



Tıp Fakültesi

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI**

**KRONİK GRANÜLOMATÖZ HASTALIKTA AKAN
HÜCRE ÖLÇERDE BELİRLenen NADPH OKSİDAZ
ENZİM AKTİVİTESİNİN VE ALT ÜNİTELERİNİN
GENOTİPİ ÖNGÖRMEDE ROLÜ**

**DR. HATİCE EZGİ BARIŞ
UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL 2018



Tıp Fakültesi

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI**

**KRONİK GRANÜLOMATÖZ HASTALIKTA AKAN
HÜCRE ÖLÇERDE BELİRLENEN NADPH OKSİDAZ
ENZİM AKTİVİTESİNİN VE ALT ÜNİTELERİNİN
GENOTİPİ ÖNGÖRMEDE ROLÜ**

**DR. HATİCE EZGİ BARIŞ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN:
DOÇ. DR. ELİF KARAKOÇ AYDINER**

İSTANBUL 2018

ÖNSÖZ

Marmara Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık eğitimi süresince her zaman desteğini hissettiğim, eğitimimiz için yoğun çaba ve emek harcayan değerli hocalarım, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı (ABD) Prof. Dr. Perran Boran ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD Klinik Sağlık Hizmetleri Sorumlusu Prof. Dr. Gülnur Tokuç'a,

Tezimin başlangıcından bitişine kadar bilgi birikiminden devamlı faydalandığım, daima olumlu yönlendirmeler yapan değerli tez danışmanı hocam Doç. Dr. Elif Karakoç Aydın'er'e,

Tezime katkılarından dolayı Çocuk Allerjisi ve İmmunolojisi Bilim Dalı hocaları Prof. Dr. Safa Barış'a ve Prof. Dr. Ahmet Oğuzhan Özen'e, Doktor Öğretim Görevlisi Ayça Kıyıkım'a, bölüm uzmanları Dr. Nurhan Kasap, Dr. Sevgi Bilgiç Eltan, Dr. Ercan Nain ve başta Dr. İsmail Öğülür, yüksek lisans öğrencileri Bengü Akçam ve Dilek Başer olmak üzere Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Mesleki olarak gelişmemde büyük katkıları olan ve her birinin üzerimde ayrı ayrı emeği bulunan tüm değerli Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı hocalarıma,

Tezimi planlarkenki heyecanımı asla unutmayacağım, özlemle hatırladığım değerli hocam Prof. Dr. Işıl Barlan'a,

Beni yetiştiren ve her zaman yanımda olan aileme,

Teşekkür ederim.

Dr. Hatice Ezgi Barış

ÖZET:

Giriş: Kronik granümatöz hastalık (KGH), doğal immün sistemde bozuklukla karakterize nadir bir bağışıklık yetmezliğidir. Fagositer hücrelerde yer alan ve patojenlerle karşılaşıldığında nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz enzim sistemi tarafından üretilen reaktif oksijen radikallerinin üretilmemesine bağlı olarak ciddi bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar gözlenir. Hastalığın kesin tanısı genetik analiz yapılarak konulur. Fakat sonuçlanması uzun sürmekte ve maliyeti yüksektir. Bu çalışmanın amacı kliniğimizde genetik mutasyonu bilinen KGH tanılı bireylerin ve annelerinin klinik ve demografik özelliklerinin analizi ve hastalar ve annelerinde NADPH oksidaz enzimi alt ünitelerinin akan hücre ölçerde ölçülmesinin ilgili protein eksikliğine yol açan mutasyonu öngörmedeki rolünün araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilmekte olan 25 KGH hastası ve anneleri alındı. 25 hastanın klinik, demografik ve laboratuvar özellikleri değerlendirildi. Hastalar daha önceden belirlenmiş dihidrorodamin (DHR) stimülasyon indeksi değerleri ve genetik mutasyonlarına göre X'e bağlı veya otozomal çekinik kalıtım özelliğine göre sınıflandırıldı. NADPH oksidaz enzim sisteminin alt üniteleri, hastalardan alınan kan örneklerinde spesifik antikorlarla hücre içi boyanarak, eksik olan protein akan hücre ölçerde tayin edildi.

Sonuçlar: Çalışmaya alınan 25 hastanın 6'sı kız (%24), 19'u erkekti (%76). Hastaların güncel ortanca yaşları 10.8 (5.2-18.0) yıldır. Hastalığın başlangıç yaşı ortancası 1.3 (0.3-4.7), tanı yaşı ortancası ise 4 (14-13.5) yıldır. Ortanca izlem süresi 4.4 (1.8-7.2) yıl idi. DHR testi ile 12 (%48) hastanın X'e bağlı, 13 (%52) hastanın ise otozomal resesif geçişli KGH olduğu anlaşıldı. Beş (%20) hastanın genetik tanısı bilinmemekteydi. Genetik tanısı bilinen hastalardan 10 (%40) tanesinde *CYBB* geninde, 8 (%32) hastada *NCF1* geninde, 1 (%4) hastada *CYBA* geninde, 1 (%4) hastada ise *NCF2* geninde mutasyon saptandı. Hücre içi boyama yapılarak kullanılan antikor kombinasyonu ile mutasyonun hangi proteinde olduğu doğru tahmin edildi. Buna göre boyama yapılan gp91 (n=5) ve p22 (n=1) hastalarında DHR testi yardımıyla beraber olguların tamamında mutasyonun hangi gende

olabileceği tahmin edildi. Diğer taraftan p47 (n=8) ve p67 (n=1)'de ise sadece hücre içi boyama ile mutasyonun hangi gende olabileceği %100 doğrulukta bulundu.

Tartışma: Kronik granüloamatöz hastalıkta NADPH oksidaz enzimin alt ünitelerinin spesifik antikorlarla boyanarak akan hücre ölçerde ölçümü ile hastaların genetik tanısı hızlı ve maliyet etkin olarak öngörülebilir.

Anahtar kelimeler: Kronik granüloamatöz hastalık, NADPH oksidaz, Dihidrorodamin, *CYBB*, *NCF1*, *CYBA*, *NCF2*, gp91, p47, p67, p22.



ABSTRACT:

Introduction: Chronic granulomatous disease (CGD) is a rare innate immune system defect. It is characterized by severe bacterial and fungal infections which are seen due to defective production of reactive oxygen species by phagocytic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) in response to pathogens. Definitive diagnosis is made by genetic analysis which is expensive and time consuming. We aimed to analyze clinical and demographic features of our CGD patients and their mothers and investigate the role of flow cytometric analysis of NADPH oxidase enzyme subunits in predicting the genetic diagnosis of the patients.

Methods: 25 patients followed for CGD in Marmara University Pendik Research and Training Hospital and their mothers were included into the study. Demographic, clinical and laboratory features are collected from patient charts. Patients are classified as X-linked or autosomal recessive CGD according to their genetic mutations and dihydrorhodamine (DHR) stimulation index values. Subunits of NADPH oxidase enzyme were intracellularly stained with specific antibodies and deficient subunit was detected by flow cytometer.

Results: Six (42%) patients were female and 19 patients were male. Median age was 10.8 (5.2-18.0) years. Median age at disease onset was 1.3 (0.3-4.7) and at diagnosis was 4 (14-13.5) years. Median follow up was 4.4 (1.8-7.2) years. Twelve patients were X-linked and 13 patients were autosomal recessive CGD according to DHR test. Five patients had no genetic diagnosis. Ten patients had *CYBB*, 8 patients had *NCF1*, 1 patient had *CYBA* and 1 patient had *NCF2* mutation. We detect the protein which is mutated by intracellular staining. Patients with gp91 (n=5) and p22 (n=1) mutations were able to be detected with intracellular staining and DHR testing. Patients with p47 (n=8) and p67 (n=1) were distinguished with intracellular staining without DHR testing.

Discussion: Analysis of NADPH oxidase enzyme subunits on flow cytometry can predict genetic diagnosis of CGD patients in a quick and low-cost way.

Key Words: Chronic granulomatous disease, NADPH oxidase, Dihydrorhodamine, *CYBB*, *NCF1*, *CYBA*, *NCF2*, gp91, p47, p67, p22

İÇİNDEKİLER

	Sayfalar
Önsöz.....	i
Özet.....	ii
İngilizce Özet (Abstract).....	iv
İçindekiler.....	v
Tablolar Dizini.....	vii
Şekiller Dizini.....	viii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	ix
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Kronik granülomatöz hastalık (KGH).....	3
2.1.1. KGH tarihçesi.....	3
2.1.2. KGH görülme sıklığı ve kalıtım şekli.....	4
2.1.3. NADPH enzimi.....	4
2.1.3.1. NADPH enzimi bileşenleri.....	5
2.1.3.2. NADPH enzimi aktivasyonu.....	7
2.1.3.3. NADPH enzimi fonksiyonu.....	10
2.1.4. KGH'ye yol açan moleküler patoloji ve gen mutasyonları.....	12
2.1.5. KGH hastalarında klinik özellikler.....	14
2.1.5.1. Enfeksiyonlar.....	14
2.1.5.2. İnflamatuvar bozukluklar.....	16
2.1.6. KGH taşıyıcılarında klinik özellikler.....	17
2.1.7. Tanı yöntemleri.....	18
2.1.7.1. NADPH oksidaz aktivitesi ölçümü.....	18
2.1.7.2. NADPH oksidaz alt ünitelerinin belirlenmesi.....	20
2.1.7.3. Mutasyon analizi.....	21
2.1.7.3.1. X'e bağlı KGH'de mutasyon analizi.....	21
2.1.8. Tedavi.....	22
3. Gereç ve Yöntem.....	25

3.1. NADPH enzimi alt ünitelerinin hücre içi boyanması.....	25
3.2. Dihidrorodamin testi.....	26
3.3. İstatiksel analiz.....	28
4. Bulgular.....	29
4.1. Demografik özellikler, klinik bulgular ve enfeksiyonlar.....	29
4.2. Enfeksiyon etmenleri.....	32
4.3. Enfeksiyonlar dışında klinik özellikler.....	32
4.4. Görüntüleme bulguları.....	33
4.4.1. Toraks Bilgisayarlı Tomografi (BT) Bulguları.....	33
4.4.2. Diğer görüntüleme bulguları.....	33
4.5. Tedavi ve Sağkalım.....	35
4.6. Laboratuvar bulguları.....	36
4.7. NADPH enzimi alt ünitelerinin hücre içi boyanması.....	38
5. Tartışma.....	44
5.1. Demografik özellikler, klinik bulgular, enfeksiyonlar ve etmenler.....	44
5.2. Enfeksiyon dışı bulgular.....	46
5.3. Görüntüleme bulguları.....	48
5.4. Tedavi ve sağkalım.....	49
5.5. Laboratuvar bulguları ve tanı.....	52
5.5.1. Kronik granülomatöz hastalığın tanısında DHR'nin yeri.....	52
5.5.2. Mutasyon çeşitliliği ve genetik tanı.....	53
5.5.3. Hücre içi boyamalar.....	54
6. Sonuçlar.....	57
7. Referanslar.....	59
8. Ekler.....	74
Ek 1A: Bilgilendirme formu.....	74
Ek 1B: Gönüllü onay formu.....	76
Ek 2: Etik kurul onayı.....	77
Ek 3: Hasta takip formu.....	78

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1 Hastaların genetik tanıları ve dihidrorodamin testine göre kalıtım şekli

Tablo 2 Hastaların klinik özellikleri

Tablo 3 Hastaların immunglobulin değerleri

Tablo 4 p47 ve gp91 için MFI değerleri dağılımı



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Sitokrom b⁵⁵⁸ modeli

Şekil 2 Sitoplazmik alt ünitelerin şematik gösterimi

Şekil 3 NADPH oksidaz kompleksi aktivasyonunun moleküler mekanizmaları

Şekil 4 Fagozom içinde reaktif oksijen türevlerinin üretimi

Şekil 5 KGH'ye yol açan moleküler patoloji ve mutasyonlar

Şekil 6 Reaktif oksijen radikallerinin üretildiği reaksiyonlar ve kataliz eden enzimler

Şekil 7 Nitroblue tetrazolium testi.

Şekil 8 Cilt granülomu ve granülomdan alınan biyopsi

Şekil 9 İnvaziv *Aspergillus* enfeksiyonu olan bir olguda akciğer tutulumu

Şekil 10 Kranial MR'da gözlenen kontrast tutan ve granülom olduğu düşünülen lezyonların yapısı

Şekil 11 Sağkalım oranları

Şekil 12 Kalıtım tipine göre DHR stimülasyon indeksinin gösterimi

Şekil 13 Akan hücre ölçer ile farklı NADPH enzim bileşenlerinin analizi

Şekil 14 Farklı hastalarda ve ebeveynlerde, sağlıklı kontrollere göre NADPH enzim bileşenlerinin histogram üze rinde yerleşim durumu

Şekil 15 gp91 MFI değerlerinin sağlıklılar, hastalar ve taşıyıcılar arasında kıyaslanması

Şekil 16 p47 MFI değerlerinin sağlıklılar, hastalar ve taşıyıcılar arasında kıyaslanması

KISALTMALAR

BCG	: Bacille Calmette Guerin
CAA	: eyrekler arası aralık CAA
DHR 123	: Dihidrorodamin 123
EDTA	: Etilen daimin tetra asetik asit
fMLP	: Formil metionil lösil fenilalanin
GAP	: GTPase-activating proteins
GEF	: Guanine-nucleotide exchange factors
IFN-γ	: Transkripsiyonu interferon-γ
IVIG	: İntravenöz immunoglobulin
KGH	: Kronik granülomatöz hastalık
MFI	: Mean fluorescence intensity
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
OPR	: Oktikoza peptid tekrarı
OR	: Otozomal resesif
PB1	: Phox ve Bem-1
PMA	: Forbol miristat asetat
PtdIns	: Fosfatidilinozitol
PX	: Phox homology
SH3	: Src homolog bölge3
SI	: Stimülasyon indeksi
TMP-SMX	: Trimetoprim-sulfametoksazol
X-KGH	: X'e bağı KGH

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik granüloamatöz hastalık (KGH), doğal immün sistem sisteminde bozuklukla karakterize nadir bir bağışıklık yetmezliğidir. Bu hastalıkta fagositer hücrelerde yer alan ve patojenlerle karşılaşıldığında nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz enzim sistemi tarafından üretilen reaktif oksijen radikallerinin üretilmemesine bağlı olarak ciddi bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar gözlenir.

NADPH oksidaz enzim sistemi fagositik lökositlerde bulunur ve beş alt ünitelerden oluşur. Bunlar uyarılmamış hücrede membrana bağlı olarak bulunan sitokrom *b₅₅₈* i oluşturan transmembran glikoproteinler gp91^{phox} ve p22^{phox} ile sitozolik alt üniteler olan ve heterotrimer oluşturan p40^{phox}, p47^{phox} ve p67^{phox} dir. Mikroorganizmaların hücre membranına bağlanmasıyla aktive olan fagositlerde heterotrimer, sitokrom *b₅₅₈* ile aktifleşir ve bunun sonucunda mikroorganizmaların yok edilmesinde görev alan superoksit ve hidrojen peroksit üretilir.

KGH, NADPH oksidaz alt ünitelerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bu genler gp91^{phox} yi kodlayan *CYBB* (X'e bağlı geçiş) ile otozomal resesif geçişli p22^{phox} yi kodlayan *CYBA*, p47^{phox} i kodlayan *NCF1*, p67^{phox} yi kodlayan *NCF2* ve p40^{phox} i kodlayan *NCF4* genleridir.

Hücresel düzeyde fagositlerdeki NADPH enzim aktivitesini ölçülerek KGH tanısı konulabilir. Bu amaçla kullanılan testler nitroblue tetrazolium (NBT) testi ile dihidrorodamin 123 (DHR 123) testidir. DHR 123 testi ile kalıtım şekli de ayırt edilebilmekte ve X'e bağlı (X-KGH) geçişli formda taşıyıcılar saptanabilmekte ancak otozomal resesif (OR) geçişli formlar birbirinden ayırt edilememektedir. Genetik analiz yapıldığında ise kesin olarak hastalıktan sorumlu beş genden hangisinde mutasyon olduğu saptanabilmekte, fakat sonuçlanması uzun sürmekte ve maliyeti yüksektir. Ancak hastalığın seyri kalıtım biçimine göre farklılık gösterebildiğinden genetik mutasyonun saptanması kullanılacak tedavi yöntemlerinin seçiminde klinisyene yol göstermektedir.

NADPH oksidaz enziminin alt ünitelerine yönelik antikolar kullanılarak hücre içi ve yüzey boyamalarıyla akım sitometrisinde alt grup analizi, KGH alt tipini genetik analiz yapmadan saptamada kullanılacak bir yöntemdir. Böylece, hastalıktan sorumlu tüm

genlerin dizilenmesi yerine sadece akım sitometrisi ile elde edilecek sonuçlar doğrultusunda en olası gen dizilenerek, kesin tanıya daha hızlı ve düşük maliyetle ulaşmak mümkündür.

Bu çalışmanın amacı kliniğimizde genetik mutasyonu bilinen KGH tanılı bireylerin ve annelerinin klinik ve demografik özelliklerinin analizi ve hastalar ve annelerinde NADPH oksidaz enzimi alt ünitelerinin akan hücre ölçerinde ölçülmesinin ilgili protein eksikliğine yol açan mutasyonu öngörmedeki rolünün araştırılmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Granüloamatöz Hastalık (KGH)

Kronik granüloamatöz hastalık, nadir görülen kalıtsal bir immün yetmezliktir. Fagositer hücrelerdeki NADPH enziminin alt ünitelerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucunda reaktif oksijen üretimi ve buna bağlı olarak da patojenlerin fagositler tarafından öldürülmesi bozulur. Erken yaşta tekrarlayan bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar gözlenir. Sıklıkla dış dünyayla temas halinde bulunan organlarda (akciğerler, gastrointestinal sistem ve cilt gibi) enfeksiyon gözlenmekle birlikte, direkt veya hematojen yayılımla kemik, karaciğer ve beyin gibi derin doku ve organlar da enfeksiyonlardan etkilenir (1-3). Enfeksiyonların yanı sıra, hastalığın en önemli özelliklerinden birisi artmış inflamasyona bağlı gözlenen granülomlar ve otoimmün bulgulardır (1,4).

2.1.1. KGH tarihçesi

KGH ilk olarak 1957 yılında sadece erkek çocuklarda tanımlanmıştır. İlk tanımlanan dört erkek çocukta kronik supüratif lenfadenit, hepatosplenomegali, dermatit ve akciğerde infiltrasyonlar gözlenmiştir (5). O dönemde hastalık ölümcül seyrettiği için ilk tanımlandığında ‘çocukluk çağıının ölümcül granüloamatöz hastalığı’ adını almıştır. Hastalardan alınan biyopsilerde ya da otopsi dokularında granüloamatöz lezyonlar gözlenmiş, bu lezyonlardan mikobakteri, mantar ya da bakteri izolasyonu başarısız olmuştur. Ancak enfeksiyon dönemlerinde ya da otopsilerde çeşitli dokularda stafilokoklar, enterobakterler ve Candida saptanmıştır (6). Laboratuvar bulguları hastalıkla ilgili yön göstermezken, hastalarda aşı yanıtları normal saptanmış ve hipergammaglobulinemi gözlenmiştir. Genellikle hastalar antibiyotik tedavisine ve intravenöz immunoglobulin (IVIG) replasmanına rağmen tedaviye cevap vermeyen ciddi akciğer enfeksiyonları nedeniyle kaybedilmişlerdir.

Öncelikle hastalığın yalnızca erkek çocuklarda gözlendiği ve X’e bağlı kalıtıldığı düşünülürken, 1962 yılında benzer sendrom üç kız kardeşte tanımlanmıştır (7). Hastalık

kız çocuklarda da tanımlandıkça, X'e bağılı kalıtımın dışında başka kalıtım tiplerinin de olabileceğı anlaşılmıştır.

Hastalığın mekanizması üzerine yapılan çalışmalarda fagositozun normal olarak gözlendiğı ancak fagositik vakuollerin büyüyemediğı saptanmış bu nedenle vakuollerin olgunlaşmasında defekt olduğı düşünölmüştür (8,9). Daha sonra yapılan çalışmalarda enfeksiyonlara yatkınlık yaratan mekanizmanın KGH hastalarının polimorfonökleer lökositlerinde hidrojen peroksit radikallerinin üretilememesi olduğı anlaşılmıştır (10).

2.1.2. KGH görölme sıklığı ve kalıtım şekli

KGH sıklığı dünyada hemen hemen 1/ 200.000- 250.000 arasında tanımlanmıştır (11,12). Birleşik krallık ve İrlanda'yı kapsayan bir çalışmada ise dünyadaki iki katı sıklıkta tanımlanmış ancak geçmiş çalışmalara göre daha iyi hasta kaydı tutulması dışında bir sebep bulunamamıştır (13). Türkiye'deki sıklığı tam olarak bilinmemektedir.

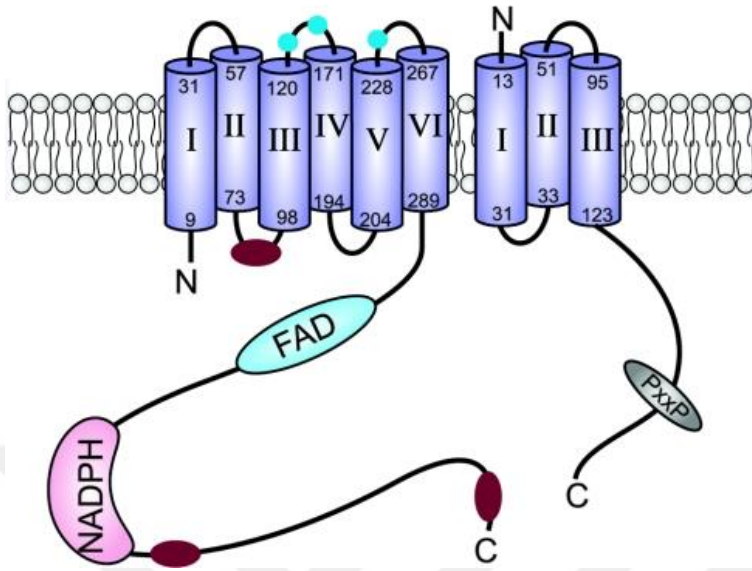
KGH, X'e bağılı ve otozomal resesif olmak üzere iki şekilde kalıtılmaktadır. Dünyada yapılan çalışmalarda en sık X'e bağılı kalıtım gözlenmektedir (11-16). X'e bağılı kalıtım çeşitli çalışmalarda değişmekle birlikte %57-70 arasında bildirilmiştir. Türkiye'de Köker ve arkadaşları tarafından bildirilen en geniş kohortta ise dünyadaki aksine otozomal resesif kalıtım daha sık gözlenmiş ve X'e bağılı kalıtım %38 oranında saptanmıştır (17). Bunun sebebi olarak da ölkemizde akraba evliliğinin sık olması öngörölmüştür.

2.1.3. NADPH enzimi

Günümüzde KGH'ye yol açan moleküler düzeydeki bozukluğun polimorfonökleer lökositlerdeki NADPH oksidaz enziminin beş alt ünitesini (gp91^{phox}, p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} ve p67^{phox}) kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı net olarak bilinmektedir.

