



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**JUVENİL SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATUZUSLU
ÇOCUKLARDA HASTALIK TAKİBİNDE YA DA
TEŞHİSİNDE SİTOPENİ OLAN VE OLMAYANLAR
ARASINDA HEMOFAGOSİTİK
LENFOHİSTİYOSİTOZ MUTASYON VARLIĞI
İNCELEMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Emre GÖK

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Tiraje CELKAN

İSTANBUL - 2019

TEŞEKKÜR

“Primum non nocere” Tıp eğitimine başladığım ilk zamanlarda öğretilen bu doktrinle çıktığım bu yolda meslek etiğini kavramayı öğreten, içinde bulunduğumuz yüzyılın koşulları çerçevesinde usta-çırak ilişkisi ile bu mesleği kazanmamı sağlayan tüm hocalarıma,

Pediyatri kliniğine geldiğim ilk dakikalarda ilk tanıştığım hocam, kendisinin bizler için sarf ettiği emeği gördüğümde bu emek karşısında gurur duyduğum Sayın Prof. Dr. Ahmet ARVAS'a,

Bana karşı her zaman sonsuz bir anlayış ve yüksek güven duyan, başaracağıma yürekten inanan, karşıma çıkan her engeli aşmama yardımcı olan, fikirleri ile bana örnek olmuş Sayın Prof. Dr. Tiraje CELKAN'a,

Asistanlığımın son dönemlerinde çok yakınında çalışma fırsatı yakaladığım. Sadece pediatri alanında değil hayatın birçok alanında çok şey öğrendiğim ve öğrenmeye de devam edeceğim, Sayın Prof Dr. Özgür KASAPÇOPUR'a,

Donanımlı bir hekim olabilmek için kendisini örnek aldığım, beni her zaman anlayış ile karşılayan, kendisi ile çalışma gururunu yaşadığım Sayın Doç. Dr. Nur CANPOLAT'a

Benim bugünlere gelmemde üstün emekleri olan değerli, annem Münevver GÖK, babam Mustafa Şahim GÖK ve sevgili kardeşim Mert GÖK'e,

Tanışmam ile hayatımı tamamlayan, bana her zaman anlayış gösteren, desteğini her anımda hissettiğim, sevgili eşim Irmak GÖK'e,

Sonsuz Teşekkürler...

Dr. Emre GÖK
İSTANBUL, 2019

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEŞEKKÜR..... | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| TABLolar LİSTESİ..... | v |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | vii |
| KISALTMALAR..... | viii |
| ÖZET..... | x |
| ABSTRACT..... | xi |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 2.1. Hemofagositik Lenfohistiyositoz..... | 2 |
| 2.1.1. Tarihçe..... | 2 |
| 2.1.2. Epidemiyoloji..... | 3 |
| 2.1.3. Sınıflandırma..... | 3 |
| 2.1.4. Patofizyoloji..... | 4 |
| 2.1.5. Tanı..... | 5 |
| 2.1.6. Perforin..... | 6 |
| 2.1.7. Sintaksin..... | 11 |
| 2.1.8. Sitokinler..... | 13 |
| 2.1.9 İmmün Yetersizlik Sendromları ile ilişkili Hemofagositik Lenfohistiyositoz..... | 14 |
| 2.1.10. Enfeksiyon ile ilişkili Hemofagositik Lenfohistiyositoz..... | 14 |
| 2.1.11. Malignite ile ilişkili Hemofagositik Lenfohistiyositoz..... | 15 |
| 2.1.12. Ayırıcı Tanı..... | 15 |
| 2.1.13. Tedavi..... | 15 |
| 2.1.14. Tedavi Seçimi..... | 16 |
| 2.2. Juvenil Sistemik Lupus Eritematozus..... | 17 |
| 2.2.1. Tarihçe..... | 17 |
| 2.2.2. Sınıflandırma Kriterleri..... | 17 |
| 2.2.3. Epidemiyoloji..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.4. Genetik..... | 22 |
| 2.2.5. Etiyoloji ve Patogenez..... | 22 |
| 2.2.6. Klinik..... | 25 |
| 2.2.6.1. Hematolojik Sistem Tutulumu..... | 25 |
| 2.2.6.2. Lokomotor Sistem Tutulumu..... | 26 |
| 2.2.6.3. Vaskülit..... | 26 |
| 2.2.6.4. Mukokutanöz Sistem Tutulumu..... | 26 |
| 2.2.6.5. Nöropsikiyatrik Tutulum..... | 27 |
| 2.2.6.6. Renal Tutulum..... | 28 |
| 2.2.6.7. Kardiyovasküler Sistem Tutulumu..... | 28 |
| 2.2.6.8. Pulmoner Tutulum..... | 29 |
| 2.2.6.9. Gastrointestinal Tutulum..... | 29 |
| 2.2.6.10. Endokrin Sistem..... | 29 |
| 2.2.7. Tedavi..... | 29 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 30 |
| 4. BULGULAR..... | 35 |
| 5.TARTIŞMA..... | 47 |
| 6. SONUÇLAR – ÇIKARIMLAR..... | 53 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 55 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo i. Hemofagositik lenfohistiyositoz genetik bulguları..... | 6 |
| Tablo ii. İnflamatuvar Sitokinler..... | 13 |
| Tablo iii. Sintaksin Mutasyonu olan hastalarda klinik ve laboratuvar bulguları..... | 36 |
| Tablo iv. Hemolitik anemisi olan ve olmayan hastalarda sintaksin mutasyonu..... | 37 |
| Tablo v. Lökopeni ve/veya lenfopenisi olan ve olmayan hastalarda sintaksin mutasyonu..... | 37 |
| Tablo vi. Trombositopenisi olan ve olmayan hastalarda sintaksin mutasyonu..... | 38 |
| Tablo vii. Hasta ve kontrol grupları arasında sintaksin mutasyonunun karşılaştırılması..... | 38 |
| Tablo viii. Hemolitik anemisi olanlarda sintaksin polimorfizmin varlığı..... | 41 |
| Tablo ix. Lökopeni ve/veya lenfopeni olan hastalarda sintaksin polimorfizmin varlığı..... | 41 |
| Tablo x. Trombositopenisi olan ve olmayan hastalarda sintaksin polimorfizmin varlığı..... | 42 |
| Tablo xi . Hasta ve kontrol grupları arasında sintaksin mutasyonunun karşılaştırılması..... | 42 |
| Tablo xii. Tekli nükleotid değişiminin saptandığı hastalarda klinik ve laboratuvar bulguları..... | 44 |
| Tablo xiii. Hemolitik anemisi olan ve olmayan hastalarda perforin tekli nükleotid değişiminin varlığı..... | 44 |
| Tablo xiv. Lökopenisi ve/veya lenfopenisi olan ve olmayan hastalarda perforin tekli nükleotid varlığı..... | 45 |
| Tablo xv. Trombositopenisi olan ve olmayan hastalarda perforin tekli nükleotid varlığı..... | 45 |

Tablo xvi. Hasta ve kontrol grupları arasında perforin
tekli nükleotid değişiminin karşılaştırılması.....46



ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. Sitotoksik lenfositlerde yaşa bağlı perforin ekspresyonu; NK hücrelerindeki perforin yüzdesi (A), Perforin içeren CD8 T hücrelerinin yüzdesi (B), Perforin içeren CD56 T hücreleri (C)..... | 8 |
| Şekil 2 Çeşitli klinik durumlarda NK hücresi, CD 8 T hücresi ve CD 56 T hücresinin perforin içeriği..... | 9 |
| Şekil 3. SNARE proteinlerinin hücreiçi yerleşimleri..... | 10 |
| Şekil 4 Çekirdek Kompleks..... | 11 |
| Şekil 5. Sağlıklı bireylerdeki immün yanıt ile HLH hastalarında kontrolsüz inefektif immün yanıt. FHL-3, FHL-4 ve FHL-5 ve CHS ve GS-2 için bozuk olan genin bu basamaklardaki görevi..... | 12 |
| Şekil 6. jSLE hastalarında sitopeni dağılımı..... | 35 |
| Şekil 7. STX11 Geni, Ekzon 2, c.367 G>A, p.V62M değişiminin hasta ve sağlıklı bireyde gösterilmesi..... | 36 |
| Şekil 8. STX11 Geni, Ekzon 2, c.290G>A, p.Q230Q değişiminin hasta ve sağlıklı bireyde gösterilmesi..... | 39 |
| Şekil 9. STX11 Geni, Ekzon 2, c.729 G>A, p.E182E değişiminin hasta ve sağlıklı bireyde gösterilmesi..... | 40 |
| Şekil 10. PRF1 geni , Ekzon 1, c. 475 A>T, p. H105R değişiminin hasta ve sağlıklı bireyde gösterilmesi..... | 43 |

KISALTMALAR

| | |
|---------|--|
| HLH | Hemofagositik Lenfohistiyositoz |
| MAS | Makrofaj Aktivasyon Sendromu |
| sJIA | Sistemik Juvenil İdiyopatik Artrit |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| NK | Doğal Öldürücü |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| TNFSF10 | TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand |
| PRF | Perforin |
| OMIM | Online Mendelian Inheritance In Man |
| FHL | Ailesel Hemofagositik Lenfohistiyositoz |
| CHS | Chediak Higashi Sendromu |
| GS | Griscelli Sendromu |
| XLP | X'e Bağlı Lenfoproliferatif Sendrom |
| APC | Antijen sunan hücre |
| EBV | Ebstein Barr Virüs |
| cSMAC | central Supramoleculer Activation Complex |
| CCV | Klathrin Kaplı Vezikül |
| RER | Çizgili Endoplazmik Retikulum |
| SER | Düz Endozplazmik Retikulum |
| SNAP25 | Snaptozom İlişkili Protein |
| TGN | Trans Golgi Network |
| V | Vezikül |
| VAMP | Vezikül İlişkili Membran Proteini |
| STXBP2 | Syntaxin binding protein 2 |
| IFN | İnterferon |
| TH1 | Yardımcı T Hücre 1 |
| TH2 | Yardımcı T hücre 2 |
| ACR | Amerikan Romatoloji Koleji |
| SLICC | Sistemik Lupus Uluslararası İşbirliği Klinikleri |

| | |
|------------|---|
| jSLE | juvenil Sistemik Lupus Eritematozus |
| ANA | Antinükleer Antikor |
| Antids-DNA | Anti Double Stranded Deoksiribo Nükleik Asit |
| HLA | İnsan Lökosit Antijeni |
| anti-nRNP | Anti Nükleer Ribonükleer Protein |
| MBP | Mannoz Bağlayıcı Protein |
| PCD1 | Programlanmış Hücre Ölümü 1 |
| TLR | Toll benzeri reseptör |
| NET | Nötrofil Ekstraselüler Ağı |
| HMGB1 | Yüksek Hareketlilik Grubu Protein B1 |
| pDC | Plazmasitoid Dendritik Hücrelerin |
| OHA | Otoimmün Hemolitik Anemi |
| TMA | Trombotik Mikroanjyopatiler |
| LAC | Lupus Antikoagülanı |
| AVN | Avasküler Nekroz |
| NP-SLE | Nöropsikiyatrik Sistemik Lupus Eritematozus |
| STX11 | Syntaxin |
| PRF1 | Perforin 1 |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| İTP | İmmün Trombositopeni |

ÖZET

Juvenile sistemik lupus eritematozuslu çocuklarda hastalık takibinde ya da teşhisinde sitopeni olan ve olmayanlar arasında hemofagositik lenfohistiyositoz mutasyon varlığı incelemesi

Bu araştırmaya Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Romatoloji Bilim Dalı tarafından takipli 57 juvenil Sistemik Lupus Eritematozus tanılı hasta katıldı.

Juvenil sistemik lupus eritematozuslu hastalar takibinde ya da teşhisinde bir veya birden fazla seride sitopenisi gelişenler ve gelişmeyenler olarak gruplara ayrıldı. Çalışmaya alınan hastalarda sintaksin ve perforin mutasyonu taraması yapıldı. Çalışmamızda araştırdığımız mutasyonlar ve polimorfizmler herhangi bir sağlık problemi olmayan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi adolesan ve genel çocuk polikliniklerine sağlık taraması amacıyla başvuran 48 sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Çalışmaya katılan hastalarımızın 39(%68)'u kız, 18(%31)'i erkekti, K:E oranı 2.1:1 idi. Tek seride sitopenisi olan 22 hasta, bisitopenisi olan 9 hasta, pansitopenisi olan 4 hasta, sitopenisi olmayan 22 hasta bulunmaktaydı.

Mutasyon analizine göre STX11 geni, 2. Ekzonda 4 hastada mutasyon vardı. STX11 geni 2. ekzonunda 11 hastada polimorfizm bulunmaktaydı. Bunlar sitopeni olan ve olmayanlar ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı. PRF1 geninde 1. Ekzonda 8 hastada tekli nükleotid değişimi tespit edildi. Bu değişim hemolitik anemisi olan jsLE hastalarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Aynı zamanda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında perforinin tekli nükleotid değişiminin jsLE hastalarında bulunması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Hemofagositik lenfohistiyositoz hastalığı ile jsLE hastalığının patofizyolojisinin benzer yollardan geliştiği düşünülerek ortak bir genetik mutasyon saptanmaya çalışıldı.

ABSTRACT

Investigation of hemophagocytic lymphohistiocytosis mutation in patients with juvenile systemic lupus erythematosus in patients with or without cytopenia in disease monitoring or diagnosis.

Fifty seven juvenile systemic lupus erythematosus followed by Cerrahapaşa Faculty of Medicine, Department of Pediatric Rheumatology.

Patients with juvenile systemic lupus erythematosus were divided into two groups who developed cytopenia in one or more series in the follow-up or diagnosis. or not were evaluated for syntaxin and perforin mutation. The mutations and polymorphisms we investigated in our study were evaluated in comparison with 48 healthy control groups. All of patients and control group who applied for health screening to the adolescent and general child polyclinics without any health problems.

Thirty nine patients (68%) were female and 18 (31%) were male. The F: M ratio was 2.1: 1. There were 22 patients with cytopenia in one series, 9 patients with bicytopenia, 4 patients with pancytopenia, 22 patients without cytopenia.

According to mutation analysis, there were mutations in 4 patients in 2nd exon of the STX11 gene. In the second exon of STX11 gene, 11 patients had polymorphism. There were no statistically significant differences between these two groups with and without cytopenia. Single nucleotide change was detected in 8 patients in the 1st exon of the PRF1 gene. This change was statistically significant in jSLE patients with hemolytic anemia. It was also statistically significant that single nucleotide changes of perforin were found in jSLE patients compared to the control group.

The pathophysiology of hemophagocytic lymphohistiocytosis and the pathophysiology of jSLE disease is thought to be developed in a similar way and a common genetic mutation has been tried to be determined.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İkincil hemofagositik lenfositosisin bir çeşidi olan Makrofaj aktivasyon sendromu romatolojik hastalıklara ikincil olarak oluşmaktadır. Vücutta kontrol edilemeyen inflamatuvar yolların aktifleşmesi aşırı sitokin salınımı ile sonuçlanır. Hem romatolojik hastalık olan juvenil sistemik lupus eritematozusun kendisi hem de makrofaj aktivasyon sendromu bu sitokinlerin aşırı üretildiği hastalıklar arasında yer almaktadır.

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı olarak Çocuk Romatoloji polikliniğimizde takipli juvenil sistemik lupus eritematozus tanılı hastaları sitopeni gelişen ve gelişmeyenler olarak gruplara ayırarak bu sitopeni tablolarına neden olabilecek veya bu tabloya eşlik edebilecek genetik bir faktörün varlığını araştırmayı hedefledik.

Amacımız benzer etyopatogeneze sahip bu iki hastalık arasında bağlantı kurup juvenil sistemik lupus eritematozus tanısı ile takipli hastalarda gelişebilecek komplikasyonları öngörmek ve bu komplikasyonlar gelişmeden belirli önlemleri risk faktörü olan hastalarda almaya çalışmaktır. Bu mutasyon taramasında bir diğer amacımız iç içe geçmiş olan bu iki klinik tabloda juvenil sistemik lupus eritematozuslu hastaların bir kısmında gelişen ve aynı zamanda tanı kriterlerinden biri olan sitopeni tablosuna neden olabilecek bir genetik faktörü ortaya çıkarmaktır.

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Romatoloji Polikliniğinden takipli hastalar aydınlatılmış onamları alınarak mutasyon analizleri çalışılmıştır. Mutasyon ve polimorfizmler saptadığımız henüz sitopeni tablosu gelişmemiş hastaların klinik takipleri ileride gelişebilecek sitopeni durumları için dikkate alınarak gözlenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemofagositik Lenfositiositoz

Hemofagositik lenfositiositoz (HLH), hemofagositik aktivite gösteren makrofajlar ile aşırı artmış aktivite gösteren T lenfositlerin (sıklıkla CD8 lenfositler) neden olduğu ölümcül olabilen artmış inflamatuvar cevaba yol açan bir sendromdur¹. Hemofagositik lenfositiositoz tek bir hastalık değildir. Çeşitli durumlarla birlikte ortaya çıkan klinik bir sendromdur². Birincil HLH, çocukların %70-80'inde 1 yaşından önce ortaya çıkar². İkincil HLH ise herhangi bir yaş döneminde ortaya çıkabilir. Hemofagositoz ve HLH semptomları yenidoğanın metabolik problemleri olan lizürik protein intoleransı ve çoklu sülfataz eksikliğinde de görülmüştür. Bu hastalarda immün sistemin aşırı aktivasyonunu tetikleyen metabolit henüz bulunamamıştır.

2.1.1. Tarihçe

İlk olarak 1979 yılında Brunning ve arkadaşları tarafından aktif viral enfeksiyon geçiren 19 hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada ifade edilmiştir. Bu çalışmada hastaların kemik iliği aspirasyon preparatlarında belirgin hemofagositoz ile birlikte histiyositik hiperplazi gösterilmiştir. Hastalarda yüksek ateş, karaciğer fonksiyon bozuklukları ve periferik kanda sitopeni karakteristik olarak saptanmıştır. Hepatosplenomegali ve lenfadenopati sıklıkla eşlik eden bulgular arasında yer almıştır. Hastaların çoğunda kemik iliği preparatlarında megakaryositer seride üretim normal veya artmış olmasına rağmen hematopoez ve granülopoezde azalma gösterilmiştir.

Romatolojide, “makrofaj aktivasyon sendromu” terimi, aşırı aktivite gösteren ve iyi farklılaşmış makrofajların proliferasyonundan kaynaklanan bir dizi klinik semptomu belirtir³. Hadchouel ve arkadaşları tarafından 1985 yılında ilk kez sistemik juvenil romatoid artrit komplikasyonu olarak tanımlanmıştır³. O dönemdeki hastaların çoğunda, kemik iliği aspirasyonlarında belirgin hemofagositik aktiviteye sahip çok sayıda non-neoplastik histiyositin varlığı ortaya çıkmış, yazarlar bu ciddi komplikasyonun makrofajların aşırı aktivasyonu ile tetiklenebileceğini öne sürmüşlerdir. “Makrofaj aktivasyon sendromu” terimi Stephan ve arkadaşları tarafından 1993 yılında aynı merkezden yayınlanan başka bir makalede ilk kez tanımlanmıştır³. Günümüzde makrofaj aktivasyon sendromu(MAS) otoimmün veya otoinflamatuvar hastalığı bulunanlarda HLH'un bir varyantı olarak tanımlanmaktadır⁴.

MAS vakalarının çoğu, sistemik juvenil idiyopatik artrit (sJIA) ve erişkin başlangıçlı formunda görülmekle birlikte aynı zamanda sistemik lupus eritematozus ve diğer romatizmal hastalıklarda da tarif edilmiştir⁴.

2.1.2. Epidemiyoloji

Ailesel hemofagositik lenfositosis için yapılmış farklı etnik gruplardaki insidans çalışmalarında Japonya'da 1/800.000⁵, İsviçre'de 1,2/1.000.000⁶ bulunmuştur. İsveç'te hastalığın sıklığı 1:50.000⁷ iken Türkiye'de yapılmış olan bir çalışmada hastalığın sıklığı 7.5:10.000 bulunmuştur⁷. Bu oranın diğer ülkelere göre yüksek olmasının nedenleri arasında genetik olarak otozomal resesif aktarılan bu hastalığın bölgedeki akraba evliliği oranlarının %23,2 olması ile ilişkilendirilebilir ve Türkiye'de yapılmış olan bu çalışmada HLH olan çocukların ebeveynlerinin akraba evliliği oranı %68 bulunmuştur⁷.

