

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK GRANULOMATOZ HASTALIK VE ALT
GRUPLARININ TANISINDA
DHR 123 TESTİ VE ANTI-NADPH OKSİDAZ
KOMPONENT ANTIKORLARLA AKIM SİTOMETRİK
ANALİZİN YERİ

Dr. M. Yavuz KÖKER

İmmünoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2006

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK GRANULOMATOZ HASTALIK VE ALT
GRUPLARININ TANISINDA
DHR 123 TESTİ VE ANTI-NADPH OKSİDAZ
KOMPONENT ANTİKORLARLA AKIM SİTOMETRİK
ANALİZİN YERİ

Dr. M. Yavuz KÖKER

İmmünoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof Dr Özden SANAL

ANKARA
2006

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından İmmünoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Fügen Ersoy
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Özden Sanal
Hacettepe Üniversitesi

ÜYE: Prof. Dr. İlhan Tezcan
Hacettepe Üniversitesi

ÜYE: Prof. Dr. Cemalettin Aybay
Gazi Üniversitesi

ÜYE: Doç. Dr. Leman Yel
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

İmmünoloji alanında doktora öğrenimine beni yönlendiren immünoloji bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Fügen Ersoy'a, bu projeyi hazırlarken bana her konuda destek olan, eğiten ve yönlendiren Prof. Dr. Özden Sanal'a, immünoloji alanında birikimlerinden yararlandığım Prof. Dr. İlhan Tezcan'a, hasta takibinde katkılarından dolayı Doç. Dr. Ayşe Metin'e ve Uzm. Dr. Tuba Turul'a, laboratuvar çalışmalarında katkılarından dolayı Uzm. Bio. Çağman Tan, Bio. Semra Gariboğlu, Lütfiye Mesci, Baran Erman ve Tekniker Semra Ülger'e ayrıca flowsitometri çalışmalarında katkılarından dolayı Kimyager Hürriyet Gürsel Yetkin ve Tekniker Selma Şar'a ve immünoloji bölümünün bütün çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışmamın sekans analizi kısmını Hollanda'da Amsterdam Üniversitesi / Sanquin Araştırma Laboratuvarında birlikte yapmamı sağlayan Prof. Dr. Dirk Roos'a ve sekans çalışmalarında bana yardımcı olan Martin De Boer'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 0202101040.

ÖZET

Kronik granulomatoz hastalık (KGH) NADPH oksidaz enzim yapısını oluşturan X kromozomunda *CYBB*, ve otozomal *CYBA*, *NCF1* ve *NCF2* genleri tarafından kodlanan, dört oksidaz proteininden (sırası ile gp91, p22, p47, p67) birisinin eksikliği sonucu bazı bakteri ve mantarların öldürülememesi ile karakterize nadir görülen bir immün yetmezlik hastalığıdır. Bu çalışmada, DHR 123 testi ve anti-NADPH oksidaz komponent antikorları ile akım sitometrik değerlendirmenin KGH tanısı ve KGH alt grup ayırımındaki yerini değerlendirmek üzere, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi İmmünoloji Ünitesinde KGH tanısı alan 23 hasta (19 aile), 53 aile bireyi ve 18 sağlıklı kontrol çalışıldı. Ayrıca, 9 hastada sekans analizi ile araştırılarak ilgili mutasyon belirlendi.

DHR 123 testi ile 19 ailenin 5'inde (%26.3) X-linked, 12'sinde (%63.6) ise otozomal (p22, p47 veya p67) KGH, 9 aile bireyinde (5 aile) X-linked taşıyıcılık bulundu. Hastaların 7'sinde (6 aile) ön planda p47 defekti düşünüldü. Böylece literatürdeki bilgilerden farklı olarak ülkemizde akraba evliliklerinin yüksek olmasına bağlı olarak otozomal resesif formun diğer immün yetmezliklerde olduğu gibi daha sık olduğu saptandı. DHR 123 testi verileri özgün antikorlarla alt grup analiz sonuçları ile birleştirilerek alt grup değerlendirmesi yapıldığında hastalardan 8'inde gp91 (5 aile), 7'sinde p47 (6 aile), 2'sinde p22 ve 1'inde p67 defekti düşünüldü. Hastaların 3'ünde p22, p67 ve 2'sinde (%10.1) ise gp91, p22 defekti (X-linked, otozomal) ayırımı yapılamadı. Elde edilen sonuçlar mutasyon analizi yapılabilen 9 hastanın sonuçları ile karşılaştırıldı. Sekans analizi ile hastalardan 4'ünde (2 aile) gp91 ve 5'inde (4 aile) p47 defekti olduğu gösterildi. Bu sonuçlar DHR 123 ve antikorlarla yapılan test sonuçları ile uyumlu bulundu.

Sonuç olarak, DHR123 ve anti-NADPH oksidaz komponent antikorları ile alt grup çalışmalarının KGH tanısı, alt grup ayırımı, özellikle de gp91 ve p47 defektlerinin ayırımında büyük ölçüde bilgi verdiği belirlenmiştir. Bunların yanında X-linked taşıyıcılarda normal nötrofil yüzdesinin ileri yaşlarda azaldığı buna karşılık aktivitelerinin arttığı yönünde bulgular elde edilmiştir.

Anahtar kelime: Kronik granulomatoz hastalık, gp91, p22, p47, p67, DHR 123

ABSTRACT

Chronic granulomatous disease (CGD) is a rare inherited disorder characterized by susceptibility to severe bacterial and fungal infections. A defect in any one of the four components of the NADPH oxidase, gp91, p22, p47 or p67, encoded by the X-linked *CYBB* gene and the autosomal *CYBA*, *NCF1* and *NCF2* genes, respectively, abolishes the activity of the oxidase.

In this study, 23 patients with CGD diagnosed in Immunology Division of Hacettepe University Children's Hospital and 53 family members (from 19 families) and 18 control samples were evaluated by DHR 123 and anti-NADPH oxidase antibodies to determine the significance of these methods in the diagnosis of CGD and its sub-groups. Additionally sequence analysis were performed in 9 patients.

DHR 123 test results showed that five of 19 families (26.3%) had X-linked and 12 (63.6%) had autosomal form of CGD. Nine family members from 5 families were X-linked carriers. Results were consistent with p47 defect in 7 patients from 6 families. As in other autosomal recessive (AR) disorders, the majority of our patients had AR form of CGD in contrast to the predominance of X-linked form in the literature, which probably is due to high frequency of consanguineous marriages in our country. When DHR 123 test and sub group analysis by specific antibodies were evaluated together, 8 patients (5 family) were diagnosed as having gp91 defect, 7 as p47 (6 family), two as p22 and one as p67 defect. In three patients differentiations between p22 and p67 and in 2 patients between gp91 and p22 (autosomal, X-linked) could not be made by these tests. Sequence analysis showed that four patients had a gp91 and five had a p47 defect. Mutation analysis confirmed the results obtained by DHR 123 and by specific antibodies.

In conclusion, DHR 123 test and flow cytometric evaluation by anti-NADPH oxidase antibodies are highly successful in the diagnosis of CGD and sub group detection, particularly for gp91 and p47 defects. Additionally, our findings have shown that the percentage of normal neutrophils of X-linked carriers decreases with age while their activity tends to increase.

Key words: Chronic granulomatous disease, gp91, p22, p47, p67, DHR 123

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	12
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1. Kronik Granulomatoz Hastalık (KGH)	13
2.1.1 KGH Tarihçesi	13
2.1.2 Fagositik Hücreler	14
2.1.3 Fagosit NADPH Oksidaz Enzimi	16
2.1.3.1 NADPH Oksidaz Kompleksinin Yapısı	18
2.1.3.2 NADPH Oksidazın Aktivasyon	20
2.1.3.3 NADPH Oksidazın Regülasyonu	21
2.1.3.4 NADPH Oksidazın Fonksiyonu	23
2.1.3.5 NADPH Oksidazda Moleküler Patoloji ve Mutasyonlar	26
2.1.4 Klinik Görünüm	29
2.1.5 Kronik Granulomatoz Hastalığın Tanı Yöntemleri	30
2.1.5.1 Fonksiyonel Analiz Yöntemleri	30
2.1.5.2 Özgün Antikorlar ile Protein Düzeyinde Analiz Yöntemleri	31
2.1.5.3 Moleküler Düzeyde Analiz Yöntemleri	32
2.1.5.4 Ayırıcı Tanı	34
2.1.6 Klinik Tedavi	35
2.1.6.1 Genel Kurallar	35
2.1.6.2 Enfeksiyonlara Yönelik Profilaksi (Korunma)	35
2.1.6.3 Tedavi	35

2.1.7 KGH Taşıyıcıları ve Liyonzasyon Sapması	38
3. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER	41
3.1 Aletler (Teçhizat)	41
3.2 Kimyasal Maddeler ve Kitler	41
3.3 Yöntemler	42
3.3.1. NBT Testi	42
3.3.2. DHR 123 Testi ile KGH Hastalarının Tanısı	43
3.3.3. Anti-human NADPH Oksidaz Komponent Antikorları Kullanılarak Membran ve Sitoplazmik Antijenlerin Boyanması ile KGH Alt Gruplarının Akım Sitometrede (FACScan) Belirlenmesi	46
3.3.4. KGH Hastalarda Sekans Analizi ile Mutasyonun Belirlenmesi	47
3.4. İstatistik	53
4. BULGULAR	54
4.1. DHR 123 Testinin Optimizasyonu	54
4.2. Kontrol Grubunda DHR 123 Test Sonuçları	56
4.3. Hasta ve Yakınlarında DHR 123 Test Sonuçları	57
4.4. DHR 123 Test Değerlerine Göre X-linked ve Otozomal Resesif KGH Ayrımının Yapılması	59
4.5. X-Linked gp91 Defekti Olan Ailelerde Taşıyıcılık ve Normal Nötrofil Düzeyinin Yaş ve Her Bir Normal Nötrofil için SI_1 ile İlişkisi	61
4.6. Otozomal Resesif KGH Düşünülen Hastaların Aile Bireylerinde DHR 123 Test Sonuçları	66
4.7. Özgün Antikorlar (anti-gp91, p22, p47, p67) ile KGH Alt Gruplarının Belirlenmesi	68
4.8. Sekans Analizi ile Genomik DNA' da Mutasyon Taraması	72
4.9. Tüm Sonuçların Birlikte Değerlendirilmesi	77
5.TARTIŞMA	80
SONUÇ VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	91
EK1	
EK2	

KISALTMALAR

KİT	Kemik İliği Transplantasyonu
cDNA	Komplementer DNA
CYBA	Sitokrom <i>b</i> α -subunit
CYBB	Sitokrom <i>b</i> β -subunit
DNA	Deoksi ribonükleik asit
dNTP	Deoksi nükleotid tri fosfat
DHR 123	1,2,3 dihydrorhodamine
EtBr-	Etidyum bromür
FITC	Floresan izotiosiyanat, Fluorescein isothiocyanate
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GAM	Goat-Anti Mouse
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IFN- γ	İnterferon gamma
MoAb	Monoklonal antikor
mRNA	Kalıp ribonükleik asit, Messenger RNA
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NBT	Nitroblue tetrazolyum
NO	Nitrik oksit
NCF1	Neutrophil cytosolic factor-1, nötrofil sitozolik faktör 1
NCF2	Neutrophil cytosolic factor-2, nötrofil sitozolik faktör 2
NO ₂ Cl	Nitril klorür, Nitryl chloride
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu, Polymerase chain reaction
PBS	Fosfat ile tamponlanmış tuzlu su çözeltisi, Phosphate buffered saline
ROS	Reaktif oksijen ürünü
SOD	Süperoksit dismutaz
O ₂ ⁻	Süperoksit anyon
UV	Ultraviyole ışığı
TAE	Tris asetat EDTA
Δ GT	GT delesyonu

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1.2.1. Reaktif Oksijen Ürünleri Sentez Aşamaları	17
Şekil 2.1.3.1. ROS Sentezinde Kimyasal Reaksiyonlar ve Enzimler	18
Şekil 2.1.3.1.1. NADPH Oksidazın Kompleksinin Oluşumu	21
Şekil 2.1.3.2.1. NADPH Oksidaz Enziminin Aktivasyonu	22
Şekil 2.1.3.4.1 NADPH Oksidazın Fagosom İçindeki Fonksiyonları	25
Şekil 2.1.3.5.1 KGH ın X91 ⁺ ve A22 ⁺ fenotiplerine yol açan Mutasyonlar	29
Şekil 2.1.5.1.1. Stimülasyon İndeksini Tanımlayan Formül	32
Şekil 2.1.7.1. KGH'da DHR 123 Histogram Görünümü	40
Şekil 2.1.7.2. X-inaktivasyonuna Bağlı Klonal Seçim	41
Şekil 3.3.2.1. DHR 123 Testinde Standart Histogram Örnekleri	46
Şekil 4.4.1. Hastaların Kalıtsal Özelliğine ve Cinsiyete Göre Dağılımı	61
Şekil 4.4.2. Hastaların Ebeveyn Akrabalık Durumuna Göre Dağılımı	61
Şekil 4.5.1. X-linked Taşıyıcılarda Normal Nötrofil Düzeyleri	63
Şekil 4.5.2. X-linked Ailelerde DHR 123 Histogram Görüntüleri	64
Şekil 4.5.3. X-linked Taşıyıcılarda Normal Nötrofil Düzeyleri ve Yaş İlişkisi	65
Şekil 4.5.4. X-linked Taşıyıcılarda Nötrofil Düzeyi ve SI ₁ İlişkisi	66
Şekil 4.6.1. Otozomal Hastalarda DHR 123 Histogram Görüntüleri	67
Şekil 4.8.1. Aile1 Soy Ağacı	72
Şekil 4.8.2. Aile1 <i>CYBB</i> gen Sekans Elektroferogramı	73
Şekil 4.8.3. <i>NCF1</i> gen Sekans Elektroferogramı	75
Şekil 4.8.4. <i>CYBB</i> geninde Mutasyon Noktaları	75
Şekil 4.8.5. <i>NCF1</i> geninde Mutasyon Noktaları	76
Şekil 4.9.1. KGH Tanısı Alan Hastaların Alt Gruplara Göre Dağılımı	77
Şekil 4.9.2. KGH Hastalarında Alt Gruplar ve SI Değerleri	79
Şekil 5.1. SI Değerlerine göre Kız Hastalarda KGH Alt Grup Ayırımı	83
Şekil 5.2. SI Değerlerine göre Erkek Hastalarda KGH Alt Grup Ayırımı	84

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1.3.1.1 NADPH Oksidaz Komponentleri ve Moleküler Özellikleri	18
Tablo 3.3.4.1 <i>CYBB</i> , Ekson Spesifik PCR Mastır Solüsyonunun İçeriği	48
Tablo 3.3.4.2 <i>CYBB</i> , Ekson Spesifik PCR için Primer Kombinasyonları	48
Tablo 3.3.4.3 <i>CYBA</i> , Ekson Spesifik PCR için Primer Kombinasyonları	49
Tablo 3.3.4.4 Kapiller PCR için İnkübasyon Şartları, <i>CYBB</i> Geni	49
Tablo 3.3.4.5 Dye-Primer için Liner PCR İnkübasyon Şartları	51
Tablo 3.3.4.6 Dye-Terminatör için Liner PCR İnkübasyon Şartları	52
Tablo 3.3.4.7 DyePrimer ve Terminatör için <i>BaseCaller</i> ve Primer Listesi	53
Tablo 4.2.1. Kontrol Grubu ve DHR 123 Değerleri	56
Tablo 4.3.1. Hastaların DHR 123 ve NBT Değerleri	58
Tablo 4.5.1. X-linked Hasta Yakınlarının DHR 123 Değerleri	62
Tablo 4.5.2. X-linked Taşıyıcılarda Normal Nötrofil Düzeyleri, SI ve SI ₁	64
Tablo 4.6.1. Otozomal KGH Düşünülen Ailelerde DHR 123 Değerleri	67
Tablo 4.7.1. Anti-NADPH Oksidaz Komponent Antikorlar ile KGH Alt Gruplarının Belirlenmesi	68
Tablo 4.7.2. DHR 123 testi, anti-NADPH Oksidaz Antikor ile Alt Grup Analizi ve Cinsiyete Göre KGH Alt Grup Sınıflandırılması	71
Tablo 4.8.1. KGH Tanısı Alan Hastaların Sekans Analizi Sonuçları	73
Tablo 4.9.1. Tüm Sonuçlar, Alt Grup Ayırımını Belirleyen ve Destekleyen Parametreler	78

GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik granulomatoz hastalık (KGH) primer immün yetmezlikler grubunda yer alan ve fagositik hücrelerin bazı bakteri ve mantarları fagosite ettikten sonra öldürememesi ile karakterize bir hastalıktır. KGH da fagosit nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzim yapısını oluşturan oksidaz proteinlerinden (gp91, p22, p47, p67) birinin eksikliği nedeni ile oksijen radikallerinin öncüsü olan süperoksit üretilemez. En sık görülen ve *CYBB* genindeki defekt sonucu oluşan X-linked formda, NADPH oksidazın en büyük bileşeni olan gp91 ünitesi eksiktir. KGH ın diğer üç formu otozomal orijinli genlerdeki (*CYBA*, *NCF1*, *NCF2*) defekt sonucu ortaya çıkar.

KGH tanısında uzun yıllardır kullanılan “*Nitroblue tetrazolium*” (NBT) testine ek olarak dihydrorhodamine 123 (DHR 123) testi de kullanılmaya başlanmıştır. DHR 123 testi akım sitometre ile değerlendirilmekte ve NBT testine göre daha hassas ve doğru sonuç elde edilebilmektedir. DHR 123 testi ile KGH’ın tanısı, X-linked formda aile bireylerinde taşıyıcılık analizi yapılabildiği gibi, özellikle annenin taşıyıcı olduğu durumlarda X-linked ile otozomal formun (p47) ayırımı da yapılabilmektedir.

KGH tanısı konulan hastalarda anti-NADPH oksidaz komponent antikolar kullanılarak akım sitometrede alt grup tayini yapılabileceği belirtilmektedir. Ancak, bu yöntemin alt grup tayinindeki yerini belirleyecek yeterli çalışma mevcut değildir.

Bu çalışmanın amacı, akım sitometre ile DHR 123 testinin; KGH tanısı, X-linked formda taşıyıcılığın belirlenmesi, otozomal veya X-linked KGH ayırımı, anti-NADPH oksidaz komponent antikolar ile beraber alt grup belirlenmesindeki yeri ve bulguların bazı hastalarda mutasyon analizi sonuçları ile de karşılaştırılması; bunun yanında X-linked taşıyıcılarda sağlıklı nötrofil yüzdesinin yaşla değişip değişmediğinin belirlenmesidir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Granulomatoz Hastalık (KGH)

Kronik granulomatoz hastalık fagositik hücrelerin bazı bakteri ve mantarları fagosite ettikten sonra öldürememesi ile karakterize kalıtsal bir primer immün yetmezlik hastalığıdır. Hastalık lökosit NADPH oksidaz enzim eksikliğinden kaynaklanır ve mikroorganizmaları öldürücü reaktif oksijen ürünleri "*reactive oxygen species*" (ROS) yeterince sentezlenemez. Bununla beraber, KGH'lı hastalarda sınırlı bir grup mikroorganizma ile oluşan enfeksiyonlara karşı duyarlılıkta artış vardır. Katalaz pozitif olan ve hidrojen peroksit benzeri ROS sentezlemeyen bakteri ve mantarlar ciddi enfeksiyonlar oluşturur. Ayrıca nadir olarak katalaz negatif olup minimal düzeyde dahi hidrojen peroksit üretmeyen mikroorganizmalar da enfeksiyona yol açabilirler. Enfeksiyonlara duyarlılıkta artış ile beraber bu hastalarda inflamatuvar ve romatizmal hastalıklara (inflamatuvar bağırsak hastalığı ve SLE gibi) eğilim vardır (1, 2) .

2.1.1. KGH Tarihçesi

KGH ilk olarak Good ve arkadaşları tarafından 1957 de çocukların fatal granulomatoz hastalığı "*fatal granulomatous disease of children*" olarak isimlendirilmiş ve diğer granulomatoz hastalıklarla (Wegener, bruselloz, tularemi, kedi tırmağı hastalığı "*cat scratch disease*", sarkoidoz) olan benzerlikleri belirtilmiştir (3, 4). Bu hastalıklardan farklı olarak, hastalarda tekrarlayan süpüratif enfeksiyonların olduğu ve çocukluk döneminde inflamatuvar komplikasyonlar olduğu gözlenmiş, granuloamların genellikle karaciğer, akciğer, dalak, beyin ve lenf nodlarında bulunduğu belirlenmiştir. KGH, ilk önce sadece erkeklerde teşhis edilebilmişken daha sonra hastalığın X-linked formu yanında otozomal formunun da olduğu ve kız çocuklarda da görülebildiği anlaşılmıştır. KGH'ın fagositlerin hastalığı olduğu 1960 lı yıllarda düşünülmüştür. Hastalarda nötrofillerin *in-vitro* şartlarda fagositik aktivitelerinin normal ancak *Staph. aureus* a karşı bakterisidal aktivitenin bozuk olduğu saptanmıştır (5-7). KGH'lı hastaların nötrofillerinde lateks partikülü fagositozundan sonra hidrojen peroksit yapımının ve oksijen

tüketiminin artmadığı gösterilmiştir (5). KGH teşhisi, klinik hikâye ve solunum patlamasının (*respiratory burst*) gerçekleşemediğinin gösterilmesi ile konulmaktadır. Reaktif oksijen ürünlerinin sentezlendiğinin gösterilmesinde birkaç farklı yöntem vardır. Nitroblue tetrazolium testinde süperoksit anyonu tarafından redükte edilen “*nitroblue tetrazolium*” hücrelerin granüllerinin maviye boyanmasına (*blue formazan precipitate*) yol açar ve bu değişim ışık mikroskobu ile belirlenir. DHR–123 yöntemi ile nötrofil fonksiyonu daha duyarlı olarak akım sitometrede ölçülebilir. NADPH oksidazın bileşenleri ve genleri tanımlanmış olup sekans analizi ile hangi molekülde mutasyon olduğu saptanabilmektedir.

2.1.2. Fagositik Hücreler

Nötrofiller dört yaş üzerinde çocukluk ve erişkin döneminde dolaşımdaki beyaz kürelerin en büyük kısmını oluşturur ve inflamatuvar yanıtın erken fazına katılır. Küre şeklinde olup, çapları 10–15 µm civarındadır ve fagositoz sırasında parmaklı çıkıntıları oluştururlar. Nötrofillerin çekirdekleri 3-5 lobülden oluşur. Bu nedenle, polimorfonükleer hücre olarak anılırlar. Nötrofil sitoplazmasında iki türlü granül vardır. Çoğunluğu spesifik granüldür ve içerisinde mikroorganizmaların yıkımını sağlayan lizozim, kollogenaz ve elastaz gibi enzimler vardır. Bu granüller asidik veya bazik boyalarla yeterince boyanamaz. Bu nedenle bazofil ve eosinofillerden ayrılır. Nötrofillerin diğer granülleri azurofilik granüller olarak adlandırılır ve lizozoma benzerler. Nötrofiller kemik iliğindeki myeloid hücre serisinden gelişir ve üretimi için G-CSF uyarımı gereklidir. Yetişkin bir insan günde 100 milyardan fazla nötrofil üretir ve bunların kandaki ömrü sadece 6 saattir. Dolaşımdaki nötrofiller bu süre içinde bir enfeksiyon bölgesine yerleşmezse dalak ve karaciğerdeki yerleşik makrofajlar tarafından fagositoza uğrarlar. Nötrofil havuzu genellikle büyük venlerin endotel yüzeyinde bulunur ve stres, enfeksiyon gibi durumlarda hızla harekete geçerler. Nötrofil ve makrofajlar aşırı aktive edildiğinde salgıladıkları ROS, nitrik oksit ve lizozomal enzimlerle *host* (konak) dokularına tahribat yapabilirler. Çünkü bu moleküllerin organizmanın kendi dokuları ile mikroorganizmaları ayırt edecek özellikleri yoktur (8).

Mikroorganizmaları Tanıma ve Aktivasyon

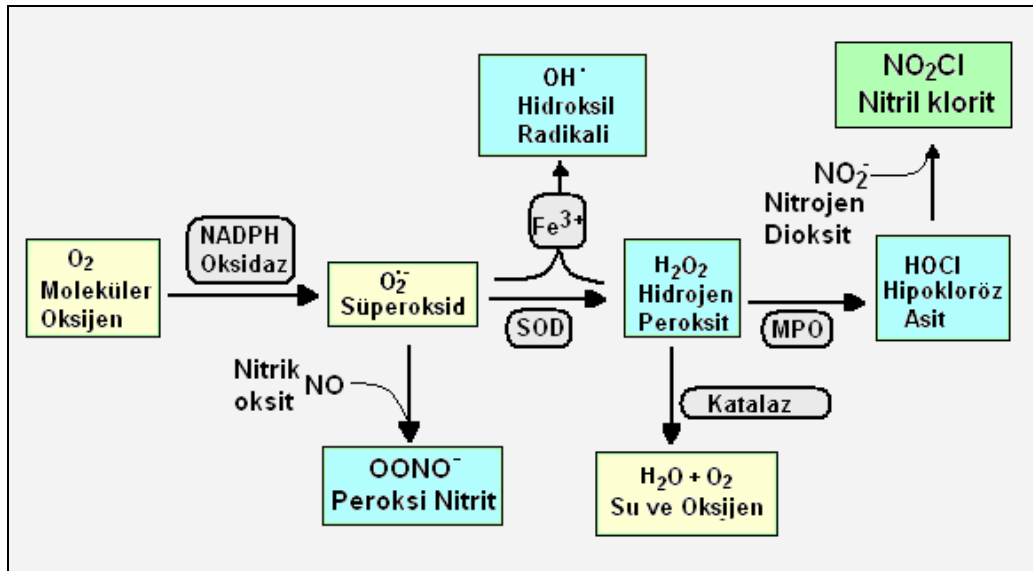
Nötrofil ve makrofajlar, mikroorganizmaları yüzeylerinde bulunan ve migrasyonu uyaran reseptörlerle tanır. Enfeksiyon bölgesine ulaşan fagositer hücreler mikroorganizmaları fagosite edip öldürücü salgılarla yıkımını sağlarlar. Nötrofillerde, makrofajlarda ve diğer lökositlerde hücre yüzeyinde bulunan yedi alfa-helikal transmembran reseptör “*seven α -helical transmembrane reseptor*” mikroorganizmaların salgılarını ve onlara karşı salınan mediatörleri tanır. Bu transmembran reseptör, lökositlerin enfeksiyon bölgesine migrasyonunda (yönelmesinde) ve kısa peptitlerin, özellikle “*N-formylmethionil*” içeren peptitlerin tanınmasında görev alır. Çünkü, bütün bakteriler ve birçok memeli proteini (mitokondride sentezlenenler) “*N-formylmethionil*” ile başlar. Bazı kemokinler (C5a, lipid mediatörler, lökotrien B4) de makrofaj ve nötrofillerdeki yedi alfa-helikal transmembran reseptörü uyarırlar. Mikroorganizmaların salgıları ve kemokinlerin bu reseptöre bağlanması, fagositleri uyararak bu hücrelerin kandan dokuya, oradan da enfeksiyon bölgesine yönelmelerini sağlar. Solunum patlaması süreciyle de mikroorganizmaları öldürücü maddelerin salınımı sağlanır (8).

Fagositoz ve Oksidatif Öldürme

Fagositoz sonrası, mikroorganizmalar genellikle iki yöntemle öldürülürler. Non-oksidatif (oksijene bağımlı olmayan) mekanizmada, lizozom içindeki proteolitik enzimler mikroorganizmanın parçalanmasına yol açarlar. Oksidatif öldürmede ise oksijen radikalleri kullanılır. Fagositoz sonrası oluşan solunum patlaması, nötrofil içerisinde yıkıma uğrayan mikroorganizmaların membran yapısına bağlıdır. Membran yapısında bulunan moleküller (özellikle gram negatif bakterilerden ortaya çıkan yıkım ürünleri) heksoz monofosfat yolağının “*hexose monophosphate shunt*” aktivitesinde artışa neden olur (9).

NADPH oksidaz enziminin üretilen süperoksit, yarı ömrü oldukça kısa (saatlerle ifade edilir), zayıf mikrobisidal etkinliği olan bir serbest oksijen radikalidir. Süperoksit anyon (O_2^-), nitrik oksit (NO) ile birleşerek peroksinitrit anyonuna ($OONO^-$) (yağ asitleri, amino asitler, proteinler ve DNA ya karşı toksiktir) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile metabolize edilerek daha

etkin hidrojen peroksit'e (H_2O_2) dönüştürülür (şekil 2.1.2.2.1). Hidrojen peroksit "*hydroxyl anion*"una ve myeloperoksidaz (nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunur) enzimi ile oldukça toksik olan hipokloröz asit "*hypohalous asit*"e, bu molekül ise ortamdaki azot (nitrojen) dioksit NO_2^- ile birleşerek inflamatuvar oksidan olan nitril klorit (NO_2Cl) (reaktif azot ürünü, RNS)'e dönüşür ve apoptoziste görev alır. Ayrıca, hidrojen peroksit katalaz ile su ve oksijene, glutatyon peroksidaz (GPX) ile de oksitlenmiş glutatyona (GSSG) dönüştürülerek etkisizleştirilir (10,11). Katalaz, glutatyon, askorbik asit self (konak) dokuyu korumak için ROS miktarını kontrol eder.



Şekil 2.1.2.1. Reaktif Oksijen Ürünleri Sentez Aşamaları. (Nitril klorit reaktif azot ürünüdür)

2.1.3. Fagosit NADPH Oksidaz Enzimi

Fagosit NADPH oksidaz, moleküler oksijene elektron transferi yaparak süperoksit üreten ve redoks (indirgeme) merkezi bulunan multikomponent bir enzimdir. Fagosit hücre zarında ve/veya vakuol zarında yerleşik olan bu enzim tarafından katalizlenen bir dizi kimyasal reaksiyon sonucu ROS sentezlenir (şekil 2.1.3.1). NADPH oksidaz enzimi ile elektron transferi çok basamaklı bir işlemdir ve bu süreçte elektronlar oksidaz bileşikleri arasında sıra ile taşınır; $NADPH \rightarrow FAD \rightarrow 2Hem \rightarrow 2O_2$. Flavin adenin dinükleotid

(FAD) ve iki hem grubunu da içeren redoks merkezi, NADPH oksidaz komponentleri tam olarak aktive olunca moleküler oksijenle bağlanıp elektron transferi yapabilir. Aktivasyon, sitokrom b_{558} 'i oluşturmak için NADPH oksidazın zarda yerleşik üniteleri $gp91^{phox}$ ve $p22^{phox}$ nin 1:1 oranında birleşmesi ile başlar. Bu aktivasyon NADPH oksidaz enziminin sitozolik bileşenlerinin (p47, p67, p40) bir araya gelerek sitokrom b_{558} ile birleşmesi ve GTP–bağlanma proteininin bu komplekse aktivatör olarak katılması ile tamamlanır. NADPH oksidaz'ın dört bileşeni ($gp91$, $p22$, $p47$, $p67$) ve GTP–bağlanma proteini (Rac2) den herhangi birinin eksikliği oksidaz aktivitesini engeller ve KGH oluşumuna neden olur. Beşinci bileşen olarak kabul edilen p40 proteinin bir defektine bu güne kadar rastlanılmamıştır (12).

