

# Hiperimmünoglobulin M Sendromunun Akan Hücre Ölçer ile Değerlendirilmesi

## Evaluation of Hyperimmunoglobulin M Syndrome by Flow Cytometry

Suzan Çınar,<sup>1</sup> Metin Yusuf Gelmez,<sup>1</sup> Safa Barış,<sup>2</sup> Elif Karakoç Aydınır,<sup>2</sup> Ahmet Oğuzhan Özen,<sup>2</sup> Hacer Aktürk,<sup>3</sup> Işıl Barlan,<sup>2</sup> Yıldız Camcıoğlu,<sup>4</sup> Günnur Deniz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

<sup>2</sup>*Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

<sup>3</sup>*İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

<sup>4</sup>*İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Klinik İmmünoloji ve Allerji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

### İletişim adresi:

Dr. Suzan Çınar  
İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, 34093 Fatih, İstanbul, Türkiye  
Tel: 0212 - 414 20 00 / 33342

e-posta: suzancinar@yahoo.com

Bu çalışma 2. Uluslararası Moleküler İmmünoloji & İmmünojenetik Kongresi (MIMIC II)'de poster bildirisi olarak sunulmuştur (27-30 Nisan 2014, Antalya, Türkiye).

©2015 Turkish Journal of Immunology.  
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2015.417

Geliş tarihi: 13 Temmuz 2015  
Kabul tarihi: 19 Ağustos 2015

**Amaç:** Bu çalışmada hiperimmünoglobulin M (HIGM) sendrom şüphesi olan hastalarda akan hücre ölçer ile elde edilen CD40 ve CD40L ekspresyon bulguları tartışıldı.

**Hastalar ve yöntemler:** Mayıs 2009 - Şubat 2014 tarihleri arasında 12 erkek (dağılım 4 ay - 20 yıl) ve sekiz kadın (dağılım 2 ay - 28 yıl) hastada CD40 analizi; sekiz erkek (dağılım 11 ay - 20 yıl) hastada ise CD40 ligand (CD40L) analizi yapıldı. Periferik kan mononükleer hücre (PBMC) örnekleri anti-CD19, -CD45, -CD20 ve -CD40 ile işaretlendi ve CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> hücreler akan hücre ölçer cihazında saptandı. X'e bağlı HIGM sendromu tanısı için, izole edilen PBMC'ler dört saat forbol miristat asetat ve ionomisin ile kültürlendi ve ardından CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> hücreler akan hücre ölçer cihazı ile analiz edildi.

**Bulgular:** Sağlıklı kontrollere göre bir kadın hastada düşük CD40 (%0.09) ve üç erkek hastada düşük CD40L (sırasıyla %0.03, %2.7 ve %4) ekspresyonu gözlemlendi.

**Sonuç:** Akan hücre ölçer HIGM sendromu tanısında hızlı ve güvenilir bir yöntem olmasına rağmen, kesin tanı için ayrıca genetik testlere ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Otozomal resesif; CD 40 ligand; CD40; akan hücre ölçer; hiperimmünoglobulin M sendromu; X'e bağlı genetik hastalık.

**Objectives:** In this study, we discuss CD40 and CD40L expression findings in hyperimmunoglobuline M (HIGM) syndrome suspected patients obtained by flow cytometry.

**Patients and methods:** Between May 2009 and February 2014, CD40 analysis was performed in 12 male (range, 4 months to 20 years) and eight female patients (range, 2 months to 28 years) and CD40 ligand (CD40L) analysis in eight male patients (range, 11 months to 20 years). Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples were stained with anti-CD19, -CD45, -CD20 and -CD40 monoclonal antibodies and CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> cells were detected in the flow cytometer. For the diagnosis of X-linked HIGM syndrome, isolated PBMCs were cultured in phorbol myristate acetate and ionomycin for four hours and then CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD40L<sup>+</sup> cells were analyzed by flow cytometry.

**Results:** Compared to the healthy controls, low CD40 expression in one female patient (0.09%) and low CD40L expression in three male patients (0.03%, 2.7% and 4%, respectively) were observed.

**Conclusion:** Although flow cytometry is a quick and reliable method in the diagnosis of HIGM syndrome, additional genetic testing is required to establish the definite diagnosis.

**Key words:** Autosomal recessive; CD40 ligand; CD40; flow cytometry; hyperimmunoglobulin M syndrome; X linked genetic disease.

