

## Klinik ve Laboratuvar Özellikleri ile Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom Düşünülen Hastalarda Apoptoz

### *Apoptosis in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Suspected Patients with Clinical and Laboratory Findings*

Baran Erman,<sup>1</sup> Deniz Ayvaz Çağdaş,<sup>1</sup> Ayşe Metin,<sup>2</sup> İlhan Tezcan,<sup>1</sup> Özden Sanal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Pediatrik İmmünoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim Araştırma Hastanesi, İmmünoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

#### İletişim adresi:

Uzm. Bio. Baran Erman  
Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Pediatrik İmmünoloji Kliniği, 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye.  
Tel: +90 312 - 305 11 67

e-posta: baranerman@gmail.com

©2013 Turkish Journal of Immunology.  
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2013.106

Geliş tarihi: 13 Haziran 2011

Kabul tarihi: 06 Mart 2013

**Amaç:** Bu çalışmada, otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) düşünülen hastalarda Fas aracılı lenfosit apoptoz mekanizmasında bozukluk olup olmadığı araştırıldı.

**Hastalar ve yöntemler:** Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nin İmmünoloji Ünitesi tarafından takip edilen, klinik ve laboratuvar bulguları ile olası ALPS tanısı ile izlenen 27 hasta (15 erkek, 12 kız; ort. yaş 12.9±2.6 yıl; dağılım 4-45 yıl) ile heterozigot Fas mutasyonu kanıtlanmış ve ALPS-Fas tanısı konulmuş dört kız hasta (ort. yaş 12±11.2 yıl; dağılım 3-27 yıl) ve 30 sağlıklı birey çalışmaya alındı. Periferik mononükleer hücreler yeni alınmış kandan heparinli ficoll-histopaque yoğunluk gradyanı santrifüj yöntemi kullanılarak izole edildi. Bu hücreler 12 gün boyunca phytohemagglutinin (PHA) ve interlekin-2 ile aktive edildi. Takiben ek 48 saat için anti-Fas monoklonal antikorunu kullanılarak hücre kültürü yapıldı. Kırk sekiz saat sonunda hücreler tripan mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda apoptotik hücre sayımı yapıldı.

**Bulgular:** Otoimmün lenfoproliferatif sendrom-Fas tanılı dört hastada Fas aracılı lenfosit apoptoz mekanizmasının defektif olduğu saptandı. Olası ALPS şüphesi ile izlenen hastalar ve kontrollerde ise Fas aracılı apoptoz normal idi.

**Sonuç:** Elde ettiğimiz sonuçlara göre, fonksiyonel apoptoz testi, Fas mutasyonu olan hastaların belirlenmesinde ve bir ileri basamakta moleküler testlerin uygulanacağı hastaların seçiminde kullanılabilir.

**Anahtar sözcükler:** ALPS, apoptoz, DNT hücreleri, Fas.

**Objectives:** This study aims to investigate whether there is an impairment of Fas-mediated lymphocyte apoptosis mechanism in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) patients.

**Patients and methods:** Twenty seven patients (15 males, 12 females; mean age 12.9±2.6 years; range 4 to 45 years) who were monitored at our Immunology Unit of Hacettepe University İhsan Doğramacı Children's Hospital with suspected diagnosis of ALPS based on clinical and laboratory signs and four patients (mean age 12±11.2 years; range 3 to 27 years) with confirmed heterozygous Fas mutation who were diagnosed with ALPS-Fas, and 30 healthy individuals were included. Peripheral mononuclear cells were isolated from freshly drawn heparinized blood using ficoll-histopaque density gradient centrifugation method. These cells were activated for 12 days with phytohemagglutinin (PHA) and interleukin-2. Subsequently, they were cultured with anti-Fas monoclonal antibody for additional 48 hours. The cells were stained with trypan blue dye and apoptotic cells were counted under light microscope.

**Results:** It was found that Fas-induced lymphocyte apoptosis was defective in four ALPS-Fas patients. The patients with suspected ALPS and controls had normal Fas-induced apoptosis.

**Conclusion:** Our results indicate that this functional apoptosis test is useful for identification of the patients with Fas mutations. It can also be used for selecting patients for further analyses.

