

# Göbek kordonu kanındaki kök hücre, lenfosit ve lenfosit alt gruplarının immünofenotipik olarak belirlenmesi

Bülent Türkmen (\*), Orhan Gürsel (\*\*), A.Avni Atay (\*\*), A.Emin Kürekcı (\*\*), Vedat Köseoğlu (\*\*\*), Erol Kısmet (\*\*\*), Ali Şengül (\*\*\*\*), Okan Özcan (\*\*\*\*\*)

## ÖZET

Bu çalışmada yenidoğan bebeklerin kordon kanlarındaki kök hücre, lenfosit ve lenfosit alt gruplarının antijenik fenotiplerine göre ayırımı yapmak ve bu hücrelerin göreceli ve mutlak sayılarını belirlemek amaçlanmıştır. Gebelik, travay ve doğum sırasında komplikasyon gözlenmeyen, normal vajinal yol ile dünyaya gelen, 16'sı kız (%48.5), 17'si erkek (%51.5) toplam 33 zamanında doğan yenidoğan bebekten kordon kanı örnekleri alındı. Lenfosit, lenfosit alt grupları ve CD34<sup>+</sup> kök hücre oranları akım sitometrisi ile saptandı. Kordon kanı örnekleri, lenfosit ve lenfosit alt grupları açısından 33 sağlıklı erişkin çevre venöz kan örneğiyle; CD34<sup>+</sup> kök hücre yönünden ise 23 sağlıklı erişkin kemik iliği örneğiyle karşılaştırıldı. Kordon kanında T hücre, sitotoksik T hücre ve büyük granüllü lenfosit oranları erişkin çevre kanına göre daha düşük; total B hücre ve T hücre helper/suppressor oranları ise daha yüksek saptandı (p<0.05). Kordon kanı beyaz küre sayılarının yüksekliğinden dolayı, büyük granüllü lenfositler hariç bütün lenfosit alt grup sayıları, erişkin örneklerine oranla daha yüksek saptandı (p<0.001). Kordon kanı örneklerinde CD34<sup>+</sup> kök hücre oranı, erişkin kemik iliği örneklerine oranla daha yüksek değerde saptandı (p<0.05). Göbek kordonu kanı lenfosit ve lenfosit alt grupları, erişkin çevre venöz kanıyla, kordon kanı kök hücreleri ise erişkin kemik iliğiyle sayı ve orantısal olarak farklılıklar içermektedir.

**Anahtar kelimeler:** CD34<sup>+</sup> kök hücre, kordon kanı, lenfosit alt grupları

## SUMMARY

**Immunophenotypic detection of umbilical cord blood stem cell, lymphocyte and lymphocyte subpopulations**

In this study it was aimed to differentiate stem cell, lymphocyte and lymphocyte subgroups in umbilical cord blood according to antigenic phenotypes and to determine the relative and absolute counts of these cells. Umbilical cord blood samples were collected from a total of 33 term newborns, 16 female (48.5%) and 17 male (51.5%), all of whom were born by spontaneous vaginal route without any complication during gestation or delivery. Lymphocyte and lymphocyte subgroups and CD34 stem cell ratios were detected by flow cytometry. Umbilical cord blood samples were compared with peripheral venous blood of 33 healthy adults and with bone marrow samples of 23 healthy adults regarding lymphocyte and lymphocyte subgroups, and CD34 stem cell, respectively. In umbilical cord blood, ratios of T cell, cytotoxic T cell and large granular lymphocytes were lower, and total B cell and T helper/suppressor ratios were higher in comparison to peripheral venous blood samples of adults (p<0.05). Numbers of all lymphocyte subgroups except for large granular lymphocytes were higher than those of the healthy adult samples because of the high number of leukocytes in umbilical cord blood (p<0.001). Ratio of CD34 stem cells in umbilical cord blood samples was higher than that of the samples of adult bone marrow (p<0.05). Significant absolute and relative differences were detected between the lymphocyte and lymphocyte subgroups of umbilical cord blood and peripheral adult venous blood, and umbilical cord stem cells and adult bone marrow.