2.1.3.1. NADPH enzimi bileşenleri

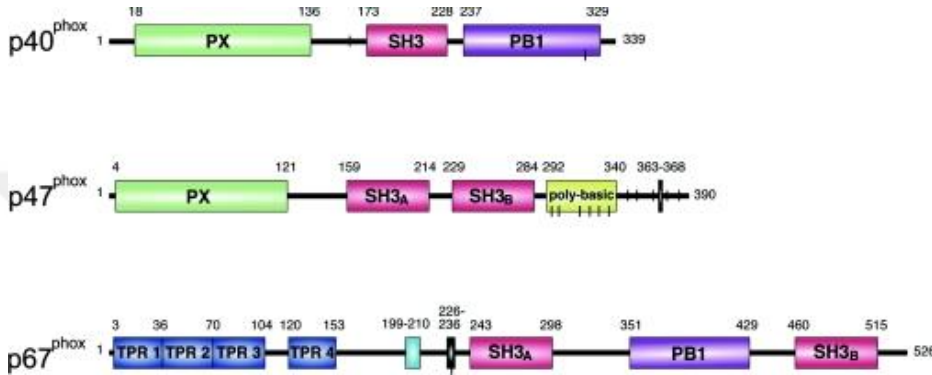
Fagositlerde bulunan NADPH oksidaz, hücre membranına bağlı katalitik bir alt ünite ve uyarılmamışken sitozolde yer alan ancak stimüle edildiğinde aktive olup hücre membranına doğru yer değiştiren birkaç adet alt ünitelerden oluşmaktadır. Membrana bağlı katalitik alt ünite gp91^{phox} adı verilen bir flavohemoproteindir. gp91^{phox}, hücre membranında bir transmembran protein olan gp22^{phox} ile stabilize edilir. Bu kompleks flavositokrom *b*₅₅₈ olarak adlandırılır (**Şekil 1**) (18,19). gp91^{phox}'in N-terminal ucu membranı dolanan 6 tane hidrofobik bölge ve üç tane glikolize N-terminal uca bağlı bölgeden oluşur. Proteinin transmembran kısımlarında her birisi iki histidin arasında bulunan iki tane hem proteini bulunur. gp91^{phox} proteininin bu kısmı gp22^{phox} ile etkileşimde rol alır (20). C-terminal ucu ise hidrofilik ve sitozolde yerleşimli olup bir adet FAD içerir (21). Tıpkı gp91^{phox} gibi, gp22^{phox} alt ünitesinin de N terminal ucu hidrofobik transmembran heliksler şeklinde ve C terminal ucu ise daha hidrofildir. gp22^{phox}'un N terminal ucunda üç adet transmembran heliks, C terminal ucunda ise prolinen zengin PxxP bölgesi bulunur.



Şekil 9. Sitokrom b^{558} modeli. $gp91^{phox}$ ve $p22^{phox}$ 'un transmembran heliksleri gösterilmektedir. $gp91^{phox}$ 'un glikolizasyon bölgeleri mavi noktalar şeklinde gösterilmiştir. kırmızı bölgeler ise aktivasyon esnasında $p47^{phox}$ ile etkileşimde bulunan bölgelerdir. $p22^{phox}$ 'un sitoplazmik PxxP motifi gri olarak gösterilmiş ve $p47^{phox}$ ile etkileşmektedir (Groemping Y, et al. Biochem J. 2005;386(Pt 3):401-16.).

NADPH enziminin sitozolik bileşenlerinden olan $p47^{phox}$ ve $p67^{phox}$, proteinlerin prolinden zengin bölgeleriyle etkileşime geçtiği bilinen iki adet src homolog bölge3(SH3) bulundurur (**Şekil 2**). Bu sitozolik alt ünitelerin her ikisi de en az bir adet prolinden zengin bölgeye sahiptir. SH3-prolin etkileşiminin $p47^{phox}$ ve $p67^{phox}$ alt ünitelerini uyarılmamış hücrelerde, inaktif konformasyonda tuttuğu düşünülmektedir. Aynı zamanda SH3-prolin etkileşimi, sitozolik alt ünitelerle flavositokrom b_{558} arasındaki etkileşimi kolaylaştırarak NADPH enziminin aktive olmasını sağlamaktadır (22,23). $p67^{phox}$ C terminalinde küçük GTPaz'lar olan Rac1 ve Rac2'nin bağlanmasını sağlayan olan dört tane tetra-trokopeptit (TPR) bölgesi içermektedir (24,25). Bu mekanizma da NADPH oksidazı aktive etmektedir. Üçüncü sitoplazmik bileşen olan $p40^{phox}$ ise uyarılmamış hücrelerde $p47^{phox}$ / $p67^{phox}$ kompleksinin stabilizasyonunu ve oksidaz aktivasyonu esnasında hücre membranına doğru yer değiştirmesini sağlamaktadır. Hem $p40^{phox}$ hem de $p47^{phox}$ 'phox homology' (PX) denilen ve plazma membranındaki fosfatidil fosfoinozitidlere bağlanarak aktif NADPH oksidazın stabilizasyonunu sağlayan bölgelere sahiptir (26). $p47^{phox}$ 'nin PX

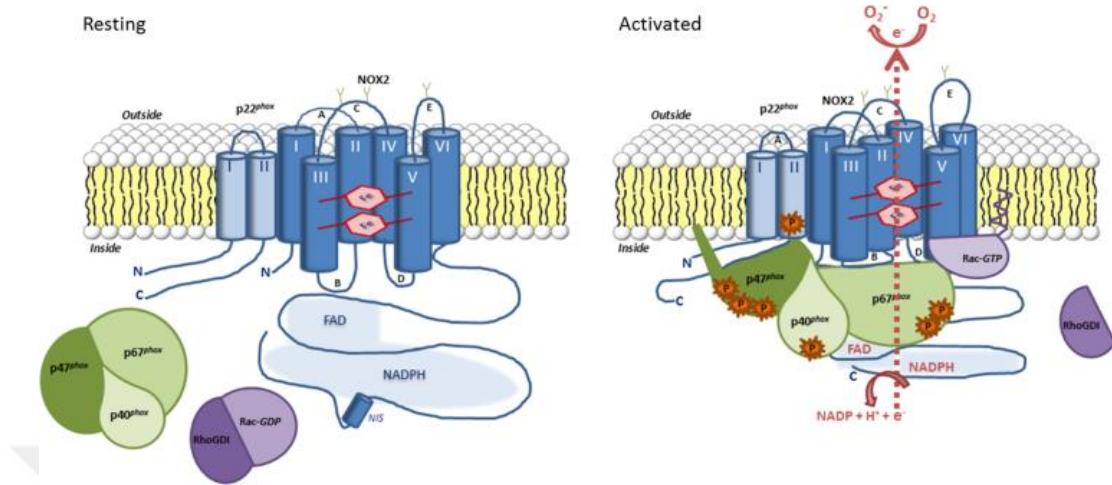
bölgesi prolinden zengin olup uyarılmamış durumda p47^{phox}'nin her iki SH3 grubuyla etkileşim halindedir (27). Bu etkileşimin p47^{phox}'un kendi kendini inhibe etmesini sağladığı düşünülmektedir. p40^{phox} ise C terminalinde bir oktikoza peptid tekrarı (OPR) içerir ve bu bölge de p67^{phox}'nin PB1(Phox ve Bem-1) bölgesine bağlanmaktadır (28).



Şekil 10. Sitoplazmik alt ünitelerin şematik gösterimi (Groemping Y, et al. Biochem J. 2005;386(Pt 3):401-16.).

2.1.3.2. NADPH enzimi aktivasyonu

Aktive olmamış fagositlerde NADPH oksidaz enzimi inaktif durumundayken, flavohemoprotein gp91^{phox} substratı olan NADPH için ulaşılabilir konumdadır. p47^{phox} ve p67^{phox} proteinlerinin flavositokrom b₅₅₈ ile etkileşimi sonucunda NADPH gp91^{phox} üzerindeki bağlanma bölgesine ulaşır (Şekil 3). Sitolitik NADPH oksidaz bileşenlerinin flavositokroma translokasyonu fagosit aktivasyonu esnasında p47^{phox}, p67^{phox} ve p40^{phox}'un serin fosforilasyonu ile başlar (29,30). Bu bileşenler protein kinaz C izoformları ERK/P38MAPK-bağımlı yolak, cAMP bağımlı protein kinazlar ve protein tirozin kinaz bağımlı yolak tarafından fosforile edilir. Fosforilasyon NADPH oksidaz aktivasyonunda anahtar olaydır. p47^{phox} en çok fosforilasyona uğrayan alt ünitedir. p47^{phox} yokluğunda ne p40^{phox} ne de p67^{phox} membrana transloke olabilir.



Şekil 11. NADPH oksidaz kompleksi aktivasyonunun moleküler mekanizmaları. Aktive edilmemiş fagositlerde NADPH oksidaz enzim kompleksi alt ünitelerinden ayrılmış haldedir. gp91^{phox} ve p22^{phox}dan oluşan sitokrom b558 membranda, sitozolik faktörler p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} ise sitoplazmada kompleks halinde bulunur. Küçük GTP-bağlayıcı protein Rac inaktif formda GDP ve Rho-GDI ile birlikte. Aktivasyon sonrası fosforilasyon ve konformasyonel değişiklikle NADPH oksidaz alt üniteleri bir araya gelir. Aktive Rac-GTP transloke olur ve membrana tutunarak NADPH oksidaz kompleksine bağlanır. Bir araya gelen NADPH oksidaz kompleksi NADPH'tan FAD ve hem gruplarına elektron transferini yaparak moleküler oksijeni superoksite indirger (O'Neill S. et al. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. Redox Biol 2015;6:135-56).

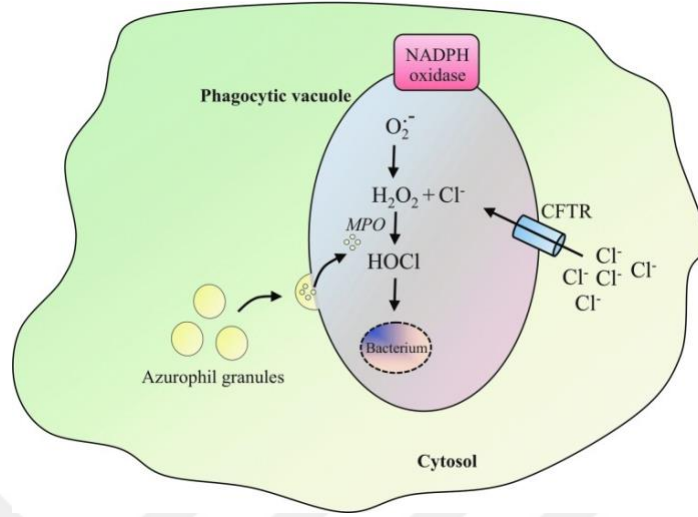
Alt ünitelerin fosforilasyonuna ilaveten, membran fosfolipidlerinin NADPH oksidaz aktivasyonunda önemli rol oynadığı bulunmuştur. Nötrofil aktivasyonu esnasında fosfoinozidit-3-hidroksi kinazlar tarafından hücre membranındaki fosfatidilinozitol (PtdIns) türevlerini fosforlaması, sitozolik oksidaz bileşenlerinin membrana doğru yer değiştirmesini kolaylaştırır. p40^{phox}'ın PX bölgesi PtdIns(3)fosfata, p47^{phox}'ın PX bölgesi ise PtdIns(3,4)fosfata bağlanır (31). gp91^{phox} ile sitozolik bileşenlerin arasındaki yük etkileşimlerinin de oksidaz kompleksinin oluşmasında etkili olduğu düşünülmektedir, çünkü mutant gp91^{phox} proteinine değişik yüklü aminosit eklenmesiyle sitozolik bileşenlerin membrana doğru transloke olamadığı gözlenmiştir (21). Bunun yanında sitoplazma iskeletini oluşturan aktin moesin ve calprotektin proteinlerine bağlanmanın da oksidaz kompleksinin uygun yerleşimini ve stabilizasyonunu sağladığı düşünülmektedir

(32-34). Buna ilaveten miyeloid ilişkili proteinler olan MRP8 ve MRP14 de fagosit aktivasyonu esnasında gp91^{phox} proteinindeki konformasyonel değişimde rol oynuyor gibi gözükmemektedir (35). Oluşturulan NADPH enzim kompleksi, stabil bir yapı olmayıp devamlı olarak sitozolik bileşenlerin membrana bağımlı bileşenlerle ayrılması ve birleşmesi gerçekleşir ancak NADPH'den oksijene elektron transferi için sitozolik komponentlerin enzim kompleksi içinde varlığının gerekip gerekmediği net olarak bilinmemektedir(36).

Bazı düşük molekül ağırlıklı GTP-bağlayıcı proteinler de NADPH oksidaz aktivasyonunda rol almaktadır. Bunlardan biri p21rac olup fagositlerde iki alt tipi bulunmaktadır: esas olarak makrofajlarda bulunan Rac1 ile daha ziyade nötrofillerde bulunan Rac2. Nötrofil aktivasyonu esnasında bu GTP bağlayıcı proteinler, inaktif GDP-bağlanmış durumdan aktif GTP-bağlanmış duruma geçerler. Bu süreç 'guanine-nucleotide exchange factors' (GEFs) ve 'GTPase-activating proteins' (GAPs) tarafından kontrol edilir(37-39). Fagositlerde iki adet Rac aktive eden GEFs tanımlanmıştır: P-Rex1 ve Vav1. P-Rex1 sinerjistik olarak PtdIns(345)P₃ ve membran reseptörleriyle ilişkili trimerik G proteinler tarafından aktive edilir. Bu da göstermektedir ki P-Rex1, nötrofillerde direkt olarak bu reseptörlere ligand bağlanmasıyla kontrol edilir, ancak bu sadece C5a için kanıtlanmıştır (40). Vav1 ise tirozin fosforilasyonu ile aktive edilmektedir. Fagositlerde formil-methionil-lösil-fenilalanine(fMLP), C5a, IgG kompleksleri, lipopolisakkaridler ve kalsiyum ionofora yanıt olarak Rac1 ve Rac2, Vav1 tarafından aktive edilir (41,42). Hem sitoplazmada hem de hücre membranında bazı GAP proteinleri tanımlanmıştır. Bu proteinler Rac'ı inaktive ederek respiratuar burst'ü sonlandırmaktadır (43). Rac inaktif durumdayken, Rho GDP-dissociation inhibitör (RhoGDI) ile bir kompleks halinde durmaktadır. Aktive edilmiş GTP-bağımlı Rac gp67^{phox}'a bağlanır, aynı zamanda membran fosfolipidleriyle de ilişki kurar (**Şekil 3**). Büyük ihtimalle Rac, gp91^{phox} ile de ilişki kurarak gp91^{phox} aracılığıyla elektron akımını kolaylaştırır (44). Başka bir düşük molekül ağırlıklı GTP-bağlayıcı protein olan Rap1A ise membrandaki flavositokrom b₅₅₈ ile bağlantılıdır. Bu bağlantı Rap1A'nın protein kinaz A aracılı fosforilasyonu sonrasında azalır, bu nedenle ileri sürülmektedir ki Rap1A, NADPH aktivitesini hücre içince cAMP'yi arttıran ajanlara yanıt olarak düzenlemektedir (45).

2.1.3.3. NADPH enzimi fonksiyonu

KGH fagositlerindeki fonksiyon bozukluğunun süperoksit, hidrojen peroksit, hipokloroz asit gibi süperoksitten türeyen radikallerin üretilmemesi olduğu bilinmektedir. Normal fagositlerde NADPH oksidaz fagozom içinde süperoksit anyon radikallerini üretir. Süperoksitin bakterisidal potansiyeli düşük olup hızlıca hidrojen peroksite dönüşür. Hidrojen peroksit ise daha sonra miyeloperoksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonla fagositlerin esas silahı olan hipokloroz asite dönüşür (**Şekil 4**). Süperoksit ve hidrojen peroksitin bakterisid etkileri düşük de olsa, hipokloroz asitin üretilmediği miyeloperoksidaz eksikliğinde hücreler neredeyse normal bakterisidal aktivite göstermektedir. Bunun yanında KGH hücreleri, bakterilerle birlikte glukoz varlığında hidrojen peroksit üretebilen glukoz oksidazın bulunduğu ortamda inkübe edildiğinde, belirgin bir şekilde bakterileri öldürebilmektedir. Bu da göstermektedir ki reaktif oksijen bileşikleri esas bakterisidal ajanlardır (46). Alternatif bir düşünce ise şu şekildedir. Lökosit esteraz ve katepsin G proteini eksik farelerin lökositleri ile gp91^{phox} proteini eksik farelerin lökositleri bakterilere karşı benzer şekilde etkisiz olduğu gözlenmiştir. Bu proteazların granüllerden katyonlar aracılığı ile serbestleştirildiği ve bu olay da bakteri içeren nötrofil fagozomlarında potasyumun içeri girmesiyle gerçekleşir. Bu ise fagosomda üretilen süperoksitlerin birikimiyle ortaya çıkan protonların içeri girmesiyle kolaylaşır. KGH fagositlerinde süperoksit birikimi olmadığından bu organellerdeki proteaz aktivitesi ve buna bağlı olarak da bakteriyel öldürme azalmaktadır (47). Voltaj-kapılı H⁺ kanalı Hv1 aracılığıyla sitozolden fagozoma proton translokasyonu, NADPH oksidaz aktivitesinin devamını sağlayan en önemli iyon hareketidir (48). Buna ilaveten reaktif oksijen türevlerinin hem direkt hem de indirekt etkisiyle fagositlerde antimikrobiyel etki mümkün olabilmektedir (49).



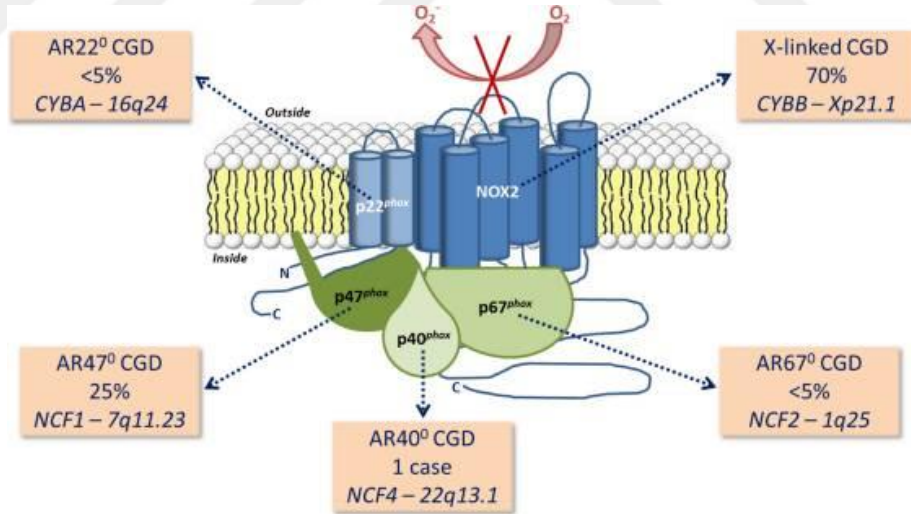
Şekil 12. Fagozom içinde reaktif oksijen türevlerinin üretimi. Fagositoz ile birlikte kistik fibroz transmembrane konduktans regulator (CFTR) kanalları fagozom membranında aktifleşerek fagozom içine klor (Cl^-) anyonlarını taşır. NADPH oksidaz kompleksi tarafından üretilen süperoksit anyonları (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşür. Miyeloperoksidaz ise H_2O_2 ile Cl^- arasındaki reaksiyonu katalizler ve hipokloroz asit oluşur (HOCL) (Sabrina Bréchar, et al. Antioxid Redox Signal. 2013;18(6):661-76.).

KGH'nin en önemli özelliğinden biri de yaygın granülomlardır. Bazı çalışmalar ileri sürmektedir ki NADPH oksidazın reaktif oksijen türevlerini üretememesi sonucunda azalmış apoptoz, granülomlara yol açar (50). Diğer yandan KGH nötrofillerinde inflamatuvar mediyatörlerin devamlı olarak gen ekspresyonunun arttığı da saptanmıştır. Buna karşılık KGH nötrofillerinde, normal nötrofillerde görülen aksine fagositozla tetiklenen apoptoz esnasında Bax ekspresyonunun artmadığı gözlenmiştir (51). Bu nedenle KGH hastalarında granülom oluşumu KGH nötrofillerinin hayatta kalmasını destekleyen artmış proinflamatuvar aktiviteye bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu artmış gen ekspresyonu reaktif oksijen türevlerinin direkt ya da indirekt etkisi olabilir. Buna ilaveten bakteri ve apoptotik hücrelerin fagositozu esnasında KGH nötrofilleri ve makrofajlar tarafından yeterince anti-inflamatuvar mediyatör salgılamaması da inflamasyonun devam etmesine katkıda bulunuyor olabilir (52). Bunun yanında apoptotik KGH nötrofil hücre yüzeyinde az miktarda fosfatidil serin içermektedir ki bu da makrofajlar tarafından nötrofilin gecikmeli olarak ortadan kaldırılmasına yol açar (50).

KGH hastalarında nötrofillerdeki bozukluğun yanında B hücre alt tiplerinden CD27⁺memory B hücrelerde azalma saptanmış, fakat viral enfeksiyonlara ya da aşılamalara karşı azalmış bir antikor yapımı gözlenmemiştir. B hücrelerindeki bu değişikliğin KGH hastalarındaki otoimmün özelliklerle alakalı olup olmadığı ise henüz netlik kazanmamıştır (53).

2.1.4. KGH'ye yol açan moleküler patoloji ve gen mutasyonları

KGH'ye yol açan NADPH oksidaz enziminin eksikliği birkaç yolla olabilir: birincisi ve en sık gözlenen NADPH oksidaz enziminin alt ünitelerini (gp91^{phox}, p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} ve p67^{phox}) kodlayan genlerdeki mutasyonlar, ikincisi ve daha nadir olan şekli ise NADPH oksidazın aktivasyon sürecini etkileyen genetik defektler (Rac2), son olarak ise NADPH oksidazın substratı olan NADPH'in üretim yolağında bozukluk sonucu KGH gözlenebilir (Şekil 5).



Şekil 13. KGH'ye yol açan moleküler patoloji ve mutasyonlar (O'Neill S. et al. Redox Biol 2015;6:135-156)

gp91^{phox}'i kodlayan *CYBB* geni 30 kb büyüklüğünde olup 13 ekzon içerir. X kromozomu üzerinde XP21.1'de bulunur. Promoter bölgesi detaylı olarak tanımlanmıştır. Promoter bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyen mutasyonlar sonucu KGH'nin görüldüğü aileler de tanımlanmıştır (53-57). *CYBB* ve p47'yi kodlayan

gen olan *NCF1*'in transkripsiyonu interferon- γ (IFN- γ) tarafından kolaylaştırılmaktadır(58-59).

16. kromozom üzerinde 16q24 te yer alan, 8.5 kb büyüklüğünde ve altı ekzondan oluşan *CYBA* geni gp22^{phox}'yi kodlar. *NCF1* geni 7. kromozomda 7q11.23'te bulunup gp47^{phox}'yi kodlar. 15 kb büyüklüğünde ve 11 ekzondan oluşur. 1. Kromozom üzerinde 1q25'te bulunan *NCF2*, gp67^{phox}'yi kodlar ve 40kb büyüklüğünde olup 16 ekzon içerir. Son olarak ise gp40^{phox}'ı kodlayan *NCF4* geni 22. kromozom üzerinde 22q13.1'de bulunur ve 18kb olup 10 tane ekzonu vardır.

22. kromozom üzerinde bulunan *RAC2*, NADPH oksidaz tarafından superoksit üretiminin aktivasyonunda rolü olan Rac2 proteinini kodlar. Rac2 mutasyonlarında KGH benzeri semptomların yanı sıra nötrofil kemotaksisi ve degranülasyonunda da bozukluklar gözlenmektedir (60-62).