Primer immün yetmezlik hastalıkları bir başka deyişle doğumsal immün yetmezlik bozuklukları tekrarlayan enfeksiyonlar ile seyreden hastalıklardır.<sup>[1,2]</sup> Görülme sıklığı gelişmiş ülkelerde 1/10.000 ile 1/100.00 arasında değişmekle birlikte, akraba evliliği sık gözlemlendiği ülke-

mizde kesin olmasa da insidansının daha fazla olduğu tahmin edilmektedir.<sup>[3]</sup> İzotip dönüşümündeki sinyal ileti yolağında yer alan moleküllerdeki kusurların neden olduğu serum İmmünoglobulin (Ig) A, IgG seviyelerinde azalma ile ortaya çıkan, primer immün yetmezlik

olgularının az bir kısmını oluşturan hiperimmünoglobulin M (HIGM) sendromu kalıtsal heterojen bir hastalıktır.<sup>[4-6]</sup> İlk altı ayda anneden gelen koruyucu antikorların etkisi ile klinik belirtiler gözlenmez iken, altıncı aydan itibaren hastalarda serum Ig düzeylerinde azalma ile birlikte tekrarlayan bakteriyel ve *Pneumocystis carinii* (*jirovecii*) gibi fırsatçı enfeksiyonlara yatkınlık, bazen ağır ve kronik ishal gözlenir.<sup>[7]</sup> İmmünoglobulin M'den diğer sınıf Ig'lere izotip dönüşüm (CSR: class switch recombination) mekanizmasında işlev gören CD40/CD40Ligand (CD40L veya CD154) yolağında meydana gelen defektler bu hastalığa neden olur.<sup>[6,8]</sup> CD40L geninde meydana gelen mutasyon X'e bağlı veya CD40, aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AID) ve urasil nükleotid glikozilazın (UNG) genlerindeki defekt ile otozomal resesif geçiş gösterebilir.<sup>[8,9]</sup> Primer immün yetmezlik ön tanısı almış olan hastalarda ciddi enfeksiyonlar ortaya çıkmadan önce tanıyı hızlı bir şekilde laboratuvar bulguları ile desteklemek oldukça önemlidir. Aile öyküsünün ve klinik özelliklerin iyi değerlendirilmesi hastalığın erken tanısı için bilgi vericidir.<sup>[3]</sup> 1950'li yıllardan beri sürekli geliştirilen, araştırma ve klinik laboratuvarların vazgeçilmez tekniklerinden biri olan akan hücre ölçer, immün yetmezliklerin tanısının konmasında oldukça değerli bilgiler vermektedir.<sup>[10]</sup> Bu çalışmada 2009-2014 yılları arasında HIGM sendrom tanısı olarak laboratuvarımıza başvuran hastalarda CD40 ve CD40L ekspresyonlarının akan hücre ölçer bulguları sunulmuştur.

## HASTALAR VE YÖNTEMLER

### Hasta grubu

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi İstanbul ve Cerrahpaşa Tıp Fakülteleri ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı tarafından takibi yapılan HIGM ön tanısı almış hastalar dahil edildi. CD40 analizi için 12 erkek ve sekiz kız (2 ay - 28 yıl), CD40L analizi için sekiz erkek (11 ay - 20 yaş) toplam 20 olgu çalışıldı. Her çalışmaya deney kontrolü olarak sağlıklı birey örnekleri eklendi. Çalışmaya katılan hasta (reşit olmayan çocuklar için veli veya vasileri) ve gönüllüler yapılacak işlem hakkında bilgilendirildi ve bilgilendirilmiş hasta onamları yazılı olarak alındı.

### B hücrelerinde CD40 ekspresyonunun Akan hücre ölçer ile analizi

Hastalardan alınan periferik kan örneklerinde CD40<sup>+</sup> ve CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> hücreler, anti-CD19 allofikosiyanın (APC), anti-CD45 peridinin klorofil (PerCP), anti-CD20 floresan izotiyosiyanat (FITC, BD-Biosciences, ABD) ve anti-CD40 fikoeritrin (PE, BD-Pharmingen, ABD) monoklonal antikorları kullanılarak tam kan lizis yöntemi

ile saptandı.<sup>[11]</sup> İzotip kontrol olarak FITC, PE, PerCp ve APC işaretli fare IgG1 veya IgG2a (BD-Biosciences, San Jose, CA, ABD) kullanıldı. Antikor ile 20 dakika karanlıkta inkübe edilen periferik kan örnekleri 2 mL lize edici solüsyon (x1, BD-Biosciences, San Jose, CA, ABD) ile 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek eritrositlerin lizisi sağlandı. Hücreler fosfat tuzlu tampon (phosphate buffered saline, PBS) çözeltisi ile 1800 rpm'de beş dakika iki kez yıkandı. Analizler CellQuest (BD-Biosciences, San Jose, CA, ABD) yazılımı kullanılarak FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, ABD) akan hücre ölçer cihazı ile yapıldı. Negatif kontrol CD40 monoklonal antikorun kullanılmadığı floresans eksi bir (fluorescence minus one, FMO) tekniği ile saptandı.<sup>[12]</sup> Pozitif kontrol olarak CD40 monoklonal antikorun kullanıldığı sağlıklı bireylere ait örnekler kabul edildi. Hastalara ait örneklerdeki CD40 ekspresyonunun (lenfosit kapısında CD40<sup>+</sup> ve CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> hücreler) azalması veya eksikliği eş zamanlı çalışılan sağlıklı birey örneklerinden elde edilen bulgulara (pozitif kontrol) göre belirlendi.