**Key words:** CD34<sup>+</sup> stem cell, cord blood, lymphocyte subgroups

## Giriş

Allojeneik kök hücre nakli, yüksek riskli ve rekürren hematolojik malign hastalıklarda, kemik iliği yetmezlik sendromlarında ve bazı metabolik bozukluklarda başarıyla kullanılmaktadır. Kök hücre kaynağı ister kemik iliği, ister mobilize çevre kanı (MÇK) olsun, doku reddi ve Graft Versus Host Hastalığı (GVHD) gelişme riski yüksektir. Bu risk; HLA-uyumlu akraba dışı vericilerden yapılan nakiller sonrası %70, HLA-uyumlu kardeş nakilleri sonrası ise %35-40 kadar yüksek olabilmektedir. Buna ilaveten HLA-uyumlu akraba verici bulunma oranının %30-40 olması gibi faktörler bu tedavinin uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır (1).

Göbek kordonu kanı (GKK) 1988 yılından itibaren allojeneik nakiller için alternatif bir kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır (2-4). Hem kardeş, hem de akraba dışı vericilerden yapılan kordon kanı transplantasyonlarında kemik iliği ve MÇK transplantasyonlarına oranla daha yüksek engrafman oranları bildirilmiştir. Fetal kan hücrelerinin immün fonksiyonlarındaki yetersizliğin sonucu olarak GKK naklinden sonra doku reddi ve GVHD daha az görülmektedir (5-7). Bu nedenle, GKK kullanımı, transplantasyona bağlı komplikasyonları azaltmış ve verici havuzunu genişletmiştir. GKK kök hücre sayısının fazla oluşu ve bu kök hücrelerin diğer kaynaklardaki (kemik iliği ve MÇK) eş değerlerine oranla ex vivo ekspansiyon kapasitelerinin çok daha yüksek oluşu, kemik iliği transplantasyonlarında (KİT) GKK kullanımının önemini artırmıştır.

Günümüzde immün sistemin fenotipik ve fonksiyonel olarak araştırılması ile birçok doğumsal ve kazanılmış immün yetmezlik sendromlarının, hematolojik malign hastalıkların kesin ve hızlı tanısı konabilmektedir. Doğum sırasında GKK'nın fenotipik yönden araştırılması ile primer immün hastalıkların ve intrauterin enfeksiyonların tanısı konulabilir. Bu nedenle, GKK'daki immün sistem hücrelerinin normal değerlerinin bilinmesi önem kazanmaktadır.

\* Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servisi, Mevki Asker Hastanesi, Ankara

\*\* GATF Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı

\*\*\* GATF Çocuk Onkolojisi Bilim Dalı

\*\*\*\* GATF İmmünoloji Bilim Dalı

\*\*\*\*\* GATF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**Ayrı basım isteği:** Dr. Orhan Gürsel, GATF Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı, Etilik-06018, Ankara

**E-mail:** orhangursel08@myinet.com

Ülkemizde, gelecekte birçok hastalığın tedavisinde standart kullanıma gireceği düşünülen GKK nakli ile ilgili çalışmalar henüz yetersiz düzeydedir. Erişkinlerden ve büyük çocuklardan farklı olarak, yenidoğan bebeklerde lenfosit ve lenfosit alt grupları için referans değerler henüz tam olarak oluşturulmamıştır. Bu çalışmada, yenidoğan bebeklerin kordon kanlarındaki kök hücre, lenfosit ve lenfosit alt gruplarının antijenik fenotiplerine göre ayrımını yapmak, bunların göreceli oranları ile mutlak sayılarını belirlemek ve Türk halkı için referans değerler oluşturmaya öncülük etmek amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

GATF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Kliniğinde normal vajinal yol ile gebelik, travay ve doğum sürecinde komplikasyon gözlenmeden, zamanında doğan (38-40 hafta), 16'sı kız (%48.5), 17'si erkek (%51.5) olmak üzere toplam 33 sağlıklı bebeğin doğumlarından hemen sonra GKK örnekleri alınarak çalışma grubu oluşturuldu. Gestasyonel yaşlar, son adet tarihine ve Ballard skorlamasına göre belirlendi (8). Doğumsal malformasyon, intrauterin gelişme geriliği, enfeksiyonlar, kan uyuşmazlığı gibi patolojik durumu olan bebekler ile prematüre olanlar ve sezaryenle doğan bebekler çalışmaya alınmadı.

