

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BÖLGEMİZDEKİ SAĞLIKLI ÇOCUKLARDA LENFOSİT SUBGRUPLARININ REFERANS ARALIKLARI

Onur UÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Prof.Dr.Akgün YAMAN**

ADANA – 2011

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BÖLGEMİZDEKİ SAĞLIKLI ÇOCUKLARDA LENFOSİT SUBGRUPLARININ REFERANS ARALIKLARI

Onur UÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof.Dr.Akgün YAMAN

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu
TF2010YL1 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ADANA – 2011

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez çalışmamı yönlendiren, danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Akgün Yaman'a, değerli hocalarım Prof.Dr.Fatih Köksal'a, Prof.Dr.Macit İlkit'e ve Prof.Dr.Fügen Yarkin'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, başta bölüm sekreterimiz Suna Gökmen olmak üzere değerli asistan, biyolog, teknisyen arkadaşlarıma, tez çalışması aşamalarında yardımlarını gördüğüm Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı çalışanlarına ve Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Gülşah Seydaoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1-GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. İmmünitinin Tipleri	5
2.3. Doğal ve Kazanılmış Bağışıklığın Genel Özellikleri	6
2.4. Lenfoid Organlar	8
2.4.1. Santral Lenfoid Organlar	9
2.4.2. Periferik Lenfoid Organlar	9
2.5. Lenfoid Hücreler	10
2.5.1. T Lenfositler	12
2.5.1.1. CD4 Yüzey Marker Hücreleri (T-Helper / Endüktör)	17
2.5.1.2. CD8 Yüzey Marker Hücreleri (T-Sitotoksik)	18
2.5.1.3. Baskılayıcı T Hücreleri	20
2.5.1.4. Bellek T Hücreleri	20
2.5.2 B Lenfositler	21
2.5.2.1. Plazma Hücresi	22
2.5.2.2. Bellek Hücresi	23
2.5.3. Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer)	23
2.6. Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC)	23
2.7. Sitokinler	26

2.8. Akım Sitometrisi	27
2.8.1. Akım Sitometrisi ile Hücrelerin Analizi	28
2.8.2. Akım Sitometrisi	29
3- BİREY VE YÖNTEM	30
3.1. Birey Seçimi ve Kan Örneklerinin Alınması	30
3.2. Tam Kan Sayımı	30
3.3. Akım Sitometrisi Analizi (Flow Cytometry)	31
3.3.1. Örnek İşlenmesi	31
3.3.2. Yüzey Boyama Prosedürü	31
3.3.3. FACS Calibur Flow Cytometry’de Sonuçların Okunması	32
3.4. İstatistiksel Analiz	32
4.BULGULAR	33
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
7. KAYNAKLAR	45
8. ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Doğal ve Kazanılmış İmmüntenin Elemanları	7
Şekil 2. Santral ve Lenfoid Organlar	9
Şekil 3. Kan Hücrelerinin Gelişimi	12
Şekil 4. $CD4^{+}$ Yardımcı T Lenfosit - Sınıf II MHC İlişkisi	17
Şekil 5. $CD8^{+}$ T Lenfosit - Sınıf I MHC İlişkisi	19
Şekil 6. MHC Sınıf I ve MHC Sınıf II 'nin Özellikleri	25
Sekil 7. Şematik Olarak Akım Sitometrisi Analizi	29

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Genel populasyon ve çalışma populasyonunun cinsiyete göre yüzde dağılımları.	33
Tablo 2. Genel populasyon ve çalışma populasyonunun çalışma gruplarına göre yüzde dağılımları.	34
Tablo 3. Genel populasyon ve çalışma populasyonunun her yaş grubunda cinsiyete göre dağılımları.	34
Tablo 4. Toplam 100 sağlıklı çocukta total lökosit sayısı ve lenfosit yüzdesi.	35
Tablo 5. 48'i kız ve 52'si erkek sağlıklı çocukta total lökosit sayıları ve lenfosit yüzdeleri ve p değerleri.	35
Tablo 6. 4 ayrı yaş grubundaki sağlıklı çocuklarda total lökosit sayılarının ve lenfosit yüzdeleri ve p değerleri.	36
Tablo 7. Toplam 100 sağlıklı çocukta lenfosit subgrup yüzdelerinin ve absolute değerlerinin ortalama $\pm$ SD, ortanca ve %95'lik referans aralıkları.	36
Tablo 8. 48'i kız ve 52'si erkek sağlıklı çocuklarda lenfosit subgrup yüzdelerinin ve absolute değerlerinin ortalama $\pm$ SD, %95'lik referans aralıkları ve p değerleri.	37
Tablo 9. 4 ayrı yaş grubundaki sağlıklı çocuklarda lenfosit subgrup yüzdelerinin ve absolute değerlerinin ortalama $\pm$ SD, %95'lik referans aralıkları ve p değerleri.	38

KISALTMA LİSTESİ

ADCC	Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
ADNKS	Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi
APC	Antigen Presenting Cell
EALT	<i>Eye Associated Lymphoid Tissue</i>
FasL	Fas Ligand
FISH	Fluorescence In-Situ Hybridization
FITC	Flourescein Isothiocyanate
GALT	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
G-CSF	Granulocyte - Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor
GVH	Graft Versus Host
HLA	Human Leucocyte Antigen
ICAM-1	Inter Cellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
K₃ EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Asid
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen 1
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
M-CSF	Monocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	Naturel Killer
NLT	Nasal Lymphoid Tissue
PE	Phycoerythrin
PMNL	Polymorphonuclear <i>Leucocyte</i>
SD	Standard Deviation
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCR	T Cell Receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

ÖZET

Bölgemizdeki Sağlıklı Çocuklarda Lenfosit Subgruplarının Referans Aralıkları

Önceki yıllarda konu ile ilgili olarak bölgemizdeki yetişkin bireylerde lenfosit subgruplarının referans aralıkları belirlenmiş ve faydalı bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışma ile bölgemizdeki sağlıklı çocuklarda lenfosit subgruplarının referans aralıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma Eylül 2010 – Aralık 2010 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışmaya 0-18 aralığında 48'i kız, 52'si erkek toplam 100 sağlıklı çocuk dahil edilmiştir. Çocuklar 0-4 yaş, 5-9 yaş, 10-14 yaş ile 15-18 yaş olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Tam kan sayımları ve CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 referans aralıkları ve CD4/CD8 oranlarının belirlemek için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında akım sitometrisi cihazı kullanılmıştır. Tüm verilerin istatistiksel analizleri Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 18.0) programı yardımıyla yapılmıştır.

İstatistiksel analizler ile 100 sağlıklı çocuğun total lökosit sayısı ve lenfosit yüzdeleri sırasıyla; $7,943 \pm 2,232$ ve $37,5 \pm 11,7$ olarak bulunmuştur. Lenfosit subgrup yüzdeleri ise CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 ve CD4/CD8 için sırasıyla; $69,4 \pm 4,9$, $40,5 \pm 4,9$, $27,8 \pm 4,7$, $14,6 \pm 4,3$, $10,3 \pm 3,2$ ve $1,51 \pm 0,36$ olarak bulunmuştur.

Çalışma sonunda bölgemizdeki sağlıklı çocukların CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56 (doğal öldürücü hücreler) lenfosit subgruplarının ve CD4/CD8 oranının referans aralıkları belirlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda normal referans aralıklarının, bağışıklık sistemi ile ilgili dallarda konuyla ilgili hastaların takip ve tedavilerini yönlendirmede özellikle çocuk hematoloji kliniği hastalarına ciddi faydalar sağlaması ve böylece patolojik değerlere ışık tutarak çocukların sağlıklı olup olmaması ile ilişkilendirilebilmesi beklenmektedir.

Anahtar Sözcükler: Akım Sitometri, CD4, CD8, Lenfosit Subgrupları, Sağlıklı Çocuklar.

ABSTRACT

Reference Ranges of Lymphocyte Subgroups of Healthy Children in Our Region

Reference ranges of lymphocyte subgroups of healthy adults were established at previous years and useful informations gained for our region. In this study we aimed to determine reference ranges of lymphocyte subgroups of healthy children from our region.

Study had been performed between September 2010 and December 2010. In this study 100 healthy children were included which of 48 were girls and 52 were boys aged between 0-18. Children were divided 4 age groups which are 0-4 years, 5-9 years, 10-14 years, 15-18 years. Complete blood count analysis and the reference ranges of CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 and the CD4/CD8 ratios were determined using a flow cytometry instrument at the Central Laboratory of the Faculty of Medicine, University of Çukurova. Statistical analysis of all data were performed by Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 18.0) program.

Total leucocyte number and lymphocyte percentages of 100 healthy children were determined as $7,943 \pm 2,232$ and $37,5 \pm 11,7$ respectively with statistic analyses. Lymphocytes subgroups percentages for CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, and CD4/CD8 were $96,4 \pm 4,9$, $40,5 \pm 4,9$, $27,8 \pm 4,7$, $14,6 \pm 4,3$, $10,3 \pm 3,2$ and $1,51 \pm 0,36$ respectively.

We determined reference ranges of CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56 (natural killer cells) lymphocyte subgroups and rate of CD4/CD8 at the end of the study. Normal reference range data obtained is expected to give useful information at treatment and prosecution of patients from immunity related diseases, especially at patients from children haematology clinics; so pathological data will give information about health status of children.

Key Words: CD4, CD8, Flow cytometry, Healthy Children, Lymphocyte Subsets.

1.GİRİŞ

Konak savunma mekanizması, enfeksiyonlara karşı ilk koruyucu engeli oluşturan, mikroorganizmaları tanıyıp onları yıkıma uğratmak için doğal olarak organizmada hazır bulunan “doğal direnç - doğal bağışıklık” ve herhangi bir patojenle karşılaştıktan sonra doğal direnci takiben ortaya çıkan, enfeksiyonlara karşı daha etkili savunma sağlayan “kazanılmış direnç - kazanılmış bağışıklık” dan oluşmaktadır^{1,2}.

Doğal direncin başlıca yapıtaşları epitel tabakası, doğal öldürücü hücreler (natural killer-NK), kompleman sistemi, fagositik hücreler ve sitokinlerdir. Doğal öldürücü hücreler kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfosit morfolojisindeki hücrelerdir. Doğal immünitinin elamanı olan NK hücreleri esas olarak kan, dalak ve periton sıvısında bulunur. Fenotipik olarak CD3-CD16+CD56± natural killer hücreleri, fagositik hücrelerdir. NK hücrelerini akım sitometrisi ile saptamak mümkündür. NK hücreleri tümör hücre büyümesinin kontrolünde, viral enfeksiyonlar başta olmak üzere parazit, mantar, bakteri gibi mikrobiyal enfeksiyonların kontrolünde, sitokin üretimi, hematopoetik sistem hücre büyüme ve farklılaşması, allograft rejeksiyonu gibi immünoregülatör fonksiyonlarda ve Graft versus host (GVH) gelişimi, aplastik anemi, nötropeni, diyabet, gastrointestinal hastalıklar gibi farklı hastalıklarda rol oynamaktadır^{1,3,4,5}.

Kazanılmış bağışıklığın yapı taşları ise T ve B lenfositleri ile bu hücrelerin ürünleridir. T lenfositler hücresel immünite, B lenfositleri ise humoral immüniteden sorumlu hücrelerdir. Antijene spesifik hücre aracılı yanıtlar T lenfositleri tarafından gerçekleştirilir. T hücreleri spesifik antijeni eksprese eden hücreleri lizi edebilir (sitotoksite) veya enflamasyonu tetikleyen sitokinler salgılayabilir. CD4+ ve CD8+ T hücreleri, kendilerine sırasıyla sınıf II MHC ve sınıf I MHC molekülleri oluğunda sunulan ve antijen sunan hücreler tarafından peptidlere dönüştürülmüş protein antijenlerine yanıt verirler. Fagosit edilen bakteriler, fagozomdan kaçabilmeyi başarabildiklerinde, ya da fagozomdan sitozole taşındıklarında, fagositik hücrelerin mikrobisidal etkisinden kurtulmuş olurlar; ancak bu durumda CD8+ T hücreleri uyarılır.Bu durum, hücre içi bakterilerin yıkımında, CD4+ T hücrelerinin aktive ettiği

makrofajların ve CD8+ T hücrelerinin işbirliği sonucu, hücreyel immüitenin rol oynadığını göstermektedir. Antijenin tanınması yardımcı T hücresinin yüzeyindeki reseptörlerle ilişkilidir. Hücre içi mikroplarla oluşan enfeksiyonları yok eden kazanılmış immüitenin hücreyel kolunu oluşturan CD4+ Th hücreleri, fagositleri aktive ederek bu fagositlerin veziküllerinde yaşayabilen mikropların yok edilmesini sağlarken, CD8+ Tc hücreler sitoplazmasında mikrop içeren hücreleri öldürerek enfeksiyonu yok ederler. CD8+ Tc hücreler enfekte hücre üzerindeki sınıf I MHC ilişkili peptidleri tanırlar ve bu hücreleri öldürerek enfeksiyonun kaynağını yok ederler^{1,2}.

Bölgemizde bu konu ile ilgili olarak CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56 lenfosit subgruplarının ve CD4/CD8 oranının referans aralıklarını sağlıklı yetişkinlerde ortaya koyan bir çalışma mevcuttur. Fakat bölgemizdeki sağlıklı çocukların bu lenfosit subgruplarının referans aralıkları konusunda herhangi bir çalışma ve bilgi mevcut değildir. Bu konudaki bilgi eksikliğini gidermek ve bölgemizdeki sağlıklı çocuklarda lenfosit subgruplarının referans aralıklarını belirleyerek lösemi, lenfoma, HIV enfeksiyonları gibi ciddi hastalıklarla ilişkili bu konunun, bağışıklık sistemi ile ilgili dallarda hastaların takip ve tedavilerini yönlendirmede özellikle çocuk hematoloji kliniği hastalarına ciddi faydalar sağlaması temel amacımızı oluşturmaktadır.

Lenfosit subgruplarının cinsiyet ve yaşa göre değişim gösterebileceğini düşündüğümüz bu çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Kan hücrelerinin tanımlanması 17. yüzyıl sonu ve 18. yüzyılda gerçekleşmiştir. Eritrositlerin Anton von Leeuwenhoek tarafından 1674'de, lökositlerin Joseph Lieutaud tarafından 1749'da, lenfositlerin ise William Hewson tarafından 1774'te tanımlanmasının ardından, İmmünoloji 19. yüzyılın sonlarına doğru humoral ve hücrel bağışıklığın hızlı gelişmeleriyle büyük ilerleme kaydetti^{6,7}.

İmmünolojide ilk bilimsel gelişme, bir kimyacı olan Pasteur'ün 1880'lerde yaptığı gözlem ve deneylere dayanır. İlk kez o yıllarda Pasteur "İmmün" ve "İmmünite" sözcüklerini bilimsel anlamı ile kullandı. Modern immünolojinin Pasteur ile başladığını kabul etmeliyiz⁸.

1870'lerde Virchow, Cohnheim ve Arnold'un enflamasyon üzerindeki ilk görüşleri oluşturmalarından sonra, 1884 yılında Metchnikoff bugün fagositoz olarak bilinen olay üzerinde ilk gözlemleri yaptı; lökositlerin mikroorganizmaları içlerine alarak nasıl sindirdiklerini gösterdi; polimorfonükleer lökositler ve makrofajların fagositozdan sorumlu hücreler olduklarını belirledi ve bu olaya "Fagositoz" adını verdi. Ayrıca Metchnikoff bağışıklık kazanmış kişilerde fagositozun daha güçlü olduğunu ve dolayısıyla bu aktivitenin organizmanın ana savunma mekanizmasını oluşturduğunu vurguladı. Bu gözlemler "Hücrel İmmünite" ile ilgili gelişmelerin başlangıcını oluşturdu⁸.

1900'lerin başlarında Behring ve Kitasato bağışıklığın, doğrudan hücrelere bağımlı olmaksızın da gelişebileceğini, difteri ve tetanus toksini verilerek bağışık duruma getirilmiş hayvanlarda gösterdiler ve böylece "Humoral İmmünite" konsepti üzerindeki çalışmalarda başlamış oldu^{8,9}.

İmmünoloji alanında kazanılan bilgi ve deneyimlerin pratik sonuçları, koruyucu bağışık serum ve serolojik reaktiflerin hazırlanmasıyla aktif bağışıklığın gündeme gelmesi oldu. Bu alanda biriken bilgiler, sonunda bir bilim dalının oluşmasına yol açtı. "İmmünoloji" sözcüğü ilk kez 1910 yılında Index Medicus'ta yer aldı ve Journal of Immunology 1916 yılında yayımlanmaya başladı⁸.

1950'lerden itibaren immün yetmezlikler ve otoimmünite üzerindeki araştırmalar gelişme gösterdi. Böylece klinik ağırlıklı immünpatoloji oluşmaya başladı. 1958 yılında Dausset, Snell ve Rappaport, "Lökositlerde Doku Uygunluk Antijenleri"ni gösterdiler. 1967 yılında "HLA Sistemi" kabul edildi ve organ transplantasyonları başarı ile denenmeye başladı. Ardından "Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC) nin kromozomal yeri belirlendi^{10,11}.