2.1.3. Sınıflandırma

Hemofagositik lenfositosis, majör tanı ve tedavi açısından zorlukları olan bir hastalıktır. Hastalık temel olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır:

A. Birincil Hemofagositik Lenfositosis

1. Ailesel HLH

- Gen defekti bilinenler; Perforin, Munc13-4, Sintaksin11
- Gen Defekti bilinmeyenler

2. İmmün yetersizlik sendromlarına eşlik eden

- Chediak-Higashi Sendromu
- Griscelli Sendromu
- Hermansky-Pudlak Sendromu
- X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom

B. İkincil Hemofagositik Lenfositosis

1. Enfeksiyon ile ilişkili; Bakteri, virüs, parazit, mantar
2. Makrofaj aktivasyon sendromu; romatolojik hastalıklar
3. Kanserle ilişkili; Non hodgkin lenfoma, anaplastik büyük hücreli lenfoma, hodgkin lenfoma, lösemi

2.1.4. Patofizyoloji

Hemofagositik lenfositosis (HLH)'un altında yatan temel patofizyolojik mekanizma T hücreleri ve makrofajların uygunsuz aktivasyonu olup, diğer kan hücrelerinin fagositozu ve klinik diğer bulgulara neden olan aşırı sitokin (interferon-c, TNF-a, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and IL-4) üretimidir⁸. Birincil HLH'de ateş (% 91), hepatomegali (% 90-95) ve splenomegali (% 84) sık görülürken, nörolojik semptomlar (% 47), döküntü (% 43) ve lenfadenopati (% 42) daha seyrek görülür. Yaygın laboratuvar anormallikleri arasında trombositopeni (% 97), anemi (% 88), nötropeni (% 69) vardır⁹. İkincil HLH romatolojik veya enfeksiyon gibi nedenlerle immün sistemin güçlü bir şekilde aktive olması ile ortaya çıkmaktadır¹⁰. İkincil HLH'de ateş, anemi ve hipertrigliseridemi çok sık olarak görülürken, nötropeni (% 55-100), trombositopeni (% 70-80), hepatomegali (% 60-90), splenomegali (% 13-90), hiperferritinemi (% 55-100), hipofibrogenemi (% 14-100), hipertrigliseridemi (% 43-79) ve LDH yüksekliği (50-100%) altta yatan etiolojiye bağlı olarak değişkenlik gösterir¹¹. İkincil HLH viral enfeksiyonlarda ortaya çıkışı %29, diğer enfeksiyonlarla %20, malignansiler ile %20, romatolojik hastalıklarda %7, immün yetersizliklerde %6 oranında görülmektedir¹².

Temelde iki farklı sitolitik özellik gösteren lenfosit bulunmaktadır; ilki antijenik peptidlerin major histocompatibility complex (MHC) aracılığı ile sunulması sonucu hedef hücreyi tanıyabilen sitotoksik T lenfosit, ikincisi ise MHC molekülü ile sunulmadan çeşitli hedef hücrelerin lizisine yol açan Doğal Öldürücü (NK) hücreleridir¹³. Bu hücreler ölüm yolağını başlatmak için yüzeylerinde bulunan CD95, Tumor Necrosis Factor (TNF), TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TNFSF10) ile öldüreceği hücre ile ligand bağlantısı kurar.

HLH'nin oluşum mekanizmasının merkezinde sitotoksik T lenfositlere antijen sunulması ile oluşan sitotoksik yanıtın bozuk olması, antijen sunumunun sonlanmasını önleyerek sitotoksik yanıtın sonlanmadan devam etmesidir¹⁴. HLH'de hastaların immüglobulin düzeyleri, mutlak lenfosit sayıları, matur T hücre sayıları, CD4/CD8 oranları normaldir³. Çoğu hastada NK hücre fonksiyonu çok azalmış veya yoktur. CD8 hücrelerin sitotoksik aktiviteleri de belirgin olarak azalmıştır³. Aktive lenfositler ve makrofajlar yüksek seviyelerde proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler ve kemokinler salgırlar ve bu da karakteristik klinik ve laboratuvar bulgularına yol açar. Ateş, interlökinler ve TNF- α nedeni ile oluşurken, ferritin aktif makrofajlar tarafından salgılanır ve yine bu makrofajlar yüksek düzeyde plazminojen aktivatörü yapar, hiperfibrinolize neden olur, fibrinojen seviyesini düşürür. Sitokinler lipoprotein lipazı ve hematopoezi baskırlar. Hemofagositoz derin sitopenilerin tek nedeni değildir. TNF- α ve IFN- γ yüksek oranda bulunması sitopeniyi oluşturan bir diğer nedendir⁴.

2.1.5. Tanı

Histiyoitoz cemiyeti bu hastalık için ilk tanı kılavuzunu 1991 yılında oluşturmuş olup şu an HLH-2009 adını verdiği, 2009 yılında yayınlamış olduğu tanı ve tedavi kılavuzunu kullanılmaktadır. Bu kılavuza göre tanı için

1. HLH'nin moleküler olarak ispatlanmış tanısı

Veya

2. Aşağıdakilerin 4 tanesinden en az 3 tanesinin bulunması

- I. Ateş

- II. Splenomegali

- III. Sitopeni (En az iki seride olmalı)

Hemoglobin <90 g/L

Trombosit <100.000 mm³

Nötrofil <1000 mm³

- IV. Hepatit

Ve

3. Aşağıdakilerin 4 tanesinden en az 1 tanesinin

- V. Kemik iliği, dalak veya lenf nodlarında hemofagositozun gösterilmesi

- VI. Ferritin yüksekliği (>500 ng/mL)

- VII. Çözünabilir CD25 (çözünabilir IL-2 reseptör- α) \geq 2400 U/mL

- VIII. NK hücrelerinin fonksiyonunun çok az olması veya olmaması

4. HLH tanısını destekleyen diğer sonuçlar

- I. Hipertrigliseridemi (açlık trigliserid düzeyi >265 mg/dL)

- II. Hipofibrinojemi (fibrinojen <150 mg/dL)

- III. Hiponatremi (sodyum <135 mmol/L)

Hemofagositik lenfohistiyostuzun moleküler tanısında mutasyonlara bakılmaktadır. Bu mutasyonlardan en sık görüleni ailesel HLH'li vakaların %40 ında gözlenen Perforin (PRF) mutasyonudur¹⁵. Online mendelian inheritance in man (OMIM) bilgi bankasına göre ailesel HLH 5 gruba ayrılmıştır. HLH'ye neden olan genetik hastalıklar aşağıdaki Tablo i'de özetlenmiştir.

Tablo i. Hemofagositik lenfohistiyositoz genetik bulguları

| FHL alt grupları | Koromozom | Gen | Gen fonksiyonu | Protein |
|---------------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| FHL-1 | 9q21.3-q22 | <i>Bilinmiyor</i> | <i>Bilinmiyor</i> | <i>Bilinmiyor</i> |
| FHL-2 | 10q21-22 | <i>PRF1</i> | Apoptozisin indükasyonu | Perforin |
| FHL-3 | 17q25 | UNC13D | Vezikül Priming | Munc13-4 |
| FHL-4 | 6q24 | STX11 | Vezikül Transportu | Sintaksin 11 |
| FHL-5 | 19p13.2-3 | STXBP2(UNC18B) | Vezikül Transportu | Munc 18-2 |
| Diğer HLH ilişkili | | | | |
| CHS-1 | <i>1q42.1-q42.2</i> | LYST | Vezikül Transportu | Lyst |
| GS-2 | <i>15q21</i> | RAB27A | Vezikül transportu | Rab27a |
| XLP-1 | <i>Xq25</i> | SH2D1A | Lenfosit aktivasyonu | SAP |
| XLP-2 | <i>Xq25</i> | BIRC4 | Çeşitli sinyal yolağı | XIAP |

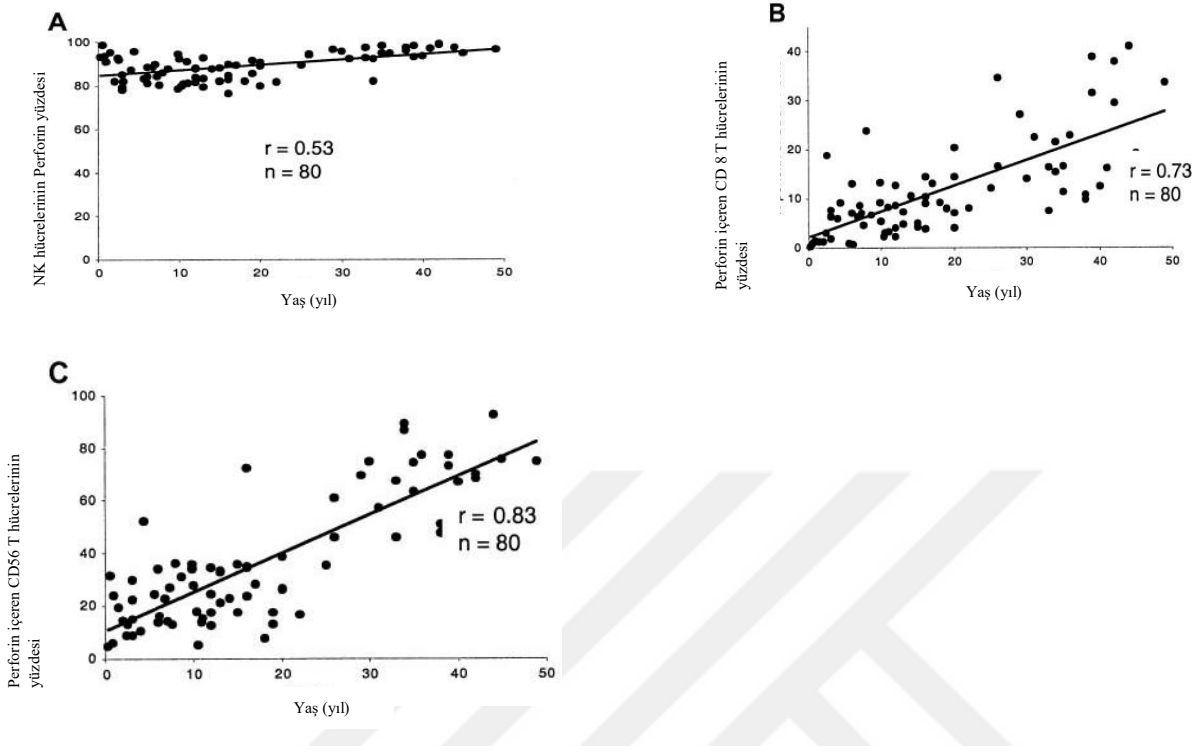
2.1.6. Perforin

Perforin, sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin sitoplazmik granüllerinde bulunan membranolitik bir proteindir¹⁶. 1999 yılında Stepp ve arkadaşları FHL'nin perforin genindeki mutasyonla ilişkisini buldular ve FHL-2 için moleküler temel kuruldu¹⁷. Perforin; efektör ve hedef hücre arasındaki bağlantı üzerine sitotoksik T lenfositleri ve NK hücreleri tarafından salgılanır ve kalsiyumun varlığında, hücre ölümüne neden olan bir gözenek oluşturulması için hedef hücrenin zarına nüfuz eder (Lichtenheld and Podack 1989; Tschopp and Nabholz 1990; Lowin vd. 1995). Gözenek oluştuğunda, apoptozu tetikleyen granzimler hücre içine girer ve ozmotik parçalanma ile hedef hücrelerin ortadan kalkmasına neden olur (Darmonetal.1995;Darmonand Bleackley 1998). Programlanmış hücre ölümü için başlangıç sinyali (apoptoz), hücreye perforin sayesinde açılan gözenekler yoluyla girebilen granzimler tarafından verilir (Berthou vd, 1995). Granzim B'nin son zamanlarda, katyondan bağımsız mannoz-6-fosfat / insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü kullanılarak, perforinden bağımsız bir şekilde hücrelere girdiği gösterilmiştir (Motyka vd, 2000). Ayrıca, dipeptidil peptidaz I eksik bir fare modelinde, sitotoksik lenfositler normal miktarlarda A ve B granzimlerini içerir,

ancak bu moleküller inaktiftirler (Pham & Ley, 1999). Bununla birlikte, deneysel modelde, NK hücrelerinin çoğu anti-tümör etki fonksiyonları için granzimlerin A ve / veya B eksikliği kritik değildir (Davis vd, 2001). Perforinin koruyucu rolü, NK hücrelerinde daha alakalı görünmektedir¹⁸. Perforin işlevsel olmadığında sitotoksik T hücreleri ve NK hücrelerinin hedef hücreler üzerinde azalmış sitolitik etki gösterdiği veya hiç sitolitik etki göstermediği kolayca düşünülebilir. Bunun sonucunda HLH hastalarının neden NK hücre işlevini belirgin olarak azalttığı veya olmadığını açıklar¹⁹. Antijen sunan hücre (APC) fonksiyonu, perforinin olaya katılması ile sonlanır. Perforin fonksiyon yapamazsa, APC'lerin fonksiyonları durdurulamaz (Parajuli vd, 1999) ve bu, T hücrelerinin sürekli uyarılmasına neden olabilir. Tüm bu işlevler, perforinin immün yanıtı etkileyebileceğini göstermektedir. Bir virüs tarafından tehdit edildiğinde PRF1 (veya benzeri) mutasyonları olan çocuklarda ne olmaktadır? T hücre aracılı peptitlerin tanınması T hücre aktivasyonuna ve klonal genişlemeye yol açsa da, ortaya çıkan hücreler enfekte olmuş hücreleri öldürmekte başarısız olmakta ve böylece antijen stimülasyon kaynağını ortadan kaldıramamaktadır. Alternatif olarak, bu kalıcı antijen ile uyarılan T-hücresi aktivasyonu, iki büyük makrofaj aktivatörü olduğu bilinen IFN- γ ve GM-CSF dahil olmak üzere çok miktarda sitokin üretilmesi ile sonuçlanır. Sürekli makrofaj ve T hücresi aktivasyonu, doku infiltrasyonuna ve yüksek düzeyde TNF- α , IL-1 ve IL-6 üretimine ve bu da doku hasarına ve klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olur¹⁸.

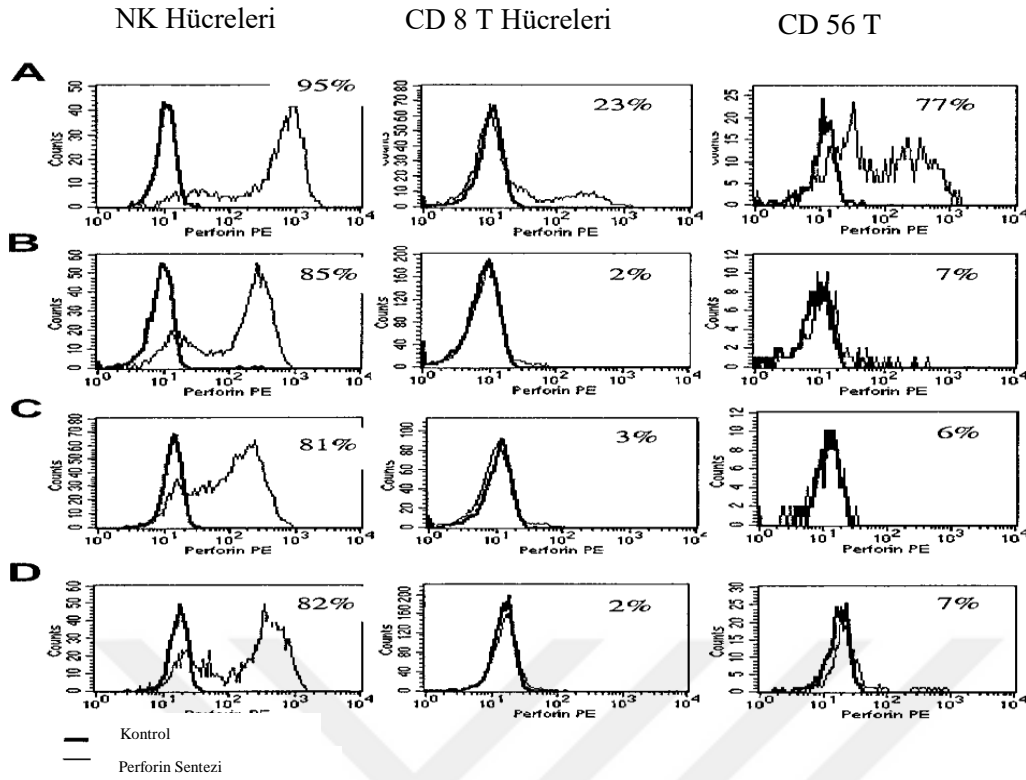
Bağışıklık cevabının sonlanması 2 şekilde olur. İlk mekanizma, antijeni 'görmezden gelerek' cevabın kendiliğinden sona ermesidir. Normal deneklerde enfeksiyon, lenfosit proliferasyonu ve enfekte olmuş hücrelerin perforinle delinmesi ile öldürülmesi dahil olmak üzere normal bir immün yanıtı tetikler. Enfekte hücreler elendikten sonra, bağışıklık yanıtı için uyarım ortadan kaldırılır ve daha fazla çoğalma durur. Bağışıklık yanıtını durdurmanın alternatif yolu, bir "aktif sonlandırma" dır. Bu durumda, spesifik sinyaller yanıt mekanizmalarını engeller. Bu işlev, T hücrelerinin farklı bir aktivasyonuna bağlıdır. Yüzey reseptörü B7'nin davranışı bu işlevi açıklamak için iyi bir model olarak düşünülebilir. Reseptör CD28'i bağlarsa, ortaya çıkan sinyal çoğalma ve farklılaşmadır; aksine, eğer B7 reseptörü CTLA4 molekülünü bağlarsa, ortaya çıkan mesaj işlemi durdurmak ve böylece anerjiyi uyarmaktır (Dahl vd, 2000). Bu bulgu, CTLA-4 knock-out farelerinin lenfoprofilatif bir hastalıktan öldüğüne dair kanıtlarla doğrulanmıştır. Ama hangi bağlantının gerçekleşmesi gerektiğine nasıl karar verdiği, halen cevaplanamamıştır. En olası cevap, reseptörlerin afinitesinin önemli rol oynamasıdır: CD28 reseptörü, CTLA-4 reseptörüne göre yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu, bağlanma oranını ve yanıtı etkileyebilir¹⁸.

Doğal Öldürücü hücrelerinin yüzdesi, yaş arttıkça oldukça sabittir¹⁹. Ancak perforin sentezleyen sitotoksik lenfositlerin oranı yaşa bağlı değişkendir. (Şekil 1)¹⁹.



Şekil 1. Sitotoksik lenfositlerde yaşa bağlı perforin ekspresyonu; NK hücrelerindeki perforin yüzdesi (A), Perforin içeren CD8 T hücrelerinin yüzdesi (B), Perforin içeren CD56 T hücreleri(C)

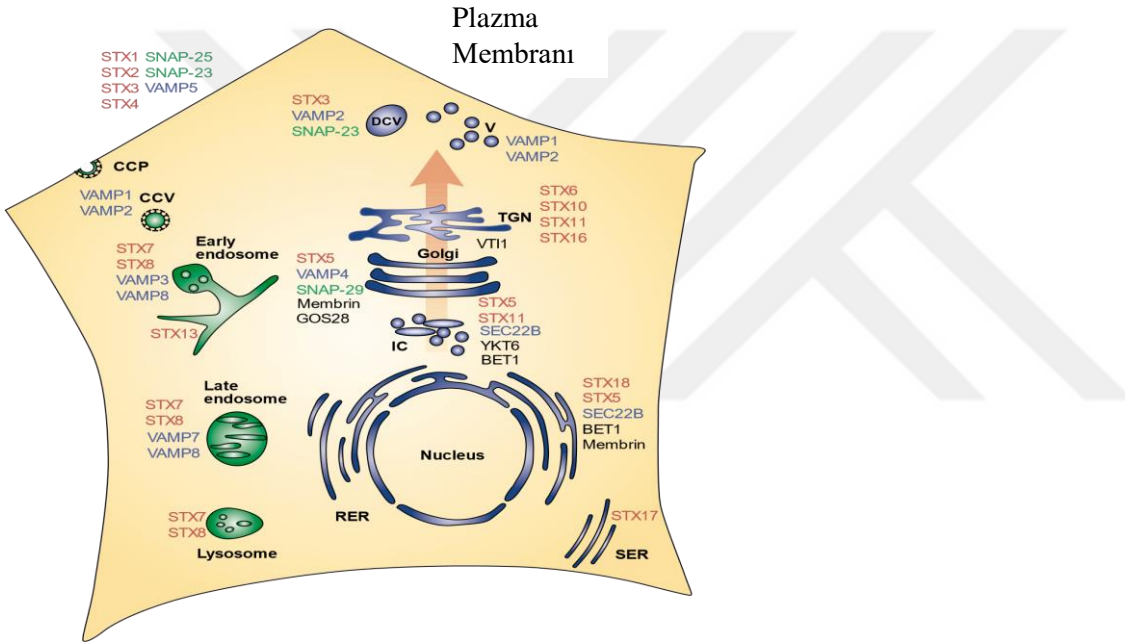
Doğal Öldürücü hücrelerindeki perforin sentez oranı çocuklarda (1-15 yaş) $86\% \pm 5\%$ iken erişkinlerde (≥ 15 yaş) bu değer $92\% \pm 6\%$ 'dır. Perforin içeren CD8 T hücreleri yaşla birlikte artmaktadır. Küçük çocuklarda özellikle süt çocuğu döneminde perforin sentezleyen CD8 T hücre oranı çok düşüktür. Perforin sentezleyen CD8 T hücre oranı çocuklarda $7\% \pm 5\%$ iken erişkinlerde bu oran $18\% \pm 10\%$ arasındadır. Perforin sentezleyen CD56 hücrelerin sayısı da yaşla birlikte artmaktadır. Çocuklarda perforin sentezleyen CD56 hücrelerinin oranı $23\% \pm 10\%$ iken erişkinlerde bu oran $54\% \pm 23\%$ arasındadır. Perforin sentezinin sağlıklı bir yetişkindeki değerleri şekil 2A'da gösterilmiştir. Perforin sentezinin tamamen olmadığı birincil HLH tanılı hastanın değerleri şekil 2B'de gösterilmiştir. Kısmi perforin sentez kusuru olan birincil HLH hastanın değerleri şekil 2C'de gösterilmiştir. EBV ilişkili HLH hastasının değerleri şekil 2D'de gösterilmiştir¹⁹.