Kordon kanı lenfosit, lenfosit alt grupları ve tam kan sayımlarını karşılaştırmak üzere, yaşları 22 ile 35 arasında değişen 16'sı kadın, 17'si erkek toplam 33 gönüllü sağlıklı erişkinin çevre venöz kan örnekleri toplandı.

Kordon kanı progenitör hücre (CD34<sup>+</sup>) sayımlarını karşılaştırmak için, GATF Çocuk Hematolojisi BD kliniğinde allojeneik KİT uygulanmış olan 23 hastanın, yaşları 20-47 arasında değişen vericilerinin kemik iliği hücre sayımları incelendi.

GKK örnekleri, vajinal doğumu takiben ilk 5 dakika içerisinde, umbilikal venin klemplenmesinden hemen sonra, plasenta uterus içindeyken alındı. Umbilikal venden steril şırıngalarla alınan kanın yaklaşık 6 cc'lik kısmı immünofenotipleme için ACD'li (Becton Dickinson) tüplere, yaklaşık 3 cc'lik kısmı ise tam kan sayımı için EDTA K3'lü tüplere (Becton Dickinson) aktarıldı. Hücre canlılığının korunabilmesi için örnekler, kan alımını takiben 1-3 saat içerisinde çalışılmaya başlandı. Sağlıklı erişkin gönüllülerin çevre venöz kanları, aynı şekilde steril şırıngalarla alınarak ACD'li ve EDTA K3'lü tüplere nakledildi ve 1-3 saat içerisinde çalışılmaya başlandı. Allojeneik KİT sağlıklı vericilerinin kemik iliği örnekleri ise, iliak kristallerinden standart prosedürlerle alındı.

GKK ve erişkin çevre kan örneklerinde; CD3<sup>+</sup> (T hücreler), CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup> (T helper/inducer), CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup> (T cytotoxic/suppressor), CD3<sup>+</sup>19<sup>+</sup> (B hücreler), CD3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> (NK hücreler), CD3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> (LGL'ler) hücre oranları ile tam kan sayımları belirlendi. Aynı şekilde GKK ve kemik iliği örneklerinde ise CD34<sup>+</sup> hücre (progenitör hücre) oranına bakıldı. Ayrıca GKK'nda CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> (progenitör hücre), CD34<sup>+</sup>71<sup>-</sup> (progenitör hücre) ve CD34<sup>+</sup>71<sup>+</sup> hücre (eritroid seriye yönlendirilmiş progenitör hücre) oranları da belirlendi. Tüm hücre oranlarının saptanmasında flow cytometry kullanıldı. Flow cytometry analizlerinde CD45 FITC/CD14 PE, IgG<sub>1</sub> FITC/Ig<sub>2a</sub> PE, CD3 FITC/CD19 PE, CD3 FITC/CD4 PE, CD3 FITC/CD8 PE, CD3 FITC/CD16+56 PE monoklonal antikorlarını içeren IMK lenfosit panel kiti (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, 95131 USA) ve CD34 FITC, CD34 FITC/CD38 PE, CD71 FITC/CD34 PE kitleri kullanıldı. IMK lenfosit panel kiti kullanımında; örnekten alınan 1 x 10<sup>6</sup> hücre 20 µl monoklonal antikor ile karıştırılıp 15-30 dakika oda ısısında (20-25 °C); CD34, CD34/CD38, CD71/CD34 kitleri kullanımında ise, 2-8 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler içerisindeki eritrositler, FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) ile karanlıkta inkübe edilerek (en fazla 10 dakika) ortamdan uzaklaştırıldı. Lysing solution ile yıkanmayı takiben bir kez de PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerlerine %1 paraformaldehid içeren PBS'den 500 µl konularak analiz zamanına kadar 2-8 °C'de bekletildi. Değerlendirme aşamasında FACS Calibur model flow cytometry'nin Simultest programı (Becton Dickinson) kullanılarak CD34, CD38, CD71 oranları saptandı. Tam kan sayımları ise otomatik kan sayım cihazı (Medonic CA 610 Cell Analyzer, Sweden) ile yapıldı.

Hücrelerin mutlak sayıları akım sitometri ile elde edilen yüzde değerlerinin, aynı anda otomatik kan sayımı cihazı ile elde edilen toplam hücre sayısı ile çarpılması sonucunda hesaplandı.

