şüpheli primer veya sekonder immün yetmezlik hastalığı olanlar çalışmaya alınmamıştır. Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğindeki sağlıklı bebeklerden alınan kordon kan örnekleri bilinen bir kronik hastalığı veya enfeksiyonu olmayan gebelerden zamanında doğan bebeklerden oluşmaktadır. Perinatal asfiksi öyküsü (5.dakikada APGAR skoru <7) olanlar, klinik (hipo-hipertermi, apne-solunum bozukluğu, letarji, ciltte renk değişikliği) ve laboratuvar (lökopeni-lökositoz <5000 - >25000/mm³, periferik kan yaymasında sola kayma; çomak/granülosit oranı >%20) olarak enfeksiyon düşündürücü bulgusu da kültür pozitifliği ile kanıtlanmış enfeksiyonu olanlar, hemoglobin değeri <12.5 gr/dl ile anemi ve/veya kan değişimi gereksinimi olanlar, ABO ve Rh-Rh uygunsuzluğu olanlar ve konjenital anomalileri olan bebekler çalışmaya alınmamıştır.

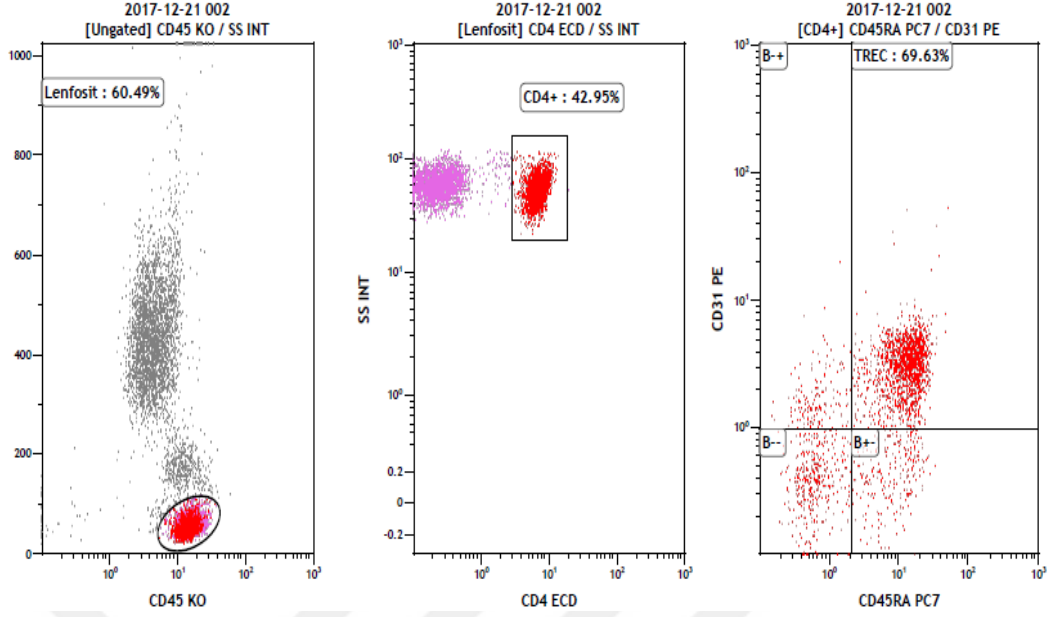
Çalışmanın gerçekleşmesi için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 23 Ocak 2017 tarihinde 02-61-17 karar numarası ile onay alınmıştır.

3.2. Laboratuvar İncelemeleri

Çalışma sürecindeki YTG (CD4+CD45RA+CD31+) ölçümleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı Klinik Servis Test Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.3. Yöntem

Şubat 2017 - Aralık 2017 döneminde 0-6 yaş arası sağlıklı 120 bebek ve çocukta periferik kanda YTG (CD4+CD45RA+CD31+) düzeyleri immünofenotipleme yöntemi ile akım sitometri (flow cytometry) cihazında, 4 renk boyama ile ölçüldü. Bu değerlendirme için EDTA içeren tüplere 2 cc venöz kan örneği alındı. 12x75 mm polistiren tüplere alınan 100µl kan örneği üzerine CD4, CD45RA, CD31, CD45 işaretli monoklonal antikorlar eklendi (Beckman Coulter, Marseille, France). Örnekler oda ısısı ve karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakılarak lenfositlerde yüzey boyaması yapıldı. İnkübasyonun ardından örnekler tam kan lizis yöntemi ile eritrosit uzaklaştırma işlemi uygulandı. Süspansiyon haline getirilen örnekler akım sitometri cihazında analiz edildi. SS/FS ve CD45/SS detektörlerinin kullanımı ile hücreler büyüklük, granül içerikleri ve CD45 pozitifliğine göre, diğer periferik kan hücrelerinden yerleşim yerleri esas alınarak ayrıldı. CD45/SS kapısı içindeki CD4+ hücre popülasyonunda CD45RA+CD31+ hücre düzeyleri ölçüldü (NAVIOS, Beckman Coulter, USA, Software Kaluza 1,3). Şekil 12'de akım sitometri ile CD45/SS kapısı içindeki CD4+ hücre popülasyonunda CD45RA+CD31+ hücre düzeyleri ölçümü örneği gösterilmiştir.



Şekil 11. Akım sitometri ile CD45/SS kapısı içindeki CD4+ hücre popülasyonunda CD45RA+CD31+ hücre düzeyleri ölçümü

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bilim Dalı'ndan destek alınarak yapılan istatistiklerde IBM SPSS Statistics 15.0 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) istatistik paket programında değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler olarak birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama±standart sapma (SD), median, 5 persantil ve 95 persantil değerleri olarak verildi. Kategorik değişkenlerin değerlendirilmesinde Pearson Ki-Kare ve Fisher's exact testi kullanıldı. Sayısal değişkenlere ait verilerin normal dağılımı Shapiro Wilk, normallik testi ve Q-Q grafikleri ile değerlendirildi. İki grubun karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değişkenlerde Bağımsız Örneklem T testi ile, normal dağılıma uymayan değişkenlerde ise Mann-Whitney U analizi ile yapıldı.

$p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Şubat 2017 - Aralık 2017 döneminde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğindeki bebeklerden alınan kordon kan örnekleri ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Sosyal Pediatri Bilim Dalı ve Çocuk Genel Polikliniğine başvuran 0-6 yaş arasındaki bebek ve çocuklardan alınan kan örnekleri olmak üzere toplam 120 sağlıklı bebek ve çocuk çalışmaya alındı.

4.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri

Çalışmaya alınan 120 sağlıklı bebek ve çocuğun yaş ve cinsiyet özellikleri Tablo 6'da sunulmuştur. Çalışmaya alınan 120 sağlıklı bebek ve çocuğun 52'si kız (%43.3), 68'i erkektir (%56.7). Kordon kan grubu 13 kız (%65) ve 7 erkektir (%35). 6 ay grubu 9 kız (%45) ve 11 erkek (%55), 1 yaş 8 kız (%40), 12 erkekten (%60) oluşmaktadır. 2 yaş grubunda 8 kız (%40) ve 12 erkek (%60) bulunmaktadır. 4 yaş grubundaki çocukların 6'sı kız (%30), 14'ü erkektir (%70). 6 yaş grubunda ise 8 kız (%40), 12 erkek vardır (%60).

Tablo 6. Sağlıklı bebek ve çocuk gruplarının yaş ve cinsiyet dağılımı

YAŞ GRUBU	Kordon	6 ay	1 yaş	2 yaş	4 yaş	6 yaş	Toplam	
SAYI	20	20	20	20	20	20	120	
Cinsiyet	Kız (%)	13 (65)	9 (45)	8 (40)	8 (40)	6 (30)	8 (40)	52 (43.3)
	Erkek (%)	7 (35)	11 (55)	12 (60)	12 (60)	14 (70)	12 (60)	68 (56.7)

4.2. Yaşa Göre Periferik Kanda YTG, BK, ALS Sayıları ve Yüzde Değerleri

Bu çalışmada 0-6 yaş grubundaki sağlıklı Türk çocuklarından alınan periferik kan örneklerinde timopoezin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu değerlendirmelerin sonuçları toplu olarak Tablo 7'de sunulmuş, grafik çizimleriyle detaylandırılmıştır.