Şekil 2 Çeşitli klinik durumlarda NK hücresi, CD 8 T hücresi ve CD 56 T hücresinin perforin içeriği

Perforin ve granzim granüllerinin salgılanması birkaç basamakta gerçekleşmektedir. Bunlar; ilk olarak sitotoksik hücre tarafından hedef hücrenin tanınması ardından adezyon ve iki hücre arasında sinaptik boşluğun oluşturulması, golgi kompleksinin ve mikrotübül organizasyon merkezinin hızlı bir şekilde yeniden yönlendirilmesi, litik granüllerin polarize olup sitotoksik T lenfositlerin bağlantı bölgesine göçü (Kupfer and Singer 1989), sitotoksik T lenfositin bu bölgedeki plazma zarına yanaşması ve füzyon gerçekleştirmesi ve salgılamasıdır (Peters vd 1989; Stinchcombe vd 2001). Talin, LFA-1 gibi adezyon molekülleri mikro tübül merkezinin kutuplaştığı bölgede halkasal yapıda bir yoğunluk oluşturur ve bu halkanın etrafı central Supramolecular activation complex (cSMAC) isimli Lck, PKC isimli sinyal moleküllerini içeren bir yapı tarafından çevrilir. Polarize olan granüller cSMAC kompleksinin içine nüfuz ettikten sonra sinaptik aralığa salgılanırlar. Granüllerin salgılanmasının kontrol mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu kutuplaşmış granüllerin salgılanması için gerekli proteinlerden bir tanesi GTPase Rab27a dır. Bu Rab proteini ekzositoz yolunun son basamağında rol almaktadır (Menasche vd 2000). Nöral hücrelerde Rab ve soluble N ethylmaleimide sensitive fusion factor (SNARE) füzyona öncelik eden moleküllerdir. Aynı zamanda Synaptotagmin ve MUNC13-1 kalsiyum ile tetiklenen ekzositozda rol alan

moleküllerdir (Augustin vd 1999, Rizo ve Sudhof 2002). MUNC 13-4 proteini de ekzositozun son basamaklarında rol almaktadır. Griscelli sendromu tip II, litik granül ekzositozunun temel bir efektörü olan GTPase Rab27a'yı kodlayan gendeki mutasyondan kaynaklanmaktadır (Me' nasche' vd 2000). CHS genindeki mutasyon sonucu oluşan Chediak Higashi sendromunda da NK ve T hücrelerinde genişlemiş anormal fonksiyon gösteren litik granüller bulunmaktadır (Baetz vd, 1995; Nagle vd, 1996). Rab27a ve CHS / LYST proteinleri hücre içinde aynı zamanda melanozomların da taşınmasından sorumlu oldukları için bu iki hastalıkta parsiyel albinizm görülmektedir²⁰.



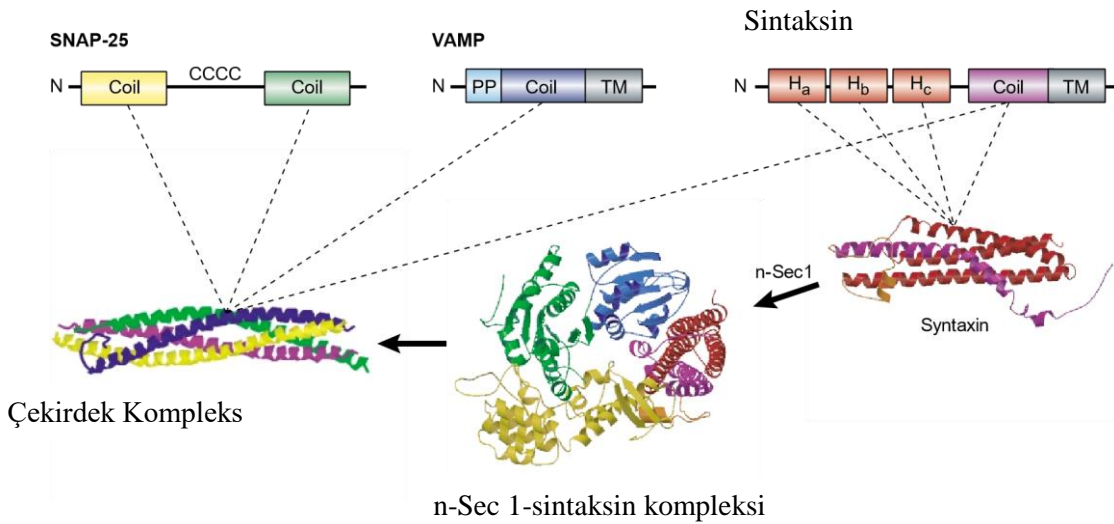
Şekil 3 SNARE proteinlerinin hücre içi yerleşimleri:

CCV:klathrin kaplı vezikül, RER:çizgili endoplazmik retikulum, SER; düz endoplazmik retikulum
SNAP25: Sanptizom ilişkili protein 25 kDa ağırlığında, TGN: transgolgi network V: vezikül ,VAMP:
vezikül ilişkili membran proteini

2.1.7. Sintaksin

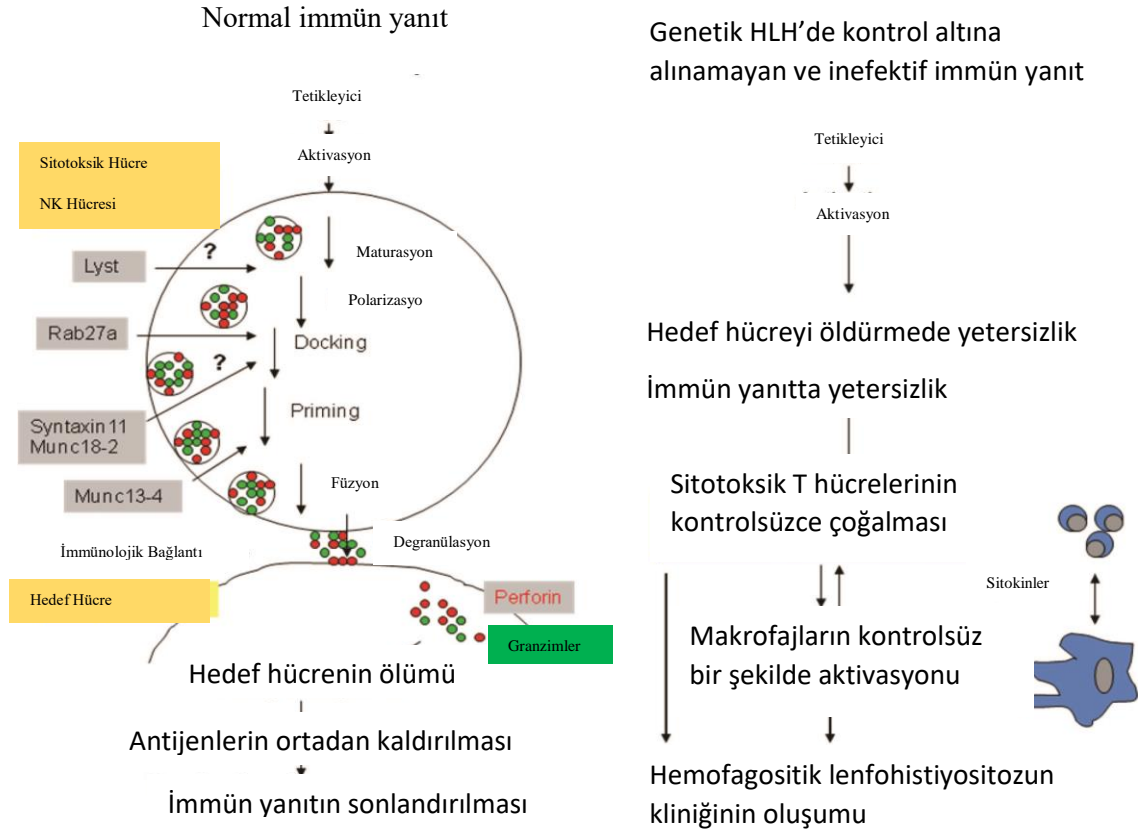
STX 11 geninin ürünü olan sintaksin 11 proteini ekzon 2 de kodlanan 287 aminoasitlik bir proteindir. Bu protein özellikle hücre içi membranların yapısında yer alır. Sintaksin 11 özellikle myelo monositik hücrelerde bulunur²¹. Ökaryotik hücrelerde, moleküllerin hücre içi bölümlerinin yapısal bütünlüğü bozulmadan, hücre içi varış yerlerine ulaşması gerekir²². Bunu başarmak için, veziküller bir hücre içi verici organelden nakledilirken, alıcı organel için hedeflenir, sabitleştirilir ve kaynaştırılır. Bir vezikül kaynaşma olayı birçok koordineli basamağı içerir. Vezikülü serbest bırakmaya hazırlamak için birkaç “priming” aşaması gerekir²³. Ca⁺ bağımlı mekanizmalar füzyonu yönlendirir. Bu hücre içi kaynaşma olayının farklı basamaklarında SNARE protein ailesi son derece önemli rol almaktadır²².

Çekirdek kompleksinin bir parçası olmayan SNARE alanları, sintaksin amino-terminal alanını, SNAP-25'in palmitoile edilmiş merkezini, Vezikül ilişkili membran proteini (VAMP)'nin amino-terminal ucundaki prolin bakımından zengin bölgesini ve VAMP'in transmembran alanlarını içerir. Sintaksin uzun amino-terminal dizim alanı, kendi karboksi-terminal sarmalının bağlanması için VAMP ve SNAP-25 sarmalları ile yarışan üç sarmallı bir demet oluşturur. Bu demete çekirdek kompleks adı verilir (şekil 3).



Şekil 4. Çekirdek Kompleks

Syntaxin binding protein 2 (STXBP2) SNARE protein ailesi ile etkileşime geçerek hücre içi vezikül transferinde rol almaktadır. STXBP2, diğer Sec1 / Munc18 aile üyeleri gibi, 3 alandan oluşan kemer şeklinde bir yapıya sahiptir. Merkezindeki boşluk sintaksinin bağlanması için yüzey alanı sağlar²².



Şekil 5. Sağlıklı bireylerdeki immün yanıt ile HLH hastalarında kontrolsüz inefektif immün yanıt. Perforin ve granzimin sitotoksik granüller aracılığı ile salınımı ve hedef hücrenin apoptozu. Sitotoksik granülde vezikülün salgılandığı basamaklar ve genetik mutasyonlar FHL-3, FHL-4 ve FHL-5 ve CHS ve GS-2 için bozuk olan genin bu basamaklardaki görevi²⁴

2.1.8. Sitokinler

Enflamatuvar sitokinler olan IFN- γ , TNF ve IL-6, aktif FHL'li çocukların periferik kanında, kontrol hastalara kıyasla artmıştır²⁵. Bu artış geri dönüşümlüdür. Bu sitokinlerden en belirgin artış gösteren tablo ii'de görüldüğü üzere IFN- γ 'dır. T lenfositlerce üretilen bir molekül olan solubl CD8 içeriği de hastalığın aktivitesi ile belirgin artış göstermektedir. IFN- γ değerindeki yükseklik ile hastalığın şiddeti arasında korelasyon gösterilmiştir²⁵.

Tablo ii. İnflamatuvar Sitokinler

| | IFN- γ | TNF | IL-6 | sCD8 |
|----------------|---------------|-------------|---------------------|---------------------|
| Sınır değer | 0.1 U/mL* | 5 U/mL* | 58 pg/mL ¥ | 614 U/mL ¥ |
| Aktif FHL | 7/7 | 6/6 | 2/6 | 7/7 |
| Remisyon FHL | 0/5 | ND | 0/5 | 5/5 |
| Kontrol | 0/9 | 3/10 | 1/9 | 0/9 |

Sınır değerinin üzerindeki serum konsantrasyonuna sahip çocuk sayısı/tüm çocuklar

ND çalışılmadı, * ölçülebilir alt limit, ¥ kontrol grubunun + 2 SD üstü

İnterferonlar (IFN) salgılandıkları hücre kaynakları ve farklı immünolojik ve kimyasal özelliklerine göre 3 gruba ayrılır. IFN- α lökositler, IFN- β fibroblastlar, IFN- γ ise immün sistem tarafından başlıca üretilir²⁶. İnterferonun kemik iliği aspiratlarında ve kemik iliği hücrelerinin uzun süreli kültürlerinin süpernatantında gösterilmiş olması bu molekülün hemotopoezde de rol aldığını gösterebilir²⁶.

IFN- γ , makrofajların klasik aktivatörü, antijen sunumunun düzenleyicisi, antimikrobiyal yanıtı oluşturması ile bilinmekle birlikte reaktif oksijen radikallerinin üretilmesi ve nitrit oksit sentatazın indüklenmesinden de sorumludur. Yardımcı T hücre 1 (TH1) ve Yardımcı T hücre 2 (TH2) yanıtı IL-12 ve IL-4 arasındaki denge ile belirlenir²⁷. Esas olarak B hücreleri ve makrofajlar gibi antijen sunan hücreler tarafından üretilen IL-12, Th1 yanıtını destekler ve Th1 hücrelerinden IFN- γ üretimini indükler. IFN- γ , Th0 hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını desteklemesinin yanı sıra, Th1 hücrelerinin yapımına yardımcı olan IL-12 üretimini artırır²⁷. Ana Th2 sitokinlerinden biri olan IL-4, Th2 yanıtını desteklemektedir²⁸. Hem IL-12 ile indüklenmiş Th1 hem de IL-4 ile indüklenmiş Th2 alt gruplarından üretilen IL-10, IFN- γ ve IL-2 diğer Th1 sitokinlerinin yanı sıra IL-12 üretimini de inhibe eder²⁹. IL-10'un baskılayıcı etkileri, T hücreleri, monositler/makrofajlar ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin

aracılık ettiği fonksiyonların inhibisyonu ile sonuçlanır²⁸. IL-10, inflamatuvar sitokinlerin üretilmesini baskılaması yanı sıra bir anti-inflamatuvar ve prokoagülan ajan olan IL-1ra'nın üretimini baskılamaktadır²⁵. Bu nedenle, IFN- γ 'ya ek olarak, IL-10, IL-4 ve IL-12, Th1 ve Th2 yanıtını belirleyen majör sitokinlerdir ve HLH'de önemli rol oynadığı düşünülmektedir³⁰.

2.1.9 İmmün Yetersizlik Sendromları ile ilişkili Hemofagositik Lenfositosis

Hemofagositik lenfositosis özellikle T hücre yetersizliği ile oluşan bazı immün yetersizlik sendromlarında da görülmektedir: 22q11 delesyonu (DiGeorge Sendromu), ağır kombine immün yetersizlik sendromu³¹. Bazen de sporadik durumlarda hastalığın komplikasyonu olarak hemofagositoz ortaya çıkmaktadır: kronik granülamatöz hastalık, X'e bağımlı agammaglobulinemi, X'e bağımlı NEMO.

2.1.10. Enfeksiyon ile ilişkili Hemofagositik Lenfositosis

Hastalığın genetiğini taşıdığı bilinen bazı hastalarda HLH oluşmasını tetikleyici etken olarak viral veya parazitik enfeksiyonlar gösterilmiştir. Leşmanya ile tetiklenen HLH tedavisinde sitotoksik veya antiinflamatuvar tedaviden ziyade sadece leşmenyanın tedavisi ile HLH gerilediği gösterilmiştir. Buna karşılık bazı enfeksiyöz etkenlerin indüklemiş olduğu HLH hastalarında genetik yatkınlık biraz şüpheli durmaktadır. En yaygın olarak HLH ilişkili virüslerden Herpes virüs ailesi sorumlu tutulmaktadır. Herpes virüslerden en sık neden olanı EBV iken; sitomegalovirüs, varisella zoster virüs, insan herpes virüsü 6, insan herpes virüsü 8 de neden olabilir. HIV enfeksiyonun bir komplikasyonu olarak da HLH karşımıza çıkabilmektedir. Nadir diğer mikrobiyal patojenler ise; mikobakterium tüberkülozis³², serretia marcesans³³, burkholderia cepacia³¹, mantar enfeksiyonu olarak da; kandida³⁴, aspergillus ve histoplazmozdur. Bu hastalığı neden olabilecek literatürdeki diğer virüsler ise: parvovirüs B19, adenovirüs, hepatit B, enterovirüs, coxsackie virüs, rubella, deng virüsü, hepatit C, influenza A, B, C, kızamık, hanta virüstür. Türk hastalarda hemofagositozun gösterildiği bunyaviridae ailesinin bir üyesi olan kırmızı Kongo kanamalı ateşi virüsü de hemofagositoza yol açarak HLH'i oluşturabilmektedir³⁵.

2.1.11. Malignite ile ilişkili Hemofagositik Lenfositosis

Maligniteye ilişkin gelişen ikincil HLH bu grubun %27 sini oluşturmaktadır¹². Çocuklarda maligniteler arasında ilk sırayı akut B hücreli lenfomalar alır³⁶. Malignitede salgılanan esas sitokinlerden olan IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α düzeylerinin aşırı artışı HLH den sorumlu tutulmaktadır. Malign hastalıkların tedavisi için yapılan kemik iliği transplatasyonu sonrası ilk 4 hafta içinde HLH gelişebildiği bildirilmiştir³⁷. Diğer maligniteler ise: anaplastik büyük hücreli lenfoma, diffüz büyük B hücreli lenfoma, hodgkin lenfoma hemotolojik olmayan malignitelerden ise nöroblastoma ve rabdomyosarkoma gösterilebilir³⁶.

2.1.12. Ayırıcı Tanı

Hemofagositik lenfositosisin ayırıcı tanısında IFN- γ , IL-10, IL-6 kullanılması bakteriyel sepsis ve viral enfeksiyonların ayırımında çok yardımcı olacağı görülmektedir. HLH'de kriter olarak IFN- γ >75 pg/ml, IL-10 60 pg/ml olarak değerlendirildiğinde HLH tanısının duyarlılık ve özgünlüğü sırası ile %98.9 ve %93 olarak belirlenmiştir³⁵. Hemogloblin-haptogloblin kompleksinin reseptörü olan CD163 molekülünün de plazma düzeyinin ölçümü HLH ayırıcı tanısı için enfeksiyöz durumlarda kullanılması fayda sağlayabilir³⁸. Ayrıca sitotoksik T hücrelerinin ve NK hücrelerinin aktivitelerinin azalmış olması veya aktivitelerinin hiç olmamasının da gösterilmesi kullanılabilir.

2.1.13. Tedavi

HLH'nin tedavisindeki asıl amaç, yaşamı tehdit edici semptomlardan sorumlu olan şiddetli hiperinflamasyonun baskılanmasıdır. Enfeksiyon ile tetiklenen HLH'de lipozomal amfoterin B ile tedavi olabilen laşmanya dışındaki HLH'de hiperinflamasyonu kontrol etmek için tanımlanmış organizmanın tedavi edilmesi yeterli değildir. Genetik temelli HLH'de ise temel amaç hatalı şekilde çalışan bağışıklık sistemini kemik iliği nakli yaparak değiştirmektir. Tedavi, öncelikle belirti ve semptomların ciddiyetine göre yönlendirilmeli, ancak aynı zamanda hastanın yaşı ve altta yatan koşullar da göz önünde bulundurulmalıdır³⁹. Hiperinflamasyonun neden olduğu hiperinflamasyon, lenfositler için sitotoksik olan ve sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu inhibe eden kortikosteroidler tarafından başarıyla önlenir⁴⁰. Kortikosteroidler ayrıca CD95 ligandının üretimine ve dendritik hücrelerin farklılaşmasına etkilidir⁴¹. Dekametazon kan beyin bariyerini prednizolondan daha iyi geçtiği için tedavi için tercih edilir. Siklosporin A, siklofilin yolağını etkileyerek T lenfositlerin aktivasyonunu inhibe eder⁴². Remisyonun sürdürülmesinde ve MAS olan çocukların tedavisinde etkinliği kanıtlanmıştır. İmmünoglobulinler sitokin ve patojene özgü antikorlara etki eder⁴³. Etoposid

1980'lerde HLH tedavisinde monositik ve histiyositik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktaydı⁴⁴. Fransa'da steroid ve siklosporin A ile birlikte antitimosit globulin başarıyla kullanıldı⁴⁵.