**Key words:** ALPS, apoptosis, DNT cells, Fas.

Otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) ilk olarak 1967 yılında Canale ve Smith tarafından tanımlanmıştır.<sup>[1]</sup> Hastalık lenfadenopati, splenomegali, TCR (T-hücre reseptörü) alfa+ beta+ CD4- CD8- T hücre (çift negatif T hücreleri; DNT) düzeylerinde artış ve otoimmünite ile karakterizedir. Bugüne kadar tanı

konulan hastaların tümünde lenfadenopati veya splenomegali görülür iken, yaklaşık %50'sinde de hepatomegali izlenmiştir. Lenfadenopati tipik olarak yıllar boyunca devam edebilir. Hastaların bilgisayarlı tomografi ve ultrason görüntülerinde büyümüş olarak bulunan torasik ve abdominal lenf nodları vardır. Hastalarda klinik bul-

gular erken çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır. Bu semptomların başlama yaşı tipik olarak yaklaşık 24 aydır. Fakat bazı çocuklarda hemolitik anemi ve trombositopeni ile beraber daha erken dönemde de görülebilmektedir. Otoimmün lenfoproliferatif sendromda en sık görülen otoimmün bozukluklar hemolitik anemi, trombositopeni ve nötropenidir. Bazı hastalarda Guillain-Barré sendromu, glomerülo nefrit ve üveit gibi otoimmün hastalıklar da bildirilmiştir. Otoimmüniteye ek olarak, ALPS tanısı konulmuş hastalar hematolojik malignite gelişme riski de taşırlar. Genel nüfusa göre, ALPS'li hastalarda Hodgkin lenfoma görülme riski 50 kat, non-Hodgkin lenfoma riski ise 14 kat fazladır. Lenfoma gelişimi genellikle ergen dönemden sonra ortaya çıkmaktadır.<sup>[2-4]</sup>

Hastalarda görülen lenfoproliferasyonun nedeni ölüm reseptör (Fas) aracılı apoptoz mekanizmasındaki bozukluktur. Hastalıkla ilgili ilk moleküler defekt, Fas aracılı lenfosit apoptozu bozuk olan bir hastada, ilgili gendeki mutasyonun gösterilmesi ile tanımlanmıştır. Moleküler tanı konulan hastaların çoğunda TNF (tümör nekroz faktör) reseptör süper protein ailesinin altıncı üyesi olan Fas geninde heterozigot mutasyonlar mevcuttur, fakat FasL (Fas-ligand), kaspaz 8, kaspaz 10 gibi Fas aracılı apoptoz mekanizmasında görev alan diğer moleküllerdeki mutasyonlar da bildirilmiştir.<sup>[5,6]</sup>

Genel olarak memelilerde hücre ölümünün iki tipi vardır. Apoptoz ve nekroz. Apoptoz enerji harcanan programlı bir hücre ölümüdür ve genetik olarak kontrol edilmektedir. Vücutta apoptoz, embriyogenez sırasında, sürekli çoğalan hücre gruplarında (özellikle bağırsak epiteli), immün sistem hücrelerinde, sinir sisteminde ve menstruasyon döneminde gözlenmektedir.<sup>[7]</sup> Apoptotik uyarıları alan hücrede çeşitli biyokimyasal mekanizmalar devreye girmekte ve DNA kırıklarının oluşması ile hücre apoptotik cisimciklere dönüşmektedir. Genel olarak apoptoz mekanizmaları, ölüm reseptör aracılı apoptoz ve mitokondriyel apoptoz olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki mekanizmada da hücre dışından alınan çeşitli apoptotik sinyaller hücreyi apoptoza götürür. Burada kaspaz olarak adlandırılan proteinler önemli rol oynar. Kaspazlar hücre içinde bulunan ve birbirlerini aktive ederek kaspaz kaskadı oluşturan moleküllerdir. Bazıları (kaspaz 2, 8, 9, 10) tetikleyici olarak görev yapar iken, bazıları ise efektör (kaspaz 3, 6, 7) moleküllerdir. Her iki yolakta da çeşitli sinyal iletimleri ile oluşturulan kaspaz kaskadı, efektör kaspazların uyarılması ile hücreyi ölüme götürür.<sup>[8]</sup>

Hastalığın en önemli laboratuvar bulgusu DNT hücre sayısında artıştır. Ancak her zaman belirgin şekilde yüksek olmayabildiği gibi tanı için tek başına yeterli değildir. Hastalık için gerekli tanı kriterleri altı aydan fazla süren, malign olmayan lenfoproliferasyon ve DNT hücre düzeyinin artışıdır. Bunların yanında

primer yardımcı kriterler ise apoptoz ile ilgili olan mutant genin gösterilmesi ya da lenfosit apoptozunun bozuk olduğunun saptanmasıdır. Kesin tanı koyabilmek için, gerekli iki kriterin yanında primer yardımcı kriterlerden birinin olması esastır. Ayrıca ALPS'li hastalarda yapılan çalışmalarda serum ya da plazma FasL, interleokinin (IL)-10 ve vitamin B12 düzeylerinin de yüksek olduğu saptanmıştır.<sup>[2]</sup>