### Uyarılmış T hücrelerinde CD40L ekspresyonunun akan hücre ölçer ile analizi

Periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) heparinize kandan ficoll gradyan santrifüj yöntemi ile izole edildi. Fosfat tuzlu tampon çözeltisi ile 1:1 sulandırılan kan ficoll üzerine yayıldı, 1800 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. İnterfazda toplanan PKMH'ler PBS çözeltisi ile 1800 rpm'de beş dakika iki kez yıkandı. Kuyu başına 3x10<sup>5</sup> PKMH olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür plaklarına eklendi, uyarımsız veya forbol miristat asetat (PMA, Sigma, final konsantrasyon: 20 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ve ionomisin (Santa Cruz, final konsantrasyon: 1 µg/mL) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas ABD) uyarınları ile 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'lik etüvde dört saat inkübe edildi. Kültür sonrası iki kez PBS ile yıkandı. Hücreler anti-CD3 PE siyanin 5 (PECy5), anti-CD8PE (BD-Biosciences, San Jose, CA, ABD), anti-CD69APC ve anti-CD40LFITC (BD-Pharmingen, San Diego, CA, ABD) monoklonal antikorlar ile 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek boyandı.<sup>[11,13]</sup> İzotipik kontrol olarak CD40 ekspresyonunun tayininde kullanılan monoklonal antikorlardan faydalanıldı. Fosfat tuzlu tampon ile bir kez yıkandıktan sonra CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD40L<sup>+</sup> hücre oranları FACSCalibur cihazında CellQuest yazılımı ile saptandı. Uyarılmış PKMH örneklerinde artan CD69 ekspresyonu uyarımın başarılı olduğunu gösterdi, aksi durumlarda deney tekrarlandı. CD40L ekspresyon değerlendirmesinde sağlıklı bireylere ait uyarılmamış PKMH negatif kontrol; yine sağlıklı bireylere ait PMA-ionomisin ile uyarılmış PKMH pozitif kontrol olarak kabul edildi. Hastalara ait örneklerdeki CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD40L<sup>+</sup> hücre oranlarının azalması veya eksikliği pozitif ve negatif kontrole göre belirlendi.

## BULGULAR

### CD40 bulguları

Otozomal resesif geçişli HIGM ön tanısı ile gelen 12 erkek ve sekiz kız hastanın örneklerinde CD40<sup>+</sup> ve CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> hücrelerin varlığı akan hücre ölçer ile araştırıldı. Sağlıklı bireylere ait örneklerde lenfosit popülasyonunda CD40<sup>+</sup> ve CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> hücre oranları karşılaştırıldı (Tablo 1). Sadece altı yaşında bir kız (YB) hastada lenfositlerdeki CD19<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> ve CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> hücre oranlarının sırasıyla %7.00, %0.09 ve %0.02); CD40 ekspresyon eden B hücrelerinin oranının ise %0.02 olduğu, sonuç olarak B hücrelerinde CD40 ekspresyonunun bulunmadığı belirlendi (Şekil 1). Sık tekrarlayan enfeksiyon öyküsü ile birlikte ataksi telenjiyektazi (AT) klinik bulguları gözlenen olguda IgG ve IgA düzeyleri düşük, IgM düzeyi oldukça yüksek düzeyde saptandı (Tablo 2).<sup>[14]</sup> Lenfosit kapısı içinde CD19<sup>+</sup> B lenfosit, CD40 ve CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> ekspresyonu sırası ile %3.60, %1.87 ve %0.76 olan üç aylık kız kardeşinde (KB) ise B hücrelerinde CD40 ekspresyonu %21.11 olarak kabul edildi. Bir başka kız olguda (SK, 28 yaş) lenfositler içindeki B hücre oranı %0.37, CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> hücre oranı ise %0.15 olarak gözlemlendi. B hücre popülasyonu içinde CD40 taşıyan hücrelerin oranı ise %40.54 olarak hesaplandı.

