

Sık Değişken İmmün Yetmezlik Hastalarında Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) Yöntemi ile Lenfosit Proliferasyonu

Ayşegül İzgi, Tunç Akkoç, İsmail Ögülür, Ayzer Tevetoğlu, Elif Karakoç Aydiner, Safa Barış, Nerin Bahçeciler, Işıl Barlan

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatrik Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Tunç Akkoç
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Pediatrik Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul-Türkiye
Telefon / Phone: +90-532-401-1222 Elektronik posta adresi / E-mail address: tuncakkoc@yahoo.com
Kabul tarihi / Date of acceptance: 19 Ekim 2011 / October 19, 2011

ÖZET

Sık değişken immün yetmezlik hastalarında Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) yöntemi ile lenfosit proliferasyonu

Amaç: Sık Değişken İmmün Yetmezlik (SDİY); hipogamaglobülinemi ve normal / düşük B hücre ile tanımlanan antikor eksikliği hastalıkları grubundadır ve tekrarlayan bakteriyel infeksiyonlar, otoimmün hastalıklar ve malignite ile karakterize edilmektedir. Bu çalışmada, SDİY hastalarındaki T ve B lenfositlerinin proliferasyonlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: T ve B hücre alt gruplarında hastalığın immünopatogenezinde önemli rol oynadığı düşünülen CD19⁺, CD21⁺, CD27⁺ B hücreleri ve CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T hücrelerinin Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) ile hücre proliferasyon yanıtına bakıldı. Çalışmaya SDİY tanısı almış hastalar (n=13) ve kontrol grubu için SDİY hastalarıyla yaş uyumu olan sağlıklı bireyler (n=5) alındı. Tüm deneklerden alınan kan örneklerine, negatif seçim yöntemi (Rosette Sep) ile T ve B hücre izolasyonu yapıldı. Daha sonra izole edilen lenfositler CFSE-FITC ile karanlık ortamda işaretlendi ve T hücre proliferasyonu için hücreler anti-CD2, anti-CD3, anti-CD28 (CDmix) ile uyarılarak 4 günlük kültürleri yapıldı. Kültür sonunda hücreler anti-CD3-PE, anti-CD4-PE, anti-CD8-APC ile boyandıktan sonra CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T hücrelerinin proliferasyonu akım sitometrisi ile bakıldı. B hücre proliferasyonu için hücreler anti-IgM + IL-4 ile 4 gün kültür edildikten sonra anti-CD19-APC-Cy7, anti-CD27-PE, anti-CD21-APC ile boyandı ve CD19⁺, CD27⁺ ve CD21⁺ B hücrelerinin proliferasyonu akım sitometrisi ile bakıldı.

Bulgular: T lenfositlerinin ve CD19⁺ B hücrelerinin proliferasyonlarının 1. bölünmesinde ve CD4⁺ T hücrelerinin 2. bölünmesinde, CDmix uyaranlı SDİY'li hastalarda, CDmix uyaranlı kontrolden anlamlı olarak daha fazla proliferasyon olduğu gözlemlendi.

Sonuç: T hücreleri ve B hücrelerinin proliferasyonlarının SDİY hastalarında normal olduğu gösterildi.

Anahtar sözcükler: SDİY, CFSE, Lenfosit proliferasyonu, T lenfosit izolasyonu, B lenfosit izolasyonu

ABSTRACT

Lymphocyte proliferation in common variable immunodeficiency (CVID) patients by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)

Objective: Common variable immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous disease in the group of predominantly antibody deficiencies, which is defined by hypogammaglobulinemia and normal or low level of B cells, and characterized by increased susceptibility to recurrent bacterial infections, autoimmune disorders, and malignancies. In this study, we aimed to investigate the proliferation of the B and T lymphocytes in patients with CVID.

Method: The proliferation of CD19⁺, CD21⁺, CD27⁺ B cells, and CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T cells were investigated by Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) method. CVID patients (n=13) and control group (n=5) were enrolled in the study. B and T cells were isolated from peripheral blood samples with the negative selection procedure called Rosette Sep and the isolated lymphocytes were stained in dark using CFSE. The cells were stimulated with anti-CD2, CD3, CD28 (CDmix) and cultured for four days in order to determine T cell proliferation. The proliferation of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T cells was analyzed by flow cytometry. Isolated B cells were cultured for four days along with anti-IgM+IL-4. The proliferation of CD19⁺, CD27⁺ and CD21⁺ B cells were analyzed with flow cytometry.

