

IFN- γ R1 (CD119) ve IL-12R β 1 (CD212) Eksikliğinin Akan Hücre Ölçer ile Analizi

Analysis of IFN- γ R1 (CD119) and IL-12R β 1 (CD212) Deficiency by Flow Cytometry

Metin Yusuf GELMEZ¹(ID), Kaya KÖKSALAN¹(ID), Suzan ÇINAR¹(ID), Nevin HATİPOĞLU²(ID), Taner COŞKUNER²(ID), Zeynep TOPKARCI³(ID), Selda HANÇERLİ TÖRÜN⁴(ID), Asuman DEMİRBUĞA⁴(ID), Esra YÜCEL⁴(ID), Ayça KIYKIM⁵(ID), Haluk Cezmi ÇOKUĞRAŞ⁵(ID), Hatice Betül GEMİCİ-KARAASLAN⁵(ID), Yasemin KENDİR-DEMİRKOL⁶(ID), Günnur DENİZ¹(ID)

¹ İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, İstanbul, Türkiye.

² Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul.

² University of Health Sciences, Dr. Sadi Konuk Research and Training Hospital, Department of Pediatrics, İstanbul, Türkiye.

³ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi, Dermatoloji Kliniği, İstanbul.

³ University of Health Sciences, Dr. Sadi Konuk Research and Training Hospital, Department of Dermatology, İstanbul, Türkiye.

⁴ İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ İstanbul University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, İstanbul, Türkiye.

⁵ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul.

⁵ İstanbul University-Cerrahpaşa, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, İstanbul, Türkiye.

⁶ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Genetik Bilim Dalı, İstanbul.

⁶ University of Health Sciences, Ümraniye Training and Research Hospital, Department of Pediatric Genetics, İstanbul, Türkiye.

*Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TOA-2020-35899).

Makale Atfı: Gelmez MY, Köksalan K, Çınar S, Hatipoğlu N, Coşkuner T, Topkarcı Z ve ark. IFN- γ R1 (CD119) ve IL-12R β 1 (CD212) eksikliğinin akan hücre ölçer ile analizi. Mikrobiyol Bul 2023;57(1):83-96.

ÖZ

Mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı mendeliyen duyarlılık (MSMD) nadir gözlenen primer immün yetersizlik (PİY) hastalığıdır. Günümüze kadar hastalarda 16'dan fazla genetik kusur tanımlanmış, en sık IL-12R β 1 eksikliği gözlenmiştir. PİY tanısında genetik testlerin yanı sıra immünolojik testler de önem kazanmaktadır. Bu çalışmada MSMD hastalarında, hasta yakınlarında ve sağlıklı bireylerde IFN- γ R1 ve IL-12R β 1 ekspresyonlarının belirlenmesi yoluyla, MSMD tanısında hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak akan hücre ölçer yönteminin yerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. MSMD tanısı alan ve genetik tanısı doğrulanmış, klinik olarak uyumlu altı hasta ve altı hasta yakını ile 20 sağlıklı birey olmak üzere toplam 32 gönüllüde akan hücre ölçer ile lenfosit IFN- γ R1 ve IL-12R β 1 ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Sağlıklı bireylerde IFN- γ R1 ve IL-12R β 1 ekspresyonlarının normal dağılımı belirlenmiştir. Sağlıklı bireylerden elde edilen dağılım eğrileri normal dağılım olarak kabul edildiğinde, üç hasta ve bir hasta yakınında IL-12R β 1 ekspresyon düzeyinin %1'in altında olduğu, STAT1 eksikliği tanısı alan hastanın IL-12R β 1 ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Sağlıklı bireyler ile kıyaslandığında bir hastada IFN- γ R1 ve IL-12R β 1 ekspresyon seviyelerinde herhangi bir farklılık gözlenmezken, bir hastada IFN- γ R1 ekspresyonunun azaldığı

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Günnur Deniz, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, Vakıf Gureba Cad, 34393, İstanbul, Türkiye.

Tel (Phone): +90 212 414 2000/33300, **E-posta (E-mail):** gdeniz@istanbul.edu.tr

gözlenmiştir. Bulgular, akan hücre ölçer ile IL-12R β 1 ve IFN- γ R1 eksikliklerinin belirlenmesinin MSMD tanısında hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Özellikle genetik tanı doğrulanmamış ve klinik olarak MSMD ile uyumlu hastalarda bu yöntemin tarama testi olarak kullanılması erken tanı konulmasına olanak sağlayabilecektir. Sağlıklı bireylerden elde edilen IL-12R β 1 ve IFN- γ R1 dağılım verisinin MSMD ile yapılacak rutin ve araştırma çalışmalarında referans olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı mendeliyen duyarlılık; MSMD; IL-12R β 1 eksikliği; IFN- γ R1 eksikliği; akan hücre ölçer.

ABSTRACT

Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) is a rare primary immune deficiency (PID). IL-12R β 1 deficiency is the most frequently observed of more than 16 genetic defects that have been identified for MSMD. Genetic and immunological tests are remarkable in the diagnosis of PID. In this study, it was aimed to determine the expression of IFN- γ R1 and IL-12R β 1 in patients with MSMD, their relatives, and healthy individuals and to evaluate the importance of flow cytometry as a fast and reliable method in the diagnosis of MSMD. IFN- γ R1 and IL-12R β 1 expression levels were analyzed in 32 volunteers including six patients, six relatives, and 20 healthy individuals. The normal range of IFN- γ R1 and IL-12R β 1 levels among healthy individuals were determined. IL-12R β 1 expression level in lymphocytes was found to be low in one patient's relative, and less than 1% in three patients and in one patient's relative. It was observed that the IL-12R β 1 expression levels of the patient with STAT1 deficiency were increased compared to the healthy individuals. No difference was found in the expression levels of IFN- γ R1 and IL-12R β 1 in one patient, but IFN- γ R1 expression was decreased in one patient compared to healthy individuals. Our results show that the determination of IL-12R β 1 and IFN- γ R1 deficiencies by flow cytometry can be used as a rapid and reliable method for the diagnosis of MSMD. The use of this method as a screening test will enable early diagnosis especially in patients whose genetic diagnosis has not been confirmed and clinically compatible with MSMD. In addition, it is thought that IL-12R β 1 and IFN- γ R1 range data obtained from healthy individuals will be considered as a reference source in routine and research studies to be conducted with MSMD.