### CD40L bulguları

Hiperimmünoglobulin M sendrom düşünülen sekiz olguda X'e bağlı geçiş, akan hücre ölçer yöntemi ile uya-

rım sonrası artmayan veya saptanmayan CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD40L<sup>+</sup> hücreler ile kesinleştirildi. CD4 aktivasyonunu göstermek amacı ile sağlıklı bireylerde CD40L ve CD69, hasta olgularda CD69 ekspresyonlarındaki artış deney iç kontrolü olarak kullanıldı (Şekil 2). Olguların üçünde uyarım sonrası CD40L ekspresyon düzeyinin düşük olduğu gözlemlendi (%0.03, %2.7 ve %4, Tablo 3).

## TARTIŞMA

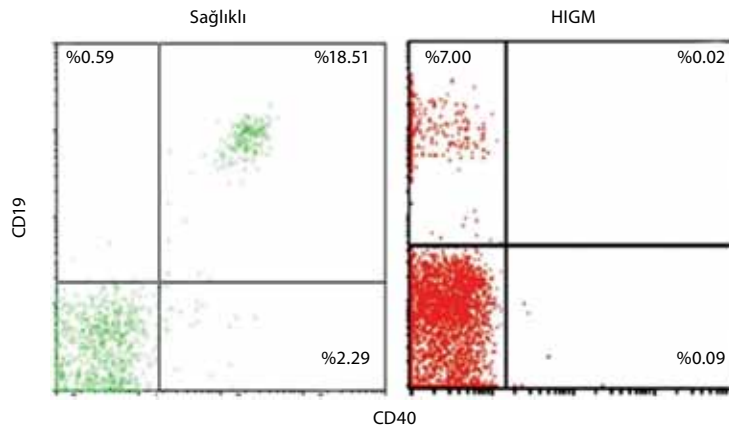
İmmünoglobulin A ve IgG düzeylerinin düşük, IgM düzeyinin ise normal ya da artmış olması HIGM sendromu tanısı için yeterli bulgu olmakla birlikte, tekrarlayan enfeksiyonların nedeninin araştırılması veya HIGM sendromu tanısı almış bir hastanın yakın akrabalarının da taranması klinik tanıyı koydurmaktadır.<sup>[7]</sup> *In vitro* uyarılan CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde CD40L molekülünün akan hücre ölçer ile gösterilememesi X'e bağlı HIGM sendromu tanısını doğrulamaktadır. Ayrıca CD40L genindeki moleküler defektler mutasyon analizi çalışmaları ile de tanımlanabilmektedir.<sup>[15]</sup> Eğer hasta X'e bağlı HIGM sendromunun tüm özelliklerini göstermesine rağmen cinsiyeti kadın ve CD40L ekspresyonu normal ise otozomal resesif formdan şüphelenilmelidir.<sup>[15]</sup> Hiperimmünoglobulin M sendromunun Burtin<sup>[16]</sup> ile Rosen ve ark.<sup>[18]</sup> tarafından 1961 yılında tanımlanmasından 1990 yılına kadar 37 olgu; 1990 yılında da Benkerrou ve ark.<sup>[17]</sup> tarafından 12 olgu bildirilmiştir. Hiperimmünoglobulin M sendromunun tüm primer immün yetmezliklerin %2'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir.<sup>[19]</sup> Sri Lanka'dan 73 immün

**TABLO 1**

Hiperimmünoglobulin M sendrom tanılı olguların CD19 ve CD40 ekspresyon (%) sonuçları

| Hasta | Yaş (yıl)/cinsiyet | Lenfosit bölgesinde (%) |                   |                                     |
|-------|--------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------------------|
|       |                    | CD19 <sup>+</sup>       | CD40 <sup>+</sup> | CD19 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> |
| ESA   | 11 (ay)/E          | 66.61                   | 54.51             | 54.51                               |
| AFS   | 15/E               | 6.87                    | 10.76             | 5.95                                |
| MA    | 12/E               | 13.50                   | 13.17             | 12.27                               |
| YEY   | 1/E                | 11.33                   | 8.18              | 4.29                                |
| OÜ    | 4 (ay)/E           | 2.01                    | 3.12              | 0.97                                |
| ME    | 3/E                | 14.83                   | 5.18              | 4.35                                |
| ÖÇ    | N/A/E              | 8.66                    | 9.48              | 5.60                                |
| AO    | 3/E                | 11.74                   | 11.11             | 10.06                               |
| AO    | 16/E               | 10.35                   | 11.51             | -                                   |
| NO    | 11/E               | 6.8                     | 9.19              | 4.54                                |
| YBY   | 2/E                | 22.38                   | 6.90              | 5.26                                |
| İT    | 20/E               | 6.59                    | 3.22              | 3.04                                |
| YB    | 6/K                | 7.00                    | <b>0.09</b>       | <b>0.02</b>                         |
| KB    | 3 (ay)/K           | 3.60                    | 1.87              | 0.76                                |
| SA    | 2/K                | 15.66                   | 15.54             | 14.64                               |
| MZÇ   | 2 (ay)/K           | 3.89                    | 3.99              | 3.47                                |
| SK    | 28/K               | 0.37                    | 0.92              | 0.15                                |
| RT    | N/A/K              | 18.54                   | 18.06             | 17.13                               |
| TD    | 27/K               | 10.33                   | 9.58              | 8.99                                |
| ME    | 2/K                | 18.61                   | 20.20             | 18.60                               |

N/A: Bilgi yok; E: Erkek; K: Kadın.