Results: First proliferation of T lymphocytes and CD19⁺ B lymphocytes and second proliferation of CD4⁺ T lymphocytes after stimulation were increased in CVID patients compared to healthy controls.

Conclusion: In CVID patients T cell and B cells proliferation seem to be normal.

Key words: CVID, CFSE, Lymphocytes proliferation, T lymphocyte isolation, B lymphocyte isolation

GİRİŞ

Bir veya daha çok immün sistem elemanlarının yokluğu veya normal fonksiyonlarını yerine getirememeleri sonu-

cunda immün yetmezlik hastalıkları oluşur. Spesifik immün yetmezlik hastalıkları adaptif immün sistem hücreleri olan T veya B hücrelerinin anomalileri sonucunda gelişir. Spesifik olmayan immün yetmezlik hastalıkları ise kompleman veya

fagosit anomalileri sebebiyle gelişir (1).

Doğumsal (primer) immün yetmezlikler ise, immün sistemin bir ya da daha çok bileşenindeki genetik anomaliler yüzünden oluşur. İmmün sistemdeki diğer bozukluklar, immün sistemin değişik bileşenlerinde işlevin hiç olmaması veya yetersiz olmasına neden olan tedaviler, beslenme bozuklukları ve infeksiyonlar sonucunda oluşur ve kazanılmış (sekonder) immün yetmezlikler olarak isimlendirilir (2).

Doğumsal immün yetmezlik grubundan olan Sık Değişken İmmün Yetmezlik (SDİY), immün yetmezlikler içinde en yaygın olarak görülen hastalıktır. Yaklaşık olarak bütün hastalarda tekrarlayan bakteriyel solunum yolu infeksiyonları görülür. %40 üzerinde hastada gastrointestinal hastalıklar, lenfoproliferatif hastalıklar, otoimmün fenomenler veya granülmatöz inflamasyon görülür. İki veya daha çok immünglobulin izotipinde hipogammaglobülineminin (düşük IgG, IgA veya IgM) olması ve bozulmuş antikor yanıtı ile karakterize edilen heterojen bir hastalıktır (3). SDİY semptomları hayatın her evresinde görülebilir. Fakat başlangıç olarak iki zirve dönemi görülür. Birincisi çocuklukta beş ile on yaş arasında ikincisi ise genç erişkin döneminde yirmi ile otuz yaş arasındadır (4). Hastaların bazılarında antijen sunan hücreler, monositler, doğal öldürücü hücreler, T ve B hücrelerinin sayı ve fonksiyonlarında farklılıklar olduğu bulunmuştur (5). Periferik kandaki B hücrelerinin sayısı normal veya azalmış olabilir (6,7).

Spesifik antijen ve mitojene karşı lenfositlerin proliferatif cevapları ölçülebilir. Bu test SDİY tanımı için gerekli değildir, çünkü hastaların %20'sinde proliferatif cevap bozulmuştur. Azalan CD4⁺ T hücre sayısı artan CD8⁺ T hücre sayısı ile ilişkilidir. CD4, CD8 oranı değişebilir (8,9). Buna karşılık bazı hastalarda ise CD4⁺ T hücre, CD8⁺ T hücreleri ve NK hücreleri normal orandadır (10). Bu hastaların serum immüno-globülinleri çok düşük olmasına karşın agammaglobülinemik hastalar ile karşılaştırıldığında immüno-globülin düzeyleri daha yüksektir (3,11). IgA ve IgM düzeyleri ise ölçülemeyecek oranda düşüktür. İmmüno-globülin düzeylerinde dalgalanmalar görülebilir. Bazı IgA ve IgG altgrup eksikliği olan olgularda SDİY gelişebilir (12). İzohemaglutininin titresi ve spesifik antikor düzeyi düşüktür veya ölçülemez. Protein veya polisakkarit aşılara ile aşılama takiben bakılan spesifik antikor düzeyi de genellikle düşüktür. Normal antikor yanıtı geçici olabileceğinden, bu tanıyı ekarte ettirmez (13). Periferik kanda bakılan lenfosit alt grup analizinde B lenfosit yüzey işaretleri normal veya düşük olabilir.

SDİY hastalarında T-hücre aracılı immünitede anomaliler görülür (13,14). Hastaların 1/3'ünde CD4⁺ T hücrelerinde azalma vardır. Ayrıca T hücre fonksiyonlarının değerlendirilmesi için bakılan mitojene proliferasyon yanıtı hastaların yaklaşık yarısında düşüktür. T lenfositlerinden lenfokin salgılanması ve CD40 gibi aktivasyon belirteçlerinin sunumu da etkilenmektedir (15).