İki bin on yılında Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH-“National Institute of Health”) tarafından yapılan çalışmada hastalığın alt gruplarının sınıflandırılmasında defektif olan molekülün adı ile tanımlama yapılması kararlaştırılmıştır (ALPS-Fas, ALPS-sFas, ALPS-FasL, ALPS-CASP10). Fakat pahalı ve zaman alıcı moleküler incelemelerin uygulanması için seçilecek hastaların çeşitli laboratuvar testleri ile belirlenmesi önemlidir. *İn vitro* fonksiyonel apoptoz testi ALPS tanısı konulmasında yardımcı bir laboratuvar yöntemi olabilir.<sup>[9]</sup>

Bu çalışmada klinik olarak ALPS tanısı düşünülen hastalarda *in vitro* fonksiyonel apoptoz testinin değerlendirilmesi amaçlanmış ve laboratuvarımızda bu yöntem kurularak hastalarda uygulanmıştır.

## HASTALAR VE YÖNTEMLER

Hastanemizin immünoloji ünitesinde klinik ve laboratuvar bulguları ile olası ALPS tanısı ile izlenen 27 hasta (15 erkek, 12 kız; ort. yaş 12.9±2.6 yıl; dağılım 4-45 yıl), heterozigot Fas mutasyonu gösterilmiş ve ALPS-Fas tanısı konulmuş dört kız hasta (ort. yaş 12±11.2 yıl; dağılım 3-27 yıl) ile 30 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan hastaların hepsinde DNT hücrelerin yüzdesi %1.5'den (total lenfosit yüzdesi) fazla idi ve bu hastaların hepsinde lenfadenopati mevcuttu. Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 2 ve 3'de verilmiştir. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Yerel Etik Kurulu tarafından tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur (2009, FON 09/36). Etik kurul tarafından onaylanan onam formları çalışmaya katılan herkese ve çocuk yaştaki bireylerin velilerine periferik

**TABLO 1**

Çalışmaya katılan hastaların yaş ve cinsiyetleri

	Hasta sayısı	Yüzde	Yaş ortalaması
Olası ALPS tanısı ile izlenen hastalar			
Erkek	15	48	13.9
Kız	16	52	10.1
<i>Toplam</i>	31		11.9±1.4
ALPS-Fas tanısı konulmuş hastalar			
Kız	4	100	12±11.2

ALPS: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom; Fas: Ölüm reseptörü.

kan alımı işlemi yapılmadan imzalatılmıştır. Kan alımı Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi İmmünoloji Birimi kan alım ünitesinde ve hastanemiz servislerinde yetkili bireyler tarafından yapılmış ve çalışmada 2008 Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi kurallarına uygun davranılmıştır.

### Yöntem

*In vitro* apoptoz testi için hasta ve sağlıklı grup-tan heparinli (AppliChem, Merck Selbstmedikation GmbH, Almanya) enjektörlere 5'er cc kan alındı. Toplanan kanlardan ficoll-histopaque (BioChrom AG, Berlin, Almanya) kullanılarak lenfositler izole edildi. Hücreler 96 saat süresince %15 FCS (fetal calf serum) (BioChrom AG, Berlin, Almanya), %1 L-glutamin

(BioChrom AG, Berlin, Almanya) ve %2 hepes (Biological Industries Ltd., İsrail) içeren RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Biological Industries Ltd., İsrail) besi ortamında phytohemaglutinin (PHA) (BioChrom AG, Berlin, Almanya) ve IL-2 (PepruTech, ABD) ile aktive edildi. Daha sonra hücre sayımı yapı-larak (400.000 hücre/1 ml) 24 kuyucuklu kültür plak-larına hücre ekimi yapıldı. Hücreler 48 saat süresince anti-Fas (Alexis Biochemicals, İsviçre) monoklonal antikor ile uyarıldı. Kültür plaklarından alınan hücreler tripan mavisi (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, ABD) ile boyanarak ölü hücre sayımı ışık mikroskobu altında yapıldı.<sup>[2]</sup> Mavi boyanan hücreler ölü olarak kabul edildi ve ölen hücre yüzdeleri şu şekilde hesaplandı:

**TABLO 2**

Çalışmaya katılan hastaların klinik özellikleri

Hasta numarası	Yaşı/ilk şikayet yaşı	SM	Süre (yıl)	Otoimmün bulgular					Diğer
				HM	LAP	ITP	OHA		
Olası ALPS tanısı ile izlenen hastalar (n=27)									
1	5/3 ay	+	4	+	+	-	-	-	
2	8/5	+	3	+	+	-	+	-	
3	9/4	+	3	+	+	-	-	-	
4	7/1	+	6	+	+	+	-	-	
5	14/4	-	-	+	+	-	-	-	
6	45/38*	+	7	+	+	+	+	-	
7	10/8	-	-	+	-	-	-	-	
8	19/7	+	12	+	+	+	-	-	
9	11/7	-	-	+	-	-	-	-	
10	9/5	+	4	+	+	+	-	-	
11	15/10	-	-	+	+	-	-	-	
12	9/2	+	7	+	+	+	-	-	
13	14/4	-	-	+	+	-	-	-	Pitriazis rosea
14	22/15	-	-	+	+	-	-	-	
15	12/7	+	1	+	+	+	-	-	Otoimmün nötro-peni
16	8/2	+	6	+	+	-	+	-	
17	4/3	+	1	-	+	+	-	-	
18	14/4	+	10	+	+	-	-	-	Otoimmün hepatit
19	12/12	-	-	+	+	-	-	-	
20	19/1	+	18	-	+	+	-	-	Çölyak hastalığı
21	9/6	+	3	-	+	-	+	-	
22	10/8	+	1	-	+	+	-	-	
23	17/8	+	9	+	+	+	+	-	
24	5/1*	+	3	+	+	+	+	-	
25	4/3	+	1	-	+	-	-	-	
26	5/2	+	3	-	+	-	-	-	
27	7/3	+	3	-	+	+	+	-	
ALPS-Fas tanısı konulmuş hastalar (n=4)									
1	27/5	+	§	-	+	-	-	-	
2	3/1	+	2	-	+	-	-	-	
3	4/1	+	3	-	+	-	-	-	
4	14/3	+	8	-	+	-	-	-	

\* 6 ve 24 numaralı hastalara splenektomi yapılmıştır; SM: Splenomegali; HM: Hepatomegali; LAP: Lenfadenopati; ITP: İmmün trombositopenik purpura; OHA: Otoimmün hemolitik anemi; ALPS: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom; Fas: Ölüm reseptörü; § Takip süresi bilinmemektedir.

TABLO 3

Çalışmaya katılan hastaların laboratuvar bulguları

Hasta numarası	DNT (%)	ALS (x1000/ $\mu$ l)	Ig A (mg/dl)	Ig G (mg/dl)	Ig M (mg/dl)	Vitamin B12	Otoantikörler
Olası ALPS tanısı ile izlenen hastalar (n=27)							
1	4	2.6	94	811	19	>2000	Anti-ds-DNA+
2	2	4.8	50	1180	128	760	D. Coombs+
3	3	2.1	154	<b>5720</b>	45	-	Anti-TPO+
4	2	2.2	875	<b>6450</b>	184	-	RF+
5	5	3.4	18	340	24	418	-
6	2	2.3	33	640	19	-	-
7	8	2.1	114	<b>2360</b>	368	393	D. Coombs+
8	3	1.4	46	858	19	-	RF+
9	3	1.8	91	<b>2330</b>	248	227	-
10	1	1.5	149	1180	37	572	-
11	2	1.0	88	1210	65	>2000	-
12	4	1.2	46	620	79	363	-
13	2	2.5	80	500	36	604	-
14	3	1.8	77	1540	221	-	-
15	3	1.3	98	1770	158	363	D. Coombs+
16	1	2.6	197	2210	165	<b>1451</b>	D. Coombs+
17	3	1.9	76	630	99	-	-
18	2	3.2	60	<b>4710</b>	86	-	-
19	4	11.9	44	544	43	627	ANA+
20	3	1.2	45	480	23	-	D. Coombs+
21	1	5.7	154	1430	165	561	-
22	2	1.8	109	560	84	604	-
23	2	2.5	292	1140	135	<b>856</b>	-
24	3	2.8	23	1020	116	604	-
25	3	1.3	43	876	79	-	-
26	1	1.7	56	776	65	475	-
27	2	2.3	97	1230	210	-	D. Coombs+
ALPS-Fas tanısı konulmuş hastalar (n=4)							
1	6.5	>10	94	<b>2160*</b>	103	-	-
2	11	>10	65	<b>2220*</b>	79	-	-
3	12	8.5	82	<b>2490*</b>	116	-	-
4	21	>10	102	<b>2950*</b>	112	>800	-

ALPS: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom; DNT: Çift negatif T hücreleri (double negative T cells); ALS: Salt lenfosit sayısı; Fas: Ölüm reseptörü; D.coombs: Direct coombs; Anti-TPO: Anti-tiroid peroksidaz; RF: Romatoid faktör; ANA: Anti nükleer antikor; Bold olarak yazılan IgG ve vitamin B12 düzeyleri normal değerlerden yüksektir. DNT hücre yüzdeleri tüm lenfositler içindeki oranları göstermektedir.