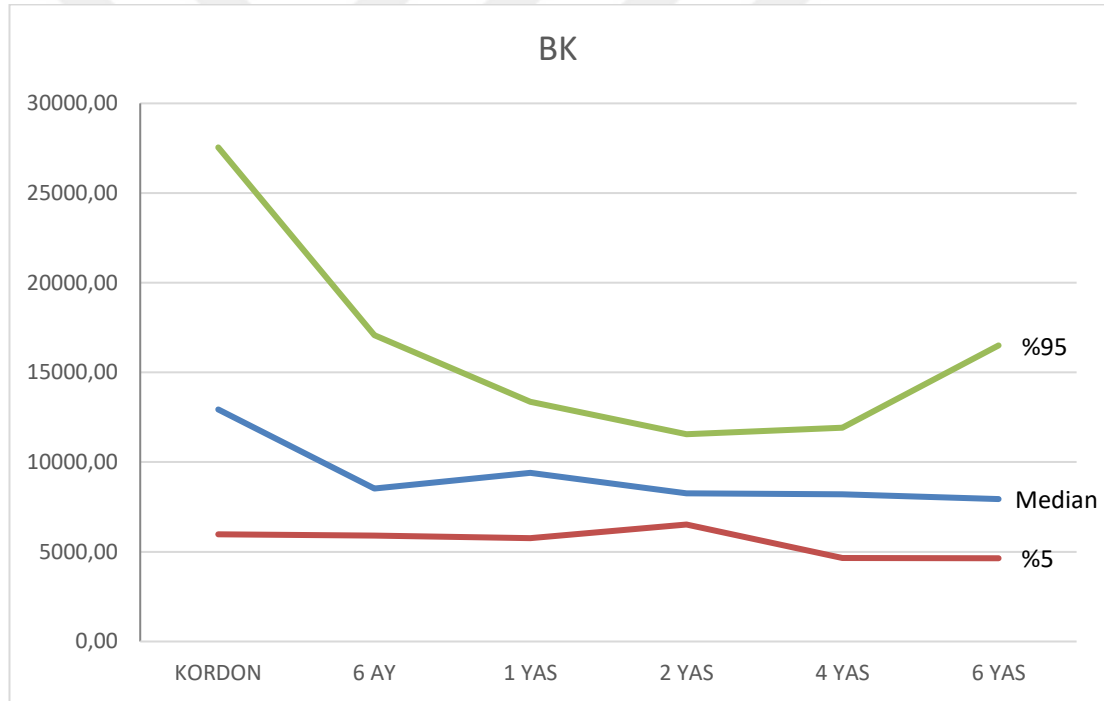
Tablo 7. Yaşa göre periferik kanda YTG, BK, ALS sayıları ve yüzde değerleri

YAŞ		BK /mm ³	ALS /mm ³	YTG (%) CD4+ CD45RA+ CD31+	Absolü YTG /mm ³
KORDON	Median	12935	3930	68.36	1319
	5	5967	2484	59.66	896
	95	27545	8949	81.09	2299
6 AY	Median	8535	5260	76.85	2043
	5	5901	3132	63.59	929
	95	17071	12092	81.79	4981
1 YAŞ	Median	9410	5385	73.00	1829
	5	5770	3056	57.15	969
	95	13356	9652	82.37	3832
2 YAŞ	Median	8260	4865	68.90	1377
	5	6521	2870	57.19	646
	95	11555	7747	79.36	2284
4 YAŞ	Median	8215	3395	63.97	852
	5	4652	1850	55.46	544
	95	11922	5784	74.47	1516
6 YAŞ	Median	7940	3105	58.05	732
	5	4640	1882	53.73	406
	95	16508	7245	69.89	1654

Tablo 8'de sağlıklı Türk çocuklarında beyaz küre sayılarının median ve %5-95 aralıkları verilmiştir. Şekil 12'de beyaz küre sayılarının yaşa göre değişimi verilmiştir.

Tablo 8. Sağlıklı Türk çocuklarında beyaz küre sayılarının median ve %5-95 aralıkları

	Kordon	6 ay	1 yaş	2 yaş	4 yaş	6 yaş
Median	12935	8535	9410	8260	8215	7940
%5	5967	5901	5770	6521	4652	4640
%95	27545	17071	13356	11555	11922	16508

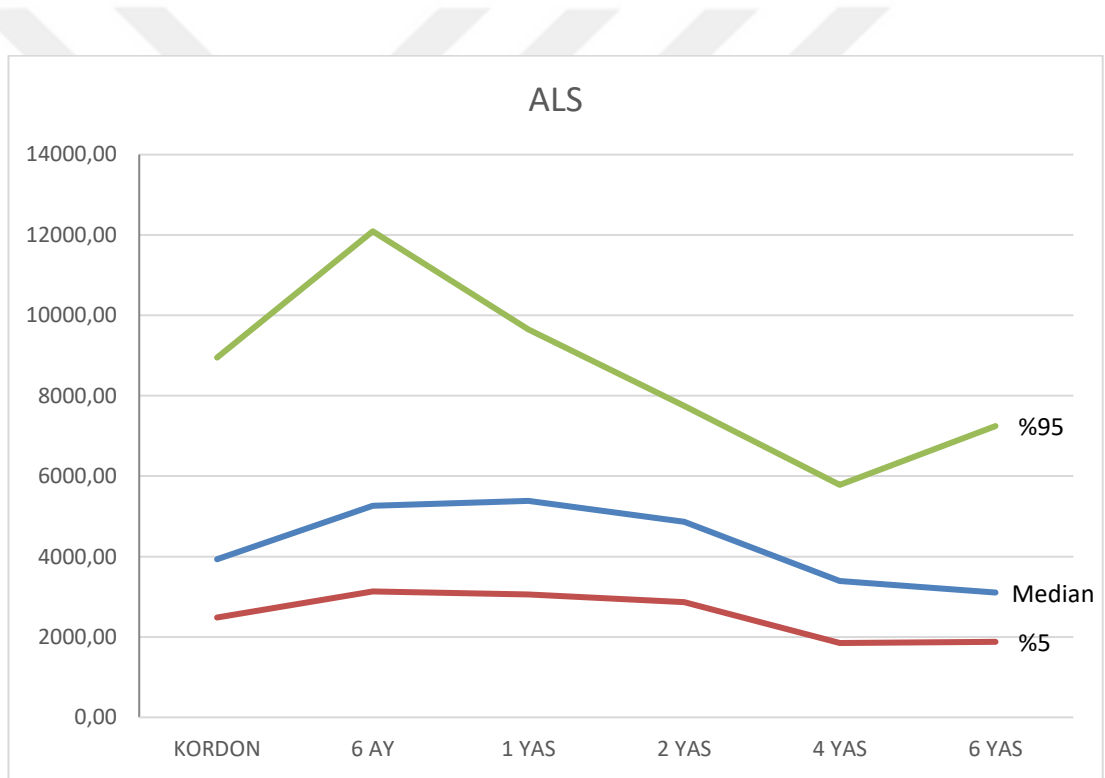


Şekil 12. Beyaz küre sayılarının yaşa göre değişimi

Tablo 9'da sağlıklı Türk çocuklarında absö lü lenfosit sayılarının median ve %5-95 aralıkları verilmiştir. Şekil 13'de absö lü lenfosit sayılarının yaşa göre değişimi verilmiştir.