2.1.14. Tedavi Seçimi

Genetik temelli HLH'nin neden olduğu 1 yaşın altındaki çocuklar ve ilerleyici pansitopeni, pıhtılaşma sorunları, karaciğer fonksiyon bozukluğu ve serebral semptomlar gibi şiddetli belirti ve semptomları olan tüm hastalar, deksametazon, siklosporin A ve etoposid ile kombinasyon tedavisi için adaydır². Genellikle ileri yaştaki hastalarda, daha az ciddi vakalarda kortikosteroidler ve immüoglobulinler yeterli olabilir, ancak ilerlemenin belirtileri için çocukların dikkatli takip edilmesi gerekir³⁹. MAS hastaları için siklosporin A ile birlikte veya tek başına kortikosteroid kullanımı hiperinflamasyonu kontrol etmek için yeterlidir ancak herhangi bir tedavi stratejisini önerecek net bir fikir birliği veya kanıt yoktur⁴⁶. Chediak Higashi sendromu, Griscelli sendromu ve X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom ile birlikte görülen HLH'de etoposid ile tedavi sağlanmaktadır³⁹. Ailesel hemofagositik sendromda ise etkin tedavi sadece kemik iliği nakli ile sağlanabilir⁴⁷. Bazı tedaviye dirençli vakalarda anti CD-25 antikoruna daclizumab ve anti CD-52 antikoruna alemtuzumab kullanılabilir.

2.2. Juvenil Sistemik Lupus Eritematozus

Sistemik lupus eritematozus(SLE) çok sayıda otoantikör ile ilişkili birden fazla sistemi tutan otoimmün bir hastalıktır. Hastalık erişkin döneme göre çocukluk döneminde klinik tablolar açısından daha ağır seyretmektedir.

2.2.1. Tarihçe

“Lupus” kelimesi aslen on üçüncü yüzyılda bir keşiş olan Rogerius'a atfedilmiştir ve o dönemde hastalarda görülen ve kurtları hatırlatan yüz ülseri bu hastalığı işaret ediyordu. Fransız bir dermatolog olan Cazenave, döküntü tanımlarında lupusa eritematozusu eklemiştir. Viyana'daki Dr. von Hebra ile çalışan dermatoloji bölümünde öğretim üyesi olan Macar dermatolog Kaposi, lupus eritematozusta görülen akut ve kronik cilt lezyonlarını 1800'lerin sonlarında tanımlayan ilk dermatologdu. Ondokuzuncu yüzyılın sonunda, Johns Hopkins'deki Osler, genç kadınların böbrek yetmezliğini kızarıklığa bağladı ve lupusun sistemik doğasını, alevlenmelerini ve remisyonlarını tanımlayan ilk kişi oldu. Libman ve Sacks hastalığın kalp belirtilerini tanımlarken, Baehr, Klemperer ve Schifrin patolojik değerlendirmeler yoluyla iç organ tutulumlarını tanımladı.

2.2.2. Sınıflandırma Kriterleri

Amerikan Romatoloji Koleji (ACR) olarak bilinen Amerikan Romatizma Derneği, 1971'de bir sınıflandırma sistemi geliştirdi. Bu sistem 1982 ve 1997'de değiştirildi⁴⁸. Tanı için ACR 11 kriterinden 4 ünün karşılanması gerekir. Sistemik Lupus Uluslararası İşbirliği Klinikleri (SLICC) sınıflandırma sistemini gözden geçirdi ve 2012'de yeni bir sınıflandırma kriteri yayınladı⁴⁹. SLICC kriterleri 11 klinik, 6 immünolojik kriterden oluşmaktadır. Tanı için 17 kriterden 4'ü olmalı ve bunlardan en az biri klinik kriterlerden, en az bir diğeri de immünolojik kriterlerden olmalıdır veya biyopside lupus nefriti tanısı konulmuş olmalıdır. Geniş kapsamlı yapılmış olan bir çalışmada SLICC kriterleri % 98,7 duyarlılığa ve % 85,3 özgüllüğe sahipken ACR kriterleri % 76.6 duyarlılığa ve % 93.4 özgüllüğe sahipti dolayısı ile SLICC kriterleri daha hassas ve daha az özgüllüğe sahiptir⁵⁰. Bununla birlikte, ACR kriterleri juvenil SLE'de (jSLE) daha faydalı görünmektedir.

SLICC Sınıflandırma Kriterleri 2012

Klinik Kriterler

1. Akut Kutanöz Lupus

Lupus Malar Döküntü (Diskoid döküntü ise sayılmaz)

Büllöz lupus

SLE'nin toksik epidermal nekroliz varyantı

Makülopapüler lupus döküntüsü

Fotosensitiv lupus döküntüsü (dermatomyozit olmadığında)

Veya

Subakut kutanöz lupus (endüre olmamış psöriaform ve/veya postenflamtuvar dispigmentasyon veya telenjektaziye rağmen skarsız iyileşen anüler polisiklik lezyonlar)

2. Kronik Kutanöz Lupus

Klasik diskoid döküntü

Lokalize (boynun üstünde)

Genaralize (boynun üstünde ve altında)

Hipertrofik (verrüköz) lupus

Lupus pannükiliti

Mukozal lupus

Lupus eritematozus tumidus

Chillblains lupus

Diskoid lupus / liken planus

3. Oral Ülserler

Damak

Yanak

Dil

Veya

Nazal ülser (diğer nedenlerin olmadığı durumlarda; Vaskülit, Behçet hastalığı, herpes virüs enfeksiyonu, inflamatuvar barsak hastalığı, reaktif artrit, asidli yiyeceklere maruziyet)

4. Skar bırakmayan Alopesi (görülebilir kırılğan saç) (diğer nedenlerin dışlanmış olması gerekir; alopesi areata, ilaçlar, demir eksikliği)

5. İki veya daha fazla eklemde şişme veya efüzyonla karakterize sinovit veya iki veya daha fazla eklemde en az 30 dakika süren sabah tutukluğu

6. Serözit

Bir günden daha uzun süren tipik plörezi

veya

Plevral efüzyon

Bir günden daha uzun süren tipik perikardiyal ağrı

Veya

Perikardiyal efüzyon

Veya

Perikardit (diğer nedenlerin dışlanmış olması gerekir; infeksiyon, üremi, Dressler perikarditi)

7. Renal

İdrarda protein kreatinin oranı (veya 24 saatlik idrarda protein) 500 mg protein/ 24 saatlik idrarda

Veya

İdrar sedimentinde eritrosit kümeleri

8. Nörolojik

Nöbet

Psikoz

Mononöritis multiplex (diğer nedenlerin dışlanmış olması gerekmektedir; primer vaskülit)

Myelit

Periferik veya kranyal nöropati (diğer nedenlerin dışlanmış olması gerekir; primer vaskülit, enfeksiyon, diyabetes mellitus)

Akut konfüzyonel durum (diğer nedenlerin dışlanmış olması gerekir; toksik/metabolik, üremi, ilaçlar)

9. Hemolitik anemi

10. Lökopeni (<4000 mm³) (diğer nedenlerin dışlanmış olması gerekir; Felty sendromu, ilaçlar, portal hipertansiyon)

Veya

Lenfopeni ($<1500 \text{ mm}^3$) (diğ er nedenlerin dışlanmış olması gerekir; kortikosteroid kullanımı, ilaçlar, enfeksiyon)

11. Trombositopeni ($<100.000 \text{ mm}^3$) (diğ er nedenlerin dışlanmış olması gerekir; ilaçlar, portal hipertansyon, trombotik trombositopenik purpura)

İmmünolojik Kriter

1. ANA pozitifliği
2. Anti-dsDNA pozitifliği
3. Anti-Sm antikor pozitifliği
4. Anti fosfolipit antikor pozitifliği
5. Kompleman dıřuklúđü;
C3, C4 dıřuklúđü
veya
CH50 dıřuklúđü
6. Direkt coombs testi pozitifliği (diğ er nedenler dışlandığında; hemolitik anemi)

Amerikan Romatoloji Koleji Sınıflandırma Kriterleri 1997

1. Malar döküntü; Nazolabial sulkusların korunmuş olduğu düz veya kabarık eritem
2. Fotosensitivite; güneş ışığı ile ortaya çıkan döküntü
3. Diskoid döküntü
4. Oral ülserler; oral veya nazofarangeal genellikle ağrısız ülser
5. Artrit; hassas, şiş ve efüzyon ile karakterize iki veya daha fazla periferik eklem non eroziv tutulması
6. Serözit; plörit veya perikardit
7. Renal tutulum; $>500 \text{ mg/ gün}$ proteinüri, idrar sedimentinde eritrosit görülmesi
8. Nörolojik Tutulum; Nöbet veya psikoz (diğ er nedenlerin dışlanmış olması gerekir; ilaçlar, üremi, ketoasidoz, elektrolit imbalansı)
9. Hematolojik tutulum
Hemolitik anemi; retikülositoz ile birlikte
Veya
Lökopeni $<4000 \text{ mm}^3$
Veya
Lenfopeni $<1500 \text{ mm}^3$

Veya

Trombositopeni $<100.000 \text{ mm}^3$

10. ANA pozitifliği

11. İmmünolojik tutulum

Anti DNA antikor pozitifliği

Anti-Sm antikor pozitifliği

Anti Fosfolipid antikor pozitifliği

Antikardiyolipin IgG, IgM antikorları pozitifliği

Lupus antikoagülanı pozitifliği

En az 6 ay boyunca sifiliz testi yalancı pozitifliği ve sifiliz olmadığının doğrulanması

2.2.3. Epidemiyoloji

Hastalığın ırklar arasında dağılımına bakılacak olursa en yüksek insidans ve prevalansa sahip olan ırk Afrika karayipleridir⁵¹. Birleşik devletlerdeki yapılmış olan insidans ve prevalans çalışmalarında ise afro Amerikanlardaki görülme sıklığı Avrupa-Amerikalılara göre yaklaşık 2 veya 3 kat yüksek bulunmuştur. 21 asya ülkesinin dahil olduğu bir çalışmada prevalans 30-50 / 100.000 bulunmuştur⁵¹. Pediatrik popülasyondaki beyaz kızlarda 6- 8,9 / 100.000 insidansa sahip olduğu düşünülmektedir⁵². Avrupa bölgesindeki çalışmalarda ise İzlanda'da 3,3/ 100.000 İsviçre'de 4,8/100.000 insidans ile karşılaşmaktayız. Birmingham'da yapılan prevalans çalışmasında ise 28/100.000 bulunmuştur. "Euro- Lupus" serisindeki 1000 hastanın 76 (%8) sinda hastalık 14 yaşından önce gelişmiştir⁵³. Hochburg'un Baltimore, Maryland'de 19 hastane ile yapmış olduğu çalışmada yıllık insidansı 0-14 yaş arası çocuklarda yılda 0.53/ 100.000 bulmuştur⁵⁴. Huang ve arkadaşlarının Çin'de yapmış olduğu bir çalışmada prevalansın 1 yaşındaki çocuklarda 0,65/ 100.000, 7 yaşındaki çocuklarda 6,7/ 100.000, 15 yaşındaki çocuklarda ise 34,6/100.000 olması prevalansın aynı zamanda yaşla birlikte arttığını göstermektedir⁵⁵. Cinsiyet arasındaki dağılım erişkinlerde gözlenen 9-10:1(kadın-erkek) oranının aksine 4.5-5:1 (kadın-erkek) oranındadır. Bu düşük oran, çocuklar ve yetişkinler arasında hormon durumundaki farklılıklara bağlanmaktadır⁵⁶.

2.2.4. Genetik

Tek yumurta ikizlerinde SLE görülmesi, ilk derece akrabalar arasında SLE sıklığının artması ve SLE hastalarının kardeşlerinde hastalığın gelişme riskinin yüksek olması hastalığın poligenik kalıtımda olduğunu göstermektedir. Tek yumurta ikizlerinde hastalığın uyumu yaklaşık % 25-50'dir ve dizotik ikizlerde bu oran % 5'tir⁵⁷. Birçok farklı gen hastalığın oluşumuna katkıda bulunur. Lupus için en çok çalışılan gen grubu MHC ile ilişkilidir⁵⁷. Popülasyonlar üzerinde yapılan çalışmalarda, SLE'ye duyarlılığın, insan lökosit antijeni (HLA) sınıf II gen polimorfizmlerini içerdiğini ortaya koymaktadır⁵⁷. Farklı etnik gruplardaki lupus hastalarında yapılmış çalışmalarda HLA DR2 ve DR3 ile hastalığın gelişimi arasında 2-5 kat artmış risk bulunmuştur⁵⁷. HLA sınıf II genleri ayrıca anti-Sm (küçük nükleer ribonükleer protein), anti-Ro, anti-La, anti-nRNP (nükleer ribonükleer protein) ve anti-DNA antikorları gibi bazı otoantikörlerin varlığı ile de ilişkilendirilmiştir⁵⁸. Birçok polimorfik MHC dışı genin de SLE ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında, mannoz bağlayıcı protein (MBP), tümör nekroz faktörü α, T hücre reseptörü, interlökin 6 (IL-6), CR1, immünoglobulin Gm ve Km allotipleri, FcγRIIA ve FcγRIIA (aynı zamanda IgG Fc reseptörleri), ısı şok protein 70 genleri bulunur⁵⁹.

2.2.5. Etiyoloji ve Patogenez

İnflamatuvar cevabı stimüle eden IFN-α'nın anormal düzenlenmesi ile karakterizedir⁶⁰. Apoptoz veya hücre ölümü, hücre içi kalıntıların hızla temizlenmesini gerektirir. Bununla birlikte, lupusta kusurlu veya anormal şekilde olan apoptotik klirens, otoantijen, RNA ve DNA dahil olmak üzere hücre içi materyallerin sunumuna izin verir⁶¹. Kompleman, kompleman reseptörleri, immünoglobulin reseptörleri, Bcl2, Fas / Fas ligand ve programlanmış hücre ölümü 1 (PCD1) 'deki kusurların tümü, apoptotik malzemelerin temizlenmesinde farklı oranlarda katkıda bulunabilir⁶². Fagositik bağışıklık hücreleri, TLR7 ve 9'un Toll benzeri reseptör (TLR) aktivasyonu ile spesifik RNA ve DNA motiflerine yanıt verir. TLR sinyalleri, tip I INF'ler de dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin sürekli aşırı üretilmesine neden olur⁶³. Lupus hastalarında, nötrofiller, otoantikörler, özellikle anti-ribonükleoprotein (RNP) antikörleri varlığında apoptotik hale gelir ve nötrofil ekstraselüler ağı (NET) oluşur. NET'ler DNA, LL37 (bölünmüş antimikrobiyal 37-kalıntı, hCAP18'in COOH-terminal peptidi [18 kD moleküler boyutuna sahip insan katyonik antimikrobiyal proteini]) ve HMGB1 (yüksek hareketlilik grubu protein B1) bakımından zengindir. Bu proteinler, plazmasitoid dendritik hücrelerin (pDC) memeli DNA'sı tarafından aktivasyonu ile ilişkilidir. pDC'lerin yüksek seviyelerde interferon ürettiği ve aktif lupus ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁶⁴. NETs ayrıca IL1-

b ve IL-18 üretimini arttırarak inflamasyonu aktive eder. Otoantikorlar IgG ve pıhtılaşma faktörleri gibi çözümlenebilir moleküllere ek olarak, çekirdek, sitoplazma ve hücre yüzeyinde bulunan çeşitli moleküllere yöneliktir⁵⁷. Antinükleer antikorlar en karakteristiktir ve hastaların% 95'inden fazlasında bulunur. Anti-çift sarmallı DNA (ds-DNA) ve anti-Sm antikorları SLE hastalarına özgüdür. Antikorların varlığına göre SLE hastalarının sınıflandırma kriterleri bile bulunmaktadır⁶⁵. Anti-DNA antikorlarının en dikkat çekici özelliği, glomerülonefrit ile olan ilişkisidir. Anti-DNA antikorları, aktif lupus nefriti olan hastaların glomerüler preparatlarından izole edilebilir. Anti-DNA antikorları, normal veya ağır immün yetmezlikli hasta farelerde nefriti indükleyebilir⁶⁶. Bununla birlikte, anti-DNA antikorları ve lupus nefriti arasındaki korelasyon tam değildir, çünkü aktif nefritli bazı hastalar anti-DNA antikorları taşımazlar, bazı yüksek miktarda anti-DNA titresi olan hastalarda da böbrek tutulumu gösterilemeyebilir. Anti-ribozomal P antikorları ile psikoze ve anti-Ro antikorları ile konjenital kalp bloğu ve subakut kutanöz lupus arasındaki ilişki gösterilmiştir, ancak bu antikorların patojenitesi yeterince araştırılmamıştır. SLE, poliklonal B hücresi aktivasyonu, artan antikor üreten hücreler, hipergamaglobülinemi, otoantikor ve immün kompleks oluşturan B hücreler, T hücreler ve monositik hücreleri içeren sayısız immün sistem anormallikleri ile karakterizedir. Aşırı ve kontrolsüz T hücresinin, otoantikor oluşturan B hücrelerinin farklılaşmasında ve aktivasyonunda yardımcı olduğu anlaşılmaktadır. B hücresi aktivasyonu, SLE hastalarında anormaldir. Aktif SLE'li hastaların periferik kanında aktivasyonun tüm aşamalarındaki B hücrelerinin sayısı artar⁶⁷. SLE hastalarındaki B hücrelerinin, IL-6 gibi sitokinlerin uyarıcı etkilerine normal bireylerdeki B hücrelerine göre daha duyarlı oldukları gösterilmiştir⁶⁸. SLE hastalarındaki B hücrelerinin antijenler, sitokinler ve diğer uyaranlarla poliklonal aktivasyona daha yatkın olduğu anlaşılmıştır. Periferik kandaki T hücrelerinin toplam sayısı, antilenfosit antikorlarının etkilerinden dolayı genellikle azdır⁶⁹. Deneyler, T hücresi aktivasyonunun erken etkilerinin, SLE'li hastalarda kontrollere kıyasla hatalı olduğunu göstermiştir⁷⁰. T hücreleri aktif olmasına rağmen, hem mitojenik stimülasyona yanıt olarak çoğalma kapasiteleri hem de IL-2 üretimi azalır⁷¹. IL-10, B hücresi çoğalması ve farklılaşmasının kuvvetli bir uyarıcısı ve dolayısıyla SLE'de potansiyel bir poliklonal B hücresi aktivasyonu aracısı olan bir Th2 sitokindir. Aslında, son çalışmalar, SLE hastalarında periferik kandaki B hücreleri ve monositlerinden spontan IL-10 üretiminin, kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir⁷². Serum IL-10 konsantrasyonları SLE'li hastalarda kontrollere göre daha yüksektir ve klinik ve serolojik hastalık aktivitesi ve anti-DNA antikor titreleri ile koreledir⁷³. B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından üretilen bir heterodimerik sitokin olan IL-12, hücre aracılı immün yanıtları arttırır, ancak humoral cevap üzerine azaltıcı etki gösterir⁷⁴.

Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında SLE hastalarında IL-12 üretiminin azaldığı bulunmuştur⁷⁵. SLE hastalarında immün düzenlemenin ve immün cevabın bozulması sonucu:

1 Aşırı aktif çalışan B hücreleri;

- Periferik kanda immünglobulin üreten aktif B hücre sayısı artar
- B hücreleri spesifik antijenlerin poliklonal aktivasyonunu artırır
- Artmış olan IL-6 ve IL-10 konsantrasyonları, B hücrelerinin çalışmasını artırabilir
- B hücrelerinin aktive edici sinyallere karşı tepkisi anormaldir

2 Aşırı aktif çalışan T hücreleri

- Periferik kandaki aktif T hücre sayısı artmıştır
- Lupus T hücreleri uyarıldığında az miktarda IL-2 üretir

3 Anormal fagositik fonksiyonlar

- Fagositik hücreler, bağışıklık komplekslerini verimli bir şekilde bağlayamaz veya işleyemez
- Apoptotik hücrelerin fagositozu bozulmuştur

4 Anormal immün düzenleme

- Hücre yüzeylerinde erken kompleman proteinlerinin (C2, C4, C1q), Fcγ, CR1 ve C1q reseptörlerinin kalitatif veya kantitatif kusurları nedeniyle immün komplekslerin ve apoptotik ürünlerin temizlenmesinde bozukluk
- Baskılayıcı T hücreleri ve NK hücrelerinin aktive edilmiş T ve B hücre ağındaki baskılayıcı aktiviteleri yetersizdir
- Antikor üretiminin idiotipik kontrolü düzensizdir

Patojenik lenfositlerin uzun süre hayatta kalmasına yol açan bozuk apoptozisin SLE için bir hastalık mekanizması olduğu düşünülmektedir. Fas ve Fas ligandının (FasL) etkileşimi, hücreler için aktif bir sinyal iletir⁷⁶. Deney farelerinde kusurlu Fas aracılı apoptozis, masif lenfoproliferasyona ve immün glomerülonefritli ciddi lupus benzeri hastalığın gelişmesine neden olur⁷⁷. Fakat insanlarda bu hipotez çelişmektedir çünkü SLE hastalarında lenfopeni sık görülen bulgular arasındadır. Bazı araştırmalarda, SLE'li hastalarda apoptotik hücrelerin makrofajlarla temizlenmesinin bozulmuş olduğunu göstermiştir⁷⁸.