Keywords: Mendelian susceptibility to mycobacterial disease; MSMD; IL-12R β 1 deficiency; IFN- γ R1 deficiency; flow cytometry.

GİRİŞ

İmmün sistemin gelişim ve fonksiyonunu etkileyen ve 350'den fazla genetik hastalığı içeren primer immün yetersizlik (PİY) hastalıklarının insidansı Avrupa'da 1/10 000-1/100 000 iken, akraba evliliğinin sık olduğu toplumlarda daha yüksek oranda gözlenmektedir^{1,2}. Akut, kronik ve/veya tekrarlayan enfeksiyonlar ile seyreden hastalıklar grubudur³. PİY hastalarının çoğu yaşamın ilk yıllarında tanı almakla birlikte, bazı hastalarda tanı konulması gecikmekte ve daha çok erişkinlikte geçirilen enfeksiyonlar veya otoimmün/lenfoproliferatif hastalıklara yönelik yapılan tetkikler sırasında konulmaktadır⁴. Bu durum PİY hastalarında kanser, hepatit, diyabet, otoimmün hastalıklar, kronik akciğer hastalıkları ve nörolojik bozuklukların ortaya çıkışını hızlandırmaktadır³.

Güncel çalışmalar, immün yetersizlik hastalarında mikobakteriyel hastalıklara yatkınlık olduğunu ve mendeliyen kalıtım gözlendiğini bildirmektedir^{5,6}. Mikobakteriyel hastalıklara mendeliyen yatkınlık (MSMD) nadir gözlenen PİY hastalıklarından biridir ve görülme sıklığı 1/50 000'dir^{7,8}. Günümüze kadar MSMD hastalarında *interferon- γ reseptör 1 (IFNGR1)*, *IFNGR2*, *sinyal dönüştürücü ve aktive edici transkripsiyon (STAT1)*, *interlökin-12 reseptör beta 1 (IL-12R β 1)*, *interferon regülatör faktör 8 (IRF8)*, *cytochrome β alt ünite beta (CYBB)* ve *NF-*

kappa-B essential modulator (NEMO) gibi çeşitli genlerde genetik kusurlar tanımlanmıştır^{5,9}. Hastalarda yaygın olarak IL-12Rβ1 (CD212) eksikliği gözlenmektedir¹⁰.

Dendritik hücre ve makrofajlardan sekrete edilen IL-12, CD4⁺ T hücrelerinin (Th) Th1 yönünde farklılaşmasını sağlarken, CD8⁺ T ve NK hücrelerinin sitotoksik kapasitelerini uyarıcı etki gösterir^{11,12}. Özellikle CD4⁺ T ve NK hücreleri tarafından sentezlenen IFN-γ, makrofajların uyarılması ve aktive edilmesi, antijen sunan hücrelerde MHC II ekspresyonunun arttırılması, nötrofillerin uyarılması gibi birçok immün reaksiyonda rol alır¹³. IFN-γ reseptörü tüm lökositlerde eksprese olurken, IL-12 reseptörü esas olarak CD3⁺ T ve NK hücrelerinde eksprese olmaktadır^{14,15}. STAT1, STAT transkripsiyon ailesinin bir üyesi olup, IFN-α, IFN-β, IL-6 ve IL-21 gibi çeşitli sitokinlerin uyarısı ile aktive olarak hücre içinde nitrik oksit (NO) sentaz ve birçok pro-enflamatuvar sitokinin aktive olmasını sağlar¹⁶. IFN-γ reseptör, IL-12 reseptör ve STAT1 geninde meydana gelen mutasyonların MSMD'ye neden olduğu bilinmektedir^{17,18}. Güncel çalışmalar IFN-γR1 ve IL-12Rβ1 eksikliklerinin akan hücre ölçer ile kanıtlanmasıyla MSMD tanısı konulabileceğini ve hastalara uygun tedavi seçiminde yol gösterici olabileceğini vurgulamaktadır^{7,19}.

PİY tanısında genetik testlerin yanı sıra immünolojik testlerin yeri gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Birinci basamak immünolojik değerlendirilmenin yapılması, hastaların erken dönemde PİY tanısı almasına yardımcı olmaktadır. Geniş monoklonal antikor çeşitliliği, hücre gruplarının detaylı ve çok yönlü olarak incelenebilmesi, hızlı sonuç alınabilmesi ve düşük maliyet gibi avantajlar immün fenotiplendirme ve immünolojik tarama testlerinde akan hücre ölçer kullanımının yaygınlaşmasını sağlamıştır. Bu çalışmada, MSMD tanılı hastalarda, birinci derecede yakınlarında ve sağlıklı bireylerde akan hücre ölçer ile lenfosit IFN-γR1 (CD119) ve IL-12Rβ1 (CD212) ekspresyon düzeyleri saptanarak MSMD tanısı için hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak akan hücre ölçerin öneminin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 12.01.2018 ve Karar no: 38). Katılan gönüllüler (reşit olmayan çocuklar için veli veya vasileri) bilgilendirilerek yazılı onamları alındı.

Hasta Grubu

Bu çalışmaya, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı Pediyatrik Enfeksiyon ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı polikliniklerinde takibi yapılan genetik tanısı doğrulanmış IL-12Rβ1 ve STAT1 eksikliği tanısı almış beş hasta ve beş hasta yakını, genetik tanısı olmayan klinik olarak MSMD ön tanılı bir hasta ve yakını ile ailesinde ya da kendisinde otoimmünite, kanser, PİY öyküsü olmayan, ilaç kullanmayan, numune alındığı sırada enfeksiyonu olmayan 20 sağlıklı birey olmak üzere toplam 32 gönüllü dahil edildi. IL-12Rβ1 ve STAT1 eksikliği tanısı almış hastalar süt çocukluğu döneminde BCG aşı bölgesinde kızarıklık, şişlik, aksiller lenfadenopati, oral kandidiyazis, *Salmonella* bakteriyemisi ile başvurmuşlardı (Tablo I).