Tablo 9. Sağlıklı Türk çocuklarında absö lü lenfosit sayılarının median ve %5-95 aralıkları

	Kordon	6 ay	1 yaş	2 yaş	4 yaş	6 yaş
Median	3930	5260	5385	4865	3395	3105
%5	2484	3132	3056	2870	1850	1881
%95	8949	12092	9652	7747	5784	7244

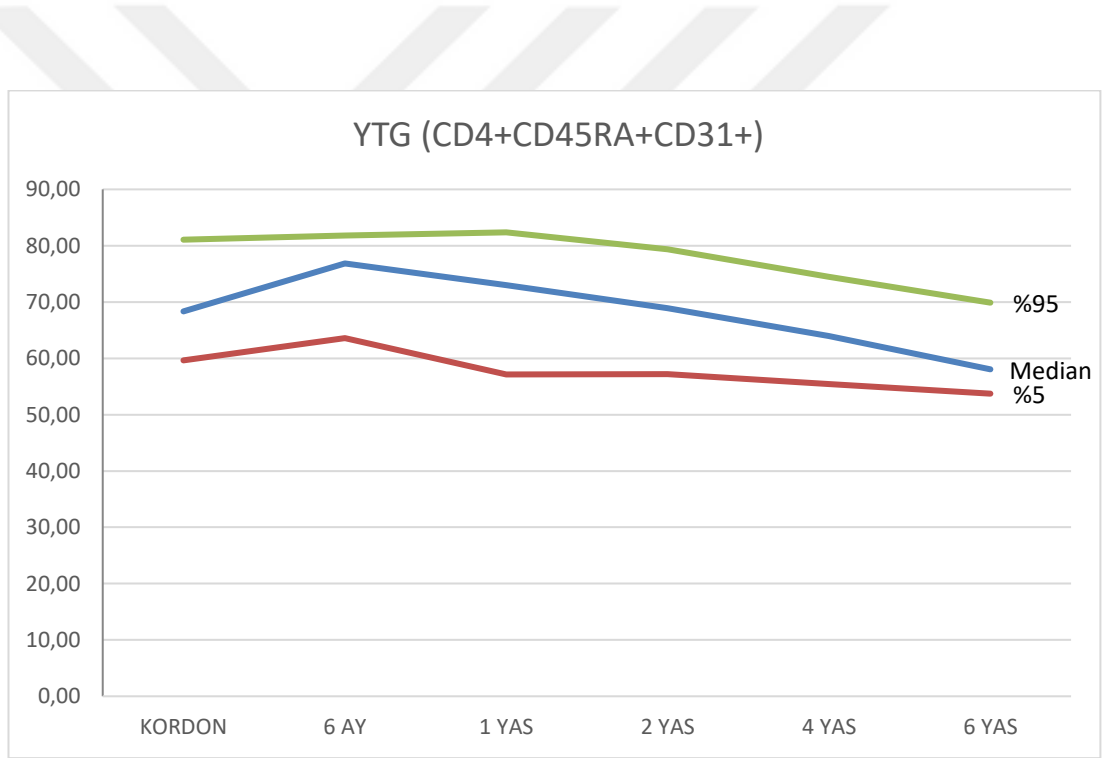


Şekil 13. Absö lü lenfosit sayılarının yaşa göre değişimi

Tablo 10'da sağlıklı Türk çocuklarında YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin median ve %5-95 aralıkları verilmiştir. Şekil 14'de YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin yaşa göre değişimi verilmiştir.

Tablo 10. Sağlıklı Türk çocuklarında YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin median ve %5-95 Aralıkları

	Kordon	6 ay	1 yaş	2 yaş	4 yaş	6 yaş
Median	68.36	76.85	73.00	68.90	63.97	58.05
%5	59.66	63.59	57.15	57.19	55.46	53.73
%95	81.09	81.79	82.37	79.36	74.47	69.89

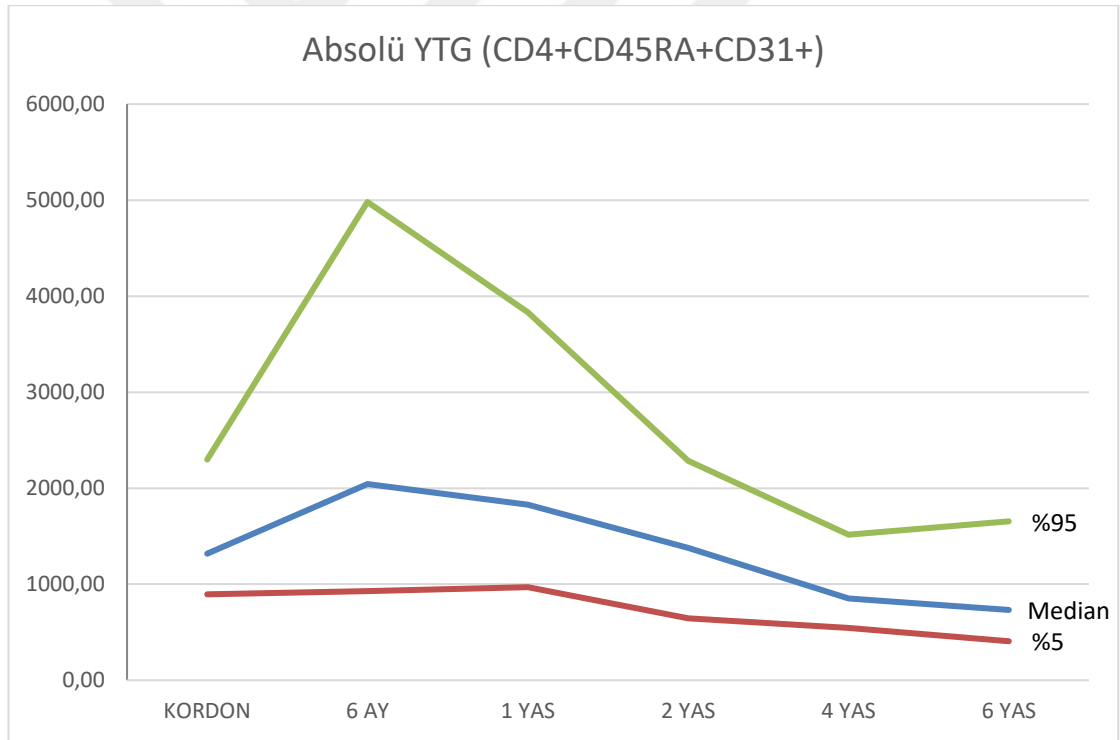


Şekil 14. YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin yaşa göre değişimi

Tablo 11'de sağlıklı Türk çocuklarında YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin absolü sayılarının median ve %5-95 aralıkları verilmiştir. Şekil 15'te YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücrelerin absolü sayılarının yaşa göre değişimi verilmiştir.

Tablo 11. Sağlıklı Türk çocuklarında YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin absolü sayılarının median ve %5-95 Aralıkları

	Kordon	6 ay	1 yaş	2 yaş	4 yaş	6 yaş
Median	1319	2043	1829	1377	852	732
%5	896	929	969	646	544	406
%95	2299	4981	3832	2284	1516	1654



Şekil 15. YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücrelerin absolü sayılarının yaşa göre değişimi

5.TARTIŞMA

Ülkemizde akraba evliliği oranının yüksek olması nedeniyle çoğu otozomal resesif geçişli olan kombine immün yetmezlikler daha sık görülmektedir. Önemli bir halk sağlığı sorunu olan primer immün yetmezlik (PİY)'lerde, özellikle de kombine immün yetmezlik (KİY)'lerde erken tanı ve etkin tedavi hayat kurtarıcıdır.