### Hastada gözlenen ölü hücre sayısı

Aynı deneydeki kontrolde gözlenen ölü hücre sayısı  $\times 100$

Not: Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün 2010 yılı kriterlerinde, *in vitro* apoptoz testinde hastalardan elde edilen hücrelerin ölüm oranlarının, sağlıklı kontrol hücrelerinin ölüm oranlarının en az %50'si oranında düşük olması apoptoz mekanizmasının bozuk olarak kabul edilmesi için gerekli olduğu belirtilmektedir.<sup>[9]</sup>

Tripan mavisi hem apoptotik, hem de nekrotik hücreleri boyamaktadır. Bu yüzden sonuçların daha geçerli olması için hasta ve kontrol gruplarından toplam 10'ar örnekte ve ALPS-Fas tanısı konulan

dört hastada akım sitometrik olarak aneksin-V (IQ Products BV, Groningen, Hollanda) ve propidium iodide (AppliChem Merck Selbstmedikation GmbH, Almanya) kullanılarak ölü hücre (geç apoptotik fazdaki hücreler) yüzdeleri bulundu ve sonuçlar karşılaştırıldı. Bu işlem için anti-Fas ile uyarılan lenfositler yaklaşık  $1-2 \times 10^5$  olacak şekilde ayrıldı. Ortama 5  $\mu$ l aneksin V- fluorescein isothiocyanate (FITC) ve 5  $\mu$ l propidium iodide eklendi. Akım sitometride FL1 ve FL2 sinyal detektörleri kullanılarak ölü hücre yüzdeleri saptandı.<sup>[10]</sup>

DNT hücre yüzdeleri ise periferik tam kandan anti-CD4-PE (BD, Biosciences ABD), anti-CD8-PE (BD,

Biosciences ABD) ve anti-TCR- $\alpha\beta$ -FITC (BD, Biosciences ABD) monoklonal antikorları kullanılarak akım sitometride saptandı.<sup>[11]</sup>

### İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel hesaplamalar Windows için SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 15.0 versiyon paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası değerlendirmeler non-parametrik Kruskal Wallis testi ile yapıldı, ikili gruplar arasındaki farkı ortaya çıkarmak için Bonferroni düzeltmesi yapıldı. Gruplar arasındaki sayı eşitsizliğine, özellikle ALPS-Fas tanısı konulan hasta sayısının çok az

olmasına rağmen sonuçlar istatistiksel ve klinik olarak anlamlı bulundu.

### BULGULAR

Testlerin tümünde kontrol grubundaki sağlıklı bireylerden izole edilen sağlıklı kontrol hücrelerin ölüm yüzdeleri %80 ve üzeri olarak saptandı. Olası ALPS tanısı ile izlenen hastalarda ve ALPS-Fas tanısı konulmuş hastalarda elde edilen ölüm yüzdeleri Tablo 4 ve 5'te verilmiştir.

*In vitro* fonksiyonel apoptoz testi ile 48 saat sonunda hasta ve sağlıklı kontrol hücrelerinin ışık mikroskobu ve akım sitometri ile saptanan ölüm oranlarının ortalamaları ayrı ayrı hesaplandığında elde edilen bulgular Şekil 1 ve 2'de görülmektedir.

Tripan mavisi ile boyanarak ışık mikroskobu ile elde edilen sonuçlara göre, çalışmamızda olası ALPS tanısı konulan hastalar ve sağlıklı kontrol grubu ölüm oranları ortalamaları arasında fark saptanmaz iken ( $p=0.9$ ), bu iki grup ile ALPS-Fas grubu hastaların sonuçları arasında belirgin bir fark saptandı ( $p=0.001$ ).

Akım sitometrik olarak elde edilen sonuçlarda ise yine benzer olarak olası ALPS tanısı konulan hastalar ve sağlıklı kontrollerin ölüm oranları ortalamaları arasında fark saptanmaz iken ( $p=0.89$ ), bu iki grup ile ALPS-Fas grubu hastaların sonuçları arasında belirgin bir fark gözlemlendi ( $p=0.006$ ).