Tablo 1. Hastalara Ait Demografik ve Klinik Veriler						
Hasta	Cinsiyet	Başvuru Yaşı (Ay)	Akraba Evliliği	Semptomlar	Etken	
					Mikroorganizmalar	Genetik inceleme
H1	Erkek	108	Yok	BCG lenfadenit ve döküntü	Deri biyopside: Tüberküloz basilleri	STAT1 geninde heterozigot c.1387C> G (p.Gln463Glu)
H1A (Anne)	Kız		Yok	Aseptomatik	Yok	STAT1 geninde heterozigot c.1387C> G (p.Gln463Glu)
H1B (Baba)	Erkek		Yok	Aseptomatik	Yok	STAT1 geninde heterozigot c.1387C> G (p.Gln463Glu)
H2	Erkek	5	Yok	BCG aşı bölgesinde kızanıklık, ısı artışı, şişlik ve sol aksiller lenfadenomegali	Lenf nodu eksizyonel biyopside <i>M.tuberculosis</i> kompleksi	TL2 NM_001318789.1 Ekzon 3 c.2258G> A p.Arg753Gln rs5743708
H3	Kız	24	1° kuzen	BCG lenfadenit, oral kandidiyazis	Lenf nodu eksizyonel biyopside: ARB pozitif, <i>M.tuberculosis</i> kompleksi pozitif, tiplendirme <i>M.bovis</i>	IL12RB1 geninde homozigot c.64+2T> G
H3A (Anne)	Kız	432	1° kuzen	14 yaş, uzamış öksürük, BCG aşılı, başka bulgu yok	-	IL12RB1 geninde homozigot c.64+2T> G
H4	Kız	13	1° kuzen	Sol aksiller lenfadenomegali, oral kandidiyazis	Lenf nodu eksizyonel biyopside; nekrotizan granülomatöz lenfadenit; BCG Bovis PCR pozitif.	IL12RB1 geninde R175W mutasyonu
H5	Erkek	8	1° kuzen	Sol aksillada lenfadenomegali batında ve mediastanda yaygın konglomere lenfadenomegali, hepatosplenomegali, lökositoklastik vaskülit	Lenf nodu eksizyonel biyopside <i>M.tuberculosis</i> kompleksi <i>Salmonella</i> spp. bakteriyemisi	19p13.11, IL12RB1 NM_005535.3, NP_005526.1
H6	Kız	144	Yok	Aseptomatik	Lenf nodu eksizyonel biyopside <i>M.tuberculosis</i> kompleksi	IFNGR1 geninde heterozigot c.523del

Akan Hücre ler ile IFN- γ R1 ve IL-12R β 1 Analizi

Olgulardan EDTA'lı tüp içine alınan 2 ml periferik kan örneklerinde IFN- γ R1 ve IL-12R β 1 ekspresyonları granülosit, monosit ve lenfosit (B, T ve NK hücrelerinde) gruplarında ayrı ayrı belirlendi. Hedef hücreler insana özgül fare kaynaklı anti-CD3 AlexaFlour700 (Klon: UCTH1), -CD19 PECY7 (Klon: SJ25C1), -CD119 (IFN- γ R1) PE (Klon: GIR-208), -CD212 (IL-12R β 1) APC (Klon: 2.4E6) ve -IgG1 izotip kontrol (Klon: MOPC) monoklonal antikorları kullanılarak tam kan lizis yöntemi ile işaretlendi. Tüm antikorlar BD-Biosciences, ABD firmasından temin edildi.

Periferik kan örnekleri (100 μ l veya 10^6 hücre/mL) zerine uygun miktarda monoklonal antikorlar eklenerek 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. Inkübasyon sonrası örnekler eritrositlerin parçalanması için 2 ml 'lysing' zeltisi (BD-Bioscience, ABD) eklenerek hücreler 1800 rpm'de beş dakika iki kez fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Örnekler 300 μ l PBS ilave edilerek NovoExpress (Agilent Tech., ABD) yazılımı kullanılarak NovoCyte (Agilent Tech., ABD) akan hücre ölçer cihazında analiz edildi. Tüm rneklerde SSC/FSC grafiğinde lenfosit kapısında 40 000 hücre sayıldı.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilere Graphpad Prism 5.0 programı yardımıyla parametrik olmayan testler (Kruskall-Wallis, Mann-Withney U) uygulandı. Anlamlı fark $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

IL-12R β 1 eksikliği tanısı almış ikisi erkek dört hasta (ortanca yaş 2, dağılımı 2-8 yıl), STAT1 eksikliği tanısı almış bir erkek hasta (9 yaş) olmak üzere beş hasta ve bu hastaların birinci derece ikisi erkek  kadın toplam beş yakını (ortanca yaş 36, dağılımı 13-40 yıl), genetik tanısı henüz doğrulanmamış klinik şüphesi olan bir kız hasta (13 yaş) ve annesi (36 yaş) ve 10'u erkek 20 sağlıklı birey (ortanca yaş 34.5, dağılımı 22-48 yıl) olmak üzere toplam 32 gönüllü dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik ve klinik zellikleri Tablo I'de verilmiştir. Sağlıklı kontrollerin lökosit (ortanca değer 7.32 10^3 /uL, dağılım 6.16-8.72) ve lenfosit (ortanca değer 2.29 10^3 /uL, dağılım 1.73-3.25) değerleri normal aralıkta saptanmıştır.

IFN- γ R1 (CD119) ve IL-12R β 1 (CD212) ekspresyonları total lenfosit, monosit, granülosit, CD3⁺ T lenfosit, CD19⁺ B lenfosit ve NK hücrelerinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Tüm örneklerde analiz sırasında öncelikle SSC/FSC grafiğinde lenfositler, monositler ve granülositler kapılanmıştır. Lenfositler içinde CD3/CD19 grafiğinde CD3⁺ T lenfositler ve CD19⁺ B lenfositler seçilmiş, CD3⁻CD19⁻ olan hücreler NK hücreleri olarak kabul edilmiştir.