Sonuçların istatistiksel analizi, bilgisayarda SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Windows Release 7.5, SPSS Inc., 1996) programı ile yapıldı. Veriler ve sonuçlar tablolar halinde bağımsız iki grubun karşılaştırılması olarak sunuldu. Değişkenlerden dağılıma uyanlar için iki grup arasında farklılık olup olmadığı t-testi (iki ortalama arasındaki farkın önemliliği testi) ile belirlendi. Normal dağılıma uymayan değişkenler için Mann Whitney-U testi ile istatistiksel değerlendirme yapıldı. İstatistik testlerde anlamlılık düzeyi; hücre oranları için 0.05, hücre mutlak sayıları için ise 0.001 olarak alındı. p değeri ile anlamlılık düzeyi gösterildi.

## Bulgular

Çalışma 16'sı kız (%48.5), 17'si erkek (%51.5) bebekten alınan 33 GKK örneği ile tamamlandı. GKK örnekleri; lenfosit ve lenfosit alt grupları açısından 33 erişkin çevre venöz kan örneğiyle; CD34<sup>+</sup> progenitor hücre yönünden ise 23 sağlıklı erişkin kemik iliği örneği ile karşılaştırıldı. Kordon kanında NK hücreler ve LGL'ler 3 olguda, CD34<sup>+</sup> hücreler ise 2 olguda laboratuvar imkansızlıklar nedeniyle çalışılmadı.

Hücre oranlarına bakıldığında 8 parametrenin 5'inde GKK ve erişkin çevre kanı arasında önemli farklılıklar saptandı. T hücre, sitotoksik T hücre ve LGL'ler GKK'da daha düşük oranlarda bulunurken; T helper/suppressor ve B hücre oranları ise daha yüksek oranlarda saptandı (p<0.05) Total lenfosit, T helper ve NK hücre oranları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo I).

GKK'daki CD34<sup>+</sup> hücre oranı (%1.71±1.09), sağlıklı erişkin kemik iliğine oranla (%1.02±0.50) daha yüksek değerde bulundu (p<0.05).

GKK'daki beyaz küre sayılarının yüksekliğinden dolayı, LGL'ler hariç bütün lenfosit alt gruplarının mutlak sayıları, erişkin örneklerine oranla daha yüksek saptandı (p<0.001) (Tablo II).

GKK örnekleri kendi aralarında bebeğin cinsiyetine bağlı farklılıklar yönünden incelendiğinde, cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Örnekler multigravida (22 örnek), primigravida (11 örnek) ve primiparite (13 örnek) açısından incelendiğinde de istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

GKK örneklerinin hepsinde CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>, 30'unda ise CD34<sup>+</sup>71<sup>-</sup> ve CD34<sup>+</sup>71<sup>+</sup> hücre oranları da çalışılarak istatistiksel olarak tanımlayıcı analiz oluşturuldu. Hücre oranları sırasıyla %0.083±0.002, %1.08±0.42, %0.62±0.30 olarak saptandı. CD34 ekspres eden hücreler içerisindeki CD38<sup>-</sup> hücre oranı %4.9±1.2, CD71<sup>-</sup> oranı %62.8±11.9, CD71<sup>+</sup> oranı ise %36.36±8.9 olarak tespit edildi.

## Tartışma

Doğumda immün sistemin fenotipik ve fonksiyonel olarak araştırılması, immün yetmezliklerin ve doğumsal hematolojik hastalıkların erken tanısında büyük değer taşır. Ayrıca intrauterin enfeksiyonların tanısında da lenfosit alt grup değişiklikleri tanısız ve önleyici bilgiler verebilir. Bu sebeple GKK'daki lenfosit alt gruplarının normal değerleri bilinmelidir.