1)	Reaktif bir ürün olan <u>süperoksit (O_2^-)</u> sentezi: NADPH Oksidaz $2O_2 + NADPH \text{-----} > 2O_2^- + NADP^+ + H^+$
2)	Hidrojen peroksit sentezi (H_2O_2): Süperoksit dismutaz $2O_2^- + 2H^+ \text{-----} > H_2O_2 + O_2$
3)	Hidroksil radikal ($OH\cdot$) sentezi: Fe^{3+} $H_2O_2 + O_2 \text{-----} > OH\cdot + OH^- + O_2$
4)	Hipokloröz asit (HOCl) sentezi: Myeloperoksidaz $H_2O_2 + Cl^- \text{-----} > HOCl + H_2O$
5)	Peroksinitrit ($OONO^-$) sentezi: $O_2^- + NO \text{-----} > OONO^-$

Şekil 2.1.3.1. ROS Sentezinde Kimyasal Reaksiyonlar ve Enzimler

2.1.3.1. NADPH Oksidaz Kompleksinin Yapısı

NADPH oksidazın zarda yerleşik üniteleri (sitokrom *b*₅₅₈);

gp91: gp91^{phox} 570 amino asit içeren bir glikoproteindir. N-linked karbonhidratlardan oluşan glikozilasyon bölgesini N-asetil glukozamin ve galaktoz oluşturur (13). Bu proteini kodlayan gen *CYBB* (sitokrom *b* β-subunit) geni olup, 13 eksondan oluşur ve X kromozomunda Xp21.1 bölgesinde bulunur (tablo 2.1.3.1.1).

Tablo 2.1.3.1.1 NADPH Oksidaz Komponentleri ve Moleküler Özellikleri

Komponent	gp91	p22	p47	p67
Gen	CYBB	CYBA	NCF1	NCF2
Kromozom	Xp21.1	16q24	7q11.23	1q25
Ekson sayısı	13	6	11	16
Baz uzunluğu	30kb	8.5kb	15.3kb	40kb
Kalıtım	X91, X-linked R	A22, OR	A47, OR	A67, OR
Görülme %	%60	%5	%30	%5
Protein aa.	570	195	390	526
Konumu	membran	membran	sitozol	sitozol

p22: p22^{phox} 195 amino asit uzunluğunda SH3 ile bağlanan prolin'den zengin bölgesi olan bir proteindir ve glikozilasyon bölgesi yoktur (14). Bu proteini kodlayan gen *CYBA* (sitokrom *b* α-subunit) geni olup, 6 eksondan oluşur ve 16q24 bölgesinde lokalizedir. p22^{phox} un N-terminali hidrofobiktir ve membran içinde yer alan transmembran domaini vardır.

Ağır ya da hafif zincirde meydana gelen bir defekt sitokrom *b* nin bu iki bileşenin kompleks oluşturmasını engeller. Sitokrom *b* nin yapısında bulunan bu iki subünit birbirinin stabilizasyonu için gereklidir (15). KGH vakalarının %65 inde X-linked gp91 veya otozomal p22 proteininin defektif olması nedeni ile sitokrom *b* negatiftir. Purifiye sitokrom *b*₅₅₈ sitoplazmik

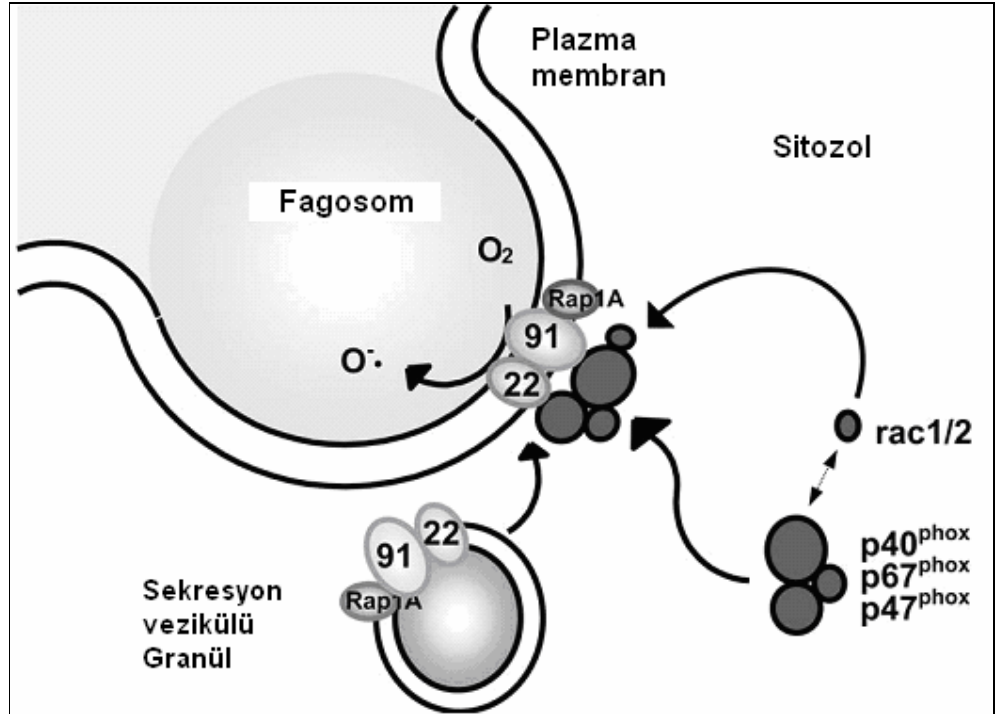
üniteler olmadan da kısmen süperoksit üretebilmektedir. Bu nedenle p47 ünitesinin eksikliğinde kısmi bir aktivite vardır (16,17). NADPH kompleksinin aktivitesinde en son aşama için gerekli olan Rac 2 bağlanmasının p67 komponenti üzerinden gerçekleşmesi nedeni ile p67 eksikliğinde, p47 eksikliğindeki kısmi aktivite gerçekleşemez (18, 19).

NADPH oksidazın sitoplazmik üniteleri;

p47: p47^{phox} 390 amino asit uzunluğunda, dokuz serin fosforilizasyon bölgesi, iki SH3, bir PX bölgesi olan oldukça bazik (pH=10.4) bir proteindir. Arginin ve serin yönünden zengin olan fosforilizasyon bölgesi C terminaline yakındır. Bu proteini kodlayan gen *NCF1* “*neutrophil cytosolic factor-1*” genidir, 11 ekson içerir ve 7q11.23 bölgesinde yerleşmiştir (18,19).

p67: p67^{phox} 526 amino asit uzunluğunda, Rac1 veya Rac2 nin bağlandığı 4 tetratricopeptid tekrar (TPR) motifi olan, iki SH3 bölgesi ve prolin yönünden zengin bir bölgesi olan, hafif asidik (pH~6) bir proteindir. Bu proteini kodlayan gen *NCF2* “*neutrophil cytosolic factor-2*” genidir, 16 ekson içerir ve 1q25 bölgesinde yerleşmiştir (18,19).

p40: p40^{phox} 339 amino asit uzunluğunda bir SH3 ve bir PX domaini olan bir proteindir. Muhtemelen, sitozolde p47 ve p67 kompleksinin stabilizasyonunda görev alır ve NADPH aktivasyonu sırasında bu kompleksin membrana bağlanmasını kolaylaştırır. Bu proteini kodlayan gen *NCF4* “*neutrophil cytosolic factor-4*” genidir, 10 ekson içerir ve 22q13.1 bölgesine yerleşmiştir (şekil 2.1.3.1.1) (18,19).



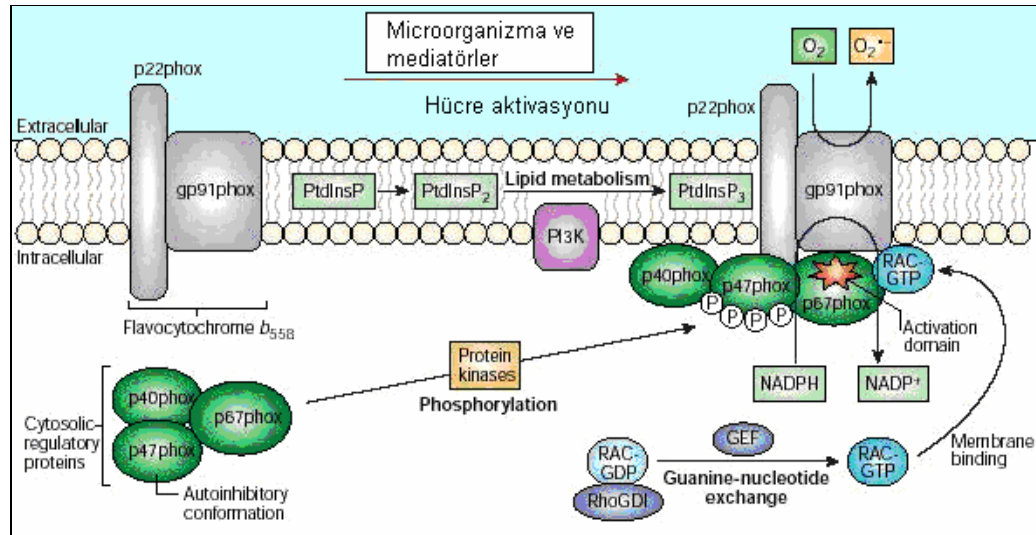
Şekil 2.1.3.1.1 NADPH Oksidaz Kompleksinin Oluşumu.

2.1.3.2 NADPH Oksidazın Aktivasyonu

NADPH oksidaz aktivasyonu multi-sinyal iletişimi gerektiren kompleks bir olaydır. İnaktif durumdaki sitozolik ünitelerin (p47, p67 ve p40) SH3 domainleri prolinden zengin motiflerine bağlı olarak birlikte dururlar. NADPH oksidazın uyarılmasından sonra sitozolik ve membran subünitler bir araya gelerek istirahat fazına göre 100 kat daha fazla süperoksit üretebilen aktif faza geçerler. Aktivasyon sürecinde subunitler, araşidonik asit ve diğer moleküllerin etkisi ile oluşan fosforilizasyon sonucu konformasyonel değişime uğrarlar ve SH3 bağlanma bölgeleri ortaya çıkar. Aktivasyon, oksidaz komponentlerinden p47 de serin fosforilizasyonu ile başlar ve tam aktivasyon için “small Rho-like GTPases (Rac1, Rac2, Rap1A)” regülasyonu gerekir (12). P47 nin belirli aşamalar ile çok sayıda fosforilizasyona uğraması regülasyon açısından önemlidir ve elektrostatik ilişkileri etkileyerek, aktivasyonu başlatır ve subunitlerin birbiri ile SH3 bağı ile bağlanmasını sağlar. Aktivasyon sürecinde sitozolde bulunan subünitler p47, p67 ve p40 bir

kompleks oluşturarak plazma membranına doğru hareket eder ve flavo-sitokromun hidrofilik bölgesine bağlanırlar. İnaktif fazda Rac1,2 rhoGDI ile bağlıdır ve GDP nin Rac dan ayrılması önlenir. Rac1,2 p47, p67 kompleksinden ayrı olarak hareket eder ve oksidaz aktivasyonu için gereken ikincil sinyalin oluşumunda görev alır. İkincil sinyal oluşumunda Rac1,2 rhoGDI den ayrılır ve GTP ile bağlanır (şekil 2.1.3.2.1).

Patojenlerin veya diğer partiküllerin içeriye alınması ile kemoatraktanlar (N-formyl peptide, C5a, platelet aggregating faktör, leukotriene B₄ ve interleukin-8) salınır. Daha sonra, fosfolipaz C-β1, inositol 1,2,5 trifosfat ve hücre içi kalsiyum etkisi ile solunum patlaması gerçekleşir ve ROS ortaya çıkar (şekil 2.1.3.2.1) (20). Solunum patlamasında; oksijen tüketimi, glukojenoliz ve glukoz oksidasyonunda artış meydana gelir.



Şekil 2.1.3.2.1 NADPH Oksidaz Enziminin Aktivasyonu (12).

2.1.3.3 NADPH Oksidazın Regülasyonu

Fagosit NADPH oksidaz enzimi çok fazla miktarda ROS sentezleyebilen güçlü bir enzimdir. Bu enzimin istenmeyen etkilerinden korunmak için aktivitesinin çok hassas bir şekilde regüle edilmesi gereklidir. Bu nedenle enzimi oluşturan komponentler, istirahat halindeki nötrofilde farklı yerlerde dir. Bir mikroorganizmanın nötrofil reseptörüne bağlanması ile subünitler bir araya gelir. Önce sitozolik kısım fosforilizasyona uğrar,

konformasyonu değişir ve sitozol-membran kompleksleri SH3-prolin bağı ve protein-lipid (PX bölgesi-fosfoinositidler) bağı ile bağlanır. Bu komplekse “*small GTPases*” bağlanır ve tam aktivasyon sağlanır. Birçok mikroorganizmada bu antimikrobial savunmadan korunma mekanizması vardır, ancak sistemin gücü hiçbirine tam olarak kurtulma fırsatı vermez.

Gelişimsel (Developmental) Regülasyon:

Embriyonel gelişim sürecinde NADPH oksidaz nötrofillerde yerleşir. gp91, p47 ve p67 proteini genellikle myeloid hücrelerde mevcutken, p22 proteini diğer hücrelerde de eksprese olabilmektedir. Yine, endotel hücreleri, fibroblastlar ve renal mesengial hücreler gibi bazı nonfagositik hücrelerde NADPH oksidaza benzer moleküller bulunabilir ve düşük düzeyde de olsa süperoksit üretilmektedir (21-26).

Transkripsiyonel Regülasyon:

Bu grupta yer alan moleküller, aktivatörler ve baskılayıcılar (represör) olmak üzere iki grupta ele alınır. Bir represör olan CDP (*CCAAT displacement protein*); CP1 ve BID “*binding increases during differentiation*” ile yarışarak bu moleküllerin promotor bölgeye bağlanmalarını önler ve *CYBB* geninin transkripsiyonu engeller.

Aktivatör olarak bilinen moleküller; CP1, BID, HAF-1 (*hematopoiesis-associated factor 1*) ve PU.1 (ets ailesi transkripsiyon faktörü) dir. CP1; çok yaygın bir transkripsiyonel faktördür ve gp91 promotor bölgesinde CCAAT motifine bağlanır. BID; gp91 promotor bölgesine bağlanır ve CP1 aktivitesini artırır (27). HAF-1: gp91 promotor bölgesine etki eder ve üç faktörden oluşur (PU1, “*interferon regulatory factor*”(IRF-1), *interferon consensus sequence binding protein* (ICSBP) den oluşur (28, 29). HAF-1, interferon γ (IFN- γ) ile uyarılarak sağlanan gp91 upregülasyonu için gereklidir ve gp91 ekspresyonunu artırır (30). PU.1; terminal nötrofil maturasyonunda etkin bir transkripsiyon faktörüdür (31). PU.1’in eksik olduğu nötrofillerde kemokinlere cevap yoktur ve fagositoz tam olarak oluşamaz. Ayrıca, PU.1 faktörü p47 promotor aktivitesi için de gereklidir.

Post-translasyonel Regülasyon:

NADPH oksidaz bileşenlerinin regülasyonu oksidaz proteinleri sentezlendikten sonra N-glikolizasyon (gp91) ve fosforilizasyon (p22, p47, p67) ile sağlanır. Fare (knock-out) deneylerinde gp91 proteininin glikolizasyon bölgesindeki değişimin aktivasyonu etkilediği gösterilmiştir.

Uyarıcı (up) Regülasyon:

IFN- γ , TNF- α , granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), fosfatidik ve araşidonik asitler gibi lipid mediatörler ile sağlanır. Ayrıca, kalsiyum iyonoforlar (A23187) NADPH oksidazı PMA gibi protein kinaz C (PKC) üzerinden aktive eder ve hücre içi kalsiyum salınımına gerek duymazlar.

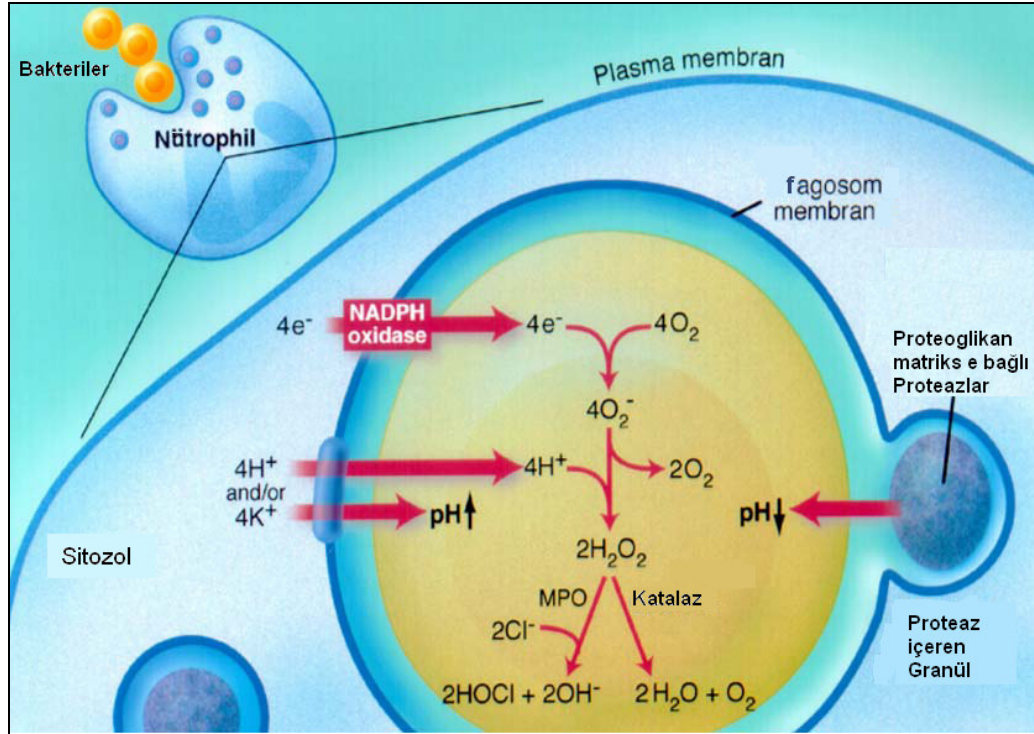
Baskılayıcı (down) Regülasyon:

Flavositokroma bağlanan Rap1A (ras onkojen ailesinden bağlanma proteini), p40, PR-39 ve azurofilik granüllerdeki katyonik proteinler NADPH oksidazın down-regülasyonunda etkindir. Ayrıca deksametazone NADPH oksidaz aktivitesini ve süperoksit sentezini baskılar (32, 33).

2.1.3.4. NADPH Oksidazın Fonksiyonu

KGH da bazı mikroorganizmaların nötrofiller tarafından öldürülememesi bu hücrelerdeki süperoksit sentezinin çok az olmasına bağlıdır. Süperoksitin bakterisidal etkisi o kadar yüksek değildir. Ancak, bu molekül daha toksik ve güçlü oksijen radikallerinin öncüsüdür. Sentezlenen süperoksit fagosomlar içerisinde önce hidrojen peroksit'e (H_2O_2) daha sonra daha toksik olan hidroksil radikallerine ve singlet oksijen'e dönüştürülür. Süperoksit ayrıca nitrojen (azot) oksit (NO) ile reaksiyona girerek peroxyinitrite (çok toksik) dönüştürülür. Hatta bir kısım süperoksitlerin ozon molekülüne (O_3) dönüştürüldüğü de tespit edilmiştir. Ayrıca, H_2O_2 ve klor azurofilik granüllerden salınan myeloperoksidaz enzimi tarafından kullanılır ve hipokloröz asit gibi bütün mikroorganizmalar için çok toksik bir maddeye dönüştürülür. Bu asit kısa ömürlüdür ve daha uzun ömürlü aynı etkide toksik sekonder kloramin moleküllerinin oluşumunu tetikler. Bu yolla, nötrofiller en toksik mikroorganizmalara karşı bile vücudu koruyabilirler.

Myeloperoxidaz geni knock-out farelerle yapılan deneylerde NADPH oksidaz eksikliğine benzer şekilde, elastaz ve katepsin G eksikliği sonucu bakteri öldürme fonksiyonunun defektif olduğu gösterilmiştir (34). Fagosom oluşumunda, azurofilik granüllerle birleşmeye rağmen ilk 30 dakikada fagosom içindeki pH'ın 8 düzeyine kadar çıktığı görülmüştür. İlk 30 dakikadan sonra fagosom içindeki pH değeri azalarak 7 nin altına iner. KGH olan nötrofillerde ise pH değeri aniden 6.5 in altına iner. NADPH oksidazın sadece sitozoldeki elektronu fagosomdaki oksijen'e nakletmediği, ayrıca sitozolden fagosoma proton transfer ettiği tespit edilmiştir. Eğer proton akımı elektron akımına eşit olursa pH değişmez ya da azurofilik granüller nedeni ile azalır (35, 36).



Şekil 2.1.3.4.1 NADPH Oksidazın Fagosom İçindeki Fonksiyonları. (Fagosom içerisinde içeriye alınan bakteri ile fagosom zarı arasında birçok kimyasal reaksiyon meydana gelir. NADPH oksidaz yardımıyla elektronlar fagosom içine gönderilir ve moleküler oksijen (O_2) süperoksit (O_2^-) dönüştürülür) (36).

Son yıllarda, AW Segal ve arkadaşları (13) pH artışının sadece H iyonu transferi ile değil ayrıca K'un hücre içerisine akımı "influx" ile de olabileceğini göstermişlerdir (şekil 2.1.3.4.1) (34-36). Potasyum iyonları elastin ve katepsin G gibi proteazların granül içindeki asidik protoglikan matriks içinden salınmasına yardımcı olur. Bu bulgularla, optimal proteaz aktivasyonu için fagosom içindeki pH değerinin NADPH oksidazın sentezlediği oksidatif ürünlerle düzenlendiği ve NADPH oksidazın asıl görevinin mikroorganizmaları öldürmekten ziyade optimal pH ayarlaması olduğu ve bu yolla lizozomal proteazların salınımını ve aktivasyonunu sağladığı belirlenmiştir (35,36).

Mikroorganizmaların Oksidatif Öldürmeden Kaçışı:

Mikroorganizmalar fagosit NADPH oksidazın etkisinden kurtulmak için farklı mekanizmalar kullanırlar. Toksik oksijen radikallerine karşı süperoksit dismutaz ve katalazın sentez ve salınımında artış bunların başlıcalarıdır. Mikobakterilerde bulunan bazı genler H₂O₂ ve ROS'a karşı direnç oluşumuna neden olur (37). *Salmonella typhimurium* variantlarında bulunan Spi-1 proteini de direnç oluşumundan sorumludur. *Anaplasma phagocytophilia* hücre içi bakteridir ve gp91 ve rac2 transkripsiyonunu engelleyerek oksidatif öldürmeden korunur.

NADPH Oksidazın Diğer Dokulardaki Fonksiyonu:

Vasküler sistem hücrelerinde (endotel, damar düz kasları ve fibroblastlar) NADPH oksidaz proteinleri tespit edilmiştir. ROS vasküler hücrelerde mitoz, apoptoz, migrasyon, hipertrofi ve hücre dışı matriksin modifikasyonunda görev alır. Dolayısıyla ROS ateroskleroz ve tümör gelişiminde de görev alır. (38). KGH'lı hastaların fibroblastları normal kişilerdeki kadar süperoksit sentezleyebilirler. Ancak, bu hücreler fagositoza aktif katılmadığı için mikroorganizmaların öldürülmesinde bir katkısı olmamaktadır (39).

Fagositer hücreler dışındaki bazı doku hücrelerinde NADPH oksidaz gp91 ünitesinin homologu olan proteinler tespit edilmiştir. Yapısal olarak gp91 proteinine büyük benzerlik gösteren bu proteinler kolon, prostat, rahim

ve damar düz kas hücrelerinde bulunur ve Nox (Nox1) olarak adlandırılırlar. Nox1 büyüme regülasyonunda görev alır ve aşırı ekspresyonu hücrel büyüme artırılmaktadır. Renox veya Nox4 olarak ifade edilen bir başka gp91 ünitesi homologu da renal kortekste ve tübül epitelinde bulunur (40). Nox4 ün oksijen duyarlılığında görev aldığı ve eritropoetin sentezini regüle ettiği belirtilmiştir.

Blouin ve arkadaşlarının (41) B₂-integrin aktivasyon yolunun redoks reaksiyonu gerektirdiği göstererek fagositlerde alternatif NADPH oksidaz varlığını göstermişlerdir. Bu aktivasyon sürecinin, KGH hastalarında bozulmadığı ve fagosit oksidazdan bağımsız olarak gerçekleştiği anlaşılmıştır (41).

2.1.3.5. NADPH Oksidazda Moleküler Patoloji ve Mutasyonlar

Hastalığın dört alt grubu X91, A22, A47 ve A67 olarak da adlandırılır. Ayrıca sağ üst köşeye (+, -, ⁰) eklenerek immunoblot analizi sonuçlarına göre normal, azalmış veya tamamen eksik oksidaz proteini ifade edilir. Şu ana kadar beşinci subunit olan p40 phox ile ilgili bir mutasyon bildirilmemiştir. Buna karşılık NADPH oksidaz aktivasyonu için gereken ikincil sinyali oluşturan (small G protein) Rac2 nin mutasyonu bulunan bir hasta bildirilmiştir. Bu dört genin bilinen 410 farklı mutasyonunun 19 unda normal ekspresyonu olan inaktif protein bulunmuştur (yaklaşık %5). Bunlar 358 *CYBB* mutasyonundan 17 si (X91⁺), 25 *CYBA* mutasyonundan 1'i (A22⁺), 17 *NCF2* mutasyonundan birini (A67⁺) oluşturmaktadır. Bu mutasyonlar fonksiyon kaybı mutasyon "*loss-of-function mutations*" olarak bilinir (42). *NCF1* geninde bulunan mutasyonlardan hiçbirinde non-fonksiyonel proteine rastlanmamıştır.

X91 (gp91 defekti): *CYBB* geninde gen konversiyonu hariç her tip mutasyon bulunmuştur. Mutasyonların %65'i tek nükleotit değişimi "*single-nucleotide substitutions*" şeklindedir. Nonsens mutasyonlar sonucu oluşan stop kodonlar (TAG, TAA ve TGA) protein sentezinin durmasına ve işlevsiz bir molekül ortaya çıkmasına neden olur. Mutasyonların %35 ini ise delesyon ve insersiyonlar oluşturur. Komşu genleri de içine alan delesyonlar sonucu

McLeod's sendromu olarak bilinen Duchenne muskuler distrofi, Retinitis pigmentosa ve X-linked KGH nin beraber olarak görüldüğü vakalar ortaya çıkar. X-linked KGH'lı bireylerdeki 261 mutasyonun %65 i özgündür. Diğerleri ise CpG dizilerine yakın "hot-spot" (sık mutasyon görülen nokta) larda bulunmaktadır (43). X-linked KGH rının çoğunluğunda mRNA ya da sentezlenen proteinin kararsızlığı (instabilitesi) nedeniyle gp91 proteini bulunmaz ve bu gruba X91⁰ fenotipi (varyantı) denilir. Nadir olan bir diğer varyant ise, bir miktar gp91 protein ekspresyonu ve aynı ölçüde süperoksit sentezi bulunan X91⁻ fenotipidir. X91⁺ fenotipinde ise normal gp91 proteini olmakla beraber, non-fonksiyonel olduğu için klinik olarak X91⁰ varyantına benzer.

CYBB genindeki X91⁺ fenotipik varyantının incelenmesi, hangi defektin oksidazın aktivasyonu nasıl etkilediğinin öğrenilmesi yönünden oldukça önemlidir. Şu ana kadar bulunan 17 farklı X91⁺ tip mutasyon gp91 in önemli bağlanma bölgelerinin tanınmasında katkı sağlamıştır (şekil 2.1.3.5.1) (44, 45).

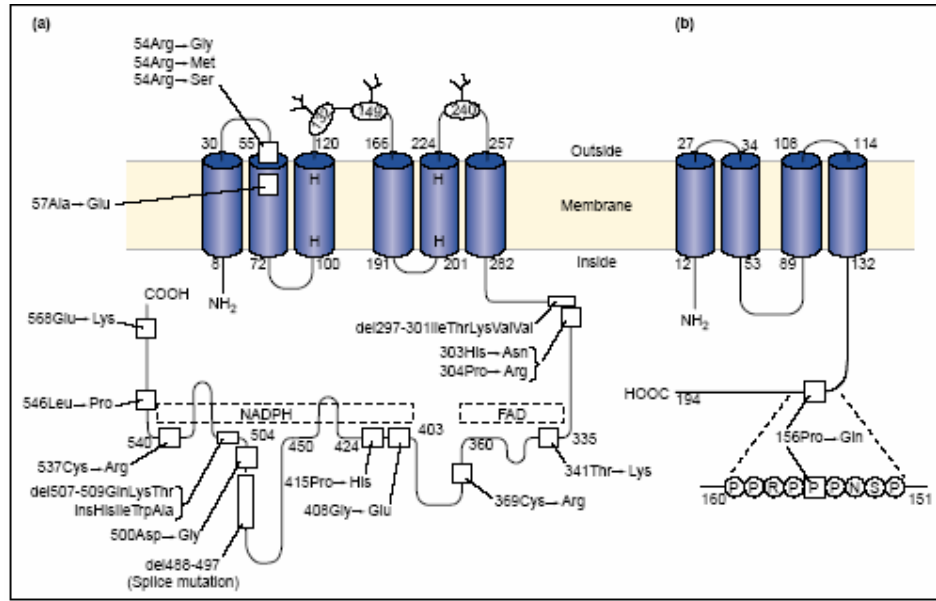
A22 (p22 defekti): KGH vakalarının %5 ini A22 oluşturur. Şu ana kadar *CYBA* geninde 27 farklı mutasyon olan 34 hasta tespit edilmiştir (46). Bilinen bir A22⁺ mutasyon vardır. Burada, prolin yerine glutamik asit yerleşmesi sonucu p47 proteini ile SH3 bağı kurulması engellenmektedir.

A47 (p47 defekti): KGH vakalarının %30 unu A47 oluşturur. Diğer alt gruplardan farklı olarak, *NCF1* genindeki mutasyonların %94 ünde, 198 bp lik normal gen yerine 196 bp lik (%99 benzerlikteki) pseudogenin krossing over "krossing over" (parça değişimi, mayoz bölünmede profaz aşamasında gen alışverişi) sonucu yerleşmesi ile, ikinci eksonun ilk dört nükleotidinde oluşan GT delesyonu (Δ GT) (GTGT→GT) vardır. Δ GT sonucu oluşan frameshift "frameshift" mutasyonu (3 veya daha az bazın değişimi ile meydana gelen kayma sonucu oluşur), prematur stop kodon (beklenenden önce mutasyon sonucu oluşan stop kodonu) oluşturarak protein sentezinin erken sonlanmasına neden olmaktadır. P47 defekti olan 52 farklı kişide bu mutasyon tespit edilmiş ve bunların 41'inin homozigot, 8'inin kompond

heterozigot olduğu gösterilmiştir (46). *NCF1* geninde, 11 farklı mutasyon tespit edilmiştir.