Özellikle taşıyıcı ve de şüpheli olgularda IL-12R β 1 (CD212) ve IFN- γ R1 (CD119) eksikliğini belirleyebilmek için, sağlıklı bireylerde (n= 20) farklı hücre gruplarında CD119 ve CD212'nin ekspresyon seviyelerinin dağılımı belirlenmiştir (Tablo II). Lenfosit, monosit, granülosit, CD3⁺ T lenfosit, CD19⁺ B lenfosit ve NK hücrelerinde CD119 ve CD212 ekspresyonlarının [% ortanca (minimum-maksimum)] değerleri Tablo II'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo II. Sağlıklı Bireylerde (n= 20; Ortanca Yaş 34.5 Yıl, Dağılımı 22-48 Yıl) Farklı Hücree Popülasyonlarında IFN- γ R1 (CD119) ve IL-12R β 1 (CD212) Ekspresyon Dağılımları (Ort: Ortanca, min: Minimum, maks: Maksimum)

	IFN- γ R1 (CD119) %Ort (min-maks)	IL-12R β 1 (CD212) %Ort (min-maks)
Lenfosit	39.39 (22.42-46.52)	18.65 (14.61-26.13)
Monosit	93.49 (89.13-97.04)	4.33 (2.30-5.20)
Granülosit	98.79 (98-100)	2.66 (2.22-4.56)
CD3 ⁺ T	30.43 (19.29-47.48)	16.64 (11.00-25.53)
CD19 ⁺ B	85,58 (80.81-92.01)	0.36 (0.30-1.52)
NK	34.01 (16.77-55.57)	30.51 (20.33-45.28)

STAT1 eksikliği tanısı ile gelen hastanın (olgu H1) CD119 ve CD212 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde lenfosit, monosit, granülosit, T, B ve NK hücrelerinde CD119 ekspresyonunun sağlıklı bireylerden elde edilen normal dağılıma göre düşük olduğu gözlenirken, CD212 ekspresyonunun sağlıklı bireylerden elde edilen normal dağılıma göre yüksek olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, sağlıklı bireylerdeki CD119 ve CD212 ekspresyon dağılımı ile karşılaştırıldığında, hastanın B lenfositlerinde CD119 ekspresyonunun düşük; lenfosit, monosit, granülosit ve CD3⁺ T lenfositlerde CD212 ekspresyonunun ise yüksek olduğu bulunmuştur (Tablo III). Benzer şekilde hastanın anne ve babasından (olgular; H1A ve H1B) alınan örneklerde yapılan çalışmada CD119 ekspresyonunun B lenfositlerde normal dağılıma göre düşük, monosit ve granülositlerde CD212 ekspresyonu ise yüksek olarak değerlendirilmiştir (Tablo III).

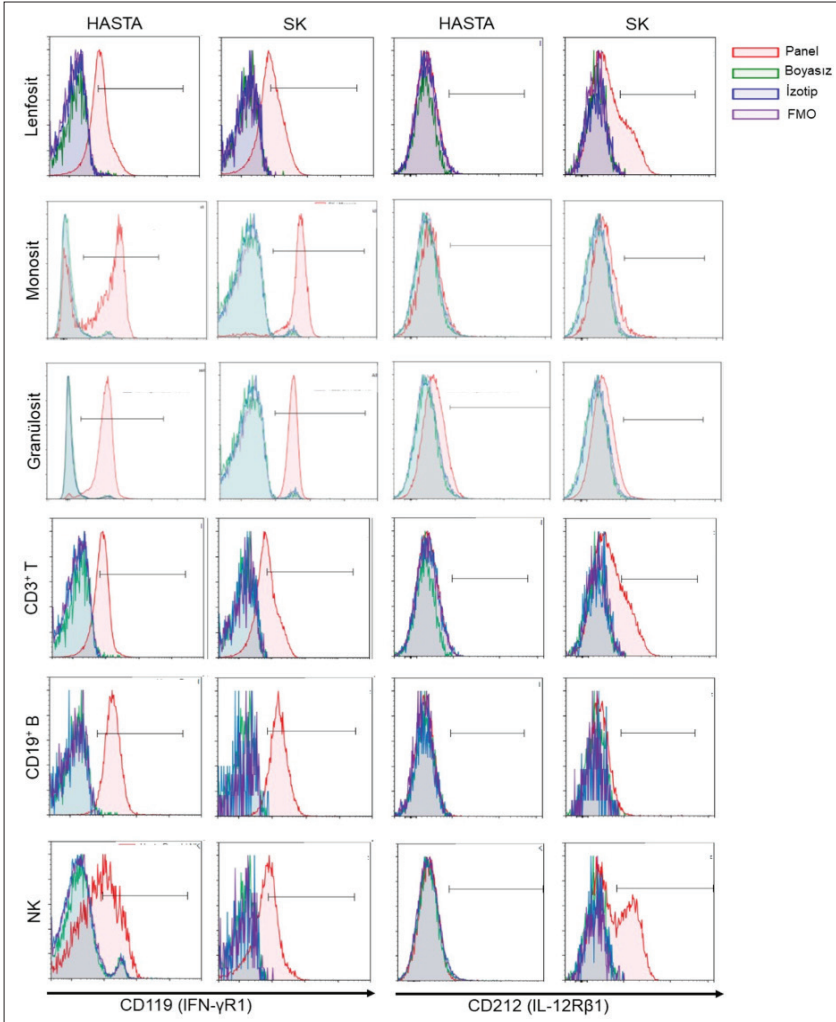
IL-12R β 1 (CD212) eksikliği ön tanısı almış olgu H2'de IL-12R β 1 (CD212) ekspresyon seviyesinin monosit ve granülositlerde normal dağılım içinde olduğu değerlendirilirken; lenfositlerde, T, B ve NK hücrelerinde normal dağılıma göre daha düşük eksprese edildiği saptanmıştır. Bu hastanın monosit ve granülosit CD119 ekspresyon seviyesinin normal dağılıma göre düşük; lenfosit, CD3⁺ T ve CD19⁺ B hücrelerinde ise yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo III). Benzer şekilde bu hastanın annesinde de (olgu H2A) monosit ve granülositlerde CD119 ekspresyonunun normal dağılıma göre düşük, CD212 ekspresyonunun monosit, granülositlerde yüksek, NK hücrelerinde ise düşük olduğu bulunmuştur (Tablo III).