2.2.6. Klinik

Çoğu hastada başlangıç semptomları belirsizdir. Bunlar ateş, kilo kaybı ve iştahsızlıktır. Tek bir organı tutarak başlayabileceği gibi sıklıkla birden fazla organ tutulumu ile başlayabilir. Çocuk yaş grubunda ise hematolojik, cilt ve lokomotor sistem en çok tutulan sistemlerdir⁷⁹.

2.2.6.1. Hematolojik Sistem Tutulumu

Hematolojik bulgular, SLE'li çocukların yaklaşık dörtte biri ile üçte birinde görülür. SLE'li çocuklarda kronik hastalık anemisi yaygındır. Bu anemi genellikle normokromik ve normositiktir, düşük retikülosit sayısı, yüksek ferritin değeri ve düşük demir düzeyine sahiptir. Enflamatuvar sitokinlere cevap olarak karaciğer, makrofajlardan demirin salınmasını ve bağırsaktan demirin emilmesini engelleyen ve böylece eritropoezi önleyen hepsidin salgılar. Coombs pozitif, otoimmün hemolitik anemi (OHA), jSLE hastalarının yaklaşık% 10'unda görülür, ancak% 30 ila % 40'ında hemoliz olmadan direkt Coombs testi pozitifliği saptanabilir⁸⁰. OHA, ağırlıklı olarak sıcak aglütininlerden, 37 ° C'de eritrosit yüzey antijenleriyle reaksiyona giren IgG antikorlarından kaynaklanır, bu da eritrositlerin dalakta yıkımına ve anemiye yol açar⁸¹. Aneminin diğer nedenleri arasında ise böbrek hastalığı, böbrek fonksiyonunun bozulması ve eritropoietin üretiminin azalması, demir eksikliği ve gastrointestinal kayıplar yer almaktadır.

Lökopeni SLE'li çocukların % 46 ila % 64'ünde görülür⁸². Lenfopeni ve nötropeni beraber bulunabilirse de lenfopeni daha yaygındır ve genellikle spesifik tedavi gerektirmez. Lenfopeni derin olduğunda (mutlak lenfosit sayısı <500) herpes virüs ailesinden bir virüs veya makrofaj aktivasyon sendromu (MAS) altta yatan neden olarak araştırılmalıdır⁸⁰.

Trombositopeni jSLE hastalarının % 7 ile % 30'unda vardır ve pediatrik olguların% 15'inde ilk bulgu olarak karşımıza çıkabilir⁸³. İki tip otoantikor, lupus ile ilişkili immün trombositopeninin patogeneğinde büyük rol oynar: anti-GPIIb / IIIa ve antitrombopoietin reseptörü (TPOR) antikorları⁸¹. Evans sendromu, OHA ve immün trombositopeninin eşzamanlı oluşumu ile tanımlanır ve SLE ile ilişkili olabilir⁸¹. Trombotik mikroanjiyopatiler (TMA), mikroanjiyopatik hemolitik anemi (parçalanmış eritrositler, periferik kanda şistositler) ve trombositopeni ile karakterize bir hastalıktır. Histolojik olarak, TMA'ler damar duvarının intimal kalınlaşması ve fibrinoid nekrozu ile birlikte arteriyolar trombüsler ile bulgu verir.

MAS, SLE ile ilişkilendirilebilecek nadir ve potansiyel olarak yaşamı tehdit edici bir durumdur. MAS'ın bulguları Lupus'un bulgularına çok benzer olması dikkat çekicidir.

SLE'de pıhtılaşma anormallikleri yaygındır. Lupus antikoagülanı (LAC), jSLE'li hastaların yaklaşık %20'sinde pozitifdir. LAC pozitif hastalar kanamazlar daha ziyade tromboembolik olaylar, özellikle arteriyel tıkanıklıklardan daha çok venöz tıkanıklıklar gelişir. Bu tromboembolik olayların en çok geliştiği bölgeler bacaklar, serebral venler ve pulmoner damarlardır. Bu antikora sahip hastalardaki tromboz riski antikor olmayan hastalara göre 25-30 kat artış göstermektedir⁸⁴.

2.2.6.2. Lokomotor Sistem Tutulumu

jSLE hastalarının çoğunda, artrit, artralji veya tenosinovit olmak üzere lokomotor sistem tutulumu vardır. Miyalji hastaların %20 ile %30'unda görülmesine rağmen, gerçek miyozit çok daha azında görülür. jSLE'da görülen artrit genellikle hem büyük hem de küçük eklemleri tutan ağrılı, simetrik bir poliartritir. Artritin radyografik değişikliklere neden olması nadirdir. Tedaviye bağlı lokomotor sistem komplikasyonları arasında avasküler nekroz (AVN), osteoporoz veya büyüme geriliği bulunur.⁸⁰

2.2.6.3. Vaskülit

Lupus vaskülit küçük boy arter ve venlerde etkilidir⁸⁵. Ciltteki lupus vaskülitinin formu lökositoklastik vaskülitir. Küçük boy damarların tutulması ile de üritikeryal vaskülit de gözlenebilir⁸⁶. Lupus vaskülit hastalığın aktivitesi ile ilişkilidir⁸⁶. Yapılmış olan bir çalışmada pentraksin-3 düzeyinin yüksekliği aktif vaskülit ile uyumlu bulunmuştur⁸⁷.

2.2.6.4. Mukokutanöz Sistem Tutulumu

jSLE hastaların tanı anında % 50 ile % 80'inde ve hastalık seyri sırasında hastaların % 85'inde cilt tutulumu bildirilmiştir. Malar döküntü, fotosensitivite, nodül veya ülserasyon ile vaskülitik cilt lezyonları, palmar / plantar eritem, Raynaud fenomeni, annüler eritem ve daha az sıklıkla diskoid lupus veya lupus pannükiliti görülebilir. Alopesi sık görülür, ancak skarlaşan alopesi nadirdir ve genellikle sadece diskoid lezyonlarda görülür⁸⁰.

2.2.6.5. Nöropsikiyatrik Tutulum

Santral sinir sistemi ve periferik sinir sisteminin tutulumu nöropsikiyatrik sistemik lupus eritematozus (NP-SLE) olarak adlandırılır. NP-SLE, jSLE hastalarının % 20 ile % 70'inde görülür⁸⁸. 1999 yılında Amerikan Romatoloji Koleji nöropsikiyatrik tutulumu 19 ayrı antite olarak ayırdı. Bunlar santral sinir sistemi ile ilişkili olanlar; aseptik menenjit, serebrovasküler hastalık, demiyelinizan sendrom, baş ağrısı (migren ve benign intrakranyal hipertansiyon dahil), hareket bozuklukları (kore), myelopati, nöbet, akut konfüzyonel durum, anksiyete bozuklukları, kognitif disfonksiyon, duygu durum bozuklukları/depresyon, psikozdur. Periferik sinir sistemi ile ilişkili olanlar; akut inflamatuvar demiyelinizan poliradikülönöropati (Guillain-Barre sendromu), otonomik bozukluklar, mononöropati, myesthenia gravis, nöropati, pleksopati, polinöropatidir. Baş ağrısı en yaygın nöropsikiyatrik bulgudur. Gerçek bir lupus baş ağrısı standart analjezik tedaviye dirençlidir⁸⁹. Baş ağrısının diğer nörolojik semptomların yokluğundaki önemi tartışmalı olsa da, şiddetli ve aralıksız bir baş ağrısı, aktif CNS vaskülit serebral ven trombozunu (CVT) veya CNS enfeksiyonu veya psödötümör serebri'nin neden olduğu artmış kafa içi basıncını yansıtabilir. Serebro vasküler hastalık mikrosirkülasyondaki bozukluklarla oluştuğu için anjiyografik çalışmalar inme varlığı dışında genellikle normaldir⁹⁰. En sık görülen klinik bulgu ve santral sinir sistemi vaskülit belirtileri baş ağrısı ve nöbetlerdir⁸⁰. Enflamatuvar belirteçler sıklıkla yüksektir. Serebrovasküler hastalık, antifosfolipid antikorlarının varlığı ile güçlü ilişkilidir⁹¹. Sıklıkla fokal nöbet yerine generalize nöbetler görülür. Hareket bozuklukları olarak ise kore, serebellar ataksi, hemiballismus, tremor ve parkinson benzeri hareketler vakaların % 5 ile % 10'unu arasında görülür⁹¹. Kore, en yaygın hareket bozukluğudur ve jSLE'de erişkin başlangıçlı SLE'den daha yaygındır⁸⁰. Koresi olan hastalarda antifosfolipid antikorları saptanır veya antifosfolipid antikor sendromunun diğer belirtileri ile birlikte ortaya çıkabilen hastalarda bulunur. Gelişmiş ülkelerde romatizmal ateşin insidansının azalmasıyla, kore ile başvuran tüm hastalarda jSLE veya antifosfolipid antikor sendromu tanısı düşünülmalıdır⁹².

2.2.6.6. Renal Tutulum

Hastalık hafif derece bir glomerülo nefrit yaratabilmekle birlikte ağır böbrek yetmezliği tablolarına da yol açabilir. Hematüri, proteinüri veya hipertansiyona yol açabilmektedir. Klinik bulgular göz önüne alınmadan yapılan böbrek biyopsilerinde çoğu çocukta değişken derecede böbrek tutulumu olduğu gösterilmektedir⁹³. Otoreaktif B lenfositlerin poliklonal antikor üretmesi ile tanı belirteci de olan “full-house-patern” karakterde IgG, IgA, IgM yapısındaki antikorların mezengiyumda birikmesi histopatolojik özelliğidir⁹⁴. İmmün kompleksler, mezengiyum, subendotel ve subepitelyal alanlarda otoantikorların kalitesine, lupus nefritinin süresine ve ciddiyetine bağlı olarak peritubüler kılcal damarlarda birikir⁹⁵. Uluslararası Nefroloji Derneği / Renal Patoloji Derneği 2003 Lupus Nefritini sınıflandırmıştır:

Sınıf I , minimal mezengiyal lupus nefriti

Sınıf II, mezengiyal proliferatif lupus nefriti

Sınıf III, fokal lupus nefriti

Sınıf IV, diffüz lupus nefriti

Sınıf V, membranöz lupus nefriti

Sınıf VI, ileri derece sklerotik lupus nefriti

2.2.6.7. Kardiyovasküler Sistem Tutulumu

Kalbin üç katmanının her biri (perikard, miyokard ve endokard) lupus tarafından tutulabilir. Perikard ise en sık tutulan katmandır. Bazı antikorların varlığı ile kardiyovasküler sistem tutulumu ilişkilendirilmiştir bunlar; antiRo/SSA, anti-La/SSB, anti-SM, anti-RNP ve antifosfolipit antikorlarıdır⁹⁶. Perikardit Amerikan Romatoloji kolejinin tanı kriterleri arasında da yer almaktadır. Perikard akut ve kronik enflamatuvar değişikliklerden etkilenebilir. Direkt immüno floresans inceleme ile gösterilen immüno globulin ve C3'ün granüler birikimi, immün komplekslerin perikardit gelişimindeki rolünü desteklemektedir⁹⁷. jSLE'da en sık görülen kapak bulguları sol taraf kapak kalınlaşması ve yetersizliğidir. En tipik olanı Libman-Sacks endokarditidir. Tipik olarak mitral kapakta yer alan steril, küçük, verrüköz kapak lezyonlarından oluşur ancak başka kapaklarda, korda tendinealarda ve endokardiyumda da bulunabilir. Yapılmış olan bir çalışmada sol ventrikül hipertrofisi %22 oranında bulunmuştur⁹⁸.

2.2.6.8. Pulmoner Tutulum

Klinik olarak plörit, pnömonit, pnömoni, pulmoner hemoraji, pulmoner hipertansiyon ve pnömotoraks görülebilir.

2.2.6.9. Gastrointestinal Tutulum

Gastrointestinal tutulum jSLE'de %20 oranında gözlenmektedir⁹⁹. Karın ağrısı periton inflamasyonu (serozit), vaskülit, pankreatit, malabsorpsiyon, psödo-obstrüksiyon, paralitik ileus veya direkt bağırsak duvarı tutulumu (enterit) sonucu ortaya çıkabilir. Lupus enteropatisi, akut iskemik enterit veya protein kaybeden enteropati olarak ortaya çıkabilir⁸⁰. Lupoid hepatitte belirgin olarak artmış karaciğer fonksiyon testleri görülebilir.

2.2.6.10. Endokrin Sistem

jSLE'de en sık görülen endokrinolojik problem hipotiroidizmdir. Bu da anti-tiroid otoantikoruna ile ilişkilidir. Lupusun tedavisine sekonder bazı endokrinolojik problemler de ortaya çıkabilir. Bunlar uzun dönem kortikosteroid kullanımına bağlı tip 2 diyabetes mellitus gelişimi ve büyüme çağındaki adölesanlarda boy kısalığı, gecikmiş puberte görülebilmektedir¹⁰⁰.

2.2.7. Tedavi

Non steroid antiinflamatuvar ve antimalarial tedaviler, lupus hastalarında kas-iskelet sistemi şikayetlerini tedavi etmek için kullanılır. Artralji ve miyalji hastaları genellikle tedaviye cevap verir; bununla birlikte, poliartrit veya miyozit hastalarının tedavisinde immünoşüpresyon uygulanması gerekmektedir. Hidroksiklorokin kas-iskelet sistemi semptomlarını, döküntü ve alopesiyi iyileştirdiği bildirilmiştir¹⁰¹. Yan etkisi retinal toksisitedir. Tanı esnasında ağır başlangıçlı seyir için glukokortikoid tercih edilmektedir. Santral sinir sistemi tutulumlarında deksametazon tercih edilebilir. Siklofosamid öncelikle şiddetli jSLE, özellikle böbrek, santral sinir sistemi tutulumu ve diğer ciddi organ tutulumu için kullanılır. Amenore ve infertilite siklofosfamidin yan etkisidir. Azatioprin ve mikofenolat mofetil lupus için kullanılabilir alternatif ajanlardır. Azatioprinin yan etkisi daha çok olmakla birlikte her iki ilaç da kemik iliğini baskılayarak sitopenilere yol açabilir. Cilt ve mukokütanöz tutulumlar için ise metotreksat tercih edilebilir¹⁰².

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu araştırmada Juvenil sistemik lupus eritematozuslu çocuklarda hastalık takibinde ya da teşhisinde sitopeni olan ve olmayanlar arasında hemafagositik lenfositler mutasyonları varlığının incelenmesi amaçlanmış olup, bu amaç doğrultusunda hastalıkla ilişkili olan *Syntaxin (STX11)* ve *Perforin 1 (PRF1)* gen taramaları yapılmıştır. Çalışmaya klinik tanısı konmuş 57 birey dahil edilmiş ve tüm bireylere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır. Hasta örnekleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndan gönderilmiştir. Çalışmaya kontrol grubu olarak 48 sağlıklı birey dahil edilmiş ve tüm bireylere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır.

Çalışmanın mutasyon analizi kısmında polimorfik değişimler (tekli nükleotid değişimleri vb) ve mutasyonlar sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Analizler İstanbul Okan Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Projenin Etik Kurul Onayı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Yöntemler

DNA İzolasyonu

Araştırmaya katılan bireylerden alınan 9ml kan, 1ml 0,5M Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Scharlau, İspanya) bulunan tüplere aktarılmıştır. Bu kan örneği 50mL'lik falkon tüpe konur ve içerisinde 25ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya) eklenir, 20 dk buzda bekletilir. +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür. Tüpün dibindeki çökelek üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave edilir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000µL RBC lizis

solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800µl'si ependorf tüpüne alınarak -20°C sıcaklıkta stok olarak saklanır. Geriye kalan 200µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20µg/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu 10mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1mM pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Memmert, Almanya) bekletilir. İkinci gün işlemi olarak proteinlerin DNA'dan uzaklaştırılması amacıyla tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzooamilalkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir. Üçüncü gün tüpler +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500µL %70'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir ve +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C veya -20°C'de saklanabilmektedir.

Elde edilen DNA'ların kalitesinin ölçümü ve çalışmaya dahil edilip edilmeyeceğinin tayini için iki yöntem kullanılmıştır:

a. Spektrofotometrik ölçüm: İzole edilen DNA örnekleri spektrofotometrede A260 ve A280 dalga boylarında okunarak hem ug/ml cinsinden konsantrasyonları tespit edilecek hem de A260/A280 oranı ile protein kontaminasyonu olup olmadığı değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonrası A260/A280 oranı 1.7-1.9 olan örneklerle işlemlere devam edilmiştir.

b. Agaroz jel elektroforezi: İzole edilen DNA örneklerinin bütünlüklerinin kontrolü amacıyla %1'lik agaroz jel hazırlanmış ve bu jeldeki yürüme profilleri değerlendirilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Syntaxin (STX11) ve Perforin1 (PRF1) genlerinin taranması için yapılan polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) son konsatrasyonu 10pmol/µl olacak şekilde seyreltilen primer çiftleri kullanılmıştır. Primerler Syntaxin geni için PMID: 16582076 (Pubmed) referansı ile

hazırlanmıştır. Perforin1 geni için primerler Santa Cruz Genom Browser Database Primer tasarım program kullanılarak tasarlanmıştır (<https://genome.ucsc.edu/>)

PCR bileşenleri; 10X Taq tampon çözeltisi (Bioron, Almanya), 25mM MgCl₂ (Fermentas, ABD), son konsantrasyon 2mM olacak şekilde dNTP [(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)(Bioron, Almanya)], son konsantrasyonu 10pmol/μl Forward ve Reverse primerler (Alpha, Kanada), Taq DNA polimeraz (Fermentas, ABD) belirli oranlarda kullanılarak PCR şartları sağlanmış son hacim 50μl'e ddH₂O ile tamamlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 34 siklusta; 94°C'de 1 dakika, Syntaxin geni için 55°C'de 1 dakika, Perforin 1 geni için 59°C'de 1 dakika 72°C'de 1 dakika, 72°C'de 7 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Thermal Cycle, Biometra, Almanya).

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Bio Basic Inc, ABD); kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Bu çalışmada STX11 genine ait 2 ekzon ve PRF1 genine ait 3 ekzon için PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde değerlendirildi. %2'lik agaroz jel için 3g TBE 1X (Tris-HCl, Borik asit, EDTA) solüsyonu ile 150ml' ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. TBE 5X solüsyonunun hazırlanışı; 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20ml 0.5M pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya) ve deiyonize su (ddH₂O) ile 1000mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromid'in (Sigma, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 8μl ilave edildikten sonra iyice karıştırılır ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür. Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlanır. Agarozun donması için yaklaşık 45 dk beklenir. Agaroz donduktan sonra jel tabağıyla birlikte jel elektroferez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilir. Elektroferez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 10μl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 5μl Brom-Fenol Mavisini (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılır ve jellere yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA-HaeIII BioLabs, ABD; ΦX174 DNA-HinfI BioLabs, ABD) PCR ürünleriyle birlikte jelle 3μl kadar yüklenir. 90-100 V akımda 30-40 dk kadar

yürütülür (Biometra, ABD). Ultraviyole ışıktta (Spectroline, ABD) incelenir. Image Analyser'da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflandır.

PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Maksimum 50µL PCR ürünü alınarak pürifikasyon işlemi yapılmıştır. İşlem pürifikasyon kitinin 96 kuyulu özel plakasında yapılır. Alınan PCR ürününün 1.8 katı AgenCourt temizleme solüsyonu eklenir ve karışması sağlanır. Plaka 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra mıknatıs özelliğindeki plaka üzerine yerleştirilir. 10 dk bekletilir. Solüsyon içindeki mıknatıs özellikli manyetik topların PCR ürünü ile birlikte plakaya yapıştığı ve kahverengi halka oluştuğu gözlenir. Oluşan kahverengi alan dışında kalan kısım mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. 200µL %70'lik etanol eklenir, 30s sonra alkol alınır. Bu işlem 2 kere tekrar edilir. Oda sıcaklığında manyetik plaka üzerinde alkolün buharlaşması sağlanır. Kuruma sağlandıktan sonra 40µL bidistile su ile sulandırılır. %2'lik jelde sonuçlar incelenir. Bant yoğunluğuna göre DNA dizi analizinde kullanılacak PCR ürünü belirlenir.