PİY hastalıkları arasında ağır kombine immün yetmezlik (AKİY)'ler ilk 1-2 yaşta tanı almadığı ve uygun tedavi edilmediği takdirde ölümlü sonuçlanan bir pediatrik acildir. AKİY'lerde yetersiz timopoez nedeniyle deneyimsiz (naif) T hücre sayılarında düşüklük saptanmaktadır. AKİY'li bebekler doğumda normal görünürler ve yaşamın ilk aylarında asemptomatik olabilirler (46). Hastaların asemptomatik oldukları dönemde taranması; ağır ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlar ortaya çıkmadan, ciddi komplikasyonlara yol açan canlı aşılardan yapılmadan ve organ hasarı gelişmeden erken tanı almalarına, uygun ve etkin tedavi edilmelerine olanak sağlamaktadır (46-48). Günümüzde hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) hastalığın tek küratif tedavisidir.

Hastaların tanı ve nakil yaşları ile nakil sırasında aktif enfeksiyonlu olup olmamaları nakil sonucunu önemli ölçüde etkilemektedir. Pai ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları retrospektif çalışmada 10 yıllık bir dönemde 25 merkezde HKHN yapılan 240 AKİY'li bebeğin uzun dönem sağkalım verileri ve etkileyen faktörler ele alınmıştır. 3.5 ay veya öncesinde ve enfeksiyonsuz nakil olan bebeklerde 5 yıllık sağkalım oranı %94 (64/68 bebek) iken 3.5 aydan büyük ve nakil sırasında aktif enfeksiyonu olan grupta sağkalım %50 (45/91 bebek) olarak bildirilmiştir (40). AKİY'li hastalarda; nakil yaşı, nakil sırasında aktif enfeksiyon varlığı ve T hücre yeniden yapılanması uzun dönemde sonucu etkileyen en önemli faktörler olarak belirlenmiştir (40).

Gennery ve arkadaşlarının Avrupa'da nakil yapılan 699 AKİY hastasını incelediği çalışmada erken yaşta nakil yapılan, T-B+ fenotipe sahip olan, aile içi tam uygun donörü bulunan ve nakilden önce enfeksiyonu olmayan hastaların iyi prognoz

gösterdiği raporlanmıştır. Nakil yaşı 6 aydan küçük olan AKİY hastalarının nakil yaşı 12 aydan daha büyük olan hastalarla karşılaştırıldığında 10 yıllık sağkalımının küçük yaşta nakil olan hastalarda daha iyi olduğu bildirilmiştir (%68 ve %51, $p<0,001$), (62).

Bu geniş hasta gruplarının yer aldığı çalışmaların da işaret ettiği gibi AKİY' de erken tanı, sonucu ve sağ kalımı etkileyen en değerli unsurdur. Erken tanının ön şartı ise bebeği ilk gören ve izleyen hekimin hastalıktan şüphe etmesi; öykü, fizik muayene ve temel laboratuvar bulguları ışığında tanıyı akla getirmesidir. Lenfopeni AKİY'li hastaların %90'ında hekime başvuru sırasında saptanmaktadır. Yetersiz timopoez nedeniyle deneyimsiz (naif) T hücre sayılarındaki düşüklük lenfopeniden sorumludur (52). Bu nedenle, başta ağır kombine immün yetmezlik olmak üzere T hücre gelişim bozukluğu gösteren tüm kombine immün yetmezliklerin tanısında timopoezin değerlendirilmesi en sağlıklı ölçüttür.

Timopoez bir başka deyişle timustan periferik kana yeni geçen naif T hücrelerin varlığı (yeni timik göçmenler-YTG) iki yöntem ile değerlendirilebilmektedir. Bu yöntemlerden birincisi moleküler olarak T hücre reseptörünün normal gelişimi sırasında gerçekleşen VDJ genlerinin rekombinasyonundan arta kalan sirküler yapılu DNA artıklarının değerlendirilmesi; yani TREC (T cell receptor excision circle) ölçümüdür. Guthrie kartlarına alınan bir damla topuk kanından elde edilen DNA örneğinde, TREC kopya sayısı PCR yöntemi ile ölçülerek değerlendirme yapılır. Bu metod günümüzde AKİY' in yenidoğan döneminde taranması (New Born Screening-NBS) amacı ile kullanılmaktadır (4). Diğeri ise CD4, CD45RA, CD31 monoklonal antikolarını yüzeyinde taşıyan, timusdan yeni olarak periferik kana geçen T lenfositlerinin akım sitometrisi ile immüfenotipik yöntemle belirlenmesi esasına dayalı ölçümdür. Öykü özellikleri ve klinik bulguları ile PİY/T hücre gelişim defekti şüphesi taşıyan bir hastada kullanılan tanı testlerinden biridir. Periferik kan lenfosit altgrup tayini ve fonksiyonel testlerle birlikte immün sistemin değerlendirilmesi amacıyla yapılır. Bu sayede PİY düşünülen bir hastada timopoezin etkilenmiş olup olmadığı belirlenir. PİY şüphesi taşıyan hastada erken tanıya olanak sağlaması bakımından çok önemlidir.

Uluslararası ve ulusal literatürde, timopoezi immüfenotipik olarak ölçtükten sonra elde edilen % değeri ve mutlak sayıların normal veya düşük olup olmadığını konusunda yorum yapmayı sağlayacak, sağlıklı bebek ve çocuklarda ölçülmüş normal referans değerler bulunmamaktadır. Bu noktadan hareketle, çalışmamızda kordon kanı, 6 ay, 1 yaş, 2 yaş, 4 yaş ve 6 yaş olarak 6 ayrı yaş döneminde, her bir yaş grubunda 20 sağlıklı bebek-çocuk olmak üzere toplam 120 sağlıklı bebek ve çocukta normal YTG düzeyleri (CD4+CD45RA+CD31+) ve absö YTG (CD4+CD45RA+CD31+) sayıları belirlenmiştir.

YTG (CD4+CD45RA+CD31+) T hücrelerin sayısal düzeyi akım sitometrisinde immüfenotipleme yöntemi ile venöz kan örneğinde ölçülmektedir. Bu yöntem PCR ile TREC ölçüm yöntemine kıyasla daha yaygın kullanılabilir bir yöntem olmakla birlikte yenidoğan tarama testi olarak değil tanı aşamasında kullanılan bir yöntemdir. Bu nedenle T hücre gelişim defekti şüphesi taşıyan hastalardan elde edilecek YTG (CD4+CD45RA+CD31+) düzeylerinin normal (referans) değerlere göre kıyaslanarak değerlendirilmesi klinik olarak AKİY veya AKİY dışı KİY düşünülen hastaların erken tanı ve etkin tedavi almasına katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda, YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre mutlak sayı ve yüzde değerleri kordon kanı grubunda 6 ay grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,028$). Gözden geçirilebildiği kadarıyla literatürde de CD45RA+ deneyimsiz (naif) T hücrelerin rölatif ve absö oranlarının doğum sonrası 6.ayda pik değerine ulaştığı; kordon kanında 6 ay grubuna göre düşük bulunduğu belirtilmiştir (63). YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücrelerin absö sayı ve düzeylerindeki bu fark kordon kanının kendine özel kompozisyonundan kaynaklanabilir. Nitekim kordon kanındaki lenfosit düzeyi yenidoğan ve süt çocukluğu dönemlerine kıyasla düşüktür (64).

YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin absö sayısı ($p<0,001$) ve rölatif oranları ($p=0,018$) yaş büyüdükçe azalmaktadır. Bu değişimin temel nedeni yaşla beraber timus dokusunda ortaya çıkan yapısal değişiklik ve involusyondur.

Literatürde erişkinlerde yapılmış ve bu bilgiyi destekler bazı çalışmalar yer almaktadır

Ye ve Kirschner'in raporunda günlük üretilen YTG sayısı ve 80 yıllık bir yaşam süreci boyunca TREC konsantrasyonundaki değişiklikler ölçülmüş ve yaşlanma sırasında timik involusyonun hem CD4 + hem de CD8 + T hücre popülasyonlarında TREC konsantrasyonlarında yaş bağımlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (65).