**Tablo I. Göbek kordon kanı ve erişkin çevre venöz kanında lenfosit ve lenfosit alt grup oranlarının karşılaştırılması**

	Göbek kordon kanı		Erişkin çevre kanı		p değeri
	Olgu sayısı (n)	Ortalama (%±SD)	Olgu sayısı (n)	Ortalama (%±SD)	
Lenfositler	33	27.7±6.5	33	26.8±8.4	>0.05
T hücre (CD3 <sup>+</sup> )	33	59.1±11.76	33	73.9±8.09	<0.05
Thelper (CD3 <sup>+</sup> 4 <sup>+</sup> )	33	43.1±10.0	33	44.5±7.7	>0.05
Tsuppressor (CD3 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup> )	33	18.1±5.3	33	26.7±6.6	<0.05
Helper/suppressor oranı	33	2.54±0.87	33	1.82±0.58	<0.05
B hücre (CD3 <sup>+</sup> 19 <sup>+</sup> )	33	12.6±3.6	33	10.8±3.3	<0.05
NK (CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> )	30	14.3±5.6	33	14.8±6.5	>0.05
LGL (CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> )	30	0.27±0.11	33	5.73±2.80	<0.05

**Tablo II. Göbek kordon kanı ve erişkin çevre venöz kanında lenfosit ve lenfosit alt grup mutlak sayılarının karşılaştırılması**

	Göbek kordon kanı		Erişkin çevre kanı		p değeri
	Olgu sayısı (n)	Ortalama (/μl)±SD	Olgu sayısı (n)	Ortalama (/μl)±SD	
Beyaz küre	33	14124±3798	33	5661±1091	<0.001
Lenfosit	33	3935±1709	33	1532±663	<0.001
T hücre (CD3 <sup>+</sup> )	33	2248±831	33	1151±376	<0.001
Thelper (CD3 <sup>+</sup> 4 <sup>+</sup> )	33	1641±626	33	699±219	<0.001
Tsuppressor (CD3 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup> )	33	685±289	33	438±186	<0.001
B hücre (CD3 <sup>+</sup> 19 <sup>+</sup> )	33	482±225	33	166±95	<0.001
NK (CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> )	30	529±268	33	212±98	<0.001
LGL (CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> )	30	10±4	33	90±36	<0.001

Ülkemizde yenidoğan kanındaki lenfosit ve lenfosit alt gruplarının referans değerleri henüz tam olarak oluşturulmamıştır. Bu çalışma, referans değer oluşturma için yeterli örnek sayısı içermese de, takip edecek çalışmalara öncülük edebilir.

Çalışmada, lenfositlerin fenotipik analizleri neticesinde GKK ve erişkin çevre kanı arasında önemli farklılıklar olduğu, kordon kanının, erişkin çevre kanına oranla daha yüksek oranda B lenfosit ve daha düşük oranda T lenfosit içerdiği saptanmıştır. T lenfosit oranındaki düşüklüğün, sitotoksik T lenfosit oranındaki düşüklüğün sonucu olduğu anlaşılmaktadır. Aynı şekilde, GKK T hücre helper/suppressor oranı da, erişkin orana daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar, lenfosit oranlarının doğumdan sonra erişkin hayata kadar değişim gösterdiğini belirten yayınlar ile uyumludur. Yapılan çalışmalarda, B lenfositlerin zamanla azalıp T lenfositlerin arttığı, doğumda 3.0 olan T hücre helper/suppressor oranının 7 aylıkken 1.75'e düştüğü bildirilmiştir (9-11).

Çalışmamızda, MHC'den bağımsız sitotoksik efektör hücre olan LGL'lerin, GKK'da hemen hemen hiç bulunmadığı ve NK hücre oranının erişkin benzer olduğu (%14.3) saptanmıştır. Bir çalışmada, GKK'da NK hücrelerinin sayıca fazla olmasına rağmen aktivasyonlarının düşük olduğu gösterilmiştir (12). Yapılan analizlerde, GKK T lenfositlerinin daha immatür olduğu ve sitotoksik T lenfosit fonksiyonlarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (13). GVHD'nin patofizyolojisinde T lenfositler ve muhtemelen NK hücrelerinin rol oynadığı düşünüldüğünde, GKK transplantasyonlarından sonra düşük oranlarda GVHD görülmesi; bu hücrelerdeki fonksiyon yetersizliği ile açıklanmaktadır (5,14).

Erişkin örneklerde total lenfosit popülasyonu; T lenfosit, B lenfosit ve NK hücre oranlarının toplamıyla oluşturulmaktadır. Oysa kordon kanında bu kriter saptanamamıştır. Bunun sebebi kordon kanındaki NK hücrelerinin üçte birinin CD16 için pozitif, CD57 için negatif olması olabilir. Bu durum NK hücre oranını gerçek seviyelerinden daha düşük bulduğumuza işaret etmektedir. Ayrıca azalmış CD3 (T lenfosit) ekspresyonu, intermediate safhada olgunlaşmış T lenfositlerin varlığını akla getirmektedir (13). Kordon kanında erişkin kanında bulunmayan bir lenfosit alt grubunun var olabileceği de düşünülebilir.