A67 (p67 defekti): KGH vakalarının %5 ini A67 oluşturur (47). Şu ana kadar *NCF2* geninde 48 allel de 24 farklı mutasyon tespit edilmiştir. A67⁺ fenotipinde bir hasta vardır. Bu protein eksikliğine bağlı olarak Rac bağlanması gerçekleşemez ve NADPH oksidaz enzimi aktive olamaz (47).

p40 proteini: Bu güne kadar *NCF4* geninde ve proteininde (p40) bir defekt bulunamamıştır.



Şekil 2.1.3.5.1 KGH in X91⁺ ve A22⁺ Fenotiplerine yol açan Mutasyonlar (gp91-*phox* ve p22-*phox* membran modeli) (45)

NADPH Oksidaz Aktivitesini Engelleyen Diğer Defektler:

Rac2 Defekti: Bir vakada *Rac2* geninin bir allelinde oluşan mutasyon sonucu Asp57Asn değişimi olduğu, aspartik asit yerine yerleşen asparginin GTP-bağlanma proteininin bağlanmasını azalttığı ve sonuçta NADPH oksidaz aktivasyonunun gerçekleşmediği bildirilmiştir (48, 49).

Genotip ve Fenotip Arasındaki İlişki:

Genel olarak X91⁰ ile X91⁺ KGH fenotipleri klinik olarak aynı özelliktedir. Ancak, X91⁻ fenotipinde kısmi aktiviteye (%3-30) bağlı olarak daha hafif bir fenotip ortaya çıkması beklenmekle beraber, bu her zaman

gerçekleşmez ve *CYBB* gen polimorfizmine bağlı olarak fenotip değişebilir. Otozomal p47 fenotipinde de residüel aktivite nedeniyle genellikle daha iyi bir klinik seyir görülmektedir (43).

2.1.4. Klinik Görünüm

İnsidans (epidemioloji): KGH 200.000–250.000 canlı doğumda bir görülen hastalıktır. Amerikada KGH vakalarının üçte ikisini gp91 phox proteinini kodlayan *CYBB* genindeki mutasyon sonucu oluşan X-linked resesif formun oluşturduğu bildirilmektedir. Geriye kalan kısmı ise *CYBA*, *NCF1* ve *NCF2* genlerindeki mutasyon sonucu oluşan otozomal resesif formlar oluşturmaktadır. (50). Bizim toplumumuzda yaygın akraba evlilikleri nedeni ile otozomal resesif KGH formunun daha fazla olması beklenmektedir.

Klinik Seyir ve Bulgular: Süpüratif lenfadenit, piyojenik cilt enfeksiyonları, karaciğer ve akciğer apseleri sık görülen klinik bulgulardır. Karaciğer ve dalakta büyüme (hepatik veya peri-hepatik apse veya granülom oluşumuna bağlı), özefagus çıkışında, pıllorda tıkanma (granulom oluşumuna bağlı), inatçı ishal, granulomatoz kolit, peri-anal apse veya rektal fistül gastrointestinal bulgulardır. Ekzematoid dermatit, impetigo, deride tekrarlayan furonküloz, subkütan apseler şeklinde cilt bulguları görülür. Diğer bulgular; muköz membranlarda enfeksiyon, konjunktivit, rinit, stomatit, kronik veya tekrarlayan pnömoni, kronik öksürük, osteomyelitdir. Taşıyıcılar çoğunlukla sağlıklıdır ve tekrarlayan enfeksiyon hikayesi yoktur. Bazılarında lupus benzeri deri döküntüleri (fotosensitivite) ve stomatit bildirilmiştir.

KGH'da Patojenler ve Enfeksiyonlar: Bakteriyel enfeksiyonlar; *Staphylococcus aureus* ile süpüratif adenit, cilt altı enfeksiyonları, karaciğer apsesi, *Serratia* ile osteomyelit, pnömoni, *Nocardia* türleri ve *Burkholderia cepacia* ile pnömoni ve sepsis görülür. En sık görülen mantar enfeksiyonları *aspergillus*, özellikle de *A. fumigatus* enfeksiyonudur. *A. fumigatus* pnömoniyeye ve *A. nidulans* türü ise ön planda osteomyelite yol açar. Diğer mantarlardan, *candida* ve *paecilomyces* türleri ile de enfeksiyon olabilmektedir (51) .

Laboratuvar Özellikleri: Beyaz küre sayısı 10-20,000 aralığında ve nötrofil çoğunluktadır. Kronik hastalık anemisi görülebilir. İmmunoglobulin seviyesi genellikle yükselmiştir. Kemotaksis normaldir.

Prognoz: X-linked formun seyri otozomal forma göre daha ağır olup enfeksiyonlar çoğunlukla ilk iki yıl içerisinde ortaya çıkar.

2.1.5 Kronik Granulomatoz Hastalığın Tanı Yöntemleri

1960'lı yıllarda KGH tanısı, nötrofillerde oksijen tüketimi ölçülerek konulurdu. Daha sonra, hastaların lökositlerinde nitroblue tetrazolium boyasının fagositoz sonrasında koyu maviye "*blue formazan*"a dönüşümünün olmadığı gözlemlendi. Bu özellik tanıda kullanılmaya başlandı ve takiben diğer tanı yöntemleri ortaya çıktı (52).

2.1.5.1. Fonksiyonel Analiz Yöntemleri

NBT: KGH tanısında kullanılan *in vitro* fagosit fonksiyon testidir. Bir semikantitatif test olan NBT testinde nitroblue boyası ve tetrazolium tuzları, oksijen radikallerinin bulunması durumunda, indirgenerek formazan bir pigment oluşumuna neden olurlar. Normal nötrofillerde nitroblue tetrazolium boyası solunum patlaması sırasında ortaya çıkan ROS ile indirgenir ve rengi sarıdan maviye dönüşür. KGH da nötrofiller O_2^- üretmediğinden bu indirgeme gerçekleşemez ve nitroblue tetrazolium boyası sarı renkli olarak kalır (52). Stimüle nötrofillerde NBT değerinin %0-10 arasında görülmesi genellikle KGH'a işaret eder.

DHR 123 Akım Sitometri: Fagositlerde DHR 123 mitokondriye yerleşir ve PMA ile uyarım sonrası oksijen radikallerinin (H_2O_2) ve peroksinitrit ($OONO^-$) etkisi ile güçlü floresan özellikteki rhodamin 123 e indirgenir. Rhodamine 123, 488 nm'de ışık yayar ve güçlü floresan uyarım sonucu akım sitometrik analizde histogramda sağa kayma gözlenir. Fagosit oksidaz defektinde ise PMA ile uyarımı gerçekleşmediği için, oksijen radikalleri (H_2O_2) sentezlenemez ve rhodamine 123 ortaya çıkamaz. DHR 123 testi sadece KGH teşhisinde değil aynı zamanda bazı subtiplerin özellikle otozomal ve X-linked ayrımında yardımcı olabilmektedir. P47

eksikliğinde ya da gp91⁻ KGH da az miktarda sentezlenen hidrojen peroksit etkisi ölçülebilir ve kolaylıkla gp91⁰ grubundan ayrılır (53-55).

DHR 123 yöntemi ile akım sitometrik analiz sonrasında, PMA ile uyarılan “*stimule*” nötrofillerden elde edilen floresan yoğunluğun geometrik ortalamasının “*unstimule*” nötrofillerden elde edilen floresan yoğunluğun geometrik ortalamasına oranı ile stimülasyon indeksi (SI) bulunur. SI KGH tanısında, X-linked ve otozomal (p47) KGH ayırımında kullanılan önemli bir parametredir. Normal sağlıklı bireylerde SI değeri 60-150 aralığında değişebilmektedir. Hastalarda ise 1-10 aralığında olmakla beraber, otozomal KGH (p47) de 52 ye kadar çıkabildiği ifade edilmiştir (55,56). Taşıyıcılarda ise normal ve defektif nötrofillerin olduğu bimodal histoğramda SI değerleri ayrı ayrı hesaplanır.

$$\text{Stimülasyon İndeksi (SI)} = \frac{\text{stimüle hücrelerin floresan yoğunluğun geometrik ortalaması}}{\text{unstimüle hücrelerin floresan yoğunluğun geometrik ortalaması}}$$

Şekil 2.1.5.1.1 Stimülasyon İndeksini Tanımlayan Formül

Farklı floresan özellikteki maddeler kullanılarak hangi oksijen radikalinin sentezinde defekt olduğu belirlenerek ROS sentezinin hangi aşamasında defekt olduğu anlaşılabilir. DHR 1,2,3 (dihidrorodamine) hidrojen peroksit (H₂O₂), HE (hydroethidine) süperoksit (O₂⁻), DCFH (2,7-dichlorofluorescein diacetate) nitrik oksit (NO)'i göstermede kullanılan floresan boyalardır (57).

2.1.5.2. Özgün Antikorlar ile Protein Düzeyinde Analiz Yöntemleri

Akım Sitometrede Anti-human NADPH Oksidaz Komponent Antikorları ile Alt-Grup Analizi: Her komponent için özgün antikorlar kullanılarak NADPH oksidaz komponentlerinin nötrofil yüzeyindeki ve sitoplazmasındaki ekspresyonları indirekt immunfloresan yöntemi ile gösterilebilir. Periferik kandan elde edilen nötrofillerin fiksasyonu ve permeabilizasyonu sonrası, NADPH oksidaz membran komponenti olan sitokrom *b558*'ın ekspresyonu, gp91 proteini için monoklonal antikor (MoAb) 7D5 ve p22 proteini için MoAb 449 kullanılarak gösterilebilir. Sitoplazmik komponentler p47 ve p67 için özgün olan tavşan orijinli poliklonal unkonjuge antikorlar kullanılır. Hücreler primer antikor olarak unkonjuge monoklonal (mouse) veya poliklonal (rabbit) orijinli antikorlarla inkübasyondan sonra sırası ile floresan-izotiosiyanat (FITC) ile konjuge *goat-anti-mouse-Ig* veya *goat-anti-rabbit-Ig* sekonder antikorla işaretlenir ve akım sitometrede görüntülenir.

Western Blot ile Protein Ekspresyonu Analizi: Western blotting yönteminin esası; proteinlerin poliakrilamid jelde elektroforez ile ayrılması ve ayrılan proteinlerin otoradyografi, ultraviyole ışığı ya da peroksidaz reaksiyon ürünü ile gösterimine dayanır. Yöntem çok geniş bir yelpazedeki proteinlerin varlığını, özgün reaksiyonlarını ve bağlanma özelliklerini göstermede kullanılmaktadır. Günümüze kadar western blotting yöntemi, normal ve kanser hücrelerinin sinyal mekanizmalarının anlaşılmasında kullanıldığı gibi mikrobiyolojik, immünolojik araştırmalarda da bu yöntemden yararlanılmıştır. Burnette ve arkadaşlarının önermiş olduğu nitrosellüloz membran kolay kullanımı nedeni ile transfer için kullanılan diğer maddelerin yerini almıştır. Bu yöntemde özgün monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılarak aranan proteinin varlığı gösterilmekte ve KGH gibi bazı hastalıkların alt grup tayini de yapılabilmektedir.

2.1.5.3. Moleküler Düzeyde Analiz Yöntemleri

Genotiplendirme (Mutasyon Analizi): DNA dizi analizi ya da sekans analizi DNA'nin nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. İlk dizi

analizi, 1960'ların başında 75-80 nükleotid kapsayan küçük tRNA'lar ile başlamıştır. Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ve Sanger'in dideoksi enzimatik yöntemidir. Her iki yöntemde dizi analizi yapılacak ekson spesifik DNA'nin hazırlanması, liner PCR ile sekansa uygun DNA'nın çoğaltılması ve yüksek voltaj poliakrilamid jel elektroforezi olmak üzere üç ana aşaması bulunmaktadır.

Maxam-Gilbert Yöntemi: Örnek DNA, P32 ile işaretlenir. Bu işaretlenen DNA plate üzerinde dört eşit hacime bölünür. Her örneğe, DNA'da ki bazlardan birisini tahrip edecek şekilde bir kimyasal madde eklenir ve DNA yapısı fosfodiester bağlarından kırılır. Böylece P32 ile işaretlenmiş kısıklı-uzunlu parçaları olan DNA zincirleri elektroforez ve otoradyografi ile analiz yapılır.

Sanger DNA Dizi Analiz Yöntemi: “*dideoxy*” veya “*chain-terminator*” yöntemi olarak bilinen Sanger yöntemi bugün en çok tercih edilen yöntemdir. Asimetrik amplifikasyon ile elde edilmiş tek iplikcikli DNA; DNA Polimeraz enzimi ile ddNTP ve biri radyoaktif olarak işaretlenmiş dNTP kullanılır. Ortama radyoaktif P32, S35 veya P33 eklenir. İşaretleme primerlere yapılabileceği gibi, ortama eklenen dNTP'lerden birisinin radyoaktif olması yeterli olabilmektedir. Burada en önemli nokta dideoksi-nükleotidlerin (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP) eklenmesidir. 2',3'Dideoksiribonükleotid trifosfat'ların (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP), klasik dNTP'lerde farklılığı deoksiriboz'un 3' noktasında hidroksil grubunun bulunmamasıdır. Büyüyen/sentezlenen DNA zincirine, DNA polimerazlar aracılığı ile bağlanabilirler ve terminatör olarak görev yaparlar. Bu bağlanma 5'trifosfat grupları aracılığı ile olur. Fakat 3' hydroxyl grubunun olmaması nedeniyle, ardından gelen dNTP'ler ile fosfodiester bağının oluşması engellenir. Doğal olarak DNA zincirinin daha fazla uzaması imkânsız hale gelir. ddNTP ile klasik dört dNTP bir reaksiyon karışımının içine konduğunda, DNA zincir uzaması için aralarında bir yarışma olur, seyrek fakat spesifik sonlanmalar oluşur. Bu reaksiyon sonucunda, primer sonundan başlayıp; prematüre sonlanmaların olduğu bölgeler kadar uzunluktaki DNA parçaları ortaya çıkar.

Dört farklı enzimatik reaksiyonda, dört farklı ddNTP kullanılarak (A,C,G,T için) birer reaksiyon elde edilir. Bu yöntem, rekombinant Taq polimerazların geliştirilmesi ile PCR ile de gerçekleştirilebilir hale gelmiş otomatik sekans sistemi adını almıştır. Bu yeni sistemde her farklı dideoksi bazı ayrı bir floresan boya ile işaretlenir ve primerlerle reaksiyona girer. Elde edilen veriler, floresan detektörlü bilgisayar sistemi ile kayıt edilip analizi yapılır. Bu yöntemle günlük 10.000 bazdan fazla DNA dizisi analiz edilebilmektedir.

Prenatal Tanı: Kordosentez ile alınan kandan elde edilen nötrofillerin DHR 123 yöntemi ile oksidatif fonksiyonunun analizi ile prenatal tanı konulabilir. Bu işlem ikinci trimesterde yapılır (58). Bir ailede daha önce mutasyonu bilinen bir vaka varsa (hamileliğin 6. haftasında) korionik villus biyopsisi ile elde edilen DNA'dan mutasyon bölgesinin direkt sekanslanması ile erken dönemde kesin sonuca ulaşmak mümkündür.

2.1.5.4 Ayırıcı Tanı

Nötrofil fonksiyonunu etkileyen bazı hastalıklar klinik seyir olarak KGH ile karışabilmektedir. Bunlardan lökosit adezyon eksikliğinde (LAD) kemotaksis bozuktur, LAD1 de CD18 eksik olup adezyon fonksiyonu gerçekleşmez, LAD 2 de (E ve P-selectin için sialyl-Lewis X eksik olup) ise rolling gerçekleşmemektedir. Myeloperoksidaz ve IFN-gamma reseptör eksikliğinde öldürme fonksiyonu gerçekleşmez. Chediak-Higashi sendromunda ise mikrotübül yapısı defektiftir ve kemotaksis gerçekleşmez. Ayrıca, sarkoidoz granülomatoz yapısı ile sık karışan hastalıklardandır. NBT testi ve DHR 123 testi KGH ayırımında kullanılan temel testlerdir.

2.1.6 Klinik Tedavi

2.1.6.1 Genel Kurallar

Hastaların BCG aşısı dışında bütün rutin aşıları yapılmalı, cilt yaralanmalarında yüzeysel antiseptikler kullanılmalıdır. Diş sağlığına önem verilmeli ve mukozal yüzeyler korunmalıdır. Mantar sporlarından korunmak için çürümüş bitki ve ağaç parçalarının batmasından korunmak gereklidir. Gerektiğinde kronik hastalık anemisine yönelik önlemler alınmalıdır.

2.1.6.2 Enfeksiyonlara Yönelik Profilaksi (Korunma)

KGH hastalarında profilaksi mutlak gereklidir. Katalaz pozitif bakteri kaynaklı enfeksiyonları önlemede profilaksi ajanı olarak trimetoprim-sulfametoksazol kullanılmaktadır. Mantar enfeksiyonlarına özellikle de aspergillus karşı itraconazol koruyucu etkiye sahiptir (59, 60). Hastalarda yapılan retrospektif çalışmalar profilaksinin ağır enfeksiyonları azalttığını göstermiştir (59). Bir araştırmada profilaksi ile otozomal resesif olan hastalarda mantar orijinli olmayan enfeksiyonlar için her 100 ayda enfeksiyon sayısı 7.1 den 2.4 e, X-linked olanlarda ise 15.8 den 6.9 a düştüğü gösterilmiştir (60).

2.1.6.3 Tedavi

İnterferon Gamma: Enfeksiyon etkenine yönelik uygun antibiyotik tedavisine ek olarak destekleyici tedavide kullanılan bir ajandır. IFN- γ nın reaktif oksidan ürünlerinden özellikle hidrojen peroksit (H_2O_2) sentezini artırdığının gösterilmesi KGH tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir. (61). IFN- γ X⁺-KGH vakalarında, otozomal resesif hastaların çoğunda ve X⁰-KGH hastalarının %30 unda etkilidir (62, 63). X⁺-KGH olan hastalarda yapılan bir çalışmada arka arkaya iki gün cilt altına 100 $\mu g/m^2$ IFN- γ verilmesinin nötrofillerde süperoksit sentezini 5-10 kat artırdığı gösterilmiştir. Bu etki 2 haftadan fazla sürmüş ve bakterisidal aktivitede artışa neden olmuştur. Ayrıca, sitokrom *b* ekspresyonu normalin %10-50 si kadar artmıştır (64).

KGH hastalarında IFN- γ profilaksisi etkisini oksidan ajanlardan bağımsız antimikrobal yolların aktivasyonu ile de sağlar. IFN- γ verilmesi; TNF- α sentezini, tryptophan metabolizmasını, granül protein sentezini ve MHC-II ekspresyonunu artırır (65). Normal kişilere IFN- γ verilmesinin fagositlerde Fc γ R1 reseptörünü artırarak fagositozu artırdığı ve monositlerde β_2 -integrin ekspresyonunu artırarak fagosit trafiğini iyileştirdiği gösterilmiştir (66). IFN- γ nin aktif enfeksiyon sırasında yararı konusunda henüz doğrulayıcı bir çalışma yoktur.

Çok merkezli, randomize, çift kör ve plasebo kontrollü olarak yapılan bir çalışmada 128 hastada (%67 X-linked ve %33 otozomal resesif) IFN- γ profilaksisi (50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ cilt altı olarak haftada üç kez) uygulanmış ve bu profilaktik tedavinin ağır enfeksiyon sayısını %70 azalttığı ve her iki grup hastada da etkin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaların aksine IFN- γ profilaksisi verilen ve plasebo grubunda yer alan hastalar arasında reaktif oksidan üretimi, sitokrom *b* ekspresyonu ve *in vitro* bakteriyel öldürme yönünden bir fark bulunmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalar sonucu, IFN- γ nin NADPH oksidaz fonksiyonuna ya da onun proteinlerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir (67, 68).

Granülosit Transfüzyonu: KGH da fagositlerin (%3-5) az bir kısmının fonksiyonel olmasının hastalığın tedavisinde yeterli olması bu destekleyici tedavi yöntemine de başvurulmasına yol açmıştır. X-linked taşıyıcılarda %3-5 lik sağlıklı nötrofil düzeyine rağmen hastalığın görülmemesi bu düzeyin korunma için yeterli olabileceği fikrini desteklemiştir (69, 70). Laboratuvar çalışmalarında da KGH lı nötrofillere az sayıda normal nötrofil eklendiğinde *A.fumigatus* un öldürülebildiği gösterilmiştir (71). Ciddi bakteriyel ve fungal enfeksiyonları, granülosit transfüzyonu ile başarılı olarak tedavi edilen KGH vakaları bildirilmiştir (72, 73). A İkinçioğulları ve arkadaşları (74) da invaziv aspergillozis olan 3 hastayı granülosit transfüzyonu ile başarı ile tedavi ettiklerini bildirmişlerdir. Granulosit transfüzyonu genellikle iyi tolere edilir fakat yan etki olarak ateş, pulmoner lökositoz (özellikle amfoterisin B ile aynı zamanda verilirse) ve lökoagglutinin gelişimi sonucu nakledilen

granulositlerin hemen ölmesi gibi yan etkiler de görülebilir. Granülosit transfüzyonu ile ilgili bir başka sorun da alloimmunizasyon olayıdır. Sistemik verilen granulositlerin hemen yıkılması durumunda mümkün olduğunda enfeksiyon bölgelerine lokal olarak verilmesinin yararlı olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (75).

Kök Hücre Nakli: KGH'ın hematopoietik kök hücrelerdeki defektten kaynaklandığı ve teorik olarak %5 donör hücresinin hakim olduğu kimerik yapının KGH tablosunu önlemede yeterli olabildiği bilindiğinden kök hücre nakli ile tedavi edilmesi gündeme gelmiştir (76). Kök hücre transplantasyonunun mortalite ve morbidite ile ilgili yan etkileri gün geçtikçe azalmaktadır. Kök hücre nakli için en uygun hastalar, antibiyotik ve IFN- γ korumasına rağmen ciddi enfeksiyonu olan ve HLA uygun kardeşi bulunanlardır. Şimdilik HLA uygunluğu olmayan kardeşlerden kök hücre nakli tavsiye edilmemektedir. Kök hücre nakli öncesinde enfeksiyonun kontrol altına alınmış olması gerekir, aksi halde yaygın enfeksiyon tablosu gelişebilmektedir (77).

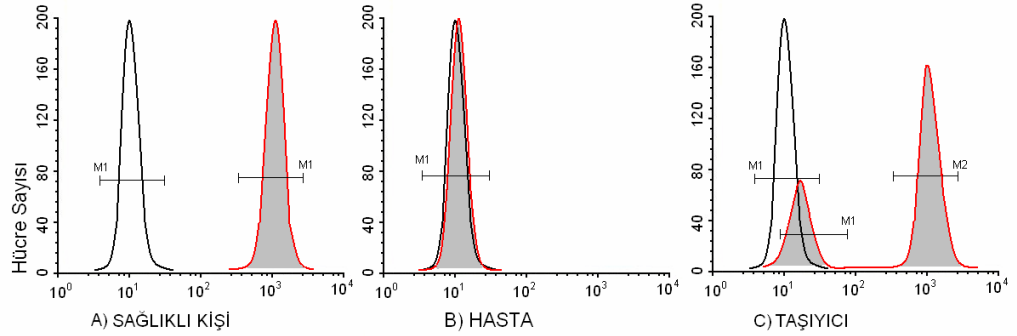
Gen Tedavisi: Gen tedavisindeki amaç biyolojik olarak yeterli düzeyde fagosit üretebilecek geni düzeltilmiş myeloid öncü hücre grubu elde etmektir. KGH da hematopoietik kök hücreler, gen tedavisi için ideal bir hedeftir (69, 70). Bunun başlıca nedenleri; a) az miktarda normal fagositin vücut savunması için yeterli olabilmesi ve ciddi enfeksiyonları önleyebilmesi (X-linked KGH taşıyıcılarından elde edilen bilgilere göre), b) KGH ta yeterli düzeyde normal fagosit üretebilecek geni düzeltilmiş myeloid kök hücre engraftmenti elde etmenin mümkün olması, c) NADPH oksidazın kısımlarını oluşturan proteinlerin genleri ve ilgili defeklerinin sekans analizi ile tanımlanması, d) uygun genin transferi ile EBV–transforme B hücre kuşağı ve monositlerde NADPH oksidaz defektini düzeltilmesi ve eksik proteinin yeniden ekspresyonunu sağlayabildiğinin gösterilmesi, e) X-linked ve otozomal resesif KGH formlarında kök hücre öncülerinde uygun geni taşıyan retroviral vektörler ile NADPH oksidaz aktivitesinin başarı ile düzeltilebilmesidir (70-80).

Son yapılan çalışmalardan birinde p47^{phox} defekti olan 5 hastada otolog CD34⁺ periferik kök hücrelere *in vitro* olarak retroviral vektörler ile p47^{phox} cDNA sı transfer edilmiş ve bu geni düzeltilmiş kök hücreler hastaya verilmiştir (70, 81). DHR 123 akım sitometri ile yapılan analizde gen transferi yapılmış granülositler, infüzyondan 3 ile 6 hafta sonra periferde en yüksek düzeye ulaşmıştır. Gen transferi yapılmış granülositler dolaşımdaki granülositlerin yaklaşık %0.004 ile %0.05 inı oluşturmuştur. Beş hastanın ikisinde, geni düzeltilmiş granulositler, infüzyondan 6 ay sonrasında da grlmştir. Ancak, nötrofil ömrünün çok kısa olması nedeniyle geni düzeltilen hücreler bir süre sonra ölmektedir. Bu nedenle gen tedavisi süreklilik isteyen bir yaklaşımdır. Ağır veya sık enfeksiyonlar sırasında kullanılabileceği düşünülmektedir.

2.1.7 KGH Taşıyıcıları ve Liyonizasyon Sapması

Embriyonik yaşamın ilk günlerinde (12-15 gün) maternal ve paternal kaynaklı her iki X kromozomu da aktiftir. Sağlıklı kadınlardaki her somatik hücrede bulunan iki X-kromozomundan birisi erken embriyonik gelişim döneminde (blastocyst evresi) inaktive edilir. Yaklaşık 1000 hücrelik bir evreye ulaşınca inaktivasyon tamamlanır. İnaktivasyon karakteri mitozla oluşan sonraki hücrelere aynen geçer. Bu hipotezi ilk açıklayan Lyon'a göre inaktivasyon maternal ve paternal orijinli X-kromozomunda rasgele "*random*" meydana gelir. Kadınlardaki hücreler %50 maternal %50 paternal X kromozomunun eksprese olduğu mozaik yapıya sahiptir (82, 83). X-kromozom inaktivasyonu genetik hastalıkların ve neoplazmaların patogenezinin anlaşılmasında oldukça önemli bir kavramdır. X kromozom inaktivasyon işlemi DNA metilasyonu ile sağlanır, paternal ve maternal X kromozomunda %50 oranındadır. Metilasyona uğrayan X kromozomu inaktive olur, hücre çekirdeğinin bir kenarında elipsoid kondens bir halde kalır ve "*Barr body*" olarak isimlendirilir. X kromozomunda bulunan ve iki adet metilasyon sensitif *HpaII* restriksiyon bölgesi olan human androgen reseptor gen (HUMARA) analizi ile paternal veya maternal X kromozomundan hangisinin inaktif olduğu belirlenebilmektedir.

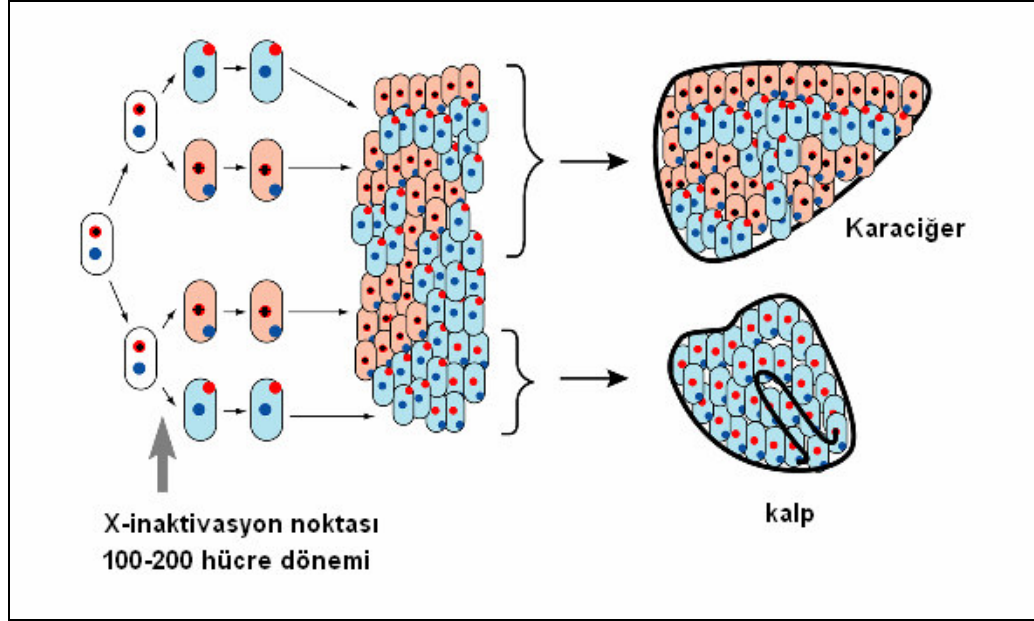
X kromozom inaktivasyonu (liyonizasyon)'a bağılı olarak, X-linked resesif KGH taşıyıcılarında periferik kanda iki nötrofil grubu gözlenir. Bu mozaik pattern (iki nötrofil grubu) X-linked KGH taşıyıcılığının saptanmasını sağlar. Bu nötrofillerden sağlam X kromozomu taşıyan ve DHR 123 testinde histogramda sağda bulunan zirve normal, solda y eksenine yakın bulunan zirve ise defektif X kromozomu olan nötrofilleri gösterir (şekil 2.1.7.1.) (56). İki nötrofil grubu arasındaki oran taşıyıcı bireyler arasında değişmektedir.



Şekil 2.1.7.1. KGH'da DHR 123 Histogram Görünümü, A) Sağlıklı Kişi, B) Hasta C) Taşıyıcı

Embriyonik gelişim sırasında X kromozomu inaktif olan hücrelerin seçiminin rastgele olmasına bağılı olarak bazı doku öncülleri sadece maternal ya da paternal X kromozomu taşıyan klonlardan oluşur ve taşıyıcı kadınlarda bazen X-linked resesif hastalıklar ortaya çıkabilir (şekil 2.1.7.2.).

Sağlıklı kadınların çoğunluğunda X-inaktivasyon düzeyi %50 olmakla beraber % 21-31'inde de X inaktivasyonunda sapma beklenmektedir. Liyonizasyon sapmasının bir nedeni X inaktivasyonu esnasında kök hücre havuzunun küçük olmasıdır. Bu nedenle inaktivasyon düzeyi dokudan dokuya değişebilir. Embriyonik dönemde inaktivasyonun oluşumu haftalar içinde gerçekleşir. İnaktivasyon süreci kan hücre progenitörlerinde en erken başlar. Bu nedenle, kan hücrelerinin aynı X kromozomu taşıyan klondan gelme ihtimali daha fazla olup liyonizasyon sapması diğer dokulardan çok daha fazla gözlenir (84).



Şekil 2.1.7.2. X-inaktivasyonuna Bağlı Klonal Seçim. (Embriyonik yaşamın 2. haftasında başlar sayı olarak 1000 hücre düzeyine ulaşıncaya kadar tamamlanır.)

