

Kronik Granülomatöz Hastalarında ve Bu Hastalığı Genetik Olarak Taşıyan Bireylerde Lenfosit Fonksiyonları

Lymphocyte Functions in Patients with Chronic Granulomatous Disease and Carrier Individuals

İsmail ÖĞÜLÜR^{ID}, Ezgi BARIŞ^{ID}, Ayça KIYKIM^{ID}, Dilek BAŞER^{ID}, Gamze AKGÜN^{ID}, Ahmet ÖZEN^{ID}, Safa BARIŞ^{ID}, Elif KARAKOÇ-AYDINER^{ID}

Öz

Giriş: Kronik granülomatöz hastalık (KGH), fagositer sistem hastalığı olarak bilinmektedir. Ancak bu hastaların takip sürecinde otoimmünite, veya otoimmün koliti düşündürülen bulguların gözlenmesi, edinsel immün sistemin de etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada KGH'li olgularda ve taşıyıcılarında, T ve B lenfosit yüzdelerinin ve T lenfosit fonksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya polikliniğimizde takip edilmekte olan 11 KGH (üçü X'e bağlı, sekizi otozomal çekinik) hastası ve altı otozomal çekinik KGH hastasının bu hastalığı genetik olarak taşıyan anneleri alındı. Sağlıklı kontroller ile karşılaştırılarak, KGH'li olgular ve taşıyıcılarda lenfositler ve alt tiplerinin yüzdeleri, lenfosit proliferasyonu, düzenleyici T hücre (Treg) yüzdesi, hücre içi sitokin miktarları saptandı.

Bulgular: Taşıyıcı anneler yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında T hücre, B hücre ve NK hücre ve T ve B hücre alt tip yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Hastalarda ise sadece uyarılmamış (naif) B hücre yüzdesinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı yüksek olduğu görüldü ($p<0,001$). Hastalarda ve taşıyıcı annelerde yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında lenfosit proliferasyonu, Treg hücre oranları, hücre içi IL-17 açısından anlamlı fark saptanmazken, tersine IFN- γ düzeylerinin hem hastalarda ($p=0,030$) hem de taşıyıcılarda ($p=0,038$) anlamlı derecede artmış olduğu gösterildi.

Sonuç: Çalışmamızda KGH'li olanlarda naif olgun B hücrelerinin arttığı belirlenmiştir. Öte yandan, hastalar ve taşıyıcılarda saptanan IFN- γ yüksekliğine neden olan mekanizmaların aydınlatılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca taşıyıcı bireylerde Treg ve IL-21 yüzdesinin sağlıklılara benzer olması bunun otoimmüniteden koruyucu olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kronik granülomatöz hastalık, lenfosit, proliferasyon, Treg, hücre içi sitokinler

Abstract

Introduction: Chronic granulomatous disease (CGD) is classically known as phagocytic system disease. However, in recent years, the observation of the development of autoimmunity, colitis-like findings during follow-up has suggested that the acquired immune system may also be defective. The aim of this project is to investigate the percent of T and B lymphocytes, and function of T lymphocytes in patients with CGD and carriers.

Material and Methods: Eleven patients followed for CGD (3 X-CGD, 8 OR-CGD) in our clinic and 6 carrier mothers of OR-CGD were included into the study. The percentages of lymphocytes and their subtypes, lymphocyte proliferation, regulator T cell (Treg), intracellular cytokine content of patients with CDG and carriers were determined in comparison to healthy controls.

Results: There was no statistically significant difference in percentages of T cell, B cell and NK cell and subtypes of T and B cells in the mothers of patients compared to age matched healthy controls. The percentage of naïve B cells was significantly higher in the patients with CGD compared to those of healthy subjects ($p<0.001$). There were no significant differences in lymphocyte proliferation, Treg cell percentage, intracellularIL-17 levels, but IFN- γ levels were significantly increased in both patients with CDG ($p=0.030$) and carriers ($p=0.038$) when compared with age-matched healthy controls.