X kromozomunda yer alan *G6PD* geni ise NADPH üretiminden sorumlu heksoz monofosfat yolağının enzimi olan G6PD'yi kodlar. Nadir olarak G6PD eksikliğinde sadece eritrositlerde değil lökositlerde de G6PD eksikliği gözlenir. Bu hastalarda NADPH oksidazın substratı olan NADPH eksikliği nedeniyle hafif formda KGH gözlenir (63).

2.1.5. KGH hastalarında klinik özellikler

KGH hastalarında tekrarlayan bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara yatkınlık gözlenir. Bunun yanında hastaların bir kısmında artmış inflamasyona bağlı olarak granülom gibi bulgular da saptanmıştır.

2.1.5.1. Enfeksiyonlar

Hastalığın en belirgin özelliği tekrarlayan bakteriyel ve fungal enfeksiyonlardır. Özellikle dış dünyayla temas halindeki organlar olan akciğerler, gastrointestinal sistem ve ciltte enfeksiyonlar gözlenmekle birlikte direkt ya da hematogen yayılım yoluyla sıklıkla beyin ve karaciğer başta olmak üzere tüm organlar enfekte olabilir. Hastaların yaklaşık üçte ikisinde yaşamın ilk yılı içinde enfeksiyonlar dermatit, kolit ve büyüme gelişme geriliği ile hastalık bulgu verir. Bununla birlikte hastalık spektrumu oldukça geniş olup bazı hastalar yenidoğan döneminde ağır enfeksiyonlarla bulgu verirken, bazı hastalarda eken çocukluk çağına kadar hiç bulgu olmayabilir (2). Genel olarak X'e bağlı KGH, otozomal resesif KGH'ye göre daha erken başlangıçlı olup daha ciddi enfeksiyonlarla seyreder (11,12).

Hastalarda en sık gözlenen enfeksiyon pnömonidir ve sıklıkla *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus* türleri, *Burkholderia cepacia* ve enterik gram negatif bakteriler etkindir. (11,12,17,64,65). Her türlü abse, pnömoniden sonra KGH hastalarında en sık gözlenen enfeksiyondur. En sık görülen abse cilt abseleridir. Etken olarak en sık olarak *S.aureus* tanımlanmıştır. Bunun yanında *Serratia marcescens*, *B.cepacia* gibi çeşitli gram negatif bakteriler de etken olarak gösterilmiştir. Özellikle burun bölgesinde gözlenen ve *S.aureus*'un yol açtığı tekrarlayan impetigo uzun süreli tedavi gerektirir. Hepatik ve perihepatik abseler de KGH hastalarında oldukça yaygın olarak izlenir. Genellikle *S.aureus* yol açar. Hastalarda osteomyelit de sık görülen enfeksiyonlar arasındadır. Mikroorganizmalar hematogen yayılım gösterebileceği gibi (*S.aureus*, *Salmonella* türleri, *S.marcescens* gibi), non-*fumigatus Aspergillus* pnömonilerinde vertebraların komşuluk yoluyla infekte olmasında görüldüğü gibi komşuluk yoluyla da yayılım gösterebilir.

Sayılan mikroorganizmalar dışında hastalarda sıklıkla rastlanan enfeksiyöz etkenler; *Escherichia coli* türleri, *Listeria* türleri, *Klebsiella* türleri, *Nocardia* ve *Candida* türleridir (64). Gelişmekte olan ve Bacille Calmette Guerin (BCG) aşılmasının olduğu ülkelerde ise BCG enfeksiyonları ile *Mycobacterium tuberculosis* gözlenebilir (66-69).

Bu ajanlar dışında son yıllarda daha nadir olarak gözlenen ama KGH için neredeyse patognomonik sayılabilecek bazı mikroorganizmalar tanımlanmıştır. *Chromcobacterium violaceum* ve *Francisella philomiragia* tuzlu sularda gözlenir ve KGH hastalarında cilt ve derin doku abseleriyle sepsis yol açtığı bildirilmiştir (70-71). *Granulibacter bethesdensis* gram negative bir çomak olup kronik nekrotizan lenfadenit ve sepsis yol açar (72). *Burkholderia gladioli*, KGH hastalarında osteomyelit ve sepsis etkeni olarak gösterilmiştir (73). Bu tip mikroorganizmalarla karşılaşıldığında KGH şüphesi uyanmalıdır.

İnvaziv fungal enfeksiyonlar da hastaların yaklaşık %20-40'ında gözlenir (2,74,75). Primer immün yetmezlikler arasında KGH invaziv fungal enfeksiyonların en sık görüldüğü immün yetmezlik olup, mortalite ve morbiditenin en önemli belirleyicilerindendir. En sık görülenler *Aspergillus fumigatus* ve *A. nidulans* olup akciğerler ve göğüs duvarının enfeksiyonuna yol açarlar. Bazı fungal enfeksiyonlar ise hemen hemen başka hiçbir hastalıkta görülmeyip sadece KGH'de gözlenir: *Paecilomyces variotti*, *Paecilomyces lilacinus* ve *Neosartorya udagawae* bunlardan bazılarıdır (74). Buna karşılık histoplazmozis ve blastomikozis gibi dimorfik küf ve kriptokokkoz gibi maya enfeksiyonları KGH'de gözlenmez. Mukormikoz ise sadece ciddi iatrojenik immünsüpresyon durumunda gözlenir (76).

Çürümekte olan saman ve yapraklarda bulunan fungal spor ve hiflerin inhalasyonu sonrası gözlenen hipersensitivite pnömonisi (mulch pneumonitis) de KGH hastalarında dramatik bir seyre sahiptir. Hastalarda ani olarak ateş, nefes darlığı ve yaygın akciğer infiltrasyonu gözlenir. Mikrobiyolojik etken saptanamayabilir ancak fungal antijenlere karşı artmış bir inflamatuvar yanıt söz konusudur. Bunun sonucunda akciğer biyopsilerinde artmış inflamasyon ve nekrotizan granülomlar saptanır. Bu sendromun tanınması tedavide antifungallerin yanında antiinflamatuvar olarak kortikosteroidlerin de kullanılması gerektiğinden çok önemlidir (77).

2.1.5.2. İnflamatuar bozukluklar

KGH hastalarında klinikte enfeksiyonlara yatkınlığın yanında inflamasyona bağlı bulgular da izlenir. Bazı hastalarda inflamatuvar bulgular ön planda olabilir hatta ilk bulgu olabilir (78).

KGH'nin tipik inflamatuvar özelliği granülomlardır. Granülomlar lenfosit ve histiositler başta olmak üzere kronik inflamatuvar hücrelerden oluşur. Tüberküloz ya da Crohn hastalığı gibi granülomların izlendiği diğer hastalıklardan farklı olarak KGH granülomlarında nötrofiller relatif olarak az gözlenir ancak plazma hücreleri eosinofillerin sayısı artmıştır ve pigmente lipid yüklü histiositler izlenir (79).

Granülomlar buldukları organa göre farklı bulgu verirler. Örneğin midede olduğunda gastrik boşalma zamanı uzar, kusma, kilo kaybı ve disfaji gözlenir. Ureteropelvik bileşkede olduğunda hidronefroz izlenebilir.

İnflamasyonun en yoğun görüldüğü sistem gastrointestinal sistemdir. Bazı serilerde neredeyse %30-60 oranında gastrointestinal sistem tutulumu görülmektedir (11,80). X'e bağlı geçişli KGH hastalarında gastrointestinal sistemin inflamasyonu otozomal resesif forma göre daha sık gözlenir ve ciddi seyirlidir. En sık görülen semptomlar sırasıyla; karın ağrısı, ishal, bulantı-kusma ve gastrointestinal sistem obstrüksiyonuna bağlı bulgulardır. Gastrointestinal sistemin her yerinde granülom gözlenebilir ve obstrüksiyona yol açıp cerrahi tedavi gerektirebilir. En sık distal ince bağırsaklar ve kolonda olmak üzere, her yerde inflamasyon ve inflamatuvar barsak hastalığı benzeri bulgular izlenebilir (81). Bu hastalarda endoskopik olarak mukozal hassasiyet, psödopolipler, peteşiyal kanamalar, striktürler, fissür ve ülserlere rastlanabilir. Histolojik olarak bu lezyonlarda eosinofil ve makrofajlardan zengin kript ve kript abseleri saptanır. Karaciğerde nodüler rejeneratif hiperplazi, non-sirotik portal hipertansiyon ve hepatosplenomegali, KGH hastalarında karaciğer tutulumunda izlenen bulgulardır. Karaciğer tutulumuna sekonder olarak portal hipertansiyon ve splenomegali gelişebilir. Karaciğer tutulumu ilerleyici olup mortalitenin güçlü bir belirleyicisidir (82,83).

Ürogenital sistemde tutulum yaklaşık hastaların %40'ında bildirilmiştir (84). Hastalarda mesane duvar kalınlığının artmasına bağlı obstruktif üropati, granülom ilişkili

üropati, mesane ülserleri, eozinofilik sistit, granümatöz orşit ve periskrotal granülolara gözlenir. Genitoüriner komplikasyonlar böbrek fonksiyonlarını etkileyebilir (84,85).

Daha nadir olarak gözlenen inflamatuvar ve otoimmün bulgular ise; granümatöz akciğer hastalığı, pulmoner interstisyel fibrozis, makrofaj aktivasyon sendromu, artrit, gingivitis, koryoretinit, üveit, glomerülonefrit, beyinde beyaz madde lezyonları, diskoid lupus ve sistemik lupus eritematozistir (86-89).

2.1.6. KGH taşıyıcılarında klinik özellikler

X'e bağlı KGH hastalarının taşıyıcı kız kardeşleri ve annelerinde iki farklı fagosit popülasyonu gözlenir. Fagositlerin bir kısmı süperoksit üretebilme yeteneğine sahipken bir kısmında süperoksit üretimi gözlenmez. Bu taşıyıcılarda normal nötrofillerin oranı %10'un altına düşmedikçe ciddi enfeksiyon görülme riski çok azdır. Ancak çok nadiren bazı taşıyıcı kadın bireylerde normal hücre neredeyse hiç olmayabilir ve KGH hastalarında görülen türde enfeksiyonlar izlenebilir (90-93). Nötrofillerin normal oksidasyon kapasitesi azaldıkça enfeksiyon riskinin arttığı gösterilmiştir. Oksidasyon fonksiyonu bir taşıyıcıda zaman içerisinde değişkenlik gösterebilir.

X-KGH taşıyıcılarının öne çıkan belirgin özelliği ise artmış otoimmünite bulgularıdır. Bu bireylerde tekrarlayan oral aftlar, fotosensitivite, diskoid lupus, artrit ve artralji, egzema, lupus benzeri malar döküntü, sistemik lupus eritematozis ve koryoretinit gözlenebilir (91-94). İlginç olarak nötrofillerin oksidasyon kapasitesiyle otoimmünite bulgularının görülmesi arasında bir ilişki saptanmamıştır. Buna ilaveten otoimmünite bulguları artmış da olsa antinükleer antikor pozitifliği de sadece taşıyıcıların az bir kısmında saptanmıştır (94).

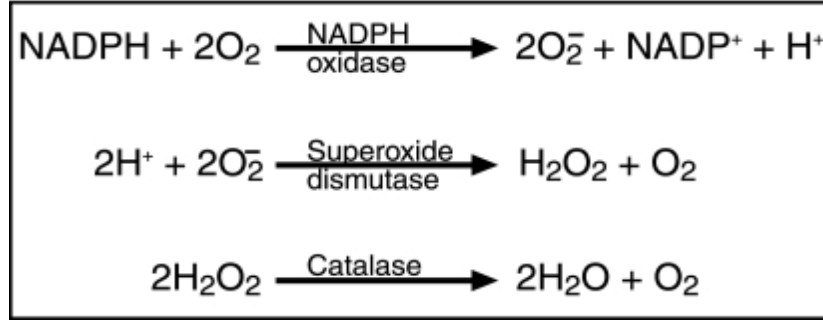
Enfeksiyonlara eğilim ve artmış otoimmünite yalnızca X'e bağlı KGH taşıyıcılarında saptanmış olup, otozomal resesif geçişli KGH taşıyıcı bireylerinde böyle bir ilişki görülmemektedir (11).

2.1.7. Tanı yöntemleri

KGH tanısı temelde üç şekilde konulabilir: 1. Fagositlerde NADPH oksidaz enziminin aktivitesi ölçülerek, 2. NADPH oksidaz enziminin alt ünitelerinin protein ekspresyonunun ölçümüyle, 3. NADH oksidaz enziminin alt ünitelerini kodlayan genlerin mutasyon analiziyle.

2.1.7.1. NADPH oksidaz aktivitesi ölçümü

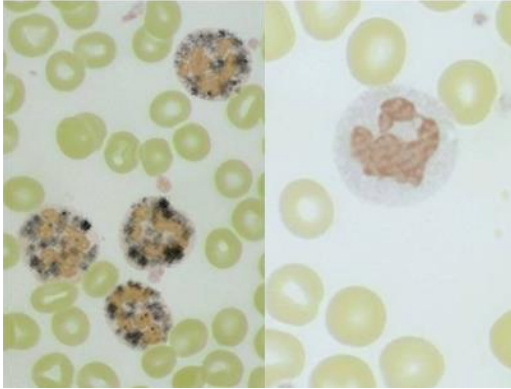
Temel olarak NADPH oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir: Moleküler oksijen (O_2), tek elektron radikali süperoksit anyonuna redükte edilir. Süperoksit ise daha sonra hidrojen peroksit redükte edilir (H_2O_2). Bu arada NADPH'tan $NADP^+$ ve H^+ elde edilir (**Şekil 6**). Fagositlerin oksidasyon kapasitesi, oksijen kullanımının ölçümüyle ya da süperoksit veya hidrojen peroksit üretiminin ölçümüyle belirlenir (95). Bu testler kan nötrofilleri ayrıştırılarak yapılır. Eş zamanlı olarak sağlıklı kontrol kan örneklerinden ayrıştırılan nötrofillerde de testler yapılarak sonuçlar birbiriyle kıyaslanır. Bu deneylerde fagositlerin NADPH oksidazı uyuracak uyarılarla inkübe edilmesi gerekmektedir, çünkü istirahatteki hücrelerde bu enzim inaktiftir. Sıklıkla kullanılan uyarılar; forbol miristat asetat (PMA) ve bakteriyel bir peptid olan formil metionil lösil fenilalanindir (fMLP). PMA intraselüler protein kinaz C'yi aktive eder. Protein kinaz C ise $p47^{phox}$ 'u fosforile eder ve böylece NADPH oksidaz kompleksi bir araya gelerek enzim aktive olur. fMLP, daha önceden trombosit aktive edici faktör (PAF), $TNF-\alpha$ ya da lipopolisakkarit (LPS) ile aktive edilmiş nötrofillerin hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak NADPH oksidazı aktive eder. Bu nedenle fMLP ve PAF enzim aktivitesini başlatmak için bir arada kullanılır.



Şekil 14. Reaktif oksijen radikallerinin üretildiği reaksiyonlar ve kataliz eden enzimler.

Oksijen kullanımının ölçümü bir oksijen elektrodu ile mümkün olur, fakat bu yöntem uzun sürer ve artık KGH için kullanılmamaktadır. Bunun yerine süperoksit ve hidrojen peroksit üretimi KGH tanısı için ölçülmektedir.

Süperoksit üretimi; süperoksitin ferrisitokrom c ve nitroblue tetrazoliumu (NBT) redükte edebilme özelliği sayesinde ölçülebilmektedir. Ferrisitokrom c, süperoksit varlığında redükte edilir ve redükte ferrisitokrom c spektrofotometrik olarak ölçülebilir. NBT ise normalde sarı bir boya olup süperoksit varlığında redükte olarak koyu mavi formazana dönüşür. Formazan hücrelerde intraselüler olarak presipite olur ve bu hücreler mikroskop altında incelenir. KGH nötrofillerinde farmazan birikimi gözlenmez. NBT testi ile X'e bağlı KGH taşıyıcıları da tanınabilir. Taşıyıcı anne ya da kız kardeşlerde normal nötrofillerde farmazan birikimi gözlenirken NADPH oksidazın eksik olduğu bazı nötrofillerde ise farmazan birikimi izlenmez (96).



Şekil 15. Nitroblue tetrazolium testi. Soldaki resimde sağlıklı nötrofillerde NBT testi pozitif olup nötrofiller koyu mavi boyanmış, sağdaki resimde ise KGH nötrofilinde NBT ile boyanma gözlenmemektedir.

Hidrojen peroksiti ölçen en yaygın kullanılan test dihidrorodamin-1,2,3 testidir (DHR). DHR, peroksidaz enzimi varlığında nötrofillerde H₂O₂ tarafından okside edilir ve rodamin-1,2,3'e dönüştürülür. Rodamin-1,2,3'ün yaydığı floresan sinyal akan hücre ölçer ile ölçülebilir (95, 96). Her bir hücrenin ayrı ayrı yaydığı sinyal akan hücre ölçerde ölçülebildiğinden DHR testi ile de X'e bağlı KGH taşıyıcıları ayırt edilebilir. Bu reaksiyon peroksidaz bağımlı olup nötrofillerdeki miyeloperoksidaz tarafından katalizlenir. Bu nedenle miyeloperoksidaz eksikliğinde de DHR testi negatif olup yanlışlıkla KGH tanısı konulabilir.

KGH'den şüphelenildiğinde NBT ya da artık günümüzde daha sık kullanılmaya başlanmış olan DHR testi ile tanı konulabilir. Bununla birlikte moleküler defektin belirlenmesi genetik danışmanlık, prenatal tanı ve hastaların prognozunu ön görme ve tedavi yönelimi açısından öneme sahiptir.

2.1.7.2. NADPH oksidaz alt ünitelerinin belirlenmesi

KGH alt ünitelerinin belirlenmesinde akan hücre ölçerden faydalanılabilir. Alt grup analizi yapılırken beş alt üniteye karşı geliştirilmiş monoklonal antikordardan faydalanılarak hücre içi boyama yapılır (3,95). Eğer sitozolik bileşenlerden biri eksikse (p40^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox}), mutasyonu taşıyan genin belirlendiğinden emin olunur. Ancak membrana bağlı bileşenlerden biri (gp91^{phox}, p22^{phox}) eksik ise diğeri de akan hücre ölçerde tespit edilemez çünkü bu iki bileşen birbirlerini stabilize etmektedir. Böyle bir durumda hastanın kadın akrabalarında NBT ya da DHR ile taşıyıcılık aranarak ayırım yapılabilir, çünkü gp91^{phox} eksikliği X geçişlidir. Ancak X-KGH hastalarının yaklaşık üçte biri, germ hücrelerindeki yeni mutasyonlara bağlı olduğundan annelerin somatik hücrelerinde mutasyon saptanmaz. Bu nedenle annenin X-KGH taşıyıcılığı saptanmaması her zaman gp91^{phox} eksikliğini dışlatmaz.

Eğer NADPH oksidaz aktivitesi yok veya azalmış olmasına rağmen, tüm alt üniteleri akan hücre ölçerde belirlenebiliyorsa buna KGH (+) varyantı adı verilmektedir. Bu durum protein ekspresyonu olmasına rağmen oksidaz kompleksi fonksiyonunu bozan mutasyonlarda görülmektedir. Böyle bir durumda etkilenmiş alt ünite genetik analiz ile

saptanabilir. Bir diğere seçenek ise hücreden yoksun oksidaz testidir. Bu testte etkilenen enzim bileşenin hücre içi ya da dışı olup olmadığı ayrımı yapılır. Hastaların nötrofil membranları sağlıklı nötrofil sitozollerile karıştırılır ya da tam tersi yapılır. Bu karışım NADPH ile inkübe edilip aktive edildikten sonra ortaya çıkan süperoksit ya da hidrojen peroksit üretimi ölçülerek defektin hücre içi mi yoksa hücre dışı bileşenlerden mi kaynaklandığı anlaşılabilir.

2.1.7.3. Mutasyon analizi

Tüm KGH hastalarında sorumlu mutasyon mutlaka belirlenmelidir. Bu sayede etkili bir genetik danışmanlık sağlanabilir. Sorumlu mutasyon saptandığında prenatal tanı yapılabilir. Bunun yanında klinik bulgusu olmayan taşıyıcılar sadece mutasyon analiziyle kesin olarak saptanabilir. Hastalara akrabadan kök hücre nakli planlandığında, donörün mutasyonu taşımadığından emin olunmalıdır.

CYBB, *CYBA*, *NCF2* ve *NCF4* genleri genomik DNA'dan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu ile sekanslanarak analiz edilebilir.

2.1.7.3.1. X'e bağlı KGH'de mutasyon analizi

X'e bağlı KGH'de 1200'den fazla ailede mutasyonlar tanımlanmıştır. *CYBB* geninde gen inversiyonu dışında her türlü mutasyon çeşidi saptanmıştır (56).

Delesyon ve/veya insersiyon mutasyonları X-KGH hastalarının %35'inde görülmektedir. Geri kalan %65'inde ise tek nukteotid substitusyonu gözlenmektedir. Delesyonlar çok büyük veya sadece tek nukteotid delesyonu olacak şekilde olabilir. Eğer delesyon çok büyükse sadece *CYBB* geni değil komşu genler de etkilenebilir. Böyle hastalarda KGH'ye ilaveten Duchenne müsküler distrofi, retinitis pigmentosa ve McLeod (K^+ proteini eksikliğine bağlı eritrositlerde Kell antijenlerinin azalması sonucu gözlenen hemolitik anemi) sendromu tanımlanmıştır. Delesyonlar eğer sentromerik ise ornitin transkarbamilaz eksikliği KGH'ye eşlik edebilir.

2.1.8. Tedavi

KGH keşfedildiğinden beri prognozu gittikçe daha iyiye gitmiştir. Antibiyotik profilaksisi ve enfeksiyonların erken tanınip agresif olarak tedavi edilmesi prognozun eskiye göre daha iyi olmasında etkili olmuştur. KGH'de enfeksiyonlardan sakınmak, yaşam boyu antibiyotik ve antifungal profilaksisi ve enfeksiyonların hızlı ve etkin tedavisi, tedavinin temellerini oluşturur (97).

Enfeksiyonlardan sakınmak amacıyla KGH hastalarında BCG dışında canlı virüs aşılıları dahil tüm rutin aşılamlar yapılmalıdır. Enfeksiyonlardan kaçınmak için hijyen önlemleri alınmalı, kesi ya da abrazyonlar mutlaka sabunlu su ile yıkanıp betadine solüsyonu gibi bir antiseptik ajanla temizlenmelidir. Perirektal abselerden kaçınmak için kabızlık önlenmelidir. Pulmoner enfeksiyon riski sigara maruziyetinin azaltılmasıyla azalmaktadır. *Aspergillus* enfeksiyonlarından korunmak için saman, çürümüş bitkiler ya da ahşap gibi maddelerden uzak durulması önerilmektedir. Ağız hijyenine de mutlaka dikkat edilmelidir.

Antibiyotik profilaksisinin enfeksiyonları önlemede etkinliği kanıtlanmıştır. Trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX) bakteriyel enfeksiyon insidansını azaltmaktadır (98). 5 mg/kg/gün bir ya da iki doza bölünmüş şekilde TMP-SMX kullanımı önerilmektedir. Sulfa alerjisi olan hastalarda dikloksasilin kullanılabilir.