1990'lı yıllara kadar her bir bireyde liyonzasyon oranının yaşam boyu sabit olduğu kabul ediliyordu. Son çalışmalarda, hemotopoetik hücrelerde liyonzasyon oranında sapmanın sonradan kazanılabileceği (*acquired skewing of lyonization*) ve yaşa bağımlı olabileceği gösterilmiştir (84).

Liyonzasyon oranındaki sonradan oluşan kazanılmış sapmanın X-linked KGH taşıyıcılarında ileri yaşlarda ortaya çıkan ciddi enfeksiyonlardan sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Nitekim Roesler ve arkadaşları (84) bir X-linked KGH taşıyıcısının, 20 yaşında normal nötrofil düzeyi %40 iken 25 yıl sonraki değerlendirilmesinde bu oranın %6 düzeyine indiğini ve KGH bulguları ortaya çıkmış olduğunu gösterdiler. Lun ve arkadaşları (85) da daha önce bir şikâyeti bulunmazken 43 yaşında ciddi apseler nedeni ile takibe alınan X-linked KGH taşıyıcısı olan bir kadında liyonzasyon sapması sonucu KGH bulgularının görüldüğünü bildirmiştir.

ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada, Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Pediatrik İmmünoloji Polikliniği'ne başvuran, 19 aileden NBT testi ile KGH düşünülen 23 hasta ve 53 hasta yakını, ayrıca 18 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 94 kişiden, EDTA lı tüpe alınan periferik kan örneği DHR 123 testi ile akım sitometrede çalışıldı. DHR 123 testi ile KGH tanısı alan 19 hasta (16 aileden) ve her çalışmada birer sağlıklı kontrolden kan örneği NADPH oksidaz bileşenlerine özgün antikorlar kullanılarak alt grup tayini amacıyla akım sitometrede çalışıldı. Ayrıca, alt grubu belirlenen 9 hasta (7 aile) ve 1 sağlıklı kontrol olmak üzere 10 kişide periferik kan örneğinden steril koşullarda total hücresel DNA izolasyonu yapılarak genomik DNA dan sekans analiz yöntemi ile mutasyon taraması yapıldı.

3.1. Aletler (Teçhizat)

Çalışmada kullanılan aletler; Hettich universal D-7200 santrifüj cihazı (Hettich-Universal Tuttlingen, Germany), Hettich Rotanta 460 / 460 R santrifüj cihazı, sıcak su banyosu, pipet, FACSCalibur akım sitometre (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), kapiller PCR cihazı (Idaho Technology, Idaho Falls, ID, USA), liner PCR termal cycluser cihazı, ABI prism 3100 XL genetik analiz cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler

Amonyum klorid, sodyum bikarbonat, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Ca, Mg ve fenol red içermeyen Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Bovin Serum Albümin (BSA, Fraksiyon V, A-9418), NBT (Nitroblue tetrazolium), katalaz, dihydrorhodamine 123 (DHR 123), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Sigma St. Louis, USA dan temin edildi.

"IntraPrep Permeabilization Reagent" kit (18-24 °C) (Immunotech Beckman-Coulter Marseille, France), unkonjuge monoklonal antikorlar; MoAb 7D5 (Dr Nakamura, Nagasaki Japonya'dan, Dr Dirk Roos Amsterdam, Hollanda eliyle hediye), MoAb 449 (Sanquin, Amsterdam The Netherlands), poliklonal antikorlar; p47 ve p67 (Upstate Serologicals Company Waltham,

MA, USA), konjuge izotipik kontrol (IgG1-FITC) (340755 BD), sekonder antikor FITC ile konjuge goat anti-mouse IgG1 (Fab2) antikor (GAM-FITC) ve FITC ile konjuge goat anti-rabbit antikor (GAR-FITC) (BD Biosciences Immunocytometry Systems, cat:349031 ve cat:610083, San Jose CA, USA), DNA izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Germany), fosfat ile tamponlanmış tuzlu çözelti (Phosphate buffered saline, PBS), 100 bp lik DNA lader, ethidyum bromür, saf etanol, yükleme solüsyonu (biorad 5X) Sigmadan, DNA PCR kiti, (goldTaq polimeraz, antiTaq polimeraz, dNTPs, Gold buffer), "sephadex" G-50 superfine resin (cat:17-0041-01, Amersham, Piscataway, NJ, USA), GFX-PCR DNA ve jel purifikasyon kiti (cat:27-9602-01, Amersham), BigDye terminator kit Applied Biosystem'den temin edildi.

3.3. Yöntemler

3.3.1. NBT Testi

NBT solüsyonunun hazırlanışı; 20 ml %0,9 luk NaCl, (10 µl) 20 µg PMA stok, 1,7 ml %20 lik serum albumin, 25 µg nitroblue tetrazolium boyası.

Stok PMA nın hazırlanışı; 1 mg PMA 500 µl DMSO içinde seyreltilerek ml de 2 µg PMA içeren stok solüsyon elde edildi.

EDTA'lı tüpe alınan 2 ml lik periferik kan örneklerinden 200 µl plastik tüplere konuldu. Üzerine önceden hazırlanan NBT solüsyonundan 200 µl eklenerek sıcak su banyosunda 20 dakika 37 °C de inkübe edildi. Örnekler, oda ısında 10 dakika bekletildikten sonra ayrı ayrı lamlara yayılarak kurumaya bırakıldı. Lamlar kuruduktan sonra giemsa ile boyandı, bir dakika bekletildi ve distile su ile yıkanarak bir dakika daha bekletildi. Boya kuruduktan sonra yaymalara mikroskopta 1x100 lük alanda bakılarak reaksiyon veren koyu mavi renge boyanan fagositlerin sayımı yapıldı.

3.3.2. DHR 123 Testi ile KGH Hastalarının Tanısı

Solüsyon ve Kimyasalların Hazırlanması:

Lizis Çalışma Solüsyonu; 500 ml distile su, 41.5 gr amonyum kloride, 4.2 gr sodyum bikarbonat, 10 ml 0.5 M EDTA karıştırılarak lizis stok solüsyonu elde edildi. 1 birim lizis stok solüsyonu / 9 birim distile su ile karıştırılarak lizis çalışma solüsyonu elde edildi.

HBSS buffer; 100 ml HBSS, 0.1 gr albümin fraksiyon V, 200 µl EDTA (PH:8.0) karışımı ile elde edildi ve aynen kullanıldı.

Katalaz; 28 mg katalaz, 400 µl HBSS ile karıştırılarak stok solüsyon elde edildi. 130 µl HBSS buffer içine 10 µl stok katalaz konuldu ve ml de 1000 U katalaz içeren solüsyon elde edildi.

DHR 123; 10 mg DHR 123 ile 1 ml DMSO (dimethyl sulfoxide) karıştırıldı. Elde edilen 29 mM DHR 123 çalışma solüsyonu aynen kullanıldı.

PMA; 1 mg PMA 500 µl DMSO içinde seyreltilerek ml de 2 µg PMA içeren stok solüsyon elde edildi. 5 µl stok solüsyon 2 ml HBSS ile seyreltildi ve son konsantrasyonu 5 ng/ml olan PMA çalışma solüsyonu elde edildi.

Fagositik Hücrelerin Hazırlanması:

Vowells SJ ve arkadaşlarının, kullandığı yöntem modifiye edilerek deney gerçekleştirildi (54, 55). EDTA lı tüpe alınan 2 ml lik periferik kan örneklerinden 200 µl 5 ml lik flow tüpüne konuldu. Üzerine 1:10 oranında olacak şekilde, 2 ml lizis çalışma solüsyonu ilave edilerek oda ısısında 5 dakika bekletildi. Hafifçe sallanarak ve alt-üst edilerek eritrositlerin lizis'i sağlanan tüp daha sonra oda ısısında 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Dipte kalan hücreler üzerine 2 ml HBSS buffer eklendi ve 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. HBSS buffer ile yıkama işlemi iki kez tekrarlandı ve fagositik hücreler eritrosit kalıntılarından temizlenerek DHR 123 testi için hazır hale getirildi.

Hücrelerin PMA ile Stimülasyonu

Eritrositlerden kalıntılarının uzaklaştırıldığı ve lökositlerin bulunduğu tüpe, içerisinde 2 µl DHR ve 5 µl katalaz bulunan 400 µl HBSS buffer ilave edildi. Tüp içeriğinin karışması hafif sallanarak ve alt üst yapılarak sağlandı. Daha sonra, 37 °C de sıcak su banyosunda 5 dakika inkübe edilen hücreler 200 er µl olarak, iki ayrı flow tüpüne bölündü. Tüplerden birine 50 µl PMA diğerine ise aynı miktarda HBSS buffer eklendi. Karışması için tekrar sallanan tüpler 37 °C de 14 dakika inkübasyona bırakıldı ve bekletilmeden akım sitometrede analiz yapıldı.

Akım Sitometrede Analiz

Cellquest yazılım kullanılarak yapılan 18-20.000 hücrenin sayıldığı analizde FL1 350 ve kompanzasyon sıfır olarak seçildi. Canlı nötrofiller etrafında “gate” oluşturulan analizde, normal ve defektif hücre dağılımı histogram olarak görüntülendi. Histogram görüntülerinde X eksenini floresan yoğunluğu (intensity), Y eksenini ise hücre sayısını gösterdi. X ekseninde; 10^1 değeri defektif hücrelerce oluşturulan floresan yoğunluğu 10^3 değeri ise normal hücrelerce oluşturulan floresan yoğunluğu göstermektedir. Histogramlarda nötrofil gruplarının (M , M_1 , M_2) sınırları belirlenerek her zirve için analiz detayları ayrı ayrı elde edildi.

Stimülasyon (uyarı) İndeksi (SI)

PMA ile uyarılan “stimule” örneklerde elde edilen floresan yoğunluğun geometrik ortalamasının uyarılmayan “unstimule” örneklerde elde edilen floresan yoğunluğun geometrik ortalamasına oranı ile stimülasyon indeksi (SI) bulundu. SI bir hücrenin PMA ile uyarılınca inaktif durumuna göre kaç kat daha fazla oksijen radikali ürettiğini göstermektedir (55). Stimülasyon indeksi normal sağlıklı nötrofil sayısına bölünerek, nötrofil aktivitesi hakkında bilgi edinmek üzere her bir nötrofil için SI değeri (SI_1) elde edildi.

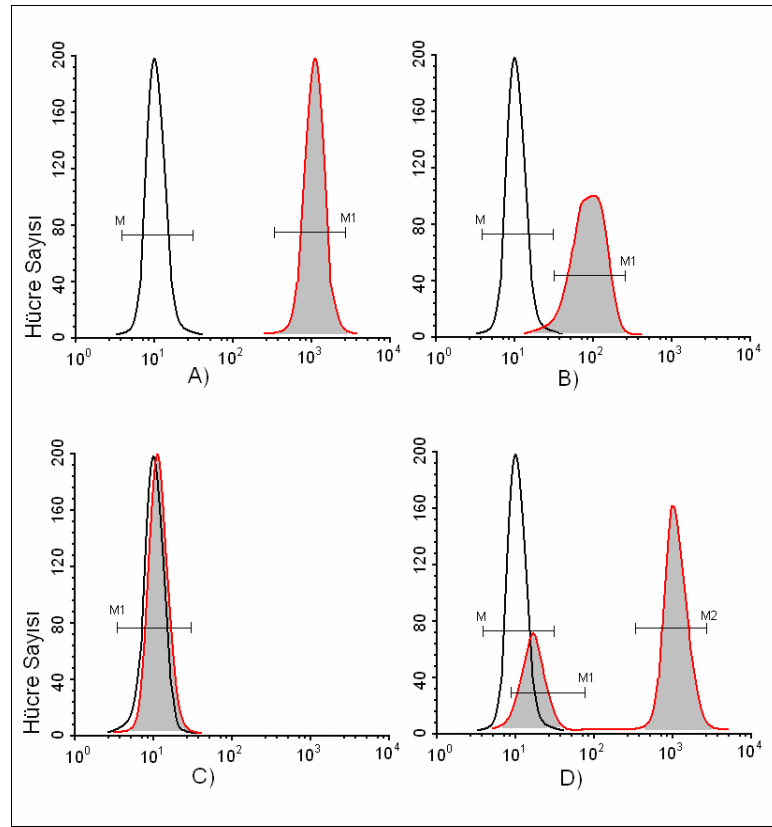
Varyasyon katsayısı (coefficient of variation)

Stimüle hücrelerin histogramda x eksenini üzerindeki floresan yoğunluğunun varyasyon katsayısı (VK) akım sitometride elde edildi. Bu değer p47 formunda yüksek ($VK; \geq 70$) X-linked formda daha düşük ($VK; 19-$

39) olarak bulunur. Varyasyon katsayısı X-linked ile p47 formunun ayırımında ayrı bir parametre olarak kullanıldı (55).

Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen histogram görüntüleri ve SI değerleri hasta, taşıyıcı ve sağlıklı kişilerden önceki çalışmalarda elde edilen standart örneklerle kıyaslanarak; KGH, X-linked KGH taşıyıcılığı ve X-linked (gp91) ve otozomal resesif KGH (p47) ayırımının yapılması amacıyla kullanıldı (55, 56) (şekil 3.3.2.1). Hastalarda aktive olmamış veya çok az aktive bir nötrofil grubu, taşıyıcılarda ise aktive olan ve olmayan olmak üzere iki farklı nötrofil grubu ve sağlıklı kişilerde ise aktive olmuş bir nötrofil grubu görülmektedir (şekil 3.3.2.1).



Şekil 3.3.2.1 DHR 123 Testinde Standart Histogram Örnekleri; A) Sağlıklı Kontrol, B) Otozomal Resesif KGH (p47 defekti), C) X-linked Resesif KGH (gp91 defekti), D) X-linked Taşıyıcı.

3.3.3 Anti-human NADPH Oksidaz Komponent Antikorları Kullanılarak Membran ve Sitoplazmik Antijenlerin Boyanması ile KGH Alt Gruplarının Akım Sitometrede (FACScan) Belirlenmesi

“Permeabilization Kit”i ile (intraPrep reagent 1 ve 2) Nötrofillerin Fiksasyonu ve “Permeabilizasyon”u

Üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak intraPrep kiti kullanıldı. EDTA lı tüpe alınan periferik kan örneklerinden 100 µl alınarak 5 ml lik flow tüpüne konuldu. Üzerine 200 µl intraPrep reagent 1 hücrelerin fiksasyonu amacı ile eklendi. Tüp sallanarak iyice karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda ısısında (18–25 °C) karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreleri yıkamak için 2 ml Ca ve Mg içermeyen PBS eklendi ve oda ısısında 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Flow tüpünün dibinde kalan hücrelerin üzerine permeabilizasyon amacı ile 200 µl intraPrep reagent 2 eklendi. Hafifçe sallanarak karışması sağlandı ve oda ısısında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası antikorla işaretlemeye hazır hale gelen hücre süspansiyonundan 50 µl 4 alt grup tüpüne ve izotip tüpüne dağıtıldı.

Unkonjuge Primer Antikor ile Fagositik Hücrelerin Membran ve Sitoplazmik Antijenlerinin İndirekt İmmün Boyaması

Alt grup tüplerine membran komponent gp91 için MoAb 7D5 (1:100) 10 µl ve p22 için MoAb 449 (1:100) 10 µl olmak üzere fare “*Mouse*” orijinli unkonjuge spesifik antikor, izotip tüpüne 5 µl fare orijinli izotip (negatif) kontrol (Ig1-FITC) (nonspesifik (irrelevant) antikor) eklendi. Ayrı tüplere sitoplazmik komponentin işaretlenmesi için tavşan “*Rabbit*” orijinli unkonjuge spesifik poliklonal p47 antikor (1:100) ve p67 antikor (1:1000) 10 ar µl ayrıca izotip kontrol tüpüne 5 µl tavşan orijinli izotipik (negatif) kontrol (IgGs-FITC) (nonspesifik (irrelevant) antikor) eklendi. Tüpler karışması için hafifçe sallandı ve 15 dakika oda ısısında (18–25 °C) karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon tamamlanınca her tüpe fazla antikorları yıkamak için 2 ml PBS eklendi ve 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Cellquest yazılımı ile 5.000 hücre sayılarak analiz yapıldı.

Konjuge Sekonder Antikor ile İşaretleme ve Akım Sitometrede Analiz

İzotip tüpleri hariç alt grup tüplerine 2 şer µl gp91 ve p22 için sekonder antikor olarak FITC ile konjuge “goat anti-mouse” IgG1 (GAM-FITC) ve p47 ve p67 için FITC ile konjuge “goat anti-rabbit” (GAR-FITC) eklendi ve karışması için hafifçe sallanarak 15 dakika oda ısısında (18-25 °C) karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon tamamlanınca nonspesifik bağlanmaların temizlenmesi için her tüpe 2 ml PBS eklendi ve 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Dipte kalan hücrelerin üzerine 500 µl PBS ilave edildi. Akım sitometrede 5000 hücre sayılarak analiz edildi. Analiz sonucunda 4 alt grup proteinin özgün antijenlerine yönelik antikorlarla boyanan hücre yüzdesi belirlendi. Sonuçlar cellquest yazılım ile değerlendirildi ve ilgili proteinin ekspresyonunun olup olmadığı incelenerek hastanın defektinin hangi KGH alt grup eksikliği olduğu belirlenmeye çalışıldı.

Bu araştırmanın yeni uygulanması nedeni ile anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla alt grup tanısında, sınır olarak hangi ekspresyon yüzdesinin alınacağı konusunda standart bir değer yoktu. Bu nedenle en düşük ekspresyonun (tüm antikorların değerleri birbirine çok yakınsa bu yönde bilgi edinilemez) defektif olan alt grubu ifade edebileceği kabul edildi.

3.3.4 KGH Hastalarda Sekans Analizi ile Mutasyonun Belirlenmesi

a) Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu

Qiagen protokolüne göre; 300 µl kan örneği, 30 µl proteinaz K ve 300 µl buffer A1 eppendorf tüp içine konularak, karıştırıldı ve 56 °C de 10 dakika inkübasyonda tutuldu. Üzerine 200 µl saf alkol eklendi, karıştırılarak spin-kolon'a konularak 8000 rpm de 1 dakika çevrildi. Alt kısım tüpü yenisi ile değiştirilerek 500 µl AW1 buffer eklendi ve 1 dakika 8000 rpm de çevrildi. Alt kısım tüpü yenisi ile değiştirilerek 500 µl AW2 buffer eklendi ve 3 dakika 14000 rpm de çevrildi. Spin-kolon tüpünün üst kısmı eppendorf tüpe yerleştirilerek üzerine 310 µl AE buffer eklendi ve 1 dakika 8000 rpm de çevrildi. Eppendorf tüp içinde ayrılmış olan DNA kullanılmak üzere saklandı.

b) gDNA'dan Mutasyon Taranacak Ekson DNA sının (Ekson Spesifik PCR ile) Elde Edilmesi

PCR için Solüsyon Hazırlanması

Ependrof tüp içine 1.5 µl 10 x "Gold buffer", 6.3 µl deiyonize steril distile su, 0.4 µl 5 U/µl goldTaq polimeraz, 0.2 µl antiTaq polimeraz, 0.6 µl 200 mM dNTPs, 0.5'er µl 40 pM primer'ler eklenerek PCR için solüsyon hazırlandı (tablo 3.3.4.1). Elde edilen karışım 30 saniye santrifüj edilerek tamamen karışması sağlandı ve üzerine 5 µl gDNA eklendi.

Tablo 3.3.4.1 *CYBB* Geni Ekson Spesifik PCR Solüsyonunun İçeriği

Madde	Hacim	(+) Kontrol	(-) Kontrol
ddH ₂ O (deiyonize distile su)	6.3 µl	+	+
10 x "GoldBuffer"	1.5 µl	+	+
AntiTaq	0.2 µl	+	+
GoldTaq	0.4 µl	+	+
dNTPs	0.6 µl	+	+
Ekson Sens Primer	0.5 µl	Su	+
Ekson Antisens Primer	0.5 µl	Su	+
Toplam PCR Mastır sol	10.0 µl		
DNA	5.0 µl	+	Su

Tablo 3.3.4.2 *CYBB*, Ekson Spesifik PCR için Primer Kombinasyonları

<i>Sense primer</i>	<i>Antisense primer</i>
Exon 1 5'-GCT GGT TAG TTA AAA AGT TAT TTC ACT GTG - 3'	5' - GAT AAC CCC AGA AGT CAG AG - 3'
Exon 2 5'-CCA GTC TTG TGT GGA ATC TAC TGT GGA AAT GCG G-3'	5' - TGT GAC CAG CCA ATA TTG CAT G - 3'
Exon 3 5'-CCT CAT GCT AAG AAC CTT GG - 3'	5'-TTGATGGCCTTTGAAAATTAGAGGAACCTTAG-3'
Exon 4 5'-TT AAC AAT TAC TAT TCC ATT CTT TCC CCC-3'	5'-CTATGAATAGAGGGA ACTCCCTGG TTCCAA G-3'
Exon 5 5'-GCT GTC CCA GAA ACC CAG CTT AC - 3'	5' - TCT AAG TCA GAT AAT GAG AGG-3'
Exon 6 5'-GTG AAA ATA TCT ATT GTT CTA TAC ATA GGA CAC-3'	5' - GGA CAT GAA ATC CTT CAC TTC AG - 3'
Exon 7 5'-TCC TAT TAC TAA ATG ATC TGG - 3'	5' - TAC ATG TTT CTT AGA CAC AGG - 3'
Exon 8 5'-CCT CTG AAT ATT TTG TTA TCT ATT ACC AC - 3'	5' - TTA GAC ACT GAC CAC TAG T - 3'
Exon 9 5'-CCA TAT GAC TAA AAA GGC AAG - 3'	5' - CCT GAA CAC ATA TAC GTT GG - 3'
Exon 10 5'-TGA AGA GCA AGA CAT CTC TGT AAC TA - 3'	5' - ACT GCT CTA AGG CCC TCC GAT AAA T - 3'
Exon 11 5'-GTG GAA TTC CAC ATG GTA ATG - 3'	5' - GTC ACT ATG GAA GGA CCT GAG - 3'
Exon 12 5'-CTG AAT TCA TGT CCT TTC CTG - 3'	5'-GGC AGA TGC AAG CCT CAA AAA CAT C-3'
Exon 13 5'-TAC CTG CTT GTA GAC ATC TCA T-3'	5'-AGCATTATTTGAGCATTGGCAGCACAAACCCACA-3'

CYBA geninin analizinde tablo 3.3.4.1 deki solüsyonlara ek olarak her bir örnek için 1.2 µl DMSO eklendi. PCR reaksiyonunda aşağıda belirtilen sentetik oligonükleotidler (primer) kullanıldı (tablo 3.3.4.2) (tablo 3.3.4.3) (87).

Tablo 3.3.4.3 *CYBA*, Ekson Spesifik PCR için Primer Kombinasyonları

<i>Sense primerler</i>	<i>Antisense primerler</i>
Intronik primerler	
1LA ccagccgggttcgtgc	1RA2 tggcgccccacttccccaccctgt
2LA8 ggtggcccacagtagtagagaa	2RA8 gctcactgtgaagtggctcccca
	2RA6 cgcccacccagcctcag
3LA ctgagctgggctgttcctt	3RA ccaccaaccctgtgagc
4LA caaaggagtcccagtgagg	4RA gctccaagccctcctgag
5LA ccctgggtctgcagctgcct	5RA ccaggctcacactgtcctcca
5LB cctgagacttgttgccct	5RB ggcttcaaggccatgctgtg
6LA5 cctctctgagtgccagtcaca	6RA3 cggccttcgctgcgttta
6LB cctgtcccagggccccta	6RB atgcaggtgggtgcacct
Exonik primerler	
cDNA 1F ATGGGGCAGATCGAGTGGGCCAT	cDNA 2F CTCATCACCGGGGGCATCGT
	cDNA 2R GAAGCGCCCAGCTGTGGCCACGAT
	cDNA 3R GGGTACTCCAGCAGGCACACAA
	cDNA 4R GATGCAGGACGGCCCGAACAT
cDNA 5F CTGCTGGCCACCATCCTTGGGA	
cDNA 5F2 CTGGCCATTGCGAGCGGCA	
cDNA 6F CAGATCGGAGGCACCATCA	cDNA 6R TCACACGACCTCGTCCGGTCAC

Ekson Spesifik Kapiller PCR için Kullanılan Sıcaklık Ayarları

Hazırlanan PCR karışımı 10 cm uzunluğundaki kapiller içine alındı, uç kısımlar yakılarak kapanması sağlandı ve kapiller termal cycler'a konuldu. *CYBB* geni için PCR, 10 saniye 95 °C de denaturasyon, 30 saniye 52 °C de “annealing” ve 15 saniye 72 °C de “extension” basamağından oluşan 50 döngülük program ile yapıldı (tablo 3.3.4.2). *CYBB* geninden farklı olarak *CYBA* geni için PCR da sadece “annealing” ısı 60 °C olarak uygulandı. Diğer parametrelerin aynısı kullanıldı.

Tablo 3.3.4.4 Kapiller PCR için İnkübasyon Şartları, *CYBB* Geni

Basamak	Süre	Sıcaklık
1-“Denaturation”	10 saniye	95 °C]
2-“Annealing”	30 saniye	52 °C } 50 döngü
3-“Extension”	15 saniye	72 °C]
<i>Slope:9</i>		

Kontrollerin Hazırlanışı

Kontaminasyonu ve reaksiyonun işleyişini takip etmek için, negatif ve pozitif kontrol örnekleri kullanıldı. Bu amaçla PCR için örnekler hazırlanırken bir tüpe hücresel DNA yerine su (negatif kontrol), diğer bir tüpe de bilinen bir DNA örneği (pozitif kontrol) konuldu. Bu negatif ve pozitif kontrol örnekleri yalancı negatifliği ve pozitifliği değerlendirmede kullanıldı. Elektroforez sonucunda negatif kontrol örneğinde amplifikasyon olması kontaminasyon, pozitif kontrol örneğinde band oluşumu da deneyin doğru olduğunu gösterdi.

c) DNA Amplifikasyonunun Agaroz Jel Elektroforezinde Gösterilmesi

Elde edilen DNA örneklerine %2 lik agaroz jel elektroforezi uygulandı. Bu amaçla 1 gr agaroz jel, 100 ml TAE (tris asetik asit EDTA) solüsyonu (1x40 mM Tris asetat, 1x1 mM EDTA, pH: 8) ile karıştırılarak mikrodalga fırında kaynatıldı. Jelin 70 °C' ye kadar soğuması beklendi ve üzerine EtBr- 3 µl %10 luk ilave edilerek karışması sağlandı. Jel tankının tarafları yerleştirilerek içerisine jel döküldü. Soğuk odaya konulan jel tankında soğuyan jel üzerine, jel seviyesini geçene kadar TAE solüsyonu eklendi. Ekson spesifik PCR sonucu elde edilen 3 µl DNA üzerine 1 µl yükleme solüsyonu (bromofenol-blue, EDTA, sükröz, lauril sülfat) eklenerek jeldeki kuyucuklara konuldu. DNA lar 90-100v / 70-90 mA de 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonucu oluşan bandları değerlendirmek için 5 µl 100 bp lik DNA lader kullanıldı. Bandları görüntüleme amacıyla, jel kameralı ultraviyole transilluminatör sisteminde incelendi ve fotoğrafı çekildi. Amplifikasyonu olan örnekler, sekans analizi ile mutasyon taraması yapılmak üzere seçildi.

d) Elde Edilen DNA nın Purifikasyonu ve Lineer PCR'a Hazırlık

Big-Dye Primer Kullanarak: PCR dan elde edilen ekson spesifik amplifiye DNA primer'lerden temizlenmeden doğrudan kullanıldı. Plate'de bulunan her kuyuya 5 µl distile su ve üzerine 2 µl DNA eklendi. Bir başka plate'e 4 nükleotitden (dNTP) (DP(BD21M13)v1) 4 er µl olmak üzere her bir örnek için konuldu. Böylece her örnek için oluşturulan Adenin, Guanin,

Sitozin ve Timin bulunan kuyulara o örneğin DNA sından 1µl transfer edildi. Üzerine buharlaşmayı engellemek için özel kırmızı yağ eklendi ve liner PCR a geçildi.

Big-Dye Terminator Kullanarak: Bu yöntemde DNA nın PCR primerlerinden temizlenmesi gerektiğinden DNA “GFX-PCR DNA ve jel purification kit”i ile primer’lerden arındırıldı. Bu amaçla kullanılan spin-kolon tüpünün üst kısmına 5 µl DNA ve üzerine 50 µl “capture buffer” eklenerek 1 dakika 15000 rpm de santrifüj yapıldı. Daha sonra üst tüpe 500 µl etanol eklenerek 15000 rpm de 1 dakika çevrildi. Spin-kolon tüpünün alt tüpü yerine yenisi konuldu ve üst tüpe washbuffer eklenerek 15000 rpm de 1 dakika çevrildi ve yeni alt tüpte purifiye DNA elde edildi.

Dye-Terminatör mix; 4 µl su, 2 µl 5x squeBuffer ve 4 µl KB_3100_POP6_BDTv1.mob ile hazırlandı ve üzerine 1 µl (0,5s+0,5as) primer ile 10 µl pürifiye edilmiş DNA eklenerek liner PCR a geçildi.

e) Lineer PCR

Dye-Primer veya Dye-Terminatör işaretli PCR amplifiye ekson spesifik DNA bulunan plate, cihazın ısıtıcı ünitesine yerleştirildi. Dye-Primer için liner PCR; 10 saniye 95 °C de “denaturation”, 15 saniye 50 °C de “annealing” ve “*extension*” basamağından oluştu. 50 döngülük programda kalibrasyon 150 olarak çalıştırıldı (tablo 3.3.4.5). Dye-Terminatör için liner PCR; 10 saniye 95 °C de “denaturation”, 10 saniye 50 °C de “annealing” ve 3 dakika 60 °C de “*extension*” basamağından oluştu. 50 döngülük programda kalibrasyon 150 olarak çalıştırıldı (tablo 3.3.4.6).

Tablo 3.3.4.5 Dye-Primer için Liner PCR İnkübasyon Şartları

Basamak	Süre	Sıcaklık
1-“Denaturation”	10 saniye	95 °C
2-“Annealing” ve “Extension”	15 saniye	50 °C }50 döngü
3-Kalibrasyon 150		

Tablo 3.3.4.6 Dye-Terminatör için Liner PCR İnkübasyon Şartları

Basamak	Süre	Sıcaklık
1-“ <i>Denaturation</i> ”	10 saniye	95 °C]
2-“ <i>Annealing</i> ”	10 saniye	50 °C }50 döngü
3-“ <i>Extension</i> ”	3 dakika	72 °C]
Kalibrasyon 150		

f) Sefadeks ile Temizleme

Sekans analiz öncesi DNA nın büyük moleküllerden arındırılması için 96 kuyulu millipore plate ve sefadeks (MAHVN4550.G50 superfine) (cross-linked dextran içerir ve DNA yı büyük moleküllerden temizler, taq polimeraz gibi) kullanıldı. Plate üzerindeki kuyular sefadeks ile dolduruldu ve üzerine 300 µl su eklenerek 3–10 saat (liner pcr sonrasına kadar) sefadeksin suyu tutması için beklendi. Liner PCR sonrası su ile genişleyen sefadeksin olduğu millipore plate 5 dk 1800 rpm (21 °C) de santrifüj edilerek suyu süzüldü ve altına analiz plate yerleştirildi. Dye-Primer veya Dye-Terminatör işaretli PCR ürünü, sefadeks plate üzerine eklenerek 5dk 1800 rpm de santrifüj edilerek DNA nın büyük moleküllerden arındırılması(taq polimeraz dahil) sağlandı.

g) Sekans Yükleme Solüsyonunun Eklenmesi

Sefadeks ile purifiye olan ve analiz plate'inde elde edilen DNA, liner PCR da 20 dakika 90 °C de içeriğindeki suyun buharlaşması için bekledi. DNA örneklerinin bulunduğu analiz plate'inde her kuyuya 10 µl sekans yükleme buffer eklendi (Hi-Di formamide P/N4311320) ve 95 °C de 1 dakika ısıtılıp DNA zincir çiftinin ayrılması sağlandı ve ABİ 3100 e analiz için yerleştirildi.

h) ABİ 3100 Sekans Cihazının Analize Hazırlanması

Cihaz pre-run da çalıştırıldıktan sonra analiz yapılacak örneklerin listesi yapıp analiz protokolü hazırlandı (tablo 3.3.4.7). Standart sekans

işlemi 50 cm lik kapiller seçilerek yapıldı. Sekans işlemi 2.5 saatte tamamlanarak sonuçları analiz aşamasına geçildi.