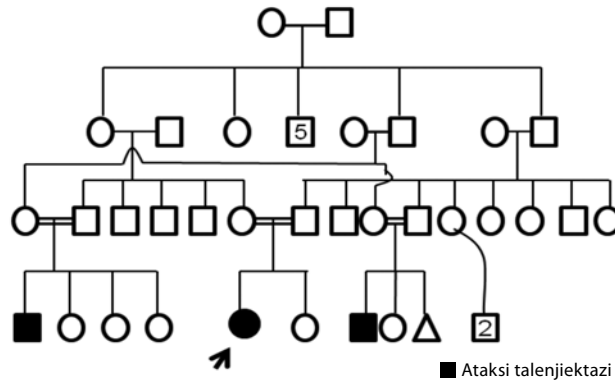
**Şekil 1.** Sağlıklı ve CD40 negatif HIGM sendromlu olguda (YB) lenfositlerin CD19 ve CD40 ekspresyonunu gösteren akan hücre ölçer noktalı çizim çıktıları. HIGM: Hiperimmünoglobulin M sendromlu olgu.

yetmezlikli hastadan beşinin (%6.85) olasılıkla HIGM sendromlu olduğu rapor edilmiştir.<sup>[20]</sup> Ülkemizde de Ersoy ve ark.<sup>[21]</sup> 1990'da HIGM sendromlu sekiz olgu bildirmişlerdir. Yorulmaz ve ark.<sup>[2]</sup> primer immün yetmezlikli 1054 olgunun retrospektif değerlendirmesini yaptıkları çalışmada sadece bir HIGM sendrom olgusu (%0.09) bildirmişlerdir. Karakoç Aydın ve ark.<sup>[22]</sup> dört HIGM (3 erkek, 1 kız) olgusunda CD40L ekspresyonunu sadece kız olguda saptar iken, CD40 ekspresyonunun tüm olgularda normal

düzeylerde olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda primer immün yetmezlikler içinde HIGM sendromu olgularının prevalansını bildirmek zordur, ancak HIGM sendrom tanısı konmuş olgularda X'e bağlı (CD40L ekspresyonu yapmayanlar) ve otozomal (CD40L ekspresyonu yapanlar) ayırımını yapmak mümkündür. Sekiz erkek olgudan üçünde X'e bağlı geçiş (%37.5) olduğu düşünülmektedir. Kızlarda ise otozomal geçiş söz konusudur. Burada otozomal HIGM

**TABLO 2**

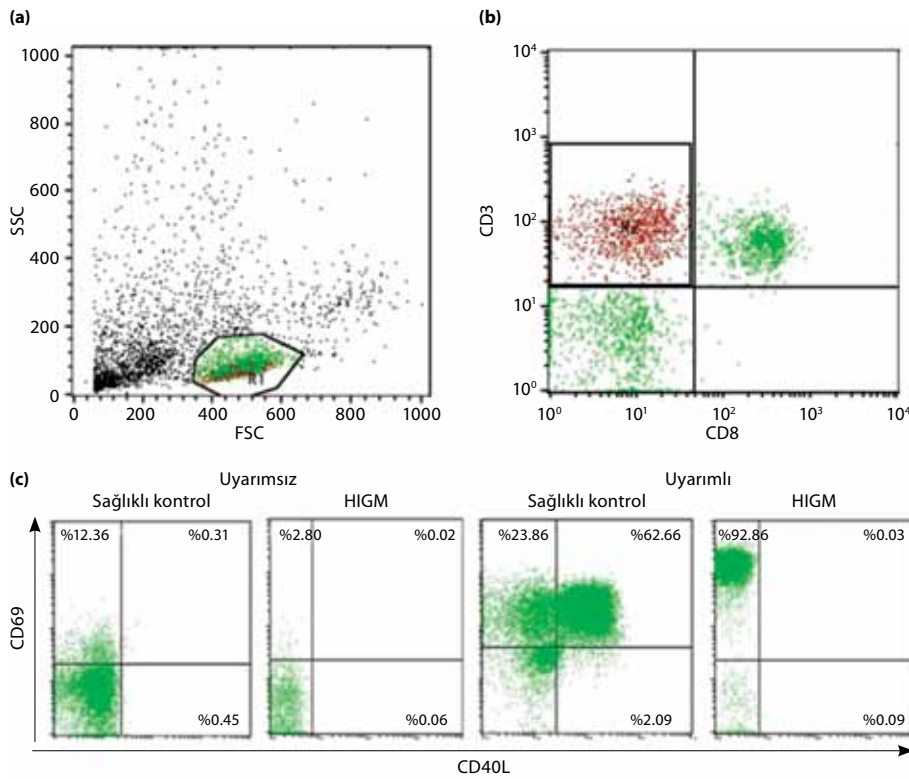
CD40 negatif HIGM sendrom olgusuna (YB 6K)\* (a) ait aile ağacı ve (b) klinik bulgular