İtrakonazol (5 mg/kg/gün) ise fungal enfeksiyonlara karşı profilaktik olarak kullanılmaktadır. İtrakonazol alan hastalarda da fungal enfeksiyonlar gözlenmekle birlikte almayan hastalara göre daha az oranda fungal enfeksiyon bildirilmiştir (99). İtrakonazolu tolere edemeyen bireylerde posakonazol tercih edilebilir (100).

Profilaktik rekombinan interferon- γ (rIFN- γ) kullanımının faydaları tartışmalıdır ve tedaviye eklenmesi hasta bazında karar verilmelidir. rIFN- γ tedavisinin hastalarda enfeksiyon sıklığını ve ciddiyetini kalıtım şeklinden bağımsız olarak azalttığı gösterilmiştir (101-102). Ancak rIFN- γ süperoksit üretimini arttırmamıştır. Hastalardaki klinik düzelmenin oksijen radikalleri üretimini tetiklemekten ziyade konak savunmasını arttırarak sağlandığı düşünülmektedir. Bunun yanında prospektif bir çalışmada rIFN- γ kullanımı enfeksiyon oranı üzerine anlamlı bir etki yaratmamıştır (14).

KGH hastalarının yönetiminde yapılabilecek en büyük hata enfeksiyonların geç tanınıp tedaviye geç başlanmasıdır. Bu nedenle enfeksiyondan şüphelenildiğinde kültür sonuçları beklenmeden hızlıca *S.aureus* ve gram negatif bakteriler kapsanacak şekilde ampirik antibiyoterapi parenteral yolla başlanmalıdır. Vankomisin/Klindamisin ve seftazidim/karbapenem kombinasyonları başlanabilir. İnvaziv fungal enfeksiyonlar açısından da dikkatli olunmalı, akciğer semptomları veya sebebi bilinmeyen ateş varlığında ajan tanımlanmasa da antifungal tedavi ampirik olarak başlanmalıdır. En sık gözlenen fungal ajan olan *Aspergillus*, KGH hastalarında serolojik testlerde ya da bronkoalveolar lavaj örneklerinde tanımlanamayabilir. Bu testlerin KGH hastalarında sensitivitesi düşük bulunmuştur (75). Fungal enfeksiyonlarda tedaviye uzun süre devam edilmelidir. Vorikonazol, *Aspergillus* türleri için ilk seçenek olarak önerilmektedir. Vorikonazol tedavisine dirençli enfeksiyonlarda lipozomal amfoterisin B, kaspofungin ve posakonazol denenebilir.

Hastalığın tedavisinde zaman zaman cerrahiye başvurulur. Enfekte lenf nodlarının cerrahi olarak çıkarılması ve abselerin drenajı enfeksiyonların kontrol altına alınabilmesi için gereklidir.

Cerrahi ve medikal tedaviye dirençli hastalarda granülosit transfüzyonu denenebilir. Granülosit ve her türlü transfüzyon öncesinde X-KGH hastalarında dikkat edilmesi gereken nokta, bazı hastalarda eşlik eden McLeod sendromu olabileceğinden transfüzyon sonrası hemoliz gözlenebilir. Bu nedenle hastanın genetik mutasyonu bilinmiyorsa ilk transfüzyon öncesi mutlaka eritrosit antijen fenotiplemesi yapılmalıdır.

Granülomlar kortikosteroidler ile tedavi edilebilir. Nispeten düşük doz kortikosteroid kullanımına (0.5-1.0 mg/kg/gün) yanıt alınır ancak uzun süreli kullanım gerekmektedir. Steroidler immünsüpresyon yaratacağından sadece kullanılması kaçınılmaz olduğunda tercih edilmelidir. Antimikrobiyal ajanlarla beraber kullanılmaları gerekebilir. Örneğin hipersensitivite pnömonisinde antifungal ile birlikte kullanılır (77). Geleneksel olarak cerrahi drenaj ve antibiyotikler ile tedavi edilen karaciğer abselerinde ise son zamanlarda gösterilmiştir ki antibiyotiklerle birlikte tedavide steroid kullanıldığında cerrahi drenaj yapılmadan karaciğer absesi tedavi edilebilir (103).

Kemik iliği nakli KGH hastalarında küratiftir (97). Transplant sonrası hem enfeksiyonlar hem de inflamasyon bulguları tedavi edilmiş olur. Ancak KGH hastaları doku reddine yatkındır ve transplant öncesi geirilmif enfeksiyonlarla organ bozuklukları transplantın başarısını etkilemektedir. Transplant  ncesi miyeloablatif tedavi, düşük yoğunluklu tedavilere göre doku reddini önlemede daha etkilidir. Transplant esnasında enfeksiyonu olmayan hastalarda sağ kalım daha iyidir. Son çalışmalarda transplant sonrası sağ kalım %90 oranında bildirilmiştir. Bunun yanında halen %10' luk bir mortalite oranı nedeniyle hangi hastaya kemik iliği nakli önerileceği bir problem teşkil etmektedir. Çünkü antimikrobiyal profilaksi ve enfeksiyonların hızlı ve etkin tedavisiyle KGH hastalarının prognozu da günden güne iyiye gitmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde takip edilmekte olan 25 KGH hastası ve anneleri alındı. Çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 03.03.2017 tarih ve 09.2017.230 protokol kodu ile etik kurul onayı alındı. Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komite'sinden SAG-C-TUP-090517-0249 protokol numarası ile desteklenmiştir. 25 hastanın ve annelerinin klinik, demografik ve laboratuvar özellikleri değerlendirildi. Hastalar daha önceden belirlenmiş DHR değerleri ve genetik mutasyonlarına göre X'e bağlı veya otozomal çekinik kalıtım özelliğine göre sınıflandırıldı.

3.1.NADPH Enzimi Alt Ünitelerinin Hücre İçi Boyanması

Çalışmada her bir KGH hastası, annesi ve sağlıklı gönüllülerden 2 mL kan örnekleri EDTA'lı (etilen daimin tetra asetik asit) tüpler içerisine alındı. NADPH bileşenlerinin her biri için, EDTA'lı tüplere alınan tam kanların 50 µL'si 5 mL'lik akan hücre ölçer tüplerine eklendi. Üzerine Beckman Coulter IntraPrep™ Permeabilization Reagent kiti (A07803) IntraPrep Reaktifi 1'den 100 µL ilave edildi ve karanlıkta oda ısısında 15 dakika fikse edildi. Tüplere 4 mL BD Cell wash (349524) eklenerek oda ısısında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet içerisine Beckman Coulter IntraPrep Permeabilization Reagent kiti (A07803) IntraPrep Reaktifi 2'den 100 µL ilave edildi ve karanlıkta oda ısısında 5 dakika permeabilizasyon sağlandı.

Her bir tüpe spesifik monoklonal antikorlar eklendi; Cytochrome B245 Light Chain antibody/p22 (MCA4686A488)'e fare monoklonal [CS9]'den 5 µL, Cytochrome B245 Heavy Chain antibody/gp91 (MCA4685A488)'e fare monoklonal [NL7]'den 5 µL, NCF1/p47 (ab179457)'e tavşan monoklonal [EPR13134]'den 7,5 µL, NOXA2/p67phox (ab109523)'e tavşan monoklonal [EPR5065]'den 7,5 µL. Karışımlar karanlıkta 4°C'de 1 saat inkübe edildi. Tüplere 4 mL BD Cell wash eklenerek oda ısısında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. p22-phox ve gp91-phox hariç tüm tüplere

ikincil antikor Alexa Fluor®647-conjugated goat anti-tavşan poliklonal antikor (ab150079) 1:200 oranında dilüe edilerek 100 µL eklendi. Karanlıkta oda ısısında 15 dakika bekletildi. Her bir tüpe 400 µL BD cell wash eklendi. Hücreler BD FACSCalibur™ akan hücre ölçer cihazı ile analiz edildi, side scatter özelliklerine dayanarak nötrofillerde oluşturulan kapılama ile ilgili hücre içi protein ekspresyonu değerlendirildi. Değerlendirmeler sırasında her bir protein için ham ortalama floresan yoğunluğu (mean fluorescence intensity - MFI) ve delta MFI (ΔMFI) değerleri dikkate alındı. Daha sonra ΔMFI'lar sağlıklı kontrollere göre normalleştirilerek karşılaştırıldı. Normalleştirme işlemi aşağıda belirtilen formüle göre gerçekleştirildi:

İlgili proteinin ΔMFI değerinin kontrole göre normalleştirilmesi (kuantifiye edilme)=

$$\left(\frac{\text{(Hasta ham MFI - boyanmamış hasta MFI değeri)}}{\text{(Sağlıklı kontrol ham MFI - boyanmamış Sağlıklı kontrol MFI değeri)}} \right) * 100$$

3.2. Dihidrorodamin Testi

Dihidrorodamin testi için hastalardan, annelerden ve sağlıklı kontrollerden 2 mL kan EDTA'lı tüpe alındı. 1 mg DHR (Sigma Aldrich, Poole, UK.) 1 mL dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, Poole, UK.) içerisinde çözülerek, DHR stok solüsyonu hazırlandı ve -80 °C'de saklandı. Çalışma solüsyonu olarak 29 mM DHR kullanıldı. Dihidrorhodamin testi içerisinde nötrofilleri aktive edici uyaran olarak forbol miristat asetat (PMA) (çalışma solüsyonu: 5 ng/mL) (Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Germany) kullanıldı. 10X lizis solüsyonu; 500 mL distile su, 41.5 g amonyum klorid, 4.2 g sodium bikarbonat, 10 mL 0.5 M EDTA karıştırılarak elde edildi. Çalışmada 1000 U/mL konsantrasyonda kullanılan katalaz (Sigma Aldrich, Poole, UK.) solüsyonu, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) tampon kullanılarak seyreltildi.

5 mL'lik akan hücre ölçer tüplerine 200 µL EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden eklendi. Üzerine 1:10 oranında 2 mL lizis çalışma solüsyonu ilave edildi ve oda ısısında beş dakika inkübe edildi. Solüsyon oda ısısında 1200 rpm'de beş dakika

santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler iki kez HBSS çalışma solüsyonu ile yıkandı ve fagositik hücreler teste hazır hale getirildi.

Hücrelere 400 µL HBSS tampon çözeltisi içerisinde DHR ve katalaz çalışma solüsyonları eklendi ve tüpler 37°C'de beş dakika su banyosu içerisinde inkübe edildi. Katalaz, hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürerek etkisizleştirmekte ve bu şekilde reaktif oksijen ara ürünleri miktarını kontrol ederek, konak dokuyu ve hücreleri korumaktadır. Daha sonra hücreler 200'er µL olarak, iki ayrı akan hücre ölçer tüpüne bölündü. Tüplerden bir tanesine uyarıcı olarak PMA, diğerine ise HBSS tampon çözeltisi eklendi ve tüpler 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Analiz için BD FACS Calibur cihazı ve Cellquest yazılım programı kullanıldı (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA). Canlı nötrofiller etrafında oluşturulan kapılama ile hücre dağılımı histogram olarak görüntülendi. Histogram görüntülerinde X eksenini floresan yoğunluğunu, Y eksenini ise hücre sayılarını göstermektedir. Histogramlarda nötrofil gruplarının sınırları belirlenerek analizler yapıldı.

Stimülasyon indeksi, PMA ile uyarılan örneklerde elde edilen floresan yoğunluğu geometrik ortalamasının, uyarılmayan örneklerde elde edilen floresan yoğunluğu geometrik ortalamasına oranlanması ile hesaplandı.

3.3. İstatiksel Analiz

Veriler SPSS 16 (Chicago, SPSS Inc) programı ile değerlendirildi. Niteliksel veriler yüzde ve oranlar ile belirtilirken, niceliksel veriler ortanca ve çeyrekler arası aralık (AA) ile belirtildi. İstatiksel olarak $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Korelasyon analizinde Spearman korelasyonu kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile analiz edildi. Normal dağılmayan devamlı değişkenlerin ortalamalarının kıyaslanmasında, grup sayısına göre Mann-Whitney U testi ya da Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Kategorik veriler Fisher'ın Exact testi'ne göre kıyaslandı.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Özellikler, Klinik Bulgular ve Enfeksiyonlar

Çalışmaya alınan 25 hastanın 6'sı kız (%24) 19'u erkekti (%76). Hastaların güncel ortanca yaşları 10.8 (5.2-18.0) yıldı. Hastalığın başlangıç yaşı ortancası 1.3 (0.3-4.7) tanı yaşı ortancası ise 4 (14-13.5) yıldı. Ortanca izlem süresi 4.4 (1.8-7.2) yıl idi. DHR testi ile 12 (%48) hastanın X'e bağlı, 13 (%52) hastanın ise otozomal resesif geçişli KGH olduğu anlaşıldı. 5 (%20) hastanın genetik tanısı bilinmemekteydi. Genetik tanısı bilinen hastalardan 10 (%40) tanesinde *CYBB* geninde, 8 (%32) hastada *NCF1* geninde, 1 (%4) hastada *CYBA* geninde, 1 (%4) hastada ise *NCF2* geninde mutasyon saptandı. Hastalarda saptanan mutasyonlar **Tablo 1**'de gösterilmektedir. *CYBB* mutasyon çeşitliliği literatürle uyumlu idi ve missense (2 olgu), nonsense (4 olgu), splice (2 olgu) ve insersiyon (1 olgu) şeklindeydi. Ayrıca, *CYBB* geninde iki adet yeni mutasyon bulundu. Bu mutasyonların biri missense iken (c.1094T>G, p.Leu365Arg), diğeri kırılma bölgesinde (c.675-2A>G) idi. A4 ve A7 aileleri arasında akrabalık olmadığı halde iki ailede (A4 ve A7) aynı mutasyon saptandı (c.469C>T, p.Arg157X).

P47 protein defekti olan altı bireyde daha önce literatüde bildirilen ve *NCF1* geninde sıklıkla görülen ekzon 2'deki GT delesyonu saptandı.

Bir olguda (H19) *CYBA* geninde daha önce bildirilen missense mutasyon saptanırken (c.70G>A, p.Gly24Arg), diğeri bir olguda (H21) ise *NCF2* geninde daha önce bildirilen bir missense mutasyon (c.279C>G , p.Asp93Glu) bulundu.

Aile no	Hasta no	DHR sonucuna göre kalıtım	DHR stimülasyon indeksi	Genetik mutasyon	Literatürde mutasyonun yeri
A1a	H1	OR	1.0	<i>NCF1</i> ; c.579G>A, p.Trp193X	Bilinen mutasyon
A1b	H2	OR		<i>NCF1</i> ; c.579G>A, p.Trp193X	Bilinen mutasyon
A2	H3	X-KGH	0.98	<i>CYBB</i> ; c.897G>T, p.Lys299Asn	Bilinen mutasyon
A3	H4	OR	2.23	<i>NCF1</i> ; c.75_76delGT, p.Tyr26Hisfs*26	Bilinen mutasyon
A4	H5	X-KGH	0.60	<i>CYBB</i> ; c.469C>T, p.Arg157X	Bilinen mutasyon
A5a	H6	OR	1.63	Mutasyon analizi devam ediyor	
A5b	H7	OR	2.61	Mutasyon analizi devam ediyor	
A6a	H8	OR	2.60	<i>NCF1</i> ; c.73_74delGT, p.Tyr26Hisfs*26	Bilinen mutasyon
A6b	H9	OR	1.00	<i>NCF1</i> ; c.73_74delGT, p.Tyr26Hisfs*26	Bilinen mutasyon
A7	H10	X-KGH	0.39	<i>CYBB</i> ; c.469C>T, p.Arg157X	Bilinen mutasyon
A8	H11	X-KGH	1.26	<i>CYBB</i> ; c.674+2 T>G, p?	Bilinen mutasyon
A9a	H12	OR	0.88	<i>NCF1</i> ; c.73_74delGT, p.Tyr26Hisfs*26	Bilinen mutasyon
A9b	H13	OR	1.92	<i>NCF1</i> ; c.73_74delGT, p.Tyr26Hisfs*26	Bilinen mutasyon
A9c	H14	OR	1.10	<i>NCF1</i> ; c.73_74delGT, p.Tyr26Hisfs*26	Bilinen mutasyon
A10	H15	X-KGH	1.90	Mutasyon analizi devam ediyor	
A11	H16	OR	5.60	Mutasyon analizi devam ediyor	
A12	H17	X-KGH	1.00	<i>CYBB</i> ; c.742dupA, p.Ile248Asnfs*36	Bilinen mutasyon
A13	H18	X-KGH	0.42	Aile takipten çıktı	
A14	H19	OR	6.00	<i>CYBA</i> ; c.70G>A, p.Gly24Arg	Bilinen mutasyon
A15	H20	X-KGH	0.88	<i>CYBB</i> ; c.1094T>G, p.Leu365Arg	Yeni mutasyon
A16	H21	OR	0.93	<i>NCF2</i> ; c.279C>G, p.Asp93Glu	Bilinen mutasyon
A17a	H22	X-KGH	1.00	<i>CYBB</i> ; c.388C>T, p.Arg130X	Bilinen mutasyon
A17b	H23	X-KGH	1.00	<i>CYBB</i> ; c.388C>T, p.Arg130X	Bilinen mutasyon
A18	H24	X-KGH	0.90	<i>CYBB</i> ; c.217C>T, p.Arg73X	Bilinen mutasyon
A19	H25	X-KGH	0.75	<i>CYBB</i> ; c.675-2A>G, p?	Yeni mutasyon

Tablo 5. Hastaların genetik tanıları ve dihidrorodamin testine göre kalıtım şekli.

Hastalık başlangıç yaş ortancası X-KGH hastalarında 0.31 (0.08-0.53) yıl, otozomal resesif KGH hastalarında ise 4.5 (2.2-7.5) yıl olup, X-KGH hastalarında hastalık anlamlı olarak daha erken başlamaktaydı ($p<0.001$). 11 hastada (%45.8) semptomlar 1 yaş altında başladı. 1 yaş altında semptomları başlayan hastaların %90.9'u (n:10) X-KGH hastası idi ($p:0.001$). Hastalık başlangıcıyla paralel şekilde X-KGH hastaları, otozomal resesif KGH hastalarına göre daha erken yaşta tanı almaktaydı (1.45 yıl, 0.66-2.75 vs 11.5, 6.7-15.6, $p:0.001$). 1 yaş altında 5 hasta (%20) tanı alabilmişti. Tanıda gecikme 1.2 (0.2-4.5) yıl idi. X-KGH hastalarında tanıda gecikme 0.8 (0.2-2.5) yıl, otozomal resesif KGH hastalarında ise 3.2 (0.35-10.4) yıl olup arada anlamlı fark bulunmamıştır.

Hastalarda en sık gözlenen başlangıç şikayeti abse idi (15 hasta, %60). Bunu pnömoni (n: 8, %32), ateş (n:3, %12), lenfadenit (n:2, %8), bakteriyemi (n:1, %4), ishal (n:1,%4), tekrarlayan otit (n:1, %4) takip etti. Otozomal resesif geçişli bir kız hastada başlangıçta hiçbir şikayet olmayıp abisine tanı konulunca yapılan aile taraması sonrası tanı aldı. Abseler en sık ciltte gözlendi (n:12, %48). 4 (%16) hastada perianal abse, 2 hastada diş absesi (%8), 1 hastada karaciğer absesi (%4), 1 hastada kemik absesi (%4), 1 hastada beyin absesi (%4) saptandı Hastaların diğer klinik özellikleri **Tablo 2**'de gösterilmektedir.

Tablo 6. Hastaların klinik özellikleri.

Klinik özellikler	Hasta sayısı (yüzde)
Tekrarlayan otit	5 (%20)
Tekrarlayan sinüzit	3 (%20)
İki aydan uzun antibiyotik kullanımı	18 (%72)
Pnömoni	17 (%68)
Büyüme gelişme geriliği	5 (%20)
Tekrarlayan derin doku ve organ abseleri	4 (%16)
Tekrarlayan pamukçuk veya ciltte mantar	6 (%24)
İntravenöz antibiyotik gereksinimi	24 (%96)
Derin yerleşimli enfeksiyon ya da sepsis	9 (%36)
Ailede primer immün yetmezlik	15 (%60)
Akraba evliliği	14 (%56)
Tekrarlayan ishal	5 (%20)
Osteomyelit	2 (%8)

4.2 Enfeksiyon Etmenleri

15 (%60) hastada enfeksiyonlar esnasında etken tanımlanabildi. 8 (%32) hasta tüberküloz enfeksiyonu nedeniyle tedavi edildi bunlardan sadece birinde tüberküloz basili lenf bezi biyopsisinde etken olarak gösterildi. 2 (%8) hastada BCG aşısı sonrası lenfadenit gelişti. Hastalarda tanımlanan diğer mikroorganizmalar şu şekildedir: Cilt abselerinde Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (n:6, %24), cilt abselerinde *Aspergillus fumigatus* (n:2, %8), cilt absesi ve kemikte *Serratia marcerenses* (n:2, %8), perianal absede *Escherichia coli* (n:1, %4), kemik iliğinde *Citrobacter freundii* (n:1, %4), kemik iliğinde *Klebsiella pneumonia* (n:1, %4), cilt absesinde *Enterococcus faecium* (n:1, %4), cilt absesinde *Pseudomonas putida* (n:1, %4) ve cilt absesinde *Candida albicans* (n:1, %4).

4.3. Enfeksiyonlar Dışında Klinik Özellikler

Hastalardan 7'sinde (%28) granülom gelişti. Granülomlar en sık lenf bezlerinde (n:5, %20) izlendi. Onun dışında akciğer (n:1, %4), karaciğer (n:2, %4), beyin (n:1, %4) ve ciltte (n:1, %4) de granülom oluşumu izlendi (**Şekil 8**). Diğer sistemlerden gastrointestinal sistem bulguları; ishal (n:4, %16), hepatomegali/splenomegali (n:7, %28) ve tekrarlayan karın ağrısı (n:2, %8) şeklinde izlendi. İshali olan hastalardan 2'sine (%8) kolonoskopi yapılarak biyopsi alındı ve mikroskopik olarak kolit bulguları izlendi (lenfoplazmositer hücre artışı, eosinofilik lökosit artışı, eosinofilik kriptit ve perikriptit, lenfoid hiperplazi). Bu hastalardan ikisi de X-KGH olup aynı ailedendi. Ürogenital sistem tutulumu veya diğer sistemlerde otoimmünite bulguları hiçbir hastada saptanmadı.

4.4. Görüntüleme Bulguları

4.4.1. Toraks bilgisayarlı tomografi (BT) bulguları

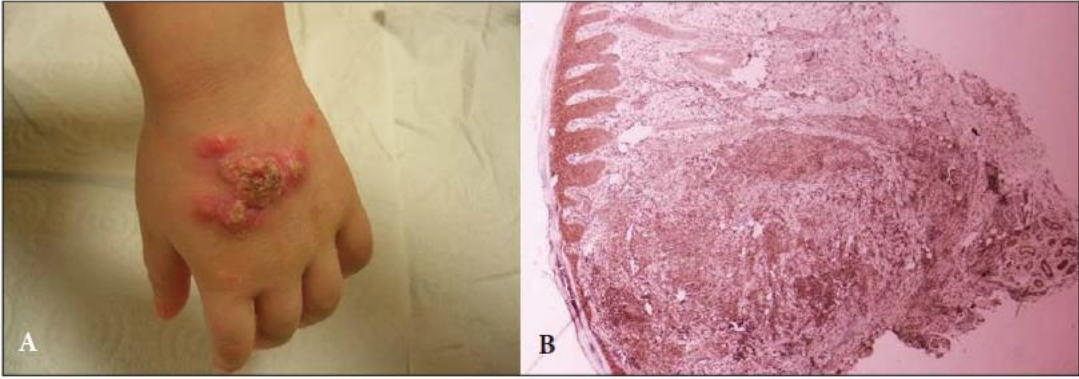
Yirmi bir (%84) hastaya toraks BT çekilmiştir. Hastaların toraks BT'lerinde saptanan anormal bulgular plevral kalınlaşma ve çekinti (n:11, %44), konsolidasyon alanları (n:10, %40), mediastinal lenfadenopati (n:8, %32), bronşiektazi (n:7, %28), buzlu cam görünümü (n:7, %28), nodül (n:6, %32), atelektazi (n:3, %12), ve amfizem idi (n:2, %8) (**Şekil 9**).