DNA Dizi Analizi

Her bir bölge için birbirinden farkları tespit edilen bant profilleri, nükleotit dizilerinin belirlenmesi için kapiller sistem otomatik sekans cihazı (CEQ800XL, Beckman Coulter, ABD) kullanıldı. DNA dizi analizi için hazırlanan primerlerle yapılan PCR işlemi sonrası pürifikasyon işlemine tabi tutulan örnekler DNA dizi analizine alındı. Bunun için 0,2ml'lik, 96 tane kuyucuk içeren plakalar kullanılıp her bir kuyucuğa 12µl premiks (2µl 10X reaksiyon tamponu, 1µl dNTP karışımı, 2µl ddUTP, 2µl ddGTP, 2µl ddCTP, 2µl ddATP, 1µl polimeraz enzimi), 5µl temizlenmiş PCR ürünü, 20pmol primer konularak "cycle sequencing" işlemi gerçekleştirildi. Bunun için plaka, PCR cihazına (Biometra, Almanya) yerleştirilip 94°C' de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C'de 20s denatürasyon, 50°C'de 20s yapışma ve 60°C' de 4 dk'lık uzama evresi gerçekleştirildi. "Cycle sequencing" sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğun dibine 5µl durdurma solüsyonu (1,5 M C2H3O2Na, 50mM EDTA, 20 mg/ml' lik Glikojen) pipetlendi. Örneklerin üzerine 60µl %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000rpm'de 4 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirildi. Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200µl eklenip, +4°C'de 4000rpm'de

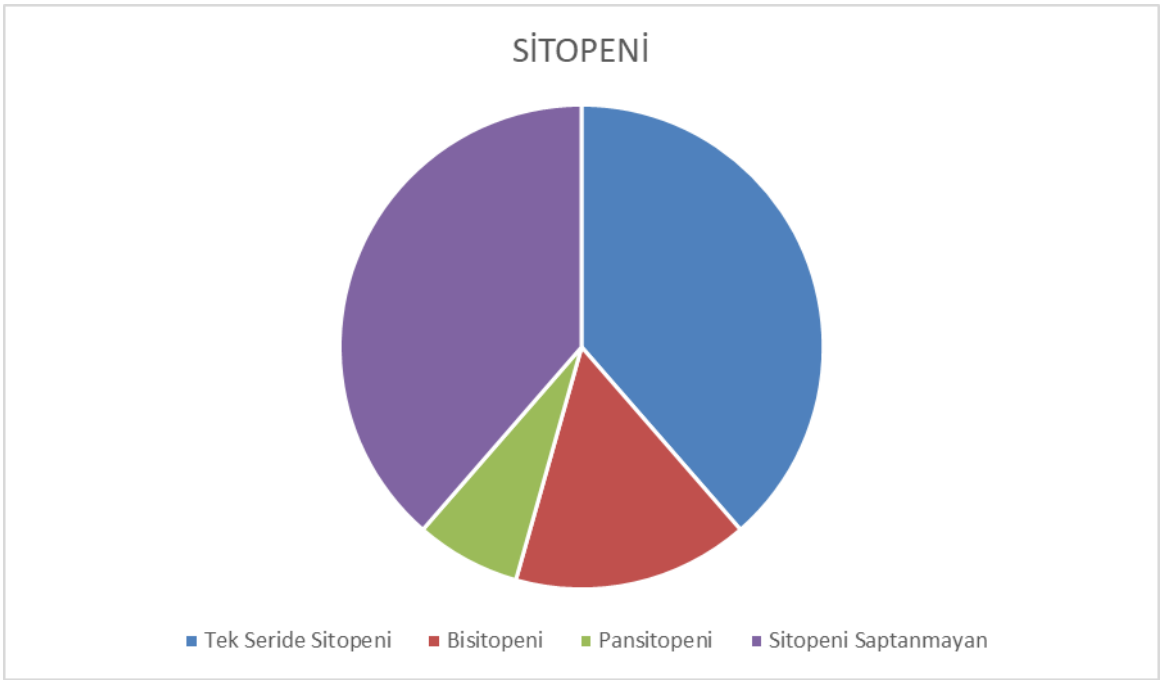
2 dk santrifüjlenerek üstteki kısım döküldü. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenip fazla etanol uzaklaştırıldı. Plate, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilip ve yüksek vakum altında örnekler kurutuldu. Kuruyan örneklerin üzerine 25µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlandı. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plate, DNA dizi analizi cihazına yerleştirildi ve elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirildi. Bu işlemler için sekans hizmet alımı yapıldı. (Medsantek)

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS 20.0 (IBM Corporation 2011, NY) paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma olarak özetlendi. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki Kare ve Fisher'in Kesin Testi kullanıldı. p-değeri <0,05 anlamlı değer olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya katılan hastalarımızın 39(%68)'u kız, 18(%31)'i erkekti, K:E oranı 2.1:1 idi. jSLE tanılı hastalarda öncelikle tanı anında veya izlemlerinde Direkt Coombs pozitifliğinin olduğu hemolitik anemiye girenler, lökosit sayısı <4000/mm³ ve/veya lenfosit sayısı <1500 mm³ olanlar, trombosit sayısı <100.000 olanlar olarak gruplandırıldı. Tek seride sitopenisi olan 22 hasta, bisitopenisi olan 9 hasta, pansitopenisi olan 4 hasta, sitopenisi olmayan 22 hasta bulunmaktaydı. Bkz Şekil 6



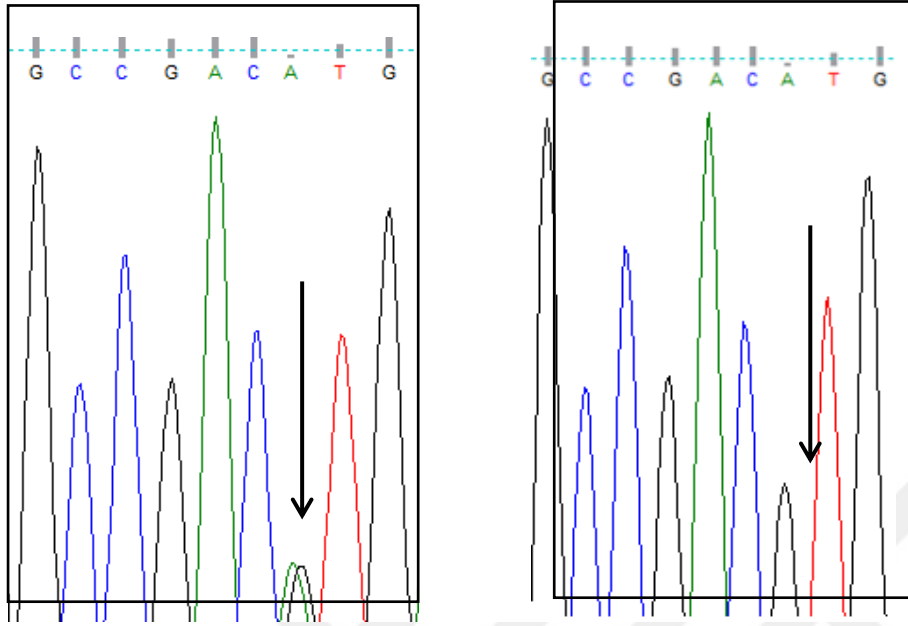
Şekil 6. jSLE hastalarında sitopeni dağılımı

Syntaxin (STX11) geni hemafagositik lenfositler için belirteç bir gen olup 6.kromozomda lokalize, 2 ekzona sahip, 1926 baz çifti uzunluğundadır. Gen 287 aminoasidi kodlamaktadır. Çalışmada 57 hastada gen taraması ile mutasyon ve tekli nükleotid değişimleri tespit edilmiştir.

STX11 geni 1. Ekzonunda herhangi bir değişim tespit edilememiştir.

STX11 geni, 2. Ekzonda bir hastada 367. Pozisyonda Guaninden Adenine değişim tespit edilmiştir. Bu değişim proteinde 62. Pozisyonda yer alan Valin aminoasidinin Metiyonin şeklinde kodlanmasına neden olmuştur. NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanında rs776227989 referans numarasıyla bildirilmiş olan bu değişim aynı veritabanında bu gen için COSM1440920 referans koduyla somatik mutasyon olarak

bildirilmiştir. Bu mutasyon aynı zamanda 3 ayrı hastada daha tespit edilmiştir. 48 sağlıklı çocuktan oluşan kontrol grubunda sintaksin mutasyonuna rastlanmamıştır.



Şekil 7. STX11 Geni, Ekzon 2, c.367 G>A, p.V62M değişiminin hasta ve sağlıklı bireyde gösterilmesi

Sintaksin mutasyonunun saptandığı hastalarda hemofagositozda gözlenen klinik ve laboratuvar bulguları ve akraba evliliği durumu özetlenmiştir (Tablo iii).

Tablo iii. Sintaksin Mutasyonu olan hastalarda klinik ve laboratuvar bulguları

| | Tanı Yaşı | Cinsiyet | Hepatosplenomegali | Ferritin(ng/ml) | sitopeni | LAP | Ateş | Akraba Evliliği |
|--------|-----------|----------|--------------------|-----------------|----------|-----|------|-----------------|
| 1 (14) | 12 | K | Yok | 495 | Yok | Var | Var | Yok |
| 2 (20) | 17 | K | Yok | 24 | Yok | Yok | Yok | Var |
| 3 (21) | 17 | K | Yok | - | Var | Var | Var | Yok |
| 4 (20) | 14 | K | Yok | - | Var | Yok | Yok | Yok |

Sintaksin mutasyonun hemolitik anemi ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,587$)(Tablo iv).

Tablo iv. Hemolitik anemisi olan ve olmayan hastalarda sintaksin mutasyonu

| | | Hemolitik Anemi | | Toplam |
|---------------------|-----|-----------------|-----|--------|
| | | Yok | Var | |
| Sintaksin mutasyonu | Yok | 43 | 10 | 53 |
| | Var | 3 | 1 | 4 |
| Toplam | | 46 | 11 | 57 |

Fisher'in kesin testi

Sintaksin mutasyonun lökopeni ve/veya lenfopeni ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır($p=0,617$)(Tablo v).

Tablo v. Lökopeni ve/veya lenfopenisi olan ve olmayan hastalarda sintaksin mutasyonu

| | | Lökopeni ve/veya Lenfopeni | | Toplam |
|---------------------|-----|----------------------------|-----|--------|
| | | Yok | Var | |
| Sintaksin mutasyonu | Yok | 28 | 25 | 53 |
| | Var | 3 | 1 | 4 |
| Toplam | | 31 | 26 | 57 |

Fisher'in kesin testi

Sintaksin mutasyonun trombositopeni ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır($p=0,563$)(Tablo vi).

Tablo vi. Trombositopenisi olan ve olmayan hastalarda sintaksin mutasyonu

| | Trombositopeni | | Toplam | |
|------------------------|----------------|-----|--------|----|
| | Yok | Var | | |
| Sintaksin mutasyonu | Yok | 39 | 14 | 53 |
| | Var | 4 | 0 | 4 |
| Toplam | | 43 | 14 | 57 |

Fisher'in kesin testi

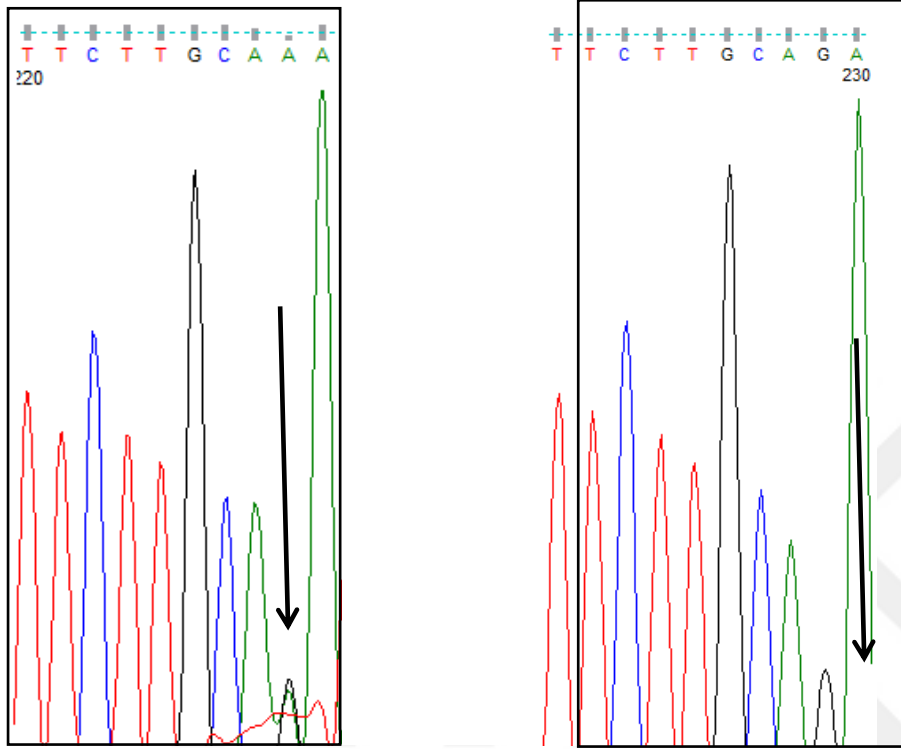
Kontrol grubu ile hasta grubumuz arasında sintaksin mutasyonunu karşılaştırdığımızda istatistiksel açıdan anlamlı değişiklik saptanmamıştır($p=0,123$)(Tablo vii).

Tablo vii. Hasta ve kontrol grupları arasında sintaksin mutasyonunun karşılaştırılması

| | | | Toplam | |
|------------------------|---------------|-------------|--------|-----|
| | Kontrol Grubu | Hasta Grubu | | |
| Sintaksin Mutasyonu | Yok | 48 | 53 | 101 |
| | Var | 0 | 4 | 4 |
| Toplam | | 48 | 57 | 105 |

Fisher'in kesin testi

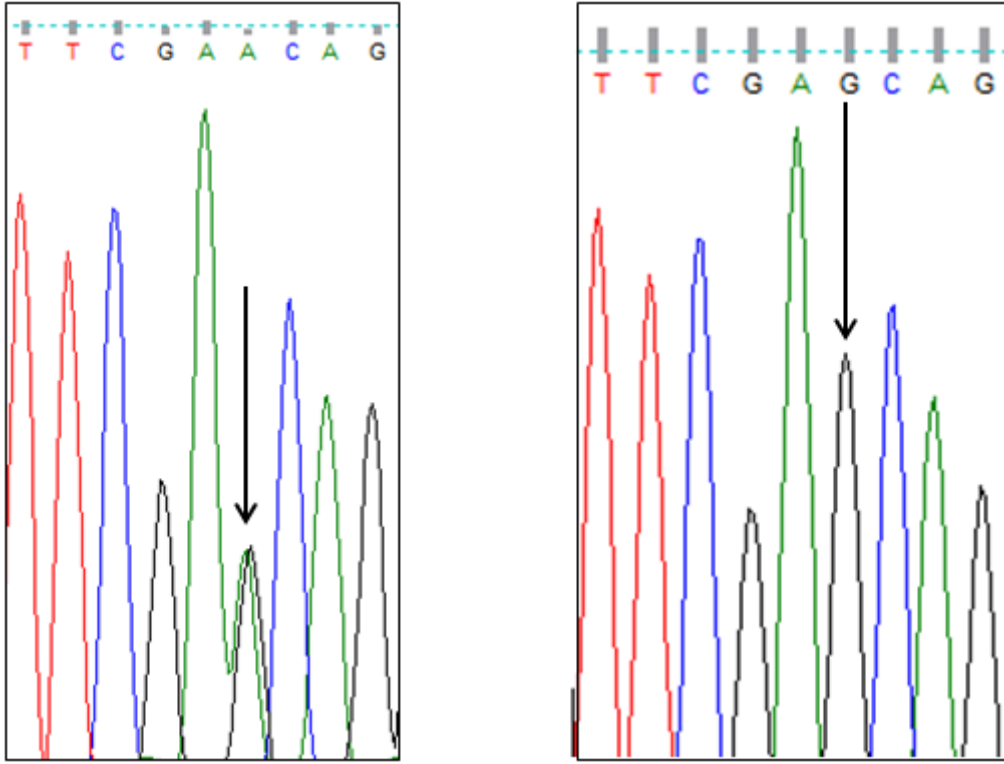
11 hastada daha önce NCBI veritabanında tanımlı olan polimorfizmler tespit edilmiştir. Bu polimorfizmlerden ilki STX11 geni 2. Ekzonunda 290. nükleotidinde Guaninden Adenine olan heterozigot değişim proteinde 230. pozisyonda (p.Q230Q) Glutamin aminoasidinde değişikliğe neden olmamaktadır.



Şekil 8. STX11 Geni, Ekzon 2, c.290G>A, p.Q230Q değişiminin hasta ve sağlıklı bireyde gösterilmesi

Bu çalışmada tespit edilen STX11 geninde 2. ekzonda 729. nükleotidde Guaninden Adenine meydana gelen değişim proteinde 182. lokasyonda Glutamat aminoasidinin kodlanmasında değişime neden olmayıp NCBI veritabanında *rs146949718* referans numarasıyla tekli nükleotid değişimi olarak yer almaktadır. Kontrol grubumuzda bulunan 48 sağlıklı çocukta bakılan STX11 geninde 3 sağlıklı çocukta p.Q230Q değişimi saptanmıştır. Bu değişim STX11 geni 2. Ekzonunda 290. nükleotidinde Guaninden Adenine olan heterozigot değişim olup proteinde 230. pozisyonda (p.Q230Q) Glutamin aminoasidinde değişikliğe neden olmamaktadır. Dört sağlıklı çocukta ise hasta grubumuzda da saptamış olduğumuz p. E182E değişimi saptanmıştır. STX11 geninde 2. ekzonda 729. nükleotidde Guaninden Adenine meydana gelen değişim proteinde 182. lokasyonda Glutamat aminoasidinin kodlanmasında değişime neden olmayıp

NCBI veritabanında *rs146949718* referans numarasıyla tekli nükleotid değişimi olarak yer almaktadır.



şekil 9. STX11 Geni, Ekzon 2, c.729 G>A, p.E182E değişiminin hasta ve sağlıklı bireyde gsterilmesi

Sintaksin polimorfizminin hemolitik anemi ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır($p=0,625$)(Tablo viii).

Tablo viii. Hemolitik anemisi olanlarda sintaksin polimorfizmin varlığı

| | | Hemolitik anemi | | Toplam |
|--------------|-----|-----------------|-----|--------|
| | | Yok | Var | |
| Sintaksin | Yok | 38 | 9 | 47 |
| Polimorfizmi | Var | 8 | 2 | 10 |
| Toplam | | 46 | 11 | 57 |

Fisher'in kesin testi

Sintaksin polimorfizminin lökopeni ve/veya lenfopeni ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır($p=0,08$)(Tablo ix).

Tablo ix. Lökopeni ve/veya lenfopeni olan hastalarda sintaksin polimorfizmin varlığı

| | | Lökopeni ve/veya lenfopeni | | Toplam |
|--------------|-----|----------------------------|-----|--------|
| | | Yok | Var | |
| Sintaksin | Yok | 28 | 19 | 47 |
| polimorfizmi | Var | 3 | 7 | 10 |
| Toplam | | 31 | 26 | 57 |

Ki Kare Testi

Sintaksin polimorfizminin trombositopeni ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır($p=0,66$)(Tablo x).

Tablo x. Trombositopenisi olan ve olmayan hastalarda sintaksin polimorfizmin varlığı

| | | Trombositopeni | | Toplam |
|------------------------|-----|----------------|-----|--------|
| | | Yok | Var | |
| Sintaksin polimorfizmi | Yok | 36 | 11 | 47 |
| | Var | 7 | 3 | 10 |
| Toplam | | 43 | 14 | 57 |

Ki Kare Testi

Kontrol grubu ile hasta grubumuz arasında sintaksin polimorfizmini karşılaştırdığımızda istatistiksel açıdan anlamlı değişiklik saptanmamıştır($p=0,682$)(Tablo xi).

Tablo xi . Hasta ve kontrol grupları arasında sintaksin mutasyonunun karşılaştırılması

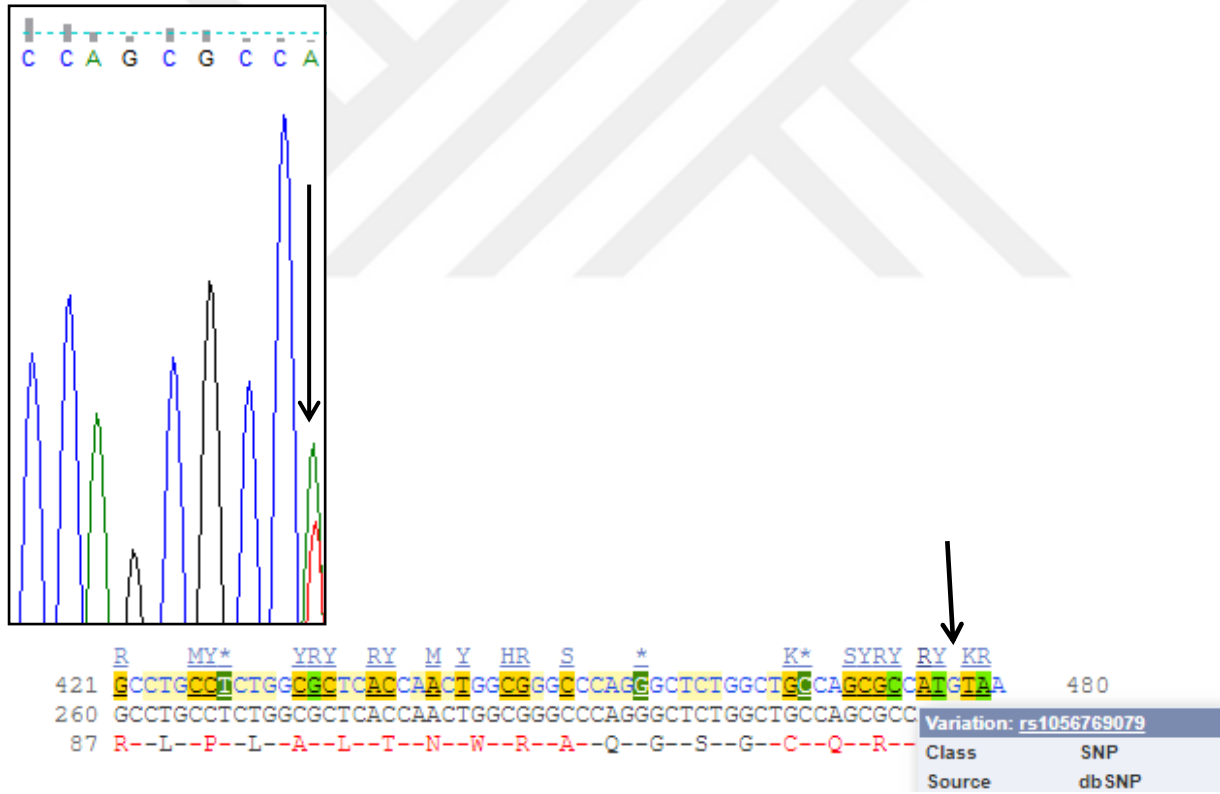
| | | | | Toplam |
|-----------------------|-----|---------|-------|--------|
| | | Kontrol | Hasta | |
| Sintaksin polimorfizm | Yok | 41 | 47 | 88 |
| | Var | 7 | 10 | 17 |
| Toplam | | 48 | 57 | 105 |

Ki Kare Testi

PERFORIN 1 (PRF1) Geni

PRF1 geni 10. kromozomda lokalize, 2533 baz çifti uzunluğunda ve 555 aminoasit kodlayabilen, 3 ekzona sahip hemafagositik lenfositler için önemli genlerden bir tanesidir.