**Klinik veriler**

|                                 |                      |
|---------------------------------|----------------------|
| Enfeksiyon                      | Var                  |
| Bronşiektazi                    | Var                  |
| Büyüme geriliği                 | Var                  |
| Diğer tanı                      | Ataksi talenjiektazi |
| Serum Ig düzeyi (normal değer)* |                      |
| IgM (44-181 mg/dL)              | 1013 mg/dL           |
| IgG (592-1402 mg/dL)            | 97 mg/dL             |
| IgA (20-177 mg/dL)              | 30 mg/dL             |

\* 6-7 yaş/kız<sup>[14]</sup>



**Şekil 2.** CD40L ekspresyonu kapılama stratejisi: **(a)** SSC/FSC lenfosit bölgesi (R1), **(b)** Lenfosit kapısında CD4<sup>+</sup> hücreler (R2, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> hücreler), **(c)** Hasta ve sağlıklı kontrolde CD4<sup>+</sup> hücrelerde CD69 ve CD40L ekspresyonunu gösteren akan hücre ölçer noktali çizim çıktıları.

sendromuna neden olabilecek CD40 yüzey belirtecinin eksikliği araştırılmıştır. CD40 ekspresyonu yapmayan ve yapanlar diye ayrıldığında; kızlarda %12.50 (1/8), bütün olgular içinde CD40 ekspresyonu yapmayanlar %8.33 (1/12) oranındadır.

Hiperimmünoglobulin M sendromu tanısı alan hastalarda akan hücre ölçer cihazı ile CD4, CD8 ve CD45 ekspresyonlarını saptayan Şentürk ve Oğuz<sup>[7]</sup> çalışmalarında CD40 ve CD40L ekspresyonlarını incelememişlerdir. Çalışmamızda CD40 ve CD40L eksprese eden B ve T lenfositleri uygun belirteçler ile işaretlenmiş ve akan hücre ölçer cihazı ile değerlendirildi. Karaca ve ark.<sup>[23]</sup> çalışmalarında yedi olgunun yedisinde de CD40 geninde mutasyon tespit ettiklerini, bunların beşinde akan hücre ölçer ile CD40 ekspresyon eksikliği gözlemlediklerini bildirmişlerdir. İki kardeş olguda ise B hücre yüzeyinde saptanan işlevi olmayan, uzun ve mutasyonlu CD40 molekülü akan hücre ölçer ile yanlış sonuç elde edilebileceğine dikkat çekilmiştir. Çalışmamızda genetik araştırmalar ile mutasyon analizi yapılmadı.

Hiperimmünoglobulin M sendromunun ayırıcı tanısında serumda IgM yüksekliği ile giden HIGM sendromu fenotipi gösteren AT (ATM geni de CSR'de önemli rol oynamaktadır); Konjenital Rubella (CD40 düşüktür);

MHC sınıf-2 eksikliği (CD40L düşüktür); mikrosefali, mental retardasyon, immün yetmezlik ile giden sendromlar gibi diğer bozukluklar dikkate alınmalıdır.<sup>[24]</sup> Genel ve ark.nın<sup>[25]</sup> çalışmasında, erkek AT olgusunda CD40L ekspresyonu değerlendirilmiş, CD40 ekspresyonu hakkında bilgi verilmemiştir. Çalışmamızda incelenen olgu kadın cinsiyette olduğu için CD40 ekspresyonu değerlendirilmiş ve anlatımın olmadığı, B hücre sayısı oldukça düşük olan küçük kız kardeşinde ise CD40 ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir. Kesin tanı için moleküler yöntemler ile akan hücre bulgularının desteklenmesi gerekmektedir.