4.4.2 Diğer görüntüleme bulguları

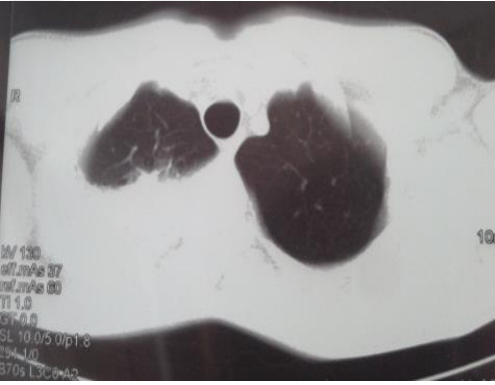
Kraniyal manyetik rezonans (MR) çekilen dört hastadan 1'inde beyin parenkiminde abse, 1'inde leptomeningeal kontrast tutan lezyonlar, 1'inde serebroserebellar atrofi ve 1 hastada beyinde granülom izlendi (**Şekil 10**).

Batın ultrasonografi (USG) çekilen hastalarda saptanan anormal bulgular, karaciğer absesi (n:1, %4), karaciğerde granülom (n:1, %4) ve batın içi multiple lenfadenopatilerdi (n:1, %4).

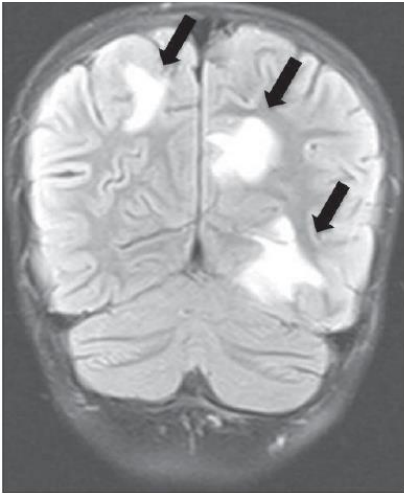
Batın BT bulguları ise hepatomegali ve batın içi multiple lenfadenopati idi (n:2, %8).



Şekil 16. Cilt granülomu ve granülden alınan biyopsi.



Şekil 9. İnvaziv *Aspergillus* enfeksiyonu olan bir olguda akciğer tutulumu.



Şekil 10. Kranial MR'da gözlenen kontrast tutan ve granülom ile uyumlu olduğu düşünülen lezyonlar.

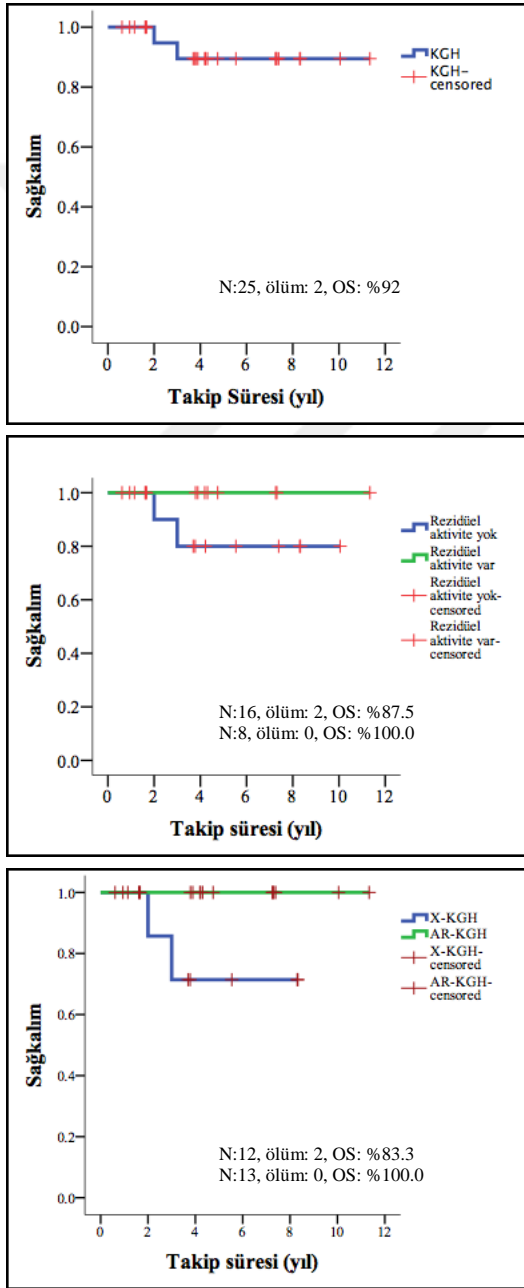
4.5. Tedavi ve Sağkalım

Tüm hastalar antibiyotik (trimethoprim sulfometaksazol) ve antifungal (itakonazol) profilaksisi kullanmaktaydı. 14 (%56) hastaya profilaktik rekombinan interferon- γ başlandı. Granülom geliştiren hastalara kortikosteroid tedavisi başlandı ve yanıt alındı. Mikroskopik kolit saptanan iki hastaya da kortikosteroid tedavisi başlandı. 8 (%32) hasta

akciğer tüberkülozu nedeniyle tedavi gördü.

Dört (%16) hastaya (hepsi X-KGH) kemik iliği transferi uygulandı (KİT) ve 2 (%8) hasta kemik iliği nakli sonrası kaybedildi. KİT uygulananlarda ortanca hastalık başlangıç yaşı 0.2 yıl (0.08-0.53) olup KİT uygulanmayanlarınkinden anlamlı olarak daha erkendir (2.0; 0.35-5.75, $p=0.03$).

Hastaların sağkalım oranları **Şekil 11**'de gösterildi. Otozomal resesif KGH hastalarında, X-KGH hastalarına kıyasla sağkalım anlamlıya yakın derecede yüksek saptandı ($p:0.05$).

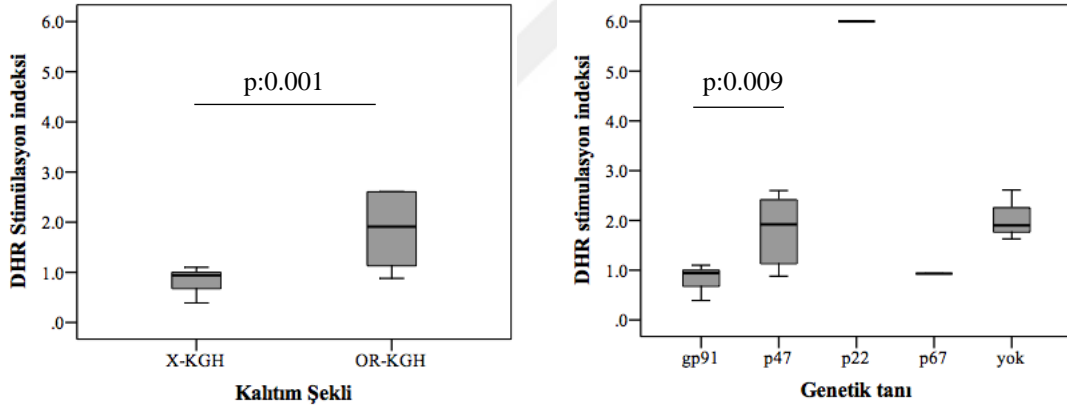


Şekil 17 Sağkalım oranları

4.6. Laboratuvar Bulguları

Hastaların DHR testi SI ortancası 1.00 (0.88-1.91) saptandı. Hastalık başlangıç yaşı ile dihidrorodamin testindeki SI arasında pozitif korelasyon saptandı ($r_s: 0.50, p:0.012$).

X-KGH hastalarının ortanca DHR SI değeri (0.94; 0.63-1.00), otozomal resesif KGH hastalarının ortanca DHR SI değerinden (1.91; 1.13-2.60) anlamlı olarak düşük saptandı ($p:0.001$). Mutasyon tipleri kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise gp91 eksikliği olan hastaların ortanca DHR SI değeri (0.94; 0.63-1.00), p47 eksikliği olan hastaların ortanca DHR SI değerinden (1.92; 1.0-2.6) anlamlı olarak düşük saptandı ($p:0.009$) (Şekil 12). p22 mutasyonu olan hastanın DHR SI değeri 6 iken, p67 olan hastanın değeri 0.93 olarak bulundu. Çalışmamızda, p47 eksikliği olan ve GT delesyonu olan olguların tümünde DHR SI değeri <3 bulunmuştur.



Şekil 18. Kalıtım tipine göre DHR stimülasyon indeksinin gösterimi.

DHR $SI \leq 1.5$ olan hastalar nötrofil rezidüel aktivitesi olmayan hastalar olarak, $SI > 1.5$ olan hastalar ise rezidüel aktivitesi olan hastalar olarak gruplandı. 16 hastada (%66.7) rezidüel aktivite saptanmazken, 8 hastada (%33.3) rezidüel aktivite saptandı. X-KGH hastalarının hiç birinde rezidüel aktivite izlenmezken 8 tane otozomal resesif KGH hastasında rezidüel aktivite izlendi ($p:0.001$). Rezidüel aktivitesi olmayanlarda ortanca hastalık başlangıç yaşı 0.49 yıl (0.09-3.37) olup, rezidüel aktivitesi olanlara kıyasla (4.5; 2.37-15) daha düşük saptandı ($p:0.01$).

Bakılan lenfosit alt grup analizi ve B hücre alt tipleri analizinde yaşa göre normale kıyasla anlamlı farklılık izlenmedi.

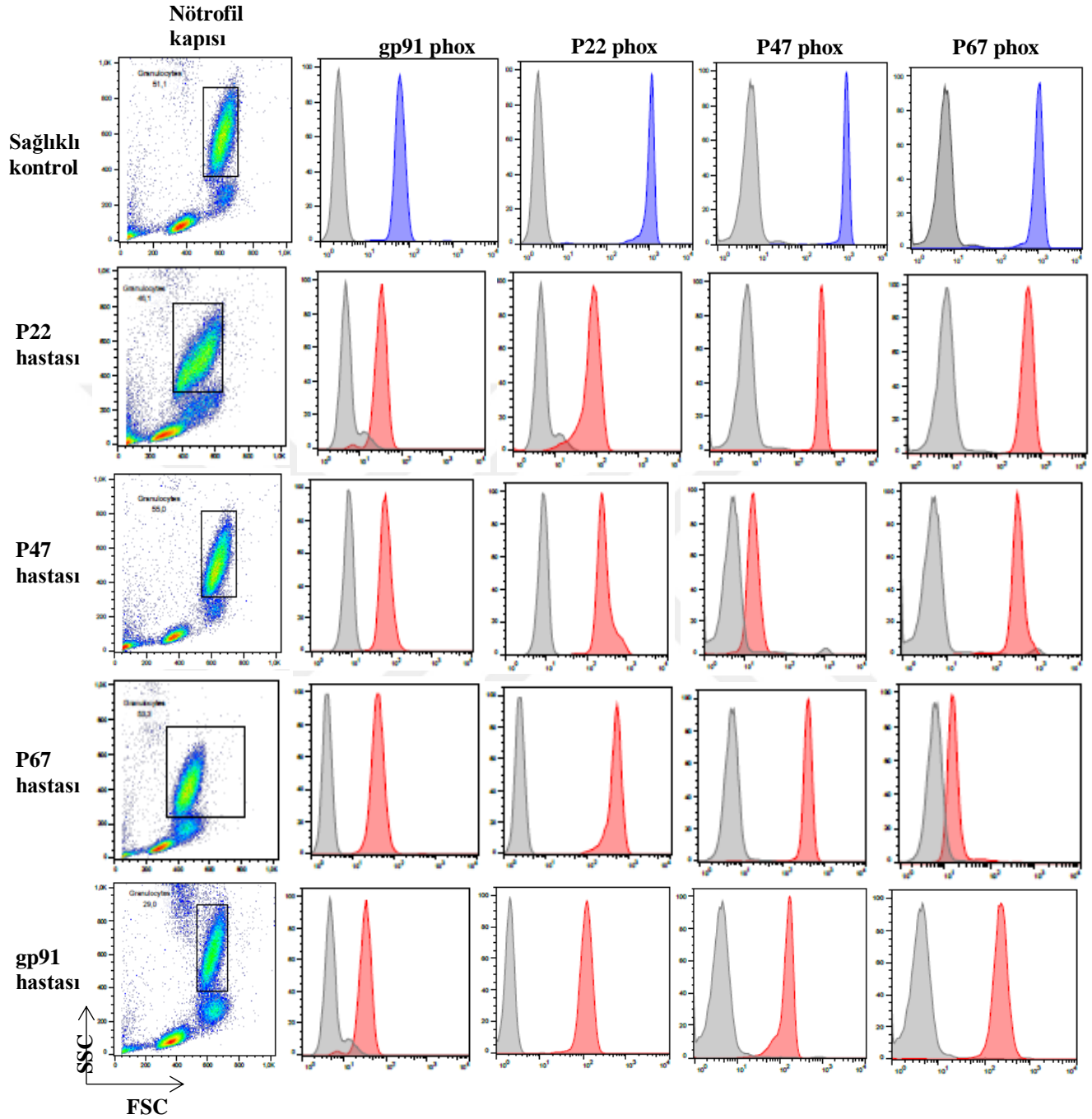
Hastaların ortanca immunglobulin değerleri **Tablo 3**'te gösterildi. 4 (%17.4) hastada hipergammaglobulinemi saptanırken 14 (%58.3) hastanın IgE değerlerinde yükseklik saptandı

Tablo 7. Hastaların immunglobulin değerleri (IgG, IgM, IgA değerleri mg/dL olarak IgE değeri IU/mL cinsinden ifade edilmektedir).

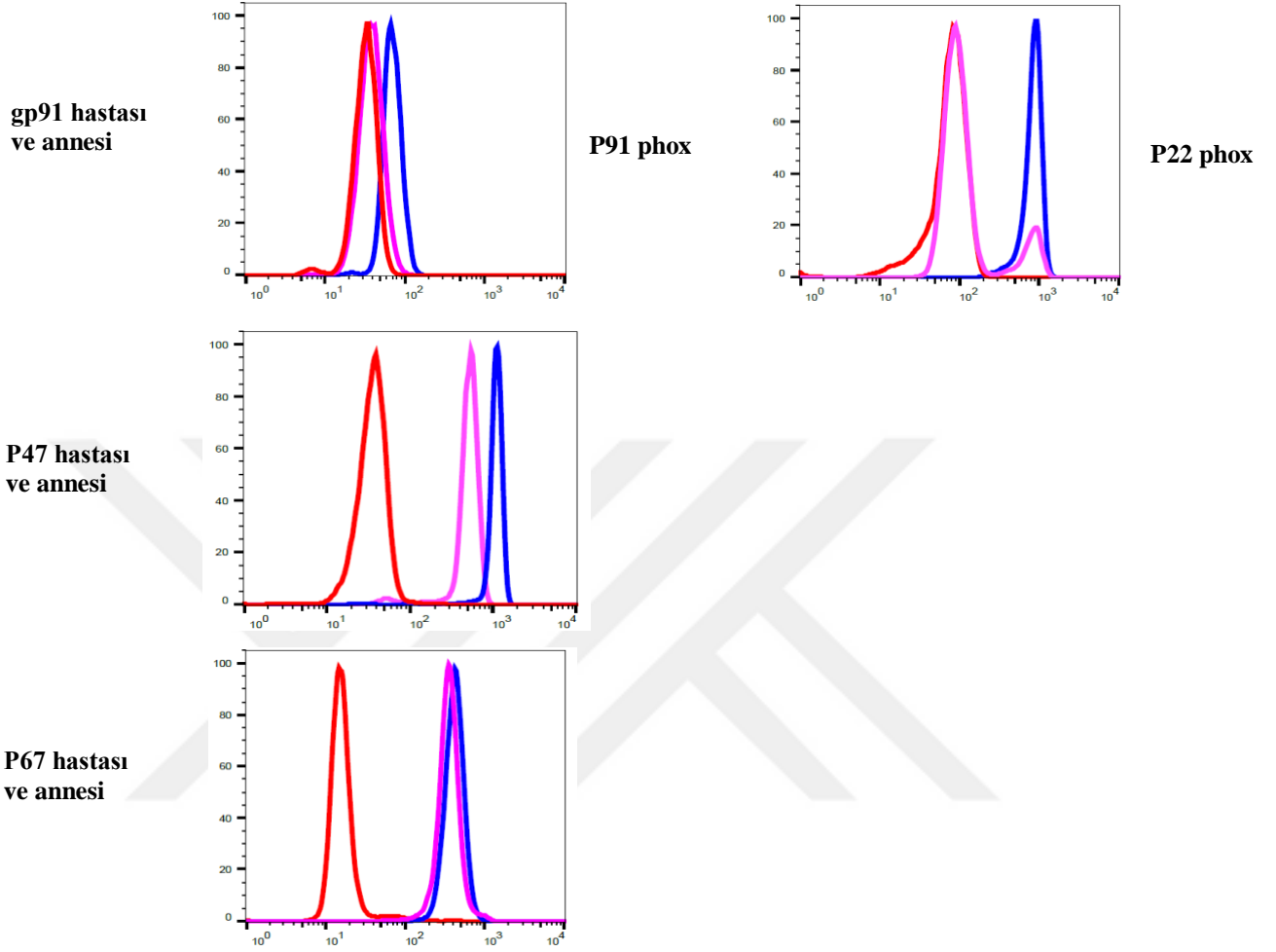
	IgG	IgM	IgA	IgE
Median (ÇAA)	1320 (1010-1700)	126 (109-173)	200 (84-291)	225 (21-1033)
Normal, n (%)	19 (82.6)	21 (91.4)	19 (82.6)	10 (41.7)
Yüksek, n (%)	4 (17.4)	1 (4.3)	3 (13)	14 (58.3)
Düşük, n (%)	0 (0)	1 (4.3)	1 (4.4)	0 (0)

4.7. NADPH Enzimi Alt Ünitelerinin Hücre İçi Boyaması

Akan hücre ölçerde NADPH enziminin alt üniteleri boyandıktan sonra elde edilen her bir protein alt tipinin sağlıklı kontrol ve hastalardaki boyanma paterni **Şekil 13**'te gösterildi. **Şekil 14**'te ise farklı hastalarda, sağlıklı kontrollerde ve taşıyıcılarda her bir NADPH enzimi alt bileşenin histogram üzerindeki durumu gösterildi. X'e bağlı kalıtılan gp91, hastalarda ve taşıyıcılarda sağlıklı kontrollere göre daha düşük oranda boyandı. Hücre membranında gp91 ile etkileşim halinde yer alan p22 de hem hastalarda hem de taşıyıcılarda sağlıklı kontrollere göre daha düşük oranda boyanmış olup taşıyıcılarda X-KGH'de görüldüğü gibi histogram grafiğinde çift tepe saptandı. p47 ve p67 hastalarda sağlıklı kontrollere göre oldukça az boyanırken, taşıyıcılarda orta derecede boyanma gösterdi. P22 ve p67 hastası birer tane olduğundan istatistiksel analiz yapılamadı.



Şekil 19. Akan hücre ölçer ile farklı NADPH enzim bileşenlerinin analizi. Farklı NADPH bileşenlerinin ikinci antikor kullanılarak ölçüm yapılan negatif kontrollere göre (gri histogram görüntüleri) yerleşim durumu. Nötrofil karakterizasyonu, tam kan örneğinde SSC ve FSC saçılım özellikleri kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 20. Farklı hastalarda ve ebeveynlerde, sağlıklı kontrollere göre NADPH enzim bileşenlerinin histogram üzerinde yerleşim durumu (kırmızı: hasta, pembe: anne, mavi: sağlıklı kontrol).

Hastalarda, sağlıklı kontrollerde ve taşıyıcılarda NADPH enzim alt ünitelerinin MFI değerlerinin dağılımı incelendi. P47 ve gp91 alt ünitelerinin MFI dağılımları **tablo 4**'te gösterildi.

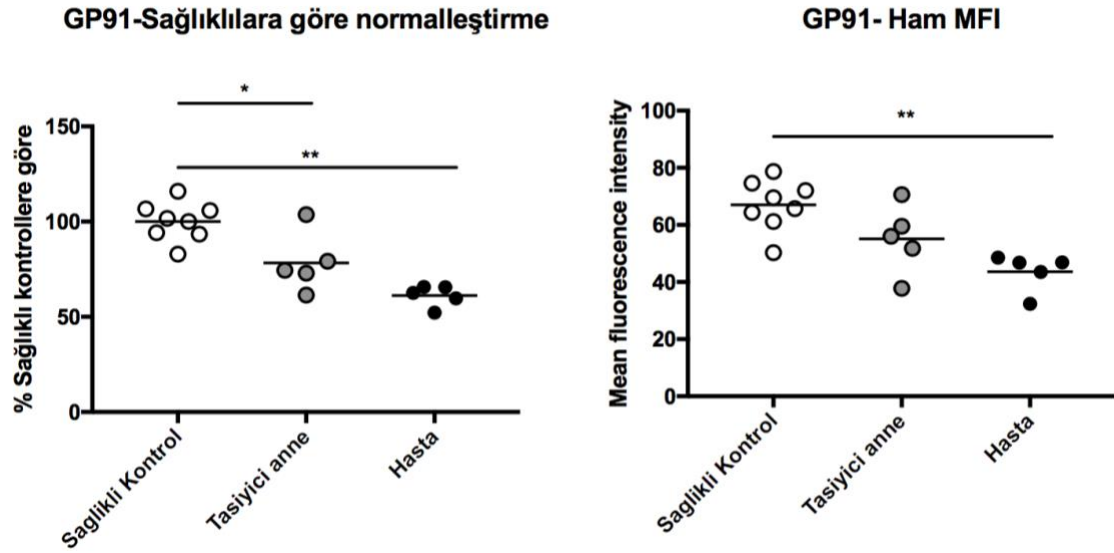
Tablo 8. p47 ve gp91 için MFI değerleri dağılımı (MFI: mean fluorescence intensity, değerler ortanca ve çeyrekler arası aralık olarak ifade edilmiştir).