Tablo 3.3.4.7. DyePrimer ve Terminatör için *BaseCaller* ve Primer Listesi

Sekans Kimyasalı	Basecaller	Dyeset/primer
ABİ Prism BigDye Primer v1.1	3100POP6SR.bcp	DP(BD21M13)v1
ABİ Prism BigDye Terminatör v1.0	KB.bcp	KB_BDTv1.mob

i) SeqScape v2.1.1 ile Sonuçların Analizi Yapılarak Mutasyon Taranması

Sonuçların 5.1 ABİ analiz programı ile ön analizi yapıldı ve mutasyon taraması için yeterli olan örneklerde SeqScape v2.1.1 yazılım kullanılarak araştırma yapıldı. Bu programla referans DNA dizileri ile örnek DNA dizileri otomatik olarak karşılaştırılarak farklılıklar araştırıldı ve mutasyonlar belirlendi.

3.4. İstatistik

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS programı kullanılarak yapıldı. Normal nötrofil düzeyi-yaş ilişkisi ve normal nötrofil düzeyi- her bir nötrofil için SI değeri arasındaki ilişki pearson korelasyon katsayısı (r) kullanılarak belirlendi ve anlamlılık yönünden p değeri hesaplandı.

BULGULAR

4.1. DHR 123 Testinin Optimizasyonu

Kan Örneklerinin Çalışma Zamanı ile İlgili Optimizasyon

EDTA lı tüpe alınan hasta ve kontrol periferik kan örnekleri 2, 6 ve 24 saat bekletilerek çalışıldı. Elde edilen sonuçlarda nötrofil fonksiyonlarında kısmi azalma dışında önemli bir farklılık gözlenmedi. Bunun üzerine gerektiğinde bazı hastalardan kargo ile kan örneği elde edilerek çalışma yapılabileceği belirlendi. Ayrıca, kan alımından sonra 48 saat beklendiğinde nötrofil fonksiyonunda kısmen azalma olduğu gözlemlendi. Çalışmalarımızda kan alımını takip eden ilk 6 saat içinde örneklerin çalışılması planlanarak örnekler arasında bu yönden bir farklılık oluşmamasına dikkat edildi.

Kullanılan Kan Miktarı ve Kimyasallar ile İlgili Optimizasyon

Bu aşamada 400 µL kanın çalışma için yeterli olduğu görüldü. Malzeme sarfiyatının azaltılması ve gerektiğinde daha az bir kan örneği ile de deneyin yapılabilirliğini incelemek amacıyla aynı deney 200 µL ve 100 µL kan örnekleri ile denendi. Her ikisinde de deneyin yeterli şekilde çalıştığı gözlemlendi. Bunun üzerine 200 µL kan örneği kullanımı ile deney aşamalarının görsel izleniminin 100 µL kullanımına göre daha kolay olması ve pipetaj hatalarının daha kolay fark edilebilmesi nedeniyle bu değer en uygun değer olarak seçildi. Deneyde kullanılan kimyasalların miktarı kan miktarına göre yeniden düzenlendi.

PMA Miktarının Optimizasyonu

Stimülasyon için kullanılan ve 3.2×10^3 nM lük konsantrasyonda hazırlanan PMA 25 µl, 50 µl ya da 100 µl olarak kullanıldığında sonuçlarda çok belirgin bir fark olmadığı gözlemlendi. Referans araştırmalara uygun olarak deney 50 µl PMA kullanılarak standardize edildi.

İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

37 °C de inkübasyon süresi 10-15 dakika arasında denendi. Birbirine benzer sonuçların her iki sürede alınması üzerine ve referans araştırmadaki 14 dakikalık süreye uyularak deney gerçekleştirildi. Ancak 37 °C de 15 dakikadan daha uzun süre beklendiğinde nütrofilerin bir kısmının fonksiyonunu kaybettiği görüldü. Ayrıca, akım sitometre cihazı analize hazırlanırken örneklerin oda ısısında 15-20 dakika daha beklemesinin sonuçlar üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı ve 37 °C yerine 22 °C lik oda ısısında inkübasyonda kısmi bir stimülasyonun olduğu ancak 14 dakikadan daha uzun bir süreye gerek duyulduğu gözlemlendi.

Akım (Flow) sitometrede analiz optimizasyonu

Stimüle edilmiş ve edilmemiş hücreler "*cellquest*" yazılımının olduğu cihazda FL1 350 değerinde iken ve kompanzasyon sıfırlanarak analiz edildi. Optimizasyon için 5000, 10,000 ve 20,000 hücre sayılarak analiz yapıldı. Elde edilen verilerin birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Hücre sayısının fazla olmasının hassasiyeti artıracakları düşünülerek her örnek için 18-20,000 hücre sayıldı.

4.2. Kontrol Grubunda DHR 123 Test Sonuçları

Kontrol grubu 10'u 3-10 yaş arasında, 4'ü 10-20 yaş arasında, diğerleri ise 25, 30, 41 ve 52 yaşında olan 11'i kadın 7'si erkek toplam 18 sağlıklı kişiden oluştu (tablo 4.2.1). Kontrol grubu yaşının median değeri 9 idi.

Tablo 4.2.1. Kontrol Grubu ve DHR 123 Değerleri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	NN Sayı	SI	SI ₁	VK
1	3	Erkek	17222	62	0.0036	27
2	3	Kız	17452	91	0.0052	33
3	4	Kız	17142	88	0.0051	46
4	5	Erkek	16642	100	0.0060	40
5	6	Erkek	18917	66	0.0035	29
6	6	Kız	18100	93	0.0051	25
7	7	Erkek	17909	70	0.0039	45
8	8	Kız	17105	65	0.0038	52
9	9	Kız	17250	75	0.0043	46
10	9	Erkek	18512	60	0.0032	25
11	10	Erkek	18831	92	0.0050	50
12	12	Erkek	18204	85	0.0047	30
13	15	Kız	18055	65	0.0036	44
14	18	Kız	17428	61	0.0035	33
15	25	Kız	14308	107	0.0074	37
16	30	Kız	18025	68	0.0037	27
17	41	Kız	17308	90	0.0051	47
18	52	Kız	18205	96	0.0052	41

SI: Stimülasyon İndeksi, SI₁: her bir nötrofil için SI, VK: Varyasyon Katsayısı, NN: Normal Nötrofil,

Kontrol grubunda periferik kan örneğinden yapılan DHR 123 testinde örneklerin hepsinde nötrofillerin tümünün sağlıklı nötrofil grubunda olduğu gözlemlendi (tablo 4.2.1.). Kontrollerin SI değeri 60-107 arasında (ortalama \pm

SD: 79.6 ± 15.4) bulundu. Kontrollerin SI_1 değeri 0.0032-0.0074 arasında (ortalama \pm SD: 0.0043 ± 0.0010) bulundu. Kontrollerde VK değeri 25-52 arasında (ortalama \pm SD: 37.6 ± 9.1) bulundu (tablo 4.2.1.).

4.3. Hasta ve Yakınlarında DHR 123 Test Sonuçları

KGH hasta grubu 2-18 yaşları arasında (ortalama \pm SD: 8.08 ± 5.15) olan, 10'u kız, 13'ü erkek, 19 aileden toplam 23 hasta içermektedir (tablo 4.3.1.). Ailelerden 12'sinde ebeveynler arası akrabalık varken 7 ailede akrabalık yoktu. Hastaların median yaş değeri 7 olarak bulundu. Hastalardan H7, H22 ve H23 çalışma devam ederken enfeksiyon nedeni ile kaybedildi.

Hasta örneklerinin DHR 123 testi ile elde edilen SI değerleri 1-10.6 arasında değişiyordu (ortalama \pm SD: 3.08 ± 2.97). Nötrofillerin PMA ile stimülasyonunun hastalardan 11 inde çok düşük düzeyde olduğu ($SI:1$), 5'inde SI 'nin 1.3-3.5 arasında ve 7'sinde ise 4-10.6 arasında olduğu gözlemlendi. SI değerleri NBT değerleri ile uyumlu bulundu.

Hasta örneklerinin DHR 123 testi ile analizinde stimüle hücrelerin histogramdaki x ekseninde dağılımının varyasyon katsayısı (VK): 25–92 arasında değişiyordu (ortalama \pm SD: 50 ± 21) (tablo 4.3.1.).

Annelerin tümü X-linked KGH taşıyıcılığı yönünden DHR 123 testi ile incelendi. Beş ailede, 8 erkek (H1-H8) hastanın annelerinden elde edilen histogramlarda X-linked taşıyıcılık ile uyumlu, hasta ve normal olmak üzere iki farklı (mozaik) nötrofil grubu (bimodal histogram) bulundu (tablo 4.3.1.). Annelerinde X-linked taşıyıcılık bulunan hastalarda ebeveynler arası akrabalık yoktu (tablo 4.3.1.).

Tablo 4.3.1. Hastaların DHR 123 ve NBT Değerleri

Aile No	Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Akrabalık	DHR 123 SI	VK	Ailede X-linked taşıyıcılık	NBT
A1a	H1	1	Erkek	-	1	31	+	2
A1b	H2	6	Erkek	-	1	25	+	2
A1b	H3	8	Erkek	-	1	28	+	0
A2	H4	5	Erkek	-	1	26	+	0
A3	H5	8	Erkek	-	1,8	49	+	1
A3	H6	6	Erkek	-	3,5	55	+	0
A4	H7	2	Erkek	-	1	44	+	0
A5	H8	0	Erkek	-	1,5	40	+	0
A6	H9	10	Erkek	+	3	78	-	1
A7	H10	9	Erkek	-	10	61	-	11
A8	H11	15	Erkek	+	7	80	-	9
A9	H12	8	Kız	+	5,2	92	-	4
A9	H13	4	Kız	+	4	78	-	4
A10	H14	15	Kız	+	10,6	60	-	7
A11	H15	13	Erkek	+	1	26	-	2
A12	H16	5	Kız	+	1	25	-	0
A13	H17	17	Kız	+	1,3	29	-	0
A14	H18	15	Kız	+	6	71	-	5
A15	H19	5	Erkek	+	1	45	-	0
A16	H20	18	Kız	+	1	29	-	0
A17	H21	7	Kız	+	1	37	-	1
A18	H22	4	Kız	+	1	59	-	2
A19	H23	5	Kız	+	4	64	-	2

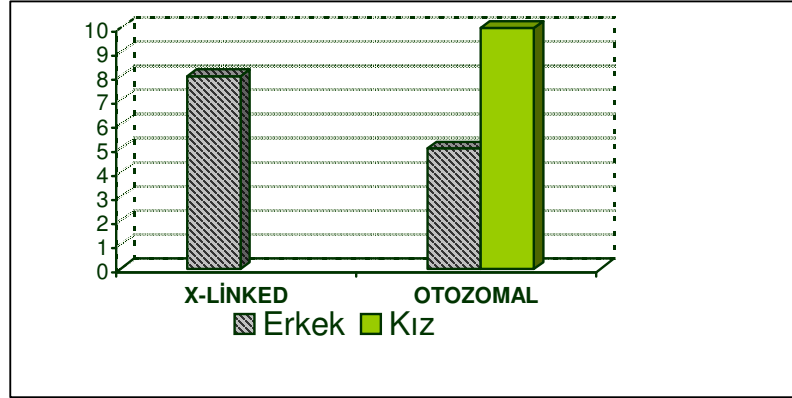
SI: Stimülasyon İndeksi VK: Varyasyon Katsayısı

4.4. DHR 123 Test Değerlerine Göre X-linked ve Otozomal Resesif KGH ayrımının yapılması

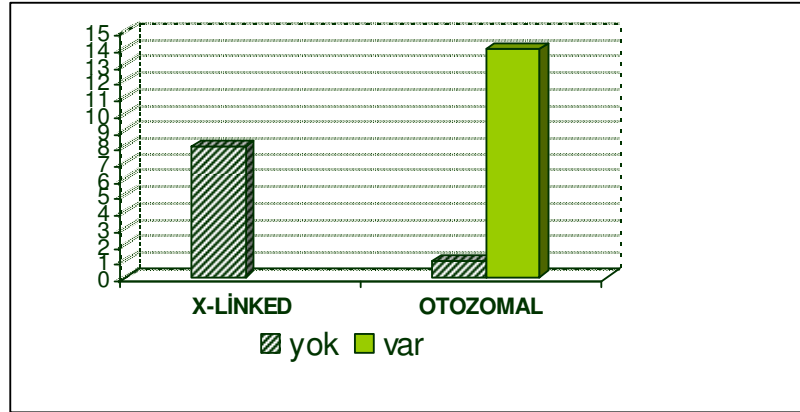
X-linked KGH, SI değerinin çok düşük olduğu ve annenin taşıyıcı olduğu erkek hastalarda ön planda düşünülür. Kız hastalar (n:10) ve annelerinde X-linked taşıyıcılık olmayan erkek hastalarda ön planda otozomal resesif KGH (p47, p22, p67) olabileceği düşünülür. Otozomal resesif KGH düşünülen 15 hastadan bir erkek hasta (H10) hariç hepsinde (n:14), ebeveynlerin arasında akraba ilişkisi olması da bu görüşü destekledi (şekil 4.4.2.). Bunlardan SI değerleri nispeten yüksek bulunanlarda ise p47 defekti düşünülür.

p47 defekti düşünülen 8 hastada (H9-H14, H18, H23) DHR 123 SI değerleri 3-10.6 (ortalama \pm SD: 6.22 \pm 2.81) ve VK değerleri 61-92 aralığında (ortalama \pm SD: 73.28 \pm 11.92), p22, gp91 ya da p67 defekti olabileceği düşünülen diğer 7 hastada (H15-17, H19-22) ise SI:1-1.3 (ortalama \pm SD: 1.04 \pm 0.11) ve VK:25-59 aralığında (ortalama \pm SD: 40.12 \pm 16.98) idi.

Annelerin tamamında X-linked KGH taşıyıcılığı incelendi ve sadece 5 ailede annelerin taşıyıcı olduğu gösterildi. SI değerleri çok düşük olan bu hastalar, annelerindeki taşıyıcı özelliğe bağlı olarak (H1-H8) X-linked resesif gp91 defekti olarak kabul edildi (tablo 4.3.1.) (şekil 4.4.1). X-linked gp91 defekti olarak kabul edilen hastalarda (n:8) SI:1-3.5, (ortalama SI \pm SD: 1.48 \pm 0.87) ve VK:25-55 (ortalama VK \pm SD: 37.25 \pm 11.38) aralığında idi. Bu grupta VK değerleri kontrol değerlerine çok yakındı. Diğer erkek hastaların (H9,10,11,15 ve 19) annelerinde ise X-linked taşıyıcılık bulgusu olan bimodal histograma rastlanmadı.



Şekil 4.4.1. Hastaların Kalıtsal Özelliğine ve Cinsiyete Göre Dağılımı, DHR
123 Testine Göre



Şekil 4.4.2. Hastaların Ebeveyn Akrabalık Durumuna Göre Dağılımı, DHR
123 Testine Göre

4.5. X-Linked gp91 Defekti Olan Ailelerde, Taşıyıcılık ve Normal Nötrofil Düzeyinin Yaş ve Her bir Normal Nötrofil için SI_1 ile İlişkisi

DHR 123 testi ile 6 ailede 9 X-linked taşıyıcı saptandı. Taşıyıcılar 2-63 yaş aralığında 6 anne, 1 annecanne, 1 büyük annecanne ve 1 kız kardeş idi. Çalışılan diğer 2 teyze ve 1 kız kardeş taşıyıcı değildi (tablo 4.5.1) (şekil 4.5.1) (şekil 4.5.2). Taşıyıcıların tamamı sağlıklı olmakla beraber, aile1 de anne ve annecanne zaman zaman lenfadenopatiler, lupus benzeri lezyonlar ve fotosensitivite olduğu öğrenildi.

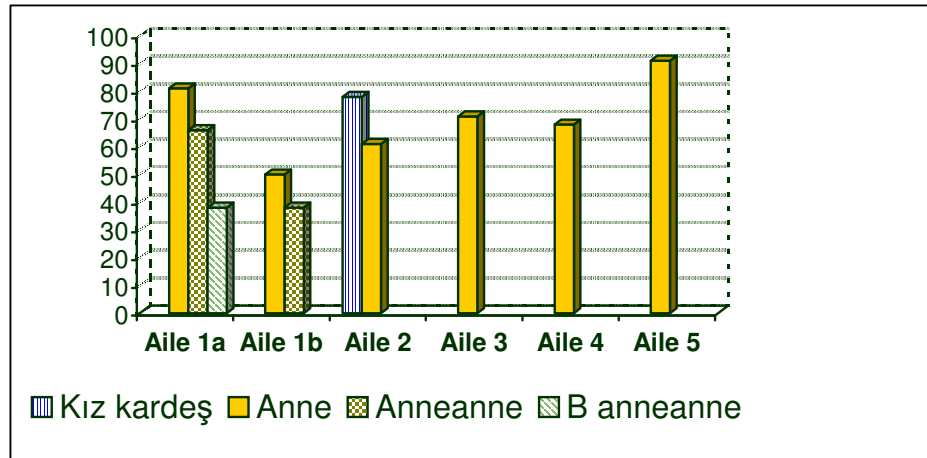
Normal ve defektif nötrofil oranları yönünden taşıyıcılar arasında farklılık olduğu gözlemlendi. Bir ailede (aile 1) aynı X geni taşıyan taşıyıcı bireylerin defektif nötrofil düzeyleri de farklı olup %19-%62 arasında değişiyordu (şekil 4.5.1) (şekil 4.5.2). Böylece bireysel faktörlerin yanı sıra taşıyıcılarda defektif nötrofil yüzdesi üzerinde yaşın da etkili olabileceği düşünüldü. Yaş ve normal nötrofil düzeyi birlikte değerlendirildiğinde taşıyıcılarda normal nötrofil düzeyinde ileri yaşlarda azalma olduğu gözlemlendi (şekil 4.5.3.). İstatistiksel analizde yaş ile normal nötrofil düzeyi arasında anlamlı bir ilişki (ters korelasyon) olduğu saptandı ($r:-0.75$, $p:0.05$). Ayrıca aile 1b de annenin 1996 yılındaki NBT değeri 72 iken bu kişinin 2004 yılındaki NBT değerinin 58 olduğu belirlendi.

Ayrıca, taşıyıcılarda ileri yaşlarda normal nötrofil düzeyi (NND) azalırken SI değerlerinde azalma olmadığı gözlemlendi (tablo 4.5.1) (tablo 4.5.2.). Bu sayıca azalan normal nötrofillerin oksidatif kapasitelerindeki artışla ilişkili olabilir. Taşıyıcılarda bir nötrofil için stimülasyon indeksi (SI_1) 0.0043–0.0146 aralığında (ortalama \pm SD: 0.0078 ± 0.0032) bulundu (tablo 4.5.2.) (şekil 4.5.4.). Kontrollerde ise SI_1 0.0032-0.0074 arasında (ortalama \pm SD: 0.0043 ± 0.0010) bulundu (tablo 4.2.1.). Taşıyıcılarda NND ile her bir normal nötrofil için SI_1 değeri arasında anlamlı bir ilişki (kuvvetli bir ters korelasyon) olduğu saptandı, $r:-0.88$, $p: 0.01$.

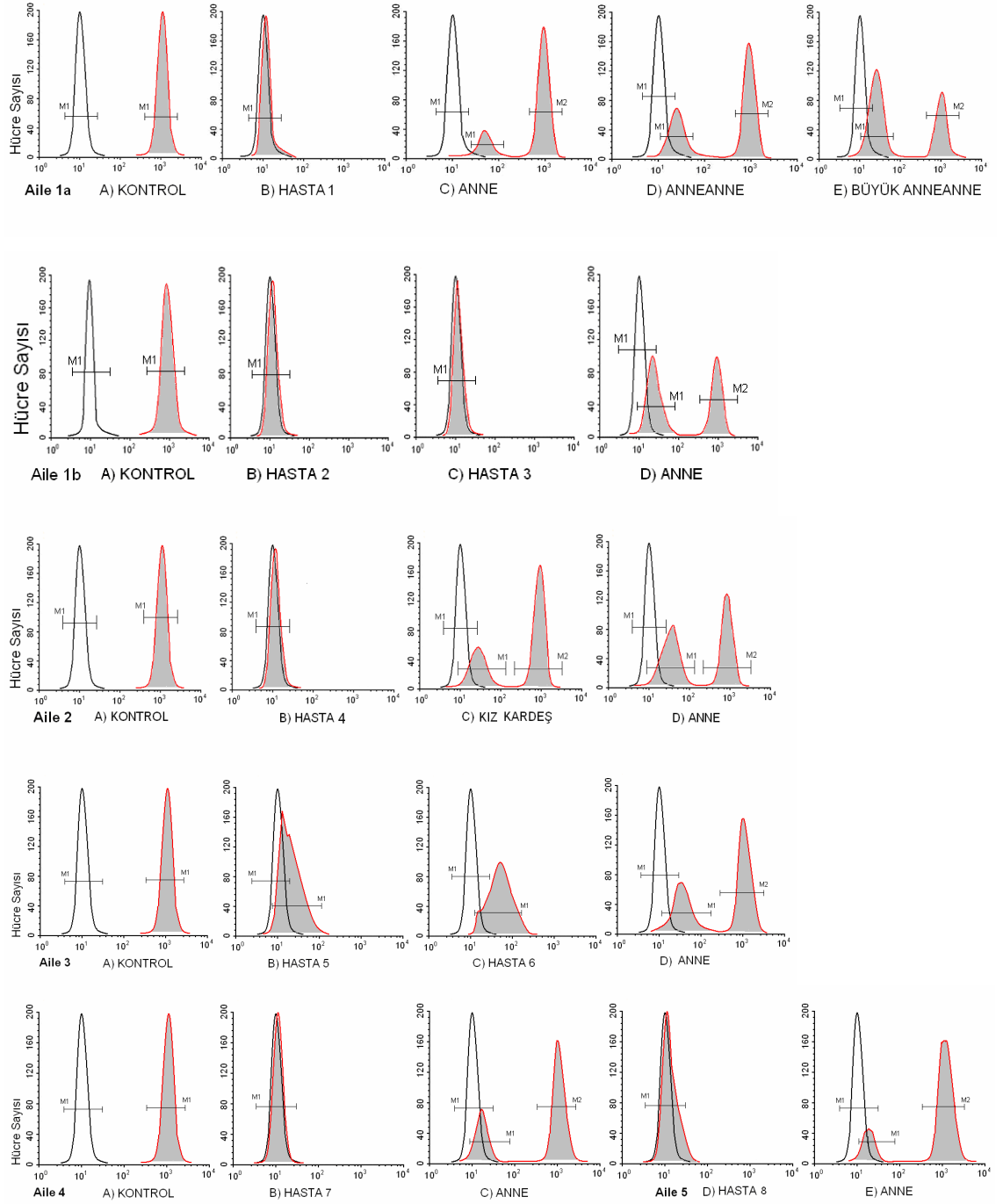
Tablo 4.5.1. X-linked Hasta Yakınlarının DHR 123 Değerleri

Hasta Yakınları	Yaş	Nötrofil		DHR 123 SI		TANI
		Defektif %	Normal	Defektif	Normal	
A1a Anne	25	19	81	4.4	63	Taşıyıcı
A1a Baba	26	0	100	0.0	104	Normal
A1a Anneanne	42	34	66	3.4	82	Taşıyıcı
A1a B.Anneanne	63	62	38	2.0	100	Taşıyıcı
A1b Anne	39	50	50	2.4	105	Taşıyıcı
A1b Baba	40	0	100	0.0	105	Normal
A2 Anne	27	39	61	4.0	102	Taşıyıcı
A2 Baba	30	0	100	0.0	105	Normal
A2 Kız kardeş	3	22	78	5.3	100	Taşıyıcı
A2 Teyze	38	0	100	0.0	92	Normal
A2 Teyze	40	0	100	0.0	105	Normal
A3 Anne	39	29	71	3.0	70	Taşıyıcı
A4 Anne	24	32	68	1.5	68	Taşıyıcı
A4 Baba	26	0	100	0.0	80	Normal
A4 Kız Kardeş	5	0	100	0.0	40	Normal
A5 Anne	23	9	91	10	93	Taşıyıcı

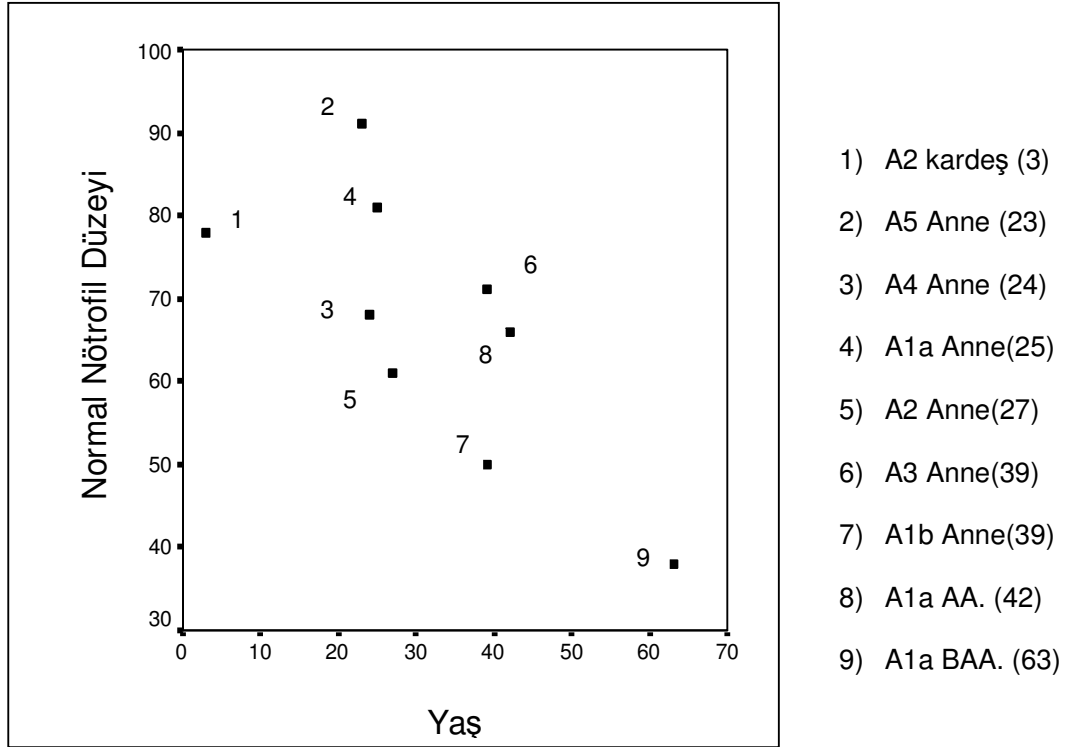
SI:PMN için stimülasyon indeksi



Şekil 4.5.1. X-linked Taşıyıcılarda Normal Nötrofil Düzeyleri



Şekil 4.5.2. X-linked KGH bulunan Ailelerde DHR 123 Histogram Görüntüleri; Aile1a-b, 2, 3 ve 4 deki Kontrol, Hasta ve Taşıyıcılar. İçi taralı olmayan histogramlar unstimüle nötrofilleri ve içi taralı histogramlar PMA ile stimüle nötrofilleri göstermektedir. Taşıyıcılarda stimülasyon sonrası iki ayrı zirve (bimodal histogram) görülmektedir.

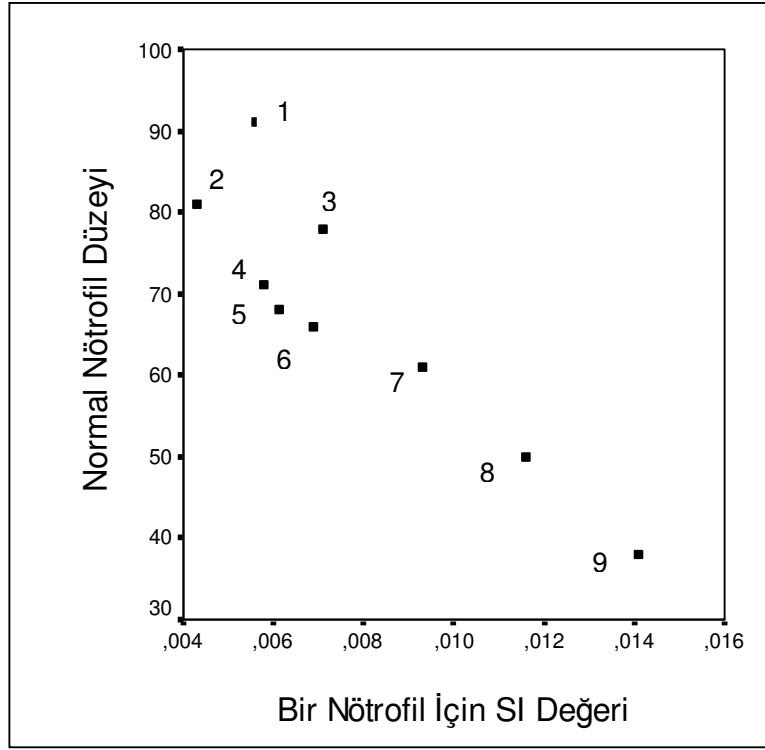


Şekil 4.5.3. X-linked Taşıyıcılarda Normal Nötrofil Düzeyleri ve Yaş İlişkisi

Tablo 4.5.2. X-linked Taşıyıcılarda Normal Nötrofil Düzeyleri, DHR SI ve SI₁

Taşıyıcı Aile No:	NN %	NN Sayı	Toplam DHR SI	Bir nötrofil için SI ₁
A1a Anne	81	14580	63	0.0043
A1a Anneanne	66	11880	82	0.0069
A1a B. Anneanne	38	6840	100	0.0141
A1b Anne	50	9000	105	0.0116
A2 Anne	61	10980	102	0.0093
A2 Kız kardeş	78	14040	100	0.0071
A3 Anne	71	12780	70	0.0058
A4 Anne	68	12240	73	0.0060
A5 Anne	91	16380	93	0.0056

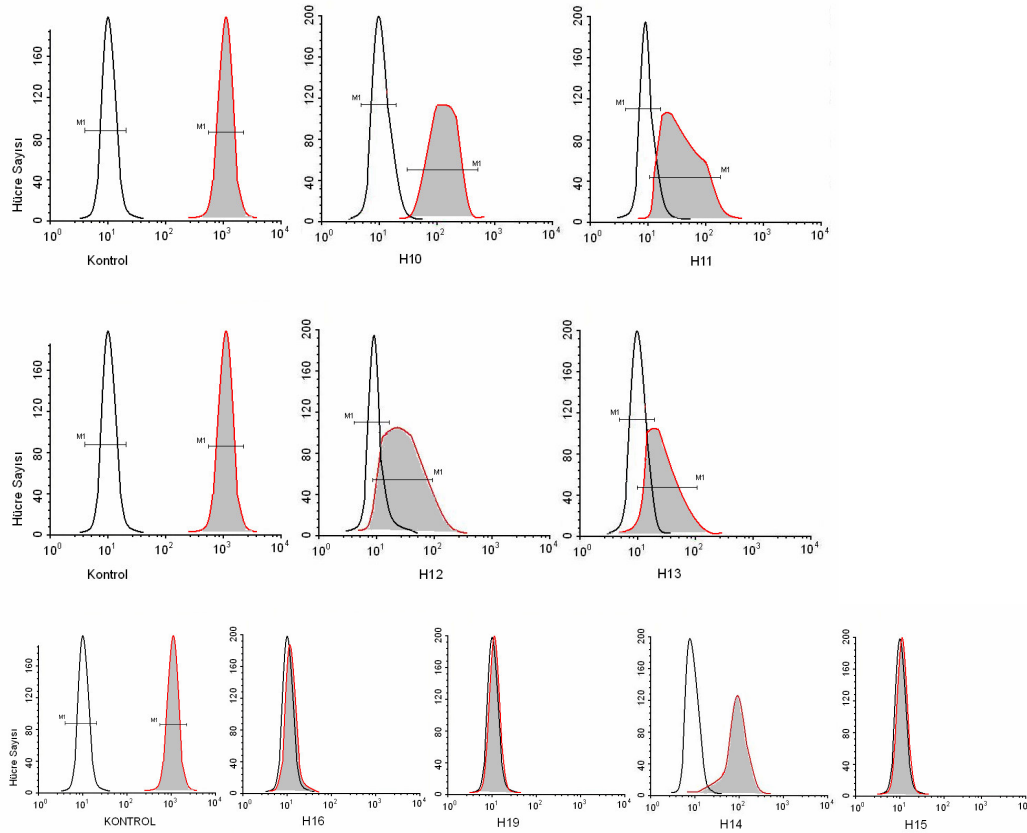
SI: Stimülasyon İndeksi, SI₁: her bir nötrofil için SI, NN: Normal Nötrofil



Şekil 4.5.4. X-linked Taşıyıcılarda Normal Nötrofil Düzeyi ve SI_1 ilişkisi. (SI_1 : Her Bir Nötrofilin Oksidatif Aktivitesidir.)