B ve T lenfositleri arasında CD40-CD40L etkileşimi B hücre içerisinde ilgili sinyal yollarını harekete geçirecek, Ig izotip dönüşümü için anahtar enzim olan AID ve UNG'nin aktif hale gelmesini sağlar.<sup>[26,27]</sup> İmmünglobulin sabit gen bölgelerinde DNA kırıkları yaratarak IgM'den diğer sınıf Ig dönüşümlerinin gerçekleşmesini sağlayan AID ve UNG enzimlerinin eksikliklerinde de HIGM sendromu görülebilmektedir.<sup>[9,28]</sup> Bu nedenle, HIGM'li hastalarda sinyal yollarını aktive ederek izotip dönüşümünde rol oynayan CD40 ve CD40L gibi yüzey moleküllerinin yanı sıra hücre içinde enzim düzeylerinin incelenmesi hastalığın tanısında önemli yer tutmaktadır.<sup>[29,30]</sup> Çalışmamızda HIGM sendromu olguları sadece CD40L ve CD40 ekspresyonu açısından değerlendirilmiş-



TABLO 3

Hiperimmünoglobulin M sendrom tanılı olguların uyarımlı ve uyarımsız CD40L ekspresyon (%) sonuçları

| Hasta            | Yaş (yıl)/cinsiyet | Uyarım | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD40L <sup>+</sup> | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD69 <sup>+</sup> |
|------------------|--------------------|--------|---|--|
| ESA              | 11 (ay)/E          | Yok    | 0.08  | 2.82   |
|                  |                    | Var    | <b>0.03</b>   | 92.86  |
| MA               | 12/E               | Yok    | 0.11  | 1.55   |
|                  |                    | Var    | 21.47   | 21.59  |
| YFY              | 1/E                | Yok    | 0.90  | 3.00   |
|                  |                    | Var    | 17.40   | 18.00  |
| AO               | 3/E                | Yok    | 7.61  | 0.32   |
|                  |                    | Var    | 9.31  | 16.00  |
| AO               | 16/E               | Yok    | 0.47  | 3.00   |
|                  |                    | Var    | <b>2.71</b>   | 14.41  |
| NO               | 11/E               | Yok    | 1.00  | 3.00   |
|                  |                    | Var    | <b>4.00</b>   | 14.25  |
| YBY              | 2/E                | Yok    | 0.11  | 1.94   |
|                  |                    | Var    | 30.92   | 92.58  |
| İT               | 20/E               | Yok    | 1.67  | 16.74  |
|                  |                    | Var    | 27.42   | 71.98  |
| Sağlıklı kontrol | 33/E               | Yok    | 0.12  | 2.79   |
|                  |                    | Var    | 33.39   | 98.01  |

E: Erkek.

tir. CD40 ekspresyonu gözlenen beş kız, CD40 ve CD40L ekspresyonu olan beş erkek olguda bu sinyal yolağında rol alan moleküllerin düzeyleri bilinmemekte ve bu konuda ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bulgularımız HIGM sendromu olguları içinde CD40L ve CD40 ekspresyonu eksikliğinin oranını göstermesi açısından önem taşımaktadır.

Akan hücre ölçer, primer immün yetmezlik tanılarının kesinleştirilmesi açısından vazgeçilmez tekniklerinden birisidir.<sup>[10]</sup> Özellikle HIGM sendromunun tanısında akan hücre ölçer hızlı ve önemli bir testtir. Akan hücre ölçer ile yapılan taramalar ile protein ve enzimlerin eksikliğinin gösterilmesi mutasyonları işaret etmektedir. İzotip dönüşüm yolağındaki diğer protein ve enzimlerin de HIGM sendromu tanı testlerine katılması otozomal geçiş gösteren alt tipleri belirleyecek; daha pahalı ve zahmetli moleküler yöntemler ile mutasyon analizi yapılacak hedef genlerin seçilmesini sağlayarak ülkemiz kaynaklarının doğru kullanılmasını sağlayacaktır.

### Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

### Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

### KAYNAKLAR

- Odek C, Kendirli T, Doğu F, Yaman A, Vatansever G, Cipe F, et al. Patients with primary immunodeficiencies in pediatric intensive care unit: outcomes and mortality-related risk factors. *J Clin Immunol* 2014;34:309-15.
- Yorulmaz A, Artaç H, Kara R, Keleş S, Reisli İ. Primer immün yetmezlikli 1054 olgunun retrospektif değerlendirilmesi. *Astım Allerji İmmünoloji* 2008;6:127-34.
- Turul T, Tezcan İ. Primer immün yetmezlik hastalıklarına yaklaşım. *STED* 2003;12:253-7.
- Hoeger PH, Mayer L. Expansion of a suppressor T-cell population associated with the hyper-IgM syndrome and generalized lymphadenopathy. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;60:118-27.
- Levitt D, Haber P, Rich K, Cooper MD. Hyper IgM immunodeficiency. A primary dysfunction of B lymphocyte isotype switching. *J Clin Invest* 1983;72:1650-7.
- Duarte-Rey C, Bogdanos DP, Leung PS, Anaya JM, Gershwin ME. IgM predominance in autoimmune disease: genetics and gender. *Autoimmun Rev* 2012;11:A404-12.
- Şentürk Ö, Oğuz A. Hiperimmünglobulin M sendromu (Vaka Takdimi). *T Klin İmmünol Romatol* 2003;3:70-3.
- Al-Saud BK, Al-Sum Z, Alassiri H, Al-Ghoniaim A, Al-Muhsen S, Al-Dhekri H, et al. Clinical, immunological, and molecular characterization of hyper-IgM syndrome due to CD40 deficiency in eleven patients. *J Clin Immunol* 2013;33:1325-35.
- Uygunil B, Bonilla F, Lederman H. Evaluation of a patient with hyper-IgM syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1692-3.e4.
- Taneli F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2007;5:75-82.
- O'Gorman MR. Role of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of primary immunodeficiency disease. *Clin Lab*

