

T, B, NK Hücrelerin Değerlendirilmesinde Pratik Yaklaşımlar

Günnur Deniz

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, Prof.Dr.

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 dirençli takiben ortaya çıkan, enfeksiyonlara karşı daha etkili savunma sağlayan "edinsel direnç - edinsel bağışıklık" dan oluşmaktadır. Doğal direncin başlıca yapıtaşları epitel tabakası, doğal öldürücü hücreler (natural killer-NK hücreleri), kompleman sistemi, fagositik hücreler ve sitokinlerdir.

Edinsel bağışıklığın yapı taşları ise T ve B lenfositleri ile bu hücrelerin ürünleridir. T lenfositleri hücrel immünite, B lenfositleri ise humoral immüniteden sorumlu hücrelerdir. Humoral immün yanıtlar antijen ile reaksiyona girebilen antikorların oluşumu ile sonuçlanır. "İmmüoglobulin" (Ig) olarak adlandırılan tüm antikorlar benzer yapıda proteinlerdir ve serum enjeksiyonu ile bir başka kişiye pasif olarak transfer edilebilir. Humoral immün sistemin aksine hücrel immünite sadece hücreler aracılığı ile transfer edilebilir (örnek: graft versus host). İmmün yanıt iki fazdan oluşur; tanıma fazında antijen sunan hücreler (ASH) ve T lenfositleri, efektör fazda ise antikorlar ve efektör T lenfositleri antijenin yok edilmesinde etkilidir.

T hücreleri

Antijene spesifik hücre aracılı yanıt T lenfositleri tarafından gerçekleştirilir. T hücreleri spesifik antijeni eksprese eden hücreleri lize edebilir (sitotoksite) veya enflamasyonu tetikleyen sitokinler salgılayabilir (gecikmiş hipersensitivite). Bu iki tip T hücre yanıtı farklı popülasyonlarla ilgilidir. Sitotoksitede sitotoksik T hücreleri (Tc), gecikmiş tip hipersensitivitede ise yardımcı T hücreleri (Th) etkilidir. Bu iki tip T hücresi, hücre içi patojenlerin (tüm virüsler, bazı bakteri ve parazitler) yok edilmesinden sorumludur. CD4+ ve CD8+ T hücreleri, kendilerine sırasıyla MHC-II ve MHC-I molekülleri oluşturan ve ASH 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 ve sonuçta Tc enfekte hücrelere saldırıp, onları yıkıma uğratır. Bu durum, hücre içi bakterilerin yıkımında, CD4+ T hücrelerinin aktive ettiği makrofajların ve CD8+ T hücrelerinin işbirliği sonucu, hücrel immünitenin rol oynadığını göstermektedir.

Antijenin tanınması yardımcı T hücresinin yüzeyindeki reseptörlerle ilişkilidir (T hücre reseptörü -THR, CD4 veya CD8 ve CD3). T hücre aktivasyonu belirli hücre yüzey molekül ekspresyonu, proliferasyonu ve sitokin üretimi ile karakterizedir. Fenotipik aktivasyon molekülleri yüksek afiniteli interlökin-2 (IL-2) reseptörü, HLA-DR ve CD38'dir. Bunlara ek olarak CD45RO ekspresyonu bellek lenfositlerini CD45RA taşıyan naif T hücre popülasyonundan ayırır.

Klinik olarak anormal hücre aracılı immünite düşündüren hastalarda in vitro lenfosit fonksiyon testleri uygulanmalıdır. Bu testler şüpheli T hücre immün yetmezliklerinde önemlidir, total kan veya lenfositler kullanılarak uygulanmalıdır. Her iki durumda da taze anti-koagulanlı kan gereklidir. Lenfosit pürifikasyonu, anti-koagulanlı kanın dansite gradyan farkına göre ayırma prensibine dayanır. Santrifüj sonrası eritrositler ve granülositler dipte, lenfosit ve monositler ise interfazda yer alır. Trombosit açısından zengin plazma tabakası ise en üsttedir. İnterfaz tabakası ayrılarak elde edilen lenfositler belirli maddelerle aktive edildiği zaman, birkaç gün içinde dinlenme halindeki lenfositler yanıt verip blast hücrelere dönüşürler. Bu işlem lenfosit transformasyonu olarak adlandırılır. Stimüle edici maddeler 4 tiptir. Antijen (pürifiye protein derivesi-PPD), bitkisel mitojenler (fitohemagglütinin), monoklonal antikor (anti-CD3) ve forbol ester ve kalsiyum iyonofor (phorbol myristate acetate ve ionomycin). Proliferatif yanıt DNA'ya bağlanan radyoaktif timidin ile veya aktive hücrelerin yüzeyinde eksprese olan CD69 gibi hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile ölçülür. Bu testler doku kültürü imkanlarını gerektirir, pahalı ve zaman alıcıdır. Lenfositlerin aktivasyon veya proliferasyon derecesini saptamak amacıyla kültürdeki blast hücrelerinin yüzdesini belirlemek veya yeni sentezlenen DNA miktarının ölçümü gibi iki önemli veriyi kullanan testler geliştirilmiştir. Bunlar canlı hücrelerin veya klonların sayıldığı; DNA analoglarının, tetrazolyum tuzlarının ya da floresan boyaların kullanıldığı testlerdir.

