

SAĞLIKLI ÇOCUKLARDA CD4⁺ VE CD8⁺ T-LENFOSİT ALT GURUPLARI

Nur OLGUN*, Gülersu İRKEN*, Feridun ÖZDAMAR**, Özden ANAL*,
Faize AKYOL**, Halil ATEŞ**, Namık ÇEVİK*, Necla ÇEVİK*

D.E.Ü. Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı*
D.E.Ü. Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarı**

ÖZET

Değişik yaş guruplarında, 74 sağlıklı çocukta CD4⁺ ve CD8⁺ T-lenfosit yüzdeleri flow-sitometrik analizle değerlendirildi. Yaşın artmasıyla birlikte CD4⁺ T-lenfosit yüzdelerinin azaldığı, CD8⁺ T-lenfosit yüzdelerinin arttığı, CD4/CD8 oranının düştüğü saptandı (p<0.001). Sadece yenidoğan gurubunda CD4⁺ lenfosit yüzdesi ve CD4/CD8 oranı belirgin olarak yüksekti (p<0.0001). Ayrıca CD8⁺ lenfosit yüzdesi bu gurupta, okul çocuğu ve adolesan yaş gurubuna göre düşük saptandı (p<0.0001). Sonuçların güvenilirliği ve bölgemizde pediatrik yaş gurubunda referans değer olarak kullanılabilirliği tartışıldı.

Anahtar sözcükler: CD4/CD8 oranı, T-lenfosit, çocukluk çağı

SUMMARY

In this study, CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte percentage of 74 healthy children in different age groups were calculated by flow-cytometric analysis. With increasing age, the percentage of CD4⁺ T-lymphocytes decreased while CD8⁺ T-lymphocytes increased with a decline of CD4/CD8 ratio (p<0.001). The newborn group was the only one in which CD4⁺ T-lymphocyte percentage and CD4/CD8 ratio were significantly high. However, CD8⁺ lymphocyte percentage of this group was only lower than the school-aged children and adolescents (p< 0.0001).

Key words: CD4/CD8 ratio, T-lymphocyte, childhood

Pediatrik yaş gurubunda görülen hastalıklar ile immün sistem komponentleri arasındaki ilişki son yıllarda giderek artan oranlarda gösterilmektedir. Bir çok immün cevap özellikle T-hücreleri kontrolü altındadır. Bu cevabın şiddetini, süresini ve karakterini belirleyen en önemli faktörlerden biri yardımcı T-hücreleri ile süpresör-sitotoksik T-hücreleri arasındaki ilişkidir (1). Günümüzde giderek

artan sayıda monoklonal antikorların kullanıma girmesi ile dokularda ve dolaşımdaki lenfositler gerek sayısal, gerek işlevsel olarak daha iyi değerlendirilebilmektedir. Bu değerlendirmenin sağlıklı yapılabilmesi için de sonuçların karşılaştırılabileceği referans değerlerine gerek duyulmaktadır. Immün sistemin pediatrik yaş gurubunda bir matürasyon süreci içinde olması nedeni ile erişkin yaş gurup-

ları için oluşturulan hücrelerin sayısal ve işlevsel referans değerlerini çocukluk çağına uygulamak mümkün olmamaktadır (2). Bu konuda yapılan çalışmalarda birbirinden farklı sayısal değerler ortaya çıkması çevresel ve ırk faktörlerinin immün sistem üzerine olan etkilerini gündeme getirmektedir. Ayrıca alınan materyalin hazırlanması ve seçilen yöntemle göre de sonuçların değişebildiği gösterilmiştir (3).

Bu çalışmada bölgemizdeki sağlıklı çocukların periferik kan yardımcı T-lenfositleri (CD4⁺), süpresör-sitotoksik T-lenfositleri (CD8⁺) ve bunların birbirlerine oranı çıkarılarak referans değeri olarak kullanılması amaçlanmıştır. Yaş gurupları, bu lenfosit alt guruplarını etkileyebileceği düşünülen yenidoğan dönemi, aşılama durumu, okul öncesi dönem, okul çağı ve hormonal değişikliklerin gözlemlendiği puberte dönemi gözönüne alınarak ayrılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma gurubunu Ocak 1993 ile Nisan 1994 tarihleri arasında hastanemizde doğan, sağlam çocuk polikliniğine kontrol ya da aşı amacı ile gelen bebekler, inguinal herni ya da minor travma nedeni ile operasyona hazırlanan çocuklar ve okul çocukları oluşturdu. Çalışmadaki 74 çocuğun 14'ü yenidoğandı. Bu bebekler normal, spontan, vaginal yolla terimde doğmuş, konjenital anomalisi olmayan, yenidoğan döneminde enfeksiyon, sarılık, siyanoz, konvülsiyon gibi şikayetleri görülmeyen ve kan transfüzyonu yapılmamış