Literatürde SDİY'li hastalarda B ve T hücrelerinin proliferasyonlarıyla ilgili geniş bir çalışma olmadığı için, bu çalışmada doğumsal immün yetmezlik hastalığı olan SDİY'li hastaların B ve T lenfositlerinin proliferasyonlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, CD3⁺, CD8⁺ ve CD4⁺ T hücrelerinin ve CD19⁺, CD21⁺ olgun ve toplam hafıza B hücrelerinin proliferasyonları CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) yöntemi ile incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Alınan Hastaların Belirlenme Kriterleri ve Çalışma Grupları

Bu çalışmaya, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Allerji- İmmünoloji Bilim Dalı'nda takibe alınan, 4-30 yaş arası, en az 2 en çok 22 yıldır takip edilen ve ESID/PAGİD kriterlerine göre SDİY tanısı konulmuş hastalar dahil edildi. Çalışmaya I. grupta sağlıklı kontroller (n=5) ve II. grupta SDİY tanısı almış hastalar (n=13) alındı.

SDİY grubunda hastaların çalışmaya alınma kriterleri aşağıdaki belirtilmiştir:

- IgG düzeylerinde belirgin düşüklük (yaşa göre ortalama değerlerin en az 2 SD altında) olması
- IgM veya IgA düzeylerinden en az birinde düşüklük gözlemesi
- İmmün yetmezliğin başlangıcının 2 yaşından sonra olması
- İzohemaglutininlerin yokluğu ve/veya aşılara zayıf immün yanıt saptanması
- Hipogammaglobülinemi yapan diğer nedenlerin dışlanmış olması

Venöz Kan Alımı ve T ve B Hücre İzolasyonu

Deneklerden heparinli tüplere 6 cc venöz kan alındı ve lenfosit izolasyonu yapılmak üzere UV kabininde 15 ml'lik steril falkonlara aktarıldı.

T hücre izolasyonu için Rosette Sep insan T hücre zenginleştirme kiti (Stemcell Technologies, Canada), B hücre izolasyonu için RosetteSep insan B hücre zenginleştirme kiti (Stemcell Technologies, Canada) kullanıldı.

T ve B hücre izolasyonu negatif seleksiyon yöntemi ile yapıldı. Deneklerden alınan 3 ml tam kan 15 ml'lik falkona konuldu. İstenmeyen hücrelerin eritrositlerle bağlanmasını sağlayan B lenfosit izolasyonu için B enrichment kokteylden ve T lenfosit izolasyonu için T enrichment kokteylden ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. 1:1 oranında %2 fetal bovine serum (FBS) içeren steril PBS ile kan sulandırıldı. Başka bir 15 ml'lik falkona 3 ml ficoll konularak kan üzerine yavaşça yayıldı. Oda ısısında 1200 g'de 20 dk santrifüj yapıldı. İstenen lenfositler bir pipet yardımıyla başka bir falkona alındı ve üzerlerine 5 ml kadar PBS+%2 FBS eklendi. Oda sıcaklığında 300 g'de 10 dk santrifüj edilerek hücreler yıkandı ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Son yıkama işleminden sonra hücreler 1 ml'ye hücre kültürü ortamı olan RPMI1640+%10 FCS ile tamamlandı. Bu aşamayı müteakip 1 ml'de bulunan lenfosit sayılarını tayin etmek için, lenfosit süspansiyonlarından alınan 10 µl örnek 10 µl Tripkan mavisini ile karıştırıldı. Boyayı içine almamış ve şişmemiş lenfositler canlı olarak nitelendirilerek Thoma lamında 16 büyük kare 40x'lik büyütme altında sayıldı.

Lenfositlerin CFSE-FITC ile İşaretlenmesi ve Saflık Tayini

İzole edilen lenfositler karanlık ortamda CFSE-FITC ile işaretlendi. 1 ml RPMI1640+%10 FCS besiyeri içerisindeki B hücreleri için ortalama 5×10^5 hücreye, T hücreleri için ortalama 2×10^6 hücreye $5 \mu\text{mol/L}$ olacak şekilde CFSE-FITC eklendi ve pipetleme ile karıştırıldı. Daha sonra süspansiyonlar karanlıkta $+4^\circ\text{C}$ 'de 12 dk bekletildi. 3 ml PBS ile 800g'de 3 dk'lık 2 defa yıkama yapıldı. Bu işlemi müteakip hücreler tekrar sayıldı ve akım sitometri cihazında hücrelerin CFSE-FITC ile işaretlenmeleri incelendi.