Th sitokin profillerine göre iki gruba ayrılır. Th1 hücreleri başlıca IFN- γ sekrete ederler ve hücrel immünitede rol oynarlar. IFN- γ , viral enfeksiyonların inhibisyonunda ve makrofaj aktivasyonu sonucunda fagosit aracılı sindirim ve mikropların öldürülmesinde rol alır; bu hücreler aynı zamanda ASH üzerinde MHC sınıf II moleküllerinin ve B7 eş-uyaranlarının ekspresyonunu uyarır ve bu nedenle hücrel immünitenin anahtar yapıtaşını oluşturur. Th2 hücreleri ise IgE antikor üretimini stimüle eden IL-4 ve eozinofilleri uyararak IL-5 üretirler. Bu nedenle, Th2 hücreleri özellikle helmintik parazitlere karşı etkili eozinofil aracılı, fagosit bağımsız immüniteyi stimüle ederler ve B hücre tarafından kuvvetli antikor üretiminin stimülasyonundan sorumludur. IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi Th2 hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin bazıları ise makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve Th1 hücre aracılı immüniteyi baskılar. Bu nedenle, bir mikroba karşı hücre aracılı immün yanıtın etkisi bu mikroba yanıtta Th1 ve Th2 hücrelerinin aktivasyonu arasındaki denge ile sağlanabilir. Tc hücreleri de aynı şekilde sitokin profillerine göre Tc1 ve Tc2 olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Th1 ve Th2 profili göstermeyen Th hücreleri ise Th0 olarak adlandırılır. Naif T hücresinin sekrete ettiği sitokin profilini nasıl seçtiği tam olarak bilinmemekle birlikte, belirli sitokinlerin bu seçimde rol oynadığı gösterilmiştir. IL-12 Th1 tip, IL-4 ise Th2 tip hücre gelişimine neden olur. İnsanda Th1 sitokin profili hücre içi patojenlere karşı korunmada esastır. Th2 profili ise IgE içeren antikorların fazla üretimi ile karakterize hastalıklarla ilgilidir.

Th fonksiyonları antijen- veya mitojen-stimülasyonu sonucu üretilen sitokinlerin (Örneğin: IL-2, IL-4, IFN- γ) ölçülmesi ile saptanabilir. Çok sayıda çözünebilir veya hücre içi sitokin seviyelerini, yüzey adezyon molekülleri veya reseptörlerini ve tüm bunların mRNA düzeylerini ölçmek mümkündür. Serum, plazma ve hücre üst sıvıları gibi örneklerde sitokin seviyelerinin saptanmasında ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), hücre içi sitokin düzeylerinin saptanmasında flow sitometri, sitokin mRNA seviyelerinin belirlenmesinde ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmaktadır.

Hücre içi mikroplarla oluşan enfeksiyonları yok eden edinsel immünitenin hücre 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. Tc'ler granül içeriklerinin (perforin, granzimler) hedef hücre membranlarında delik oluşturarak ve hedef hücrelerde DNA parçalanması ve apoptoza yol açan maddeler aracılığı ile hedef hücrelerini yok ederler.