IL-12R β 1 (CD212) eksikliği tanısı olan diğer üç hastada (olgular; H3, H4 ve H5) IL-12R β 1 (CD212) ekspresyon seviyesinin bütün hücre gruplarında normal dağılıma göre oldukça düşük olduğu saptanmıştır. İstatistiksel olarak hastalar ve sağlıklı bireyler arasında anlamlı bir fark olmamasına karşın, hasta lenfosit ve CD3⁺ T lenfosit CD119 ekspresyonlarının normal dağılımın üzerinde olduğu, monositlerde ise normal dağılımın altında olduğu bulunmuştur (Tablo III).

Tablo III. Hasta ve Yakınlarının Farklı Hücre Popülasyonlarında IFN- γ -R1 (CD119) ve IL-12R β 1 (CD212) Ekspresyon Düzeyleri

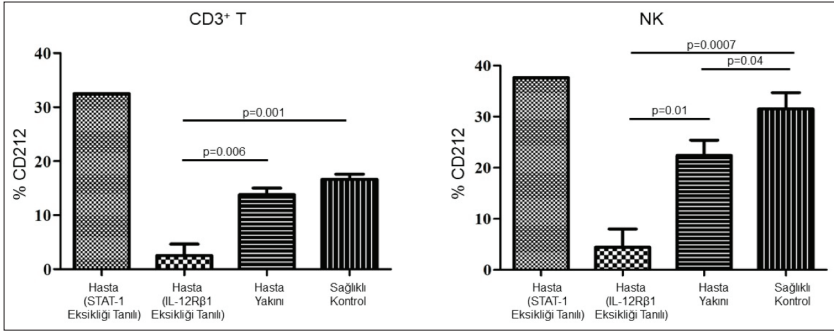
Hasta	Klinik	Lenfosit		Monosit		Granülosit		CD3 ⁺ T		CD19 ⁺ B		NK	
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
		IFN- γ -R1 (CD119)	IL-12R β 1 (CD212)	IFN- γ -R1 (CD119)	IL-12R β 1 (CD212)	IFN- γ -R1 (CD119)	IL-12R β 1 (CD212)	IFN- γ -R1 (CD119)	IL-12R β 1 (CD212)	IFN- γ -R1 (CD119)	IL-12R β 1 (CD212)	IFN- γ -R1 (CD119)	IL-12R β 1 (CD212)
H-1	STAT-1 Eksikliği	35.71	35.55	97.65	6.35	98.63	17.56	30.57	32.50	74.59	1.06	39.82	37.65
H-2	IL-12R β 1 Eksikliği	64.83	10.16	78.55	6.51	92.41	5.31	61.73	11.10	95.88	0.29	22.51	18.62
H-3	IL-12R β 1 Eksikliği	54.25	0.94	70.38	3.11	97.32	5.93	56.69	0.37	96.71	0.16	42.89	0.59
H-4	IL-12R β 1 Eksikliği	50.24	0.67	43.20	1.62	67.36	3.52	57.48	0.35	75.04	0.03	19.88	1.62
H-5	IL-12R β 1 Eksikliği	49.87	0.79	80.88	2.33	98.1	9.21	68.45	0.48	89.23	0.20	10.36	0.65
H-6	MSMD (IL-12R β 1 Eksikliği)	9.95	16.69	87.72	4.08	78.12	4.13	6.05	13.91	41.35	0.30	NA	22.55
H-1A	H-1 Anne	50.65	22.11	97.77	7.61	99.81	9.62	46.57	17.06	71.61	0.54	52.51	33.21
H-1B	H-1 Baba	30.87	17.07	95.57	6.86	98.40	12.09	19.91	15.08	68.77	0.37	34.85	20.75
H-2A	H-2 Anne	45.10	16.64	75.85	10.97	97.69	5.44	50.62	15.74	77.54	0.37	21.64	10.97
H-3A	H-3 Anne (MSMD)	36.60	0.58	86.04	2.01	98.8	3.92	34.70	0.25	80.12	0.10	26.50	0.68
H-3B	H-3 Baba	47.77	12.07	89.56	7.72	99.37	6.76	45.52	8.33	88.79	0.12	33.71	20.08
H-6A	H-6 Anne	9.35	16.8	75.60	4.82	75.38	5.54	8.750	12.51	39.00	0.16	NA	26.68

Sağlıklı bireylerden elde edilen normal dağılımlara göre düşük olan değerler açık gri, yüksek olan değerler koyu siyah olarak verilmiştir.



Şekil 1. Hasta (IFN- γ R1 eksikliği tanılı) ve sağlıklı kontrole ait örnek lenfosit, monosit, granülosit, CD3⁺ T, CD19⁺ B ve NK hücre popülasyonları içinde IFN- γ R1 (CD119) ve IL-12R β 1 (CD212) ekspresyon seviyelerini gösteren histogram görüntüleri (kırmızı grafik çalışma panel örneği, yeşil grafik boyasız örneği, mavi grafik izotip boyanan örneği, mor grafik FMO boyanan örneği göstermektedir).

Bununla birlikte genetik tanısı konulmamış IL-12R β 1 (CD212) eksikliği ön tanısı bildirilen H3'ün annesinde (olgu H3A) hastalarda olduğu gibi normal dağılıma göre düşük CD212 ekspresyonu tespit edilmiştir. Aynı hastanın babasının (olgu H3B) lenfosit, CD3⁺ T ve NK hücrelerinde CD212 seviyesinde normal dağılıma göre hafif bir azalma, buna karşın monosit ve granülositlerinde ise hafif bir artış gözlenmiştir. CD119 seviyesi ise normal olarak değerlendirilmiştir (Tablo III).