Lenfosit izolasyonundan sonra, izolasyonun saflığına bakmak için, 0. günde B lenfositlerden 2×10^5 hücre, T lenfositlerden 4×10^5 hücre alınarak ayrı ayrı akım sitometri tüplerine konuldu. Üzerlerine T hücreleri için anti-CD3-PE, anti-CD8-APC ve anti-CD4-PE; B hücreleri için anti-CD19-APC-Cy7, anti-CD27-PE ve anti-CD21-APC eklenerek 20 dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. PBS ile 300 g'de 10 dk santrifüj yapılarak 2 kez yıkama yapıldı ve akım sitometri ile değerlendirildi.

Hücre Kültürü

Gruplardan ortalama 2×10^6 T hücre elde edildi. Uyarım 48 kuyulu steril hücre kültür plaklarında yapıldı. Kuyular 500 µl'de 6×10^5 hücre olacak şekilde ayarlandı. CDmix uyaranlı ve uyaransız olarak iki kuyu seçildi. Uyaranlı kuyuya anti-CD2 0,5µg/ml (klon:4B2 ve GG4), anti-CD3 0,5µg/ml (klon: CRL 8001), anti-CD28 0,5µg/ml (klon:15E8) (CDmix), uyaransız kuyuya ise sadece hücreler eklendi, herhangi bir uyarım konulmadı. Kuyuların son hacmi RPMI 1640+%10 FCS ile 500 µl'ye tamamlandı. Kültür plakları 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde 4 gün inkübe edildi. 4 gün sonunda kuyulardan 200 µl hücre alınarak hücreler anti-CD3-PE (BD Pharmingen), anti-CD4-PE (BD Pharmingen) ve anti-CD8-APC (BD Pharmingen) ile boyandı ve akım sitometride CFSE-FITC ile proliferasyon analizi yapıldı.

Gruplardan ortalama 5×10^5 B hücre izole edildi. Hücre miktarı az olduğu için uyarım 96 kuyulu plaklarda yapıldı. Kuyular 200 µl'de 2×10^5 hücre olacak şekilde ayarlandı. Uyaranlı kuyuya B hücrelerinin proliferasyonu için 5µg/ml anti-IgM (BD Pharmingen) + 6,25ng/ml IL-4 (BD Pharmingen), uyaransız kuyuya ise sadece hücre eklendi. Kuyuların son hacmi RPMI 1640+%10 FCS ile 200 µl'ye tamamlandı. Kültür plakları 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde 4 gün inkübe edildi. 4 gün sonunda kuyulardan 100 µl hücre alınarak hücreler anti-CD19-APC-Cy7 (BD Pharmingen), anti-CD27-PE (BD Pharmingen) ve anti-CD21-APC (BD Pharmingen) ile boyandı ve akım sitometride proliferasyon analizi yapıldı.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Gruplar arası proliferasyonların ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Release 16- SPSS Inc., 1989-1992) paket programı kullanılarak yapıldı. Yapılan karşılaştırmalarda p değeri $\leq 0,05$ bulunduğu zaman, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

T ve B Lenfositlerinin Saflığı

SDİY'li hastalardan izole edilen CD3^+ T hücre saflığı %95,1'dir. Bu hücrelerin %44,8'i CD4^+ ve %47,5 CD8^+ T hücreleridir (Şekil 1). Kontrol grubundan izole edilen CD3^+ T