B hücreleri

Antikor üreten B hücreleri plazma hücreleri olarak adlandırılır ve B hücre yüzeyinde yer alan Ig'ler B hücre reseptörü (BHR) olarak rol oynar. Gelişim esnasında B hücre yüzeyinde ilk olarak hücre içi μ zincirleri sonar da IgM görülür. Olgun hücreler IgM'den diğer sınıfların üretimini sağlar, sırasıyla IgM ve IgD, en sonunda IgG, IgA veya IgE eksprese edilir ve bu işlem izotip kayma olarak bilinir. Yüzeysel Ig'nin en son tipi sekrete antikorun sınıfını belirler. Bu olgunlaşma dizilimi antikor yanıtının kinetiği ile uyumludur. Birincil yanıtta esas olarak IgM oluşurken, ikincil yanıtta esas olarak IgG antikorları oluşur. İzotip değişimi 2 önemli proteinin reaksiyonu ile ilişkilidir. B hücre yüzeyindeki CD40 molekülü IL-4 etkisinde aktive T hücrelerindeki CD40L ile reaksiyona girer ve B hücrelerinde IgM'den diğer Ig altgruplarının (IgG, gA, IgE) oluşumunu indükler. CD40 veya CD40L molekülünün eksikliğinin farede ciddi immünyetmezliğe neden olduğu, IgM'den IgG oluşumunda yetersizlik ve düşük serum IgG ve IgA konsantrasyonuna karşılık yüksek serum IgM (hiper IgM sendromu) seviyeleri gösterilmiştir. Bruton hastalığında periferik kanda B hücreleri yoktur. T hücreleri normal veya artmıştır. Gecikmiş aşırı duyarlık deri testleri ve lenfositlerin PHA'ya yanıtları normaldir.

T hücre kökenli sitokinler polisakkaridler gibi T hücre bağımsız antijenlere karşı B hücre yanıtını uyarırlar. T, B veya ASH deki eksiklik, antikor üretiminde eksikliğe neden olabilir. Tekrarlayan veya ciddi enfeksiyonlarda ve belirli lenfoproliferatif hastalıklarda serum immünoglobülin ölçümleri esastır. Birbirini takip eden ölçümler seçici ve sürekli immünoglobülin eksikliklerini birbirinden ayırmada ve lenfoproliferatif hastalıkların tedavisinin monitorizasyonunda yardımcıdır. IgM yüksekliğinde primer biliyer siroz, IgA yüksekliğinde alkolik karaciğer hastalığı, IgG yüksekliğinde primer Sjögren sendromu, HIV enfeksiyonu, SLE, karışık izotiplerin yüksekliğinde ise tüberküloz, kronik hepatit, kronik bakteri enfeksiyonları görülmektedir.

Her bir B hücresi antijen bağlama bölgesi olarak rol oynayan yüzeysel Ig'ni eksprese eder. Antijen ve yardımcı T hücrelerinden (IL-4, IL-5, IL-6) salgılanan faktörler B hücre bölünme ve farklılaşmasını stimüle eder ve aynı türden immünoglobülin üreten hücreler oluşur, simultan olarak aynı yüzeysel Ig reseptörü eksprese olur. Bu hücrelerin bölünmesi sonucunda aynı antijen ile daha sonra karşılaşılması durumunda antijen-spesifik B hücrelerinin sayısı daha da artar. Bu klonal ekspansiyon olarak adlandırılır ve ikincil yanıtı artırır.

İkincil yanıt daha hızlı ve kuvvetli olduğu için daha etkilidir. Bu antijene yüksek afinite ile bağlanan antikorların üretiminden kaynaklanır. Bu üretimde iki nokta önemlidir. Birincisi, primer yanıtta antijen uzaklaştırıldığında kalan düşük konsantrasyondaki antijen sadece yüksek afiniteli reseptörlere sahip hücrelerle reaksiyona girer. İkinci olarak sekonder yanıtın germinal merkezinde hızlı B hücre bölünmesi ve buna eşlik eden somatik mutasyon yüksek afiniteli B hücrelerini oluşturur ve bu işlem maturasyon - olgunlaşma olarak adlandırılır. Oluşan B hücreleri öncelikle antikor ile kompleks halde bulunan antijene bağlanır ve foliküler dendritik hücreler tarafından bağlanır. B hücrelerinin çok az bir kısmı T hücre bağımsız antijen olarak antijene direkt yanıt verebilir ve IgM antikor yanıtına neden olurlar. Bu maddeler diğer bellek B hücrelerinin non-spesifik proliferasyonunu uyarabilirler ve bu nedenle poliklonal B hücre mitojenleri olarak bilinirler. B hücreleri uygun eşlikçi hücre ile sunulmaları bile çoğu antijene direkt olarak yanıt vermez ikinci sinyal B hücresini tetiklemelidir ve bu sinyal genellikle T hücresi tarafından sağlanır. Bu ilk olarak adaptif transfer deneyleri ile gösterilmiştir. B hücresinin ve antijenin irradiye hayvana transferinde antikor yanıtı saptanmamıştır. T hücrelerinin eklenmesi, antikor yanıtına neden olmakla birlikte sadece T hücreleri antikor oluşturma yeteneğinde olmadığından, antikor yapımında B hücrelerine ek olarak Th hücrelerine gereksinim vardır.