4.6 Otozomal Resesif KGH Düşünülen Hastaların Aile bireylerinde DHR 123 Test Sonuçları

Bu grupta yer alan ikisi kardeş 10 kız ve 5 erkek hastanın ailelerinde (n:14) DHR 123 testi ile analiz yapıldı. DHR 123 testi ile hastaların ebeveynlerinde (n:27) ve kardeşlerinde (n:9) sadece sağlıklı normal nötrofil grubunun olduğu (%100) saptandı (tablo 4.6.1.). Elde edilen SI değerleri sağlıklı kontrol örneklerinden elde edilen değerlerle benzer bulundu. A11, A12 ve A16 daki SI değerleri ise en düşük, kontrol SI değerinin biraz altında ancak, aynı gün çalışılan kontrollerin SI değerlerine yakın bulundu. SI değerlerindeki bu düşüklüğün deneylerdeki stimülasyon azlığından kaynaklanabileceği düşünüldü. Bu düşüklük tanıyı etkileyecek düzeyde değildi.



Şekil 4.6.1. Otozomal Hastalarda DHR 123 Histogram Görüntüleri, H10-13 (p47), H16 (p22), H19 (p67) ve (p22, gp91) ayrımı yapılamayan H14,15.

Tablo 4.6.1. Otozomal KGH Düşünülen Ailelerde DHR 123 Değerleri

Hasta yakınları	Normal Nötrofil %	DHR SI
A6 Anne	100	88
A6 Baba	100	65
A7 Anne	100	82
A7 Baba	100	80
A7 K kardeş	100	89
A7 K kardeş2	100	70
A7 Dede	100	65
A8 Anne	100	92
A8 Baba	100	70
A8 K kardeş	100	105
A9 Anne	100	66
A9 Baba	100	65
A10 Anne	100	61
A10 Abla	100	94
A11 Baba	100	55
A11 Anne	100	55
A11 Abi 1	100	56
A11 Abi 2	100	57
A12 Anne	100	56
A12 Baba	100	53
A12 E Kardeş	100	73
A12 E Kardeş2	100	68
A13 Anne	100	73
A14 Anne	100	63
A14 Baba	100	65
A15 Anne	100	85
A15 Baba	100	60
A16 Anne	100	54
A16 Baba	100	53
A17 Anne	100	66
A17 Teyze	100	55
A17 Anneanne	100	66
A18 Anne	100	58
A19 Anne	100	67
A19 Baba	100	90
A19 E kardeş	100	68
A19 E kardeş2	100	66

4.7. Özgün Antikorlar (anti-gp91, p22, p47, p67) ile KGH Alt Gruplarının Belirlenmesi

6 sı kız 13 ü erkek olmak üzere 19 hasta ve her bir deneyde 1'er sağlıklı kontrolde unkonjuge monoklonal ve poliklonal anti-NADPH oksidaz komponent antikorlar kullanılarak alt grup araştırması yapıldı. Alt grup proteinlerine özgün antijenleri hücre yüzeyinde ve içinde eksprese eden hücre yüzdeleri akım sitometre ile değerlendirildi.

Tablo 4.7.1. Anti-NADPH Oksidaz Komponent Antikorlar ile KGH Alt Gruplarının Belirlenmesi

Hasta No	%gp91	%p22	%p47	%p67	SI
H1	6	22	97	67	1
H2	4	4	98	69	1
H3	0	9	99	70	1
H4	5	5	100	67	1
H5	4	10	85	80	1,8
H6	9	15	86	83	3,5
H7	4	30	97	66	1
H8	9	5	95	81	1,5
H9	89	99	19	75	3
H10	97	99	20	74	10
H11	68	99	24	70	7
H12	85	90	2	72	5,2
H13	94	90	18	76	4
H14	6	6	75	72	10,6
H15	35	27	95	65	1
H16	5	4	97	63	1
H17	5	19	99	70	1,3
H18	94	98	39	71	6
H19	99	96	92	3	1
Kontrol	90-100	90-100	90-100	80-100	60-107

* Rakamlar herbir antikor ile boyanan hücre yüzdelerini ifade etmektedir.

Hastalardan 9 erkek ve 3 kız (H1-8, H14-17) toplam 12 sinde gp91 ve p22 phox ekspresyonu birlikte düşük bulundu. Bunlardan H15'te gp91 phox ekspresyonu %35, diğerler hastalarda %9'un altında bulundu. Kalan hastalardan 3 kız ve 3 erkekte (H9-H13, H18) (4 antikorla elde edilen değerler arasında) p47 phox ekspresyonu ve bir erkek hastada da (H19) p67 phox ekspresyonunun en düşük düzeyde olduğu bulundu (tablo 4.7.1.).

Araştırmanın yeni uygulanması nedeni ile hastaların anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla alt grup tanısı için kriter olabilecek önerilen bir ekspresyon yüzdesi mevcut olmadığından en düşük ekspresyonu olan proteinin esas defektif komponent olabileceği düşünüldü. Ancak bu kriterin birbirine çok yakın değerler olduğunda uygulanamayacağı dikkate alınarak gp91 ve p22 defektinin ayırımında DHR 123 test sonuçları ile birlikte değerlendirildi. DHR 123 testi ile annelerinde taşıyıcılık bulunarak X-linked gp91 defekti olduğu kabul edilen hastalarda (H1-H8) alt grup antikorları ile de gp91 ekspresyonu düşük (%0-9 arasında) bulundu ve tanı desteklendi. gp91 ve p22 ekspresyonu düşük (%4-19) bulunan diğer hastalardan 2'sinde (H16, H17) kız olmaları ve p22 ekspresyonunun daha düşük olması nedeni ile ön planda p22 defekti düşünüldü (tablo 4.7.2.).

DHR 123 SI değerine (10,6) göre p47 defekti ön planda düşünülen kız hastada (H14) anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla p47 ekspresyonu normal, gp91 ve p22 ekspresyonu çok düşük (%6) bulundu (bu sonuç westernblot analizinde p22 ve gp91 phox'a ait bant yokluğu ile de doğrulandı). Hastanın annesinde X-linked taşıyıcılığa rastlanmaması, kız olması ve 1. derece ebeveyn akrabalığı olması nedeni ile muhtemel tanının p22 defekti olabileceği düşünüldü. Ancak, SI değerinin yüksek olması nedeni ile ileri düzeyde liyonizasyon sapmasına bağlı gp91 defekti taşıyıcılığı da ekarte edilemedi. DHR 123 testi ile annede X-linked taşıyıcılık bulunamayan ve erkek olması nedeniyle ön planda otozomal defekt düşünülen H15 ise anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla her iki alt grup defektinin (gp91, p22) de olma ihtimali mevcuttu ve bu yöntemlerle bir ayırım yapılamadı. Hastalardan p47 protein ekspresyonu en düşük olan 3 kız ve 3 erkek olmak üzere toplam 6'sında (H9-H13, H18) p47 defekti düşünüldü (tablo 4.7.2.)

Hasta 20, 21, 22 sadece DHR 123 testine göre değerlendirildi ve kız olmaları ve DHR 123 testi ile elde edilen SI in 1-1.2 aralığında düşük bir değerde olması nedeniyle p22 veya p67 defekti olabileceği düşünöldü. Hasta 23 ün ise DHR 123 testi ile SI değeri diğerlerine göre nispeten yüksek (4) ve kız olması nedeni ile ön planda p47 defekti olabileceği düşünöldü.

Tablo 4.7.2. DHR 123 testi, anti-NADPH Oksidaz Antikor ile Alt Grup Analizi ve Cinsiyete Göre KGH Alt Grup Sınıflandırılması

Hasta No	Alt Grup Sonuçları				Sonucu Destekleyen Parametre		
	gp91	p22	p47	p67	DHR-T	Antikor	Cinsiyet
H1	gp91				+	**	
H2	gp91				+	**	
H3	gp91				+	**	
H4	gp91				+	**	
H5	gp91				+	**	
H6	gp91				+	**	
H7	gp91				+	**	
H8	gp91				+	**	
H9			p47			+	
H10			p47			+	
H11			p47			+	
H12			p47			+	
H13			p47			+	
H14	p22, gp91?					**	
H15	p22, gp91?					**	
H16		p22				**	+
H17		p22				**	+
H18			p47			+	
H19				p67		+	

** : p22 veya gp91 defekti,

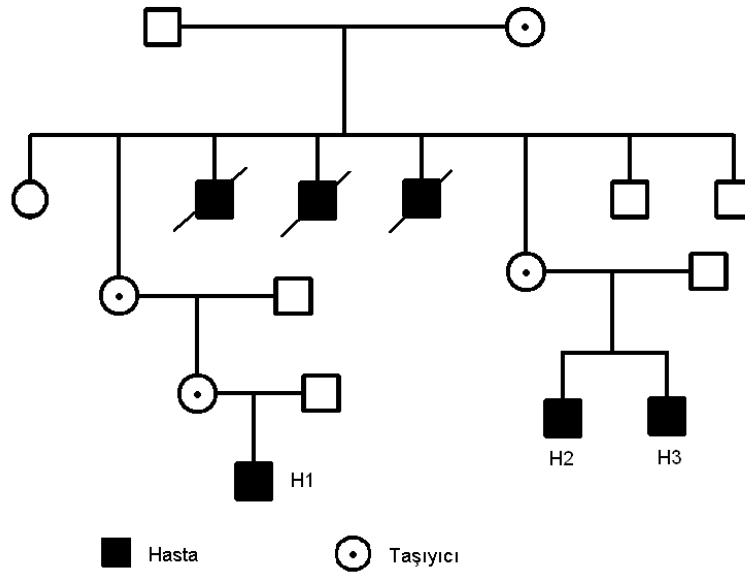
+ : sonucu destekleyen ana parametre

DHR-T : annede X-linked taşıyıcılık

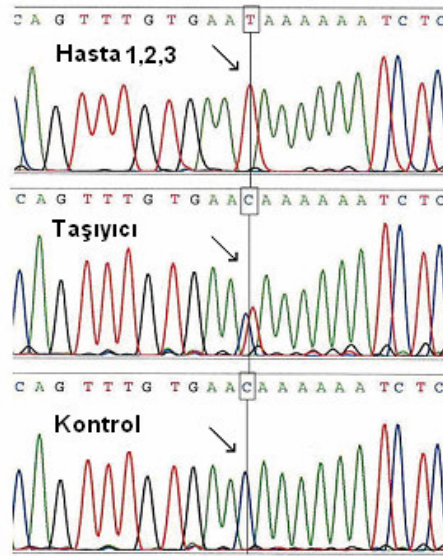
? : alt grup ayırımı tam olarak yapılamayan

4.8. Sekans Analizi ile Genomik DNA' da Mutasyon Taraması

DHR 123 testi ile tanısı konulan ve özgün antikorlarla akım sitometrede alt grup tayini yapılan 3 aileden (A1a, A1b, A2) X-linked gp91 defekti düşünölen 4 hasta (H1-4) ve 4 aileden (A6, A7, A8, A9) p47 defekti düşünölen 5 hastada (H9-13) sekans analizi ile mutasyon taraması yapıldı. *CYBB* geninin 13 eksonunun hepsinde ekson spesifik PCR ile genomik DNA dan mutasyon taraması yapıldı. Aile 1 de aynı X genine sahip 3 kuzen hastada 7. ekson 736'ncı nükleotitte sitozinin yerini timin'in aldığı (C736>T) tespit edildi (şekil 4.8.1.). Bu değışim sonucu 246. amino asit (aa) olan glutaminin (Q, gln) bağlandığı kodonun (CAA) stop kodona (TAA) dönüştüğü ve daha önce bilinen bir nonsense mutasyona neden olduğu tespit edildi. Bu ailenin taşıyıcılarında X kromozomunun allellerinden birisinde de aynı mutasyon tespit edildi (şekil 4.8.2). Aile 2 deki hastada ise 7. ekson 700'üncü nükleotitinde guanin yerini timin'in aldığı (C700>T) tespit edildi. Bu değışim sonucu 234. amino asit olan glutamate'in (E, glu) bağlandığı kodonun (GAG) stop kodona (TAG) dönüştüğü ve daha önce gösterilmemiş novel nonsense mutasyona neden olduğu saptandı (tablo 4.8.1) (şekil 4.8.2.) (şekil 4.8.4.).



Şekil 4.8.1. Aile1 Soy Ağacı



Şekil 4.8.2. Aile1'in *CYBB* gen Sekans Elektroferogramı, Hastalarda C736>T dönüşümü, kontrolde C736 sekansı ve taşıyıcılarda ise C736 ve T736 sekansı mevcut.

Tablo 4.8.1. KGH Tanısı Alan Hastaların Sekans Analizi Sonuçları

Aile No	Hasta No	Alt Grubu	Gen	Ekson	Mutasyon yeri	Mutasyon şekli
A1a	H1	X-linked	<i>CYBB</i>	7	C736>T	nonsense
A1b	H2	X-linked	<i>CYBB</i>	7	C736>T	nonsense
A1b	H3	X-linked	<i>CYBB</i>	7	C736>T	nonsense
A2	H4	X-linked	<i>CYBB</i>	7	G700>T	nonsense
A6	H9	p47	<i>NCF1</i>	2	ΔGT	*frameshift
A7	H10	p47	<i>NCF1</i>	2,7	ΔGT, G579>A	nonsense
A8	H11	p47	<i>NCF1</i>	6	G574A	**Splice defekt
A9	H12	p47	<i>NCF1</i>	6	G574A	**Splice defekt
A9	H13	p47	<i>NCF1</i>	6	G574A	**Splice defekt

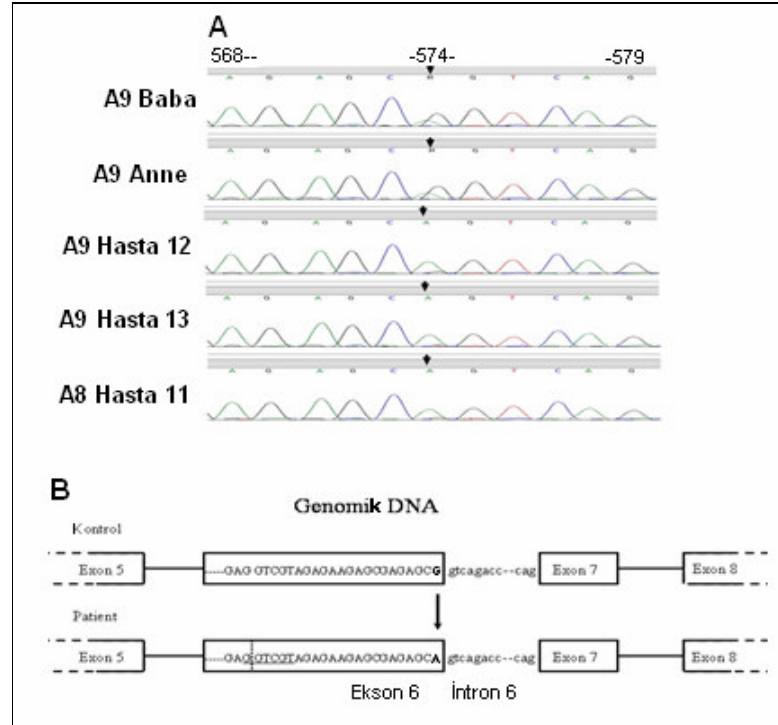
ΔGT: GT delesyonu *: çift mutasyonu, **: kes-yapıştır mutasyonu

*:frameshift mutasyon (şift): 3 veya daha az bazın değişimi ile oluşan şift (kayma) sonucu yanlış okuma ile stop kodunu oluşumu ve protein sentezinin durması.

**splice defekt (kes-yapıştır); (premRNA dan mRNA oluşum aşamasında intronlar atılıp, eksonlar birleştirilirken mutasyon nedeni ile bozuk işlem yapılır.)

DHR 123 testi ile otozomal KGH düşünülen ve fagosit oksidaz alt grup proteinlerine özgün antikorla p47 formu düşünülen hastalarda (H9, H10, H11, H12, H13) *NCF1* geninin 11 eksonun tamamında ekson spesifik PCR ile genomik DNA dan sekans analizi ile mutasyon taraması yapıldı. Hasta 9-13 da *NCF1* geninde mutasyon olduğu tespit edildi. P47 defekti olan hastaların %94'ünde görülen ve 198 bp uzunluğundaki normal gen yerine 196 bp lik pseudogenin yerleşmesi ile oluşan ikinci eksonun ilk dört nükleotidinde GT delesyonu (Δ GT) (GTGT→GT) H9'da homozigot, H10'da (hastada ebeveynler arasında akrabalık yoktu) ise heterozigot olarak bulundu. GT delesyonu frameshift mutasyon ile protein sentezinin erken sona ermesine yol açmaktadır. H10 nun diğer allelinde ise 7. ekson 579. nükleotitte guaninin yerine adenin'in yerleştiği (G579>A) saptandı. Bu mutasyon sonucu 193. amino asit olan tryptophan'ın (W, trp) bağlandığı kodonun (TGG) stop kodona (TGA) dönüştüğü ve nonsense mutasyona neden olduğu saptandı. Trp193 bağlanmasını engelleyen bu mutasyon homozigot olarak daha önce gösterilmiştir. Bizim hastamız ise Δ GT mutasyonu ile birlikte heterozigot G579>A mutasyonunun bir arada olduğu ilk hastadır. Nonsense mutasyonlar sonucu TAG, TAA ve TGA gibi stop kodonlarından biri oluşmakta ve ilgili protein sentezi durmaktadır.

H11, H12 ve H13 te 6. ekson 3' ucunda bulunan G574. (en son) nükleotiti guanin yerine adenin'in yerleştiği (G574>A) saptandı (şekil 4.8.3) (şekil 4.8.5). Bu mutasyon sonucu 192. amino asit olan glisin'in (G, gly) bağlandığı (GGT) kodonun (AGT) kodona dönüştüğü, yerine serin (S, ser) aa bağlandığı ve bu değişimin *splice defekt*'e neden olduğu belirlendi. Yapılan mRNA analizinde mRNA nın beklenenden 200 bp daha kısa olduğu gözlemlendi. G574>A mutasyonu daha önce bir erkek hastada bildirilmiştir.



Şekil 4.8.3 *NCF1* gen Sekans Elektroferogramı, A) H11-13, G574>A dönüşümü B) genomik DNA daki yeri.

```

505 CTGGCTGTGACCTGTTGGCAGGCATCACTGGAGTTGTTCATCAGCTGTGCCTCATATTA
169 -L--A--V--T--L--L--A--G--I--T--G--V--V--I--T--L--C--L--I--L-

565 ATTATCACTTCCTCCACCAAACCATCCGGAGGTCTTACTTTGAAGTCTTTTGGTACACA
189 -I--I--T--S--S--T--K--T--I--R--R--S--Y--F--E--V--F--W--Y--T-
                                     Ekson 6                                     Ekson 7
625 CATCATCTCTTTGTGATCTTCTTCATTGGCCTTGCCATCCATGGAGCTGAACGAATTGTA
209 -H--H--L--F--V--I--F--I--G--L--A--I--H--G--A--E--R--I--V-
                                     Hasta 4                                     Hasta 1,2,3
685 CGTGGGCAGACCGCAGAGAGTTTGGCTGTGCATAATATAACAGTTTGTGAACAAAAAATC
229 -R--G--Q--T--A--E--S--L--A--V--H--N--I--T--V--C--E--Q--K--I-
                                     234aa                                     246aa
745 TCAGAAATGGGGAAAAATAAAGGAATGCCCAATCCCTCAGTTTGTGAAACCCCTCCTATG
249 -S--E--W--G--K--I--K--E--C--P--I--P--Q--F--A--G--N--P--P--M-
                                     Ekson 8
805 ACTTGGAAATGGATAGTGGGTCCCATGTTTCTGTATCTCTGTGAGAGTTGGTGC GGTTT
269 -T--W--K--W--I--V--G--P--M--F--L--Y--L--C--E--R--L--V--R--F-

865 TGGCGATCTCAACAGAAGGTGGTCATCACAAGGTGGTCACTCACCCCTTTCAAACCATC

```

Şekil 4.8.4. *CYBB* geninde Mutasyon Noktaları; 7. ekson, G700>T, C736>T dönüşümü (nonsense mutasyon)

```

61 CCACCCAGTCAATGGGGGACACCTTTCATCCGTACATCGCCCTGCTGGGCTTTGAGAAGCG
.....-M--G--D--T--F--I--R--H--I--A--L--L--G--F--E--K--R
      1.Ekson          hasta 9,10          2.Ekson
121 CTTTCGTACCCAGCCAGCACTATGTGTACATGTTTCCTGGTAAAATGGCAGGACCTGTTCGGA
18 --F--V--P--S--Q--H--Y--V--Y--M--F--L--V--K--W--Q--D--L--S--E

181 GAAGGTGGTCTACCGGCGCTTCACCGAGATCTACGAGTTCATAAAACCTTAAAAGAAAT
38 --K--V--V--Y--R--R--F--T--E--I--Y--E--F--H--K--T--L--K--E--M

241 GTTCCCTATTGAGGCAGGGGCGATCAATCCAGAGAACAGGATCATCCCCACCTCCCAGC
58 --F--P--I--E--A--G--A--I--N--P--E--N--R--I--I--P--H--L--P--A

301 TCCCAAGTGGTTTGACGGGCAGCGGGCCGCCGAGAACCGCCAGGGCACAATTACCGAGTA
78 --P--K--W--F--D--G--Q--R--A--A--E--N--R--Q--G--T--L--T--E--Y

421 CTTCAAGGTGCGCCCTGATGACCTCAAGCTCCCCACGGACAACCAGACAAAAAAGCCAGA
118 --F--K--V--R--P--D--D--L--K--L--P--T--D--N--Q--T--K--K--P--E
      5. Ekson
481 GACATACTTGATGCCCAAAGATGGCAAGAGTACCGCGACAGACATCACCGGCCCCATCAT
138 --T--Y--L--M--P--K--D--G--K--S--T--A--T--D--I--T--G--P--I--I

541 CCTGCAGACGTACCGCGCCATTGCCAACTACGAGAAGACCTCGGGCTCCGAGATGGCTCT
158 --L--Q--T--Y--R--A--I--A--N--Y--E--K--T--S--G--S--E--M--A--L
      6.Ekson          H11-13 H10 7.ekson
601 GTCCACGGGGGACGTGGTGGAGGTCTAGAGAAGAGCGAGAGCGGTTGGTGGTTCGTCA
178 --S--T--G--D--V--V--E--V--V--E--K--S--E--S--G--W--W--F--C--Q

```

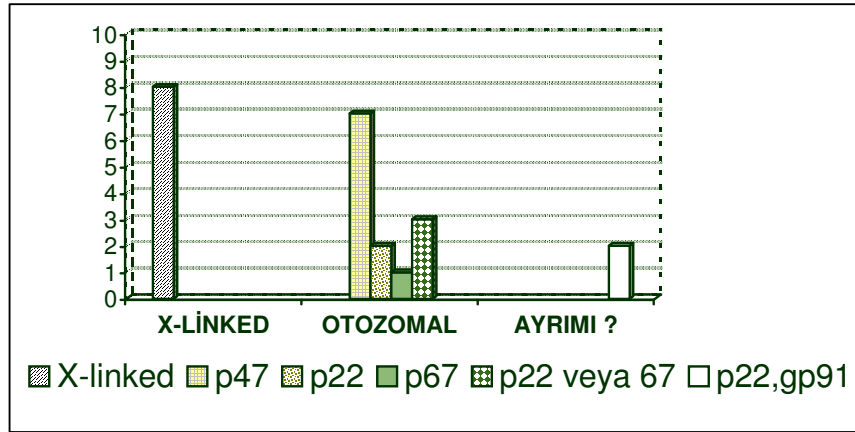
Şekil 4.8.5. *NCF1* geninde Mutasyon Noktaları; 2. eksonda delesyon, 6. eksonda splice defekt G574>A ve 7. eksonda G579>A dönüşümü ile nonsense mutasyon.

Sekans analizi ile tanıları kesinleşen 9 hastadan 4'ünde; DHR 123 SI, VK değerleri, anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla elde edilen sonuçlar ve annelerde taşıyıcılık bulunmasına göre X-linked KGH, 5'inde ise DHR 123 SI, VK değerleri ve anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla elde edilen sonuçlar ile otozomal p47 defekti düşünülmüştü. Bu değerlendirme sekans analiz sonuçları ile uyumlu bulundu.

Hasta (H15)'te DHR 123 sonuçlarına (SI:1) göre gp91, p22 veya p67 defekti ve özgün antikorlarla alt grup tayini sonuçlarına göre ön planda gp91 veya p22 defekti olabileceği düşünülmüştü. Hastanın annesinde X-linked taşıyıcılık bulunmaması, ebeveynlerin birinci derece akraba olmaları ve sekans analizinde *CYBB* geninde mutasyon bulunmaması nedeni ile bu hastada muhtemel defektin p22 de olabileceğine işaret ediyordu, kesin tanı için *CYBA* geninin sekans analizinin yapılması planlandı.

9.9. Tüm Sonuçların Birlikte Değerlendirilmesi

Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, 19 ailenin 5 (%26.3) inde X-linked form, 12 (%63.6) sinde ise otozomal form (p22, p47 veya p67) bulunduğu anlaşıldı. Ailelerden 2 (%10.1) sinde ise otozomal, X-linked ayırımı yapılamadı (şekil 4.9.1). Ayrıca, literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak p47 defekti düşünülen hastaların (n:7) SI değerinin SI: 3-10, (ortalama \pm SD: 5.6 ± 2.36) arasında ve diğer komponentlerdekine göre daha yüksek olduğu (SI \geq 3.5) gözlemlendi (şekil 4.9.2.B). Sekans analizi ile p47 defekti olduğu kanıtlanan H9'da SI değerinin 3.5'in altında (SI:3) (X-linked hastalarımızda bulunan en yüksek değere yakın) bulunması DHR 123 SI değerlerinin alt grup değerlendirilmesinde önemli düzeyde bilgi vermesine rağmen tek başına yeterli olmadığını, istisnaların olabileceğini gösterdi (şekil 4.9.2, B). H9'un da dahil edildiği p47 defekti bulunan hastalarda VK değerleri de literatüre uygun (VK: \geq 70) 61-92 arasında olup (ortalama \pm SD: 74.85 ± 10.52) bulundu. SI değeri 1-3.5 arasında bulunan hastalarda X-linked gp91, SI; $<$ 2 olan hastalarda otozomal p22 ve otozomal p67 defektinin ön planda düşünülebileceği sonucuna varıldı (şekil 4.9.2.A,C).