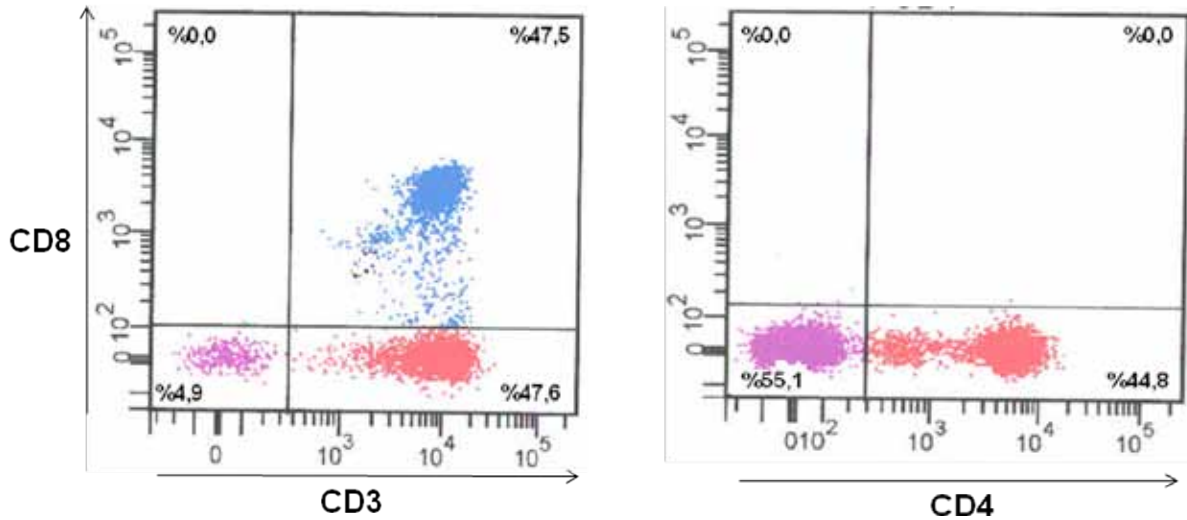
hücre saflığı %96,6'dır. Bu hücrelerin %57,5'i CD4⁺ T hücresi ve %28,8 CD8⁺ T hücreleridir. Kontrol grubundan izole edilen CD19⁺ B hücre saflığı %81,1'dir. Bu hücrelerin %73,6'sı CD21⁺ B hücresi, %25,1'i CD27⁺ B hücreleridir.

T ve B Hücreleri Proliferasyon Sonuçları, 4. Gün

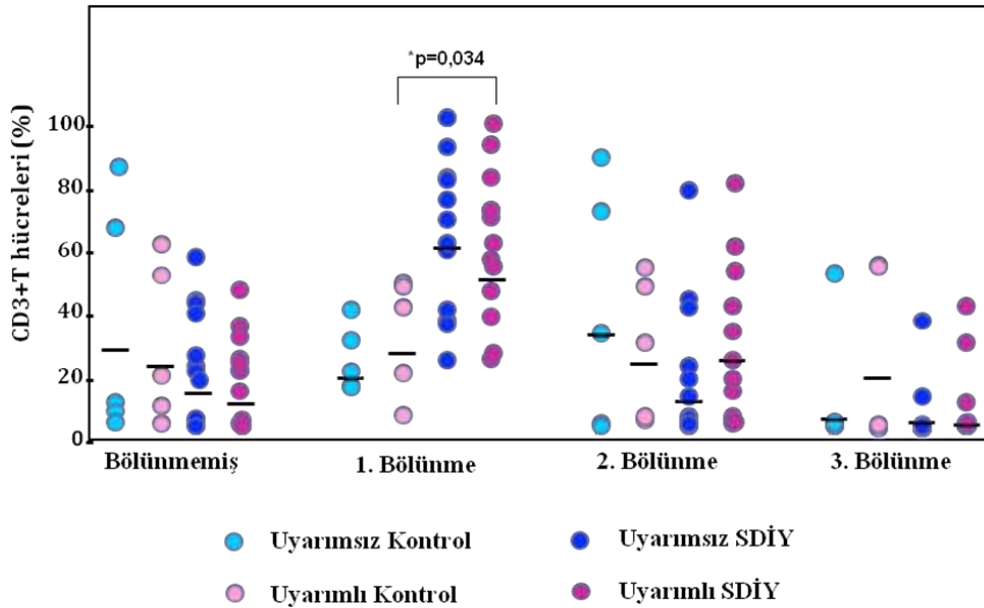
CD3⁺ T hücrelerinin birinci bölünmesinde CDmix uyaranlı kontrol ile CDmix uyaranlı SDİY grupları karşılaştırıldı-

ğında; SDİY'li hastaların proliferasyonunun kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla proliferere olduğu görüldü. Diğer bölünmelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 2).

CD8⁺ T hücre proliferasyon grafiğinin birinci bölünmesinde CDmix uyaranlı kontrol grubuna kıyasla, CDmix uyaranlı SDİY grubunun istatistiksel olarak anlamlı ve daha fazla proliferere olduğu görüldü. Diğer grupların proliferasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.