İmmünyetmezlikler ve lenfoproliferatif hastalıklarda T ve B lenfosit alt gruplarının ve fonksiyonlarının saptanması önemli ve yardımcıdır. HIV enfeksiyonunda dolaşan CD4+ T lenfositlerin sayısı güçlü prognostik faktördür ve hastalığın takibinde önemli bir belirteçtir, aynı zamanda anti-HIV terapiye yanıtın takibinde de kullanılır. Tüm çalışmalar taze anti-koagulanlı kanda yapılmalıdır. İnsan periferik kan B ve T lenfositlerin tanımlanmasında monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Her biri farklı floresan ile işaretlenmiş hücreler flow sitometri cihazı aracılığı ile tanımlanır ve sayılır. Hücre popülasyonlarının büyüklük ve granülaritesi farklıdır. Bu özellikler hücre süspansiyonunda farklı hücre popülasyonlarının belirlenmesinde kullanılır. Belirli büyüklük ve granülaritedeki hücre popülasyonunun sınırları belirlenerek (gate-kapılama) bu alandaki hücrelerin detaylı analizlerinin yapılması mümkündür. Elde edilen bilgiler histogramlar halinde sunulur.

NK hücreleri

Doğal öldürücü (natural killer, NK) hücreler kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfosit morfolojisindeki hücrelerdir. Doğal immünitenin elamanı olan NK hücreleri esas olarak kan, dalak ve peritoniyal sıvıda bulunur. Fenotipik olarak CD3-CD16+CD56± NK hücreleri, spontan olarak litik aktivite gösteren, yüzeysel immünoglobülin ekspresyonu negatif, non-adherent ve non-fagositik hücrelerdir. Antikor veya antijenik stimülasyona gerek duymaksızın hedef hücreleri öldürme yeteneğindedirler. Non-spesifik olarak mitojenler ve IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 ile aktive olurlar. Virüsle enfekte hücrelerin yok edilmesinde ilk yanıt veren hücreler NK hücreleridir. NK hücrelerinin enfekte ve non-enfekte hücreleri birbirinden nasıl ayırdığı kesin açıklanmamakla birlikte, lizis mekanizmasında hücre yüzey reseptörlerinin rol oynadığı görüşü yaygındır. NK hücreleri iki tip hücre yüzey reseptörü eksprese eder. NKR-P1 lektin-tip reseptör, hedef hücre yüzeyindeki karbohidrat ligandları tanırlar ve lizisi tetikler. Killer immünoglobülin-benzeri reseptörler (KIR) olarak adlandırılan ve lizisi inhibe eden bu reseptörler, hedef hücre yüzeyindeki MHC sınıf I moleküllerine bağlanır. Virüslerde MHC ekspresyonunun olmaması veya MHC sınıf I molekülündeki değişikliklerden dolayı NK hücreleri virüs ile enfekte hücreleri direkt olarak öldürme yeteneğindedir.

NK hücreleri, HLA-A, HLA-B, HLA-C gibi klasik HLA antijenleri, HLA-E ve HLA-G gibi non-klasik HLA antijenleri ve stress ile indüklenen molekül MICA (major histokompatibilite I zincir ilişkili antijen) moleküllerinin her biri için reseptör eksprese eder. Bu reseptörler natural killer-doğal öldürücü reseptörler (NKR) olarak adlandırılır. Bu reseptörler aktive edici ve inhibe edici reseptörler olarak iki gruba

ayrılmaktadır. HLA sınıf I molekülleri ile reaksiyonu öldürme veya sitokin üretimini inhibe eden sinyal iletimine yol açan reseptörler ilk olarak katil inhibitör reseptörler olarak daha sonra ise killer immüoglobulin-benzeri reseptörler (KIR), öldürme ve sitokin üretimi gibi efektör fonksiyonları tetikleyen reseptörler ise katil aktivatör reseptörler (KAR) olarak adlandırılmıştır. İlk çalışmalarda tanımlanan KIR, NK hücrelerine inhibitör sinyaller göndermesine karşılık, daha sonraki çalışmalar sınıf I MHC antijenleri için aktive edici reseptörlerin de KIR ailesi içinde olduğunu göstermiş ve genel olarak killer immüoglobülin-benzeri reseptörler olarak adlandırılmıştır. KIR sadece NK hücrelerinin değil aynı zamanda daha önceden aktive olmuş T hücre aktivasyonunun regülasyonunda da rol oynar.