1960'lı yılların başlarında, Miller ve Good'un öncülük ettiği çalışmalarla timusun, immünitenin santral organı olduğu kesinlikle belirlendi. Bu yıllarda 2 farklı tip lenfosit bulunduğu Mitchell ve Miller'in çalışmaları ile anlaşıldı. Claman ve ark. ve daha sonra Mitchison, B ve T lenfosit kooperasyonu konusunda önemli açıklamalar getirdiler. İlk kez 1964 yılında Govans ve Knight "Lenfosit Sirkülasyonu"nun özelliklerini (homing olayı) gösterdiler ve buluşlar birbirini izlemeye devam etti^{8,12,13}.

1974 yılında "Natural Killer" (NK) hücreleri bulundu. Daha sonraki çalışmalarla bu hücrelerin doğal immünite ve kazanılmış immünite arasında çok önemli bir köprü görevi yaptıkları gösterildi. 1980 yılından sonra "Lenfokinle Aktive Öldürücü" hücreler üzerindeki bilgiler gelişme gösterdi⁸.

Bir başka kilometre taşını "Sitokinler" in keşfedilmesi oluşturuyor. Isaacs ve Lindenmann'ın 1957 yılında "İnterferon" u keşfetmelerini izleyen uzunca bir durgun dönemi takiben, 1970'lerden itibaren sitokinler üzerindeki bilgilerimiz genişlemeye başladı. İlk kez Dumonde'un "Lenfokinler" üzerine dikkat çekmesinden sonra bunu diğer sitokinler üzerindeki araştırmalar izledi. "İnterlökin" (IL) sözcüğü ilk kez 1979 yılında önerildi. 1980'li yıllarda bu konuda yoğun bilgi birikimi oluştu. IL-1 ve IL-2'nin bilinen en önemli özellikleri ortaya çıkarıldı ve günümüzde sayıları 27'ye ulaşan diğer interlökinler aralıklarla da olsa peşpeşe geldiler¹⁴.

Yine 1986 yılında Mosmann ve ark.'nın sitokin profillerine göre farklı immün cevap oluşturan "Yardımcı T Hücre Subgrupları" nı göstermeleri önemli gelişmelerden birini oluşturdu. Böylece, mesela bir enfeksiyon etkeninin tetiklediği hastalık tablosunun ve hastalığın klinik gidişinin bu profillerden birinin dominansına göre değişebileceğini kavramaya başladık. Bundan, immün cevabın konak lehine manipüle edilebileceği umudu doğdu. 1950'lerden günümüze ulaşan yarım yüzyıllık periyodun, immünolojinin altın çağını oluşturduğunu belirtmek gerekiyor¹⁵.

2.2. İmmünitenin Tipleri

İmmün sistem, doğal (innate) ve kazanılmış (spesifik-adaptif) olarak ayrılan iki kısımda incelenebilen bir savunma sistemidir. Bu iki sistem birbiriyle çok hassas bir denge içerisinde ve yardımlaşma ile çalışarak konağı patojenlere karşı korumaktadır.

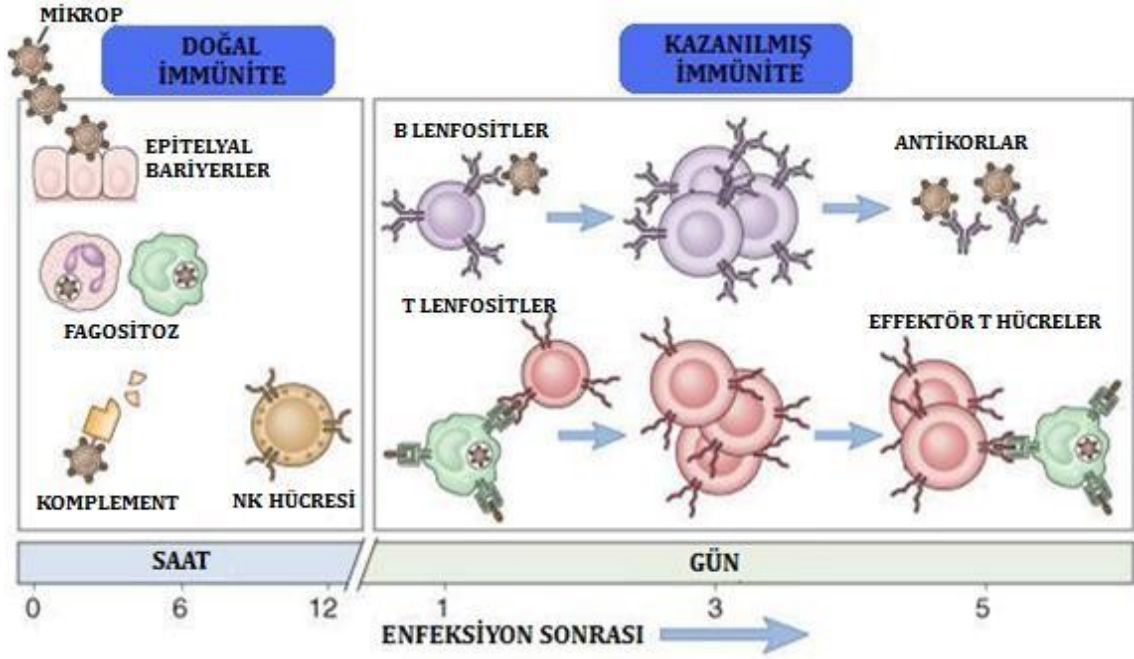
Doğal immünite, bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı doğumdan itibaren oluşturabilen, genetik olarak belirlenmiş immün özellikleri içeren ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip olan savunma sistemi olup belirli bir patojen için selektivite göstermez ve birey bazı mikroorganizmaları tanıma ve yoketme özelliklerine doğuştan itibaren sahiptir. Doğal immün sistem, hücre ve çeşitli molekülleri içerir. Hücresel elemanlar polimorfonükleer lökositler (PMNL), monosit, makrofaj, eozinofil, mast hücre ve bazofiller, çözünür faktörler ise sitokinler, akut faz reaktanları ve özellikle en önemli faktörlerden biri olan kompleman sisteminden oluşur¹⁶. Organizmanın enfeksiyonlarla mücadelesinde hem evrimsel olarak eski hem de oldukça evrensel olan doğal immün sistem, spesifik immüniteyle kıyaslandığında patojenleri tanıyan reseptörler açısından daha kısıtlı bir repertuara sahiptir^{17,18}. Doğal direnç mekanizmaları; anatomik ve fizyolojik bariyerler, kimyasal ve biyolojik faktörler, dalağın fonksiyonu, yaş, beslenme, ateş ve akut faz reaktanları, ırk ve genetik etki, bakteriyel interferens ve interferon, enfeksiyonlara doğal duyarsızlık, oral tolerans, fagositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler, fagositoz ve enflamasyondur¹⁹.

Kazanılmış immünite ise, belirli bir antijene özgün olup, antijenle tekrarlayan karşılaşmalarda daha hızlı ve güçlü cevap oluşturma gibi üstünlüklere sahiptir. Bu olaya antikor ve T lenfositleri aracılık eder ve sorumlu hücreler özgül bir antijen için uzun vadeli belleğe sahiptir. Bu savunma, organizmanın patojene primer veya sekonder yanıtına göre humoral veya hücresel düzeyde olabilir. Hücre aracı (hücresel) yanıt esas olarak T lenfositlerden kurulu iken antikor aracı (humoral) bağışıklık B lenfositlerden ve plazma hücrelerinden kuruludur²⁰. Kazanılmış immünite, iki şekilde sağlanır. Aktif immünizasyon, hastalık etkeninin doğrudan alınması (doğal enfeksiyon) veya bu etkenin zararsız hale getirilmesinden sonra konağa verilmesiyle (aşılama) kazanılır. Pasif immünizasyon ise anneden bebeğe geçen bağışıklık dışında, belirli bir antijene karşı hiperimmün kılınmış başka konaktan (at) alınan immün serumun veya immüoglobülinlerin korunmak istenilen kişiye verilmesiyle kazandırılır^{19,21}.

Daha önce karşılaşılmamış bir patojenle ilk kez karşılaşıldığında, kazanılmış bağışıklığın gelişimine kadar geçen ortalama 5 gün içerisinde, vücudun patojen ile mücadelesinde doğal bağışıklık önemlidir. Kazanılmış immün sistemin, antijen tanıma kapasitesi çok geniş bir reseptör repertuarıyla spesifisiteyi sağlarken, doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olan ve olmayanı belirleyerek ilk savunmayı başlatabilmektedir^{16,18}.

2.3. Doğal ve Kazanılmış Bağışık Yanıtın Genel Özellikleri

Doğal bağışıklık sistemi konak genomunda kodlanmış savunma mekanizmalarını içerir. Herhangi bir enfeksiyon olmadan da vücutta hazır bir şekilde bulunduğu için enfeksiyon durumunda bu yanıt hızla gelişir ve tekrarlayan enfeksiyonlara aynı şekilde ve aynı şiddette yanıt verir. Doğal bağışıklıkta hücreleri birbiri ile sıkı temasta bulunan epitelyum hücre katmanları, solunum, sindirim ve genitoüriner sistemini örten epitelyumdan mukus salgılanması, solunan ve yutulan parçacıklar ile kontamine bu mukusun epitelyum silyası ile temizlenmesi gibi anatomik ve fizyolojik savunma mekanizmaları yer alır. Doğal immün yanıt çözünebilir proteinler ve küçük biyoaktif moleküller de içerir. Bu moleküller arasında kompleman proteinleri ve defensinler gibi biyolojik sıvılarda yapısal olarak bulunanlar olduğu gibi etkileşen hücrelerden salgılanan sitokin, kemokin, biyoaktif aminler ve enzimler gibi indüklenebilir moleküllerde bulunur. Doğal immün sistem tüm istilacı mikrop yüzeylerinde ortak olarak bulunan yapısal moleküllere bağlanan hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile özü, öz olmayandan ayırt edebilmektedir. Kısaca doğal bağışık yanıt; doğuştan var olduğu için istilacı mikroplara karşı ilk savunma hattını oluşturan, mikroplarla ilk ve sonraki karşılaşmalarında etkinlik derecesi değişmeyen, immünolojik desteğe sahip olmayan ve mikrop antijenlerine özgül olmayan yanıtlardır²².



Şekil 1. Doğal ve Kazanılmış İmmüitenin Elemanları

Doğal bağışık yanıtın aksine enfeksiyöz ajanla karşılaştıktan sonra uyarılan ve savunma yeteneği ve derecesi aynı mikropla her karşılaşmada giderek artan yanıt tipleri de vardır. Herhangi bir patojene özgül az sayıda lenfosit olduğundan bu lenfositlerin mikroba etkin yanıt verebilmek üzere yeterli sayıya ulaşabilmesi için çoğalması gerekmektedir. Dolayısıyla B ve T lenfositlerinin klonal çoğalmasına bağlı olarak antijenle karşılaştıktan birkaç gün sonra ortaya çıkan bu tip yanıtlar doğal yanıtın sonra gelişirler. Bu tip immünite enfeksiyona yanıt olarak geliştiğinden ve enfeksiyon tipine uyum sağladığından adaptif immün yanıt adını alır. Adaptif bağışık yanıtın tanımlayıcı özellikleri; birbirinden farklı moleküller için mutlak olarak özgül olması, hatırlama yeteneği ve tekrarlayan karşılaşmalarda daha güçlü ve etkin olarak gelişmesidir. Adaptif bağışık yanıt çok sayıda ve çok çeşitli mikrobik olan ve de olmayan maddeleri tanıyabilme ve yanıt verme yeteneğindedir. Birbirine çok yakın olan farklı mikrop ve molekülleri ayırt edebilme özelliğinde olduğundan özgül bağışıklık, deneyimle kazanıldığı için de kazanılmış bağışık yanıt denmektedir²³.

Kazanılmış immün sistem hedef alınan antijenler için kusursuz bir özgüllük sergiler. Kazanılmış yanıtlar başlıca T ve B lenfositlerinin membranlarında bulunan antijene özgül reseptör aracılığı ile oluşur. Doğal immün yanıtta mikrop antijenlerini

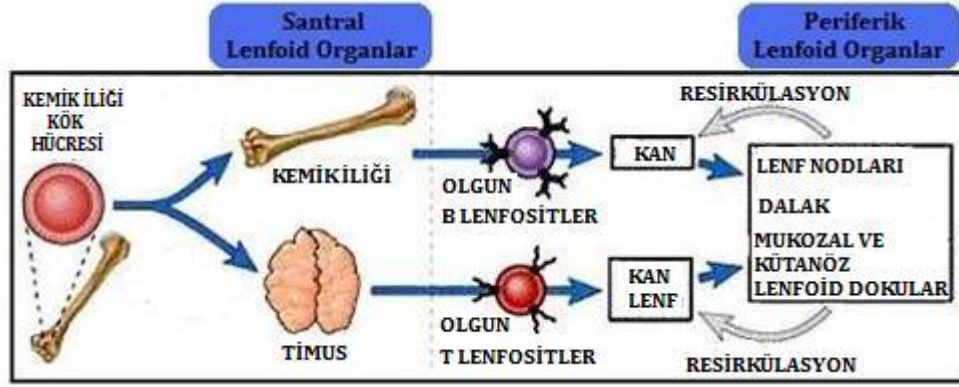
tanıyan moleküller konak genomunda bulunan genlerle kodlanmakta iken B ve T hücre yüzeyinde bulunan antijen reseptörleri, ilgili gen elemanlarının somatik olarak yeniden düzenlenmesi (rearanjman) ile bir araya gelirler. Yüzlerce antijen reseptör gen elemanının toplanması ve yeniden birleşmesi milyonlarca farklı antijen reseptörünün oluşmasına olanak tanır. Sonuçta kazanılmış bağışık yanıtın en önemli özelliği olan tek bir antijene özgüllük sağlanmış olur. Antijenik özgüllük antijenler arasında çok küçük farklılıkları ayırt edebilme özelliğidir. Örneğin antikorlar sadece bir aminoasidi farklı olan iki protein molekülünü bile ayırt edebilmektedir. Özgüllüğün yanı sıra kazanılmış bağışık yanıtın diğer çok önemli özellikleri çeşitlilik ve immünolojik bellektir. Bir kişideki lenfositlerin antijenik özgüllüklerinin total sayısı lenfosit repertuvarını oluşturur ve bu repertuvar çok geniştir. Bir kişinin sisteminin 10^7 - 10^9 kadar farklı antijenik epitopu ayırt edilebildiği düşünülmektedir. Lenfosit repertuvarının bu özelliğine çeşitlilik denir. Çeşitlilik lenfosit antijen reseptörlerinin yapılarındaki değişkenlikten kaynaklanmaktadır. Antijen bağlayan reseptörlerdeki çeşitlilik yabancı antijenler üzerinde bulunan milyonlarca farklı yapıyı tanımayı olanaklı kılar. Diğer bir deyişle antijen reseptör yapısı, dolayısıyla özgüllüğü farklı olan birçok lenfosit klonu vardır ve sonuçta bir hayli çeşitlilik gösteren bir repertuvar oluşmaktadır.

Kazanılmış immün sistem bir antijeni tanıyıp yanıt verdikten sonra immünolojik bellek geliştirir. Aynı antijenle ikinci kez karşılaştığında daha yüksek düzeyde ve daha çabuk bir immün yanıt gelişir. Bu ikincil yanıt antijene ilk yanıt gelişimi sırasında oluşan etkin lenfosit klonlarının yanı sıra uzun ömürlü bellek hücre gelişimine bağlıdır^{23,24}. Doğal ve kazanılmış bağışık yanıtlar etki mekanizmaları açısından temelde farklı olsalar bile tam anlamıyla etkin ve eksiksiz bir bağışık yanıt için birlikte çalışarak birbirlerini tamamlamaktadırlar^{23,25}.

2.4. Lenfoid Organlar

Lenfoid organlar santral ve periferik olmak üzere ikiye ayrılır. Santral (Primer) organlar, yeni lenfositlerin antijene bağımlı olmaksızın otonom olarak yapıldıkları ve immün tepki oluşturma yeteneği kazandıkları yerlerdir. İnsanda santral lenfoid organlar kemik iliği ve timustur. Periferik (Sekonder) lenfoid dokular ise, lenfositlerin antijenik uyarılarla reaksiyona girdikleri yerler olup dalak ve lenf nodülleri gibi sistemik lenfoid organlar ile gastrointestinal sistem, respiratuar sistem, genitoüriner sistem, konjonktiva

gibi mukozal yüzeylerle ilişkili hep beraber mukozal immün sistemi yapacak şekilde, mukozal bağlantılı lenfoid dokular (MALT) 'dan oluşur^{17,26}.



Şekil 2. Santral ve Lenfoid Organlar

2.4.1. Santral Lenfoid Organlar

Kemik İliği: Retikulum lifleri ve retiküler hücrelerden oluşan gevşek bir stroma içinde yer alan, değişik olgunlaşma evrelerindeki kan hücreleri ve yağ hücrelerinden oluşur. B lenfositlerin gelişiminin ana yeri olmasının yanında olgun T lenfosit ve plazma hücrelerini de içerir^{27,28,29,30}.

Timus: Kemik iliğinden göç eden T lenfositlerin olgunlaşarak olgun T lenfositlerine dönüştükleri organdır^{27,28,29,30}.