bebeklerdi. Diğer yaş guruplarına dahil olan tüm çocuklar son 1 ay içinde enfeksiyon geçirmemiş, ilaç kullanmamış, kronik bir hastalığı ya da konjenital anomalisi olmayan, herhangi bir nedenle kan transfüze edilmemiş ve fizik muayeneleri normal olan çocuklardan seçildi. Tüm çocukların rutin idrar analizleri ve kan sayımları normal sınırlardaydı. Olgular yaşlarına göre yenidoğan (1-28 gün), süt çocuğu (1-11 ay), oyun çocuğu (1-5 yaş), okul çocuğu (6-10 yaş), adolesan (11-17 yaş) olarak ayrıldı (Tablo I).

Tablo I. Olguların yaş guruplarına ve cinsine göre dağılımı

Grup yaşı	Vaka sayısı			Ortalama Yaş (SD)	Min-Max
	Erkek	Kız	Sayı		
Yenidoğan	6	8	14	5,6±3,7 gün	3-18 gün
Süt çocuğu	8	4	12	5,2±2,1 ay	2-9 ay
Oyun çocuğu	9	8	17	3,7±1,4 yaş	1,4-5 yaş
Okul çocuğu	12	5	18	8,7±1,3 yaş	6,25-10,5 yaş
Adolesan	4	9	13	15,2±1,8 yaş	11-17 yaş

Üç-dört ml periferik kan örnekleri sabah 9⁰⁰-11⁰⁰ saatleri arasında etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere alındı ve bekletilmeden çalışıldı. Tüm olgularda tam kan sayımları ve formül lökosit değerleri Coulter-STKS ile çalışıldı. Elde edilen formül lökosit değerleri periferik kan yayması ile kontrol edildi. Mononükleer hücreler Ficoll-Hypaque dansite gradient santrifüjleme yöntemi ile izole edildi.

Sonuçların, yaş guruplarına ve cinsine göre istatistiksel değerlendirilmesinde Student t testi, tek yönlü varyans analizi ve Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

BULGULAR

Periferik kanda lökosit ve mutlak lenfosit oranının yaşı artması ile birlikte düştüğü gözlemlendi ($p<0.001$) (Tablo II). Mutlak lenfosit sayısı, yenidoğanlarda süt çocukluğu dönemine göre daha küçük değerdeydi, ancak bu fark anlamlı değildi. Süt çocukluğu döneminden sonra mutlak lenfosit sayılarında yaşla birlikte düşme gözlemlendi ve değerlerdeki bu azalma okul çocuğu ve adölesan yaş gurupları için istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0001$) (Tablo II).

yenidoğan döneminden itibaren yaş ilerledikçe giderek azaldığı görüldü. Ancak bu azalma diğer yaş gurupları arasında önemli bir fark göstermezken, yenidoğan döneminde diğer yaş guruplarına göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0.0001$) (Tablo II).

Guruplar dikkate alınmadan tüm sonuçlar yaş ile korele edildiğinde yaşı artması ile birlikte mutlak lenfosit sayısının, CD4+ T-lenfosit yüzdesinin, ve CD4/CD8 oranının düştüğü (r değeri sırasıyla $r = -0.6$, $r = -0.4$, $r = -0.5$), CD8+ T-lenfosit yüzdesinin ise arttığı ($r = 0.4$) saptandı ($p<0.001$) (Tablo II). Cinsi-

Tablo II. Yaşlara göre lenfosit dağılımındaki değişiklikler

	Yenidoğan (1-28 gün)	Süt çocuğu (1-11 ay)	Oyun Çocuğu (1-5 yaş)	Okul çocuğu (6-10)	Adölesan (11-17)
Lökosit sayısı (SD) ($\times 10^3$ hücre/ml)	12.5 \pm 4.4	9.5 \pm 1.5	8.5 \pm 1.9	8.1 \pm 2.1	7.0 \pm 1.6
Mutlak lenfosit sayısı (SD) ($\times 10^3$ hücre/ml)	4.7 \pm 1.5	5.8 \pm 1.2	4.5 \pm 1.6	2.9 \pm 0.8	2.6 \pm 0.6
% CD4+ T-lenfosit (SD)	55.3 \pm 9.0	40.6 \pm 7.7	39.1 \pm 7.0	36.3 \pm 5.4	37.3 \pm 8.7
% CD8+ T-lenfosit (SD)	20.4 \pm 6.1	24.3 \pm 9.3	23.6 \pm 5.7	28.5 \pm 6.4	29.6 \pm 5.1
CD4+/CD8+ (SD)	2.94 \pm 1.04	1.8 \pm 0.5	1.75 \pm 0.58	1.36 \pm 0.4	1.27 \pm 0.4