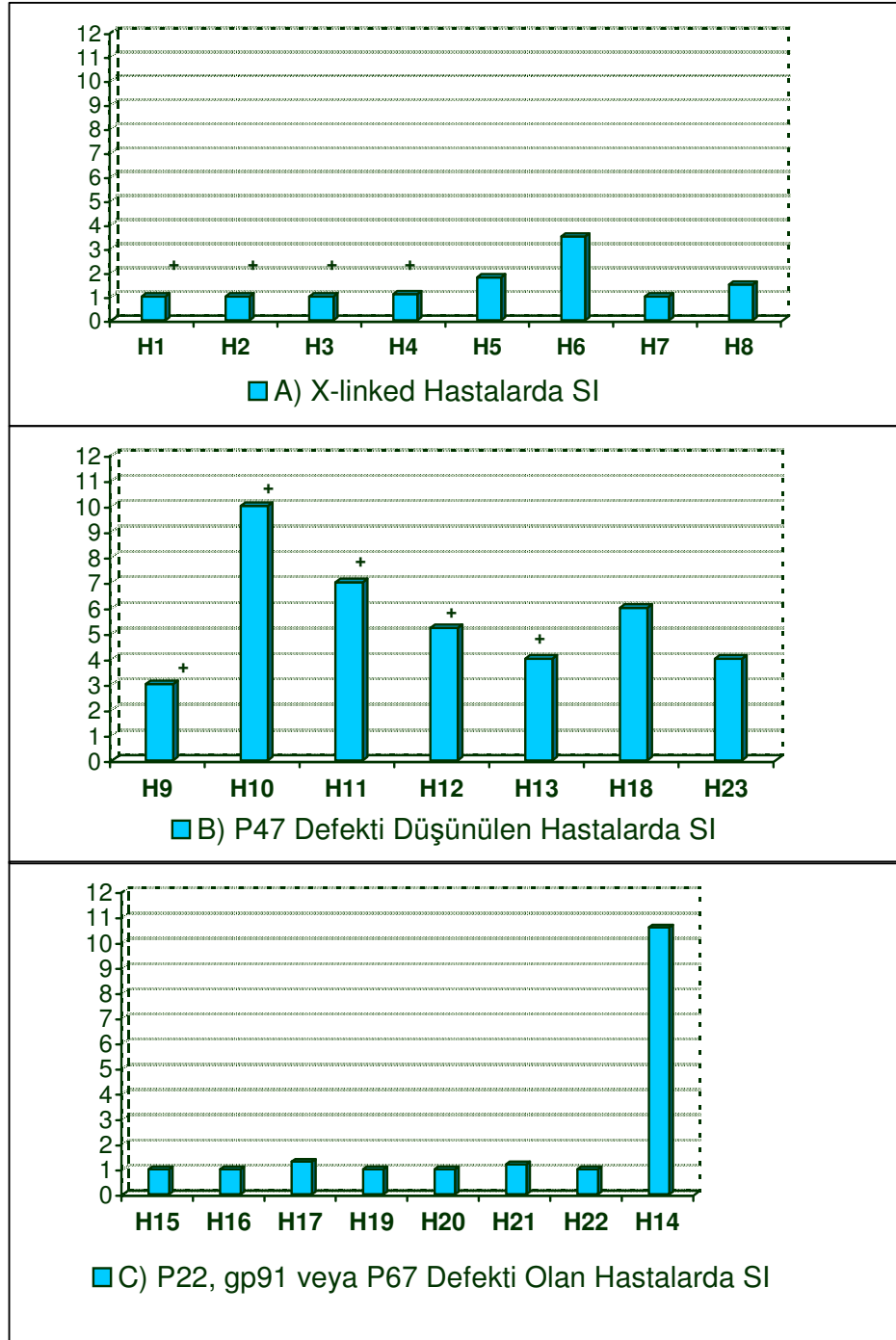


Şekil 4.9.1. KGH Tanısı Alan Hastaların Alt Gruplara Göre Dağılımı

Tablo 4.9.1. Tüm Sonuçlar, Alt Grup Ayırımını Belirleyen ve Destekleyen Parametreler

Hasta No	Alt Grup Sonuçları		Tanıyı Belirleyen ve Destekleyen Parametreler				
	X-linked	Otozomal	DHR-T	Antikor	DHR SI	Cinsiyet	DHR CV
H1	gp91*		+++	+++**	++	++	++
H2	gp91*		+++	+++**	++	++	++
H3	gp91*		+++	+++**	++	++	++
H4	gp91*		+++	+++**	++	++	++
H5	gp91		+++	+++**	++	++	-
H6	gp91		+++	+++**	++	++	-
H7	gp91		+++	+++**	++	++	++
H8	gp91		+++	+++**	++	++	++
H9		p47*	∅	+++	-	-	++
H10		p47*	∅	+++	++	-	-
H11		p47*	∅	+++	++	-	++
H12		p47*	∅	+++	++	-	++
H13		p47*	∅	+++	++	-	++
H14	p22, gp91?		∅	++**	+	+	-
H15	p22, gp91?		∅	++**	-	-	-
H16		p22	∅	+++**	-	++	-
H17		p22	∅	+++**	-	++	-
H18		p47	∅	+++	++	++	-
H19		p67	∅	+++	-	++	-
H20		p22,p67?	∅	ND	+	++	-
H21		p22,p67?	∅	ND	+	++	-
H22		p22,p67?	∅	ND	+	++	-
H23		p47	∅	ND	++	++	-

*: Sekans analizi ile belirlenen, **: p22,gp91 defekti ayırımı yapılamıyor, **ND**: yapılmadı, **∅**: annede X-linked taşıyıcılık yok, **■**: her bir hasta için alt grubu belirleyen ana parametre, **DHR-T**: annede X-linked taşıyıcılık, **Alt grubu destekleyen parametreler**; +++: kuvvetle destekliyor, ++:uyumlu, +: bilgi verici, - bilgi verici değil.



Şekil 4.9.2 KGH Hastalarında Alt Gruplar ve DHR 123 SI Değerleri.

+: sekans analizi ile belirlenenler.

TARTIŞMA

Kronik granulomatoz hastalık kalıtsal primer immün yetmezlikler grubunda yer alan ve nötrofillerin bazı bakteri ve mantarları fagosite ettikten sonra öldürememesi ile seyreden bir hastalıktır. Bu hastalıkta fagositik hücreler NADPH oksidaz enzimideki defekt nedeni ile reaktif oksijen metabolitlerinin sentezinde kullanılan süperoksiti yeterince üretemezler. Özellikle katalaz pozitif mikroorganizmalar ile oluşan hücre içi enfeksiyonlara karşı yatkınlıkta artış olur.

Fagosit NADPH oksidaz moleküler oksijene elektron transferi yaparak süperoksit üreten bir multikomponent enzimdir. NADPH oksidazın dört bileşeninden (gp91, p22, p47 ve p67) herhangi birinin defekti oksidaz aktivitesini engeller ve KGH tablosunun oluşumuna neden olur. NADPH oksidazın membran kısmını sitokrom b_{558} ve sitozolik kısmını da p47 ve p67 proteini oluşturur. Sitokrom b_{558} gp91 ve p22 alt gruplarının 1:1 oranında birleşmesi ile oluşur. Bu iki molekülden birinin eksikliğinde sitokrom b_{558} in yapısı bozulacağından her ikisinin de ekspresyonu bozulur. Gp91 komponent eksikliğinin p22 eksikliğine göre 12 kat fazla görüldüğü bildirilmektedir (43).

NADPH oksidaz enziminin sentezlediği süperoksit sonraki aşamalarda oluşan reaktif oksijen ürünleri için bir öncüdür. Hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen metabolitleri, bir defekt sonucu üretilemediğinde DHR 123 ile akım sitometride sağlıklı bireylerde görülen floresan etki elde edilemez ve histogram görüntüsü solda (y eksenine yakın) kalır (57). Bu özellik hastalığın tanısı için kullanılan akım sitometrik yöntemin temelini oluşturur. Bu yöntemde temel mekanizma PMA ile uyarılmış nötrofillerde ortaya çıkan reaktif oksijen metabolitlerinin DHR 123'ü güçlü floresan özellikteki rhodamin 123'e indirgemesidir. Nötrofilleri bu aktiviteye sahip olmayan KGH bulunan kişiler akım sitometrede kolayca belirlenebilir. Ayrıca, NADPH oksidaz aktivitesine sahip olan ve olmayan nötrofillerin fonksiyonel olarak ayırt edilebilmesi mozaik yapıdaki X-linked KGH taşıyıcıların da saptanabilmesini sağlar (56). Bu nedenle, DHR 123 testi KGH tanısında ve X-linked taşıyıcıların belirlenmesinde pratik olarak kullanılacak bir yöntemdir. Bu

yöntemde elde edilen histogram görüntülerine ek olarak hasta ve taşıyıcıların yorumlanmasında kullanılan önemli bir parametre SI değeridir. SI değeri yönünden hasta ve sağlıklı bireyler arasında 100 kat'a varan farklılık bulunabilir (54). P47 formunda SI değeri diğer formlara göre daha yüksek olabilmektedir (55, 56). Bunun nedeni membran komponentinin p47 ye ihtiyaç duymadan kısmi bir fonksiyon gösterebilmesidir (43). Böylece, DHR 123 yöntemi ile gerek SI değerleri, gerekse taşıyıcılara özgün histogram görüntüleri ile vakaların birçoğunda X-linked ve p47 formunun ayrılmasının mümkün olabileceği belirtilmektedir (55).

X-linked ve p47 defekti olan hastaların ayırımında kullanılacak bir başka parametre ise histogram görüntülerininin sayısal ifadesi olan varyasyon katsayısı (VK)'dir. Varyasyon katsayısı p47 formunda X-linked forma göre daha yüksektir (57). Bu değer p47 formu için 70 ve üzeri, X-linked form için 15-39 arası olduğu bildirilmiştir (57). Bu nedenle X-linked formda genellikle dar ve dik olan histogram görüntüleri p47 formunda basıktır (şekil 3.3.2.1.) (55, 56).

Bu çalışmada, 19 aileden 23 hastada KGH tanısı, X-linked ve otozomal resesif ayırımı yapılmak üzere DHR 123 testi uygulandı. Bu ailelerden 5'inde (A1-5) annelerde X-linked taşıyıcılık ile uyumlu bimodal histogram bulundu (tablo 4.3.1.) (şekil 4.5.1). De novo mutasyon olduğunda annenin sonuçlarının normal olması (taşıyıcı olmaması) beklenmekle birlikte, DHR 123 yöntemi ile X-linked hastaların birçoğunun diğer alt gruplardan ayırımı yapılabilmektedir. Çalışmamızda X-linked KGH tanısı için annelerinin taşıyıcı olması ve hastanın erkek oluşu destekleyici bulgu olarak kullanıldı (tablo 4.3.1.) (tablo 4.9.1.). Bu ailelerdeki hastaların (n:8) SI değerleri 1-3.5 arasında (ortalama \pm SD: 1.48 ± 0.87) ve VK değerleri 25-55 arasında (ortalama \pm SD: 37.25 ± 11.38) bulundu.

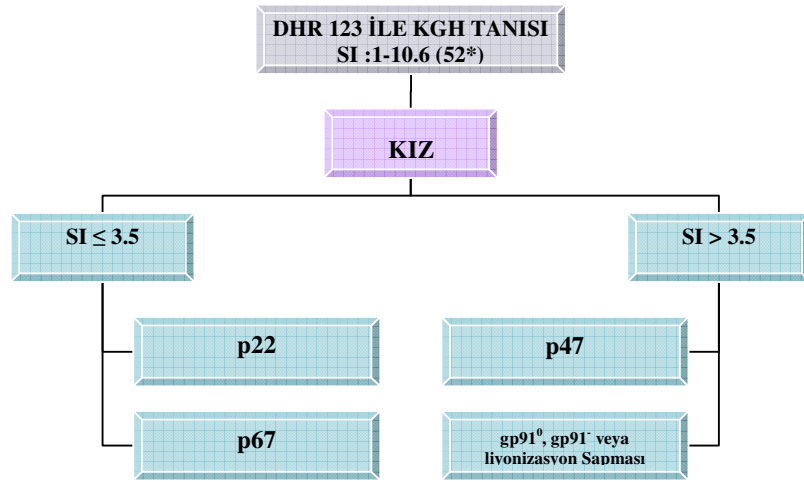
Vowells ve arkadaşları (57) otozomal (p47) KGH'da SI değerinin 3.5-52 arasında olabileceğini bildirmelerine rağmen bizim annede taşıyıcılık saptadığımız aileler dışındaki 17 hastamızda SI 1-10.6 arasında bulundu. Jirapongsananuruk ve arkadaşları (56) DHR 123 testinde SI değeri >4.5 ,

Vowells ve arkadaşları ise SI değeri >3.5 olduğunda ön planda otozomal resesif KGH (p47 formu) düşünülmesi gerektiği belirtmektedirler (55, 56).

Çalışmamızda SI değeri 3.5 den büyük (4-10.6) aralığında olan kız (H12-14, H23) ve erkek (H10-11) 5 hastanın annelerinde X-linked taşıyıcılığa uygun mozaik nötrofil grubu gözlenmedi. Bu grupta SI değerinin diğer gruplara göre yüksek olması nedeniyle öncelikle p47 defekti düşünüldü ve p47 defekti olabileceği düşünülen hastaların VK değerleri literatürde belirtildiği şekilde yüksek (VK: 60-92) bulundu. Ayrıca, Vowells'in p47 defekti için belirttiği VK değeri sınırının biraz altında (VK:61) olan hastada (H10) erkek olmasına rağmen annenin X-linked taşıyıcı olmaması ve SI değerinin yüksek olması (SI:10) nedeni ile ön planda p47 defekti düşünüldü. H14'de SI değerinin yüksek olması (10.6), annenin X-linked taşıyıcı olmaması ve kız olması nedeni ile p47 defekti düşünülmüş ancak, VK değerinin p47 için önerilen değerlerin altında olması (VK:60) ve aynı bulguların X-linked gp91 defekt taşıyıcılarında ileri düzeyde liyonzasyon sapmasında da görülebileceği dikkate alınarak X-linked KGH taşıyıcısı da olabileceği ve alt grup tanısı için daha ileri yöntemlerle araştırılmasının gerektiği sonucuna varılmıştır. H9 da SI değeri 3 ve erkek olması nedeni ile ön planda gp91 defekti, VK değerinin 78 olması ve erkek olmasına rağmen annesinde X-linked taşıyıcılık bulunmaması nedeniyle de p47 defekti olabileceği düşünülmüştür. Hastalarımızın 3'ünde (H20-22) kız olmaları ve SI değerlerinin düşük (1) olması ve DHR 123 testi ile p22 ve p67 defekti ayırımı yapılamadığı için p22 veya p67 defekti olabileceği düşünülmüştür.

Vowells ve arkadaşları 18 X-linked ve 17 p47 defekti olan KGH'yı kapsayan çalışmalarında ortalama SI değerini sırası ile 1.32 (0.9-2.2) ve 13.2 (3.5-52.1) olarak bulmuştur. (55). Jirapongsananuruk ve arkadaşları ise 75 X-linked KGH'da yaptıkları çalışmada SI değerinin hastaların %17'sinde 4.5 tan daha yüksek olduğunu gösterdiler (56). Bu grupta en yüksek SI değeri 44.2 idi ve histogram görünümü p47 formun görünümüne benziyordu. Bu hastanın annesinde taşıyıcılığa özgün bimodal histogramın bulunması X-linked KGH tanısının konulmasında yardımcı olmuştur. X-linked vakaların yaklaşık %10'unu oluşturan kısmı gp91 fonksiyonu olan X91 fenotipinde yüksek SI

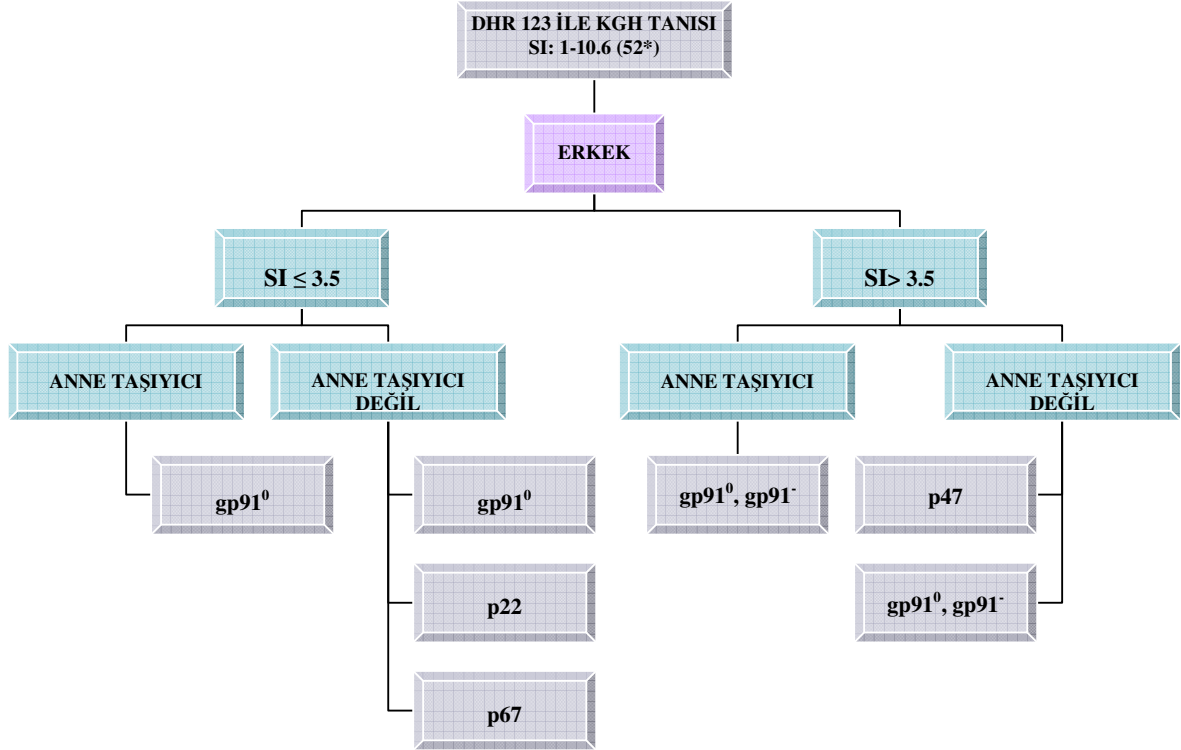
değerleri bulunabilmektedir (56). Bu araştırmada otozomal resesif p47 defekti olan 31 hastanın 2 si hariç diğerlerinde SI değerinin 4.5 in üzerinde olduğu gösterilmiştir. Böylece X-linked hastaların %17 si ile p47 defekti bulunan hastaların %6 sının SI değerleri yönünden benzer olduğunu, SI değerleri ile ayırıcı tanı yapılamayacağı ancak annede mozaik nötrofil grubunun varlığının X-linked KGH tanısının konulmasını sağlayabileceği üzerinde durulmuştur (56).



Şekil 5.1. SI Değerlerine göre Kız Hastalarda KGH Alt Grup Ayırımı

*: Vowells'e göre SI üst sınırı (ref 55)

DHR 123 testi p47 formunu diğer otozomal KGH formlardan ayırmada etkin olarak kullanılabilir. Nadir de olsa X-linked taşıyıcılarda liyonzasyon sapmasının yüksek olduğu durumlarda da SI değeri p47 forma benzeyebilir. Ayrıca, çok nadir bulunsa da kısmi aktivite (X91⁻) ile giden mutasyonlarda p47 formu şeklinde yorumlanabilir. Bu nedenle, her aile X-linked taşıyıcılık yönünden araştırılmalıdır. Rae ve arkadaşları (88) X-linked KGH bulunan 87 hastanın annelerinde yaptıkları araştırmada %89 düzeyinde taşıyıcılık olduğunu bildirmişlerdir. Buna rağmen X91⁻ defektinin varlığı her zaman X-linked taşıyıcılıkla belirlenmeyebilir. Bu durumda alt grup analizi ya da sekans analizi yapılmalıdır.



Şekil 5.2. SI Değerlerine göre Erkek Hastalarda KGH Alt Grup Ayırımı
*: Vowells'e göre SI üst sınırı (ref 55)

DHR 123 testinin NBT testine göre üstünlükleri mevcuttur. NBT testinde mikroskopik analizle tanı konulmakta ve dolayısıyla değerlendirmeyi yapan kişinin bu konuda deneyimli olması gerekmektedir. Oysa, DHR 123 testinde hücre sayım işlemi akım sitometre ile yapılmakta SI değerleri, VK değerleri, histogram görüntüleri gibi çeşitli parametreler X-linked ile p47 formun ayırımının yapılmasında ve X-linked taşıyıcıların saptanmasında kullanılabilir. NBT testinde 100–200 hücreden elde edilen sonuçlar kullanılırken, DHR 123 testinde 18-20.000 hücrenin analiz sonuçlarına göre değerlendirme yapılarak tanı konulmaktadır. Bu nedenle sonuçlar daha güvenilir olmaktadır.

Çalışma sonuçlarımız da DHR 123 testinin X-linked ve otozomal KGH hastalarının ayırımında yardımcı olabilecek ve güvenilir sonuçlar veren bir yöntem olduğunu göstermektedir (şekil 5.1 ve şekil 5.2).

Böylece DHR 123 test sonuçları ile hastalarımızda X-linked (n:8), p47 (n:6), p22 veya p67 (n:6) ve diğer (gp91, p22, p47 veya p67) defekler (n:3) olabileceği düşünüldü. Ancak sonuçların desteklenmesi için anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla alt grup analizi yapıldı. Bu yöntem yalnızca 4 hastaya uygulanamadı (H20-23). Monoklonal ve poliklonal antikorlarla birlikte KGH alt gruplarının araştırılması bu büyüklükte bir hasta popülasyonunda ilk olarak yapılmıştır.

Özgün antikorlarla alt grup tayininde anti-NADPH oksidaz antikorlar ile incelenen komponentlerden ekspresyon düzeyi en düşük olanın defektif olabileceği düşünülerek ve sonuçlar diğer parametrelerle (DHR 123 test sonuçları, annenin X-linked taşıyıcılığı, cinsiyet ve ebeveyn akrabalığı gibi) desteklenerek değerlendirildi.

Anti-NADPH oksidaz komponent antikorları kullanılarak yapılan alt grup analizinde hastaların 12 sinde gp91 ve p22 ekspresyonu birlikte düşüktü (tablo 4.7.1.). Anti-NADPH oksidaz komponent antikorla analizde gp91 defekti olduğunda birlikte p22 veya p22 defekti olduğunda birlikte gp91 ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir (56). Antikorla alt grup tayininde gp91 ve p22 defektini ayırmak her ikisinin de ekspresyonunun düşük ve birbirine yakın olduğu durumlarda mümkün olmamaktadır. Bu aşamada DHR 123 testi ile annenin X-linked taşıyıcılık durumunun gösterilmesi gp91 defekti olan hastaların büyük ölçüde saptanmasını sağlayabilmektedir. Annelerinde X-linked taşıyıcılık gösterilemeyen hastaların alt grup yönünden gp91 mi yoksa p22 defekti mi olduğunun ayırımı ancak mutasyon analizi ile mümkündür. Bizim hastalarımızdan gp91 ve p22 ekspresyonları düşük olan 12'sinden DHR 123 testi ile annelerinde X-linked taşıyıcılık bulunan 8'ine gp91 defekti tanısı konuldu. Kalan 4 hastadan SI değeri SI 1 ve 1.3 olan H16-17, kız olmaları ve SI değeri nedeni ile ön planda p22 defekti olarak düşünüldü. SI değeri yüksek SI:10.6 olması nedeni ile daha önce p47 defekti olabileceği düşünülen H14'de ise p47 ekspresyonu normal buna karşılık gp91 ve p22

düşük bulundu ve yapılan “westernblot” analizinde de gp91 ve p22 protein ekspresyonunun olmadığı gözlenmesi sonucu altta yatan defektin p22 veya daha önce de belirtildiği gibi liyonzasyon sapması olan gp91 taşıyıcılığı olabileceği düşünüldü, ancak p22 defekti olasılığı ekarte edilemedi. H15 de erkek olması, gp91 ve p22 ekspresyonunun düşük olması nedeniyle her iki alt grup (gp91,p22) defektinin de olabileceği düşünüldü. Bu hastalarda kesin alt grup tanısı için sekans analizi planlandı.

Daha önce DHR 123 analizi ile p47 defekti düşünülen H10-13, H18 ve p47 veya gp91 defekti olabileceği düşünülen H9’da anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla yapılan alt grup analizinde p47 oksidaz ekspresyonunda belirgin düşüklük gözlemlendi. Diğer komponentlerin ekspresyonu normaldi. Bu sonuçlar ışığında, bu 6 hastada p47 defekti olabileceği kuvvetle düşünüldü. SI değeri düşük olması (SI:1) nedeni ile p47 düşünülmemeyen bir kız hastada (H19) p67 ekspresyonu da düşük bulunduğundan ön planda p67 defekti düşünüldü.

Böylece çalışmada, DHR 123 testi ve NADPH oksidaz komponent antikorlarla hastaların alt grupları belirlenmeye çalışıldı. Hastalardan bir kısmında ilgili moleküler defekt yönünden sekans analizi ile mutasyon taraması yapılarak diğer yöntemlerle alınan sonuçlarla uyum değerlendirildi. Bu mutasyonlardan *CYBB* geninde olanlar, A1’de daha önce bildirilen C736>T nonsense mutasyon ve A2’de yeni bulunan G700>T nonsense mutasyondur. *NCF1* geni mutasyonları H9’da ‘hot-spot’ da (2. ekson başında) yer alan homozigot GT delesyonu, H11-13’de daha önce bildirilen G574A homozigot *splice* defektidir (46,89). H10’da ise ΔGT ile birlikte daha önce bir hastada homozigot olarak bildirilmiş olan nonsense G579>A mutasyonu kompond heterozigot şeklinde bulunmuştur. ΔGT mutasyonu p47 defekti olan hastaların %94 ünde bulunmakla birlikte daha önce G579>A nonsense mutasyonu ile birlikte kompond heterozigot olarak bildirilmemiştir (tablo 4.8.1.) (58). Bu hastada VK değeri (61), SI değeri SI:10 bulunmuş olup, homozigot mutasyon bulunan hastalarda VK değerleri (78-92), SI değerleri (3-7) arasında bildirilmiştir (tablo 4.3.1.).

Böylece, DHR 123 testi ve anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla alt grup analizinde X-linked gp91 defekti (n:4) ve p47 defekti (n:5) düşünülen 9 hastanın sonuçları sekans analizi ile doğrulanmıştır. (tablo 4.8.1.) (tablo 4.9.1.). Bu hastalardan DHR 123 testi ile p47 defekti düşünülenler antikorlarla daha iyi tanımlanabilmiştir. Ancak, gp91 ile beraber p22 ekspresyonunun da düşük olması ve SI değerlerinin bu alt grupların ayırımı için yeterli bilgi vermemesi nedeniyle bu iki defektin ayırımı DHR 123 yöntemi ile annelerdeki X-linked taşıyıcılığın değerlendirilmesi ile yapılabilmektedir. KGH alt grup sınıflamasında anti-NADPH oksidaz komponent antikorlar önemli derecede bilgi vermesine rağmen, X-linked gp91 ve p22 alt grup ayırımında DHR 123 yöntemi ile birlikte annelerdeki X-linked taşıyıcılığın değerlendirilmesi de novo mutasyon bulunmaması halinde alt grup ayırımında karşılaşılan sorunları gidermektedir.

Monoklonal ve poliklonal antikorlarla yapılacak akım sitometrik analiz DHR123 yönteminin yetersiz kaldığı (%15-20) durumlarda, özellikle de en sık görülen X-linked ve p47 defektin ayırımını sağlayabilmekte, diğer alt grup defektleri ayırımında da önemli düzeyde bilgi verebilmektedir.

Bu sonuçlar, DHR 123 testi ve anti-NADPH oksidaz antikorlarla alt grup tayini yapılmasının defektif olabilecek en muhtemel gen yönünden fikir verebildiği ve mutasyon taramasının bu gen üzerinde yapılmasının sekans analizi iş yükünü önemli derecede azattığı gösterilmiştir.

Sağlıklı kadınlardaki her somatik hücrede bulunan iki X-kromozomundan birisi erken embriyonik gelişim döneminde (blastocyst evresi, 8-256 hücre) inaktive edilir. Bu inaktivasyon maternal ve paternal orijinli X-kromozomunda %50 -%50 oranında ve rastgele meydana gelir ve liyonzasyon (X-inaktivasyon) olarak adlandırılır (82). Liyonzasyona bağlı olarak, X-linked KGH taşıyıcılarında annelerde periferik kanda iki farklı nötrofil grubu gözlenmektedir. Solda y eksenine yakın olan zirve defektif nötrofil grubuna, sağda bulunan zirve ise normal nötrofil grubuna aittir. Taşıyıcılarda bu iki nötrofil grubundaki hücre yüzdesi veya aralarındaki oran bireyler arasında değişebilmektedir (tablo 4.5.1.). Bireyler arasındaki bu farklılığın önde gelen nedeni embriyonik dönemde oluşan liyonzasyon

farklılığıdır. Sağlıklı kadınlarda %21-31 oranında liyonzasyon sapması bulunabilir (90).

Bizim X-linked KGH bulunan hastalarımızın taşıyıcı olduğu saptanan aile bireylerinde yapılan araştırmada 6 anne, 1 annearne, 1 büyük annearne, 1 kız kardeş ve 1 teyzede sağlıklı ve defektif nötrofil düzeylerinde farklılıklar olduğu gözlemlendi (tablo 4.5.1.) (şekil 4.5.1). Önceleri bir bireyde liyonzasyon oranının yaşam boyu sabit olduğu kabul edilirken, son araştırmalar, hematopoetik hücrelerde liyonzasyon oranında sonradan kazanılan sapma olabileceğini göstermiştir (82). Hematopoetik dokularda liyonzasyon sapmasının önde gelen nedenlerinden biri X-inaktivasyonunun en erken kan hücre progenitörlerinde başlaması (8 progenitör hücre varken başlar) ve dolayısıyla X-inaktivasyonu sırasında stem hücre havuzunun yeterince büyük olmamasıdır. Bu nedenle diğer dokulara göre daha fazla liyonzasyon sapması görülür. İnaktivasyonun gerçekleştiği süreçte embriyonik hücre bölünmelerinin devam etmesi nedeniyle dokudan dokuya farklı düzeylerde inaktivasyon patterni ve klonal hematopoezis oluşabilir (91, 92). Ayrıca, Busque ve arkadaşları (86) sağlıklı kadınlarda hematopoetik dokularda liyonzasyon oranındaki sapmanın yaşla artabildiğini göstermiştir.

X-linked KGH taşıyıcılarında liyonzasyon oranında sonradan oluşan sapma “*acquired skewing*” sonucu zamanla oluşan nötrofil popülasyonundaki değişimin taşıyıcılarda ciddi enfeksiyonlara yol açabileceği gösterilmiştir (51). Roesler ve arkadaşları 25 yıl öncesinde normal nötrofil düzeyi %40 olan bir X-linked KGH taşıyıcısının 25 yıl içinde normal nötrofil düzeyinin %6 ya kadar düştüğünü ve KGH bulgularının ortaya çıktığını göstermişlerdir (84). Lun ve arkadaşları da daha önce bir şikâyeti olmayan, ancak 43 yaşında iken ciddi apseleri nedeni ile takibe alınan bir kadın hastanın X-linked KGH taşıyıcısı olduğunu göstermişlerdir (85). Bizim de, aile1’de taşıyıcı olduğu gösterilen H2-3’ün annesinde 8 yıl önce normal nötrofil oranı %72 iken çalışmamız sırasında %50 olarak bulunmuştur. Taşıyıcı yaşları ile normal nötrofil düzeylerini birlikte değerlendirdiğimizde, X-linked KGH taşıyıcılarında ilerleyen yaşlarda normal nötrofil düzeyinde azalma eğilimi olduğunu saptadık (tablo 4.5.1.) (şekil 4.5.2.) (şekil 4.5.3.). Aile 1a’da aynı mutasyonu

taşıyan üç kuşaktaki taşıyıcılarda (anne, anneanne ve büyük anneanne) normal nötrofil düzeyi değerlendirildiğinde ileri yaşlarda normal nötrofil düzeyinin azaldığını (sırasıyla %81, %66, %38) gözledik. Taşıyıcıların tamamında yaş ile normal nötrofil düzeyi arasında ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir ilişki (kuvvetli bir ters korelasyon) olduğu bulundu, $p:0.05$, (pearson korelasyon katsayısı) $r:-0.75$.

Total normal nötrofil içinde her bir normal nötrofil için SI_1 değeri aile 1a da hesaplandığında; annede $SI_1: 0,0043$, anneannede $SI_1: 0.0069$ ve büyük anneannede $SI_1: 0.0141$ olduğu görüldü. Sağlıklı kontrollerde ise $SI_1 0.0032-0.0074$ arasında (ortalama \pm SD: 0.0043 ± 0.0010) bulundu (tablo 4.2.1.) Bu bulgu ileri yaştaki hastalarda azalan normal nötrofil yüzdesine rağmen hücrelerin ROS üretim yeteneklerinin arttığını düşündürmektedir (tablo 4.5.2) (şekil 4.5.4). Taşıyıcılarda normal nötrofil düzeyi ile her bir normal nötrofil için SI_1 değeri arasında ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde yine anlamlı bir ilişki (kuvvetli bir ters korelasyon) olduğu saptandı, $p:0.01$, $r:-0.88$. Bu artışın ROS ihtiyacını karşılamak için gerçekleşen bir kompanzasyon mekanizması olabileceği düşünülmektedir. Sağlıklı nötrofil popülasyonunun %5 düzeyine kadar düşmesine rağmen enfeksiyonlardan korunma sağlanabilmektedir (50).