2.4.2. Periferik Lenfoid Organlar

Dalak: Kırmızı ve beyaz pulpadan oluşur. Beyaz pulpada başlıca lenfositler kırmızı pulpada ise makrofajlar ve eritrositler bulunur. Kanı filtre etmek ve kandaki antijenleri yakalamakla görevlidir^{27,28,29,30}.

Lenf Düğümleri: Lenf düğümünü çevreleyen kapsül trabekülalar oluşturarak lenf düğümünü korteks (ağırlıklı olarak B lenfositleri içerir), parakorteks (T lenfosit ve makrofajlar yer alır) ve medulla (plazma hücreleri bulunur) olmak üzere bölmelere ayırır. Kortekste B lenfosit hücre kümelerinin oluşturduğu birincil ve ikincil lenf folikülleri yer alır^{27,28,29,30}.

Mukoza İlişkili Lenfoid Doku (MALT): Kısaca MALT adı verilen organize lenfoid dokular; sindirim, solunum ve ürogenital sistemleri döşeyen muköz membranların savunmasını üstlenmişlerdir. Tonsiller ve peyer plakları gibi yapılardan oluşur^{27,28,29,30}.

Tüm lenfoid organların yapısı benzer olup kapsüle ve bağ doku uzantıları ile lobüllere bölünmüşlerdir. Perfüzyon tek bir arterden, drenaj ise venler ve lenfatikler yardımı ile sağlanır. Parenkim dokusu, korteks (periferik zon) ile medulla (santral zon)’dan oluşur⁷. Mukozal lenfoid dokularda ise lenfositler, dağınık agregatlar halinde (difüz lenfoid doku) veya germinal merkezler içeren sekonder foliküller (organize lenfoid doku) şeklinde bulunabilirler³¹.

2.5. Lenfoid Hücreler

İmmün sistemin fonksiyonları, tüm vücuda dağılmış olmakla birlikte esas olarak timus, lenf nodülleri ve dalakta bulunan hücrelerin oluşturdukları “Lenforetiküler Sistem“ tarafından yürütülür. Bu sistemin en önemli komponenti olan lenfoid hücreler, lenfositler ve plazma hücrelerinden oluşmaktadır. Plazma hücreleri, antijen veya yabancı cisimlere karşı reaksiyon oluşturan protein yapıdaki antikorların üretiminden sorumlu iken, lenfositlerin antijene özgün tepki gösterme ve sonuçta bazı hücrel ürünler oluşturma yeteneği vardır²¹.

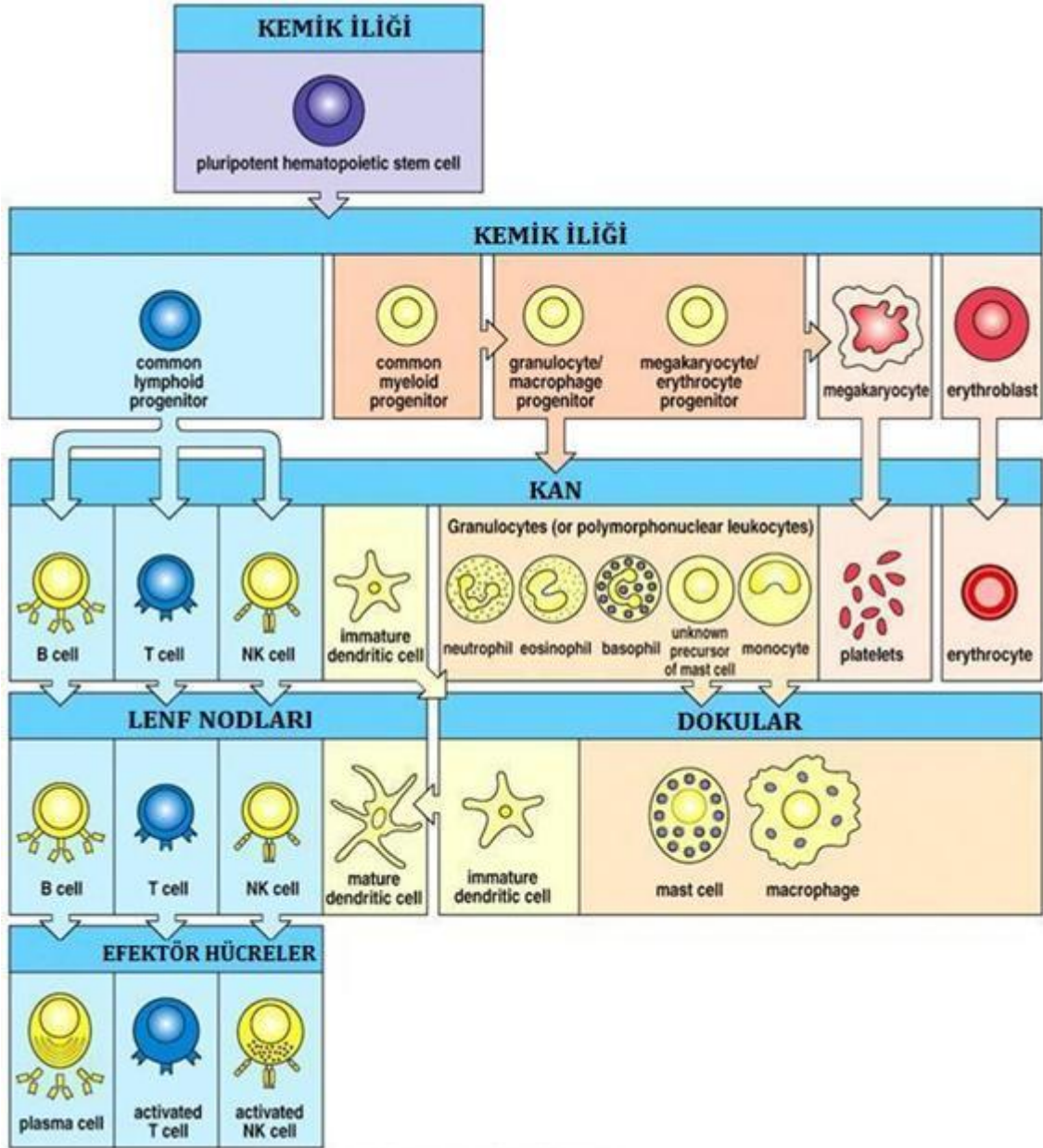
Gebeliğin 8. haftasında hepato-spleno-timik evrede, hemapoietik kök hücrelerinin vitellus kesesinden karaciğer ve dalağa göç etmesiyle granülopoiesis, lenfositopoiesis ve monositopoiesis başlar. Bu dönemde timusta da lenfosit yapımı başlamıştır. İntrauterin 3. ayda oluşmaya başlayan kemik iliğinde ise 4. aydan sonra bütün kök hücrelerinin gelişmesi ile hemopoiesis etkin duruma geçer. Doğumdan sonraki yaşam süresince organizmadaki lenfosit yapımı, esas itibarı ile lenf nodüllerinde olmak üzere lenfoid dokulardaki lenfositlerin çoğalması ile sağlanır. Ancak bu yapım, normal lenfosit sayısını karşılamaya yetmediğinden, kök hücrelerinin farklılaşması ile kemik iliğinden de dolaşıma lenfosit verilir. Erişkinde bir günde dolaşıma verilen lenfosit sayısı yaklaşık 10^9 ’dur^{17,19}.

Morfolojik olarak birbirine çok benzemekle beraber birbirinden bağımsız olarak gelişen, görevleri ve antijen yapıları birbirinden farklı iki ana lenfosit grubu mevcuttur. Lenfosit klonları, santral lenfoid dokuları oluşturan fetal karaciğer, kemik iliği ve

timusta iki ayrı doğrultuda fonksiyonel farklılaşmaya uğrarlar. Kuşlarda son barsaktaki kloakada yer almış bir lenfoid organ olan bursa of Fabricious'a bağımlı gelişme göstererek humoral (antikora dayalı) immüniteyi oluşturan lenfositlere B lenfositleri; timusa bağımlı gelişme göstererek hücrel immüniteyi oluşturan lenfositlere de T lenfositleri denmektedir. Bursa'nın memelilerdeki karşılığının fetal karaciğer ve erişkin kemik iliği olduğu kabul edilmektedir²⁶. Her iki lenfosit grubu da uyarıldığında morfolojik değişiklikler gösterir ve bölünmeye başlar. T hücreleri özgün antijenleri tanıma özelliğine sahip blast formuna bürünürken, B lenfositleri antikor oluşturmak üzere plazma hücrelerine dönüşürler²¹.

Üçüncü bir lenfosit grubu olarak kabul edilen doğal öldürücü (NK) hücreler olarak adlandırılan grup ise, bazı T hücre belirteçleri taşıdıkları halde olgunlaşma için timustan geçmeyen, doğal konak savunmasında önemli bir rol oynayan büyük sitoplazmik granüllü lenfositlerdir²⁰.

Lenfoid kök hücrelerinden farklılaşan T, B ve NK hücrelerinin aksine lenfoid sistemin diğer elemanları olan monositler, makrofajlar ve granülositler myeloid öncüllerinden gelişir¹⁷.



Şekil 3. Kan Hücrelerinin Gelişimi

2.5.1. T Lenfositler

Timus, T lenfositlerin gelişimi ve fonksiyonel hale gelebilmesi için temel organdır. Gestasyonun dördüncü haftasında timus 3–4. farengal yarıktan aşağı doğru ilerler ve üst mediastende V şeklinde epitelyal solid yapı meydana getirir. Fetal timus, gestasyonun üçüncü ayından itibaren işlevsel hale gelir^{32,33}.

Fetus'ta pro-timosit (CD7+, diğer timosit belirteçleri negatif) fenotipi, fetusun karaciğer ve vitellüs kesesinde gebeliğin 7. haftasından itibaren görülmeye başlar. Hücrelerin timusa göçü gebeliğin 7–8'inci haftalarında gerçekleşir. Bunu, timositlerin CD2, CD3, T lenfosit hücre algacı (TCR), CD4 ve CD8 moleküllerini eksprese etmeleri izler. Fetal timusta $\gamma\delta$ (gama-delta) algaç sunumu 9., $\alpha\beta$ (alfa-beta) algaç sunumu 10. haftalarda başlar. Gebeliğin 14. haftasından itibaren majör timosit subgruplarının hepsi mevcuttur. CD4 ve CD8 T lenfositleri ilk olarak karaciğer ve dalakta gebeliğin 14. haftasından itibaren görülürler ve T lenfositlerinin sayısı bundan sonra kanda artar. Bu artış, doğumdan 6 ay sonraya kadar devam eder ve sonra yavaş yavaş azalarak erişkindeki düzeye iner. Yenidoğanda T lenfosit sayısı ve total lenfosit sayısı, bir çocuk veya erişkindekinden fazladır. Fetal hayatta CD4/CD8 oranı 3,5 iken, doğumda bu oran 2,5 düzeyine iner. Erişkindeki düzeye ise 4 yaş civarında gelir ve 2 civarındadır. Gebeliğin ilk 3 aylık döneminde T hücre algacı repertuarı dardır. Doğumla birlikte genişler^{32,34,35}.

T lenfositleri, bu yönde farklılaşacağı belli olan bir kök hücreden gelişirler. Kemik iliği kaynaklı T lenfosit kök hücreleri, olgunlaşmak için seçici bir şekilde timus korteksine gelirler. Timustaki T lenfositlere timosit de denir. Prekürsör hücreler timusa girmeden önce matür T lenfositlere özgü olan yüzey belirteçlerini taşımazlar. Gelişen hücreler medullaya doğru hareket ederken timus stroması tarafından yönlendirilen bir dizi farklılaşmaya uğrarlar. Bu hücreler, öncü hücrelerden olgun T lenfositlere geçişleri sırasında bazı yüzey belirleyicilerini kazanırken bazılarını da kaybederler^{32,33,35}.

Timustaki T lenfositleri (timosit) yüzeylerinde CD4 ve CD8 moleküllerini sergilemelerine göre 4 ana gruba ayrılabilir. CD4 ve CD8 bulundurmayan çift negatif, her iki molekül de bulunduran çift pozitif ve sadece CD4 veya CD8 bulunduran tek pozitif hücreler. Kemik iliğinden timus korteksine ulaşan kök hücrelerden gelişen ilk hücrelerde (pro-T), TCR ve CD fenotipi oluşmamıştır (CD2–, CD3–, CD4–, CD8–). Timus içi farklılaşmanın en erken evresindeki hücreler CD2 gibi T lenfositleri için karakteristik yüzey moleküllerini eksprese ederler. Ayrıca CD71, CD38 ve CD7 yüzey molekülleri de bu erken evrede eksprese edilir. Hücreler, korteksten medullaya hareket ederler ve gelişmeleri sırasında pre-T lenfositlerde CD2+ ,CD3–, CD4–, CD8– bulunur. Bunu takiben CD2+, CD3+, CD4–, CD8– fenotipine sahip (çift negatif) hücreler meydana gelir. Bu dönemde T lenfosit hücre algaç genlerinin düzenlenmesi başlayarak

ilk T lenfosit hücre algacı sentezlenir. T lenfosit hücre algacının TCR-1 (γ / δ) ve TCR-2 (α / β) olmak üzere iki ayrı tipi vardır. İlk önce β , daha sonra da α zinciri sentez edilir. Çift pozitif hücrelere geçiş için β zincir sentezinin tamamlanmış olması gereklidir. TCR sentez edilirken intrasitoplazmik CD3 de eş zamanlı eksprese edilir. CD2+, CD3+, CD4+, CD8+ fenotipine sahip (çift pozitif) ve TCR taşıyıcı hücreler gelişir. Gerek timositler, gerekse lenfoid olmayan hücrelerden salgılanan sitokinlerin büyüme ve farklılaşmada etkili oldukları bilinmektedir. CD4+–CD8+ timositler timustaki olgun popülasyonu oluştururlar. Çoğu henüz olgunlaşmamış CD4+–CD8+ timositler büyük ve aktif olarak bölünen blast hücreler olup düşük düzeyde TCR $\alpha\beta$ kompleksini eksprese eden kortikal, küçük ve bölünmeyen hücrelere gelişirler. CD4+–CD8+ timositlerde TCR angajmanı, pozitif seleksiyonun erken indüksiyon fazının ağırlıklı bölümüdür. TCR–MHC–peptid etkileşimi tek başına CD4+–CD8+ timositlerin pozitif seleksiyonunu indüklemeye yetmez, bunun için gereken ko–stimülasyon sınıf II MHC timik epitel hücrelerince sağlanır^{32,35,36,37,38}.

Timositler timus içerisinde olgun T lenfositlere dönüştükçe TCR ekspresyonu artar ve yüzeylerindeki CD4+ ve CD8+ moleküllerinden birini kaybederler. Sonunda, medullada CD2 ve CD3 belirteçlerini ortak olarak taşıyan (CD2+–CD3+), ayrıca birinde CD4+; diğerinde CD8+ belirteçlerinin yer aldığı (tek pozitif) iki farklı T lenfosit subgrubu oluşur. Bu hücreler kısa bir süre sonra post kapiller venül yoluyla dolaşıma katılır. Perifere geçmiş T lenfositlerde CD4 ve CD8 belirteçleri birlikte yer almazlar. Her iki T lenfosit subgrubunun özgüllüğünü CD4 ve CD8 yüzey belirteçleri belirler. Timustaki tek pozitif (CD4+–CD8–) medüller timositler heterojen bir subgrubu oluştururlar. Hücrelerin büyük çoğunluğunu CD4+ CD25– periferik bağışıklık efektör hücreler, daha azını da CD4+ CD25+ regülatör T lenfositleri oluşturur. Timusta CD4+–CD8– timositler, CD4+–CD25+ T lenfositlerin esas kaynağıdır. Timositler, timustaki olgunlaşmalarını 3 gün içinde tamamlar. Olgunlaşma sırasında timositlerin %90'ından fazlası apoptoz ile ölür^{32,35,36,39}.

Tüm timositlerin yaklaşık %1'i timusu terk eder, geri kalanı timusta apoptoza uğrayarak ölür. Apoptoza uğrayan timositlerin %75'i CD4+–CD8+ (çift pozitif), %13'ü de CD4–CD8– (çift negatif) hücrelerdir. Apoptotik hücrelerin çoğunluğu CD4+–CD8+ lenfositlerin yüksek yoğunlukta bulunduğu kortiko–medüller bağlantı bölgesinde, daha az bir bölümü de kortekste tespit edilir. TCR repertuarının özgüllüğü, gelişigüzel gen

düzenlemeleri ile ortaya çıkar. İntratinik self peptid– sınıf II MHC molekülleri, CD4+–CD8+ olgunlaşmamış timositlerin pozitif ve negatif seleksiyonu süresince T lenfosit repertuvarını şekillendirir. Kendi MHC moleküllerine uygun (düşük) afinite gösteren TCR eksprese eden timositler, pozitif seçimle ölümden kurtulurlar ve bunların olgunlaşmalarına izin verilir (pozitif seleksiyon). Kendi MHC'sine afinitesi olmayan hücreler ölür. MHC bağımlı self tolerant olan hücrelerin seçimi, hücre yüzeyinde CD3, CD4, CD8 ve TCR moleküllerinin sergilenmesine bağlıdır. Böylece periferde bulunan antijen sunucu hücrelerin sundukları antijenlerin tanınamaması ile sonlanacak bir durum engellenmiş olur. Hücrelerin seçilerek çoğalmaları veya ölmelerinde açık olmayan pek çok nokta vardır. T lenfositlerinin %95 kadarı α ve β zincirlerinin yer aldığı TCR-2'leri taşır^{32,35,36}.