Şekil 1: SDİY'li hastanın CD3⁺/CD8⁺/CD4⁺ T hücre saflık sonucu; 0. Gün



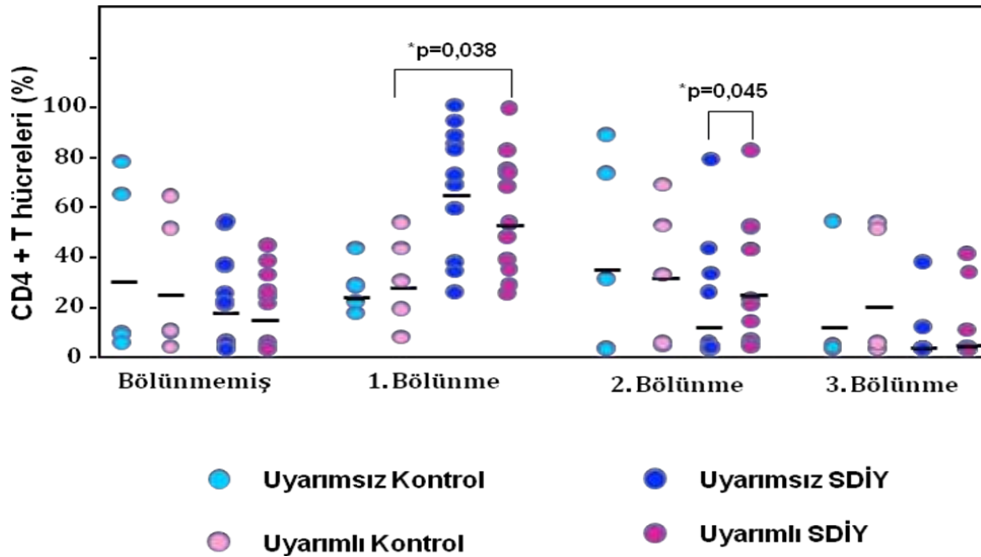
Şekil 2: CD3⁺ T hücre proliferasyonu, 4. Gün

CD4⁺ T hücre proliferasyon grafiğinin birinci bölünmesinde CDmix uyaranlı kontrol grubuyla, CDmix uyaranlı SDİY grubu karşılaştırıldığında, uyaranlı SDİY grubunun istatistiksel olarak anlamlı ve daha fazla proliferere olduğu görüldü. İkinci bölünmede uyaransız SDİY grubu ile uyaranlı SDİY grubu karşılaştırıldığında uyaranlı olanın istatistiksel olarak anlamlı ve daha fazla bölündüğü belirlendi (Şekil 3).

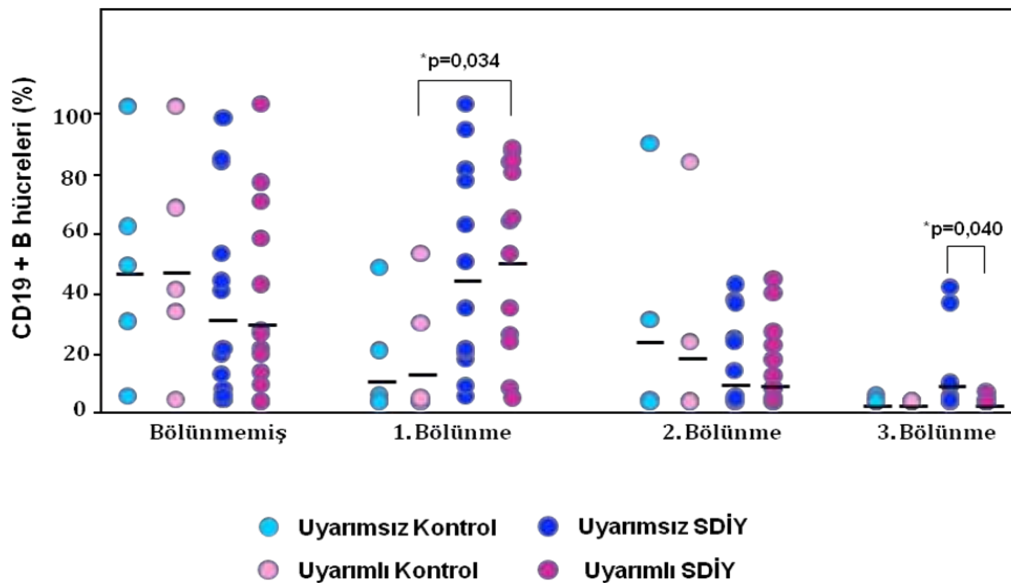
CD19⁺ B hücre proliferasyon grafiğinin birinci bölünmesinde CDmix uyaranlı kontrol grubu ile CDmix uyaranlı SDİY

grubu karşılaştırıldığında, SDİY grubunun kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ve daha fazla bölündüğü görüldü. Son bölünmede uyaransız SDİY grubuyla CDmix uyaranlı SDİY grubu karşılaştırıldığında uyaransız hücrelerin, CDmix ile uyaranlı hücrelere göre anlamlı olarak daha fazla bölündüğü gözlemlendi. Diğer gruplarda anlamlı farklılık olmadığı belirlendi (Şekil 4).