Flow-sitometrik analiz ile elde edilen T-lenfosit alt gurupları incelendiğinde CD4+ hücre yüzdeleri yaş ilerledikçe azalmakta iken, CD8+ hücre yüzdelерinin arttığı saptandı ($p<0.001$). CD4+ T-lenfosit yüzdeleri yenidoğan döneminde tüm yaş guruplarına göre önemli oranda yüksekti ($p<0.0001$). Yenidoğan CD8+ T-lenfosit yüzdesi ise okul çağı ve puberte dönemine göre önemli oranda düşük bulundu ($p<0.0001$). CD4/CD8 oranlarının

yet faktörü gözönüne alındığında ise, değişkenler arasında herhangi bir fark saptanmadı.

TARTIŞMA

Araştırmada, T-lenfosit alt guruplarının yaşa göre gösterdiği fizyolojik değişiklikler; aşılama, çevresel faktörler ve hormonal değişikliklerin ışığı altında guruplandırılarak her yaş gurubu için normal değerler elde edilmeye çalışılmıştır.

Literatürde, periferik kanda mononükleer hücre alt grupları arasında elde edilen değerler farklılıklar göstermektedir (2-5). Ayrıca mononükleer hücre alt gruplarının jeografik faktörler, yaş ve cins, periferik kan örneklerinin alınış saati, enfeksiyonlar, kan transfüzyonu, kullanılan alet ve yöntemler, hatta ultraviyole ışını ve egzersiz gibi faktörlerle değişebileceği belirtilmektedir (2-8).

T hücrelerinin yardımcı ve supresör-sitotoksik alt gruplarının ilişkisi immün regülasyonun en önemli parçalarından biridir. Bu hücre grupları ve aralarındaki orandan konjenital ve akkiz immün yetmezlikler, özellikle de AIDS tanısında ve izleminde faydalanılmaktadır (9-11). Bronşial astımda sistemik lupus eritematozus gibi kollajen doku hastalıklarında, IgA nefropatisi, pemisiöz anemi, idiopatik trombositopenik purpura, nefrotik sendrom gibi immünpatogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamış hastalıklarda CD4+, CD8+ T hücreleri ve CD4/CD8 oranı araştırılmış ve bu hastalıklar ile oranların değişebileceği gösterilmiştir (12-17). Flow-sitometrik analizlerin rutin laboratuvar yöntemleri arasına girmesi ile pediatrik yaş gurubunda sağlıklı çocuklar için referans değerlerinin belirlenmesi zorunluluğu doğmuştur. Çalışmada, yenidoğan döneminden itibaren adölesan yaş gurubuna doğru CD4+ T hücrelerinde giderek azalma saptanmıştır. Bu sonuç, sağlıklı çocuklarda yapılan diğer çalışmalarla uyumludur (2,4,18,19). CD8+ T hücre yüzdelerinde aksine yaş ile birlikte yükselme saptanmıştır. Sonuçta, CD4/CD8 oranı yaş artı-

şı ile birlikte düşmektedir. Orandaki bu düşüş sağlıklı çocuklarda yapılan diğer çalışmalarla da benzerlik göstermiştir (4,19,20). Ancak çalışmamızda CD4+ ve CD8+ yüzdelerinin değişiklikleri yaş grupları arasında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde diğer çalışmalardan farklı olarak yenidoğan döneminde CD4+ T hücre yüzdelerinin diğer yaş gruplarına göre anlamlı yüksek, CD8+ T hücre yüzdelerinin ise okul çağı ve adölesan yaş grubuna göre anlamlı düşük olduğu bulunmuştur. Bu konuda en geniş çalışmalardan biri olan Erkeller-Yüksel FM ve arkadaşları (2) yenidoğan dönemini ayrı ayrı inceledikleri için muhtemelen buna bağlı olarak CD4+ T hücre ve CD4/CD8 oranındaki yüksekliği gösterememişlerdir. Diğer taraftan Raes ve arkadaşları (6) sağlıklı yeni doğanlarda kord kanında ve 5. gün venöz kanında elde ettikleri değerleri karşılaştırarak CD4/CD8 oranlarının kord kanında ortalama 1.97'den 5. günde 2.74'e istatistiksel anlamlı olarak yükseldiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da yenidoğan ortalama yaşı 5.6 gün olup CD4/CD8 oranı 2.94 olarak saptanmıştır.