### TARTIŞMA

Otoimmün lenfoproliferatif sendrom kronik lenfadenopati, splenomegali, DNT hücre düzeylerinde artış ve otoimmünite ile karakterizedir. Otoimmün lenfoproliferatif sendrom tanısı konulmuş hastalarda görülen lenfoproliferasyonun nedeni apoptoz mekanizmasındaki bozukluktur. Özellikle ölüm reseptör (Fas-FasL) aracılı apoptoz mekanizmasındaki bozukluk nedeni ile aktive olan lenfositler apoptoza gidememekte ve lenfoproliferasyon ortaya çıkmaktadır.<sup>[12]</sup> Fas molekülünün lenfosit homeostazındaki rolü ilk olarak 1992 yılında Nagata ve Golstein<sup>[13]</sup> tarafından fare modelinde tanımlanmıştır. Çalışmada Fas molekülünü kodlayan gende bir mutasyon saptanmış ve bu mutasyona sahip farelerde lenfosit apoptozunun bozuk olduğu gösterilmiştir. Rieux-Laucat ve ark.<sup>[14]</sup> tarafından yapılan çalışmada lenfoproliferatif sendrom ve otoimmün bozukluklar görülen iki kardeş, Fas molekülünü kodlayan gende geniş bir delesyon saptanmış ve mutant gen nedeni ile hücre yüzeyinde Fas ekspresyonunun olmadığı bildirilmiştir. Fisher ve ark.<sup>[15]</sup> tarafından ise aralarında akrabalık olmayan, ALPS klinik özellikleri gösteren beş çocukta heterozigot Fas mutasyonları saptanmıştır. Bu çalışmalarla beraber ALPS'de tarama testi olarak kullanılabilecek *in vitro* fonksiyonel apoptoz testi geliştirilmiştir. Bu testin temeli, aktive olan lenfositlerde

**TABLO 4**

Çalışma sonunda tripan mavisi kullanılarak saptanan lenfosit ölüm yüzdeleri

Olası ALPS tanısı ile izlenen hastalar (n=27)	Ölüm yüzdeleri	ALPS-Fas tanısı konulmuş hastalar (n=4)	Ölüm yüzdeleri
1	95	1	26
2	90	2	27
3	91	3	22
4	100	4	20
5	100		
6	100		
7	100		
8	97		
9	97		
10	100		
11	98		
12	100		
13	88		
14	95		
15	88		
16	96		
17	94		
18	96		
19	97		
20	89		
21	96		
22	96		
23	97		
24	98		
25	90		
26	96		
27	96		

ALPS: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom; Fas: Ölüm reseptörü.

TABLO 5

Çalışmada akım sitometrik olarak saptanan lenfosit ölümü yüzdeleri

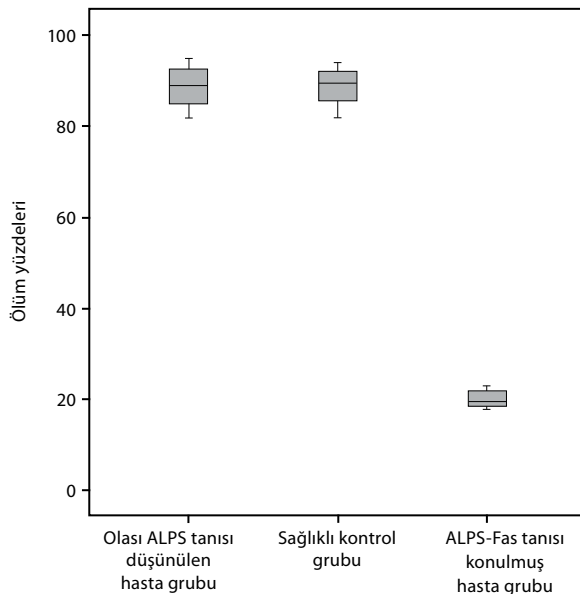
Olası ALPS tanısı ile izlenen hastalar	Lenfosit ölümü yüzdesi	ALPS-Fas tanısı konulmuş hastalar (n=4)	Lenfosit ölümü yüzdesi
1	94	1	25
2	98	2	21
3	89	3	22
4	99	4	19
5	98		
6	100		
7	96		
8	88		
9	89		
10	90		

ALPS: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom; Fas: Ölüm reseptörü.