Yine erişkin çağda HIV enfeksiyonu veya "*HAART (highly active antiretroviral therapy)*" sonrası TREC hücre düzeyi değişiklikleri ile ilgili çalışmalara literatürde rastlanmaktadır.

Douek ve arkadaşlarınca, TREC'in deneyimsiz (naif) T hücrelerine spesifik olduğu, HIV enfeksiyonu sırasında ve sağlıklı bireylerde yaşla ilişkili olarak azaldığı, erişkinlerde timik fonksiyonun HIV ile enfekte kişilerde baskılanabileceği ve viral yükün azalmasıyla iyileşebileceği gösterilmiştir. Yaşamın erken evrelerinden sonra, timopoezin etkinliğinin giderek azaldığı, naif T hücrelerin ve geniş TCR repertuarının timüs aracılı rekonstitüsyonunun yetişkinlerde yavaş bir süreç olduğu saptanmıştır. HAART sırasında toplam naif T hücre sayısındaki artışların daha geç olurken TREC seviyelerindeki değişikliklerin tedavi sürecinde çok daha erken gerçekleştiği ve naif T hücre rekonstitüsyonunun timik potansiyelinin göstergesi olduğu belirtilmiştir. Çalışmada 25 sağlıklı bireyden alınan kan örneklerinde CD4 + ve CD8 + lenfositlerindeki TREC'lerin sayısının doğumdan 73 yaşa kadar azaldığı ve HIV-1 ile enfekte 10 bireydeki düşük TREC düzeylerinin HAART ile tedavi sonrasında yükseldiği belirtilmiştir (66).

Zhang ve ark. T hücre reseptör yeniden düzenlenmesinin yan ürünü olan eksizyonel bir DNA parçasının ($\alpha 1$ çemberi) saptanmasına dayanarak kandaki timustan yeni çıkan göçmen T hücrelerin sayısını ölçmek için bir analiz geliştirerek 532 sağlıklı bireyi incelemiş, kandaki $\alpha 1$ çember düzeylerinin yaşamın ilk 10-15 yılına kadar yüksek olduğunu, geç ergenlik yıllarında keskin sonra ise kademeli bir azalma meydana geldiğini belirtmiştir. HIV-1 ile enfekte olmuş yetişkinler, enfekte olmamış bireyler ile karşılaştırıldığında $\alpha 1$ çember düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir. HAART alan 74 bireyde, tedavi öncesi düzeyleri normal sınırlar içinde olanlarda tedavide ve sonrasında $\alpha 1$ çember düzeyleri üzerinde anlamlı

bir etki bulunmamıştır. HAART öncesi $\alpha 1$ çember düzeylerinde bozukluğu olanlarda anlamlı artışlar gözlenmiştir (67).

Ye ve Kirschner bir başka çalışmalarında, sağlıklı bireylerde yaşla birlikte TREC konsantrasyonlarının kademeli olarak azaldığını belirtmişlerdir. Hücre bölünmesini ve proliferasyonunu temsil eden Ki67 ekspresyonunun 23 ila 88 yaşları arasındaki sağlıklı bireylerde CD4+ veya CD8+ T hücrelerde artmadığı çalışmada vurgulanmıştır. Bu veriler ışığında, çalışmada yaşlanma sırasında TREC düzeyindeki azalmanın, YTG'lerin timustaki üretiminde azalmaya bağlı olduğunu düşünülmüştür. Aynı çalışmada TREC düzeyinin HKHN'den haftalar sonra artmakta olduğu ve naif T hücrelerinin sıklığı ile korelasyon gösterdiği belirtilmektedir (68).

PİY'lerde allojenik HKHN endikasyonları özellikle son 10 yılda hızla artış göstermektedir. HKHN'de amaç:kararlı ve kalıcı bir engrafman ve immün yapılanma oluşturarak yeni ve normal işlev görev bir immün sistem yaratmaktır. İşte tam da bu amaca yönelik olarak hastalarda nakil sonrasında immün yapılanmanın denetlenmesi ve izlemi prognozu belirlemede önemli rol oynayan faktörlerden biridir. Nitekim nakil sonrası CD4+CD45RA+CD31+ hücre düzeylerinin ölçümü ile timopoezin longitudinal olarak izlenmesi HKHN sonrasında immün yapılanmanın değerlendirilmesi ve prognoz tayinine büyük oranda katkı sağlamaktadır. O halde bu çalışmadan elde edilen 0-6 yaş grubu sağlıklı bebek ve çocuklara ait normal değerler, HKHN sonrası immün yapılanmanın ve timopoezin objektif olarak değerlendirilmesine olanak tanıyacaktır.

Nitekim İmmünoloji-Allerji Bilim Dalımızda 2008 – 2014 yıllarında allojenik HKHN yapılan ve iki yıl süreyle izlenen 22 AKİY'li hastanın, periferik kanda YTG hücre düzeyleri, CD4+CD45RA+CD31+ hücreler denetlenerek retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Hastaların tümünde HKHN sonrası donör tipi ve immün fenotipten bağımsız olarak YTG hücre düzeylerinin nakil sonrası 1.aydan 6.aya kadar giderek belirgin yükselme eğilimi gösterdiği; 6.aydan sonra 2.yıla kadar yüksek ve kararlı seyrettiği belirlenmiştir. Bu çalışmada periferik kanda ölçülen YTG düzeyinin periferik kanda CD4+CD45RA+CD31+ hücre ölçümünün AKİY'de HKHN sonrası immün yapılanmanın değerlendirilmesinde ve izleminde kullanılabilecek değerli bir belirteç olduğu vurgulanmıştır (69).

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bir diğer sonuç, absolü lenfosit sayısının yaşla birlikte değişmekte olduğudur. Çalışmamızda 6 ay ve 1 yaş gruplarında absolü lenfosit sayısı %5 alt sınırı sırasıyla 3132/mm³ ve 3056/mm³ bulunmuştur. ALS büyük yaş gruplarında beklendiği üzere azalmış ve 4 yaş grubunda %5 sınır değeri 1850/ mm³ olarak saptanmıştır.

Yaşamın ilk yılında lenfopeni sınırının 3000/mm³'ün olduğu bu çalışmada da bir kez daha kanıtlanmıştır. Buna karşın 1 yaş sonrasında ve devamında 1500/mm³'ün altı değerler lenfopeni olarak kabul edilmektedir. Halbuki çalışmamızdaki veriler absolü lenfosit sayısının yaşla birlikte kademeli olarak düştüğünü ve 4 yaş ve üzerinde ALS %5 alt sınırının 1850/ mm³ olduğunu göstermektedir. Bu veriler ışığında, süt çocukluğu dönemi sonrasında lenfopeni alt sınırının genel kabul olan 1500/mm³'den daha yüksek olduğu ve PİY şüphesi gösteren hastalarda absolü lenfosit sayısının dikkatle değerlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, 120 sağlıklı bebek ve çocuğun YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerini değerlendirdiğimiz bu çalışma, ülkemizde, bu alanda yapılan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Kordon kanı ve 0-6 yaş grubu sağlıklı Türk çocuklarında, periferik kanda YTG CD4+CD45RA+CD31+ hücrelerin normal değerleri tespit edilmiştir. Primer immün yetmezliklerin önemli bir sağlık sorunu olduğu ülkemizde, kanımızca, PİY ön tanılı hastalarda belirlenen CD4+CD45RA+CD31+ hücre düzey ve sayılarının bu yaş normalleri ile kıyaslanarak değerlendirilmesi, hastalarının tanı ve tedavilerine önemli ölçüde katkı sağlanacaktır. Bu noktadan hareketle CD4+CD45RA+CD31+ hücre tayini, PİY hastalarının tanı ve tedavisini yürüten tüm merkezlerde, periferik kan lenfosit altgrupları panelinde yer almalıdır.