Yaş gurupları dikkate alınmadan tüm olgularda incelenen T-lenfosit alt gruplarının cinsine bağlı farklılık göstermediği bulunmuştur. Bugüne kadar bu yönde yapılan çalışmalarda farklı ve çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (2,5,6).

Sağlıklı çocuklarda lenfosit alt grupları için referans değerlerini elde edebilmek üzere olgu seçiminde bu değerleri etkileyebilecek tüm

faktörler elimine edilse de kullanılan flow-sitometre cihazı, monoklonal antikorlar ve tekniğin sonuçları etkileyebileceği bildirilmektedir (3). Bu faktörleri çalışmamızda en aza indirgeyebilmek için tüm olgularda aynı

cihaz ve aynı monoklonal antikorlar kullanılmıştır. Bu nedenle elde edilen sonuçların bölgemizde referans değer olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1991; 98-204.
2. Erkeller-Yüksel FM, Deneys V, Yüksel B, et al. Age related changes in human blood lymphocyte subpopulations. J Pediatr 1992; 120: 216-22.
3. Linda M, Ashmore, George M, Shoop S, Bruce SE. Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. J Immunological Methods 1989; 118: 209-15.
4. Heldrup J, Kolm O, Prellner O. Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children. Acta Paediatr 1992; 81: 125-32.
5. Reichert T, DeBruyere M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult caucasians. Clin Immunol Immunopathol 1991; 60: 190-208.
6. Raes M, Alliet P, Gillis P, et al. Lymphocyte subpopulations in healthy newborn infants: Comparison of cord blood values with values five days after birth. AJ Pediatr 1993; 123: 465-7.
7. Gasparoni A, Maccario R, Chirico G, et al. Neonatal B lymphocyte subpopulations in method of delivery. Biol Neonate 1992; 61: 137-41.
8. Smith J, Chi D, Salazar S, et al. Effect of moderate exercise on proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells. J Sports Med and Physical Fitness 1993; 33 (2): 152-8.
9. Rand TH, Meyers A. Role of the general pediatrician in the management of human immunodeficiency virus infection in children. Pediatrics in Review 1993; 14 (10): 371-9.
10. Iseki M, Heiner DC. Immunodeficiency disorders. Pediatrics in Review 1993; 14 (6): 226-39.
11. Davies EG, Levinsky RJ, Butler M, et al. Lymphocyte subpopulations in primary immunodeficiency disorders. Arch Dis Child 1983; 58: 346-51.
12. Fiser RT, Arnold WC, Charlton RK, et al. T-lymphocyte subsets in nephrotic syndrome. Kidney International 1991; 40: 913-6.
13. Kameda A, Yoshikawa N, Shioza S, et al. Lymphocyte subpopulations and function in childhood IgA nephropathy. Nephron 1991; 59: 546-51.
14. Tuncer M, Özsoylu Ş. Idiopatik trombositopenik purpurada T- lenfosit subpopulasyonundaki değişiklikleri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 1985; 28: 3-12.
15. Stohl W. Deficient CKT 4 epitope on helper T cells in a patient with SLE:

- confusion with AIDS. *N Engl J Med* 1984; 21: 1531-5.
16. Imamura N. Lymphocyte subpopulations in pernicious anemia. *N Engl J Med* 1984; 311: 56-61.
17. Hsieh KH. Study of T-cell subpopulations defined by monoclonal antibodies in asthmatic children with or without atopic eczema and normals. *Ann Allergy* 1982; 48: 345-51.
18. Gerli R, Bertotto A, Spinozzi F, et al. Phenotypic Dissection of cord blood immunoregulatory T-cell subsets by using a two-color immunofluorescence study. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; 40: 429-35.
19. Paoli PD, Battistin S, Santini F. Age-related changes in human lymphocyte subsets: progressive reduction of the CD4 CD45R (suppressor inducer) population. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 48: 290-6.
20. Yanase Y, Tango T, Okumuro K, et al. Lymphocyte subsets identified by monoclonal antibodies in healthy children. *Pediatr Res* 1986; 20: 1147-51.