İnsan T lenfositleri, CD4 ve CD8 farklılaşma belirteçleri dışında başlıca CD2, CD3, CD5, CD6, CD7 yüzey belirteçlerini; IL-1R, IL-2R, IL-6R, IFN- γ R, TNF-R gibi çeşitli sitokin algaçlarını ve LFA-1, ICAM-1 gibi adezyon moleküllerini eksprese ederler. Periferdeki T lenfositleri uyarıldıklarında yüzey antijen ekspresyonları da değişir. İlk önce CD25, CD26 sonra CD38, CD71 ve daha sonra da HLA-DR yüzey antijenleri sergilenmeye başlar. Bir lökosit belirteci olan ve TCR sinyali için tirozin fosfataz aktivitesi gösteren CD45'in hücrenin aktivasyon durumuna göre değişen izoformları da T lenfositlerde eksprese edilir. CD45RA izoformu naif, CD45RO izoformu antijeni tanımış bellek durumunda olan T lenfositlerde yer alırlar. Ayrıca IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-25, IL-27, IFN- γ gibi çeşitli sitokinler de T lenfositlerinin gelişiminde ve aktive olmasında rol alırlar^{34,35}.

Timusta olgunlaşmasını tamamlayan T lenfositlerinin dolaşıma hangi mekanizmalarla geçtikleri ve hangi subgruplara farklılaşacağı kesin olarak bilinmemektedir. Olgun T lenfositleri; kan dolaşımına geçerek dalak, lenf nodülleri, peyer plakları gibi ikincil lenfoid dokulara giderler. Dolaşımdaki lenfositlerin %60– 80 kadarını T lenfositleri oluştururlar. Periferik kandaki T lenfositlerinin üçte ikisi CD4, üçte biri CD8 yüzey belirteci taşır^{32,34,35,36}.

Timustan perifere geçen T lenfositleri orada çoğalırlar ve persiste olurlar. Periferdeki T lenfosit sayısının sabit tutulması, timik prekürsör havuzuna bağlı olmaksızın periferde hücre bölünmesi ile sürdürülür. T lenfosit repertuvarı timusta

şekillenir. Fakat T, lenfosit özelliklerinin bundan sonraki seçimi periferde olgun T lenfosit havuzunun ekspansiyonu ile sağlanır³⁵.

T Lenfosit Hücre Algacı (TCR): T lenfositlerde yüzey immünoglobülinleri bulunmaz. Antijenik peptidlerin tanınması T lenfosit hücre algacı ile sağlanır. TCR, antijeni ancak MHC ile yaptığı kompleks sonrası tanır. TCR, immünoglobülinlerden hem yapısal hem de fonksiyonel olarak farklıdır. Hiçbir zaman salgılanmazlar. İki tip TCR tespit edilmiştir. T lenfosit hücre algaçları genelde α ve β polipeptid zincirlerinden (TCR-2) oluşmuş heterodimer yapıda olup bu zincirler birbirine disülfid bağı ile bağlıdır. TCR-1 ise γ ve δ heterodimerlerden meydana gelir. Bu yapıyı bulunduran T lenfositlerin α/β yapısını bulunduranlardan önce ortaya çıktıkları, CD4 ve CD8 bulundurmadıkları, MHC'den bağımsız sitotoksistide rol aldıkları düşünülmektedir. TCR'nin sitoplazmik kısmı, çok kısa olması nedeniyle antijene bağlanma sonrasında sinyal oluşturmaz. Sinyal oluşumu ve iletiminden TCR ile ilişkili ilave polipeptid yapılar (CD3 kompleksi) sorumludur. Bu nedenle fonksiyonel T lenfosit algacı TCR/CD3 kompleksi olarak tarif edilebilir. Periferik kandaki insan T lenfositlerinin yaklaşık % 95'i yüzeyinde TCR-2'yi bulundurur^{32,35,40,41,42}.

T lenfositler özgün yüzey belirteci olan CD3 ile, iki temel subgrubu ise CD4 ve CD8 yüzey belirteci ile özgün olarak tanınabilmektedir.

CD3: T lenfositlerde bulunmaktadır. CD3 kompleksi gama (γ), delta (δ), epsilon(ϵ), zeta (ζ) ve eta(η) polipeptid zincirlerinden oluşur. T lenfosit reseptör kompleksinin hücre içinde kalan bölümünü oluşturur. TCR heterodimerleri ile yan yana bulunur. En önemli görevi T lenfosit aktivasyonunda rol oynamasıdır. Sinyalin hücre içine naklinden sorumlu temel bir sinyal iletim molekülüdür. T lenfosit algacının hücre yüzeyine sunumunu ve bütünlüğünün korunmasını sağlar^{32,36,43}.

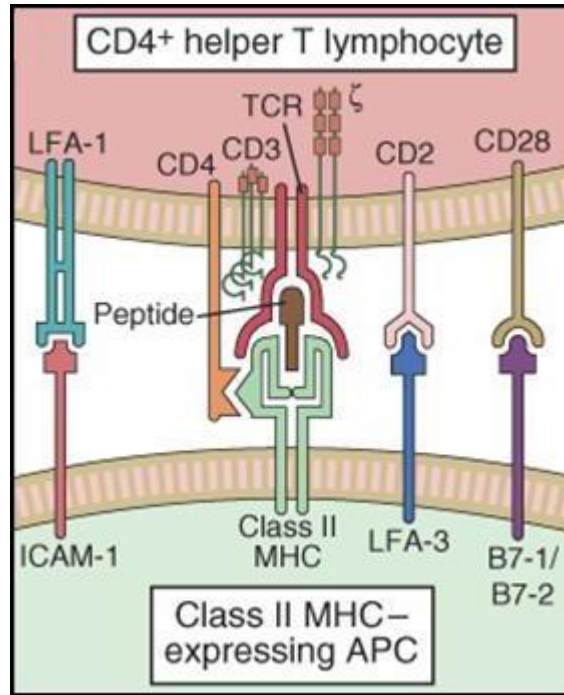
CD4: Yardımcı T (Th) lenfositlerin başlıca belirleyicisidir. CD4 molekülü glikoprotein yapıda olup 55 kDa ağırlığında tek bir polipeptid zincirinden oluşmuştur. CD4+ T lenfositlerin, antijen sunan hücrede bulunan sınıf II MHC molekülüne bağlanmasında ve sinyal iletiminde yardımcı molekül olarak rol oynar. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) CD4 molekülüne bağlanır^{32,36,44}.

CD8: Sitotoksik T lenfositlerin yüzey belirleyicisidir. Periferik kan T lenfositleri CD8 molekülü ya CD8 α zincirinden oluşmuş bir homodimer ya da CD8 α ve CD8 β zincirlerinin birlikte oluşturdukları heterodimer yapısındadır. CD8 molekülü hem sınıf I

MHC molekülüne tutunmayı sağlamakta hem de sinyal iletimini kolaylaştırmaktadır^{32,36,44}.

2.5.1.1. CD4 yüzey marker hücreleri (T-Helper / Endüktör)

T Hücre grubunun %65'ini oluştururlar ve timus medullası, tonsiller ve kanda baskındırlar. Bu hücreler, özellikle IL2 (T hücre büyüme faktörü) olmak üzere ürettikleri çeşitli sitokinler vasıtası ile CD8 T hücrelerinin, etkinleşmiş sitotoksik T ve süpresör T hücrelerine dönüşmesine yardım eder. Yine makrofajların gecikmiş aşırı duyarlılık etkilerine yardım ederek diğer T-Hücrelerinin, monosit, makrofaj ve diğer bazı hücrelerin proliferasyon ve diferansiyasyonunu sağlayan ve sitokin denen çözünür maddeler oluştururlar^{45,46}.



Şekil 4. CD4⁺ yardımcı T Lenfosit - Sınıf II MHC ilişkisi

T hücrelerine bağımlı humoral yanıtta, B Hücrelerinin bölünme ve çok sayıda antikor üreten plazma hücrelerine gelişmesine yardım eder. B hücrelerinin antikor

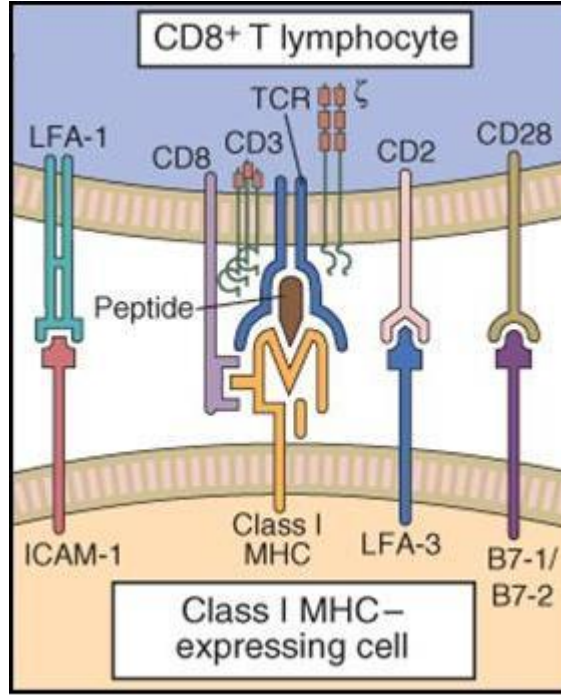
üreten plazma hücrelerine farklılaşmasının uyarılması için, dinlenimdeki B hücrelerinin yüzeyindeki CD40 adlı bir protein ile, etkinleştirilmiş T helper hücrelerinin üstündeki bir zar proteininin etkinleşmesi zorunludur. Üstelik CD4 T lenfosit yüzeyinde bulunan ve B hücresi üzerindeki lenfosit fonksiyonuyla ilişkili proteinlerle (LFA) etkileşen hücreler arası adezyon molekülü proteinleri (ICAM) ile yine B hücre yüzeyindeki B7 ile etkileşen CD28 molekülü gibi bazı proteinler, T helper ile antijen sunan B hücresi arasındaki karşılıklı etkileşimi güçlendirmeye yardım eder. T hücrelerine bağımlı yanıtta bütün antikor sınıfları (IgG, IgM, IgA, v.b.) üretilirken T hücrelerinden bağımsız yanıtta esas olarak IgM oluşur. T hücresi tarafından üretilen IL 4 (B hücre gelişme faktörü) ve IL5 (B hücre farklılaşma faktörü), üretilen ilk immünglobulin sınıfı olan Ig M yerine IgG, IgA, Ig E gibi diğer sınıfların üretilmesi için sınıf anahtarını çevirmektedir. Bu durum, sınıfın açılıp kapatılmasında yardımcı T lenfositleri tarafından üretilen lenfokinlerin gerektiğini gösterir. T hücrelerine bağımlı yanıt bellek B hücreleri üretirken, T hücrelerinden bağımsız yanıtta bu durum dolayısıyla sekonder antikor yanıtı görülmez²⁰.

CD4(+) T-helper hücreler, işlevsel özelliklerine göre iki temel gruba ayrılır. Th1 hücreler IL-2, IL-12 ve IFN- γ gibi sitokinler sentezlemekte, sitolitik aktivite gösterebilmekte, B hücrelerini IgG, IgM, IgA sentezlemesi yönünde uyarmakta ve daha çok hücre aracılı gecikmiş tip immün reaksiyonlarda görev almaktadır. Öte yandan Th2 lenfositler daha çok IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 salgılama yolu ile hücre aracılı reaksiyonun baskılanmasında rol oynarlar fakat antikor aracılı immün cevapta ve alerjik reaksiyonlarda yer alırlar, sitolitik değildir, diğer Ig'lerin yanı sıra IgE sentezini de aktive eder. Th1 lenfositlerinin daha çok pro-enflamatuar, Th2 lenfositlerinin ise daha çok anti-enflamatuar olduklarına dair görüş, her iki grubun da her iki çeşit sitokini üretebilmesi ve bir sitokinin duruma göre farklı roller oynayabilmesinden dolayı bugün terkedilmiştir. Ek olarak tanımlanmış olan bir diğer grup Th3 lenfositler ise antienflamatuar TGF- β sentezleyerek regülasyonda görev alırlar^{47,48}.

2.5.1.2. CD8 yüzey marker hücreleri (T-Sitotoksik)

Sitotoksik T lenfositleri, insan kemik iliği ve barsak lenfoid dokusunda baskın olup periferdeki T hücrelerinin yaklaşık %35'ini oluşturur. Bu hücreler, virus, bakteri ve parazit ile enfekte hücreler, tümör hücreleri, doku ve organ transplant hücreleri gibi

organizmaya zararlı veya yabancı hücelere doğrudan saldırıp öldürerek sitotoksik işlev görür. Allogreft reaksiyonlarında yer alır¹⁹.



Şekil 5. CD8⁺ T Lenfosit - Sınıf I MHC ilişkisi

Virüsle enfekte hücelere verilen yanıtta, CD8 lenfositlerin enfekte hücrelerin yüzeyindeki hem viral antijenleri hem de sınıf 1 MHC molekülü tanıması zorunludur. Virüsle enfekte hücreyi öldürmesi için sitotoksik T hücresinin bir yardımcı T hücresinden gelen ve virüse özgül sitotoksik T hücresinin etkinleşmesini sağlayan, IL 2 gibi bir sitokin uyarısını alması da zorunludur. Etkinleşmiş sitotoksik T hücreleri enfekte hücreyi öldürmek üzere perforin ve granzim adlı litik enzimler salgırlar ve enfekte hücreyi öldürdükten sonra kendileri bir harabiyete uğramadan aynı virüsle enfekte diğer hücreleri öldürmeyi sürdürebilirler. Bu hücrelerin serbest virüs üzerine hiçbir etkisi bulunmamakta olup bunlar sadece virüsle enfekte hücreleri öldürür²⁰.

Sitotoksik T hücrelerinin hedef hücreleri öldürmede kullandıkları bir diğer yöntem hedef hücre yüzeyinde bir epitopu tanıdığı anda kamçılanan Fas-Fas ligand etkileşimi sonrası hedef hücrede apoptoz sağlanmasıdır. Fas (CD95) ve Fas ligand

(FasL) hücre yüzey molekülleridir ve bunlar “Tümör Nekroz Faktör” ailesinin üyeleridir. Fas hücre yüzeyinde yer alarak apoptotik işaretleri hücre içine iletir ve FasL’nin reseptörüdür. FasL ile Fas bağlantısı olduğu zaman hedef hücre hızla apoptozise gider. Fas çeşitli memelilerin hücre yüzeylerinde tespit edilmiş olmasına rağmen FasL özellikle uyarılmış T hücrelerin yüzeylerinde belirlenmiştir. Normal şartlar altında Fas-FasL kaynaklı apoptozis bağışık sistem düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamasa bile bu iletişimin bozulması otoimmünitenin gelişiminde etkili olabilir⁴⁹.

Birçok tümör hücresinin yüzeyinde geliştirilen ve sınıf 1 MHC proteinlere bağlanan antijenler ile allogreft hücrelerin üzerinde bulunan yabancı sınıf 1 MHC antijenler de sitotoksik T hücreleri tarafından tanınarak bu hücrelerinin öldürülme işlemi gerçekleştirilir²⁰.

Sitotoksik T-Hücrelerinde immunoglobulin için Fc reseptörü bulunmaz, bu neden ile antikor bağımlı hücrel sitotoksiste (ADCC) göstermez²¹.

2.5.1.3. Baskılayıcı T-Hücreleri

Baskılayıcı veya regülatör (düzenleyici) T hücreleri, sitotoksik ve T-Helper hücre etkinliğini baskılayarak immün reaksiyonların aşırıya kaçmasına izin vermezler, geç duyarlılık reaksiyonlarını ve antikor yapımını inhibe ederler. Bu hücreler, immün toleransın sürdürülmesinde ve böylece aşırı immün tepkinin ve belki de otoimmünitenin önlenmesinde önemli rol oynarlar. Baskılamaya aracılık eden özgül bir T hücre popülasyonu bulunmayabilir. Sitolitik ve yardımcı T lenfositlerinin bazı durumlarda süpresör görevi mi gördüğü, yoksa supresör görevi gören ayrı bir subgrup mu bulunduğu netlik kazanmamıştır⁷. Eldeki kanıtlar bazı hallerde CD8 hücrelerin baskılama yapabildiğini fakat CD4 hücreler tarafından üretilen inhibitör lenfokinlerin de bu rolü oynayabildiğini göstermektedir²⁰.

2.5.1.4. Bellek T-Hücreleri

Bellek T hücreleri adlarının da işaret ettiği gibi özgül bir antijen ile ilk karşılaşmadan yıllar sonra tekrar karşılaşıldığında buna ani ve şiddetli yanıt verilmesini sağlayarak konak savunmasına katkıda bulunur. Bellek hücreleri yıllarca yaşar veya kendi kendine üreme yeteneğine sahiptir. Etkinleştirilmiş bellek hücreleri ilk kez

etkinleşen T hücrelerine göre daha küçük miktarda antijen ile etkinleşip çok daha büyük miktarda interlökin üretirler ve çok sayıda bellek hücresi üretildiğinden ikincil yanıt primer yanıtla göre çok daha büyük olur²⁰.