Th1 ve Th2 hücrelerine benzer şekilde insan NK hücre alt gruplarının in vivo şartlardaki varlığı, taze olarak izole edilen IFN- γ salgılayan ve salgılamayan NK hücre gruplarında gösterilmiştir. IFN- γ salgılayan NK hücre alt grubunun esas olarak IFN- γ salgılamasına karşılık IL-4, IL-5 ve IL-13 salgılamadığı, aksine IFN- γ salgılamayan NK hücrelerinin ise IL-4, IL-5 ve IL-13 salgıladığı bulunmuştur. Taze olarak izole edilen IFN- γ salgılayan ve salgılamayan NK hücre alt grupları ile in vitro olarak farklılaşmış NK1 ve NK2 hücre alt gruplarının K562 hücrelerine karşı benzer sitotoksik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Son bulgular dolaşımdaki NK hücrelerinin farklı sitokin profillerine sahip efektör NK hücre alt gruplarına dönüşebileceğini ve farklı enflamatuvar özellikler kazanabileceğini göstermektedir.

Eksprese ettikleri yüzey molekülleri (CD56, CD16) ile NK hücrelerini flow sitometride saptamak mümkündür. NK hücrelerinin sitotoksik etkisini saptamada kullanılan Cr51 salınımı yanında, floresan işaretli hedef hücrelerle efektör hücrelerin inkübasyonu sonucu oluşan lizis yine flow sitometride saptanabilmektedir. Antikor bağımlı hücrel sitotoksiste (ADCC)'de antikor kaplı hedef hücreler Fc reseptörü taşıyan (NK hücreleri, monositler, nötrofiller) hücreler tarafından MHC'den bağımsız olarak yok edilir. Hedef hücre yıkımının mekanizması tam olarak aydınlatılmamakta beraber, sitoplazmik komponentlerde bulunan perforin ve granzimler aracılığı ile yıkımın gerçekleştiği kabul edilmektedir. Konağın korunmasında ADCC'nin önemi açık olmamakla beraber, bakteri virüslerin yok edilmesinde ek bir mekanizma olarak kabul edilmektedir.

NK hücreleri tümör hücre büyümesinin kontrolünde, viral enfeksiyonlar dışında parazit, mantar, bakteri gibi mikrobiyal enfeksiyonların kontrolünde, sitokin üretimi, hematopoetik sistem hücre büyüme ve farklılaşması, allograft rejeksiyonu gibi immüno-regülatör fonksiyonlarda ve GvH gelişimi, aplastik anemi, nötropeni, diyabet, gastrointestinal hastalıklar gibi farklı hastalıklarda rol oynamaktadır.

Kaynaklar

1. Abbas AK, Lichtman AH. Temel immünoloji, immün sistemin işlev ve bozuklukları. Editörler: Y. Camcıoğlu, G. Deniz. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007.
2. Segal S, Hill A V S. Genetic susceptibility to infectious disease. Trends Microbiol 2003; 11:445.
3. Manes S, del Real G, Martinez-A C. Pathogens: raft hijackers. Nat Rev Immunol 2003; 3:557.
4. Bachmann MF, Kopf M. Balancing protective immunity and immunopathology, Curr Opin Immunol 2002; 14:413.
5. Paul WE. Fundamental Immunology. Lippincott Williams & Wilkins, 5. baskı, Philadelphia, PA, USA, 2003.
6. Vosshenrich CAJ, Samson-Villeger SI, Di Santo JP. Distinguish features of developing natural killer cells. Current Opinion in Immunology. 2005; 17:151-8.
7. Aktas E, Akdis M, Bilgic S, Disch R, Falk CS, Blaser K, Akdis CA. Deniz G. Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells. Clin Exp Immunol. 2005; 140(2):301-9.
8. Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. Cancer Immunology and Immunotherapy. 2004; 53:176-86.
9. Deniz G, Akdis M, Aktas E, Blaser K, Akdis CA. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells. European Journal of Immunology. 2002; 32(3):879-84.
10. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends in Immunol. 2001; 22(11):633.