6. SONUÇLAR

Sağlıklı Türk çocuklarında timopoezi, YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerini belirlemek ve yaşla birlikte değişimini saptamak amacıyla yapılan bu çalışma; kordon kanı, 6 ay, 1 yaş, 2 yaş, 4 yaş ve 6 yaş olarak 6 ayrı yaş döneminde, her bir yaş grubunda 20 sağlıklı bebek-çocuk olmak üzere toplam 120 sağlıklı bebek ve çocukta gerçekleştirilmiştir.

Şubat 2017 - Aralık 2017 döneminde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğindeki bebeklerden alınan kordon kan örnekleri ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Sosyal Pediatri Bilim Dalı ve Çocuk Genel Polikliniğine başvuran 0-6 yaş arasındaki bebek ve çocuklardan alınan kan örnekleri çalışmaya alınmıştır.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 23 Ocak 2017 tarihinde 02-61-17 karar numarası ile onay alınmıştır.

YTG (CD4+CD45RA+CD31+) ölçümleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı Klinik Servis Test Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Alınan periferik kan örneklerinde CD4+ T hücrelerde CD45RA+CD31+ (YTG) ekspresyonları 4 renk boyama yöntemi ile akım sitometrisinde ölçülmüştür. Bu araştırmamızdan aşağıda yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

1. Periferik kan beyaz küre, total lenfosit sayısı ve YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeyleri yaşla birlikte değişmektedir. Bu nedenle çocuklarda periferik kan YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin sağlıklı olarak değerlendirilebilmesi için çocuk yaş grubunun normallerinin oluşturulması gereklidir. Nitekim yapılan bu çalışma ile kordon kanı ve 0-6 yaş dönemi 6 ayrı yaş grubunda periferik kanda YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeyleri normalleri belirlenmiş olup ülkemiz çocuklarında referans değerler oluşturulmuştur.

2. Yaşla birlikte YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin absölü sayısı ($p<0.001$) ve rölatif oranları ($p= 0,018$) azalmaktadır. Bu değışimin ana nedeni yaşla beraber timus dokusunun involusyonudur.
3. YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin absölü sayısı ve yüzde değeri (rölatif) oranları kordon kanı grubunda 6 ay grubuna göre düşük saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ($p= 0,028$). YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücrelerin absölü sayı ve düzeylerindeki bu fark kordon kanının kendine özel kompozisyonundan kaynaklanabilir. Nitekim kordon kanındaki lenfosit düzeyi yenidoğan ve süt çocukluğu dönemlerine kıyasla düşüktür.
4. Çalışmamızda absölü lenfosit sayısının yaşla birlikte değışmekte olduğu saptanmıştır. ALS, 6 ay ve 1 yaş gruplarında %5 alt sınırdaki sırasıyla $3132/\text{mm}^3$ ve $3056/\text{mm}^3$ olmakla birlikte daha büyük yaş gruplarında azalmakta ve 4 yaş grubunda $1850/\text{mm}^3$ 'e kadar düşmektedir. Absölü lenfosit sayısı yenidoğan ve erken süt çocukluğu döneminde genellikle $3000/\text{mm}^3$ 'ün altındaki değeri düşük kabul edilirken hayatın devamında $1500/\text{mm}^3$ 'ün altı düşük olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızdaki veriler absölü lenfosit sayısının yaşla birlikte kademeli olarak düşüğünü ve alt sınırının $1850/\text{mm}^3$ olduğunu göstermektedir. Bu veriler ışığında, süt çocukluğu dönemi sonrasında özellikle 4 yaştan sonra lenfopeni alt sınırının genel kabul olan $1500/\text{mm}^3$ 'den daha yüksek ($1850/\text{mm}^3$) olduğu gösterilmiştir.

ÖZET

Primer immün yetmezlikler (PİY), immün sistemi oluşturan komponentleri kodlayan genlerdeki mutasyon sonucu ortaya çıkan bir grup kalıtsal hastalıktır. Ülkemizde yaygın olan PİY'lerde erken tanı ve etkin tedavi hayat kurtarıcıdır. Ağır kombine immün yetmezlik (AKİY) temel olarak T hücre gelişim bozukluğudur. Bu hastalığa yol açan 20 kadar genetik defekt tanımlanmıştır. AKİY'lerde yetersiz timopoez nedeniyle deneyimsiz (naif) T hücre sayılarında düşüklük saptanmaktadır. Günümüzde timopoez; bir başka deyişle timus bezinin fonksiyonu; timustan periferik kana geçen naif (deneyimsiz) T hücre gelişiminin "*Recent Thymic Emigrants*" -YTG (Yeni Timik Göçmenler)- gösterilmesi sayesinde ölçülebilmektedir. YTG 2 yöntem ile değerlendirilmektedir. Birincisi TREC; yani moleküler olarak T hücre reseptörünün gelişimi sırasında gerçekleşen VDJ genlerinin rekombinasyonundan arta kalan sirküler yapı DNA artıklarının ölçümüdür. Diğeri ise CD4, CD45RA ve CD31 monoklonal antikorlarını yüzeyinde taşıyan timustan yeni olarak periferik kana geçen T lenfositlerinin akım sitometrisi ile (flow cytometry) tanımlanması esasına dayalı ölçümüdür. Bu hücrelerin TREC içeriği yüksektir. Bu çalışmanın amacı, kordon kanı ve 0-6 yaş grubu sağlıklı Türk çocuklarında, periferik kanda timustan yeni çıkan naif T lenfositleri; yani YTG (CD4+CD45RA+CD31+) sayı ve düzeylerini immünofenotipik yöntemle ölçerek, farklı yaş gruplarında YTG normal (referans) değerlerini belirlemek ve bu yolla sağlıklı bebek ve çocuklarda timopoezi değerlendirmektir. Çalışmamızda, TREC düzeyini temsil ettiği bilinen CD4, CD45RA, CD31 belirteçlerini yüzeyinde taşıyan T lenfositlerini akım sitometrisi ile ölçerek periferik kanda YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeyleri normalleri belirlenmiş olup kordon kanı ve 0-6 yaş dönemi 6 ayı yaş grubunda ülkemiz sağlıklı çocuklarında normal (referans) değerler oluşturulmuştur. Yaşla birlikte YTG (CD4+CD45RA+CD31+) hücre düzeylerinin absölu sayısı ($p < 0.001$) ve yüzde değer (rölatif) oranları ($p = 0,018$) azaldığı saptanmıştır. Bu değişime yaşla beraber timus dokusundaki involusyonun neden olduğu düşünülmüştür. Çalışmamızda ayrıca absölu lenfosit sayısının yaşla birlikte değiştiği, 6 ay ve 1 yaş gruplarında %5 alt sınırın sırasıyla $3132/\text{mm}^3$ ve $3056/\text{mm}^3$, daha büyük yaş gruplarında azalarak 4 yaş

grubunda 1850/ mm³'e olduğu belirlenmiştir. Bu veriler ışığında, süt çocukluğu dönemi sonrasında özellikle 4 yaş üstü lenfopeni sınırının genel kabul olan 1500/mm³'den daha yüksek (1850/ mm³) olduğu gösterilmiştir. Primer immün yetmezliklerin önemli bir sağlık sorunu olduğu ülkemizde, kanımızca, PİY n tanılı hastalarda belirlenen CD4+CD45RA+CD31+ hücre düzey ve sayılarının bu yaş normalleri ile kıyaslanarak değerlendirilmesi, hastalarının tanı ve tedavilerine önemli lde katkı sağlanacaktır. Bu noktadan hareketle CD4+CD45RA+CD31+ hücre tayini, PİY hastalarının tanı ve tedavisini yürüten tüm merkezlerde periferik kan lenfosit alt grupları panelinde yer almalıdır.