Bebeğin cinsiyeti, annenin grvida ve parite durumları göz önüne alındığında, kordon kanı örneklerinin kendi aralarında anlamlı farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir. Ancak bu durum, çalışmamızda olgu sayısının anlamlı bir fark oluşturmak için yeterli sayıda olmamasından kaynaklanabilir.

KİT sonrası hem kısa süreli, hem de uzun süreli rekonstitüsyon için gerekli hücrelerin CD34 eksprese eden mononükleer hücre popülasyonu içerisinde bulunduğu kabul edilmektedir. Nakil için kullanılan her üç kaynağın (kemik iliği, GKK, MÇK) CD34<sup>+</sup> kök hücre içeriklerinde niceliksel ve niteliksel farklılıklar mevcuttur (15). Çalışmamızda CD34<sup>+</sup> hücre oranı GKK'da %1.72, kemik iliği örneklerinde ise %1.02 olarak saptanmıştır. Daha önceki çalışmalarda bu değerlere yakın sonuçlar bildirilmiştir (16-18). GKK'daki CD34<sup>+</sup> hücre oranı yüksekliğine rağmen, kemik iliğindeki mononükleer hücre sayısının daha fazla olduğu unutulmamalıdır. Kordon kanı transplantasyonlarından sonra görülen yavaş engrafman, kilogram başına düşen daha az sayıda CD34<sup>+</sup> hücre varlığı ile açıklanmaktadır (15).

MÇK kök hücrelerinin, kemik iliğindeki hücrelere oranla trombosit rekonstitüsyonunu daha hızlı oluşturduğu, nötrofil rekonstitüsyonunu da daha başarılı olarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir (19-21). Çevre kanı ile yapılan transplantasyonlarda CD34<sup>+</sup> hücre sayısı ile engrafman başarısı arasında direkt bir ilişki vardır. Aynı ilişki kemik iliği ürünleri için geçerli sayılmaz. Kemik iliği ve MÇK ürünlerinde görülen bu engrafman değişikliklerinin, CD34<sup>+</sup> hücre alt gruplarının kompozisyonu ile yakından ilişkili olduğu sanılmaktadır. Çalışmamızda CD34<sup>+</sup>71<sup>+</sup> hücre (eritroid seriyeye yönelmiş kök hücre) oranı %0.62 olarak belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, bütün CD34<sup>+</sup> popülasyon içindeki CD34<sup>+</sup>71<sup>+</sup> hücre oranı ise %36.26 olarak saptanmıştır (22).

CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> hücreler, lineage-spesifik antijenleri eksprese etmez. İn vitro ortamda miyeloid, lenfoid, eritroid ve megakaryositer seriyeye farklılaşabilir. Hem kordon kanı, hem de kemik iliğinde pluripotent kök hücreye bilinen en yakın hücrelerdir. Ancak bu iki kaynaktaki CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> hücrelerin fonksiyonel farklılıkları belirlenmiştir. Hücre ömrünü araştırmak için yapılan telomeraz uzunluğu ve telomeraz aktivite çalışmaları, erişkin kemik iliğinden elde edilen CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> hücrelerin kordon kanındakilerden daha kısa telomere sahip olduklarını göstermiştir. Bu durum kordon kanı immatür hücrelerinin aşırı çoğalmasını açıklamaktadır (23,24).

KİT'de kullanılan kemik iliği örneği, kordon kanı örneğinden 10-15 kat daha fazla CD34<sup>+</sup> hücre içerir. Ancak kordon kanında 4 kat daha fazla CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> hücre bulunur. Kordon kanındaki CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> hücrelerin klonlaşma etkinlikleri de daha yüksektir (25). Dolayısıyla, kordon kanıyla yapılan KİT daha etkin olabilmektedir. Uzun süreli engrafmanda CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> hücre fraksiyonunun büyük rol oynadığı gösterilmiştir. GKK ile yapılan transplantasyonlarda engrafmanın



daha yavaş olması buna bağlı olabilir. Çalışmamızda kordon kanındaki CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> hücre oranı %0.083; yine bir kök hücre olan CD34<sup>+</sup>71<sup>-</sup> hücre oranı ise %1.08 olarak saptanmıştır. Bu oranlarla uyumlu çalışmalar vardır (17,25,26).