CD27⁺ ve CD21⁺ B hücreleri proliferasyon grafiğine baktığımızda, bu hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı proliferasyon görülmedi.



Şekil 3: CD4⁺ T hücre proliferasyonu, 4. Gün



Şekil 4: CD19⁺ B hücre proliferasyonu, 4. Gün

TARTIŞMA

Doğumsal immün yetmezlikler, immün sistemin farklı bileşenlerinin işlev bozukluğu ve/veya olgunlaşmasında kesintiye yol açan genetik bozuklukların neden olduğu hastalıklardır. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da doğumsal immün yetmezlikten farklı ağırlıkta etkilenme oranı tahmini olarak 1/500'dir. Tüm doğumsal immün yetmezliklerin ortak yönü enfeksiyona bağlı komplikasyonlardır (2).

SDİY'li hastaların 4 geninde hata tanımlanmıştır. Bunlar; indüklenmiş T hücre kostimülatorü (ICOS) (16,17), Tümör Nekroz Faktör Reseptör ailesi üyesi 13B (TNF RS13B=TACI) (18,19), 13C (TNF RSF13C= BAFFR) (20) ve CD19 (21) dur. ICOS mutasyonlu SDİY hastalarında tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar, splenomegali, otoimmün nötropeni, intestinal lenfoid hiperplazi ve neoplazi görülür (22). CD19 mutasyonu olan hastaların kanındaki B hücrelerinin sayısı normal veya azalmıştır. Yüzye CD19⁺ B hücre ekspresyonu saptanamaz ve CD27⁺ hafıza B hücreleri ve CD5⁺ B hücrelerinin sayısı azalmıştır (21,23).

Ray ve arkadaşları manyetik boncuklarla yapmış oldukları CD4⁺ T hücre saflığı %98,7, B hücrelerinin saflığı ise %97 olarak rapor etmişlerdir. Saflık sonuçlarının %95-100 arasında olması yüksek bir izolasyon yapıldığının göstergesidir (24). Bu çalışmada, Rosette Sep (Stemcell Technologies) ile lenfosit izolasyonu sonrasında lenfosit sayısı fazla olan hastalardan yüksek saflıkta hücre izole edildi.

CD3⁺, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre proliferasyon grafiklerinin birinci bölünmesinde, CDmix uyaranlı SDİY'li hasta grubu CDmix uyaranlı sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ve daha fazla proliferatördür. Bu hücrelerin proliferasyonlarının hepsinde CDmix uyaranlı bölünmemiş SDİY hücrelerine kıyasla, CDmix uyaranlı bölünmüş SDİY hücrelerinin istatistiksel olarak anlamlı ve daha fazla bölünmüş olması, T lenfositlerinin proliferasyonlarıyla ilgili

bir problem olmadığını göstermektedir. Buna ek olarak CD4⁺ T hücrelerinin 2. bölünmesinde CDmix uyaranlı SDİY grubunun, uyaransız SDİY grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ve daha fazla bölündüğü görülmektedir. CDmix uyaranlı bölünmemiş kontrol grubuna göre CDmix uyaranlı bölünmüş kontrol grubunun istatistiksel olarak anlamlı proliferasyonu kontrol grubunun T lenfositlerinin bölünmesinin normal gerçekleştiğini göstermektedir.

B lenfositlerinin proliferasyonlarına baktığımızda CD19⁺ B hücrelerinin birinci bölünmesinde, CDmix uyaranlı kontrol ile CDmix uyaranlı SDİY grubu karşılaştırıldığında SDİY grubunun istatistiksel olarak anlamlı artışı ve CD19⁺ B hücrelerinin toplam proliferasyonlarında bölünmemiş CDmix uyaranlı SDİY grubuna kıyasla bölünmüş CDmix uyaranlı SDİY grubunun istatistiksel olarak anlamlı artışı CD19⁺ B hücrelerinin bölünmesinde bir sorun olmadığını göstermektedir.

CD27⁺ ve CD21⁺ B hücrelerinin 4 günlük kültürde istatistiksel olarak anlamlı proliferasyonun görülmemesiyle ilgili olarak net bir yorum yapılamaz. Bu durum B hücre izolasyonu sonucu az olan hücre sayısının bölünme için yetersiz olmasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak Sık Değişken Immün Yetmezlik hastalığı T ve B lenfositlerinin proliferasyonu üzerine baskılayıcı bir etki göstermemektedir.