Sonuç itibari ile T hücrelerinin fonksiyonel farklılaşması sonucu, hücre esasına dayanan immün olaylarda yer alan regülatör (T helper ve T süpresor) lenfositlerle, efektör (geç aşırı duyarlılık ve sitotoksik etki yapan) T lenfositleri ayrılabilir. İmmün denge için CD4/CD8 (endüktör-helper/sitotoksik-supresor) oranı büyük önem taşır. Çünkü bu hücreler birbirlerinin fonksiyonlarını negatif feed-backlerle kontrol ederek immün cevabın optimal düzeyde sürdürülmesini sağlarlar. Sayı ve etkinlikleri arasında nerede bir dengesizlik varsa orada hücresel bağışıklık mekanizmaları büyük ölçüde bozulmuştur¹⁹.

2.5.2. B Lenfositler

B hücre öncülleri embriyogenez sırasında ilk kez fetal karaciğerde görülürken erişkin yaşam sırasında ana yerleşimleri olan kemik iliğine göç ederler. B hücrelerinin olgunlaşması iki evrede cereyan eder. Antijen bağımsız evrede kök hücrelerinden pre-B hücreleri ve B hücreleri oluşurken; antijene bağımlı evre, antijenin B hücreleriyle daha sonraki etkileşiminden doğan hücreleri, yani etkinleşmiş B hücreleri ve plazma hücrelerinden oluşur²⁰. Antijen bağımsız evrede, Pre-B lenfositlerinde henüz yüzey immunglobulinleri ile hafif zincirler bulunmaz ise de sitoplazmalarında ağır zincirleri vardır. Sonra hücre yüzeyinde IgM moleküllerinin ortaya çıkması ile olgunlaşmamış B-Hücresi, bunu takiben, IgD moleküllerinin de belirmesi ile olgunlaşmış B-Hücresi meydana gelir¹⁹.

B hücreleri dolaşıma tekrar tekrar giren küçük lenfosit havuzunun %30'unu oluşturur ve bunların yaşam süresi kısa, yani günler veya haftalardır. Hergün yaklaşık 10^9 B hücresi üretilir. Lenf düğümleri içinde bunlar germinal merkezlere yerleşiktir, dalakta ise beyaz pulpada bulunurlar. Olgunlaşmış B hücreleri daha sonra mukozal immün sisteme (MALT) ait, Peyer plakları gibi barsakla ilişkili lenfoid doku (GALT), nazal lenfoid doku (NLT) , göze ait lenfoid doku (EALT), mezenterik lenf nodları, adenoid ve tonsiller bölgelere göç ederler^{20,48}.

B-Hücrelerinin yüzeylerinde antijen reseptörü gibi çalışan immunglobulinlerden başka, IgG'nin Fc parçası, kompleman, bazı virüsler, bazı hormonlar ve mitojenler için

spesifik reseptörler ile T-Hücre, makrofaj faktörleri, sitokinler için reseptörler, sınıf I ve sınıf II MHC molekülleri ve B-Hücrelerinin diğer özel antijenleri yer alır. CD19, CD 20 ve CD22 insan B hücrelerinde bulunan temel belirteçlerdir^{17,19,20}.

B-Hücreleri iki ana işleve sahiptir. Antijenik bir uyarı aldıkları zaman, aktive T-Hücreleri ve makrofajlardan salınan çoğalma ve farklılaşma faktörlerinin (interlökinler ve interferon) etkisi ile antikor üreten plazma hücrelerine dönerler. Ayrıca antijen sunan hücre (APC) olarak da fonksiyon gösterebilirler²¹.

B hücrelerinin antikor üretmek üzere etkinleştirilmesi için, önce antijenin B hücrenin kendisi veya başka bir antijen sunan hücre tarafından sınıf II MHC ile eşlenik halde T hücrelerine sunulması, T hücre antijen reseptörü tarafından tanınması ve daha sonra T helper lenfositler tarafından B hücrelerinin üreme ve farklılaşmasını uyuracak IL-4 ve IL-5 üretilmesi gerekir. Dahası T ve B hücrelerinin yüzey proteinleri arasında iki etkileşim daha gereklidir. T hücre üzerindeki CD28'in B hücre üzerindeki B7 ile etkileşmesi zorunludur. T hücre üzerindeki CD40L'nin ise B hücre üzerindeki CD40 ile etkileşmesi zorunludur. Burada, T hücrenin IL-2 üretmesi için CD28-B7 etkileşmesi gerekirken Ig M'den diğer IG sınıflarına anahtar çevriminin görülmesi için CD40L-CD40 etkileşimi gereklidir. Sonuçta, belirli bir antijen için özgül büyük miktarda immunoglobulin üretecek çok sayıda plazma hücresi oluşur²⁰.

2.5.2.1. Plazma Hücre

Bu hücreler uyaran antijene özgü immunoglobulin sentezleyen hücrelerdir. İmmünolojik olarak yanıt verebilen her B hücre, bir antijen ile tepkime verebilen bir yüzey reseptörüne (IgM veya IgD) sahiptir ve B lenfosit havuzundaki miktar yani 10^7 kadar farklı bir özgüllük söz konusudur. Bir antijen yüzey reseptörüne en iyi uyduğu B lenfosit ile etkileşir. Antijen bağlandıktan sonra, B hücre üreme yönünden uyarılır ve bir hücre topluluğu oluşur. Bu seçilmiş B hücreleri kısa süre sonra plazma hücreleri halini alarak antijen için özgül olan antikor salgılamaya başlarlar. Plazma hücreleri, seçilmiş B hücrelerinin taşıdığı ile birebir aynı, aynı antijenik özgüllük gösteren immunoglobulinler üretir²⁰.

2.5.2.2. Bellek Hücresi

Plazma hücrelerine farklılaşmayan etkinleşmiş bir grup B-Hücresi özgün antijenik uyarıyı tanıyıp saklayan bellek hücrelerine dönüşürler. Bunlar istirahat halinde kalırlar ve aynı antijen ile yeniden karşılaştıklarında hızla etkinleşme yeteneğine sahip olup süratle çoğalarak immün cevabın daha çabuk oluşmasını sağlar. Bellek T hücreleri, bellek B hücreleri tarafından yapılan antikor üretimini şiddetlendiren interlökinler salgılar. Bu hücreler IgM ve IgD'den başka yüzeylerinde IgG ve IgA da taşırlar^{19,20}.

2.5.3. Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer)

NK hücreleri, bazı T hücre belirteçleri taşıyan lenfositler olmakla birlikte bunların olgunlaşma için timustan geçme zorunlulukları yoktur. İmmünolojik bellekleri yoktur ve T hücre reseptörleri taşımazlar. Bu hücrelerin çoğu çeşitli sitoplazmik granüller içeren büyük lenfositler olup, mononükleer hücrelerin %5-10'unu oluştururlar. NK hücrelerde bulunan temel CD molekülleri CD 16 ve CD 56'dır¹⁷.

Bu hücreler, doğal immünitinin bir komponenti olarak yabancı hücreleri önceden tanıyıp sensitize olmalarına veya MHC proteinleri ile birlikte sunumuna gerek bulunmaksızın çeşitli tümör veya enfekte hücelere, sitotoksinler (perforinler ve granzimler) vasıtası ile doğrudan saldırıp yok ederler. Ayrıca Fas-Fas ligand aracılı apoptoza katılmak üzere de uzmanlaşmışlardır. Etkinlikleri için daha önceden virüsle karşılaşmaya gerek olmaması, verdikleri tepkinin virüsle karşılaşma ile şiddetlenmemesi ve herhangi bir virüs için özgül olmayışlarından ötürü bunlara doğal öldürücü hücreler adı verilmiştir. Bu hücreler herhangi bir antikor olmaksızın öldürebilirse de antikor varlığı bunların etkinliğini artırır ve antikor bağımlı hücrel toksisite (ADCC) adı verilen bu olayda enfekte hücrenin yüzeyine bağlı antikor, NK hücrelerin yüzeyinde bulunan IgG için Fc reseptörü tarafından tanınır ve enfekte hücre öldürülür. IL12 ve IFN γ NK hücrelerin güçlü etkinleştiricisidir^{20,21}.

2.6. Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC)

Kanlarında beyaz hücrelerin olduğu tüm canlılardaki hücrelerde, bunları tanımlamaya yarayan ve hücre yüzeyinde yer alan birtakım glikoprotein yapıları izlenmektedir ve bunlar “Major Histokompatibilite Antijenleri” (doku uygunluk antijenleri) olarak adlandırılmaktadır. İnsanlardaki MHC proteinleri ise “İnsan Lökosit

Antijeni“ (HLA) olarak anılmaktadır. Bunlar tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücre zarının lipid tabakasında serbestçe hareket edebilen ve çeşitli immünolojik işlevlere doğrudan katılmak yolu ile iş gören homolog antijenlerdir^{21,49}.

Major histokompatibilite antijenleri, insanda 6. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan bir grup gen tarafından kontrol edilirler. Bu gen kompleksine Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC) denmektedir. MHC, sınıf I, sınıf II, sınıf III olmak üzere, yapı ve fonksiyonları bakımından farklı üç grupta incelenir. İlk üç gen sınıf I MHC kompleksini oluşturmak üzere HLA A, HLA B, HLA C olarak bilinirken, ikinci üç gen lokusu sınıf II MHC kompleksini oluşturmak üzere HLA D gen bölgesi olarak bilinir ve HLA DR, HLA DP ve HLA DQ olarak adlandırılır^{19,21,50}. Bunların yanı sıra III. sınıf MHC antijenleri ve bazı minör MHC antijenleri de tanımlanmıştır. Sınıf I ve sınıf II arasında kompleman sisteminin bazı komponentlerini kodlayan sınıf III MHC alanı bulunmaktadır⁶. Sınıf I antijenler sınıf II'den daha yaygın eksprese edilirler. Sınıf I HLA molekülleri hemen tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde yer alırken, sınıf II HLA molekülleri özellikle immün sistemde aktif olarak yer alan ve antijen sunan hücre (APC) özelliği taşıyan makrofaj ve B lenfosit gibi hücrelerin zarlarında yer almaktadır^{21,49}.

HLA antijenleri, özellikle greft reddi reaksiyonunun temelini oluşturdukları için klinik olarak önem taşımakta olup her bireyin farklı HLA fenotipi bulunmaktadır. Her lokusta 2 allel gen bulunur ve allel genlerin çeşitliliğine bağlı olarak pek çok HLA fenotipi mümkündür²¹. MHC, her lokus için alternatif genlerin çok sayıda olmasından dolayı çok polimorfik bir yapıya sahiptir. HLA sınıf I ve sınıf II antijenlerini kodlayan 100 kadar allel gen belirlenmiştir. Ancak türün her üyesinde bu allellerden ikiden fazlası için genetik bilgi bulunmadığından, bu lokus için ayrılmış diğer bütün alleller kişiye yabancıdır. Allelerin bu lokuslara dağılım şansları sonuç itibarı ile kişinin histokompatibilite mozağini tayin eder. Ancak HLA yüzey molekülleri klonal olarak değişkenlik göstermezler. Yani herhangi bir kişide, aynı tür hücreler aynı HLA antijenlerini taşırlar¹⁹.

HLA antijenleri organizmada yaşamsal önemde biyolojik fonksiyonlar yaparlar. MHC içindeki tüm lokusların görevi, immün cevapları regüle etmektir. T Hücrelerinin antijenleri tanınması bu moleküller aracılığı ile olur. Bir yabancı antijen, hücre yüzeyinde HLA sınıf II molekülleri ile birleşmedikçe immün cevap için T-Helper hücrelerini

uyaramaz. Yine bir yabancı antijen HLA sınıf I molekülleri ile birleşmedikçe de T-Sitotoksik hücreleri tarafından tanınmaz ve hedef hücreye karşı sitolitik tepki gerçekleşmez⁴⁹.

Özellik	MHC sınıf II yolu	MHC sınıf I yolu
Dayanıklı MHC-peptid kompleksi birleşimi		
ASH tipleri	Dendritik hücre, fagositler, B hücre, endotel, timik epitel	Tüm çekirdekli hücreler
Yanıtı hücre	CD4+ yardımcı T	CD8+ sitotoksik T
Proteinlerin kaynağı	Endozomal proteinler	Sitosolik proteinler
Peptit hazırlayan enzimler	Endozomal proteazlar	Sitosolik enzim kompleksi
MHC yükleme yeri	Endozomal vesikül	Endoplazmik retikulum
Eşlikçi/yardımcı moleküller	Değişmez zincir, DM	TAP

Şekil 6. MHC Sınıf I ve MHC Sınıf II ‘nin Özellikleri

HLA sistemi ile hastalıklar arasında bağlantılar 4 temel hipotezle açıklanmaktadır. Bunlardan bir tanesi HLA’ların yalnızca özgül bir takım etiyolojik ajanları veya enfeksiyöz ajanları sunan moleküler olmasıdır. Bu nedenle yalnızca belli HLA yapısına sahip insanlar bu hastalıklara maruz kalabilmektedir. HLA yapısı genetik özelliklerle de yakından ilişkili olduğundan hem genetik özellikler, hem çevre koşulları, hem de dışarıdan alınan bazı tetikleyici etkenler hastalık gelişiminde rol oynamaktadır. Bir diğer teoriye göre ise bir bakteriyel antijen ile HLA molekülünün bir parçası arasında moleküler benzerlik olduğu ve moleküler taklidin çapraz yanıtı yol açması yolu ile otoimmün hastalıkların ortaya çıktığıdır. Üçüncü teori ise T hücre antijen

reseptörünün esas duyarlılık noktası olduğudur. Özgün T hücre reseptörü, gene özgün bir HLA kullandığına göre HLA ve T hücre antijen reseptör çeşitliliği arasında kuvvetli bir ilişki olmalıdır. Dördüncü teori de bu çapraz yanıt olasılıklarını göz ardı ederek belli HLA genetik yapısına sahip olan bireylerde bağışık yanıtın daha alevli bir şekilde seyrettiği öngörüsüne dayalıdır^{20,49,50}.

Sonuç olarak bazı HLA antijenlerinin ekspresyonu birtakım immünolojik hastalıkların ortaya çıkmasına genetik yatkınlık oluşturmaktadır. Buna karşılık bu hastalıklarda tam bir genetik geçişin gösterilememesi, ailelerde izlenen sıklığın beklenenden daha düşük olması ve göçlerle değişen çevrelerde hastalık sıklığının beklenenden daha değişik olması patogeneizde genetik yatkınlığın yanı sıra bazı çevresel etkenlerin de rol oynadığının düşündürmektedir. Birtakım HLA yapılarının hastaları ya dışarıdan gelen bazı tetikleyici enfeksiyon etkenlerine karşı duyarlı hale getirdiği, ya enflamatuvar yanıtı oluşturmak üzere birtakım sitokinlerin salınımını kolaylaştırdığı, ya da bazı antijenlere karşı yanıtı kolaylaştırdığı düşünülmektedir^{49,51}.

2.7. Sitokinler

Bağışık ve bağışık olmayan çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen ve salgılanan polipeptidler olan sitokinler, hücreler arası ilişkileri, bağışık yanıt ve enflamatuvar olayları düzenleyen bağışıklık düzenleyici sinyal proteinleridir. 100'den fazla sitokin tanımlanmıştır^{52,53,54,55}.

En önemli sitokin üreten hücreler, Th lenfositler ve makrofajlardır. Sitokinler, doğal ve kazanılmış bağışıklığın aktivasyon ve efektör fazında üretilerek bağışıklık ve inflamatuvar yanıtların oluşmasını ve düzenlenmesini sağlarlar^{53,57,58,59}.

Genellikle uyarılan hücreler tarafından salınırlar. Bir sitokin farklı hücreler tarafından üretilir. Bir sitokin diğer bazı sitokinlerin sentezini arttırabilir veya azaltabilir. Sitokin sentez ve salınımı kısa süreli, kendini sınırlayan bir olaydır. Yarı ömürleri kısadır. Sitokinler öncül moleküller olarak depolanmazlar ve sentezleri yeni gen transkripsiyonu ile başlatılır. Etkilerini hedef hücredeki özgül algaçlara bağlanarak yaparlar. Sitokin algaçları transmembran proteinleridir. Hücre dışı kısım sitokini bağlar, hücre içi kısım ise sinyal iletimini sağlar^{52,53,54,55,56}.

Sitokinler genellikle diğer sitokinlerin fonksiyonlarını etkilerler. İki sitokin birbirini antagonize eder veya aditif etki gösterebilir. Ya da bazı durumlarda sinerjik

etki gösterebilirler. Bir sitokin birçok farklı hücre tipine etki edebilir (pleiotropi). Yani aynı sitokin birden fazla etkisi olabilir^{53,54,55,56,57}.

Sitokinler, hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran algaçlarına bağlanarak etkilerini başlatırlar. Sitokin etki yeri sitokini salgılayan hücrenin kendisi (otokrin etki), çevresindeki hücreler (parakrin etki) ya da dolaşıma salınan sitokinler tarafından uyarılan uzaktaki bir hücre olabilir (endokrin etki). Sitokinler, etkilerini genelde lokal olarak gösterirler^{52,54,55,58}.