Taşıyıcıların yaşam sürecinde izlenmesi bir kaç yılda bir yapılacak kontrollerde normal nötrofil popülasyonundaki değişimin takibi liyonzasyon sapmasının yaşla ilişkisi konusunda önemli ipuçları verecektir. Ayrıca, bu veriler taşıyıcılarda liyonzasyon sapması sonucu gelişebilecek KGH tablosu yönünden yakın takip imkânı sağlayacaktır.

Çalışmamız ile DHR 123 ve anti-NADPH oksidaz komponent antikoru ile alt grup çalışmalarının, KGH alt grup ayırımında özellikle de gp91 ve p47 defektlerinin saptanmasında başarılı olduğu belirlenmiş, bazı hastalarda kesin tanı ve genetik danışma için gerekli olan mutasyon analizi yapılacak gen büyük ölçüde saptanabilmiştir. Ayrıca, DHR 123 testi ile X-linked taşıyıcılarda normal nötrofil yüzdesinin ileri yaşlarda azaldığı buna karşılık nötrofil aktivitelerinin artma eğiliminde olduğu gösterilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada 19 aileden 23 KGH bulunan hasta, 53 hasta yakını ve 18 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 94 kişiden alınan kan örnekleri DHR 123 testi ile incelenmiş ve 19 ailenin 5'inde (%26.3) X-linked, 12'sinde (%63.6) otozomal KGH (p22, p47 veya p67) bulunduğu belirlenmiş, iki ailede (%10.1) ise X-linked otozomal ayırım yapılamamıştır. Böylece, literatürdeki bilgilerden farklı olarak hastaların çoğunluğunun otozomal resesif KGH olduğu ve bunun diğer otozomal resesif hastalıklarda olduğu gibi ülkemizdeki akraba evliliklerinin yüksek olması ile ilgili olabileceği sonucuna varılmıştır.
- DHR 123 testinin; KGH tanısında kullanılabilecek yeni bir tarama testi olduğu, histogram özellikleri ve X-linked taşıyıcılarının güvenilir şekilde belirlenebilmesi ile X-linked, otozomal ayırımında kullanılabilecek hızlı, güvenilir ve NBT testine göre daha üstün bir test olduğu anlaşılmıştır.
- Anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla (monoklonal ve poliklonal) alt grup tayini yapılmasının defektif olabilecek en muhtemel gen yönünden ek bilgi verebildiği, DHR 123 test sonuçlarını önemli ölçüde desteklediği ve mutasyon taramasının öngörülen defektif gen üzerinde yapılmasının iş yükünü azaltabildiği görülmüştür.
- Taşıyıcılarda her bir normal nötrofil için stimülasyon indeksi (SI₁) değerinin, ileri yaşlarda normal nötrofil düzeyinin azalmasına karşın arttığı bulunmuş, bu artışın her bir hücrede sentezlenen oksijen metabolitlerinin miktarı ölçülerek de gösterilmesinin, normal nötrofil düzeyi ve SI₁ değeri arasındaki ilişki hakkında daha kesin bilgi verebileceği düşünülmektedir.
- Taşıyıcıların uzun dönemde takibi; yaşa bağlı değişimlerin bir bireyde uzun dönem izlenmesine, normal nötrofil düzeyinin yaşla ilişkisinin daha ileri düzeyde belirlenmesine ve taşıyıcılarda liyonzasyon sapması sonucu gelişebilecek KGH olasılığının yakından izlenmesine yardımcı olacağı anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Curnutte JT. Chronic granulomatous disease: The solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopath*, 67: S2-15, 1993.
2. Forehand JR, Nauseef WM, Curnutte JT, Johnston RB Jr. Inherited disorders of phagocytic killing. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, pp 3995-4026, 1995.
3. Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatous disease of childhood: The clinical study of a new syndrome. *Minn Med* 40: 309-12, 1957.
4. Bridges RA, Berendes H, Good RA. A fatal granulomatous disease of childhood. *Am J Dis Child* 97: 387-408, 1959.
5. Holmes B, Page AR, Good RA. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* 46: 1422-32, 1967.
6. Quie PG, Kaplan EL, Page AR, Gruskay FL, Malawista SE. Defective polymorphonuclear-leukocyte function and chronic granulomatous disease in two female children. *N Engl J Med* 278: 976-80, 1968.
7. Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest* 46: 668-79, 1967.
8. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology* (5th Ed.) Philadelphia: WB Saunders, McGraw-Hill, cap 12-2. 2003.
9. Ross JP, Holland SM, Gill VJ, DeCarlo ES, Gallin JI. Severe Burkholderia (*Pseudomonas*) *gladioli* infection in chronic granulomatous disease: Report of two successfully treated cases. *Clin Infect Dis* 21: 1291-93, 1995.

10. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391: 393-97, 1998.
11. Evans TJ, Buttery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, Cohen J. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9553-58, 1996.
12. Roos D, Bruggen RV, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5, s1307–15, 2003.
13. Harper AM, Chaplin MF, Segal AW. Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem J* 227:783-88, 1985.
14. Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3319-23, 1988.
15. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 86: 1729-37, 1990.
16. Koshkin V, Pick E. Generation of superoxide by purified and relipidated cytochrome b559 in the absence of cytosolic activators. *FEBS Lett* 327: 57-62, 1993.
17. Koshkin V, Pick E. Superoxide production by cytochrome *b*558. Mechanism of cytosol-independent activation. *FEBS Lett* 338: 285-89, 1994.
18. Lomax KJ, Leto TL, Nuno H, Gallin JI, Malech HL. Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science* 245: 409-12, 1989.

19. Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7195-99, 1989.
20. Thrasher AJ, Keep NH, Wientjes F, Segal AW. Chronic granulomatous disease. *Biochim Biophys Acta* 1227: 1-24, 1994.
21. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q 4th, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 80: 45-51, 1997.
22. Jones SA, Hancock JT, Jones OT, Neubauer A, Topley N. The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: Detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. *J Am Soc Nephrol* 5: 1483-91, 1995.
23. Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 633-44, 1996.
24. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: Enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14483-88, 1997.
25. Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol* 268: H2274-80, 1995.
26. Dusi S, Nadalini KA, Donini M, Zentilin L, Wientjes FB, Roos D, Giacca M, Rossi F. Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly and activation in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines of normal and chronic granulomatous disease patients. *J Immunol* 161: 4968-74, 1998.

27. Luo W, Skalnik DG. CCAAT displacement protein competes with multiple transcriptional activators for binding to four sites in the proximal gp91phox promoter. *J Biol Chem* 271: 18203-10, 1996.
28. Eklund EA, Jalava A, Kakar R. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91phox expression. *J Biol Chem* 273: 13957-65, 1998.
29. Sharf R, Meraro D, Azriel A, Thornton AM, Ozato K, Petricoin EF, Lerner AC, Schaper F, Hauser H, Levi BZ. Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J Biol Chem* 272: 9785-92, 1997.
30. Eklund EA, Skalnik DG. Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. *J Biol Chem* 270: 8267-73, 1995.
31. Anderson KL, Smith KA, Pio F, Torbett BE, Maki RA. Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood* 92: 1576-85, 1998.
32. Condino-Neto A, Whitney C, Newburger PE. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. *J Immunol* 161: 4960-67, 1998.
33. DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* 101: 455-63, 1998.
34. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux, *Nature* 416, s291–297, 2002.
35. Henderson LM, Meech RW. Proton conduction through gp91phoxG, *J. Gen. Physiol.* 120 s759–765, 2002.

36. Roos D, Winterbourn CC, Lethal weapons, *Science* 296, 669–671, 2002.
37. Ehrt S, Shiloh MU, Ruan J, Choi M, Gunzburg S, Nathan C, Xie Q-W, Riley LW, A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Exp. Med.* 186, s1885, 1997.
38. Van Heerebeek L, Meischl C, Stoker W, Meijer CJLM, Niessen HWM, Roos D, NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J. Clin. Pathol.* 55 s561–568, 2002.
39. Meier B, Jesaitis AJ, Emmendorffer A, Roesler J, Quinn MT. The cytochrome *b558* molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leukocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct, *Biochem. J.* 289, s481–486, 1993.
40. Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. Identification of renox an NAD(P)H oxidase in the kidney, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, s8010–8014, 2000.
41. Blouin E, Halbwachs-Mecarelli L, Rieu P, Redox regulation of β 2-integrin CD11b/CD18 activation, *Eur. J. Immunol.* 29, 3419–3431, 1999.
42. Heyworth PG, Crossz AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease *Current Opin in Immunology*, 15, 578–584, 2003
43. Roos D, Curnutte JT. Chronic Granulomatous Disease, in: H.D. Ochs, C.I.E. Smith, J.M. Puck (Eds.), *Primary Immunodeficiency Diseases. A Molecular and Genetic Approach*, Oxford University Press, NewYork, Oxford, pp. 353–374, 1999.
44. Heyworth PG, Curnutte JT, Rae J, Noack JD, Roos D, Koppen EV, Cross AR. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update), *Blood Cells Mol. Dis.* 27, 16–26, 2001.
45. Heyworth PG, Curnutte JT, Badwey JA. Structure and regulation of NADPH oxidase of phagocytic leukocytes: insights from chronic granulomatous disease. In *Molecular and Cellular Basis of Inflammation*. Edited by Serhan CN, Ward PA: Humana Press: 165-191, 1999.

46. Cross AR, Noack D, Rae J, Curnutte JT, Heyworth PG. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (first update), *Blood Cells Mol. Dis.*26, 561–565, 2000.
47. Leusen JHW, De Klein A, Hilarius PM, Åhlin A, Palmblad J, Smith CIE, Diekmann D, Hall A, Verhoeven AJ, Roos D. Disturbed interaction of p21-rac with mutated p67phox causes chronic granulomatous disease, *J. Exp. Med.* 184, 1243–1249, 1996.
48. Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, Levine JE, Petryniak B, Derrow CW, Harris C.: Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human immunodeficiency. *Blood*,96:1646-1654, 2000.
49. Gu Y, Jia B, Yang FC, D'Souza M, Harris C, Derrow CW, Zheng Y, Williams DA: Biochemical and biological characterization of a human Rac2 GTPase mutant associated with phagocytic immunodeficiency. *J Biol Chem*, 276:15929-15938, 2001.
50. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM: Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*, 79:170-200, 2000.
51. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Boyle J, Curnutte JT, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs HD, Quie P et al.: Chronic granulomatous disease: report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*, 79:155-169, 2000.
52. Baehner RL, Nathan DG. Leukocyte oxidase, defective activity in chronic granulomatous disease. *Science* 155: 835-36, 1967.
53. Crockard AD, Thompson JM, Boyd NA, Haughton DJ, McCluskey DR, Turner CP. Diagnosis and carrier detection of chronic granulomatous disease in five families by flow cytometry. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 144-52, 1997.

54. Emmendorffer A, Nakamura M, Rothe G, Spiekermann K, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. *Cytometry* 18: 147-55, 1994.
55. Vowells SJ, Fleisher TA, Sekhsaria S, Alling DW, Maguire TE, Malech HL. Genotype-dependent variability in flow cytometric evaluation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase function in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 128: 104-7, 1996.
56. Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, Niemela JE, Brown MR, Anderson-Cohen M, Fleisher TA. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol.* 111(2): 374-9, 2003.
57. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: A comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 178: 89-97, 1995.
58. Boer MD, Singh V, Dekker J, Rocco MD, Goldblatt D, Roos D.. Prenatal diagnosis in two families with autosomal, p47phox-deficient chronic granulomatous disease due to a novel point mutation in NCF1. *Prenat Diagn*; 22: 235–240, 2002.
59. Margolis DM, Melnick DA, Ailing DW, Gallin JI. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease. *J Infect Dis* 162: 723-26, 1990.
60. Weening RS, Kabel P, Pijman P, Roos D. Continuous therapy with sulfamethoxazole-trimethoprim in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 103: 127-30, 1983.
61. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 158: 670-89, 1983.

62. Ezekowitz RA, Orkin SH, Newburger PE. Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 80: 1009-16, 1987.
63. Sechler JM, Malech HL, White CJ, Gallin JI. Recombinant human interferon-gamma reconstitutes defective phagocyte function in patients with chronic granulomatous disease of childhood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4874-78, 1988.
64. Ezekowitz RA, Dinauer MC, Jaffe HS, Orkin SH, Newburger PE. Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma. *N Engl J Med* 319: 146-51, 1988.
65. Gallin JI, Farber JM, Holland SM, Nutman TB. Interferon-gamma in the management of infectious diseases (clinical conference). *Ann Intern Med* 123: 216-24, 1995.
66. Schiff DE, Rae J, Martin TR, Davis BH, Curnutte JT. Increased phagocyte Fc gammaRI expression and improved Fc gamma- receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon-gamma treatment of normal human subjects. *Blood* 90: 3187-94, 1997.
67. Muhlebach TJ, Gabay J, Nathan CF, Erny C, Dopfer G, Schroten H, Wahn V, Seger RA. Treatment of patients with chronic granulomatous disease with recombinant human interferon-gamma does not improve neutrophil oxidative metabolism, cytochrome b558 content or levels of four anti-microbial proteins. *Clin Exp Immunol* 88: 203-6, 1992.
68. Woodman RC, Erickson RW, Rae J, Jaffe HS, Curnutte JT. Prolonged recombinant interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease: Evidence against enhanced neutrophil oxidase activity. *Blood* 79: 1558-62, 1992.
69. Malech HL, Bauer TR Jr, Hickstein DD. Prospects for gene therapy of neutrophil defects. *Semin Hematol* 34: 355-61, 1997.

70. Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, Linton GF, Sekhsaria S, Vowells SJ, Li F, Miller JA, DeCarlo E, Holland SM, Leitman SF, Carter CS, Butz RE, Read EJ, Fleisher TA, Schneiderman RD, Van Epps DE, Spratt SK, Maack CA, Rokovich JA, Cohen LK, Gallin JI. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12133-38, 1997.
71. Rex JH, Bennett JE, Gallin JI, Malech HL, Melnick DA. Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Infect Dis* 162: 523-28, 1990.
72. Buescher ES, Gallin JI. Leukocyte transfusions in chronic granulomatous disease: Persistence of transfused leukocytes in sputum. *N Engl J Med* 307: 800-803, 1982.
73. Depalma L, Leitman SF, Carter CS, Gallin JI. Granulocyte transfusion therapy in a child with chronic granulomatous disease and multiple red cell alloantibodies. *Transfusion* 29: 421-23, 1989.
74. Ikinciogullari A, Dogu F, Solaz N, Reisli I, Kemahli S, Cin S, Babacan E. Granulocyte transfusions in children with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. *Ther Apher Dial*. 4;9(2):137-41, 2005.
75. Lekstrom-Himes JA, Holland SM, DeCarlo ES, Miller J, Leitman SF, Chang R, Baker AR, Gallin JI. Treatment with intralesional granulocyte instillations and interferon-gamma for a patient with chronic granulomatous disease and multiple hepatic abscesses. *Clin Infect Dis* 19: 770-73, 1994.
76. Seger RA, Ezekowitz RA. Treatment of chronic granulomatous disease. *Immunodeficiency* 5: 113-30, 1994.
77. Ozsahin H, von Planta M, Muller I, Steinert HC, Nadal D, Lauener R, Tuchschild P, Willi UV, Ozsahin M, Crompton NE, Seger RA. Successful treatment of invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease by bone marrow transplantation, granulocyte colony-stimulating

- factor-mobilized granulocytes, and liposomal amphotericin-B. *Blood* 92: 2719-24, 1998.
78. Ding C, Kume A, Bjorgvinsdottir H, Hawley RG, Pech N, Dinauer MC. High-level reconstitution of respiratory burst activity in a human Xlinked chronic granulomatous disease (X-CGD) cell line and correction of murine X-CGD bone marrow cells by retroviral-mediated gene transfer of human gp91phox. *Blood* 88: 1834-40, 1996.
79. Li F, Linton GF, Sekhsaria S, Whiting-Theobald N, Katkin JP, Gallin JI, Malech HL. CD34+ peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of the two flavocytochrome b558 defective forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 84: 53-58, 1994.
80. Porter CD, Parkar MH, Collins MK, Levinsky RJ, Kinnon C. Efficient retroviral transduction of human bone marrow progenitor and longterm culture-initiating cells: Partial reconstitution of cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease by gp91-phox expression. *Blood* 87: 3722-30, 1996.
81. Iwata M, Nuno H, Matsuda I, Kanegasaki S, Tsuruo T, Sugimoto Y. Drug-selected complete restoration of superoxide generation in Epstein-Barr virus-transformed B cells from p47phox-deficient chronic granulomatous disease patients by using a bicistronic retrovirus vector encoding a human multi-drug resistance gene (MDR1) and the p47phox gene. *Hum Genet* 103: 419-23, 1998.
82. Lyon MF. Lyonization of the X-chromosome. *Lancet*;12: 1120-1, 1963.
83. Buescher ES, Alling DW, Gallin JI. Use of an X-linked human neutrophil marker to estimate timing of lyonization and size of the dividing stem cell pool. *J Clin Invest* 76: 1581-84, 1985.
84. Rosen WA, Soldan W, Heyne K, Bickhardt J, Gahr M, Roesler J. Increased susceptibility of a carrier of X-linked chronic granulomatous disease (CGD) to *Aspergillus fumigatus* infection associated with age-related skewing of lyonization. *Ann Hematol*; 80:113-5, 2001.

85. Lun A, Roesler J, Renz H. Unusual Late Onset of X-linked Chronic Granulomatous Disease in an Adult Woman after Unsuspicious Childhood, *Clinical Chemistry* 48, No. 5, 780-81, 2002.
86. Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*; 88,59–65, 1996.
87. Meischl C, de Boer M, Åhlin A, Roos D. A new exon, created by intronic insertion of a rearranged LINE-1 element, as the cause of chronic granulomatous disease. *Eur J Hum Genet.*; 8: 697-703, 2000.
88. Rae J, Newburger PE, Dinauer MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R. X-linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. *Am J Hum Genet*; 62:1320–31,1998.
89. Noack D, Rae J, Cross AR, Ellis BA, Newburger PE, Curnutte JT, Heyworth PG. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in *NCF-1*, the gene encoding the phagocyte p47-*phox*: Mutations not arising in the *NCF-1* pseudogenes. *Blood*. 1;97(1):305-11, 2001.
90. Kassir NE, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. X-chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms. *Clinical Chemistry* 44.1, 61-7, 1998.
91. Young NS. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr Dameshek's riddle, restated. *Blood*;79:1385–92, 1992.
92. Tan SS, Williams EA, Tam PPL. X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo. *Nature Genet*; 3:170–4, 1993.

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR ALMA FORMU (EK 1)
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ, CERRAHİ ve İLAÇ ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
GENETİK ARAŞTIRMA AMAÇLI BİR ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ
(BİLGİLENDİRİLMİŞ) ONAM FORMU ÖRNEĞİ

(Hekimin Açıklaması)

Kronik Granulomatoz Hastalık (KGH) bağışıklık sistemi tarafından bazı mikroorganizmaların öldürülememesi ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır. Sizin çocuğunuzda da KGH saptanmış olup hastalık kalıtsal olduğundan diğer aile bireylerinde benzer hastalık yada taşıyıcılık bulunma ihtimali mevcuttur. Çalışmamız mevcut olan ancak bulgu vermeyen bu bozukluğu bulmaya, siz ve yakınlarınızı bilgilendirmeye yöneliktir. Çalışmanın adı; **“Kronik Granulomatoz Hastalık ve Alt Gruplarının Tanısında DHR 123 Testi Ve Anti-NADPH Oksidaz Komponent Antikorlarla Akım Sitometrik Analizin Yeri”** dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı, bu tetkiki aile fertlerinize yaptırmanızı öneriyoruz. Bu tetkiki yaptırıp yaptırmamakta serbestsiniz. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız bu yöntemin kurulması ve önceden tespit edilmiş bu hastaların aile fertlerini de bu yönden tarayarak yatkınlığı olanları ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirecektir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz. Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İmmunoloji Ünitesi'nden Dr. Özden Sanal veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından aile fertlerinin ve sizin kanınız alınarak Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İmmunoloji Ünitesi laboratuvarında yapılacak testler ile tanı konulacaktır. Sonuçlar kimliğiniz belirtilmeden bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu sonuçlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 5 ml (yaklaşık bir tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz. Çok düşük bir ihtimal olarak iğne batması sonrasında enfeksiyon riski vardır.

Yapılacak testin getirebileceği olası riskler: Eğer test sonucu KGH olduğunu gösterirse genetik (kalıtsal) geçişli olan bu hastalık sizin bundan sonra doğacak çocuklarınız ve akraba ile evlenen yakınlarınızın çocuklarında da bu hastalık riskini taşıyabileceğini gösterecektir. Bu özelliğin öğrenilmesi sizi psikolojik yönden etkileyebilir ancak bu risk bu tipte başka kalıtsal hastalık bulunan diğer ailelerdekine benzer olup akraba evliliği yapmayan aile fertlerinde önemli bir sorun yaratmayacaktır. Sizde böyle bir eksiklik olduğunu saptadığımızda bulgularımızı herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Ancak böylesi bir bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Hemen belirtmeliyiz ki; aldığımız sonuçları sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle olacaktır.

Yapılacak tanı amaçlı testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz aile fertlerinizde bu hastalığın olup olmadığını saptanmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde çocuğunuzun takibi ve uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dr Özden Sanal tarafından Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Ünitesi'nde tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimizin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Herhangi bir sağlık sorunum olduğunda doktoruma 0312/3051170-72 no'lu telefondan ulaşabileceğim. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun çocuğumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza

Veli Vasi

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

**DÜNYA TIP BİRLİĞİ
HELSİNKİ BİLDİRGESİ (EK 2)**

**İnsan Deneklerinin Yer aldığı Biyomedikal Araştırmalara
Yönelik Rehber İlkeler**

Dünya Tıp Birliği'nin 18. toplantısında (1964, Helsinki-Finlandiya) benimsenmiş, 29. (1975, Tokyo-Japonya), 35. (1983, Venedik-İtalya), 41. (1989, Hong Kong) ve 48. (1996, Somerset West-Güney Afrika Cumhuriyeti) toplantılarında yenilenmiştir.

GİRİŞ

Hekimin görevi insanların sağlığını korumaktır. Onun bilgi ve vicdanı bu göreve ithaf edilmiştir.

Dünya Tıp Birliği'nin Cenevre Bildirgesi, hekimi "Benim için hastanın sağlığı en önde gelecek" sözleriyle bağlamakta ve Uluslararası Tıp Etiği Kodu da "Hastanın fiziksel ve zihinsel durumunu zayıflatıcı etkise de olabilecek tıbbi bakımı sağlarken, hekim yalnızca hastanın yararına göre davranacaktır" şeklinde beyanda bulunmaktadır.

İnsan denekleri üzerindeki biyomedikal araştırmaların amacı tanı koyucu, iyileştirici ve koruyucu işlemleri geliştirmek ile hastalığın etiyolojisini-patogenezini anlamak olmalıdır. Yürürlükteki tıp uygulamasında yer alan tanı, tedavi ya da koruma yöntemlerinin çoğu bazı riskler içermektedir. Bu durum biyomedikal araştırmaları özellikle ilgilendirmektedir.

Tıptaki gelişmeler bir ölçüde, eninde sonunda insan deneklerinin yer aldığı deneylere dayanan araştırmaları temel alır. Biyomedikal araştırmalar alanında; özde teşhis-tedavi edici olanlarla, hasta için bu nitelikte olmayan ve yalnız bilimsel amaçların hedeflendiği araştırmaların birbirlerinden ayırt edilmesi gerekir.

Çevreyi etkileyebilecek araştırmaların yürütülmesi sırasında özel önlemler alınmalı ve araştırmada kullanılan hayvanlara karşı saygı içinde olunmalıdır.

Daha fazla bilimsel bilgi edinmek ve insanlığın acılarına yardım etmek için, insanlara uygulanan laboratuvar deneylerinden sonuçlar çıkartmak zaruri olduğundan, Dünya Tıp Birliği insan deneklerini içeren biyomedikal araştırmalara katılan hekimlere yol göstermek üzere aşağıdaki önerileri hazırlamıştır. Bu öneriler zaman içerisinde gözden geçirilmelidir.

Ana hatları verilen standartların, dünyadaki hekimler için yalnızca birer yol gösterici olduğunun vurgulanması gerekir.

Hekimler kendi ülkelerindeki yasaların getirdiği ceza hukuku, medeni hukuk ve etik ile ilgili sorumluluklardan bağımsız değildir.

TEMEL İLKELER

1. İnsan deneklerini içeren biyomedikal araştırmaların genel bilimsel ilkelere uyması ile birlikte hem yeterli laboratuvar-hayvan deneylerine hem de tam bir bilimsel yayın bilgisine dayanması gerekir.
2. İnsan deneklerini içeren her bir deneysel işlem tasarım ve yürütümü açık olarak formüle edilmiş bir deney protokolü şeklinde araştırmacı-sponsordan bağımsız, araştırmanın yapıldığı ülkenin yasal mevzuatına uyumlu, özel olarak atanmış bir kurula değerlendirme, yorum ve yol göstermesi amacıyla gönderilmesi gerekir.
3. İnsan deneklerini içeren biyomedikal araştırmalar bilimsel nitelikteki kişiler ile klinik alanda yetkin tıbbi elemanların gözetimi altında yürütülmelidir. Denek tarafından aksi yönde bir onam verilmiş olsa bile, araştırmadaki deneklerin sorumluluğu kesinlikle tıbbi elemanlar üzerinde olmalıdır.
4. Amaç, denek için taşınan riskten daha önemli olmadıkça insan deneklerini içeren biyomedikal araştırmaların uygulanması meşru sayılamaz.
5. İnsan deneklerini içeren her biyomedikal araştırma projesi öncesinden denek ya da başka kişiler için sağlanması gereken yararlar ile öngörülen riskler karşılaştırılarak dikkatlice değerlendirilmelidir. Deneğin yararı, her zaman bilim ve toplumun yararından üstün gelmelidir.
6. Deneklerin; sahibi oldukları değersel bütünlüğün korunmasını bekleme hakkına her zaman saygı gösterilmelidir. Deneğin kişilik haklarına saygı gösteren, fiziki ve akli bütünlüğü ile kişiliğine karşı zararlarını en aza indirgeyen her türlü önlemin alınması gerekir.
7. Olası tehlikeler konusunda tatmin edici önbilgilere sahip değillerse, hekimlerin, insan deneklerinin yer aldığı araştırma projelerini uygulamaktan kaçınmaları gerekir. Eğer tehlike potansiyel yarardan ağır basıyorsa, hekimlerin araştırmayı sona erdirmeleri gerekir.
8. Hekim, araştırma sonuçlarını yayınlarken sonuçların doğruluğunu korumak zorundadır. Bu bildirmede saptanmış olan ilkelere uymayan deney raporları yayın için kabul edilmemelidir.
9. İnsanlar üzerindeki her türlü araştırmada her denek adayı; amaçlar, yöntemler, beklenen yararlar, olası tehlikeler ve ortaya çıkabilecek rahatsızlıklar konusunda gerektiği kadar bilgilendirilmelidir. Denek adayına çalışmaya katılmama özgürlüğünün olduğu ve herhangi bir anda katılma konusunda verdiği onamı geri çekebileceği bildirilmelidir. Ondaki sonra hekimin, tercihen yazılı olarak deneğin, özgürce verilmiş, aydınlatılmış onamını alması gereklidir.

10. Araştırma projesi için onam alırken, hekim deneğin kendisiyle bağımlı bir ilişki içinde olup olmadığı ya da baskı altında bulunup bulunmadığı konusunda özel önlemler içerisinde olmalıdır. Böyle bir durumda aydınlatılmış onam, araştırmayla ilgisi olmayan ve resmi ilişkilerden tümüyle bağımsız bir hekim tarafından alınmalıdır.

11. Yasal yetersizlik (ehil olmama) durumunda aydınlatılmış onam ulusal hukuk sistemine uygun olarak yasal veli/vasiden alınmalıdır. Bedensel veya zihinsel yetersizlik, aydınlatılmış onam almayı olanaksız kıldığında ya da denek reşit değil ise ulusal mevzuata uygun olarak sorumlu akrabadan alınan izin deneğin izni yerine geçer. Reşit olmayan ocuk aslında onam verebilir durumda ise, onunki de yasal veli/vasinin onamına eklenir

12. Araştırma protokolü her zaman için, etik gereklerin gözönünde tutulduğu ifadesini içermeli ve bu bildirmede dile getirilen ilkelere uyulduğu belirtilmelidir.

TIBBİ BAKIM İLE BİRLİKTE OLAN TIBBİ ARAŞTIRMALAR (KLİNİK ARAŞTIRMA)

1. Yaşam kurtarıcı, sağlığı koruyucu ya da acıyı hafifletici olduğuna kanaat getiriyor ise, hekim, yeni tanı ve tedavi önlemlerini kullanmakta özgür olmalıdır.
2. Yeni yöntemin sebep olacağı olası yarar, zarar ve rahatsızlıklar yürürlükteki en iyi tanı ve tedavi yöntemlerinin faydalarından ağır basmalıdır.
3. Her bir tıbbi çalışmada her hastaya, varsa kontrol grubuna da, kanıtlanmış en iyi tanı ve tedavi yönteminin sağlanacağı güvencesinin verilmesi gerekir. Bu gereklilik kanıtlanmış tanı ve tedavi yöntemlerinin bulunmadığı durumda plasebo kullanımını engel değildir.
4. Hastanın araştırmaya katılmak istemeyişi, hekim-hasta ilişkisini hiçbir zaman olumsuz etkilememelidir.
5. Eğer hekim olur bildirimini alınmasının gerekli olmadığı görüşündeyse, bunun gerekçesi bağımsız kurula gönderilecek deney protokolünde belirtilmelidir.
6. Somut tıbbi bilgiler elde edilecekse, yalnızca hastanın lehine gelişecek tıbbi sonuçlara istinaden haklı görülebilecek şekilde; hekim, tıbbi araştırma ve tıbbi bakımı birarada yürütebilir.

İNSAN DENEKLERİNİN KATILDIĞI TEDAVİ EDİCİ OLMAYAN BİYOMEDİKAL ARAŞTIRMALAR (KLİNİK DIŞI ARAŞTIRMALAR)

1. İnsanlar üzerinde gerçekleştirilen salt bilimsel amaçlı araştırma uygulamalarında araştırmada yer alan kişinin, sağlık halinin ve yaşamının koruyucusu durumunda olmak hekimin ödevidir.
2. İster sağlıklı, isterse deneysel tasarımla ilgili olmayan bir hastalığı olsun, deneklerin gönüllü olmaları gerekir.
3. Devam edilmesi halinde araştırmanın kişiye zarar verebileceği görüşünde ise, araştırmacı ya da araştırma ekibinin araştırmayı durdurması gerekir.
4. İnsan üzerindeki araştırmalarda bilimin ve toplumun yararı, hiç bir zaman deneğin sağlığına verilen önemden daha önce gelmemelidir.

Prof Dr Fügen ERSOY

Prof Dr Özden SANAL

Prof Dr İlhan TEZCAN

Dr M Yavuz KÖKER

Bio. Semra Gariboğlu