Şekil 2. Hasta, hasta yakını ve sağlıklı kontrollerin CD3⁺ T ve NK hücrelerinde IL-12Rβ1 (CD212) ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.

MSMD ön tanısı ile gelen olgu H6 ve annesinin (olgu H6A) CD212 ekspresyonlarının sağlıklı bireylerden elde edilen normal dağılım içinde olduğu gözlenirken, CD119 ekspresyon seviyelerinin normal dağılımın altında olduğu gözlenmiştir (Tablo III).

IL-12Rβ1 eksikliği olan hastalarda, CD119 ekspresyon düzeyleri hasta yakınlarında ve sağlıklı bireylerde karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). MSMD ön tanısı alan olgu H6 ve yakını (H6A) örneklem sayısının az olması nedeniyle CD119 ekspresyonu açısından sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmamıştır. CD212 ekspresyonları analiz edildiğinde, IL-12Rβ1 mutasyonu saptanan hastaların CD3⁺ T lenfosit ve NK hücrelerinde CD212 ekspresyonlarının sağlıklı kontrollere (sırasıyla, $p = 0.001$ ve $p = 0.006$) ve hasta yakınlarına (sırasıyla, $p = 0.0007$ ve $p = 0.001$) göre düşük olduğu saptanmıştır. Hasta yakınlarının CD3⁺ T lenfositlerinde CD212 ekspresyonu sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olmasına karşılık istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bununla birlikte, hasta yakınlarının NK hücre CD212 ekspresyon seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı gözlenmiştir ($p = 0.04$) (Şekil 2).

TARTIŞMA

PİY hastalıklarında aile hikayesinin ve klinik özelliklerin iyi değerlendirilmesi hastalığın erken tanısında oldukça önemli olmakla birlikte, immünolojik ve genetik tarama testleri hastalarda immün yetersizlik bulunup bulunmadığı ve hangi immün sistem komponentinin tutulmuş olabileceğinin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır^{20,21}. İmmünolojik ve genetik tanı testlerinin uygulanması ile hastaya hızlı ve doğru tanının konulması, tanıda gecikme oranlarının azaltılmasını mümkün kılarak, hastaların yaşam standartlarının erken dönemden itibaren artırılmasını, hastaya uygulanacak tedavi stratejisinin belirlenmesini, ikincil olarak gelişebilecek diğer hastalıkların önüne geçilmesini, enfeksiyonlardan korunmak için uygun aşının seçimi ve aşuların kontrendike olduğu durumları belirlemektedir^{20,22}. MSMD patogeneğinde birçok gende oluşan defektin etkili olduğu, en sık gözlenen defektlerin IL-12Rβ1 ve IFNGR1 gen bölgelerinde olduğu bildirilmektedir⁵.

Genetik tanı testlerinin güncel maliyetlerinin yüksek olması ve analiz sonuçlarının raporlanmasının daha uzun zaman alması gibi dezavantajlarına karşın, daha düşük maliyetli ve daha hızlı sonuçların alınabilmesine olanak sağlayan akan hücre ölçer uygulamaları PİY tanısında her geçen gün daha yaygın olarak kullanılmaktadır^{23,24}. Bu çalışmada MSMD tanısı almış hastalarda lenfosit, monosit, granülosit, CD3⁺ T, NK ve CD19⁺ B hücrelerinde IL-12R β 1 ve IFN- γ R1 ekspresyonları akan hücre ölçer ile değerlendirilerek, MSMD tanısında bu reseptörlerin eksikliklerinin gösterilmesinde akan hücre ölçer kullanımının önemi vurgulanmıştır.

MSMD'nin bazı alt tiplerinde otozomal resesif geçiş olması nedeniyle hasta yakınlarında taşıyıcılık söz konusudur. Literatürde bu kişilerde IL-12R β 1 ve IFN- γ R1 ekspresyon seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğu bildirilmektedir^{7,10}. Literatürde özellikle taşıyıcı bireylerde IL-12R β 1 ve IFN- γ R1 ekspresyonları için sağlıklı bireylerdeki % dağılımları belirlenmemiştir. Bu amaçla çalışmada öncelikle sağlıklı bireylerde farklı hücre popülasyonlarında IL-12R β 1 ve IFN- γ R1 düzeyleri tespit edilerek taşıyıcı ya da şüpheli olguların değerlendirilmesi için dağılım aralığı belirlenmiştir.

MSMD, virüsları görece düşük potansiyel patojen mikobakteriler ve Salmonel gibi intramakrofüjik patojenlere seçici bir yatkınlık ile karakterize, nadir görülen bir birincil immün yetersizliktir. İlk genetik bozukluk 1996 yılında tanımlanmıştır. Sekiz otozomal gende (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IL12B*, *IL12RB1*, *IRF8*, *TYK2* ve *ISG15*) ve X'e bağılı gende (*NEMO* ve *CYBB*) üç mutasyon tanımlanmıştır²⁵. Olguların *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve bir olguda *Salmonella* spp. üremesi başvuru anında saptanmış ve bu özellikleri ile MSMD tetkik edilerek tanı almışlardır.

IL-12, esas olarak T lenfositleri olmak üzere monosit ve granülositlerin uyarımını ve farklılaşmasını indüklemektedir²⁶. Güncel çalışmalar IL-12 ve IL-18 uyarımı ile monosit farklılaşmasının ve aktivasyonunun, monosit kaynaklı kemokin salınımının ve nötrofillerde de IL-8 gibi çeşitli sitokin salınımının arttığını bildirmektedir^{27,28}. IFN- γ R1 eksprese eden hücreler aynı zamanda IL-12R β 1 de eksprese etmektedir. IFN- γ R1'in uyarılması sonucu hücre içi STAT1 aktive olarak hedef genleri uyarmaktadır²⁹. STAT1'in fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar IFN- γ R1 yolağının bozulmasına da yol açmaktadır. STAT1 varyantlı hastada IL-12R β 1 ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum, hücrelerin STAT1 yolağından kaynaklanan fonksiyon kaybını tolere edebilmek için IL-12R β 1 ekspresyonlarını arttırarak bu yolağı daha fazla aktive etmeye çalıştığını düşündürmektedir. Bu bulgunun STAT1 eksikliği olan daha fazla sayıdaki hastada tekrar edilmesi ve fonksiyonel çalışmalar yapılarak desteklenmesi gerekmektedir.