Teşekkür

Ayşe Gül İzgi'nin "İmmün Yetmezlik Hastalarında Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) Yöntemi ile Lenfosit Proliferasyonunun İncelenmesi" başlıklı yüksek lisans tezidir ve SAG-C-YLP-120309-0031 no ile Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BABKO) tarafından desteklenmiştir. Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 19.12.2008 tarih ve MAR-YÇ-2008-0215 sayılı rapor ile onaylanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Roitt I, Brostoff J, Male D. Primary Immunodeficiency. Immunology. 3rd edition. JB Lippincott Co: London; 1989. p. 299.
2. Abbas AK, Lichtman AH. Doğumsal ve Edinsel İmmün Yetersizlikler. Yıldız Camcıoğlu, Günnur Deniz. Temel İmmünoloji. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2007. p. 209.
3. Ochs HD, Stiehm ER, Winkelstein JA. Antibody deficiency. Immunologic Disorders in infants and children. 5th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2004. p.373-80.
4. Eades-Perner AM, Gathmann B, Knerr V, Guzman D, Veit D, Kindle G, Grimbacher B. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2004-06. Clin Exp Immunol. 2007;147(2):306-12.
5. Bayry J, Hermine O, Webster DA, Lévy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. Trends Mol Med. 2005;11(8):370-6.

6. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol.* 1999;92:34-48.
7. Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 1989;9(1):22-33.
8. Eisenstein EM, Jaffe JS, Strober W. Reduced interleukin-2 (IL-2) production in common variable immunodeficiency is due to a primary abnormality of CD4+ T cell differentiation. *J Clin Immunol.* 1993;13(4):247-58.
9. Jaffe JS, Strober W, Sneller MC. Functional abnormalities of CD8+ T cell define a unique subset of patients with common variable immunodeficiency. *Blood.* 1993;82(1):192-201.
10. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood.* 2008;111(1):77-85.
11. Hammarstrom L, Smith CIE. Genetic approach to common variable immunodeficiency and IgA deficiency. In: Ochs HD, Smith E, Puck JM (eds). *Primary immunodeficiency diseases. A molecular and genetic approach.* New York: Oxford University Press 1999. p. 250-62.
12. International Union of Immunological Societies. Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. *Clin Exp Immunol.* 1999;118:1-28.
13. Di Renzo M, Serrano D, Zhou Z, George I, Becker K, Cunningham-Rundles. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas / fas ligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. *Clin Exp Immunol.* 2001;125(1):117-22.
14. Oliva A, Scala E, Quinti I, Paganelli R, Ansetequi IJ, Giovannetti A, Pierdominici M, Auti F, Pandolfi F. IL-10 production and CD40 ligand expression is in patients with common variable immunodeficiency. *Scan J Immunol.* 1997;46(1):86-90.
15. Warnatz K, Denz A, Dreger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schleiser M, Peter HH. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood.* 2002;99(5):1554-51.
16. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, Eibel H, Fischer B, Schäffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol.* 2003;4(3):261-68.
17. Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J, Holm A, Franco JL, Plebani A, Hammarstrom L, Skrabl A, Schwinger W, Grimbacher B. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol.* 2004; 113(3):234-40.
18. Castigli E, Wilson S, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Morra M, Curran J, Geha R. Reexamining the role of TAC1 coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2007;39(4):430-31.
19. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, Peter HH, Rockstroh JK, Schneider P, Schäffer AA, Hammarström L, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TAC1 are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet.* 2005;37(8):820-28.
20. Warnatz K, Salzer U, Gutenberger S. Human BAFF-R deficiency causes hypogammaglobulinemia. *Clin Immunol.* 2005;115(suppl 1):820.
21. van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJ, van Tol MJ, Woellner C, Grimbacher B, Patiño PJ, van Dongen JJ, Franco JL. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med.* 2006;354(18):1901-12.
22. Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Skrabl-Baumgartner A, Schwinger W, van der Burg M, van Dongen JJ, Orłowska-Volk M, Knoth R, Durandy A, Draeger R, Schlesier M, Peter HH, Grimbacher B. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood.* 2006;107(8): 3045-52.
23. Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science.* 1992;256(5053):105-7.
24. Basu S, Campbell HM, Dittel BN, Ray A. Purification of specific cell population by fluorescence activating cell sorting (FACS). *J Vis Exp.* 2010. doi:10.3791/1546.