Anahtar Kelimeler: YTG, PİY, AKİY, Timopoez, Akım sitometri

SUMMARY

Primary immunodeficiencies (PIDs) are a group of hereditary diseases result from mutations in genes that encode the components of the immune system. Early diagnosis and effective treatment is life-saving in primary immunodeficiencies which are common in our country. Severe combined immunodeficiency is constitutively a T-cell developmental defect. Up to 20 genetic defects leading to this disease have been identified. There is a reduction in naive T cell counts due to inadequate thymopoiesis in severe combined immunodeficiencies. At the present time, thymopoiesis meaning the function of the thymus gland can be measured by demonstration of naive T cell development -Recent Thymic Emigrants(RTE)- that passes into peripheral blood from thymus. RTE can be measured by two methods. The first of these methods is TREC: is the remaining residual circularly formed DNA residues from recombination of VDJ genes that occur molecularly during the normal development of the T cell receptor. The other measurement is based on flow cytometry identification of T lymphocytes newly inflowing peripheral blood from the thymus carrying CD4, CD45RA, CD31 monoclonal antibodies (markers) on its surface. The TREC content of these cells is high. The aim of this study was to determine RTE normal (reference) levels in different age groups (cord blood and 0-6 age group healthy Turkish children) by measuring the number and levels of RTE (CD4 + CD45RA + CD31 +) (naive T lymphocytes newly emerging from thymus to peripheral blood) and to evaluate thymopoiesis in healthy infants and children in this way. In our study, RTE (CD4 + CD45RA + CD31 +) cell levels in peripheral blood were normalized by measuring T lymphocytes bearing surface CD4, CD45RA, CD31 markers that represent TREC levels by flow cytometry. In six different age groups (cord blood and 0-6 age group) normal (reference) values were established in healthy children of our country. The absolute numbers ($p < 0.001$) and relative ratios ($p = 0.018$) of RTE (CD4+CD45RA+CD31+) decreased with age. This alteration was thought to be caused by the involution of the thymus tissue with age. In our study, the levels of absolute lymphocytes changed with age, and in groups of 6 months and 1 age group, 5% lower limit was 3132/mm³ and 3056/mm³ respectively.

The levels of lymphocytes decreased in older age groups and it was found to be 1850/ mm³ in 4 age group. In the light of these data, it has been shown that the lymphopenia limit after infancy especially after above 4 years of age is higher than the general accepted 1500/mm³ (1850/ mm³). In our country, where primary immunodeficiency is an important health problem, we believe that CD4+CD45RA+CD31+ cell levels in primary immunodeficiency pre-diagnosed people compare with healthy people will contribute significantly to the diagnosis and treatment. From this point on, the CD4 + CD45RA + CD31 + cell assay should be included in the panel of peripheral blood lymphocyte subgroups in all centers that perform the diagnosis and treatment of primary immunodeficiency patients.

Key Words: RTE, PID, SCID, Thymopoesis, Flow cytometry

KAYNAKLAR

1. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Holland SM, Klein C. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *Journal of clinical immunology*. 2015; 35(8): 696-726.
2. Picard C, Gaspar HB, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Crow YJ, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL. International union of immunological societies: 2017 primary immunodeficiency diseases committee report on inborn errors of immunity. *Journal of clinical immunology*. 2018; 38(1): 96-128.
3. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Ailal F, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Chatila T, Crow YJ, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck J, Tang MLK, Tangye SG, Torgerson TR, Casanova JL, Sullivan KE. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *Journal of clinical immunology*. 2018; 38(1): 129-43.
4. King JR, Hammarstrom L. Newborn Screening for Primary Immunodeficiency Diseases: History, Current and Future Practice. *Journal of clinical immunology*. 2018; 38(1): 56-66.
5. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai. Introduction to the Immune System. In: *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai (eds). 4th ed. Elsevier Inc, Philadelphia, 2014; 1.
6. Diseases of White Blood Cells, Lymph Nodes, Spleen, and Thymus. In: *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Kumar, Vinay, Abul K. Abbas, and Jon C. Aster (eds.) 9th edition. Elsevier/Saunders, Philadelphia, PA, 2015; 579-580.
7. Blood cells, immunity, and blood coagulation. In: *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Hall, J., Guyton, A. (eds). 13th edition. Elsevier, Philadelphia, 2015; 433.

8. İliçin G., Timus ve Hastalıkları: İç Hastalıkları, İliçin G.(ed). 3. Baskı, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2012; 2464-2465
9. Junqueira LC, Carneiro J: Temel Histoloji (Çev. Y.Aytekin, S.Solakoğlu). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006; 273-278.
10. Çolak T, Bamaç B. "Timus Anatomisi". Available from: <http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/book/file/442012114115-13.pdf>
11. Shah P. Thorax, In: Gray's Anatomy. Stading S (ed). Thirty-ninth edition, Elsevier Churchill Livingstone, New York, 2005; 980-984
12. Elma B. Timus Anatomisi: Mediyasten Hastalıkları ve Cerrahisi, BALCI, A.E.(ed). 1.baskı: TÜSAD Eğitim Kitapları Serisi, 2015.
13. Parmar K. "Lymphatic system- Thymus and MALT". Available from: <https://www.slideshare.net/KomalParmar4/lymphatic-system-thymus-and-malt>.
14. Flinn AM, Gennery AR. Treatment of Pediatric Acute Graft-versus-Host Disease Lessons from Primary immunodeficiency? *Frontiers in immunology*. 2017; 8: 328.
15. Abbas, A. K, Lichtman, A. H. Cellular and molecular immunology. Abbas, A. K, Lichtman, A. H (eds). 5th edition. Philadelphia:Saunders/Elsevier, 2005.
16. Parham, P. The Immune System. Parham, P (ed). 3rd Edition. Taylor & Francis Group, 2009.
17. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125(2): 33-40.
18. C. Boboila, F.W. Alt, B. Schwer, Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks, *Advances in Immunology*. 2012; 116: 1-49.
19. Abul Abbas AHL, Shiv Pillai. Lymphocyte development and antigen receptor gene rearrangement. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed.2012; 173-202.
20. Kwan A, Abraham RS, Currier R, Brower A, Andruszewski K, Abbott JK, et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *Journal of the American Medical Association*. 2014; 312(7): 729-738.

21. Adams SP, Rashid S, Premachandra T, Harvey K, Ifederu A, Wilson MC, Gaspar HB. Screening of neonatal UK dried blood spots using a duplex TREC screening assay. *Journal of clinical immunology*. 2014; 34(3): 323-330.
22. Şekerel BE. Çocukluk çağında Alerji Astım İmmünoloji. Şekerel BE(ed). Ada Basın Yayın. 2015; 86-87
23. Kwan A, Puck JM. History and current status of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Seminars in Perinatology*. 2015; 39(3): 194-205.
24. İkinciogulları A, Bolkent MG, Güloğlu D, Primer İmmün Yetmezliklerin Tanı ve İzleminde Akan Hücre Ölçer Testlerinin Yeri: Akan Hücre Ölçer. Ed: Deniz G, Yanıkkaya Demirel G, Yelken Yayıncılık, İstanbul, 2014; 111-129.
25. Riley RS, Massey D, Jackson-Cook C, Idowu M, Romagnoli G. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2002; 16: 245-299.
26. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A, Thiel A. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine*. 2002; 195(6): 789-794.
27. Kilic SS, Ozel M, Hafizoglu D, Karaca NE, Aksu G, Kutukculer N. The Prevalances and Patient Characteristics of Primary Immunodeficiency Diseases in Turkey—Two Centers Study. *Journal of clinical immunology*. 2013; 33(1): 74-83.
28. Sanal O, Tezcan I. Thirty years of primary immunodeficiencies in Turkey. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011; 1238(1): 15-23.
29. Ödek Ç, Kendirli T, Doğu F, Yaman A, Vatansever G, Çipe F, Haskoloğlu S, Ateş C, Ince E, İkinciogullari A. Patients with primary immunodeficiencies in pediatric intensive care unit: outcomes and mortality-related risk factors. *Journal of clinical immunology*. 2014; 34(3): 309-315.
30. Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Kobrynski LJ, Levinson AI, Mazer B, Nelson RP Jr, Orange JS, Routes JM, Shearer WT, Sorensen RU. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2005; 94: 1-63.