Fonksiyonlarına göre sitokinler 4 gruba ayrılabilir:

1. Doğal bağışıklığa aracılık eden sitokinler: TNF, IL-1, IL-6, TipI interferonlar.
2. Lenfosit aktivasyonu, proliferasyon ve diferansiasyonunu düzenleyen sitokinler: IL-2, IL-4, transforming büyüme faktörü-beta (TGF- β).
3. Bağışıklık aracılı enflamasyonu düzenleyen sitokinler: IL-5, IL-10, IL-12, interferon gama (IFN- γ).
4. Hematopoezi uyaranlar: IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF), monosit-makrofaj koloni stimulan faktör (M-CSF), granülosit koloni stimulan faktör (G-CSF).

Sitokinler, proinflamatuvar (IL-1, IL-6, TNF- α) ve antiinflamatuvar sitokinler (IL-4, IL-10, IL-13) olarak da ayrılabilir.

Th1 lenfositler TNF- α , IFN- γ , IL-2 ve IL-12'yi; Th2 lenfositler IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13'ü; Treg hücreler ise TGF- β salgılayarak Th17 hücreler IL-17 salgılayarak etkilerini gösterirler^{52,55,56,58,60,61}.

2.8. Akım Sitometrisi (Flow Cytometry)

Akım sitometrisi, bir sıvı akımı içerisinde hareket eden hücreleri büyüklüğüne ve granülaritesine bağlı olarak tek hücre seviyesinde araştırma imkanı sağlar. Akım sitometrisinde birçok teknik bir arada kullanılır. Akım sitometrisi sistemi, bilgisayar teknolojisi, optik, hidrodinamik odaklama ve elektronik alandaki teknik gelişmeler, monoklonal antikorların üretimi, sitokimyasal boyamalar ve florokrom kimyasındaki gelişmelerin birarada uygulanması ile ortaya çıkmıştır. Akım sitometrisi; süspansiyon halindeki hücrelerde yüzey ve hücre içi belirteçlerinin tipi ve miktarının belirlenmesi, B lenfositleri ile T lenfosit subgruplarının tayini, lösemi ve lenfoma tiplendirmesi, DNA ve RNA içeriği, fagositoz, otoantikor tayini ve kromozom analizi gibi birçok konuda

kullanılmaktadır. Akım sitometrisi ile hücreler teker teker incelenir ve hücrelerin fiziksel ve biyolojik özelliklerinin kantitatif ölçümleri yapılır. Hücrelerin çok sayıda parametresi arka arkaya ölçülebilir ve hücre subgrupları birbirlerinden ayırt edilebilir. Akım sitometride analizler periferik kan, kemik iliği aspirat ve biyopsileri, serozal sıvılar, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveolar lavaj sıvısı, deri, mukoza ve kitlelerden alınan biyopsi örnekleri üzerinde yapılabilir^{62,63,64,65,66,67}.

Akım sitometrisinin klinikteki önemi şöyle özetlenebilir:

1. Çok sayıda hücreyi hızla sayabilme özelliği vardır.
2. Çok az sayıdaki neoplastik hücreyi geniş bir hücre grubu içerisinde saptama imkanı sağlar.
3. Sorting (ayırma) mekanizması hücre subgruplarının ayırma ve heterojen hücre gruplarının saflaştırılmasına imkan sağlar.
4. Apoptozisin saptanmasında, floresan in-situ hibridizasyon (FISH) tekniği ve tümör kinetiğinin saptanmasında da akım sitometrisi kullanılmaktadır⁶².

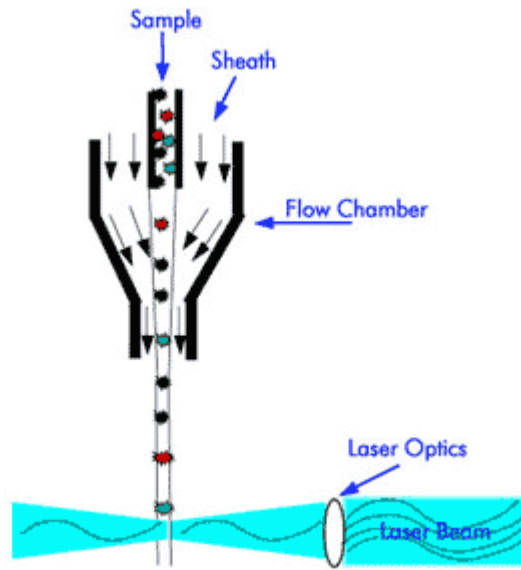
2.8.1. Akım Sitometrisi ile Hücrelerin Analizi

Akım sitometrisi analizinde ana kural, örnekteki hücrelerin süspansiyon haline getirilmesi ve monoklonal antikorlarla işaretlenmesidir. Hücreler; saf olarak elde edildikten sonra bir veya daha fazla floresan bağlı monoklonal antikor veya diğer kromoforlar ile konjuge edilir. Bu floresan bağlı monoklonal antikorlara veya kromoforlara prob denir. Problar genellikle yüzey antijenine veya hücre içi elemanlara özgüdür. Hastalığın ön teşhisine göre o hastalığa ilişkin problemler kullanılır^{62,63,64,65}.

Direkt ve indirekt metodlar olmak üzere iki farklı immünfloresan işaretleme tekniği kullanılır. Direkt metodda antikorla konjuge olmuş florokrom madde [fluorescein isothiocyanate(FITC), rhodamin, phycoerythrin(PE)...vb.] kullanılır. İndirekt metoda ise süspansiyon halindeki hücrelere ilkin işaretsiz monoklonal antikor bağlanır, bu antikorlara da işaretli monoklonal antikor bağlanır. Direkt metodda kullanılan antikorun monospesifik olması nedeniyle nonspesifik bağlanma ihmal edilecek kadar azdır. Ancak çok düşük dansiteye sahip yüzey antijenlerinin gösterilememesi bir dezavantajdır. İndirekt metodun avantajı çok düşük dansiteye sahip yüzey antijenlerini gösterebiliyor olmasıdır. Fakat nonspesifik bağlanma daha sık görülmektedir^{62,63,64,65}.

2.8.2. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (sheath fluid), lazer kaynağı, sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik sinyal ve elektrik sinyali), bilgisayar (data toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) ve ayırma mekanizması (cell sorting) olmak üzere pek çok sistemin birleşmesinden oluşur.



Sekil 7. Şematik olarak akım sitometrisi analizi

Süspansiyon halindeki işaretli hücreler belirli bir hava basıncı ile akış sistem içinden geçirilir ve hücreler akış kabinine gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek bir sıra halinde geçişini sağlar ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Hücreye bağlı florokrom, lazer ışığı ile aktiflenir ve bu enerjiyle ışın yayar. Bu yayılan ışının yoğunluğuna göre hücre boyutu, içyapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi edinilir^{62,63,64,65}.

3-BİREY VE YÖNTEM

Eylül 2010 ve Aralık 2010 tarihleri arasında, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalına kontrol amaçlı gelen ve Adana ilinde ikamet eden 0-18 yaş arası, 48'i kız ve 52'si erkek olmak üzere toplam 100 sağlıklı çocuk çalışmamıza dahil edilmiştir.

Çalışmaya katılan 100 sağlıklı çocuk 4 yaş grubunda sınıflandırıldı. 1.grup; 0-4 yaş, 2.grup; 5-9 yaş, 3.grup; 10-14 yaş, 4.grup 15-18 yaş. TÜİK-ADNKS veri tabanının son güncel kayıtlarına göre 2009 yılı itibariyle Adana ilinin toplam nüfusu 2.062.226, çalışmada ele alınan 0-18 yaş arası çocukların toplam nüfusu ise toplam 757.213'dür.

3.1. Birey Seçimi ve Kan Örneklerinin Alınması

Enfeksiyon hastalıkları uzmanı tarafından kontrol edilen, son 4 hafta içerisinde enfeksiyon geçirmemiş, antibiyotik vb. ilaç kullanmamış, 5-18 yaş aralığında olup son 6 ay içerisinde aşılama yapılmamış sağlıklı çocuklar seçilerek ve ebeveynlerinden gerekli izinler alınarak çalışmaya katılmışlardır. Ayrıca yaş aralığı 0-4 olan 25 çocukta aşı takvimi uygulaması nedeniyle aşılamaları yapıldığından, bu grupta son 6 ayda aşılama yapılmamış olması şartı aranmamıştır⁶⁸.

Çalışma şartlarına uygun çocuklardan, ethylenediaminetetraacetic acid içeren, antikoagulanlı K₃ EDTA tüplerine 2 ml periferik venöz kan alındı. K₃ EDTA tüpleri, kan hücre yapısının bozulmadan kalmasını sağlayan ve trombositlerin kümeleşmesini engelleyen özelliktedir. Alınan her kan örneği aynı gün içerisinde Ç.Ü.T.F.B.H. Merkez Laboratuvarında tam kan sayımları ve lenfosit subgruplarının ölçümleri yapılmak üzere işleme alınmıştır.

3.2. Tam Kan Sayımı

K₃ EDTA'lı tüplerde muhafaza edilen örneklerin tam kan sayımları, LH-750 Analyzer (Beckman Coulter) cihazında yapılmıştır. Cihaz beyaz kan hücresi, kırmızı kan hücresi ve plateletleri elektrik empedans metoduna göre sayar. Bu metot esas olarak aparatürden geçen bir partikülün cihazın üzerindeki elektrik değişimlerinin

ölçülmesidir. Cihaz hücreleri çeşitlerine göre sınıflandırır ve tek tek sayar, bu sırada oluşan elektriksel empedans direkt olarak hücrenin büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Cihaz bizim mikroskop altında gördüğümüzden daha fazla hücre sayar ve doğruluğu arttırırken statik hataları azaltır.

Cihaz, kullanıma hazırlanmadan önce günlük kontrolleri yapılmıştır ve çalışmamız süresince, cihazın kurulumunda yapılmış olan ve 6 aylık periyotlarla tekrarlanan kalibrasyon ayarlarında herhangi bir problem ile karşılaşılmamıştır.

3.3. Akım Sitometrisi Analizi (Flow Cytometry)

K₃ EDTA'lı tüplerde muhafaza edilen örneklerin akım sitometrisi analizleri, FACS Calibur Flow Cytometry (Becton Dickinson) cihazında yapılmıştır.

Çalışmada lenfositlerin immün fenotiplendirilmesinde fluoresan izotiyosiyanat (FITC) ve pikoeritrin (PE) boya ları kullanıldı. CD3 ve CD4 için FITC , CD16+56 , CD8 ve CD 19 için PE kullanılmıştır ayrıca CD3 FITC/CD16+56 PE ve CD4 FITC/CD8 PE birlikte ikili olarak çalışılmıştır. Çalışmada her örnek için kontrol kiti olarak ise γ_1 / γ_{2a} izotipik kontrolleri kullanılmıştır.

Cihazda kullanılan kitlerin kalibrasyonları talimatlara uygun şekilde iki haftalık periyotlarla ve cihazın kalibrasyonu 6 aylık periyotlarla tekrarlanmaktadır ve çalışmamız süresince herhangi bir problemle karşılaşılmamıştır.

3.3.1. Örnek İşlenmesi

Çalışmada CD3 FITC/CD16+56 PE, CD4 FITC/CD8 PE, CD19 PE ve γ_1 / γ_{2a} izotipik kontrolleri olmak üzere 4 ayrı kit kullanılmıştır. Her bir kit için 100µl kan 12x75mm'lik falcon tüpüne pipetlenir ve kullanılacak her kitten 20µl tüpe alınır^{69,70}.

3.3.2. Yüzey Boyama Prosedürü

Yüzey boyama için örnekler Lyse/Wash Assistant cihazına alınır ve sırasıyla şu aşamalardan geçer;

1. Örnekler vortekslenerek 15-30 dk karanlık ortamda ve oda ısısında inkübe edilir.
2. İnkübasyon sonrası yeniden vortekslenir, 1.5-2 ml lysing buffer eklenir.
3. Yeniden vortekslenir, 8-10 dk karanlık ortamda ve oda ısısında inkübe edilir.
4. 300g 'de 5 dk santrifüj edilir.

5. Süpernatant atılır pellet vortekslenir. 2 ml cell wash eklenir, yeniden vortekslenir.
6. 5. aşama tekrar edilir.
7. 350g 'de 5 dk santrifüj edilir.
8. Süpernatant atılır pellet vortekslenir. 500µl cell wash eklenir, yeniden vortekslenir^{69,70}.

3.3.3. FACS Calibur Flow Cytometry’de Sonuçların Okunması

Tüm örnekler FACS Calibur Flow Cytometry’de çalışıldı ve sonuçlar CellQuest Pro yazılımı ile analiz edildi. Sonuçlar forward scatter/side scatter yardımıyla oluşturulan lenfosit kapısındaki hücrelerin CD ile işaretli hücrelere oranları olarak hesaplandı ve yüzde olarak kaydedildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 18.0) programı yardımıyla tüm verilerin analizi yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu test edildi, normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin analizinde Independent Sample T Testi veya Tek Yönlü Varyans Analizi ile Post Hoc Testleri kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma, medyan, %95 referans aralığı (%2,5 ve %97,5 percentil) olarak ifade edildi. p değerinin $\leq 0,05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir^{71,72}.

4.BULGULAR

Çalışmamıza Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına kontrol amaçlı gelen ve Adana ilinde ikamet eden 0-18 yaş arası, 48'i kız ve 52'si erkek olmak üzere toplam 100 sağlıklı çocuk, Türkiye İstatistik Kurumunun son güncel verilerini içeren Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi Veri Tabanının 2009 yılı Adana ili, cinsiyete göre nüfus sayımı sonuçları dikkate alınarak dahil edilmiştir.

Çocuklardan alınan kan örneklerinin lökosit sayımları, lenfosit yüzde oranları ve lenfosit subgrup yüzde oranlarının tespiti Ç.Ü.T.F.B.H Merkez Laboratuvarında, istatistiksel analizleri ise Bioistatistik Anabilim Dalında yapılmıştır.

Genel populasyon ve çalışma populasyonunun cinsiyete göre yüzde dağılımları Tablo 1.'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Genel populasyon ve çalışma populasyonunun cinsiyete göre yüzde dağılımları.

CİNSİYET	GENEL POPULASYON % (0-18 YAŞ)	ÇALIŞMA POPULASYONU % (0-18 YAŞ)
KIZ	%48.7	%48
ERKEK	%51.3	%52

Çalışmaya dahil edilen toplam 100 çocuk, Türkiye İstatistik Kurumunun son güncel verilerini içeren Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi Veri Tabanının 2009 yılı il, yaş grubu ve cinsiyete göre nüfus sayımı sonuçları dikkate alınarak 4 yaş grubuna ayrılmıştır. Bu yaş gruplarının genel popülasyona uygun dağılımı Tablo 2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Genel populasyon ve çalışma populasyonunun çalışma gruplarına göre yüzde dağılımları.

YAŞ GRUPLARI	YAŞ ARALIĞI	GENEL POPULASYON %	ÇALIŞMA POPULASYONU %
Grup 1	0 - 4	% 24,70	% 25
Grup 2	5 – 9	% 24,30	% 25
Grup 3	10 – 14	% 25,80	% 25
Grup 4	15 - 18	% 25,20	% 25

Yine bu verilere uygun olarak 48 kız, 52 erkek çocuğun yaş gruplarının genel populusyona uygunluğu da Tablo 3.'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Genel populasyon ve çalışma populasyonunun her yaş grubunda cinsiyete göre dağılımları.

YAŞ GRUPLARI		GENEL POPULASYON %	ÇALIŞMA POPULASYONU %
0-4 YAŞ	KIZ	%12	%12
	ERKEK	%12.7	%13
5-9 YAŞ	KIZ	%11.8	%12
	ERKEK	%12.5	%13
10-14 YAŞ	KIZ	%12.6	%12
	ERKEK	%13.2	%13
15-18 YAŞ	KIZ	%12.3	%12
	ERKEK	%12.9	%13

Tablo 1., Tablo 2. ve Tablo 3.'de oluşturulan çalışma populusyonuna uygun sayıda kan örneklerinin lökosit sayımları, lenfosit yüzde oranları ve lenfosit subgrup yüzde oranlarının bulunmasından sonra istatistiksel analiz aşamasında Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 18.0) programından faydalanılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen sağlıklı 100 çocuğun total lökosit sayısının ve lenfosit yüzdesinin ortalama±standart sapma (mean±SD) değerleri Tablo 4.'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Toplam 100 sağlıklı çocukta total lökosit sayısı ve lenfosit yüzdesi.

KAN HÜCRELERİ	TOPLAM (n=100) ORTALAMA ± SD
Total Lökosit (hücre/μl)	7,943±2,232
Lenfosit Yüzdesi (%)	37.5±11.7

Çalışmaya dahil edilen 48 kız, 52 erkek sağlıklı çocuğun total lökosit sayılarının ve lenfosit yüzdelerinin ortalama±standart sapma (mean±SD) değerleri ve p değerleri Tablo 5.'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 48'i kız ve 52'si erkek sağlıklı çocukta total lökosit sayıları, lenfosit yüzdeleri ve p değerleri.

KAN HÜCRELERİ	KIZ (n=48) ORTALAMA ± SD	ERKEK (n=52) ORTALAMA ± SD	P Değeri
Total Lökosit (hücre/μl)	7,627±2,068	8,235±2,356	0.175
Lenfosit Yüzdesi (%)	38.2±12.5	36.9±11	0.571

*P değeri ≤ 0.05 ise anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 5.'de elde edilen p değerleri incelendiğinde total lökosit sayısı ve lenfosit yüzdesi için > 0.05 olduğu görülmektedir. p değerinin 0.05'ten büyük olması lökosit sayısının ve lenfosit yüzdesinin cinsiyet bakımından anlamlı farklar içermediğini göstermektedir.