Çalışmamızda tüm CD34 eksprese eden hücre popülasyonu içinde CD38<sup>-</sup> hücreler %4.9, CD71<sup>-</sup> hücreler %63.2 olarak saptanmıştır. Bu oranlar daha önce bildirilmiş olan kemik iliği oranlarından daha fazladır. Bu durum, kordon kanında multipotansiyel progenitör hücre oranının daha fazla olduğuna işaret etmektedir (27).

Çalışmamızı genel olarak değerlendirdiğimizde; yenidoğan bebeklerin immün sisteminin, lenfosit ve lenfosit alt grupları açısından erişkin immün sisteminden sayı ve orantısal olarak farklılıklar içerdiğini, GKK CD34<sup>+</sup> kök hücre oranının, sağlıklı erişkin ilik ürünlerinden daha yüksek olduğunu, GKK CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> hücre oranının, bildirilen kemik iliği oranlarından daha yüksek olduğunu tespit ettik.

Bütün bu bulguların sonucunda, primer immün yetmezliklerin, intrauterin enfeksiyonların ve doğumsal hematolojik hastalıkların erken tanısında yararlanabileceğimiz kordon kanı lenfosit alt grup oranlarıyla ilgili olarak, Türk halkı için referans değerlerin oluşturulmasında ilk adımları attığımız kanısına varılmıştır.

## Kaynaklar

1. Rocha V, Sanz G, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 375-385.
2. Cohen Y, Nagler A. Cord blood biology and transplantation. *Isr Med Assoc J* 2004; 6: 39-46.
3. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174-1178.
4. Gluckman E, Rocha V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy* 2005; 7: 219-227.
5. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 2265-2275.
6. Locatelli F, Rocha V, Reed W, et al. Eurocord Transplant Group. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood* 2003; 101: 2137-2143.
7. Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 2000; 342: 1846-1854.

8. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard score expanded to include extremely premature infant. *J Pediatr* 1991; 119: 417-423.
9. Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, et al. Age related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1992; 120: 216-222.
10. Helderup J, Kalm O, Prellner K. Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children. *Acta Paediatr* 1992; 81: 125-132.
11. Hulstaert F, Hannet I, Deneys V, et al. Age related changes in human blood lymphocyte subpopulations. II. Varying kinetics of percentage and absolute count measurements. *Clin Immunopathol* 1994; 70: 152-158.
12. Bradstock KF, Kuxford C, Grimsley PG. Functional and phenotypic assessment of neonatal human lymphocytes expressing natural killer cell-associated antigens. *Immunol Cell Biol* 1993; 71: 535-542.
13. Rabian-Herzog C, Lesage S, Gluckman E. Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 64-67.
14. Risdon G, Gaddy J, Stehman FB, Broxmeyer HE. Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogenic stimulation. *Cell Immunol* 1994; 154: 14-24.
15. Kinniburgh D, Russell NH. Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 489-494.
16. Reisbach G, Bartke I, Kempkes B, et al. Characterization of hematopoietic cell populations from human cord blood expressing C-kit. *Experiment Hematol* 1993; 21: 74-79.
17. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Zendoli F, Carotenuto M. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 1996; 81: 404-409.
18. Guo R, Ma B, Zou D. Analysis of immunophenotype of hematopoietic stem/progenitor cells in human umbilical cord blood with flow cytometry and its significance. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2001; 22: 426-428.
19. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, et al. Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet* 1992; 339: 640-644.
20. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood* 1987; 69: 255-263.
21. Bender JG, Williams SF, Myers S, et al. Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10: 281-285.
22. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood* 1993; 82: 2664-2672.
23. Hiyama K, Hirayama Y, Kyoizumi S, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995; 155: 3711-3715.

24. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9857-9860.
25. Hao Q-L, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. A functional comparison of CD34+CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 1995; 86: 3745-3751.
26. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 1991; 77: 1218-1227.
27. Van Epps DE, Bender J, Lee W, et al. Harvesting, characterization and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood and cord blood. *Blood Cells* 1994; 20: 411-423.