- Med 2007;27:591-626.
12. O'Gorman M, Paul R. Scholl role of flow cytometry in the diagnostic evaluation of primary immunodeficiency disease. *Clin Appl Immunol Rev* 2002;2:321-35.
  13. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 2001;45:194-205.
  14. Stoop JW, Zegers BJ, Sander PC, Ballieux RE. Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults. *Clin Exp Immunol* 1969;4:101-12.
  15. Kracker S, Gardes P, Mazerolles F, Durandy A. Immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Clin Immunol* 2010;135:193-203.
  16. Burtin P. An example of atypical agammaglobulinemia (a case of severe hypogammaglobulinemia with increase of the beta-2 macroglobulin. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1961;6:286-9. [Abstract]
  17. Benkerrou M, Gougeon ML, Griscelli C, Fischer A. Hypogammaglobulinemia G and A with hypergammaglobulinemia M. Apropos of 12 cases. *Arch Fr Pediatr* 1990;47:345-9. [Abstract]
  18. Rosen FS, Kevy SV, Merler E, Janeway CA, Gitlin D. Recurrent bacterial infections and dysgamma-globulinemia: deficiency of 7S gamma-globulins in the presence of elevated 19S gamma-globulins. Report of two cases. *Pediatrics* 1961;28:182-95.
  19. Üner G, Çekiç Ş, Kılıç Gültekin SŞ. Hiperimmünglobulin M sendromu. *Güncel Pediatri* 2014;1:81-7.
  20. de Silva NR, Gunawardena S, Rathnayake D, Wickramasingha GD. Spectrum of primary immunodeficiency disorders in Sri Lanka. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2013;9:50.
  21. Ersoy F, Sanal O, Tezcan I. Clinical and immunological aspects of hyper-IgM syndrome. *Turk J Pediatr* 1990;32:13-20.
  22. Karakoç Aydın E, Özdemir C, Keleş S, Barış S, Adın Çınar S, Deniz G ve ark. Hiperimmünglobulin M sendromlu olguların uzun dönem izlemi. *Asthma Allergy Immunol* 2010;8:101-7.
  23. Karaca NE, Forveille M, Aksu G, Durandy A, Kutukçuler N. Hyper-immunoglobulin M syndrome type 3 with normal CD40 cell surface expression. *Scand J Immunol* 2012;76:21-5.
  24. Geha RS, Plebani A, Notarengelo LD. CD40, CD40 Ligand and the Hyper IgM Syndrome. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, editors. *Primary Immunodeficiency Diseases: a molecular and genetic approach*. New York: Oxford University Press; 2007. p. 251-68.
  25. Genel F, Aksu G, Öztürk C, Kütükçüler N. Ataksi-telenjektazinin nadir bir prezantasyonu: monoklonal IgM artışı ile seyreden immün yetersizlik (Olgu Sunumu). *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2003;4:23-5.
  26. Barreto VM, Magor BG. Activation-induced cytidine deaminase structure and functions: a species comparative view. *Dev Comp Immunol* 2011;35:991-1007.
  27. Basu U, Franklin A, Schwer B, Cheng HL, Chaudhuri J, Alt FW. Regulation of activation-induced cytidine deaminase DNA deamination activity in B-cells by Ser38 phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 2009;37:561-8.
  28. Nagaoka H, Tran TH, Kobayashi M, Aida M, Honjo T. Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity. *Int Immunol* 2010;22:227-35.
  29. Catalan N, Bustamante J, Tezcan İ, Ersoy F, Kayserili H, Sanal Ö, et al. The autosomal recessive HIGM2 syndrome is due to mutation in activation induced cytidine deaminase (AID) gene. *Turk J Immunol* 2001;6:5-14.
  30. Imai K, Catalan N, Plebani A, Maródi L, Sanal O, Kumaki S, et al. Hyper-IgM syndrome type 4 with a B lymphocyte-intrinsic selective deficiency in Ig class-switch recombination. *J Clin Invest* 2003;112:136-42.