31. Buckley RH. Evaluation of the Immune System. In: Nelson textbook of pediatrics. Kliegman, R., Stanton, B., St. Geme, J. W., Schor, N. F., & Behrman, R. E.(eds). 20th Edition. Elsevier, Philadelphia, PA, 2016; 999.
32. Mazzucchelli J, Buzolin M, Vilela M, Moraes L, Porto Neto A, Monteiro F. Severe combined immunodeficiency in Brazil: a multi-center analysis of demographics; clinical features regarding BCG infection and outcome in 33 patients. *Journal of Clinical Immunology*. 2011; 31(Suppl 1): 1-71.
33. Sevinç S, Haskoloğlu ZS, Köstel Bal S, İslamoğlu C, Doğu EF, İkinciogulları A. Primer İmmün Yetmezlik Hastalarında Kemik İliği Nakli Sonrasında Bacillus Calmette Guerin (BCG) Aşısı Morbiditesi. 4 Klinik İmmünoloji Kongresi, 2018.
34. “Jeffrey Modell Foundation. 10 Warning Signs of Primary Immunodeficiency”. Available from: <http://downloads.info4pi.org/pdfs/10-Warning-Signs---Generic-Text--2-.pdf>.
35. Dur Ö. Primer İmmün Yetmezlik Tanısında 10 Uyarıcı İşaretin Önemi. Ankara Üniversitesi. Ankara. 2015.
36. İkinciogulları A. Ders Notları-Dönem 5, 2017.
37. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125(2): 182-194.
38. İkinciogulları A. 22. AİD Kongresi, 2015.
39. Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, Markert ML, Williams LW, Harville TO, Roberts JL, Puck JM. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *The Journal of pediatrics*. 1997; 130(3): 378-387.
40. Pai S-Y, Logan BR, Griffith LM, Buckley RH, Parrott RE, Dvorak CC, Kapoor N, Hanson IC, Filipovich AH, Jyonouchi S. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000–2009. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371(5): 434-46.
41. Roifman CM, Somech R, Kavadas F, Pires L, Nahum A, Dalal I, Grunebaum E. Defining combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 130(1): 177-183.

42. Notarangelo LD. ESID 15th biennial meeting, 2012.
43. İkinciogulları A. , XIX. TPOG, 2016.
44. Yorulmaz A AH, Kara R, Reisli İ. Primer İmmün Yetmezlikli 1054 Olgunun Retrospektif Değerlendirilmesi. *Astım Allerji İmmünoloji*. 2008; 6: 127-134.
45. Rechavi E, Lev A, Simon AJ, Stauber T, Daas S, Saraf-Levy T, Broides A, Nahum A, Marcus N, Hanna S. First Year of israeli newborn screening for severe combined immunodeficiency—clinical achievements and insights. *Frontiers in immunology*. 2017; 8: 1448.
46. Chiarini M, Zanotti C, Serana F, Sottini A, Bertoli D, Caimi L, Imberti L. T-cell Receptor and K-deleting Recombination Excision Circles in Newborn Screening of T- and B-cell Defects: Review of the Literature and Future Challenges. *Journal of Public Health Research*. 2013; 2(1): 9-16.
47. Puck JM, Group NSW. Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: steps toward implementation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007; 120(4): 760-768.
48. Buckley RH. The long quest for neonatal screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 129(3): 597-604.
49. Rosen FS. Severe combined immunodeficiency: a pediatric emergency. *The Journal of pediatrics*. 1997; 130(3): 345.
50. Cirillo E, Giardino G, Gallo V, D'assante R, Grasso F, Romano R, Lillo CD, Galasso G, Pignata C. Severe combined immunodeficiency—an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015; 1356(1): 90-106.
51. "SCID Summary". Available from: <https://www.immunodeficiencysearch.com/scid>.
52. Bayram Ö. 1997-2017 Yılları Arasında AÜTF Çocuk İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı'nda Ağır Kombine İmmün Yetmezlik Tanısı Alan Olguların Klinik ve İmmünolojik Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi. Ankara. 2018.

53. "Severe Combined Immunodeficiency (SCID)". Available from: <https://esid.org/Working-Parties/Clinical/Resources/Severe-Combined-Immunodeficiency-SCID>.
54. Buckley RH, Lucas Z, Hattler B, Zmijewski C, Amos D. Defective cellular immunity associated with chronic mucocutaneous moniliasis and recurrent staphylococcal botryomycosis: immunological reconstitution by allogeneic bone marrow. *Clinical and experimental immunology*. 1968; 3(2): 153.
55. Gaspar HB, Qasim W, Davies EG, Rao K, Amrolia PJ, Veys P. How I treat severe combined immunodeficiency. *Blood*. 2013; 122(23): 3749–58.
56. Rivers L, Gaspar HB. Severe combined immunodeficiency: recent developments and guidance on clinical management. *Archives of disease in childhood*. 2015; 100(7): 667–72.
57. Chan K, Puck JM. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 115(2): 391-398.
58. Routes JM, Grossman WJ, Verbsky J, Laessig RH, Hoffman GL, Brokopp CD, Baker MW. Statewide newborn screening for severe T-cell lymphopenia. *Journal of the American Medical Association*. 2009; 302(22): 2465-2470.
59. "IDF SCID Newborn Screening Campaign" Available from: <https://primaryimmune.org/idf-advocacy-center/idf-scid-newborn-screening-campaign>.
60. Villoria JG, Pajares S, Lopez RM, Marin JL, Ribes A. Neonatal Screening for Inherited Metabolic Diseases in 2016. *Seminars in Pediatric Neurology*. 2016; 23(4): 257-272.
61. King J, Ludvigsson JF, Hammarström L. Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: the past, the present and the future. *International Journal of Neonatal Screening*. 2017; 3(3): 19.
62. Gennery AR, Slatter MA, Grandin L, Taupin P, Cant AJ, Veys P, Amrolia PJ, Gaspar HB, Davies EG, Friedrich W. Transplantation of hematopoietic stem cells and long-term survival for primary immunodeficiencies in Europe: entering a new century, do we do better? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 126(3): 602-610.

63. De Vries E, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, De Groot R, Hop WC, Boerma GJ, Lotgering FK, Van Dongen JJ. Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatric Research*. 2000; 47(4): 528.
64. İkinciogulları A, Kendirli T, Doğu F, Eğin Y, Reisli İ, Cin Ş, Babacan E. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *The Turkish journal of pediatrics*. 2004; 46(2): 125-130.
65. Ye P, Kirschner DE. Reevaluation of T cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants. *The Journal of Immunology*. 2002; 168(10): 4968-4979.
66. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998; 396: 690-695.
67. Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanicolas R, He Y, Jin X, Tuttleton S, Vesanen M, Spiegel H, Kost R, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Wolinsky S, Borkowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho DD. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *Journal of Experimental Medicine*. 1999; 190(5): 725-732.
68. Ye P, Kirschner DE. Measuring emigration of human thymocytes by T-cell receptor excision circles. *Critical Reviews in Immunology*. 2002; 22(5-6): 483-497.
69. Koçak S, Güloğlu D, Arıkan M, Haskoloğlu ZS, Doğu EF, İkinciogulları A. Ağır Kombine İmmün yetmezlikler (AKİY)'de Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) Sonrası İmmün Yapılanmanın TREC Ölçümü İle İzlenmesi. 2. Klinik İmmünoloji Kongresi, 2016.