	Ham MFI		Δ MFI-percentage	
	p47	gp91	p47	gp91
Sağlıklı kontroller	783 (704-917)	61.5 (49.7-68.8)	100 (99.7-100.07)	100 (93.6-106.4)
Taşıyıcılar	483 (463-501)	56.0 (44.8-65.0)	59.3 (49.2-65.6)	74.3 (67.1-91.3)
Hastalar	22.15 (14.4-27.1)	46.8 (37.9-47.7)	1.6 (0.8-2.6)	62.5 (55.9-65.6)

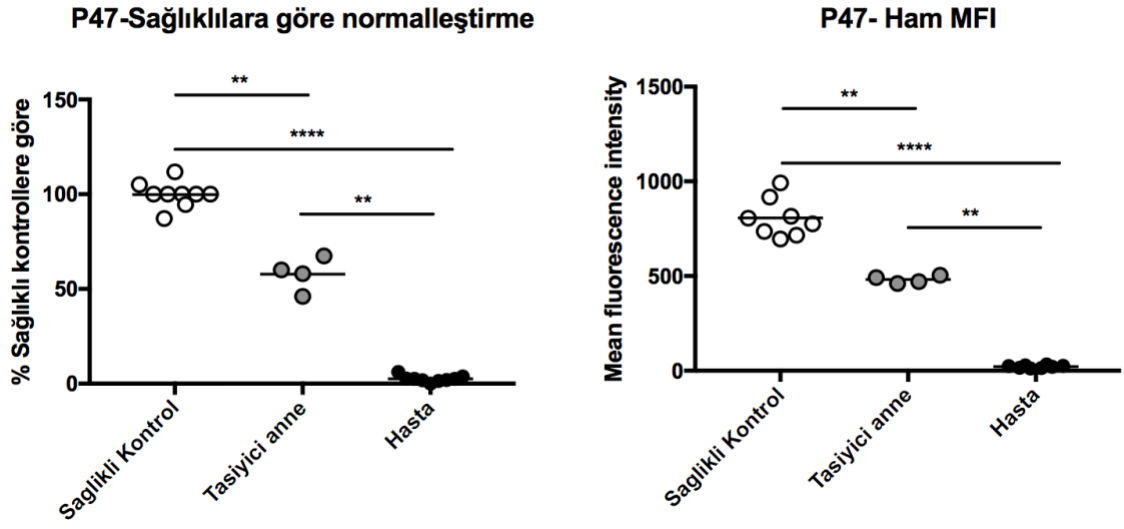
Ham MFI değeri ortancası sağlıklı kontrollerde p22 için 574 (431-803.5), p67 için 742.5 (416.5-912.5) saptandı. Δ MFI-percentage ortancası ise sağlıklı kontrollerde p22 için 100 (94.3-106.7) ve p67 için 100 (100-100.01) olarak bulundu. Kullanılan antikor kombinasyonu ile mutasyonun hangi proteinde olduğu doğru tahmin edildi. Buna göre boyama yapılan gp91(n=5) ve p22 (n=1) hastalarında DHR testi yardımıyla beraber olguların tamamında mutasyonun hangi gende olabileceği tahmin edildi. Diğer taraftan p47 (n=8) ve p67 (n=1) de ise sadece hücre içi boyama ile mutasyonun hangi gende olabileceği %100 doğrulukta bulundu.

Elde edilen MFI değerlerinin p47 ve gp91 için sağlıklı kontroller hastalar ve taşıyıcılar arasında karşılaştırılması **Şekil 15** ve **Şekil 16**'te gösterildi. gp91 için MFI değerleri sağlıklı kontrollerde taşıyıcılara ve hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p:0.02$ ve $p:0.0016$). gp91 eksikliği olan olgularımızda, gp91 ekspresyonu sağlıklı kontrole göre ortanca değeri %62.5 olarak saptanırken, bu olgulardaki p22 ekspresyonu median değeri kontrole göre %14.1 idi. P22 mutasyonu olan olgumuzda hem p22 hem de

gp91 kontrole göre düşük saptanmış olup, sırasıyla %21.6 ve %70.5 olarak ölçülmüştür. p67 olgusunun hücre içi protein ekspresyonu kontrole göre %2.5 olarak saptandı. Benzer şekilde p47 için de MFI değerleri sağlıklı kontrollerde taşıyıcılara ($p:0.0014$) ve hastalara ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. gp91'den farklı olarak p47 boyaması için taşıyıcıların MFI değerleri de hastalara kıyasla yüksek saptandı ($p:0.0028$).



Şekil 21. gp91 MFI değerlerinin sağlıklılar, hastalar ve taşıyıcılar arasında kıyaslanması (*: <0.05 , **: <0.01).



Şekil 22 p47 MFI değerlerinin sağlıklılar, hastalar ve taşıyıcılar arasında kıyaslanması (**:<0.01, ****<0.0001)

5. TARTIŞMA

Kronik granülomatöz hastalık, nötrofil fonksiyonlarında bozukluk sonucu tekrarlayan enfeksiyonlarla karakterize kalıtsal bir primer immün yetmezliktir. Erken dönemde bulgu verebilen hastalık tekrarlayan enfeksiyonların yanı sıra artmış inflamasyona bağlı otoimmünite ve inflamatuvar bozukluklarla ilişkilidir. Tedavide uzun dönem antibiyotik profilaksisinin kullanılması ve enfeksiyonların erken dönemde tanınıp tedavi edilmesiyle birlikte hastalığın mortalitesi azalmış ve giderek daha fazla sayıda hasta erişkin döneme ulaşabilmektedir. Hastalığa erken tanı konulması ve enfeksiyonların önlenmesi uzun dönemde sağkalıma olumlu etkiye sahiptir. Bu çalışmada kliniğimizde takip edilen 25 KGH hastasının klinik ve demografik özellikleri incelenmiş, mevcut yaygın olarak kullanılmakta olan tanı yöntemlerinin yanı sıra NADPH enziminin alt ünitelerinin spesifik antikolarla boyanarak akan hücre ölçerinde ölçümünün, genetik tanıya alternatif olabileceği üzerinde çalışılmıştır.

5.1. Demografik Özellikler, Klinik Bulgular, Enfeksiyonlar ve Enfeksiyon Etmenleri

Hem X'e bağlı hem otozomal resesif olarak kalıtılan hastalığın, X'e bağlı kalıtılan formu tüm dünyada daha yaygınken akraba evliliklerinin sık olduğu topluluklarda otozomal resesif tipin daha sık görüldüğü saptanmıştır (11-17). Bizim kohortumuzda akraba evliliği öyküsü hastaların yaklaşık yarısında olmakla birlikte, her iki kalıtım şekli de hemen hemen eşit oranda gözlemlendi. Daha önce Köker ve arkadaşlarının yayınladığı 89 hastalık kohortta ise hastaların yaklaşık üçte ikisinde otozomal resesif kalıtım paterni izlenmiştir (17).

Hastalık başlangıç yaş ortancası çalışmamızda oldukça düşük saptandı ve hemen hemen her iki hastadan birinde semptomların bir yaş altında başladığı görüldü. Buna rağmen bir yaş altında sadece 5 hastadan biri KGH tanısı almıştı. KGH yenidoğan dönemi dahil olmak üzere her yaşta başlayabilir (97). X-KGH hastalarının daha erken dönemde semptomatik seyrettiği bilinmektedir (11,12). Bizim kohortumuzda da X-KGH hastalarının, otozomal resesif KGH hastalarına göre daha erken dönemde bulgu verdiği ve daha erken yaşta tanı aldığı gözlemlendi. Anlamlı bir bulgu olmasa da tanıda gecikme X-KGH

hastalarında daha kısadır. Bunda X-KGH hastalarında daha erken dönemde daha ciddi enfeksiyonların ortaya çıkması rol oynuyor olabilir.

Çeşitli serilerde sıklığı değişmekle birlikte hastalarda en sık pnömoni gözlenmektedir. Bunun yanında tekrarlayan cilt ve organ abseler, lenfadenit, sepsis, osteomyelit de izlenmektedir (3). Bizim hastalarımızda da pnömoni en sık gözlenen enfeksiyon olmakla birlikte en sık başlangıç şikayeti abse olarak belirlendi. Hastalarda gözlenen enfeksiyon çeşitlerinin genel olarak literatürle uyumlu olduğu gözlemlendi. KGH hastalarında pnömoni esnasında etkenin tanımlanması zordur. Profilaktik olarak antibiyotik kullanımının etkenin tanımlanmasını engelliyor olduğu düşünülmektedir (105). Hastalarımızda akciğer filmleri ve toraks BT bulguları klinik bulgularla beraber pnömoniyi desteklemekle birlikte pnömoni esnasında etkeni tanımlamak mümkün olamamaktaydı. Pnömoni KGH hastalarında en sık ölüm sebebi olarak bildirilmiştir (2,11). Bu nedenle agresif olarak tedavi edilmesi gerekmektedir. KGH hastalarında pnömoniyeye yol açtığı bilinen *Aspergillus* türleri ve bakteriyel ajanlardan *Burkholderia cepacia* kompleksi, *S. aureus*, *Nocardia*, *Serratia* gibi ajanlar düşünülerek tedavi planlanmalıdır. KGH'nin akciğerde en sık bulgusu pnömoni olmakla birlikte nadir olarak KGH hastalarında akciğer absesi de gelişebilir. Bunun yanında tekrarlayan enfeksiyonlar ve kronik inflamasyon akciğerde fibrozis, pulmoner hipertansiyon, plevral kalınlaşma gibi kronik değişikliklere yol açabilir (106,107).

Subkutan abseler ve lenfadenit, pnömoniden sonra KGH hastalarında en sık gözlenen enfeksiyondur. Sıklıkla klinisyenin karşısına KGH'nin ilk bulgusu olarak ortaya çıkar (13). Bununla uyumlu olarak bizim hastalarımızda da abseler en sık gözlenen başlangıç şikayeti olarak saptandı. *S.aureus*, abselerde en sık izole edilen etkeni. Bunun yanında *Aspergillus* ve *Candida* gibi fungal etmenler ile *E. coli* ve *Serratia* da hastalarda abse kültüründe izole edildi. Bu etkenler literatürde KGH hastalarında abse gelişimine yol açtığı bilinmekte olan etmenlerdir. Bunların yanında daha nadir etmenler de tanımlanmıştır. Örneğin *Granulibacter bethesdensis* kültür negatif kronik süpüratif lenfadenite yol açar (72). BCG aşılmasının yapıldığı ülkelerde ise *Mycobacterium bovis* lenfadenite yol açabilir (17). Hastalarımız arasında da 2 hastada BCG sonrası lenfadenit

gelişimi izlenmiştir. Lenfadenit ve abselerin tedavisinde antimikrobiyal tedavinin yanında cerrahi drenaj ve eksizyon da gerekebilir (105).

5.2. Enfeksiyon Dışı Bulgular

KGH'nin enfeksiyonlar dışında diğer özelliği hastalarda inflamatuvar bulguların gözlenmesidir. İnflamasyona bağlı komplikasyonlar ciddi olabilir ve hastalığın ilk bulgusu inflamasyon olabilir. Bu nedenle atipik inflamasyon bulguları olan ya da multisistem inflamasyon gözlenen hastalarda KGH ayırıcı tanıda düşünülmelidir.

KGH hastalarında inflamasyonun mekanizması henüz tam olarak netleştirilememiştir. Öne sürülen mekanizmalar arasında nötrofil apoptozisi ve 'efferocytosis'te azalma, Th17 hücrelerin aktivasyon ve inflamazom aktivasyonu yer almaktadır (4). Nötrofillerin vücutta enfeksiyonlara karşı savunma dışında diğer bir görevi apoptotik hücrelerin fagositozla temizlenmesidir. Apoptotik hücrelerin yüzeyine fosfatidilserin rezidüleri eksterne edilir. Bunlar makrofajlardaki fosfatidilserin reseptörleri tarafından tanınır ve böylelikle apoptotik hücreler fagositler tarafından yok edilir. Bu sürece 'efferocytosis' adı verilir. Efferocytosis esnasında makrofajlardan antiinflamatuvar sitokinler salınır ve böylelikle inflamasyon sonlandırılmış olur. KGH nötrofillerinde hücre yüzeyinde fosfatidilserin rezidülerinin eksterne edilememesine bağlı olarak apoptozis ve efferocytosis defekti olduğu ve buna bağlı olarak inflamasyonun sonlandırılmadığı gösterilmiştir. Tedavide kullanılan rekombinan IFN- γ 'nın apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasını arttırdığı gösterilmiştir.

Hastalığa adını veren steril granülomlar KGH'nin klasik inflamatuvar bulgusudur. Granülomlarda enfeksiyöz etmen tanımlanmamıştır ve steroid ve siklosporin gibi antiinflamatuvar tedaviye cevap verdiğinden enfeksiyonlara bağlı değil inflamasyona bağlı ortaya çıktıkları düşünülmektedir. Granülomlarda kazeifikasyon gözlenmez ve akut ya da kronik inflamasyonla karakterize fibrozis eşik eder (78). Başlıca cilt, kolon, mide üreterler, mesane ve göz olmak üzere bir çok sistemde gözlenebilir. Bizim hastalarımızda granülom formasyonu en sık ciltte izlenmiştir. Bir hastada ise daha nadir olarak görülen beyin granülomu saptanmıştır. Kranial MR ile tanı konulan olguda fungal enfeksiyon

ayrımı net olarak yapılamadığından hem steroid hem antifungal tedavi başlanmış ve tedaviye yanıt alınmıştır (108).

Genel olarak hastalarımızda inflamasyon bulgularından ziyade enfeksiyonlar ön planda saptanmıştır. Magnani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma göstermiştir ki inflamatuvar bulgular %70 gibi yüksek bir oranda gözlenebilir (88). İnflamatuvar bulgular bizim hastalarımızda literatürde belirtilen oranlardan daha az olarak izlenmiştir (3,88). Bunun başlıca sebebi hastalarımızın yaş ortalamasının düşüklüğü ve takip süresinin kısalığı olabilir. Magnani ve arkadaşlarının çalışmasında inflamatuvar bulguları olan hastaların %85'inden fazlasında ilk inflamasyon atağı 20 yaşından sonra izlenmiştir. Ayrıca hastalar retrospektif 30 yıllık uzun bir süreçte izlenmiştir. Antibiyotik profilaksisi ve enfeksiyonların erken dönemde tanınip tedavi edilmesi nedeniyle geçmişe kıyasla daha fazla KGH hastası erişkin döneme ulaşmakta ve otoinflamatuvar bulgular ön plana çıkmaktadır (109).

İnflamatuvar bulgular en sık gastrointestinal sistemde gözlenmektedir (11,88). KGH hastalarında gastrointestinal bulguların incelendiği bir çalışmada hastaların yaklaşık %30'unda gastrointestinal sistem tutulumu izlenmiştir. En sık bildirilen semptomlar karın ağrısı, ishal, bulantı/kusma, ve gastrointestinal sistem tıkanıklığı olarak sıralanmıştır (80). Gastrointestinal sistemde tıkanıklık en sık distal midede gözlenir ve gastrik çıkış yolu tıkanıklığına bağlı bulgular izlenir. Yenidoğan döneminde pilor stenozu şekline bulgu verebilir. Tüm gastrointestinal sistemde yaygın inflamasyon ve kolit bulguları gözlenebilir. Bazı hastalarda gastrointestinal sistem bulguları ön planda olabilir ve enfeksiyonlardan önce ortaya çıkabilir. Bu hastalar inflamatuvar bağırsak hastalığı şeklinde takip edilebilir ve hastalığın tanısı gecikebilir. Daha da önemlisi inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde kullanılan immünsüpresif ajanların kullanımına bağlı hastalarda enfeksiyöz komplikasyonlar artabilir (110). Gastrointestinal sistemin diffüz inflamasyonu X-KGH hastalarında daha sık ve daha ciddidir (11,80,81). Kohortumuzda ishali olan hastalardan ikisine yapılan kolonoskopi sonucunda mikroskobik bulgular kolit ve kronik inflamasyon ile uyumlu saptanmıştır. Bu hastaların ikisi de X-KGH hastası idi. KGH'ye bağlı koliti Crohn hastalığından mikroskobik olarak ayırt etmek mümkün olabilir. Crohn hastalığında gözlenen granülomlar daha gevşek yapılı olup genellikle pigmente histiositler

ve eosinofilik infiltrat izlenmez. KGH kolitinde ise yoğun histiosit, lenfosit ve eosinofil infiltratları gözlenir (111).in tedavisinde Bununla uyumlu olarak her iki hastamızda da patolojik incelemede eosinofilden yoğun infiltrasyonlar izlenmiştir. Bu hastalar kortikosteroidler ile tedavi edildi. Ancak KGH ilişkili kolit tedavisinde yoğun immünsüpresyon enfeksiyonlara yatkınlık nedeniyle mortaliteyi artırabilir. TNF blokörleri, kolit tedavisinde etkili olsalar da ciddi enfeksiyonlara ve ölüme yol açtığı bildirildiğinden kontraendikedir (112). Uzun süreli kortikosteroid kullanımı ise invaziv süperenfeksiyon riskini arttırır (113). Genel olarak tedavide önerilen meselamin gibi lumen içi antiinflamatuvar ajanlar ve düşük doz kortikosteroid tedavisidir. Ciddi gastrointestinal sistem tutulumu olan hastalarda hematopoetik kök hücre nakli gastrointestinal sistem bulguları için küratiftir (114).

5.3. Görüntüleme Bulguları

Hastalarımızda en sık tekrarlayan akciğer enfeksiyonları gözlendiğinden toraks BT ile değerlendirme gerekmiştir. KGH hastalarında toraks BT’de en sık izlenen bulgular konsolidasyon alanları, nodüller, bronşiektazi, budanmış ağaç manzarası, amfizematöz değişiklikler, mediastinal ve hilar lenfadenopatiler ve pulmoner arterde genişleme olarak tanımlanmıştır (106,107). Literatürle uyumlu olarak bu bulgular bizim hastalarımızda da izlenmiştir. Pulmoner enfeksiyonlar Toraks BT’de konsolidasyon şeklinde gözlenir. Uzun süren dirençli akciğer enfeksiyonları granüloamatöz inflamasyon, pulmoner fibrozis ve mediastinal/hilar lenfadenopatiye yol açar (115). Toraks BT bulguları, pnömoni enfeksiyonunu doğrulamakla birlikte enfeksiyon etmeni hakkında yön gösterebilir. Örneğin nodül formasyonu fungal enfeksiyonlara işaret eder. Bunun yanında plevral kalınlaşma ve fibrozis gibi bulgular kronik inflamasyona veya tekrarlayan akciğer enfeksiyonlarına bağlı oluşabilir.

Santral sinir sistemi tutulumu KGH hastalarında nadir de olsa görülebilir. Beyin absesi ve granülom oluşumunun yanında bilişsel defisit de bildirilmiştir (115,116). Bilişsel defisit ve IQ skorlarında düşüklük bazı KGH hastalarında tanımlanmış olmakla birlikte, bunun tekrarlayan enfeksiyonları nedeniyle sık hastane yatışlarına mı yoksa

NADPH oksidaz enziminin nörofizyolojide oynadığı role mi bağlı olduğu konusunda bir netlik yoktur. Kohortumuzda bilişsel fonksiyonlar değerlendirilmedi ancak santral sinir sistemi tutulumu kranial MR görüntülemesiyle gösterildi.

5.4. Tedavi ve Sağkalım

KGH ilk tanımlandığında tamamen ölümcül seyretmekteydi (5). Yıllar içerisinde ise sağkalım oranları gittikçe arttığı gözlemlendi. 368 KGH hastasının incelendiği geniş ABD serisinde genel mortalite oranı %17 olarak bildirilmiştir (11). 5 yıllık sağkalım oranı otozomal resesiflerde %88, X-KGH hastalarında ise %76 olarak saptanmış, 30 yaşında sağkalım oranı %50 olarak bulunmuştur. 429 hastayı kapsayan Avrupa çalışmasında da X- KGH hastalarında ölüm oranı %23, otozomal resesif KGH hastalarına ise %15 saptanmış, genel ölüm oranı ise %20 olarak bildirilmiştir (12). Beklenen yaşam süresi X-KGH hastalarında 37 yıl otozomal resesif KGH hastalarında ise 49 yıldır. Bu çalışmada otozomal resesif KGH hastalarının sağkalımı daha uzun olarak bulunmuştur. Ancak retrospektif olan bu çalışmada hastaların hepsi antibiyotik profilaksisi almamaktaydı. Bu çalışmalarda ilk tanımlandığına kıyasla mortalite oranının azaldığı görülse de her iki çalışma da aslında antifungal ajanlar olarak azollerin kullanıma girmesinden önceki verileri yansıtmaktadır. Son yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki hastaların yaşam süresi gittikçe artmaktadır. 10 yaşında sağkalım %88-97, 20 yaşında sağkalım %73-87, 30 yaşında sağkalım %46-55 arasındadır (13,14,117). Çocukluk döneminde ölüm oranı artık daha nadir gözlenmekle birlikte ilerleyen yaşlarda ölüm oranı hala yüksektir. Bizim hastalarımızda ölüm oranı %8 saptandı. Mevcut literatürdeki diğer çalışmalara kıyasla ölüm oranının düşük olması takip süresinin kısa olması ile açıklanabilir. Diğer çalışmalarla uyumlu olarak ölüm oranı X-KGH hastalarında daha yüksek bulundu.

Nötrofillerde DHR testi ile ölçülen rezidüel oksidaz aktivitesinin sağkalım üzerine ve klinik bulgular üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (17,117). Bizim kohortumuzda da rezidüel oksidaz aktivitesi düşük olan hastaların sağkalım oranı daha düşük saptandı.

KGH'nin geleneksel tedavisi enfeksiyonların önlenmesi amacıyla ömür boyu kullanılan antibiyotik ve antifungal profilaksisidir. Profilaktik tedavinin sağkalım üzerine

olumlu etkisi mevcuttur. Özellikle profilaktik itrakonazol kullanımının enfeksiyonları önlemede etkinliğinin Gallin ve arkadaşları tarafından gösterilmesinde sonra yürütülen çalışmalarda sağkalım oranlarının arttığı bildirilmiştir (14,99). Sağkalımı arttıran diğer bir faktör ise Kobayashi ve arkadaşlarının çalışmasında gösterildiği gibi düzenli takip, kontrol ve konusunda uzman hekimlere erişim imkanının olmasıdır (16).

Profilaktik olarak kullanılan TMP-SMX, KGH'de en sık enfeksiyona yol açan gram pozitif (*S.aureus*), gram negatif (*Burkholderia* ve *Serratia* türleri) ve kısmi aside dirençli (*Nocardia*) bakterilere karşı etkindir. KGH'de profilaktik olarak 40 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Polimorfonüklerer hücrelerin içinde kontsantre olabilmektedir ve bağırsak florasını bozmamaktadır. Randomize kontrollü bir çalışmada TMP-SMX profilaksisi olmadan hastalar 10 ayda bir hayati tehdit edici enfeksiyon geçirirken, profilaksi ile birlikte hayatı tehdit edici enfeksiyon sıklığı 40 ayda bire düşmüştür. Otozomal resesif hastalarda bakteriyel enfeksiyon insidansı %66 oranında, X-KGH hastalarında ise bakteriyel enfeksiyon insidansı %56 oranında azalmıştır (118). Enfeksiyonların önlenmesiyle hastane yatışları ve cerrahi girişim sıklığı da önlenebilmektedir (119). Tüm bu veriler ışığında bizim merkezimizde de TMP-SMX tüm KGH hastalarına 5 mg/kg/gün dozunda profilaktik olarak başlanmaktaydı. TMP-SMX tedavisinin yan etkileri nadirdir. Agranülositoz, interstisyel nefrit, hiperpotasemi, karın ağrısı, ishal, pankreatit, fotosensitivite ve Stevens-Johnson sendromu bildirilmiştir (120). Tedavi başladıktan sonra tam kan sayımı ve serum kreatinin düzeylerinin kontrol edilmesi önerilmektedir. Bahsedilen yan etkilere hastalarımızda izlemimiz sırasında rastlanmadı.

Fungal enfeksiyonlar, özellikle *Aspergillus* türleri KGH hastalarında majör ölüm sebepleri arasındadır (11). Profilaktik itrakonazol kullanımı fungal enfeksiyon insidansını azaltmaktadır (99).Fungal enfeksiyonlar halen başlıca ölüm sebebi olsa da, hastalar itrakonazol profilaksisinden sonra daha uzun yaşam süresine sahip olup, daha az invaziv fungal enfeksiyon geçirmektelerdir (2).