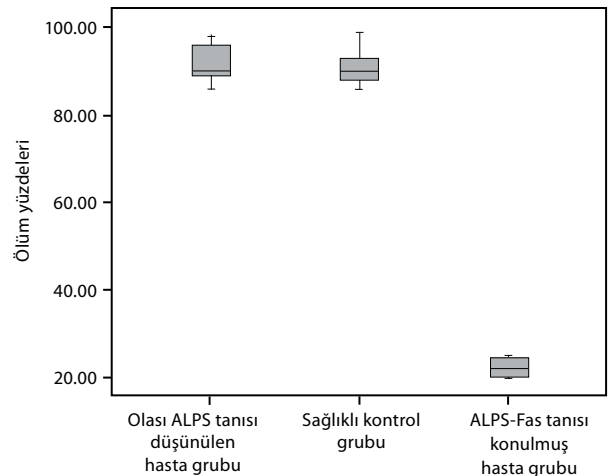
Fas-FasL aracılı yolağın uyarılması ile hücrelerin apoptoz mekanizmasında bozukluk olup olmadığının saptanmasına dayanmaktadır. Biz de son yıllarda klinik özellikleri ALPS'yi düşündüren hastalarımızda bu testi uygulayarak Fas, FasL yönünden genetik çalışma yapılması gereken hastaları seçmek ve negatif bulunan hastaların muhtemel yeni moleküler defektler yönünden incelenmesini sağlamak için bu yöntemin uygulamasını başlattık.

Otoimmün lenfoproliferatif sendromun en önemli laboratuvar bulgusu dolaşımdaki DNT hücre düzeyindeki artıştır. Normalde tüm lenfositler içinde %1.5'in altında bulunması gerekir iken ALPS'li hastalarda bu oran %60'a kadar çıkabilmektedir.<sup>[16]</sup> Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün 2010 yılı kriterlerine göre ALPS tanısı koyabilmek için gerekli iki ana kriter kro-

nik lenfadenopati veya splenomegali ve DNT hücre düzeylerinde artıştır. Bunlarla beraber primer yardımcı kriterlerden lenfosit apoptozunda bozukluk veya Fas, FasL ya da kaspaz 10 moleküllerini kodlayan genlerdeki patojenik mutasyonun gösterilmesi gerekmektedir.<sup>[9]</sup> Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamıza Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Ünitesi'nde olası ALPS tanısı ile izlenen 27 hasta, ALPS-Fas grubundan pozitif kontrol olarak Fas geninde heterozigot I259 mutasyonu saptanan dört hasta ve 30 sağlıklı kontrol dahil edildi. Hastaların tamamında DNT hücre düzeyleri normalden yüksek idi, kronik lenfadenopati veya splenomegali bulunmakla birlikte bir çoğunda otoimmün sitopeni ve diğer otoimmün bozukluklar görülmekte idi. Hastalarda *in vitro* fonksiyonel apoptoz testi yapılan ve her deneyde kontrol olarak sağlıklı bir bireyden elde edilen lenfositlerde apoptoz değerlendirildi. Deneylerde, hasta ve kontrollerden elde edilen lenfosit



Şekil 1. Çalışma sonunda tripan mavisi kullanılarak saptanan lenfosit ölümü yüzdeleri. ALPS: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom; Fas: Ölüm reseptörü.



Şekil 2. Çalışma sonunda akım sitometrik olarak saptanan lenfosit ölümü yüzdeleri. ALPS: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom; Fas: Ölüm reseptörü.



ölüm yüzdeleri karşılaştırıldı. Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün apoptozun bozuk kabul edilebilmesi için önerdiği kriter, hastalardan elde edilen hücrelerin ölüm oranlarının, sağlıklı bireylerden elde edilen lenfositlerin ölüm oranlarından en az %50 daha az olmasıdır.<sup>[9]</sup> Bizim çalışmamızda sağlıklı bireylerden izole edilen hücrelerin ölüm oranları ise en az %80 olarak saptandı. Olası ALPS tanısı ile izlenen hastaların tümünde bu oran yine %80 ve daha fazla saptandı. Fas geninde heterozigot dominant mutasyonu gösterilen dört hastada ise bu oran %20 ila %27 arasında idi. Lenfosit ölümü oranları saptanır iken iki farklı yöntem kullanıldı. Tripnan mavisi ile ışık mikroskopunda sayılan ölü hücreler nekrotik ve apoptotik hücreler idi fakat sağlıklı kontrol hücrelerinden elde edilen değerlerle karşılaştırma sonucunda bu hücrelerin tamamının ya da çok büyük bir kısmının Fas ile uyarım sonucu ölen apoptotik hücreler olduğu kabul edildi. Ayrıca bu bulguları doğrulamak için akım sitometrik olarak 10 hasta, 10 kontrol ve dört ALPS-Fas tanısı konulan hastada aneksinsin ve propidium iodid kullanılarak geç faz apoptotik hücreler saptandı, sonuçlar tripnan mavisi kullanılarak elde edilen değerler ile hemen hemen aynı çıktı. Çalışmada elde edilen bu bulgular sonucunda, teknik olarak, uygulanan *in vitro* apoptoz testinin güvenilir olduğu sonucuna varıldı.