Çalışmada PRF1 geninde 1. Ekzonda 8 hastada daha önce tanımlanmış olan tekli nükleotid değişimi tespit edilmiştir. Bu değişim gende 1. Ekzonda 475. nükleotidde Adenin> Timin değişimi olup proteinde 105. Pozisyonda Histidin aminoasidinin Arginin şeklinde kodlanmasına neden olmaktadır. NCBI veritabanında *NP_001076585.1:p.His105Arg* referansı ile yer almaktadır.



Şekil 10. PRF1 geni , Ekzon 1, c. 475 A>T, p. H105R değişiminin hasta ve sağlıklı bireyde gösterilmesi

Tekli nükleotid değişiminin saptandığı hastalarda hemofagositozda gözlenen klinik ve laboratuvar bulguları ve akraba evliliği durumu özetlenmiştir (Tablo xii).

Tablo xii. Tekli nükleotid değişiminin saptandığı hastalarda klinik ve laboratuvar bulguları

| | Tanı Yaşı | Cinsiyet | Hepatosplenomegali | Ferritin(ng/ml) | sitopeni | LAP | Ateş | Akraba Evliliği |
|---------|-----------|----------|--------------------|-----------------|----------|-----|------|-----------------|
| 2 (20) | 17 | K | Yok | 24 | Yok | Yok | Yok | Var |
| 5 (19) | 8 | K | Yok | - | Yok | Yok | Yok | Yok |
| 6 (13) | 9 | K | Yok | - | Var | Yok | Var | Yok |
| 7 (17) | 9 | E | Yok | - | Var | Yok | Yok | Yok |
| 8 (21) | 15 | E | Var | - | Var | Yok | Yok | Var |
| 9 (19) | 16 | K | Yok | - | Var | Yok | Yok | Yok |
| 10 (21) | 16 | K | Yok | - | Yok | Yok | Yok | Yok |
| 11 (21) | 13 | K | Yok | - | Var | Yok | Yok | Yok |

Perforin tekli nükleotid değişiminin hemolitik anemi ile ilişkisine bakıldığında **istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmıştır**($p=0,03$)(Tablo xiii)

Tablo xiii. Hemolitik anemisi olan ve olmayan hastalarda perforin tekli nükleotid değişiminin varlığı

| | Hemolitik anemi | | Toplam |
|--------------|-----------------|-----|--------|
| | Yok | Var | |
| Perforin Yok | 42 | 7 | 49 |
| Perforin Var | 4 | 4 | 8 |
| Toplam | 46 | 11 | 57 |

Fisher'in kesin testi

Perforin tekli nükleotid değişiminin lökopeni ve/veya lenfopeni ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmamıştır($p=0,78$)(Tablo xiv)

Tablo xiv. Lökopenisi ve/veya lenfopenisi olan ve olmayan hastalarda perforin tekli nükleotid varlığı

| | Lökopeni ve/veya lenfopeni | | Toplam | |
|----------|----------------------------|-----|--------|----|
| | Yok | Var | | |
| perforin | Yok | 27 | 22 | 49 |
| | Var | 4 | 4 | 8 |
| Total | | 31 | 26 | 57 |

Ki Kare Testi

Perforin tekli nükleotid değişiminin trombositopeni ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmamıştır($p=0,39$)(Tablo xv)

Tablo xv. Trombositopenisi olan ve olmayan hastalarda perforin tekli nükleotid varlığı

| | Trombositopeni | | Toplam | |
|----------|----------------|-----|--------|----|
| | Yok | Var | | |
| perforin | Yok | 38 | 11 | 49 |
| | Var | 5 | 3 | 8 |
| Toplam | | 43 | 14 | 57 |

Fisher'in kesin testi

Kontrol grubu ile hasta grubumuz arasında perforin tekli nükleotid değişimini karşılaştırdığımızda **istatistiksel açıdan anlamlı değişiklik saptanmıştır**($p=0,007$)(Tablo xvi).

Tablo xvi. Hasta ve kontrol grupları arasında perforin tekli nükleotid değişiminin karşılaştırılması

| | | | Toplam |
|--------------|---------|-------|--------|
| | Kontrol | Hasta | |
| perforin Yok | 48 | 49 | 97 |
| perforin Var | 0 | 8 | 8 |
| Toplam | 48 | 57 | 105 |

Ki Kare Testi

5.TARTIŞMA

Juvenil sistemik lupus eritematozuslu hastalar arasında bir veya daha fazla seride sitopeniye giren ve sitopeniye girmeyen hastaların olması bu hastalıkta sitopeniye neden olabilecek faktörlerin varlığına işaret etmektedir. Hastalığın etyopatogenizini incelediğimizde aynı yolaklarla sitokin fırtınası yaratan bir diğer hastalık olan ve aynı zamanda romatolojik hastalıkların bir komplikasyonu olarak gerçekleşen makrofaj aktivasyon sendromu bulunmaktadır. Bu iki hastalık arasında benzer yolakların kullanılması sitopeniye neden olan bir faktör olarak ailesel hemofagositik lenfositariositozda gözlenen mutasyonların varlığı olabileceğini düşündük ve bu mutasyonları jSLE'li hastalarda inceledik.

Çalışmamızda jSLE'li hastalarda sintaksin ve perforin mutasyonlarının varlığı, kontrol grubu ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Hastalığın bir sonucu olan sitopeni tablolarının oluşumunda bu mutasyona sahip olan ve olmayan hastaları karşılaştırdığımız sonuçlarda istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar elde ettik. Aynı zamanda kontrol grubu ile yapmış olduğumuz karşılaştırmada da bu hastalık grubunda bahsettiğimiz mutasyonlardan birinin görülme sıklığındaki artışın istatistiksel açıdan anlamlı fark oluşturduğunu bulduk. Primer hemofagositik lenfositariositozda neden olan genetik bozukluklar etnik gruplar arasında farklı sıklıklarda görülmektedir. Hennies ve arkadaşlarının 2006 yılında, primer hemofagositik lenfositariositozlu hastalarda PRF1, UNC13-D, STX11, RAB27A mutasyonlarının moleküler ve fonksiyonel analizini yaptıkları çalışmada 63 hemofagositozlu hastanın 32 tanesi Türkiyeden katılmış ve bu Türk hastaların %43'ünde PRF1, %19'unda STX11, %19'unda UNC13D, %19'unda da tanımlanmamış mutasyonlar tespit edilmiştir¹⁰³.

STX 11 geninin ürünü olan sintaksin 11 proteini ekzon 2 de kodlanan 287 aminoasitlik bir proteindir. Bu genin hemofagositik lenfositariositoz ile ilişkisi ilk kez Hennies ve arkadaşları tarafından 2005 yılında keşfedilmiş ve bu hastalığın ailesel formunun 4. tipi olarak adlandırılmıştır¹⁰⁴. Delesyon şeklinde saptanan bu mutasyonda özellikle Türkiyeden katılan hastaların ailelerine bakıldığında bu mutasyonun gözlemlendiği etnik bir grup bu çalışmada ortaya çıkmaktadır¹⁰⁴. Bizim çalışmamızda saptamış olduğumuz sintaksin genindeki mutasyon için önceden yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Kontrol grubumuzda ise sintaksin geninde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Mutasyonun görülme sıklığının hasta ve kontrol gruplarımız arasında karşılaştırdığımızda ise istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç ortaya çıkmamıştır. Gürgey ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir başka çalışmada Türkiyeden katılan hastalarda yine belirli bir etnik gruba ait hastalarda ve ailelerde sintaksin

mutasyonu 369_370 pozisyonunda yer alan AG delesyonu ve 374_376 pozisyonunda yer alan CGC delesyonları 2. Ekzonda tespit edilmiştir¹⁰⁵. Literatürde yapılmış olan bu çalışmalara bakıldığında Türk hastalarda özellikle Türkiyenin güney doğusunda yaşayan etnik bir grupta görülmesi mutasyonun etnisite ile çok ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bizim çalışmamızda Türk hastalarında görülen bu belirtilen mutasyona rastlamamızın nedeni bahsettiğimiz bu etnik gruptan yeterli hastamızın olmaması ile ilişkili olabilir. Sintaksin geninde tanımlamış olduğumuz 367. Pozisyonda GA değişiminin oluşturduğu mutasyon ve 2. Ekzonda 269. Nükleotidde GA değişiminin neden olduğu polimorfizm NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanında araştırıldığında fenotipik herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Çalışmamızda sintaksin mutasyonu saptadığımız 4 hastanın cinsiyeti kızdı. Hastalarımızda hemafagositik lenfohistiyositozun klinik bulguları arasında yer alan ateş, hepatomegali, splenomegali, lenfadenopati durumlarını değerlendirdik bunlar arasında 2 hastanın klinik başvurusunda ateş yakınması bulunmaktaydı ve bu hastalarımızda aynı zamanda lenfadenopatileri mevcuttu. Hastalarımızın hiçbirisinde, başvurusunda veya takipli olduğu süre boyunca hepatomegali veya splenomegali saptamadık. Hastalarımızdan yalnızca birinde 1. derece akraba evliliği bulunmaktaydı. Hastalarımızı başvurusunda veya takibinde hemolitik anemi, lökopeni ve/veya lenfopeni, trombositopeni gelişenler ve gelişmeyenler olarak gruplandırdığımızda 4 hastamızda saptamış olduğumuz Val62Met mutasyonunun sitopeniye etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk. Çalışmamızda hasta grubumuzdan 11 hastada sintaksin genine ait polimorfizmlere rastlanmıştır. Bu polimorfizmler STX11 geni 2. Ekzonunda 290. nükleotidinde Guaninden Adenine olan heterozigot değişimi olup proteinde 230. pozisyonda (p.Q230Q) Glutamin aminoasidinde değişikliğe neden olmamaktadır diğer polimorfizm ise STX11 geninde 2. ekzonda 729. nükleotidde Guaninden Adenine meydana gelen değişim proteinde 182. lokasyonda Glutamat aminoasidinin kodlanmasında değişime neden olmayıp NCBI veritabanında *rs146949718* referans numarasıyla tekli nükleotid değişimi olarak yer almaktadır ve bu değişimler NCBI veritabanında araştırıldığında fenotipik herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu hastalarımızı da başvurusunda veya takibinde hemolitik anemi, lökopeni ve/veya lenfopeni, trombositopeni gelişenler ve gelişmeyenler olarak gruplandırdığımızda bu polimorfizmlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk. Yine kontrol ve hasta grupları arasında polimorfizmlerin görülme sıklığı istatistiksel açıdan anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür.

Perforin, sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin sitoplazmik granüllerinde bulunan membranolitik bir proteindir¹⁶. Perforin geni 555 aminoasitten oluşan 67 kDa

ağırlığında 3 ana bölümden oluşmaktadır; membran atak kompleks perforin like/ kolesterol bağımlı sitolizin(MACPF/CDC), epidermal büyüme faktörü, C terminal uç. Perforin genindeki değişiklikler ölümcül immün yetersizlikler, ailesel hemofagositik lenfohistiyositoz tip 2, juvenil romatoid artrit, makrofaj aktivasyon sendromu, dianzani lenfoproliferatif hastalığı ile ilişkili bulunmuştur. Perforin genindeki Ala91Val mutasyonu perforin proteininin %90 işlev kaybına yol açmaktadır¹⁰⁶. Exome aggregation consortium'un veri tabanında perforin ile ilgili 460 adet tekli nükleotid değişimi bulunmaktadır. Perforin genindeki mutasyonların çoğunluğu nokta mutasyonlardır. Çalışmamızda kontrol ve hasta gruplarımızda perforin genine ait herhangi bir mutasyon gözlenmemiştir. Exome aggregation consortium veri tabanında mutasyonların en sık görüldüğü bölge 212. ve 241. Nükleotidler arasındaki amphipatic α - helix bölgesi, bundan sonra 2. En sık bölge litik peptik bölgesi olan 21. ve 55. nükleotidler arasındaki bölgedir. Leader peptid, C2 domain, C terminal bölgeleri iste literatürdeki en az mutasyon ve tekli nükleotid değişiminin gözlemlendiği yerlerdir¹⁰⁷. Çalışmamızda 475. Nükleotidde bulmuş olduğumuz tekli nükleotid değişimi de C2 domain bölgesine denk gelmektedir. Çalışmamızda 8 hastada bulmuş olduğumuz tekli nükleotid değişimi 1. Ekzonda 475. nükleotidde Adenin> Timin değişimi olup proteinde 105. Pozisyonda Histidin aminoasidinin Arginin şeklinde kodlanmasına neden olmaktadır. NCBI veritabanında *NP_001076585.1:p.His105Arg* referansı ile yer almaktadır. Bu tekli nükleotid değişimi NCBI veritabanına göre herhangi bir fenotip değişikliğe neden olmamaktadır. Johnson ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada tekli nükleotid değişiminin kalıtsal çeşitliliği yaygın olan ve olmayan bazı genler ile birlikte perforin genine bakılmıştır. Yüksek oranda genetik kodlanmasının korunmuş olduğu aktin, TNF- α , kompleman 9 genlerinde tekli nükleotid değişimi çok az görülürken insan lökosit antijeni(HLA) ve perforin geninde tekli nükleotid değişimi oranı yüksek saptanmıştır. Perforin genindeki tekli nükleotid değişimi ile jeografik ilişkisinin değerlendirildiği bu çalışmada ekvator bölgesinden kutuplara doğru gidildikçe perforin genindeki tekli nükleotid değişim oranının azaldığı çok anlamlı bir şekilde istatistiksel olarak kanıtlanmıştır¹⁰⁷. Zaja ve arkadaşları immün trombositopenili (İTP) hastalarda defektif fas fonksiyonunun bulunduğu in vitro ortamda bu hastalardan elde edilen aktive T hücrelerinde fas ekspresyonunda azalma göstermişlerdir. İmmün trombositopenili hastalarda regülatuar T hücreleri, IL-10 ve IL-17 düzeyleri azalmaktadır. Zaja'nın bu çalışmasında İTP'li hastalarda perforin varyasyonunun sıklığı artmıştır¹⁰⁸. Çalışmamızda ise trombositopeni gelişen hastalar ile gelişmeyen hastaları karşılaştırdığımızda perforin genindeki tekli nükleotid değişiminin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Perforindeki yanlış anlamlı (missense) mutasyonların aynı zamanda otoimmün lenfoproliferatif sendrom için artmış bir risk oluşturabileceği gösterilmiştir. Kuis ve arkadaşlarının İtalya ve Hollanda'dan 56

sistemik juvenil idiyopatik artrit (sJİA) tanılı hasta ile yapmış olduğu çalışmada 56 sJİA hastasının 15 inde makrofaj aktivasyonu sendromu tespit edilmiş, 56 hastada Perforin 1 geninin analizi yapılmış ve 11 hastada yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar tespit edilmiştir; bir hastada Arg4His, yedi hastada Ala91Val, üç hastada Asn252Ser, bir hastada Arg28Cys mutasyonudur. Ala91Val mutasyonuna sahip hastalarda MAS gelişimi açısından istatistiksel olarak artmış anlamlı bir risk bulunmuştur¹⁰⁹. Gürgey ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılmış olan uluslararası çok merkezli bir çalışmada toplam 34 hasta değerlendirilmiş değerlendirilen bu hastalardan 20 tanesi Türkiye'den katılmıştır. Türkiye'den katılmış olan bu hastalarda 3. ve 2. ekzona ait mutasyonlar tespit edilmiştir¹⁵. Perforin 1 genindeki bulunan mutasyonlar jeografik kökenle çok yakından ilişkili bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır¹⁰⁷. Bunlardan Trp374X sonucuna neden olan c.1122G>A mutasyonu Stadt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Türklerde sık görülürken, c50delT mutasyonu Molleran Lee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Afro-Amerikalarda gösterilmiş, c.1090-1091delCT mutasyonu Suga ve arkadaşları tarafından Japonlarda karşımıza çıkmaktadır¹⁰³. Çalışmamızda saptamış olduğumuz tekli nükleotid değişimi ise 1. ekzonda saptanmıştır. Hohlfeld ve arkadaşlarının otoinflamatuvar hastalıklardan olan polimyozit ve dermatomyozit tanısı almış hastalarda yapmış olduğu çalışmada kontrol grubuna göre hastalarda yapılan kas biyopsisinin analizinde bulunan perforin proteininin miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur¹¹⁰. Çalışmamızda saptamış olduğumuz bu tekli nükleotid değişimi NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında araştırıldığında fenotipik herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. **Çalışmamızda bu tekli nükleotid değişiminin jSLE hastalarından hemolitik anemisi olan hastalarda anlamlı bulmuş olmamızın nedeni bu tekli nükleotid değişiminin ailesel hemofagositik lenfositariositozun patofizyolojisinin temellerini oluşturan mekanizmalardan olan sitokin fırtınası ile ilişkili olabileceği ve yine jSLE'de bu tekli nükleotid değişimine sahip bireylerde oluşan sitokin fırtınasının hemolitik anemiye yol açmış olduğunu bize düşündürdü.** Makrofaj aktivasyon sendromunun jSLE'de bir komplikasyon olarak olabileceği bildirilmiştir fakat literatürde sintaksin ve perforin mutasyonlarına jSLE'li hastalarda hiç bakılmamıştır. Bizim bu çalışmayı yapmaktaki amacımız ortak etyopatogeneze sahip olabilecek bu klinik durumları mutasyon varlığı ile ilişkilendirmektir.

Lorenz ve arkadaşları SLE'li hastalarda Treg hücrelerinin konsantrasyonlarını kontrol grupları ile karşılaştırmış ve kontrol grubuna göre hastalarda belirgin yükseklik saptanmıştır bu durum

SLE'li hastalarda Treg hücrelerine karşı gelişen duyarsızlığın sonucu olduğu öngörülmektedir¹¹¹.

Koike ve arkadaşlarının 1997-2007 tarihleri arasında Hokkaido Üniversitesine başvuran otoimmünitesi olan hastalarda hemofagositik sendrom gelişen hastaların incelendiği çalışmada 18 SLE hastasının yaş ortalaması 34'tü. Bu hastalarda lökosit sayısı 500/mm³'ün altında, trombosit sayısının 50.000/mm³'ün altında olması ve CRP düzeyinin yüksek olması kötü prognoz ile anlamlı ilişkilendirilmiştir¹¹².

Marciano ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada deney farelerine IFN- γ aralıklı olarak verildiği takdirde sitopeniye yol açmadığı, Brown ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise deney farelerine sürekli infüzyon ile sitokin verilmesinin sitopeniye yol açtığı gösterilmiştir. Zoumbss ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise IFN- γ 'nın hematopoezi baskıladığı düşünülse de sitopeni etiolojisinde hipoprotektif üretimden ziyade bu hücrelerin tüketimi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür¹¹³. Juvenil sistemik lupus eritematozus inflamatuvar ataklarla seyreden bir hastalık olduğu için bu hastalardaki IFN- γ üretiminin aralıklı salınım şeklinde olmasından dolayı sitokin fırtınası oluşsa da bu hastalarda sitopeniye sürekli salınımının olmaması neden olarak gösterilebilir. Çalışmamızda sitokin fırtınasının hastalarımızda ataklar şeklinde seyretmesi nedeni ile sitopeni ile sitokin fırtınasındaki ilişkiyi saptayamamış olabiliriz.