Profilaktik γ -IFN, KGH hastalarında etkinliğinin araştırılması 1980'lerin sonlarına doğru in vitro çalışmalarla başlanmıştır (121-123). Bu çalışmalarda hastaların üçte ikisinde hastalardaki genetik defekten bağımsız olarak oksidatif patlamanın stimüle

edildiği gösterilmiş ve oksidatif patlama yolağı dışındaki mekanizmalarla bakterisidal aktivitenin artırıldığı öne sürülmüştür. Daha sonra yapılan randomize çift kör plasebo kontrollü bir çalışmada, profilaktik rIFN- γ ciddi enfeksiyon sayısını %67 oranında azaltmıştır. rIFN- γ tüm hastalarda enfeksiyon sıklığını azaltmış olmakla birlikte özellikle erken yaştaki X-KGH hastaları daha fazla fayda görmüşlerdir (101). Uzun dönem etkileri ve yan etkilerini araştırmak üzere yapılan faz 4 çalışmasında 9 yıllık izlemde yaşamı tehdit edici yan etki gözlenmemiştir. Hasta yılı başına gözlenen ciddi enfeksiyon oranı ise 1.1'den 0.3'e gerilemiştir (102). Ancak bu çalışma profilaktik itrakonazol kullanımının rutine geçmesinden önce yapılmıştır. Bu nedenle profilaktik olarak optimum antibiyotik ve antifungal tedavi alan hastalarda rIFN- γ kullanımının ciddi bakteriyel enfeksiyonları önlemedeki etkisi henüz bilinmemektedir. Çalışmamızda hastaların yaklaşık yarısına profilaktik rIFN- γ başlandığı gözlemlendi. rIFN- γ , 50 mikrogram/m² dozunda haftada üç gün subkutan olarak başlandı. Hastalarda ciddi yan etki gözlenmedi. rIFN- γ kullanımı esnasında en sık rastlanan sorun hastaların zaman zaman ilacı temin etmelerinde sıkıntı yaşamaları idi. Profilaktik rIFN- γ tedavisinin hangi hastalara başlanması gerektiğiyle ilgili net bir konsensus yoktur. Genel olarak hastaların klinik ciddiyetine ve takip eden merkezin tecrübesine göre başlanır. KGH hastalarında birden fazla mekanizma ile etki gösterdiği düşünülmektedir. Oksidatif patlamayı tam olarak düzeltmediği ve başka mekanizmalarla etki ediyor olabileceği fare modellerindeki çalışmalardan sonra öne sürülmüştür (124). Fagositlerde nitrik oksit (NO) üretimini arttırdığı bulunmuştur. Nitrik oksit bakteri ve fungal ajanlara karşı etki etmektedir (125). Bunun yanında makrofajların S.aureus'a karşı bakterisidal etkisini arttırdığı gösterilmiştir (126). Tüm bu bulgular rIFN- γ profilaksisinin KGH hastalarında defektif olan oksidatif patlamayı düzelterek değil de doğal immünitinin diğer elemanları üzerine etki göstererek enfeksiyonları önlemede işe yaradığını desteklemektedir.

İngiltere ve İrlanda'da yapılan çalışmada hemen hemen tüm hastalar antibiyotik ve antifungal profilaksisi almalarına rağmen 30 yaşında sağkalım oranı halen %55'tir. Bu nedenle küratif tedaviler üzerinde çalışılmaktadır. Hematopoetik kök hücre nakli KGH için küratiftir. Ancak yüksek riskli bir prosedürdür ve ciddi morbidite ve ölüme yol

açabilir. Bu nedenle yüksek riskli hastalığı ve uygun donörü olan hastalarda uygulanması önerilmektedir (127). Erken başlangıçlı ciddi enfeksiyonlar gözlenen dört hastamıza kemik iliği nakli uygulandı ve iki hasta kemik iliği nakli sonrası kaybedildi.

Gen tedavisi KGH tedavisinde heyecan verici bir gelişmedir. Kemik iliği nakli için HLA uyumlu donörü olmayan hastalar için bir alternatif olabilir. Genetik olarak düzeltilmiş otolog kök hücre nakli yapıldığında hayat boyu immüsupresyon gerekmez. Bunun yanında sadece %10-20 oranında normal nötrofil bulunduğu ciddi enfeksiyonlar önlenemediğinden nakledilen kök hücrelerin kemik iliğine tamamen engrafmanı gerekmez. Yeni geliştirilen lentoviral vektörlerin gen düzenlenmesinde kullanılması ve gen tedavisi öncesi ideal miyeloablasyon rejimlerinin oluşturulması, günümüzde gen tedavisinin kemik iliği nakline bir alternatif olarak gelişmesiyle sonuçlanmıştır. Çalışmalar X-CGD hastaları üzerinde yapılmaktadır ancak gelişmelerle birlikte yakın gelecekte otozomal resesif geçişli formda da gen tedavisi uygulanabileceği düşünülmektedir.

5.5. Laboratuvar Bulguları ve Tanı

Nitroblue tetrazolium, KGH tanısında kullanılan semikantitatif tarihsel bir testtir. NBT yerini artık DHR testine bırakmıştır. Çalışmamızda bir hastaya NBT ile diğer tüm hastalara DHR testi ile tanı konulmuştur. Tanıyı doğrulamak üzere genetik analiz ulaşılabilen tüm hastalardan gönderilmiştir.

5.5.1. Kronik granüloamatöz hastalıkta DHR'nin yeri

Dihidrorhodamin testi KGH tanısının konulmasında oldukça yararlı bir yöntemdir (95, 96). Bu test ile elde edilen histogram özelliklerine göre X'e bağlı veya otozomal resesif tipler arasında ayırım yapılabilmesinin yanında, taşıyıcılık durumları da saptanabilmektedir. Gerek tanısal amaçlı, gerekse aile için hastalık taraması açısından DHR testinin yapılması bu hastalıkta büyük yarar sağlamaktadır. Bu testin tanı ve kalıtım şeklini tahmin etmedeki yararlarının yanında rezidüel aktiviteyi ölçmesi nedeniyle

hastalık prognozu hakkında da bilgi vermektedir (17, 96). Rezidüel aktivitenin yüksek olduğu olgularda semptomlar daha geç başlamakta ve klinik daha hafif seyretmektedir. Kronik granümatöz hastalıkta içerisinde yer alan gp91, p22 ve p67 eksikliği ile giden hastalarda rezidüel aktivite genellikle saptanmamakta ve 1,5 altında saptanmaktadır. Oysa p47 eksikliğinde rezidüel oksidatif aktivite 1,5 üzerinde olmaktadır. Bu nedenle p47 olgularında hastalık daha hafif seyirlidir. Çalışmamızda, literatür ile uyumlu bir şekilde p47 olgularında en yüksek DHR SI değerleri elde edilmiştir. Köker ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, p47 olgularının tümünde $SI \geq 3$ saptanırken (17), çalışmamızda bu değer daha düşük saptanmış olup, 1,0 ile 2,6 arasında değişmektedir. Merkezler arasındaki farklı sonuçlar, kullanılan yöntemlerin farklı olması, laboratuvarındaki çevresel faktörler veya testi yapan kişilerin el beceresinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenlerle, her merkezin kendine ait referans verisi oluşturması sonuçların daha sağlıklı değerlendirilmesini sağlayacaktır.

5.5.2. Mutasyon çeşitliliği ve genetik tanı

Kronik granümatöz hastalığın büyük bir kısmından X'e bağlı kalıtım gösteren *CYBB* geninde oluşan mutasyonlar sorumludur. Literatürde bu gende çok çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır (56). Kabaca en sık görülen mutasyonlar %65 oranında tek nükleotid değişimi (missense, nonsense, splice) şeklinde iken, %35 oranında delesyon ve insersiyonlardır. Oluşan missense mutasyonlar tamamen protein kaybına ($X91^-$), azalmış protein ($X91^-$) veya normal miktarda ama fonksiyonsuz protein ($X91^+$) varlığına neden olabilmektedir (56). Literatürde tanımlanan delesyonlar küçük olabildiği gibi (tek nükleotid), gross (büyük) da olabilmektedir. Büyük delesyonlar sonucu X kromozomu üzerindeki diğer yakın genlerinde kaybı söz konusu olabilmektedir. Örneğin bazı CGD hastalarına Duchenne müsküler distrofi, retinitis pigmentosa, ornitin transkarbamilaz eksikliği ve McLeod sendromu (hemolitik aneminin eşlik ettiği Kell eritrosit antijen kaybı) eşlik edebilmektedir. Yine bazı mutasyonlar sık görülebilmekte ve hot spot konumundadır. Bu mutasyonlara örnek olarak c.252G>A verilebilir. Çalışmamızda görülen *CYBB* mutasyon çeşitliliği literatürle uyumlu idi ve missense (2 olgu), nonsense

(4 olgu), splice (2 olgu) ve insersiyon (1 olgu) şeklindeydi. Çalışmamızda, *CYBB* geninde iki adet yeni mutasyon bulundu. Bu mutasyonların biri missense iken (c.1094T>G, p.Leu365Arg), diğeri kırılma bölgesinde (c.675-2A>G) idi. İlginç olarak, A4 ve A7 aileleri arasında akrabalık olmadığı halde 2 ailede (A4 ve A7) benzer mutasyon saptandı (c.469C>T, p.Arg157X).

Literatürde *NCF1* geninde en sık saptanan mutasyon ekzon 2'nin başlangıcında yer alan GT delesyonudur (129). *NCF1* geninde gözlenen bu delesyonun sık olmasının nedeni her bir kromozomdaki *NCF1* genine eşik eden 2 ayrı %99 oranında benzer gen dizilimi (homolog) içeren olan pseudogenlerin olmasıdır. Normal şartlarda bu pseudogenlerde doğal olarak GT delesyonu olduğu için protein üretimi söz konusu değildir. Ancak gerçek gen ile pseudogen arasında oluşan sık rekombinasyon olayından dolayı, GT delesyon bölgesi gerçek *NCF1* genine geçmekte bu da KGH hastalığının oluşmasına neden olmaktadır. Pseudogenlerin varlığının bir diğer zor tarafı mutasyon analizi yaparken ortaya çıkmaktadır. Hastada bulunan delesyonun hangi genden kaynaklandığının saptanması tanı sürecini uzatabilmektedir. Bunun dışında tanımlanan bazı hot spot mutasyon bölgeleri de bulunmaktadır. Bunlar arasında c.579G>A mutasyonu bulunmaktadır (129). Bugüne kadar tanımlanmış mutasyonların tümü p47 proteinin tama yakın kaybına yol açmaktadır (p47°). Çalışmamızda p47 protein defekti olan altı bireyde GT delesyonu ve iki kardeşte c.579G>A mutasyonu saptandı.

Literatürde saptanan *CYBA* ve *NCF2* mutasyonları genellikle tam protein kaybına (p22°, p67°) veya nadiren rezidüel protein (p22^R, p67^R) miktarına yol açmaktadır. Çalışmamızda, bir olguda (H19) *CYBA* geninde daha önce bildirilen missense mutasyon saptanırken (c.70G>A, p.Gly24Arg), diğer bir olguda (H21) ise *NCF2* geninde daha önce bildirilen bir missense mutasyon (c.279C>G , p.Asp93Glu) bulundu.

5.5.3. Hücre içi boyamalar

Bu çalışmada kullanılan antikor kombinasyonu ile mutasyonun hangi proteinde olduğu doğru tahmin edildi. Buna göre boyama yapılan gp91 (n=5) ve p22 (n=1) hastalarında DHR testi yardımıyla beraber olguların tamamında mutasyonun hangi gende olabileceği

tahmin edildi. Diğer taraftan p47 (n=8) ve p67 (n=1) de ise sadece hücre içi boyama ile mutasyonun hangi gende olabileceği %100 doğrulukta bulundu. Oluşan mutasyonların bazıları protein ekspresyonunda değişikliğe yol açmayıp sadece fonksiyon bozukluğuna yol açabildiği için tüm KGH olgularında hücre içi protein analizi yaparken, fonksiyon değerlendirmesi de yapılmalıdır (DHR gibi).

Hastalardaki p22 ekspresyonu gp91 ile ilişkili olduğu için gp91 mutasyonu olan bireylerde genelde p22 ekspresyonu olmamaktadır. Buradaki p22 ekspresyonu aynı zamanda olgularda görülen mutasyon çeşidi ile değişkenlik göstermektedir. Örneğin gp91 proteinini tamamen yok eden mutasyonlarda %5'ten daha az p22 ekspresyonu görülebilirken, gp91 ekspresyonu az miktarda olan bireylerde orantısız olarak daha yüksek miktarda p22 ekspresyonu edilebilmektedir (117). Çalışmamızda gp91 eksikliği olan olgularımızda gp91 ekspresyonu sağlıklı kontrole göre ortanca değeri %62,5 olarak saptanırken, bu olgulardaki p22 ekspresyonu median değeri kontrole göre %14,1 idi.

Diğer taraftan p22 mutasyonu olan olgularda genellikle gp91 ekspresyonu düşük saptanmaktadır (130). Ancak Al Hawary ve arkadaşlarının (131) yaptığı çalışmada %53 olguda gp91 ekspresyonu normal bulunmuştur. Yazarlar bu durumu gp91 proteinin yüzey ekspresyonun p22'den bağımsız olan posttranslasyonel modifikasyon süreçleri ile açıklamaktadırlar. P22 mutasyonu olan olgumuzda hem p22 hem de gp91 kontrole göre düşük saptanmış olup, sırasıyla %21,6 ve %70,5 olarak ölçülmüştür. İlginç olarak bu hastamızın DHR SI'i 6 olarak saptanmıştır. Bu sonuç Köker ve arkadaşlarının tanımladığı üç p22 olgusu ile benzerlik göstermekte olup, DHR SI değerleri 1,5 üzerinde olmasına rağmen hücre içi hem p22 hem de gp91 ekspresyonu hiç saptanmamıştır. Gözlenen bu olayın çalışmada kullanılan antikorlarla saptanmayan p22 protein varlığı şeklinde açıklanmıştır. Benzer mutasyonu olan olgumuzda (p.Gly24Arg) gözlenen düşük miktardaki protein ekspresyonunu kullanılan farklı monoklonal antikor ile açıklanabilir. Bu da hastamızda görülen yüksek DHR değerini açıklamaktadır. Çalışmamızda ve diğer çalışmalarda kullanılan p22 ve gp91 antikorlarının farklı epitopları tanınması, sonuçların farklı olmasına neden olabilmekte bu da sağlıklı karşılaştırmanın yapılmasını engellemektedir.

Otozomal resesif hastalık formları içerisinde en sık görüleni p47 protein eksikliğidir. Hücre içi boyama yapıldığında elde edilen MFI median değeri 1,6 (0.8-2.6) olarak bulunmuştur. Bulunan bu düşük MFI değeri literatürde belirtilen p47° protein kaybını desteklemektedir. Çalışmamızda p47 eksikliği olan hastalara bakıldığında en sık görülen mutasyon çeşidi delGT olup bu olgulardaki DHR SI değeri <3 bulunmuştur. Bu sonuç, Köker ve arkadaşlarının delGT olgularındaki sonuçlar (median 5,6 (aralık: 3-12)) ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. İlginç olarak, bu mutasyona sahip olgularımız ile Köker ve arkadaşlarının olguları arasındaki ortanca tanı yaşları benzer (15 vs 16 yaş) olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız, p47 protein ekspresyonunu kontrol eden mutasyonlar dışında başka mekanizmaların varlığını akla getirmektedir.

Kohortumuz içerisinde yer alan p67 olgusunun hücre içi protein ekspresyonu kontrole göre %2,5 olarak saptandı. Bu değer literatürde benzer mutasyonu olan olgular ile korele olup hastanın fenotipini p67° olarak açıklamaktadır.

Hücre içi protein boyamasının en önemli kısıtlamalarından birisi kullanılan antikorların spesifik olarak proteine bağlanmaması veya özellikle gp91 proteini için iyi bir boyama paterni elde edilememesidir. Ticari olarak satılan ve literatürde belirtilen antikorlara bakıldığında gp91 proteini için MFI değerleri hasta, taşıyıcılar ve sağlıklı kontroller arasında minimal düzeyde farklılık göstermektedir. Çalışmamızda gp91 için iki farklı klon kullanılmasına rağmen ideal bir boyama histogramı elde edilememiştir.

Sonuç olarak;

Kronik granüloamatöz hastalığın tanısında spesifik antikorlarla NADPH enziminin alt ünitelerinin boyanması ile akan hücre ölçerinde hastalığın alt tipi belirlenebilir ve böylelikle genetik mutasyon analizi yapılmadan genetik mutasyon tipi öngörülebilir.

6. SONUÇLAR

- Çalışmaya alınan 25 hastanın 6'sı kız (%24) 19'u erkekti (%76). Hastaların güncel ortanca yaşları 10.8 (5.2-18.0) yılıdır. Hastalığın başlangıç yaşı ortancası 1.3 (0.3-4.7) tanı yaşı ortancası ise 4 (14-13.5) yılıdır. DHR testi ile 12 (%48) hastanın X'e bağlı, 13 (%52) hastanın ise otozomal resesif geçişli KGH olduğu bulundu.
- Genetik olarak hastaların 10 (%40) tanesinde CYBB geninde, 8 (%32) hastada NCF1 geninde, 1 (%4) hastada CYBA geninde, 1 (%4) hastada ise NCF2 geninde mutasyon saptandı.
- P47 protein defekti olan altı bireyde daha önce literatürde bildirilen ve *NCF1* geninde sıklıkla görülen ekzon 2'deki GT delesyonu gözlemlendi.
- Hastalık başlangıç yaş ortancası X-KGH hastalarında hastalık anlamlı olarak daha erken başlamaktaydı ($p<0.001$). Hastalık başlangıcıyla paralel şekilde X-KGH hastaları, otozomal resesif KGH hastalarına göre daha erken yaşta tanı almaktaydı (1.45, 0.66-2.75 vs 11.5, 6.7-15.6, $p:0.001$).
- Hastalarda en sık gözlenen başlangıç şikayeti abse idi (15 hasta, %60). Daha sonra sırasıyla, pnömoni (n: 8, %32), ateş (n:3, %12), lenfadenit (n:2, %8), bakteriyemi (n:1, %4), ishal (n:1,%4), tekrarlayan otit (n:1, %4) gözlemlendi.
- 15 (%60) hastada enfeksiyonlar esnasında etken tanımlanabildi. 8 (%32) hasta tüberküloz enfeksiyonu nedeniyle tedavi edildi.
- Hastalardan 7'sinde (%28) granülom gelişti. Granülomlar en sık lenf bezlerinde (n:5, %20) izlendi. Onun dışında akciğer (n:1, %4), karaciğer (n:2, %4), beyin (n:1, %4) ve ciltte (n:1, %4) de granülom oluşumu izlendi.
- Tüm hastalar antibiyotik (trimetoprim sulfometaksazol) ve antifungal (itakonazol) profilaksisi kullanmaktaydı. 14 (%56) hastaya profilaktik rekombinan interferon- γ başlandı.
- Dört (%16) hastaya (hepsi X-KGH) kemik iliği transferi uygulandı ve 2 (%8) hasta kemik iliği nakli sonrası kaybedildi.

- Otozomal resesif KGH hastalarında, X-KGH hastalarına kıyasla sağ kalım anlamlıya yakın derecede yüksek saptandı ($p:0.05$).
- Hastaların DHR testi SI ortancası 1.00 (0.88-1.91) saptandı. Hastalık başlangıç yaşı ile dihidrorodamin testindeki SI arasında pozitif korelasyon saptandı ($r_s: 0.50$, $p:0.012$).
- X-KGH hastalarının ortanca DHR SI değeri (0.94; 0.63-1.00), otozomal resesif KGH hastalarının ortanca DHR SI değerinden (1.91; 1.13-2.60) anlamlı olarak düşük saptandı ($p:0.001$).
- DHR SI $SI \leq 1.5$ olan hastalar nötrofil rezidüel aktivitesi olmayan hastalar olarak, $SI > 1.5$ olan hastalar ise rezidüel aktivitesi olan hastalar olarak gruplandı. 16 hastada (%66.7) rezidüel aktivite saptanmazken, 8 hastada (%33.3) rezidüel aktivite saptandı. X-KGH hastalarının hiç birinde rezidüel aktivite izlenmezken 8 tane otozomal resesif KGH hastasında rezidüel aktivite izlendi ($p:0.001$).
- Hücre içi protein boyama analizlerinde X'e bağlı kalıtılan gp91, hastalarda ve taşıyıcılarda sağlıklı kontrollere göre daha düşük oranda boyama saptandı. Hücre membranında gp91 ile etkileşim halinde yer alan p22 de hem hastalarda hem de taşıyıcılarda sağlıklı kontrollere göre daha düşük oranda boyanmış olup taşıyıcılarda X-KGH'de görüldüğü gibi histogram grafiğinde çift tepe saptandı. p47 ve p67 hastalarda sağlıklı kontrollere göre oldukça az boyanırken, taşıyıcılarda orta derecede boyanma gösterdi.
- Kullanılan antikor kombinasyonu ile mutasyonun hangi proteinde olduğu doğru tahmin edildi. Buna göre boyama yapılan gp91 (n=5) ve p22 (n=1) hastalarında DHR testi yardımıyla beraber olguların tamamında mutasyonun hangi gende olabileceği tahmin edildi. Diğer taraftan p47 (n=8) ve p67 (n=1) de ise sadece hücre içi boyama ile mutasyonun hangi gende olabileceği %100 doğrulukta bulundu.
- gp91 için MFI değerleri sağlıklı kontrollerde taşıyıcılara ve hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p:0.02$ ve $p:0.0016$).
- p47 için de MFI değerleri sağlıklı kontrollerde taşıyıcılara ($p:0.0014$) ve hastalara ($p < 0.0001$) kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu.

7. REFERANSLAR

1. Roos D. Chronic granulomatous disease. *Br Med Bull.* 2016;118(1):50-63.
2. Marciano BE, Spalding C, Fitzgerald A et al. Common severe infections in chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* 2015;60:1176–83.
3. Roos D, Holland SM, Kuijpers TW. Chronic granulomatous disease. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM. (eds). *Primary Immunodeficiency Diseases, A Molecular and Genetic Approach* 3rd ed New York: Oxford University Press, 2014,689–722.
4. Rieber N, Hector A, Kuijpers T, Roos D, Hartl D. Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:252460.
5. Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med.* 1957;40(5):309-12.
6. Bridges RA, Berendes H, Good RA. A fatal granulomatous disease of childhood; the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. *AMA J Dis Child.* 1959;97(4):387-408.
7. Ford DK, Price GE, Culling CF, Vassar PS. Familial lipochrome pigmentation of histiocytes with hyperglobulinemia, pulmonary infiltration, splenomegaly, arthritis and susceptibility to infection. *Am J Med.* 1962;33:478-89.
8. Holmes B, Quie PG, Windhorst DB, Good RA. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet.* 1966;1(7449):1225-8.
9. 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.* 1967;46(4):668-79.
10. 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.* 1967;46(9):1422-32.

11. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H. Chronic granulomatous disease . Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79(3):155-69.
12. van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, Español T, Fischer A, Kurenko-Deptuch M, Mouy R, Petropoulou T, Roesler J, Seger R, Stasia MJ, Valerius NH, Weening RS, Wolach B, Roos D, Kuijpers TW. Chronic granulomatous disease : the European experience. *PLoS One*. 2009;4(4):e5234
13. Jones LB, McGrogan P, Flood TJ, Gennery AR, Morton L, Thrasher A, Goldblatt D, Parker L, Cant AJ. Special article: chronic granulomatous disease in the United Kingdom and Ireland: a comprehensive national patient-based registry. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(2):211-8.
14. Martire B, Rondelli R, Soresina A, Pignata C, Broccoletti T, Finocchi A, et al. Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with chronic granulomatous disease : an Italian multicenter study. *Clin Immunol* 2008;126:155-64.
15. Ahlin A, de Boer M, Roos D, Leusen J, Smith CI, Sundin U, et al. Prevalence, genetics and clinical presentation of chronic granulomatous disease in Sweden. *Acta Paediatr* 1995;84:1386-94.
16. Kobayashi S, Murayama S, Takanashi S, Takahashi K, Miyatsuka S, Fujita T, et al. Clinical features and prognoses of 23 patients with chronic granulomatous disease followed for 21 years by a single hospital in Japan. *Eur J Pediatr* 2008;167:1389-94.
17. Köker MY, Camcıoğlu Y, van Leeuwen K, Kılıç SŞ, Barlan I, Yılmaz M et al. Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(5):1156-1163.e5.
18. Huang J, Hitt ND, Kleinberg ME. Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry*. 1995;34(51):16753-7.

19. Wallach TM, Segal AW. Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem J.* 1997;321 (Pt 3):583-5.
20. Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC. Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem.* 2001;276(33):31105-12.
21. Leusen JH, Meischl C, Eppink MH, Hilarius PM, de Boer M, Weening RS, et al. Four novel mutations in the gene encoding gp91-phox of human NADPH oxidase: consequences for oxidase assembly. *Blood.* 2000;95(2):666-73.
22. Leusen JH, Bolscher BG, Hilarius PM, Weening RS, Kaulfersch W, Seger RA, et al. 156Pro-->Gln substitution in the light chain of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase (p22-phox) leads to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J Exp Med.* 1994;180(6):2329-34.
23. Leusen JH, de Boer M, Bolscher BG, Hilarius PM, Weening RS, Ochs HD, et al. A point mutation in gp91-phox of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J Clin Invest.* 1994;93(5):2120-6.
24. Koga H, Terasawa H, Nuno H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 1999;274(35):25051-60.
25. Nisimoto Y, Freeman JL, Motalebi SA, Hirshberg M, Lambeth JD. Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem.* 1997 ;272(30):18834-41.
26. Ellson CD, Gobert-Gosse S, Anderson KE, Davidson K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat Cell Biol.* 2001;3(7):679-82.

27. Hiroaki H, Ago T, Ito T, Sumimoto H, Kohda D. Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat Struct Biol.* 2001;8(6):526-30.
28. Nakamura R, Sumimoto H, Mizuki K, Hata K, Ago T, Kitajima S, et al. The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Biochem.* 1998;251(3):583-9.
29. Dusi S, Rossi F. Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox. *Biochem J.* 1993;296 (Pt 2):367-71.
30. Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV, Fuchs A. p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30097-103.
31. Kanai F, Liu H, Field SJ, Akbary H, Matsuo T, Brown GE, et al. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol.* 2001;3(7):675-8.
32. Grogan A, Reeves E, Keep N, Wientjes F, Totty NF, Burlingame AL, et al. Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 24):3071-81.
33. Tamura M, Kai T, Tsunawaki S, Lambeth JD, Kameda K. Direct interaction of actin with p47(phox) of neutrophil NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(3):1186-90.
34. Wientjes FB, Reeves EP, Soskic V, Furthmayr H, Segal AW. The NADPH oxidase components p47(phox) and p40(phox) bind to moesin through their PX domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(2):382-8.
35. Berthier S, Paclet MH, Lerouge S, Roux F, Vergnaud S, Coleman AW, Morel F. Changing the conformation state of cytochrome b558 initiates NADPH oxidase activation: MRP8/MRP14 regulation. *J Biol Chem.* 2003;278(28):25499-508.

36. van Bruggen R, Anthony E, Fernandez-Borja M, Roos D. Continuous translocation of Rac2 and the NADPH oxidase component p67(phox) during phagocytosis. *J Biol Chem.* 2004;279(10):9097-102.
37. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature.* 1991;353(6345):668-70.
38. Dusi S, Donini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67phox is required for the translocation of rac 1 but not of rac 2 from cytosol to the membranes. *Biochem J.* 1995;308 (Pt 3):991-4.
39. Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science.* 1991;254(5037):1512-5.
40. Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, et al. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell.* 2002;108(6):809-21.
41. Kim C, Marchal CC, Penninger J, Dinauer MC. The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J Immunol.* 2003;171(8):4425-30.
42. Zhao T, Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils. *J Clin Invest.* 2003;112(11):1732-40.
43. Szászi K, Korda A, Wöfl J, Paclet MH, Morel F, Ligeti E. Possible role of RAC-GTPase-activating protein in the termination of superoxide production in phagocytic cells. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(7-8):764-72.
44. Diebold BA, Bokoch GM. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol.* 2001;2(3):211-5.
45. Bokoch GM, Quilliam LA, Bohl BP, Jesaitis AJ, Quinn MT. Inhibition of Rap1A binding to cytochrome b558 of NADPH oxidase by phosphorylation of Rap1A. *Science.* 1991;254(5039):1794-6.

46. Johnston RB Jr, Baehner RL. Improvement of leukocyte bactericidal activity in chronic granulomatous disease . *Blood*. 1970;35(3):350-5.
47. 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*. 2002;416(6878):291-7.
48. Ramsey IS, Ruchti E, Kaczmarek JS, Clapham DE. Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(18):7642-7.
49. Rada BK, Geiszt M, Káldi K, Timár C, Ligeti E. Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood*. 2004;104(9):2947-53.
50. Hampton MB, Vissers MC, Keenan JI, Winterbourn CC. Oxidant-mediated phosphatidylserine exposure and macrophage uptake of activated neutrophils: possible impairment in chronic granulomatous disease. *J Leukoc Biol*. 2002;71(5):775-81.
51. Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, Whitney AR, Nauseef WM, Malech HL, DeLeo FR. Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease. *J Immunol*. 2004;172(1):636-43.
52. Brown JR, Goldblatt D, Buddle J, Morton L, Thrasher AJ. Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis and macrophage phagocytosis in chronic granulomatous disease (CGD). *J Leukoc Biol*. 2003;73(5):591-9.
53. Bleesing JJ, Souto-Carneiro MM, Savage WJ, Brown MR, Martinez C, Yavuz S, et al. Patients with chronic granulomatous disease have a reduced peripheral blood memory B cell compartment. *J Immunol*. 2006;176(11):7096-103.
54. Defendi F, Decleva E, Martel C, Dri P, Stasia MJ. A novel point mutation in the *CYBB* gene promoter leading to a rare X minus chronic granulomatous disease variant--impact on the microbicidal activity of neutrophils. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(3):201-10.

55. Newburger PE, Skalnik DG, Hopkins PJ, Eklund EA, Curnutte JT Mutations in the promoter region of the gene for gp91-phox in X-linked chronic granulomatous disease with decreased expression of cytochrome b558. *J Clin Invest.* 1994;94(3):1205-11.
56. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45(3):246-65.
57. Stasia MJ, Brion JP, Boutonnat J, Morel F. Severe clinical forms of cytochrome b-negative chronic granulomatous disease (X91-) in 3 brothers with a point mutation in the promoter region of CYBB. *J Infect Dis.* 2003;188(10):1593-604. Epub 2003 Nov 4.
58. Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J Biol Chem.* 1990;265(33):20241-6.
59. Weening RS, de Klein A, de Boer M, Roos D. Effect of interferon-gamma, in vitro and in vivo, on mRNA levels of phagocyte oxidase components. *J Leukoc Biol.* 1996;60(6):716-20.
60. Accetta D, Syverson G, Bonacci B, Reddy S, Bengtson C, Surfus J, et al. Human phagocyte defect caused by a Rac2 mutation detected by means of neonatal screening for T-cell lymphopenia. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(2):535-38.e1-2
61. Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Thurman G, et al. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(9):4654-9.
62. Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, et al. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood.* 2000;96(5):1646-54.
63. van Bruggen R, Bautista JM, Petropoulou T, de Boer M, van Zwieten R, Gómez-Gallego F, et al. Deletion of leucine 61 in glucose-6-phosphate dehydrogenase leads

to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood*. 2002;100(3):1026-30.

64. Roos D. Chronic granulomatous disease. *Br Med Bull*. 2016;118(1):50-63.
65. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 2000; 79(3):170-200.
66. Wolach B, Gavrieli R, de Boer M, Gottesman G, Ben-Ari J, et al. Chronic granulomatous disease in Israel: clinical, functional and molecular studies of 38 patients. *Clin Immunol*. 2008;129(1):103-14.
67. Zhou Q, Hui X, Ying W, Hou J, Wang W, Liu D, et al. A Cohort of 169 Chronic Granulomatous disease Patients Exposed to BCG Vaccination: a Retrospective Study from a Single Center in Shanghai, China (2004-2017). *J Clin Immunol*. 2018;38(3):260-72.
68. Wolach B, Gavrieli R, de Boer M, van Leeuwen K, Berger-Achituv S, Stauber T, et al. Chronic granulomatous disease: Clinical, functional, molecular, and genetic studies. The Israeli experience with 84 patients. *Am J Hematol*. 2017;92(1):28-36.
69. Conti F, Lugo-Reyes SO, Blancas Galicia L, He J, Aksu G, Borges de Oliveira E Jr, et al. Mycobacterial disease in patients with chronic granulomatous disease: A retrospective analysis of 71 cases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):241-248.e3.
70. Meher-Homji Z, Mangalore RP, DR Johnson P, Y L Chua K. *Chromobacterium violaceum* infection in chronic granulomatous disease: a case report and review of the literature. *JMM Case Rep*. 2017;4(1):005084.
71. Mailman TL, Schmidt MH. *Fancisella philomiragia* adenitis and pulmonary nodules in a child with chronic granulomatous disease. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(4):245–248.
72. Greenberg DE, Shoffner AR, Zelazny AM, Fenster ME, Zarembek KA, Stock F, et al. Recurrent *Granulibacter bethesdensis* infections and chronic granulomatous disease. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(9):1341-8.

73. 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*. 1995;21(5):1291-3.
74. Falcone EL, Holland SM. Invasive fungal infection in chronic granulomatous disease: insights into pathogenesis and management. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25(6):658-69.
75. Blumental S, Mouy R, Mahlaoui N, Bougnoux ME, Debré M, Beauté J, et al. Invasive mold infections in chronic granulomatous disease: a 25-year retrospective survey. *Clin Infect Dis*. 2011;53(12):e159-69.
76. Vinh DC, Freeman AF, Shea YR, Malech HL, Abinun M, Weinberg GA, Holland SM. Mucormycosis in chronic granulomatous disease: association with iatrogenic immunosuppression. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(6):1411-3.
77. Siddiqui S, Anderson VL, Hilligoss DM, Abinun M, Kuijpers TW, Masur H, et al. Fulminant miliary pneumonitis: an emergency presentation of chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2007;45(6):673-81.
78. Schäppi MG, Jaquet V, Belli DC, Krause KH. Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin Immunopathol*. 2008;30(3):255-71.
79. Levine S, Smith VV, Malone M, Sebire NJ. Histopathological features of chronic granulomatous disease (CGD) in childhood. *Histopathology*. 2005;47(5):508-16.
80. Marciano BE, Rosenzweig SD, Kleiner DE, Anderson VL, Darnell DN, Anaya-O'Brien S, et al. Gastrointestinal involvement in chronic granulomatous disease. *Pediatrics*. 2004;114(2):462-8.
81. Schäppi MG, Smith VV, Goldblatt D, Lindley KJ, Milla PJ. Colitis in chronic granulomatous disease. *Arch Dis Child*. 2001;84(2):147-51.
82. Feld JJ, Hussain N, Wright EC, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Ahlawat S, et al. Hepatic involvement and portal hypertension predict mortality in chronic granulomatous disease. *Gastroenterology*. 2008;134(7):1917-26.

83. Hussain N, Feld JJ, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Garcia-Eulate R, Ahlawat S, et al. Hepatic abnormalities in patients with chronic granulomatous disease. *Hepatology*. 2007;45(3):675-83.
84. Walther MM, Malech H, Berman A, Choyke P, Venzon DJ, Linehan WM, Gallin JI. The urological manifestations of chronic granulomatous disease. *J Urol*. 1992;147(5):1314-8.
85. Barese CN, Podestá M, Litvak E, Villa M, Rivas EM. Recurrent eosinophilic cystitis in a child with chronic granulomatous disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26(3):209-12.
86. Sillevs Smitt JH, Bos JD, Weening RS, Krieg SR. Discoid lupus erythematosus-like skin changes in patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Arch Dermatol*. 1990;126(12):1656-8.
87. Manzi S, Urbach AH, McCune AB, Altman HA, Kaplan SS, Medsger TA Jr, et al. Systemic lupus erythematosus in a boy with chronic granulomatous disease: case report and review of the literature. *Arthritis Rheum*. 1991;34(1):101-5.
88. Magnani A, Brosselin P, Beauté J, de Vergnes N, Mouy R, Debré M, et al. Inflammatory manifestations in a single-center cohort of patients with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(3):655-662.e8.
89. Akagi K, Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Arai K, Harayama S, et al. A case of macrophage activation syndrome developing in a patient with chronic granulomatous disease -associated colitis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014;36(3):e169-72.
90. Rösen-Wolff A, 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*. 2001;80(2):113-5.
91. Marciano BE, Zerbe CS, Falcone EL, Ding L, DeRavin SS, Daub J, et al. X-linked carriers of chronic granulomatous disease: Illness, lyonization, and stability. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):365-71.

92. Battersby AC, Braggins H, Pearce MS, Cale CM, Burns SO, Hackett S, et al. Inflammatory and autoimmune manifestations in X-linked carriers of chronic granulomatous disease in the United Kingdom. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(2):628-30.e6.
93. Battersby AC, Cale AM, Goldblatt D, Gennery AR. Clinical manifestations of disease in X-linked carriers of chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol.* 2013;33(8):1276-84.
94. Cale CM, Morton L, Goldblatt D. Cutaneous and other lupus-like symptoms in carriers of X-linked chronic granulomatous disease: incidence and autoimmune serology. *Clin Exp Immunol.* 2007;148(1):79-84.
95. Roos D, de Boer M. Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol.* 2014;175(2):139-49.
96. Elloumi HZ, Holland SM. Diagnostic assays for chronic granulomatous disease and other neutrophil disorders. *Methods Mol Biol.* 2014;1124:517-35.
97. Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous disease. *Adv Ther.* 2017;34(12):2543-57.
98. Margolis DM, Melnick DA, Alling DW, Gallin JI. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease. *J Infect Dis.* 1990;162(3):723-6.
99. Gallin JI, Alling DW, Malech HL, Wesley R, Koziol D, Marciano B, et al. Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 2003;348(24):2416-22
100. Segal BH, Barnhart LA, Anderson VL, Walsh TJ, Malech HL, Holland SM. Posaconazole as salvage therapy in patients with chronic granulomatous disease and invasive filamentous fungal infection. *Clin Infect Dis.* 2005;40(11):1684-8.
101. The International Chronic Granulomatous disease Cooperative Study Group. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 1991;324(8):509-16.

102. Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, et al. Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2004;39(5):692-9.
103. Leiding JW, Freeman AF, Marciano BE, Anderson VL, Uzel G, Malech HL, et al. Corticosteroid therapy for liver abscess in chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54(5):694-700.
104. Keller MD, Notarangelo LD, Malech HL. Future of care for patients with chronic granulomatous disease: Gene Therapy and Targeted Molecular Medicine. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2018;7(suppl_1):S40-S44.
105. Bennett N, Maglione PJ, Wright BL, Zerbe C. Infectious complications in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2018;7(suppl_1):S12-S17.
106. Godoy MC, Vos PM, Cooperberg PL, Lydell CP, Phillips P, Müller NL. Chest radiographic and CT manifestations of chronic granulomatous disease in adults. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;191(5):1570-5.
107. Khanna G, Kao SC, Kirby P, Sato Y. Imaging of chronic granulomatous disease in children. *Radiographics*. 2005;25(5):1183-95.
108. Fernandez-Boyanapalli R, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Dinauer MC, Riches DW, et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in chronic granulomatous disease is reversed by IFN- γ in a nitric oxide-dependent manner. *J Immunol*. 2010;185(7):4030-41.
109. Dunogué B, Pilmis B, Mahlaoui N, Elie C, Coignard-Biehler H, Amazzough K, et al. Chronic granulomatous disease in patients reaching adulthood: A nationwide study in France. *Clin Infect Dis*. 2017;64(6):767-75.
110. Henrickson SE, Jongco AM, Thomsen KF, Garabedian EK, Thomsen IP. Noninfectious manifestations and complications of chronic granulomatous disease. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2018;7(suppl_1):S18-S24.
111. Alimchandani M, Lai JP, Aung PP, Khangura S, Kamal N, Gallin JI, et al. Gastrointestinal histopathology in chronic granulomatous disease: a study of 87 patients. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(9):1365-72.

112. Uzel G, Orange JS, Poliak N, Marciano BE, Heller T, Holland SM. Complications of tumor necrosis factor- α blockade in chronic granulomatous disease-related colitis. *Clin Infect Dis*. 2010;51(12):1429-34.
113. Vinh DC, Freeman AF, Shea YR, Malech HL, Abinun M, Weinberg GA, et al. Mucormycosis in chronic granulomatous disease: association with iatrogenic immunosuppression. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(6):1411-3.
114. Seger RA. Hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30(2):195-208.
115. Towbin AJ, Chaves I. Chronic granulomatous disease. *Pediatr Radiol*. 2010;40(5):657-68.
116. Pao M, Wiggs EA, Anastacio MM, Hyun J, DeCarlo ES, Miller JT, et al. Cognitive function in patients with chronic granulomatous disease: a preliminary report. *Psychosomatics*. 2004;45(3):230-4.
117. Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, et al. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 2010;363(27):2600-10.
118. Gallin JI, Buescher ES, Seligmann BE, Nath J, Gaither T, Katz P. NIH conference. Recent advances in chronic granulomatous disease. *Ann Intern Med*. 1983;99(5):657-74.
119. Weening RS, Kabel P, Pijman P, Roos D. Continuous therapy with sulfamethoxazole-trimethoprim in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr*. 1983;103(1):127-30.
120. Ho JM, Juurlink DN. Considerations when prescribing trimethoprim-sulfamethoxazole. *CMAJ*. 2011;183(16):1851-8.
121. Newburger PE, Ezekowitz RA. Cellular and molecular effects of recombinant interferon gamma in chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1988;2(2):267-76.
122. Ezekowitz RA, Orkin SH, Newburger PE. Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-chronic granulomatous

- disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease . J Clin Invest. 1987;80(4):1009-16.
123. 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. 1988;85(13):4874-8.
 124. Jackson SH, Miller GF, Segal BH, Mardiney M 3rd, Domachowske JB, Gallin JI, Holland SM. IFN-gamma is effective in reducing infections in the mouse model of chronic granulomatous disease (CGD). J Interferon Cytokine Res. 2001;21(8):567-73.
 125. Naderi beni F, Fattahi F, Mirshafiey A, Ansari M, Mohsenzadegan M, Movahedi M, et al. Increased production of nitric oxide by neutrophils from patients with chronic granulomatous disease on interferon-gamma treatment. Int Immunopharmacol. 2012;12(4):689-93.
 126. Greenlee-Wacker MC, Nauseef WM. IFN- γ targets macrophage-mediated immune responses toward *Staphylococcus aureus*. J Leukoc Biol. 2017;101(3):751-758.
 127. Connelly JA, Marsh R, Parikh S, Talano JA. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Chronic Granulomatous disease: Controversies and State of the Art. J Pediatric Infect Dis Soc. 2018;7(suppl_1):S31-S39.
 128. Keller MD, Notarangelo LD, Malech HL Future of Care for Patients With Chronic Granulomatous disease: Gene Therapy and Targeted Molecular Medicine. J Pediatric Infect Dis Soc. 2018;7(suppl_1):S40-S44.
 129. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Bustamante J, Kannengiesser C, de Boer M, et al. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). Blood Cells Mol Dis. 2010;44(4):291-9.
 130. Köker MY, van Leeuwen K, de Boer M, Celmeli F, Metin A, Ozgür TT, et al. Six different CYBA mutations including three novel mutations in ten families from Turkey, resulting in autosomal recessive chronic granulomatous disease. Eur J Clin Invest. 2009;39(4):311-9.

131. El Hawary R, Meshaal S, Deswarte C, Galal N, Abdelkawy M, Alkady R, et al. Role of flow cytometry in the diagnosis of chronic granulomatous disease: the Egyptian experience. *J Clin Immunol.* 2016;36(6):610-8.



VII. EKLER

Ek-1A: BİLGİLENDİRME FORMU

Sayın

“Kronik granülatöz hastalıkta akan hücre ölçerde belirlenen NADPH oksidaz enzim aktivitesinin ve alt ünitelerinin genotipi öngörmede rolü ” isimli çalışmanın amacı bu hastalıkta protein alt tiplerininakan hücre ölçerde araştırılması ve klinik bulgular ile ilişkisinin saptanmasına yöneliktir. Çalışma kapsamında tıbbi kayıtlarınızdan bağışıklığınızla ilgili bilgiler alınacaktır. Ayrıca damardan 4 ml kan alınarak bu hastalıkla ilişkili eksik olan proteinleriniz belirlenecektir. Kan alınma esnasında geçici olarak acı hissetmeniz, küçük çapta enfeksiyon ve cilt altı kanama ve morluk görülebilir. Bu araştırmada yer almanız için bir defa gelmeniz yeterli olup 25 hastanın değerlendirilmesi 6 ay içinde tamamlanacaktır.

Ayrıca bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0 216 625 45 45 numaralı telefonda doktorunuz Ast. Dr. Hatice Ezgi Barış ve Doç. Dr. Elif Karakoç-Aydiner’e başvurabilirsiniz. Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz halinde olağan tıbbi bakım, tedavi ve hizmetleri almaya devam edeceksiniz.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz. Bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Ayrıca araştırmacını gerekli gördüğü hallerde çalışmadan çıkarılmanın mümkündür. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır, çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir. Alınan kan örneği sadece bu çalışma kapsamında kullanılacaktır. Gelecek alışmalar için saklanmayacaktır. Ayrıca araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.



Ek-1B: GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin adı-soyadı, imzası, adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının adı-soyadı, imzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin adı-soyadı, imzası, görevi

Ek-2: ETİK KURUL ONAYI



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2017.230
	PROJE ADI	Kronik granülatöz hastalıkta akan hücre ölçerinde belirlenen NADPH oksidaz enzim aktivitesinin ve alt unitelerinin genotipi öngörmede rolü
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Doç. Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER

KARAR BİLGİLERİ	Tarih	03.03.2017
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımlar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.	

ÜYELER						
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Özyineleyen Proje ile ilişkisi		Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİREKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof. Dr. Şefik GÖRKEY	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Atilla KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> EVET <input type="checkbox"/> HAYIR	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof. Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	<i>[Signature]</i>
Doc. Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	Araştırmacı (Projenin tartışılmasına katılmamıştır.)
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç.Dr. Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	<i>[Signature]</i>
Gözde Aynur MIRZA	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var	Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	<i>[Signature]</i>

Ek-3: HASTA TAKİP FORMU

Ad Soyad

Doğum tarihi

Cinsiyet

Akrabalık

Semptom başlama yaşı

Semptomlar

Tanı tarihi

Almakta olduğu tedaviler

Soyağacı

NBT

DHR ve SI

Akan hücre ölçer ile protein ifadesi

Aile bireylerinden değerlendirilenler protein ifadesi