Dünya genelinde bugüne kadar ALPS tanısı konulmuş ve mutasyonu gösterilmiş hastaların yaklaşık %70'inde Fas aracılı apoptoz yolağında bozukluk olduğu bilinmektedir.<sup>[16]</sup> Bu yüzden laboratuvarlarda teknik olarak daha basit ve daha ucuz olan *in vitro* fonksiyonel apoptoz testinin uygulanması önemlidir. Daha kapsamlı ve daha pahalı olan moleküler tanı yöntemlerinin uygulanması gereken hastalar bu şekilde belirlenebilir.

Çalışmamıza katılan, olası ALPS tanısı ile izlenen hastalarda Fas aracılı lenfosit apoptozunda bir bozukluk saptanmadı. Bu hastaların klinik bulguları, ALPS tanı kriterlerine uygun ve DNT hücre düzeyleri artmış olmasına rağmen Fas aracılı lenfosit apoptozunda bozukluk olmaması diğer apoptoz mekanizmalarında bozukluk olabileceğini düşündürmektedir. Bu hastaların bazılarında somatik Fas mutasyonu olabileceği gibi apoptoz mekanizmalarında yer alan diğer moleküllerde de bir defekt bulunabilir. Nitekim 2007 yılında Oliveira ve ark.<sup>[17]</sup> tarafından yapılan çalışmada NRAS (N-Rat sarcoma) molekülünü kodlayan gende bir mutasyon saptanmış ve bunun ALPS'ye neden olduğu gösterilmiştir. Otoimmün lenfoproliferatif sendrom klinik özelliklerini taşıyan hastaların önemli bir kısmında bilinen moleküllerde defekt saptanmamış olması, ölüm reseptör aracılı veya mitokondriyel apoptoz yollarında görev alan moleküllerde henüz gösterilmemiş genetik bozukluklar bulunabileceği işaret etmektedir.

Sonuç olarak, uyguladığımız bu yöntem Fas aracılı apoptoz testi ile gösterilemeyen, bilinen diğer defektler yönünden taranması gereken hastaların belirlenmesi için ve bir ileri basamakta da yeni moleküler defektlerin bulunması yönünden yararlı olacaktır. Yaptığımız bu çalışma ile *in vitro* fonksiyonel apoptoz testinin olası ALPS tanısı ile izlenen hastalarda uygulanabileceği gösterilmiştir.

### Çıkar çakışması beyanı

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

### Finansman

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından FON 09/36 numaralı projeye desteklenmiştir.

### KAYNAKLAR

1. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. J Pediatr 1967;70:891-9.
2. Sneller MC, Wang J, Dale JK, Strober W, Middleton LA, Choi Y, et al. Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. Blood 1997;89:1341-8.
3. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. Ann Intern Med 1999;130:591-601.
4. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rösen-Wolff A, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. Blood 2001;98:194-200.
5. Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderson SM, Choi Y, Wang J, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. Am J Hum Genet 1999;64:1002-14.
6. Rieux-Laucat F, Blachère S, Danielan S, De Villartay JP, Oleastro M, Solary E, et al. Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations. Blood 1999;94:2575-82.
7. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ 2009;16:3-11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.
8. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995;146:3-15.
9. Oliveira JB, Bleasing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. Blood 2010;116:e35-40. doi: 10.1182/blood-2010-04-280347.
10. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection

- of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
11. Magerus-Chatinet A, Stolzenberg MC, Loffredo MS, Neven B, Schaffner C, Ducrot N, et al. FAS-L, IL-10, and double-negative CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> TCR alpha/beta<sup>+</sup> T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood* 2009;113:3027-30. doi: 10.1182/blood-2008-09-179630.
  12. Lim MS, Straus SE, Dale JK, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W, et al. Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Pathol* 1998;153:1541-50.
  13. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-56.
  14. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268:1347-9.
  15. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995;81:935-46.
  16. Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol* 2006;133:124-40.
  17. Oliveira JB, Bidère N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Nix CP, et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8953-8.