Cheng ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada otoimmün hemolitik anemisi olan hastaları sistemik lupus eritematozusun yol açtığı ve diğer primer hastalıkların yol açtığı nedenler olarak iki grubu ayırmış ve bu iki grupta bazı sitokin düzeylerini ölçmüşlerdir. Her iki grupta belirgin olarak artmış sitokinler MCP-1/CCL2, MIP-1 β /CCL4, IL-8/ CXCL8, BLC/CXCL13, sTNFRI ve sTNFRII'dir. İki grup arasında etiyolojiye bağlı olarak farklı sitokin gruplarında artış tespit edilmemiştir¹¹⁴. Bu iki hastalık grubunda da ortak sitokinlerde artışın görülmesi hastalıkların etyopatogenizindeki ortak genetik bir temelin varlığına işaret edebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde SLE hastalığının etyopatolojisini ve bunun klinik sonuçlarını araştıran çalışmalara baktığımızda hemofagositoz hastalığına benzer sitokin yolaklarının rol aldığı ve benzer laboratuvar sonuçlarının ortaya çıktığı görülmektedir. Bu iki hastalığın bazı durumlarda iç içe geçmiş olabileceği ve jSLE'li hastalarda gelişmesi muhtemel olan sekonder hemofagositik lenfositosisi, primer hastalıkla benzer özelliklerinden dolayı tanı ve tedavide zorluklar ortaya çıkabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda ise SLE hastalığının farklı klinik bulgularının ortaya çıkmasına neden olabilecek predispozan bir genetik mutasyonun varlığını klinik benzerlikten yola çıkarak incelemek istedik.

Kontrol grubumuz ile hasta grubumuz arasında yapmış olduğumuz karşılaştırmada da perforin tekli nükleotid değişiminin hastalarda gözlenmesi istatistiksel olarak güçlü bir anlam oluşturmaktadır($p=0,007$). Bu nedenle ortak etyopatogeneze sahip olduğunu düşündüğümüz bu hastalıklarda perforin tekli nükleotid değişiminin jSLE hastalığı ile ilişkisi olabileceğini bize düşündürdü.



6. SONUÇLAR - ÇIKARIMLAR

Bu araştırmada jSLE tanısı ile Cerrahpaşa Çocuk Romatoloji polikliniğinden takipli 57 hastada hemofagositik lenfositosisine neden olan perforin ve sintaksin gen mutasyon analizi yapıldı. Bu çalışma sonucunda;

- 1- Çalışmaya katılan hastaların 39'u kız, 18'i erkekti.
- 2- Tek seride sitopenisi olan 22 hasta, bisitopenisi olan 9 hasta, pansitopenisi olan 4 hasta, pansitopenisi olmayan 22 hasta bulunmaktaydı.
- 3- Mutasyon analizine göre STX11 geni, 2. Ekzonda 367. Pozisyonda Guaninden Adenine değişim mutasyonu 4 hastada tespit edilmiştir.
- 4- Onbir hastada STX11 geni 2. Ekzonunda 290. nükleotidinde Guaninden Adenine olan heterozigot değişim, proteinde 230. pozisyonda (p.Q230Q) Glutamin aminoasidinde değişikliğe neden olmamaktadır.
- 5- Kontrol grubumuzda sintaksin mutasyonuna rastlanmadı. Ancak kontrol grubumuzda hasta grubumuzda saptadığımız sintaksin polimorfizmine rastlanıldı.
- 6- Sintaksin mutasyonunun ve polimorfizminin jSLE'li hastalarda sitopeni gelişen ve gelişmeyenler arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı.
- 7- Sintaksin mutasyon ve polimorfizminin hasta grupta görülme sıklığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı.
- 8- Perforin geninde 1. Ekzonda 8 hastada daha önce tanımlanmış olan tekli nükleotid değişimi tespit edildi. Bu değişim gende 1. Ekzonda 475. nükleotidde Adenin> Timin değişimi olup proteinde 105. Pozisyonda Histidin aminoasidinin Arginin şeklinde kodlanmasına neden olmaktadır.
- 9- Perforin geninde saptadığımız tekli nükleotid değişimi hemolitik anemisi olan ve olmayanlar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark ortaya çıktı(p=0.03).**
- 10- Perforin geninde saptadığımız tekli nükleotid değişimine kontrol grubunda rastlamadık. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı(p=0.007).**
- 11- Hipotezimizle uyumlu olmaksızın, çalışmamız sonucunda sitopeni varlığında HLH mutasyonlarının çalışmasının çok getirisi olmadığını bize düşündürdü.

12- Ancak hemolitik anemisi olan jSLE'li hastalarda perforin tekli nükleotid değişiminin klinik bulgularda etkisi olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle özellikle hemolitik anemi tanı veya izleminde gelişen jSLE'li hastalarda aile öyküsünün iyi alınması, HLH düşündürülen bulgular varlığında (akraba evliliği, kardeş ölümü, ağır enfeksiyon, nedeni bilinmeyen hepatosplenomegalisi olan kardeşler) tekli perforin gen polimorfizmlerinin incelenmesi uygun olacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Jordan MB, Allen CE, Weitzman S, Filipovich AH, McClain KL. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2011;118:4041-52.
2. Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Pediatr*. 2007;166:95-109.
3. Grom AA. Macrophage activation syndrome and reactive hemophagocytic lymphohistiocytosis: The same entities? *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15:587-90.
4. Atteritano M, David A, Bagnato G, et al. Haemophagocytic syndrome in rheumatic patients. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16:1414-24.
5. Ishii E, Ohga S, Imashuku S, et al. Nationwide Survey of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Japan. *Int J Hematol*. 2007;86:58-65.
6. Henter J, Elinder G, Soder O, Ost AKE. Incidence in Sweden and Clinical Features of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Acta Paediatrica* 1991;80:428-35.
7. Gürgey A, Göğüş S, Özyürek E, et al. Primary hemophagocytic lymphohistiocytosis in Turkish children. *Pediatr Hematol Oncol*. 2003;20:367-71.
8. Takada H, Takahata Y, Nomura A, Ohga S, Mizuno Y, Hara T. Increased serum levels of interferon- γ -inducible protein 10 and monokine induced by gamma interferon in patients with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin Exp Immunol*. 2003;133:448-53.
9. Trottestam H, Horne A, Aricò M, et al. Chemoimmunotherapy for hemophagocytic lymphohistiocytosis: Long-term results of the HLH-94 treatment protocol. *Blood*. 2011;118:4577-84.
10. Janka G, Imashuku S, Elinder G. Infection and malignancy associated hemophagocytic syndromes: secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 98;12:435-44

11. Tong H, Ren Y, Liu H, et al. Clinical characteristics of T-cell lymphoma associated with hemophagocytic syndrome: Comparison of T-cell lymphoma with and without hemophagocytic syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:81-7.
12. Dhote R, Simon J, Papo T, et al. Reactive hemophagocytic syndrome in adult systemic disease: Report of twenty-six cases and literature review. *Arthritis Rheum*. 2003;49:633-9.
13. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular Mechanisms of Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity and Their Role in Immunological Protection and Pathogenesis in Vivo. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:207-32.
14. Behrens EM. Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: What is the role of the antigen presenting cell? *Autoimmun Rev*. 2008;7:305-8.
15. Göransdotter Ericson K, Henter J. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hum Genet*. 2001;68:590-7.
16. Pinkoski MJ, Heibein JA, Barry M, Bleackley RC. Nuclear translocation of granzyme B in target cell apoptosis. *Cell Death Differ*. 2000;7:17-24.
17. Stepp SE, Dufourcq-lagelouse R. References and Notes Perforin Gene Defects in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Science* 1999;286:1-4.
18. Arico M, Danesino C, Pende D. Pathogenesis of haemophagocytic lymphohistiocytosis. *British Journal of Haematology* 2001;54:24-9
19. Kogawa K, Lee SM, Villanueva J, Marmer D, Sumegi J, Filipovich AH. Perforin expression in cytotoxic lymphocytes from patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and their family members. *Blood*. 2002;99:61-6.
20. Campbell K, Buder A, Deuschle U. Interaction of p56lck with CD4 in the Yeast Two-hybrid System. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;766:89-92.
21. zur Stadt U, Schmidt S, Kasper B, et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum Mol Genet*. 2005;14:827-34.
22. Chen Y, Scheller R. SNARE - mediated membrane fusion. *Nature* 2001;2:98-106.
23. Klenchin VA, Martin TFJ. Priming in exocytosis: Attaining fusion-competence after

- vesicle docking. *Biochimie*. 2000;82:399-407.
24. Janka GE, Lehmborg K. Janka. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: pathogenesis and treatment. *Hematology* 2013;1:605-11.
 25. Henter JI, Elinder G, Söder O, Hansson M, Andersson B, Andersson U. Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 1991;78:2918-22.
 26. Raefsky EL, Plataniias LC, Zoumbos NC, Young NS. Studies of interferon as a regulator of hematopoietic cell proliferation. *J Immunol*. 1985;135:2507-12.
 27. Trinchieri G. Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:251-76.
 28. Fujisaki H, Kobayashi M, Sakata N, Kawahara K, Okada S, Tawa A. Cytokine production regulating Th1 and Th2 cytokines in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 1997;89:4100-3.
 29. Moore KW, O'Garra A, Malefyt RDW, Vieira P, Mosmann T, et al. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90.
 30. Sornasse BT, Larenas P, Davis KA, Jan E. From the *Department of Human Immunology, D N A X Research Institute, Palo Alto, California 94304; and :-Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California 95131. *Cytokine*. 1996;184.
 31. Filipovich AH. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis and Other Hemophagocytic Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2008;28:293-313.
 32. Zhang Y, Liang G, Qin H, Li Y, Zeng X. Tuberculosis-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis with initial presentation of fever of unknown origin in a general hospital: An analysis of 8 clinical cases. *Medicine*. 2017;96.
 33. Edner J, Rudd E, Zheng C, et al. Severe bacteria-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in an extremely premature infant. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2007;96:1703-6.

34. Ismail S, Zulkifli M, Mansor R, Mat Yusof M, Ismail MI. The Role of Exploratory Data Analysis (EDA) in Electricity Forecasting. *Pertanika J Soc Sci Humanit.* 2016;24:93-100.
35. George M. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: review of etiologies and management. *J Blood Med.* 2014:69.
36. Celkan T, Berrak S, Kazanci E, et al. Malignancy-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in pediatric cases: a multicenter study from Turkey. *Turk J Pediatr.* 2009;51:207-13.
37. Levy J, Wodell RA, August CS, Bayever E. Adenovirus-related hemophagocytic syndrome after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1990;6:349-52.
38. Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2009:127-31.
39. Janka GE, Schneider EM. Modern management of children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol.* 2004;124:4-14.
40. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2002;16:61-71.
41. Woltman AM, Massacrier C, de Fijter JW, Caux C, van Kooten C. Corticosteroids Prevent Generation of CD34+-Derived Dermal Dendritic Cells But Do Not Inhibit Langerhans Cell Development. *J Immunol.* 2002;168:6181-8.
42. Fruman DA, Burakoff SJ, Bierer BE. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1994;8:391-400.
43. Ross C, Svenson M, Nielsen H, Lundsgaard C, Hansen MB, Bendtzen K. Increased in vivo antibody activity against interferon alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-6 after highdose Ig therapy. *Blood* 90:2376-80.
44. Ambruso DR, Hays T, Zwartjes WJ, Tubergen DG, Favara BE. Successful treatment of lymphohistiocytic reticulosis with phagocytosis with epipodophyllotoxin. *Cancer.* 1980;45:2516-20

45. Stéphan JL, Donadieu J, Ledest F, Blanche S, Griscelli C, Fischer A. Treatment of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with antithymocyte globulins, steroids, and cyclosporin A. *Blood*. 1993;82:2319-23.
46. Janka G. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: When the Immune System Runs Amok. *Klin Pädiatrie*. 2009;221:278-85.
47. Blanche S, Caniglia M, Girault D, Landman J, Griscelli C, Fischer A. Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with chemotherapy and bone marrow transplantation: a single-center study of 22 cases. *Blood* 1991;78:51–54.
48. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;40:1725.
49. Petri M, Orbai A-M, Alarcon GS, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64:2677-86.
50. Sag E, Tartaglione A, Batu ED, et al. Performance of the new SLICC classification criteria in childhood systemic lupus erythematosus: a multicentre study. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32:440-4.
51. Fortuna G, Brennan MT. Systemic lupus erythematosus. Epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. *Dent Clin North Am*. 2013;57:631-55.
52. Al-Mayouf S, Abdwani R, Al-Brawi S. Familial juvenile systemic lupus erythematosus in Arab children. *Rheumatol Int*. 2012;32:1939-43.
53. Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 1973;3:1-54.
54. Pineles D, Valente A, Warren B, Peterson M, Lehman T, Moorthy LN. Worldwide incidence and prevalence of pediatric onset systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2011;20:1187-92.
55. Huang JL, Yao TC, See LC. Prevalence of pediatric systemic lupus erythematosus and juvenile chronic arthritis in a Chinese population: A nation-wide prospective population-based study in Taiwan. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22:776-80.

56. Vilar MJP, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*. 2002;11:528-32.
57. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol*. 2003;56:481-90.
58. Schur PH. Review: Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1995;4:425-437.
59. Sullivan KE. GENETICS OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: Clinical Implications. *Rheum Dis Clin North Am*. 2000;26:229-56.
60. Niewold TB. Interferon alpha as a primary pathogenic factor in human lupus. *J Interf cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res*. 2011;31:887-92.
61. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AWK, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2888-97.
62. Xue C, Lan-Lan W, Bei C, Jie C, Wei-Hua F. Corrigendum to Abnormal Fas/FasL and caspase-3-mediated apoptotic signaling pathways of T lymphocyte subset in patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol*. 2006;239:121-28.
63. Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6:280-9.
64. Caielli S, Banchereau J, Pascual V. Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:671-7.
65. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25:1271-7.
66. Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH, et al. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney Int*. 1995;48:705-11.
67. Klinman DM, Shirai A, Ishigatsubo Y, Conover J, Steinberg AD. Quantitation of IgM- and IgG-secreting B cells in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1991;34:1404-10.

68. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol.* 1991;147:117-23.
69. Bakke AC, Kirkland PA, Kitridou RC, et al. T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus Correlations with Corticosteroid Therapy and Disease Activity. *Arthritis Rheum* 1983;19:46-47.
70. Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S, Morado C, Hernandez-Garcia C, Banares A, Jover JA. Defective early T and T-dependent B cell activation in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1998;7:314-22.
71. Linker-Israeli M, Bakke AC, Kitridou RC, Gendler S, Gillis S, Horwitz DA. Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J Immunol.* 1983;130:2651-5.
72. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, et al. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum.* 1994;37:1647-55.
73. Gröndal G, Gunnarsson I, Rönnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology.* 2000:565-70.
74. Horwitz DA, Gray JD, Behrendsen SC, et al. Decreased production of interleukin-12 and other Th1-type cytokines in patients with recent-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41:838-44.
75. Liu TF, Jones BM. Impaired production of IL-12 in systemic lupus erythematosus. I. Excessive production of IL-10 suppresses production of IL-12 by monocytes. *Cytokine.* 1998;10:140-7.
76. Suzuki N, Ichino M, Mihara S, Kaneko S, Sakane T. Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41:344-53.

77. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunol Rev.* 1981;55:179-216.
78. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1241-50.
79. Bader B, Armengaud J, Salomon R, French EA, Study M. Initial presentation of childhood-onset systemic lupus erythematosus: a french multicenter study. *The Journal of Pediatrics.* 2015;146:648-53.
80. Benseler SM, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus. *Pediatr Clin North Am.* 2005;52:443-67.
81. Newman K, Owlia MB, El-Hemaidi I, Akhtari M. Management of immune cytopenias in patients with systemic lupus erythematosus - Old and new. *Autoimmun Rev.* 2013;12:784-91.
82. Malattia C, Martini A. Paediatric-onset systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2013;27:351-62.
83. Bilginer Y, Besbas N, Ozaltin F, Cetin M. Hematological features of pediatric systemic lupus erythematosus: Suggesting management strategies in children. *Lupus.* 2012;23-9
84. Levy DM, Massicotte MP, Harvey E, Hebert D, Silverman ED. Thromboembolism in paediatric lupus patients. *Lupus.* 2003;12:741-6.
85. Drenkard C, Villa AR, Reyes E, Abello M, Alarcon-Segovia D. Vasculitis in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1997;6:235-42.
86. Ramos-Casals M, Nardi N, Lagrutta M, et al. Vasculitis in systemic lupus erythematosus: prevalence and clinical characteristics in 670 patients. *Medicine.* 2006;85:95-104.
87. Sahin S, Adrovic A, Barut K, et al. Pediatric lupus Pentraxin-3 levels are associated with vasculitis and disease activity in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2017:1-6.
88. Almeida RT, Campos LM de A, Aikawa NE, et al. Polineuropatia periférica em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil. *Rev Bras Reumatol.* 2009;49:362-

- 74.
89. Mitsikostas DD, Sfikakis PP, Goadsby PJ. A meta-analysis for headache in systemic lupus erythematosus: the evidence and the myth. *Brain*. 2004;127:1200-9.
 90. Liem MD, Gzesh DJ, Flanders AE. MRI and angiographic diagnosis of lupus cerebral vasculitis. *Neuroradiology*. 1996;38:134-6.
 91. Sanna G, Bertolaccini ML, Cuadrado MJ, et al. Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: prevalence and association with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol*. 2003;30:985-92.
 92. Saatci SAU. Association of antiphospholipid antibodies with systemic lupus erythematosus in a child presenting with chorea : a case report. *European Journal of Pediatrics* 1994:891-3.
 93. Nossent JC, Bronsveld W, Swaak AJ. Systemic lupus erythematosus. III. Observations on clinical renal involvement and follow up of renal function: Dutch experience with 110 patients studied prospectively. *Ann Rheum Dis*. 1989;48:810-6.
 94. Lech M, Anders H. The Pathogenesis of Lupus Nephritis Cell Death and Dead Cell Handling. *Clinical Immunology* 2013:1357-66.
 95. Yu F, Wu L-H, Tan Y, et al. Tubulointerstitial lesions of patients with lupus nephritis classified by the 2003 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society system. *Kidney Int*. 2010;77:820-9.
 96. Zawadowski GM, Klarich KW, Moder KG, Edwards WD, Cooper LTJ. A contemporary case series of lupus myocarditis. *Lupus*. 2012;21:1378-84.
 97. Tincani A, Rebaioli CB, Taglietti M, Shoenfeld Y. Heart involvement in systemic lupus erythematosus , anti-phospholipid syndrome and neonatal lupus. *Rheumatology*. 2006;45:8-13.
 98. Canpolat N, Kasapcopur O, Caliskan S. Ambulatory blood pressure and subclinical cardiovascular disease in patients with juvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Pediatric Nephrology*. 2013;28:305-13.
 99. Richer O, Ulinski T, Lemelle I, et al. Abdominal manifestations in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:174-8.

100. Abdalla E, Jeyaseelan L, Ullah I, Abdwani R. Growth Pattern in Children with Systemic Lupus Erythematosus. *Oman Med J.* 2017;32:284-90.
101. Molad Y, Gorshtein A, Wysenbeek AJ, et al. Protective effect of hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus. Prospective long-term study of an Israeli cohort. *Lupus.* 2002;11:356-61.
102. Carneiro JR, Sato EI. Double blind, randomized, placebo controlled clinical trial of methotrexate in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1999;26:1275-9.
103. Stadt U Zur, Beutel ÅK, Kolberg S, et al. Mutation Spectrum in Children With Primary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis : Molecular and Functional Analyses of PRF1 , UNC13D. *Human Mutation.* 2006;27:62-8.
104. Stadt U, Schmidt S, Kasper B, et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Human Molecular Genetics.* 2005;14:827-34.
105. Rudd E, Göransdotter Ericson K, Zheng C, et al. Spectrum and clinical implications of syntaxin 11 gene mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: association with disease-free remissions and haematopoietic malignancies. *J Med Genet.* 2006;43:12-4.
106. House IG, Thia K, Brennan AJ, et al. Heterozygosity for the common perforin mutation , p . A91V , impairs the cytotoxicity of primary natural killer cells from healthy individuals. *Immunol Cell Biol.* 2015;93:575-80.
107. Willenbring RC. Human perforin gene variation is geographically distributed. *Molecular Genetics & Genomic Medicine.* 2018;6:44-55.
108. Boggio E, Gigliotti CL, Rossi D, et al. Decreased function of Fas and variations of the perforin gene in adult patients with primary immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology.* 2017;176:258-67.
109. Vastert SJ, Wijk R Van, Urbano LED, et al. Mutations in the perforin gene can be linked to macrophage activation syndrome in patients with systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology.* 2010;46:441-9.

110. Goebels N, et al. Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996;97:2905-10.
111. Kumar R, Venigalla C, Tretter T, et al. Reduced CD4⁺, CD25⁺ T Cell Sensitivity to the Suppressive Function of CD4⁺, CD25^{high}, CD127^{low} Regulatory T Cells in Patients With Active Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 2008;58:2120-30.
112. Fukaya S, Yasuda S, Hashimoto T, et al. Clinical features of haemophagocytic syndrome in patients with systemic autoimmune diseases : analysis of 30 cases. *Rheumatology*. 2008;47:1686-91.
113. Zoller EE, Lykens JE, Terrell CE, et al. Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2011;208:1203-14
114. Wu B, Wang W, Zhan Y, et al. Inflammatory cytokine markers in primary and SLE-related autoimmune hemolytic anemia. *Journal of Translational Medicine* 2015;13:112.