Çalışmaya dahil edilen 4 ayrı yaş grubundaki 25'er sağlıklı çocuğun total lökosit sayılarının ve lenfosit yüzdelerinin ortalama±standart sapma (mean±SD) değerleri ve p değerleri Tablo 6.'da gösterilmiştir.

Tablo 6. 4 ayrı yaş grubundaki sağlıklı çocuklarda total lökosit sayıları, lenfosit yüzdeleri ve p değerleri.

KAN HÜCRELERİ	Grup 1 0-4 yaş (n=25) Ort. ± SD	Grup 2 5-9 yaş (n=25) Ort. ± SD	Grup 3 10-14 yaş (n=25) Ort. ± SD	Grup 4 15-18 yaş (n=25) Ort. ± SD	P değeri
Total Lökosit (hücre/μl)	9,068±2,632	7,556±1,987	7,432±2,041	7,716±1,926	0.031*
Lenfosit Yüzdesi (%)	49.19±12.86	37.27±5.52	34.28±8.59	29.25±8.24	0.000*

*P değeri ≤ 0.05 ise anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 6.'da p değerleri incelendiğinde total lökosit sayısı ve lenfosit yüzdesi için ≤ 0.05 olduğu görülmektedir. p değerinin 0.05'ten küçük olması lökosit sayısının ve lenfosit yüzdesinin yaş grupları arasında anlamlı farklar içerdiğini göstermektedir.

Çalışmaya dahil edilen 100 kan örneğinin tek tek lökosit sayımları, lenfosit yüzde oranları ve lenfosit subgrup yüzde oranlarının bulunmasından sonra, Lenfosit Subgruplarının Absolute Değerlerinin (hücre/μl) hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Lenfosit Subgrup Absolute Değeri (hücre/μl)} = \frac{\text{Lökosit Sayısı} \times \text{Lenfosit Yüzdesi} \times \text{Lenfosit Subgrup Yüzdesi}}{10.000}$$

Çalışmaya dahil edilen 100 sağlıklı çocuğun lenfosit subgruplarının ortalama±standart sapma (mean±SD) , ortanca (median) ve %95'lik referans aralıklarını (2,5% - 97,5% percentile) gösteren Tablo 7. oluşturulmuştur.

Tablo 7. Toplam 100 sağlıklı çocukta lenfosit subgrup yüzdelерinin ve absolute değерlerinin ortalama±SD, ortanca ve %95'lik referans aralıkları.

LENFOSİT SUBGRUPLARI	ORTALAMA ± SD (MEAN ± SD)	ORTANCA (MEDIAN)	%95 REFERANS ARALIKLARI
CD 3 % Hücre/μl	69.4±4.9 2,064±981	70.0 1,744	58.3-77.9 979-5,016
CD 4 % Hücre/μl	40.5±4.9 1,207±629	40.0 1,021	32.0-51.1 655-3,497
CD 8 % Hücre/μl	27.8±4.7 831±411	28.1 707	19.7-36.9 342-1,995
CD 19 % Hücre/μl	14.6±4.3 445±274	13.7 360	5.8-26.5 121-1,330
CD 56 % Hücre/μl	10.3±3.2 294±137	10.4 260	4.0-16.5 111-689
CD 4 / CD 8	1.51±0.36	1.42	1.00-2.30

Çalışmaya dahil edilen sağlıklı 48 kız ve sağlıklı 52 erkek çocuğun lenfosit subgruplarının ortalama±standart sapma (mean±SD), ortanca (median) ve %95'lik referans aralıklarını (2,5% - 97,5% percentile) gösteren Tablo 8. oluşturulmuştur.

Tablo 8. 48'i kız ve 52'si erkek sağlıklı çocukta lenfosit subgrup yüzdelerinin ve absolute değerlerinin ortalama±SD, %95'lik referans aralıkları ve p değerleri.

LENFOSİT SUBGRUPLARI	ERKEK (n=52)		KIZ (n=48)		p değeri
	ORTALAMA ± SD	%95 REFERANS ARALIKLARI	ORTALAMA ± SD	%95 REFERANS ARALIKLARI	
CD 3 % Hücre/µl	69.3±5.3 2,103±992	57.9-79.2 992-5,299	69.5±4.5 2,022±978	57.6-77.6 956-4,950	0.880 0.683
CD 4 % Hücre/µl	40.6±4.7 1,229±622	29.4-52.7 651-3,610	40.5±5.2 1,183±642	32.0-50.8 605-3,452	0.875 0.718
CD 8 % Hücre/µl	28.1±4.6 852±425	18.4-36.9 337-2,426	27.7±4.3 808±398	20.3-37.0 312-2,026	0.661 0.598
CD 19 % Hücre/µl	15.1±4.7 467±277	4.8-27.2 113-1,267	14.0±3.7 421±271	8.1-27.0 120-1,423	0.213 0.406
CD 56 % Hücre/µl	10.4±3.2 306±153	3.2-16.6 96-792	10.2±3.3 281±117	4.1-16.5 108-583	0.784 0.361
CD 4 / CD 8	1.50±0.34	1.00-2.30	1.52±0.38	0.90-2.30	0.843

*P değeri ≤ 0.05 ise anlamlı kabul edilmiştir.

Normal dağılıma uyan CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 lenfosit subgrup parametrelerinin ve CD4/CD8 oranın kız ve erkek çocuklarda ortalama±standart sapma ve %95'lik referans aralıklarını (2,5% - 97,5% percentile) gösteren Tablo 8.'de p değerleri incelendiğinde, lenfosit subgrup yüzde oranlarına ve absolute (hücre/µl) lenfosit subgrup sayılarına ait değerlerin tümünün > 0.05 olduğu ve cinsiyet grupları arasında anlamlı farklar içermediği belirlenmiştir.

Tablo 9. 4 ayrı yaş grubundaki sağlıklı çocuklarda lenfosit subgrup yüzdelерinin ve absolute değеrlerinin ortalama±SD, %95’lik referans aralıkları ve p değеrleri.

LENFOSİT SUBGRUPLARI	<u>Grup 1</u> <u>0-4 yaş</u> (n=25)		<u>Grup 2</u> <u>5-9 yaş</u> (n=25)		<u>Grup 3</u> <u>10-14 yaş</u> (n=25)		<u>Grup 4</u> <u>15-18 yaş</u> (n=25)		P değeri
	Ort. ± SD	%95 referans aralıkları	Ort. ± SD	%95 referans aralıkları	Ort. ± SD	%95 referans aralıkları	Ort. ± SD	%95 referans aralıkları	
CD 3%	69.9±4.4	60.1-77.0	69.1±5.6	57.0-79.8	69.0±4.3	59.3-77.9	69.5±5.5	57.2-77.8	0.930
Hücre/µl	3,113±1,260	1,695-5,403	1,932±570	1,287-3,363	1,702±526	1,121-3,311	1,510±398	948-2,528	0.000*
CD 4%	41.4±6.2	27.9-53.4	38.0±3.5	32.0-45.0	38.7±3.5	32.0-46.0	44.0±3.6	37.5-51.2	0.000*
Hücre/µl	1,877±898	846-3,659	1,059±300	669-1,798	942±230	681-1,530	949±223	587-1,568	0.000*
CD 8%	26.6±4.6	18.0-36.8	29.6±3.7	20.1-36.0	28.2±4.6	21.0-36.5	27.4±4.6	21.0-37.2	0.102
Hücre/µl	1,193±556	493-2,669	835±241	463-1,272	707±289	372-1,621	599±193	294-1,002	0.000*
CD 19%	16.4±5.7	6.2-28.0	15.0±3.8	5.3-21.9	13.7±4.0	4.5-22.2	13.4±2.8	8.0-19.2	0.050*
Hücre/µl	729±359	155-1,435	427±186	100-925	331±122	142-557	291±91	119-446	0.000*
CD 56%	8.9±3.0	3.5-13.2	10.4±2.9	4.6-15.6	11.1±3.3	5.6-16.9	10.9±3.5	4.1-16.5	0.066
Hücre/µl	379±173	117-792	291±117	128-596	277±124	106-576	230±79	87-433	0.001*
CD 4/CD 8	1.61±0.41	1.00-2.34	1.33±0.26	1.00-1.85	1.43±0.34	0.89-2.18	1.66±0.33	1.09-2.30	0.003*

*P değeri ≤ 0.05 ise anlamlı kabul edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 4 ayrı yaş grubundaki 25’er sağlıklı çocuğun lenfosit subgruplarının anlamlı değеrleri±standart sapma (mean±SD) ve %95’lik referans aralıklarını (95% reference range) gösteren Tablo 9. oluşturulmuştur.

Normal dağılıma uyan CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 lenfosit subgrup parametrelerinin ve CD4/CD8 oranının önceden belirlediğimiz 4 ayrı yaş grubundaki çocuklarda ortalama±standart sapma ve %95’lik referans aralıkları gösteren Tablo 6.’da p değеrleri incelendiğinde lenfosit subgrup parametrelerinden CD4 ‘ün ve CD19’ un

ayrıca CD4/CD8 oranının $p \leq 0.05$ olduğu görülmektedir. p değerinin ≤ 0.05 olması yaş grupları bakımından CD4 ve CD19 lenfosit subgrup yüzdeleri ve CD4/CD8 oranı açısından anlamlı farklar içerdiğini gösterir. Yapılan istatistiksel analizlerle CD4 parametresinde belirlenen anlamlı farkın, Grup 4 'ün Grup 2 ve Grup 3 ile olan ilişkisinden kaynaklandığı belirlenmiştir. CD19 parametresinde belirlenen anlamlı farkın Grup 1 ve Grup 2'nin Grup 3 ve Grup 4 ile olan ilişkisinden kaynaklandığı belirlenmiştir. CD4/CD8 parametresinde belirlenen anlamlı farkın ise Grup 2'nin Grup 1 ve Grup 4 ile olan ilişkisinden kaynaklandığı belirlenmiştir.

5.TARTIŞMA

Çalışmada analizleri yapılan lökosit sayılarının, lenfosit yüzdelerinin ve lenfosit subgruplarının bölgemizdeki sağlıklı çocuklarda cinsiyet ve değişik yaş grupları ele alındığında ne gibi farklılıklar gösterebileceğinin anlaşılması ve referans aralıklarının belirlenmesi açısından, elde edilen bulgular cinsiyet ve yaş gruplarını gösteren tablolarda değerlendirildi.

Dünyada, hakkında çok fazla çalışma bulunmayan “sağlıklı bireylerin lenfosit subgruplarının referans aralıklarının belirlenmesi” konusunda bölgemizdeki tek çalışmada geçtiğimiz yıllarda, Yaman A. ve ark.’nın yaptığı çalışmadır. Sağlıklı yetişkinlerde lökosit sayılarının, lenfosit yüzdelerinin ve lenfosit subgruplarının analizlerini içeren çalışmada toplam lökosit sayısı $7,558 \pm 1,820$ bulunmuşken, bu çalışmada sağlıklı çocuklarda toplam lökosit sayısı $7,943 \pm 2,232$ olarak bulunmuştur. Cinsiyet farklılığı dikkate alındığında aynı çalışmada sağlıklı yetişkin kadınlarda toplam lökosit sayısı $7,367 \pm 1,747$ ve sağlıklı yetişkin erkeklerde toplam lökosit sayısı $7,732 \pm 1,874$ olarak yakın değerlerde bulunmuştur. Bu çalışmada ise sağlıklı kız çocuklarında toplam lökosit sayısının $7,627 \pm 2,068$ ve sağlıklı erkek çocuklarda toplam lökosit sayısının $8,235 \pm 2,356$ olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir⁶⁸.

Aynı çalışmaya göre; CD3 lenfosit subgrubu yüzdeleri açısından sağlıklı yetişkinlerde ortalama değer 72.7 ± 8.4 iken bu çalışmada sağlıklı çocuklarda ortalama değer daha düşük şekilde 69.4 ± 4.9 olarak belirlenmiştir. CD4 lenfosit subgrubu yüzdeleri açısından sağlıklı yetişkinlerde ortalama değer 47.4 ± 9.1 iken bu çalışmada sağlıklı çocuklarda ortalama değer daha düşük şekilde 40.5 ± 4.9 olarak belirlenmiştir. CD8 lenfosit subgrubu yüzdeleri açısından sağlıklı yetişkinlerde 29.0 ± 6.0 olan değer bu çalışmada sağlıklı çocuklarda daha düşük şekilde 27.8 ± 4.7 olarak belirlenmiştir. CD19 lenfosit subgrubu yüzdeleri açısından sağlıklı yetişkinlerde 11.0 ± 4.4 olan değer bizim çalışmamızda sağlıklı çocuklarda daha yüksek şekilde 14.6 ± 4.3 olarak belirlenmiştir. CD56 lenfosit subgrubu yüzdeleri açısından sağlıklı yetişkinlerde 7.0 ± 3.3 olan değer bizim çalışmamızda sağlıklı çocuklarda daha yüksek şekilde 10.3 ± 3.2 olarak belirlenmiştir. CD4/CD8 oranı açısından sağlıklı yetişkinler ve sağlıklı çocuklar

karşılaştırıldığında sağlıklı yetişkinlerde 1.68 ± 0.43 olan oran sağlıklı çocuklarda daha düşük şekilde 1.51 ± 0.36 olarak belirlenmiştir. Özet olarak bölgemizdeki sağlıklı çocuklara ait CD3, CD4, CD8 subgrup yüzdeleri ve CD4/CD8 değerlerinin bölgemizdeki sağlıklı yetişkinlere ait değerlerden daha düşük, CD19 ve CD56 subgrup yüzdeleri ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir⁶⁸.

Yine aynı çalışmada, bölgemizdeki sağlıklı yetişkinlerde CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 subgrup yüzdeleri ve CD4/CD8 değerlerinin hiçbirinin cinsiyet farkı dikkate alındığında 2 grup arasında anlamlı farklar içermediği görülmüştür. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde bölgemizdeki sağlıklı çocuklarda CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 subgrup yüzdeleri ve CD4/CD8 değerlerinin hiçbirinin cinsiyet farkı dikkate alındığında 2 grup arasında anlamlı farklar içermediği görülmüştür. Absolute değerler (hücre/ μ l) açısından bölgemizdeki sağlıklı yetişkin ve sağlıklı çocuk populasyonları incelendiğinde, iki çalışmada cinsiyetler dikkate alındığında anlamlı farklar ifade etmemektedir⁶⁸.

Ayrıca bu çalışmada, bölgemizdeki sağlıklı yetişkinler çeşitli yaş gruplarında sınıflandırılarak CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 subgrup yüzdeleri ve CD4/CD8 değerleri analiz edilmiş ve CD4, CD8, CD19, CD56 subgrup yüzdeleri ve CD4/CD8'in yaş grupları arasında anlamlı farklar içerdiği gösterilmiştir. Bölgemizdeki sağlıklı çocukları 4 ayrı yaş grubunda sınıflandırdığımız çalışmamızda da CD4, CD19 subgrup yüzdeleri ve CD4/CD8'in p değerleri açısından yaş grupları arasında anlamlı farklar içerdiği belirlenmiştir. Absolute değerler (hücre/ μ l) açısından bölgemizdeki sağlıklı yetişkin ve sağlıklı çocuk populasyonları incelendiğinde, yetişkinlerde CD8, CD56 subgrup yüzdeleri ile CD4/CD8'in, çocuklarda ise CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 subgrup yüzdelerinin ve CD4/CD8'in yaş grupları dikkate alındığında, anlamlı farklar içerdiği belirlenmiştir⁶⁸.

William T. Shearer ve ark.'nın ABD'de yaptıkları çalışma sonucunda 2003 yılında yayımlanan makalelerinde 0-18 yaş aralığındaki sağlıklı çocuklarda lenfosit subgruplarını incelediği ve CD4 lenfosit subgrubu yüzdesi haricinde CD3, CD8, CD19, CD56 lenfosit subgrup yüzdelerinin cinsiyet dikkate alındığında anlamlı bir fark içermediği görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise CD4 subgrubu yüzdesi de dahil tüm lenfosit subgrup yüzdelerinin cinsiyet dikkate alındığında anlamlı farklar içermediği görülmüştür⁷³.

Bu çalışma yaş grupları dikkate alınarak değerlendirildiğinde CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 lenfosit subgrup yüzdelерinin tümünde anlamlı farklar görölmekte iken bizim çalışmamızda CD4 ve CD19 lenfosit subgrup yüzdeleri ile CD4/CD8 oranının anlamlı farklar içerdiği belirlenmiştir⁷³.

0-18 yaş arası sağlıklı çocukları kapsayan iki çalışmada da CD4 subgrup yüzdeleri 0 ve 18'e yakın yaş gruplarında yüksek iken ara gruplarda düşüktür. CD19 subgrup yüzdeleri incelendiğinde ise iki çalışmada da benzer şekilde değerlerin yaş arttıkça düştüğü gözlenmektedir. CD19 subgrup yüzdesinin yaş arttıkça düştüğüne dair benzer sonuçlar İkincioğulları A. ve ark., Comas-Bitter ve ark., Yüksel FM ve ark., ve Katevas P. Ve ark.'nın yapmış olduğı diğer çalışmalarda da görölmektedir^{74,75,76,77}.