IL-12R β 1 eksikliği (n= 6) genetik olarak gösterilmiş bir çalışmada, hastada PMA ile uyarılmış lenfositlerde IL-12R β 1 ekspresyon düzeyi %1'in altında, kontrol ve zorunlu taşıyıcı grubunda akan hücre ölçer sistemi ile %85 (%71-98) ve %47 (%18-75) olarak saptanmıştır. IL-12R β 1 eksprese eden lenfosit oranı homozigot IL-12R β 1 eksikliği olanlarda < %1, taşıyıcı bireylerde < %70 ve sağlıklılarda (n= 20) > %76 (ortalama %85, dağılım %71-98) şeklinde bildirilmiştir¹⁰. Çalışma grubumuzda da IL-12R β 1 eksikliği genetik ola-

rak kanıtlanmış dört olgudan üçünde (%75; H3, H4, H5) lenfositlerde (T, B ve NK alt gruplarında da) CD212 düzeyi %1'in altında saptanmıştır. IL-12Rβ1 eksikliği olan bir olgunun (H2) lenfosit ve alt gruplarında CD212 ekspresyonu diğer üç hastadan yüksek olsa da sağlıklı verilerine göre düşüktür. Tan ve arkadaşlarının¹⁰ sağlıklı bireylerden izole edilen periferik kan mononükleer hücreleri uyardıktan sonra elde ettikleri CD212 ekspresyon dağılımı ile karşılaştırıldığında, çalışmada lenfosit CD212 ekspresyon dağılımının daha düşük (%14.61-26.13) olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın çalışmada periferik kan örneklerinin uyarılmadan boyanarak analiz edilmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte uyarım basamağının olmaması prosedürün kolay uygulanmasını sağlamakta, maliyeti azaltmakta ve hücre kültürü ortamı ihtiyacını bertaraf etmektedir.

Çalışmada hem genetik hem de immünofenotipik olarak IL-12Rβ1 eksikliği gösterilen bir hastanın (H3) MSMD bulgusuna sahip annesinde (H3A) de lenfositlerde IL-12Rβ1 ekspresyonunun olmadığı, babasında (H3B) ise düşük düzeyde eksprese edildiği gözlenmiştir.

MSMD tanılı H6 kodlu hasta ve annesinde IFN-γR1 (CD119) ekspresyonu tüm hücre gruplarında normal dağılıma göre düşük, CD212 ekspresyonu ise benzer bulunmuştur. Bu olgularda IFN-γR1 eksikliği düşünülmüştür. Daha sonra yapılan genetik inceleme ile her iki olgunun *IFNGR1* geninde heterozigot delesyon olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, elde edilen sonucun akan hücre ölçer ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Elde edilen bulgular, şüpheli ve taşıyıcı olguların akan hücre ölçer ile hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilebileceğini göstermektedir.

Elde edilen bulgulara göre, akan hücre ölçerde bu reseptörlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirilirken en fazla eksprese oldukları hücre popülasyonu dikkate alınarak analiz yapılması daha objektif veri sağlayacaktır. Bu doğrultuda CD19⁺ B, NK, monosit ya da granüositlerde CD119 pozitifliğinin; CD212 ekspresyonunun ise lenfositler, CD3⁺ T ya da NK hücre topluluğunda değerlendirilmesinin uygun olduğu düşünülmektedir.

STAT1 eksikliği olan hastada IFN-γR1 ve IL-12Rβ1 ekspresyonu gözlenmiş, IL-12R eksikliği genetik olarak doğrulanmış olgularda immünofenotipik olarak IL-12Rβ1'in düşük bulunması, akan hücre ölçerin genetik testlere yönlendirme konusunda öncü test olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma, genetik olarak tanısı doğrulanmış MSMD hastalarında periferik kan mononükleer hücrelerin uyarımına gerek olmaksızın, tam kan boyama ile hızlı ve kolay uygulanabilir bir akan hücre ölçer yönteminin MSMD tanısında tarama amacıyla kullanılabileceğini gösteren bir ön çalışmadır. MSMD tanısında yüksek maliyetli bir yöntem olan yeni nesil dizileme (NGS) yöntemleri yerine öncelikle uyarılmamış hücrelerde ilgili reseptör ekspresyonlarının akan hücre ölçer ile taranması, bununla birlikte şüpheli durumlarda periferik kan mononükleer hücrelerin uyarılarak sitokin reseptörlerinin hücre yüzeyindeki artışının tekrar analizi de mümkündür. Nadir hastalık grubunda genetik tanısı konmuş MSMD hasta sayılarının az olması nedeniyle çalışmaya dahil edilen hastaların istatistiksel değerlendirmesinin güvenli olmayacağı görülmekle birlikte, bu yöntemin rutin laboratu-

varların iş yükünü azaltacağı ve uygulamanın yaygınlaştırılabileceği, böylelikle daha geniş topluluklarda tanısı konamayan MSMD hastalarına ulaşılabileceği ve özellikle reseptör eksikliğini hızlı bir şekilde açığa çıkaracağı düşünölmektedir.

Sonuç olarak, akan hücre ölçer ile IL-12R β 1 ve IFN- γ R1 eksikliklerinin belirlenmesi MSMD tanısında hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Özellikle genetik tanısı doğrulanmamış ve klinik olarak MSMD ile uyumlu hastalarda tarama testi olarak kullanılması erken tanı konulmasına olanak sağlayabilir. Bununla birlikte sağlıklı bireylerden elde edilen IL-12R β 1 ve IFN- γ R1 dağılım verisinin MSMD ile yapılacak rutin ve araştırma çalışmalarında referans bir kaynak olarak değerlendirileceği düşünölmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu proje, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje No: TOA-2020-35899).

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 12.01.2018, Sayı: 38).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Al-Herz W, Ailal F, Chatila T, et al. Human inborn errors of immunity: 2019 update of the IUIS phenotypical classification. *J Clin Immunol* 2020; 40(1): 66-81. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00758-x>
2. Sanal O, Tezcan I. Thirty years of primary immunodeficiencies in Turkey. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1238: 15-23. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06242.x>
3. Notarangelo LD, Bacchetta R, Casanova JL, Su HC. Human inborn errors of immunity: An expanding universe. *Sci Immunol* 2020; 5(49). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abb1662>
4. Lindegren ML, Kobrynski L, Rasmussen SA, Moore CA, Grosse SD, Vanderford ML, et al. Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: A potential approach to genetic disorders. *MMWR Recomm Rep* 2004; 53(RR-1): 1-29.
5. Bustamante J. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Recent discoveries. *Hum Genet* 2020; 139(6-7): 993-1000. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02120-y>
6. van Coller A, Glanzmann B, Cornelissen H, Moller M, Kinnear C, Esser M, et al. Phenotypic and immune functional profiling of patients with suspected mendelian susceptibility to mycobacterial disease in South Africa. *BMC Immunol* 2021; 22(1): 62. <https://doi.org/10.1186/s12865-021-00452-6>
7. Ying W, Liu D, Dong X, Wang W, Hui X, Hou J, et al. Current status of the management of mendelian susceptibility to mycobacterial disease in mainland China. *J Clin Immunol* 2019; 39(6): 600-10. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00672-x>
8. Taur PD, Gowri V, Pandrowala AA, Iyengar VV, Chougule A, Golwala Z, et al. Clinical and molecular findings in mendelian susceptibility to mycobacterial diseases: Experience from India. *Front Immunol* 2021; 12: 631298. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631298>

9. Mahdavian SA, Mansouri D, Jamee M, Zaki-Dizaji M, Aghdam KR, Mortaz E, et al. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD): Clinical and genetic features of 32 Iranian patients. *J Clin Immunol* 2020; 40(6): 872-82. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00813-7>
10. Tan ÇS, Ayvaz DÇ, Tezcan I, Sanal O. Akım sitometri ile IL-12Rß1 ekspresyon analizinin IL-12Rß1 eksikliğinin tanısındaki rolü. *Turk J of Immunol* 2013; 1(1): 1-4. <https://doi.org/10.5606/tji.2013.160>
11. Mahmoudzadeh S, Nozad Charoudeh H, Marques CS, Bahadory S, Ahmadpour E. The role of IL-12 in stimulating NK cells against *Toxoplasma gondii* infection: A mini-review. *Parasitol Res* 2021; 120(7): 2303-9. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07204-w>
12. Robert M, Miossec P. Reactivation of latent tuberculosis with TNF inhibitors: Critical role of the beta 2 chain of the IL-12 receptor. *Cell Mol Immunol* 2021; 18(7): 1644-51. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00694-9>
13. Gocher AM, Workman CJ, Vignali DAA. Interferon-gamma: Teammate or opponent in the tumour microenvironment? *Nat Rev Immunol* 2022; 22(3): 158-72. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00566-3>
14. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN-gamma in tumor progression and regression: A review. *Biomark Res* 2020; 8: 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
15. Bastian D, Wu Y, Betts BC, Yu XZ. The IL-12 Cytokine and receptor family in graft-vs.-host disease. *Front Immunol* 2019; 10: 988. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00988>
16. Goswami R, Kaplan MH. STAT transcription factors in T cell control of health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 2017; 331: 123-80. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.09.012>
17. Ghanavi J, Farnia P, Farnia P, Velayati AA. The role of interferon-gamma and interferon-gamma receptor in tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. *Int J Mycobacteriol* 2021; 10(4): 349-57. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_186_21
18. Mogensen TH. IRF and STAT transcription factors - from basic biology to roles in infection, protective immunity, and primary immunodeficiencies. *Front Immunol* 2018; 9: 3047. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03047>
19. Bhattad S. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: A clinical and laboratory approach. *Pediatric Infectious Disease* 2019; 1(1): 34-6. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10081-1108>
20. Locke BA, Dasu T, Verbsky JW. Laboratory diagnosis of primary immunodeficiencies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014; 46(2): 154-68. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8412-4>
21. Raje N, Dinakar C. Overview of immunodeficiency disorders. *Immunol Allergy Clin North Am* 2015; 35(4): 599-623. <https://doi.org/10.1016/j.iaac.2015.07.001>
22. McCusker C, Upton J, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2018; 14(Suppl 2): 61. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0290-5>
23. Kanegane H, Hoshino A, Okano T, Yasumi T, Wada T, Takada H, et al. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergol Int* 2018; 67(1): 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.06.003>
24. Fleisher TA, Madkaikar M, Rosenzweig SD. Application of flow cytometry in the evaluation of primary immunodeficiencies. *Indian J Pediatr* 2016; 83(5): 444-9. <https://doi.org/10.1007/s12098-015-2011-0>
25. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-gamma immunity. *Semin Immunol* 2014; 26(6): 454-70. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.008>
26. Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8(1): 40-52. <https://doi.org/10.2174/187152809787582507>
27. Coma G, Pena R, Blanco J, Rosell A, Borrás FE, Este JA, et al. Treatment of monocytes with interleukin (IL)-12 plus IL-18 stimulates survival, differentiation and the production of CXC chemokine ligands (CXCL)8, CXCL9 and CXCL10. *Clin Exp Immunol* 2006; 145(3): 535-44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03145.x>

28. Ethuin F, Delarche C, Benslama S, Gougerot-Pocidallo MA, Jacob L, Chollet-Martin S. Interleukin-12 increases interleukin 8 production and release by human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol* 2001; 70(3): 439-46. <https://doi.org/10.1189/jlb.70.3.439>
29. Vargas-Hernandez A, Mace EM, Zimmerman O, Zerbe CS, Freeman AF, Rosenzweig S, et al. Ruxolitinib partially reverses functional natural killer cell deficiency in patients with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141(6): 2142-55 e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.040>