William T. Shearer ve ark.'nın bu çalışması ve bizim çalışmamızda absolute değerler (hücre/μl) açısından cinsiyet dikkate alındığında, iki çalışmada benzer şekilde tüm lenfosit subgruplarında anlamlı farklar içermediğı görölmektedir. Yaş grupları dikkate alındığında ise iki çalışmada yine benzer şekilde tüm gruplarda anlamlı farklar içermekte olduğı görölmektedir⁷¹.

Ülkemizde İkincioğulları A. ve ark. 1998-2000 yılları arasında yaptığı çalışmada yaş grupları açısından incelendiğinde, lenfosit subgrup yüzde ve absolute değerlerinin CD56 subgrup değerleri haricinde çalışmamıza benzer şekilde anlamlı farklar içerdiği görölmektedir⁷⁴.

Sağlıklı Malavililerde lenfosit subgrupları üzerine Wilson L. Mandala ve ark.'nın 2005 yılında yaptığı çalışmada, bizim bölgemizde yaptığimiz çalışma ile benzer şekilde, sağlıklı çocuklarda yaş artışı ile birlikte total lökosit sayısı, lenfosit yüzdeleri, absolute (hücre/μl) lenfosit subgrup değerleri ve CD19 lenfosit subgrup yüzdeleri azalmaktadır⁷⁸.

Ayrıca aynı çalışmada CD4/CD8 değerleri çocuk yaş gruplarında bizim çalışmamızla benzer şekilde yaş grupları arasında anlamlı farklılıklar göstermektedir⁷⁸.

Özet olarak; gerek sağlıklı yetişkinlerde, gerekse sağlıklı çocuklarda yapılmış olan çeşitli lenfosit subgruplarının referans aralıklarını belirlemeye yönelik çalışmalarda cinsiyetin, lenfosit subgruplarının yüzde ve absolute değerlerinin üzerinde önemli farklar barındırmadığı görölmektedir. Fakat bunun aksine sağlıklı yetişkin ve sağlıklı çocuklarda yaş grupları bakımından durum incelendiğinde lenfosit subgrup yüzde ve absolute değerlerinin önemli farklar içerebileceğı görölmektedir. Yaş grupları arasında

bu anlamlı farkların ortaya çıkması, yaş ile değişebilen lenfosit subgrup yüzde ve absolute değerlerinin referans aralıklarının yaş faktörü göz önüne alınarak belirlenmesinin önemini ortaya koymaktadır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 48'i kız 52'si erkek olmak üzere bölgemizdeki 100 sağlıklı çocuğa ait periferik kan örneklerinden lenfosit subgruplarının referans aralıkları belirlenmiştir. Değerlendirmeler ve istatistiksel analizler sonucunda;

1. Toplam 100 sağlıklı çocukta, total lökosit sayısı ve lenfosit yüzdesi sırasıyla $7,943 \pm 2,232$ ve 37.50 ± 11.67 olarak bulunmuştur.
2. 48'i kız ve 52'si erkek sağlıklı çocukta, total lökosit sayıları ve lenfosit yüzdeleri incelendiğinde cinsiyet bakımından anlamlı bir fark gözlenmemiştir.
3. 4 ayrı yaş grubundaki sağlıklı çocuklarda, total lökosit sayıları ve lenfosit yüzdeleri incelendiğinde yaş grubu farkı bakımından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.
4. Toplam 100 sağlıklı çocukta, lenfosit subgrup yüzdelерinin ve absolute değerlerinin ortalama $\pm$ SD, ortanca ve %95'lik referans aralıkları belirlenmiştir.
5. 48'i kız ve 52'si erkek sağlıklı çocukta, lenfosit subgrup yüzdelерinin ve absolute değerlerinin ortalama $\pm$ SD, %95'lik referans aralıkları ve p değerleri belirlenmiş ve cinsiyet bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir.
6. 4 ayrı yaş grubundaki sağlıklı çocuklarda, lenfosit subgrup yüzdelерinin ve absolute değerlerinin ortalama $\pm$ SD, %95'lik referans aralıkları ve p değerleri belirlenmiş ve CD4, CD19 parametreleri, CD4/CD8 oranı ve tüm absolute değerler arasında yaş grubu farkı bakımından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.
7. Bu çalışma sonucunda lösemi, lenfoma, HIV enfeksiyonları gibi ciddi hastalıklarla ilişkili bu konunun, bağışıklık sistemi ile ilgili dallarda hastaların takip ve tedavilerini yönlendirmede özellikle çocuk hematoloji kliniği hastalarına ciddi faydalar sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Abbas AK, Lichtman AH.** Temel immunoloji, immun sistemin işlev ve bozuklukları. Editorler: Y. Camcıoğlu, G. Deniz. *İstanbul Medikal Yayıncılık*, **2007**.
2. **Segal S, Hill A V S.** Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol* **2003**.
3. **Vosshenrich CAJ, Samson-Villeger SI, Di Santo JP.** Distinguish features of developing natural killer cells. *Current Opinion in Immunology*. **2005**; 17:151-8.
4. **Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN.** Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. **2004**; 53:176-86.
5. **Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA.** The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunol*. **2001**; 22(11):633.
6. **Ulutin ON.** Hematoloji. In: Unat EK, editor. Dünya'da ve Türkiye'de 1850 yılından sonra tıp dallarındaki ilerlemelerin tarihi. İstanbul: *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları* No: 4; **1988**.191-7.
7. **Metchnikoff, Elie .** *Immunity in Infective Diseases*. Cambridge University Press.**1905**.
8. **Kılıçturgay K.** *İmmünoloji* 2003. 3.Baskı, Bursa: Nobel&Güneş Tıp Kitabevleri Ltd.Şti., **2003**:1-7.
9. For Roux's Nobel claims, see Franz Lutteberger, "Excellence and Chance: The Nobel Prize Case of E. Von Behring and É. Roux," *Hist. Phil. Life Sci.*, 18 **1996**; 225-38.
10. **Snell GD.** Histocompatibility genes of the mouse. I. Demonstration of weak histocompatibility differences by immunization and controlled tumor dosage. *J Natl Cancer Inst* **1958**; 20:787-824.
11. **Dausset J.** The major histocompatibility complex in man: past, present, and future concepts. *Science* **1981**; 213:1469-74.
12. **Mitchell, G.F., and J.F.A.P. Miller.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **1968**; 59:296–303.
13. **Miller, J.F.A.P., and G.F. Mitchell.** J.Exp. Med. **1968**; 128:801–820.
14. **Isaacs A & Lindenmann J.** Virus interference. I. The interferon, Proc. Roy. Soc. London Set. B **1957**; 147:258-73.
15. **Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. J.** *Immun.* **1986**; 136, 2348–2357.
16. **Armstrong RA.** The immune system and the eye. *Ophtalmic Physiol Opt* **1998** Sep; 18 (2): 40-8.
17. **Roitt I, Brostoff J, Male D.** Immunology, 3. ed. London: Mosby, **1993**; 1.1-25.16.
18. **Turul T, Ersoy F.** Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni:TLR. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **2004**; 35:114-8.
19. **Kılıçturgay K.** İmmünolojiye giriş, 2.Baskı. Bursa: *Güneş Kitabevi*, **1991**; 1-150.

20. **Lewinson W, Jawetz E.** İmmünoloji. In: Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, 5. ed. Çeviri Editörü: İsmail H Dünder. İstanbul: *Barış Kitabevi/Appleton ve Lange*, **1998**; 327-400.
21. **Friedlaender MH.** Allergy and immunology of the eye, 2. ed. New York: *Raven Press*, **1993**; 1-325.
22. **Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ.** How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leuko Biol* **2003**;74:479-85.
23. **Janeway CA, Travers P, Walpot M, Schlomchik MJ.** Immunobiology, Sixth Edition, Garland Science, **2005**.
24. **Chaplin DD.** Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* **2003**; 111:442-59.
25. **Chaplin DD.** Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* **2006**; 117:430.
26. **Çetin ET.** İmmünoloji, 1. ed. İstanbul: *Bayda Yayınevi*, **1981**; 1-235.
27. **Peter J. Delves D. Ivan M.** The Immune System. N. Engl. J. Med. 2000; 343:37-49.
28. **Haynes BF. Fauci AS.** Introduction of the Immune System. In.: Braunwald E. Fauci AS. Kasper DL .(eds.) . Harrison's Principles of Internal Medicine. 15nd Ed. New York, Mc Graw-Hill, **2001**; 1805-1830.
29. **Kuby H.** Overview of the Immune system and cell and organs of the immune system. In Immunology. 3rd Ed. W.H. Freeman and Company, USA. **1997**: 1-83.
30. **Fike DJ.** Cells and tissues of the immune system. In: Sheehan C (ed.) Clinical Immunology Principles and Laboratory Diagnosis 2nd. Ed.Philadelphia : Lippincott -Raven Publishers , **1997**; 7-18.
31. **Knop E, Knop N.** The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat* **2005**; 206(3): 271-85.
32. **Punt JA, Singer A.** T cell development. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W (eds) . Clinical Immunology Principles and Practice 1nd Ed. St Louis, Mosby , **1997**; 157-176.
33. **Kindt TJ, Osborne BA.** Cell & Organs of the Immune System. In: Goldsby RA (ed.) . Kuby Immunology. 2nd Ed. New York. WH Freeman, **1994**; 162-256.
34. **Dalva K, Beksac M.** Mononükleer hücrelerin maturasyonu. Ustaçelebi Ş.(editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara : *Güneş Kitabevi* ,**1999**; 153-159.
35. **Kılıçturgay K.** Kan hücrelerinin gelişimi. İmmünoloji. Bursa. *Nobel & Güneş Kitabevi*. **2003**; 15-51.
36. **Imboden JB.** T Lymphocytes & Natural Killer Cells. In Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). Medical Immunology. 9nd Ed. California , Appleton & Lange , **1997**; 130-145.
37. **Robey E, Fowlkes BJ.** Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol*. **1994**;12:675-705.
38. **Anderson G, Hare KJ, Jenkinson EJ.** Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol Today*. **1999**; 20(10):463-8.

39. **Chinen J, Finkelman F, Shearer WT.** Advances in basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol.* **2006;** 118(2):489–95.
40. **Weiss A, Littman DR.** Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* **1994;** 76(2):263–74.
41. **Samelson LE, Donovan JA, Isakov N, Ota Y, Wange RL.** Signal transduction mediated by the T–cell antigen receptor. *Ann N Y Acad Sci.* **1995** Sep 7;766:157–72.
42. **Weiss A, Irving BA, Tan LK, Koretzky GA.**Signal transduction by the T cell antigen receptor. *Semin Immunol.* **1991;** 3(5):313–24.
43. **Aybay C.** Antijen tanınması, salgısal ve hücrel immün yanıt. Ustaçelebi Ş.(ed.). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara : *Güneş Kitabevi*, **1999;** 177–185.
44. **Romagnani S.** T–cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* **2000;** 85(1):9–18;
45. **Araslı M.** Lökosit yüzey molekülleri. Yılmaz MT. Deniz G.(editörler). Flow Cytometry ve Tıpta Kullanımı. İstanbul: Bilim Medya Grup. *Aktüel Tıp Dergisi*,**1999;** 21–32.
46. **Poppema S, Lai R, Visser L, Yan XJ.** CD45 (leucocyte common antigen) expression in T and B lymphocyte subsets. *Leuk Lymphoma.* **1996;** 20(3–4):217–22.
47. **Akpek EK, Gottsch JD.** Immune defense at the ocular surface. *Eye* **2003;** 17(8):949-56.
48. **Meek B, Speijer D.** The ocular humoral immune response in health and disease. *Prog Retin Eye Res* **2003** May; 22(3): 391-415.
49. **Akbatur HH, Şengün A.** Behçet Hastalığı, Endoftalmiler ve Üveitler, 1. ed. Ankara: *Atlas Kitabevi*, **2002;** 1-481.
50. **Yabuki K, Inoko H, Ohno S.** HLA testing in patients with uveitis. *Int Ophtalmol Clin* **2000** Spring; 40(2): 19-35.
51. **Rao NA.** Uveitis and other intraocular inflammations. In: Yanoff M, Duker JS, eds. *Ophthalmology*, 2. ed: Philadelphia: Mosby, **2004;** 1105-238.
52. **Bolaman Z, Müftüoğlu E, Bilgiç O, Ertan S.** İmmünoloji .Müftüoğlu E. Ed.).*İzmir, Saray Medikal Yayıncılık*;**1993;** 77–100.
53. **Oppenheim JJ, Ruscetti FW.** Cytokines. In; Parslaw TG, Stites OP, Terr AI, Imoden JB (eds). *Lange Medical Immunology*. 10nd Ed.New York: Lange Medical boks/Mc Graw Hill;**2001;** 148–167.
54. **Elgert KDA.** Immunology: Understanding the Immune System. New York: Wiley Liss, A Jhon Wiley & Sons Inc Publishing Company;**1996;** 199–217.
55. **Abbas AK, Lichtman AH, Rober JS** (Eds). Cytokines. Cellular And Molecular Immunology 3nd Ed. Philedelphia: WB Saunders Company: **1997;** 249–278.
56. **Sharon J.** Basic Immunology. Baltimore: Williams & Wilkins A Waverly Company; **1998;** 107–123.
57. **Erken E.** Sitokinler. *Aktüel Tıp Dergisi* **1998;** 3: 98–109.
58. **Bilgehan H.** Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. *İzmir. Barış Yayınları;* **1999;** 81–92.

59. **Vılcek, J.** The cytokines: an overview. The cytokines handbook. In: Thomson AW, Lotze MT (Eds). 4nd Ed. Elsevier Science Ltd. **2003**; 3–19.
60. **Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY.** TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **2005**; 201(7):1061–7.
61. **Bi Y, Liu G, Yang R.** Th17 cell induction and immune regulatory effects. *J Cell Physiol.* **2007**; 211(2):273–8.
62. **Bilgiç S.** Flow cytometry'nin çalışma mekanizması ve prensipleri. Yılmaz M.T. Deniz G.(editörler). Flow Cytometry ve Tıpta Kullanımı. İstanbul. Bilim Medya Grup. *Aktüel Tıp Dergisi*, **1999**; 1–9.
63. **McCoy JP,** Basic principles in clinical flow cytometry. In: Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE (eds). Flowcytometry and Clinical Diagnosis, Chicago: *American Society of Clinical Pathologist Press*, **1994**; 26–55.
64. **Nguyen A, Henry J.** Principles of Instrumentation. In: Henry J. (Ed). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20 nd Ed. Philadelphia: W. B. Saunders, **2001**; 60–78.
65. **Paxton H, Cunningham-Rundles S, and O’Gorman M.R.G.,** Laboratory evaluation of the Cellular Immun System. In: Henry JB (ed). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20 nd Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, **2001**; 850–877.
66. **Carey JL, Hanson CA,** Flow cytometric analysis of leukemia and lymphoma. In: Keren DF, Hanson CA , Hurtubise PE, (ed) Flowcytometry and Clinical Diagnosis, Chicago: *American Society of Clinical Pathologist Press*, **1994**; 197–308.
67. **Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P, Lovett EJ, Schwarz A.** U.S.–Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry* (Communication in Clinical Cytometry). **1997**; 30:214–230.
68. **Yaman A,** Reference ranges of lymphocyte subsets of healthy adults in Turkey. *Med Princ Pract* **2005**; 14:189-193.
69. Becton Dickinson Biosciences Catalog; Monoclonal Mouse anti-human reagent for identification of cells expressing CD3 FITC/CD16+56 PE, CD4 FITC/CD8 PE and CD19 PE antigens.
70. Erişim: www.bdbiosciences.com Erişim Tarihi: 05.09.2010.
71. Erişim: www.istatistikselanaliz.com Erişim Tarihi: 06.01.2011.
72. SPSS Inc. SPSS for Windows. Version 18.0 IBM, Corporation **2010**.
73. **William T. Sherar,** Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol.* Nov **2003**; 973-978.
74. **İkinciogulları A,** Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *The Turkish Journal of Pediatrics* **2004**; 46: 125-130.
75. **Comans-Bitter WM, Groot R, Beemd R,** Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. *J Pediatr* **1997**; 130: 388-393.
76. **Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B,** Agerelated changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* **1992**; 120: 216-222.

77. **Katevas P, Lembesopoulos C, Kamitaki C, Sakellariou D, Douna V**, Establishment of normal ranges of lymphocyte subpopulations in cord blood and in peripheral blood in infants and children. *Haema* **1999**; 2: 145-151.
78. **Wilson L. Mandala**, Lymphocyte subsets in healthy Malawians: Implications for immunologic assessment of HIV infection in Africa. *J Allergy Clin Immunol*. Jan **2010**; 203-208.

ÖZGEÇMİŞ

10.03.1985 tarihinde Adana’da doğdu. İlköğrenimini Emine Nabi Menemencioğlu İlkokulunda, ortaöğrenimini D.S.İ Baraj Ortaokulunda, lise öğrenimini ise İsmail Safa Özler Anadolu lisesinde tamamladı. 2008 yılında Lisans eğitimini Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü tamamladı. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Orta derecede Almanca ve iyi derecede İngilizce bilmektedir.