Conclusion: Increased naïve B cells were found in CGD patients. High levels of IFN- γ in patients and carriers need to be further evaluated by further studies. In addition, the normal percentages of Treg and IL-21 in the carriers as in healthy subjects may be offered as the protective mechanism for autoimmunity.

Key words: Chronic granulomatous disease, lymphocyte, proliferation, Treg, intracellular cytokines

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Bilim
Dalı, İstanbul, Türkiye

Correspondence:

Elif AYDINER,
T.C. Sağlık Bakanlığı, Marmara
Üniversitesi Eğitim ve Araştırma
Hastanesi, Pediatrik Allerji ve
İmmünoloji Bilim Dalı, Fevzi Çakmak
Mah. Muhsin Yazıcıoğlu Cad. No: 10,
34890, İstanbul, Türkiye
Tel: 0216 657 24 24 – 4736
E-posta: elif_karakoc@hotmail.com

Received: Apr 05, 2019

Accepted: Aug 01, 2019

<https://doi.org/10.25002/tji.2019.1111>

©2019 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

Giriş

Kronik granüloematöz hastalık (KGH), etkilenen hastaların tekrarlayan bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara yatkınlığı ile seyreden fagositlerin kalıtsal bir bozukluğudur. Mikrobiyal uyarana yanıt olarak beklenen solunum patlaması oluşturulamaması ile karakterizedir.^[1] Kronik granüloematöz hastalıkta, genetik olarak beş farklı mutasyondan kaynaklanan protein kusuru tanımlanmıştır (gen/protein: *CYBA*/p22^{phox}, *NCF1*/p47^{phox}, *NCF2*/p67^{phox}, *NCF4*/p40^{phox}, *CYBB*/gp91).^[2] Kalıtım modeli *CYBB* mutasyonlarında X'e bağlı diğerlerinde otozomal çekiniktir. Bugüne kadar tanımlanan olgular içinde X'e bağlı geçiş sıklığı dünyada %60-70 olarak saptanmıştır. Ancak, akraba evliliğinin sık olduğu ülkelerde otozomal çekinik tiplerin görülme sıklığı daha yüksektir.^[3,4] Genel olarak X'e bağlı KGH, otozomal çekinik KGH'ye göre daha erken başlangıçlı olup daha ciddi enfeksiyonlarla seyreder.^[5,6]

Kronik granüloematöz hastalıklı olgularda hücre içi mikroorganizmaların öldürülememesi sonucu, özellikle katalaz pozitif *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp*, *Burkholderia cepaci*, *Aspergillus*, *Candida* ve *Nocardia* enfeksiyonlarına yatkınlık oluşmaktadır. Tekrarlayan enfeksiyonlar dışında çeşitli otoimmün hastalıklar, kolit, lenfadenopati ve granülomlar kliniğe eşlik eder. Otoimmünite %10 olguda tanımlanmıştır. Bunlar arasında sistemik lupus eritematozus, antifosfolipid sendromu, otoimmün trombositopeni, perkardiyal efüzyon, romatoid artrit, IgA nefropati, sarkoidozis ve çölyak hastalığı görülebilmektedir.^[7] Tanımlanan otoimmün hastalıklarla KGH arasındaki ilişki hâlâ tam olarak anlaşılamamış ancak birkaç mekanizma ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bu olgularda artmış enflamasyon nötrofillerin geç apoptozisine bağlanmış ve bu hastalarda anti-inflamatuvar sitokinlerin daha az salgılandığı gösterilmiştir.^[8] Diğer taraftan hayvan modellerinde KGH'li farelerde T lenfositlerin Th1 yönüne kaydığı ve laboratuvar ortamında aspergillus mantarıyla maruziyeti sonucu IL-17 gibi enflamatuvar sitokinlerin arttığı saptanmıştır.^[9] Ayrıca Kraaij ve ark.^[10] düzenleyici T hücre (Treg) yanıtının oluşumunda NADPH oksidaz aktivitesi ile üretilen reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) rolü olduğunu göstermiştir.

X'e bağlı KGH taşıyıcılarında; akne, artrit, fotosensitivite ve lupus benzeri otoimmünite bulguları rapor edilmiş ve semptomların oluşum mekanizması, sağlıklı nötrofil varlığının yanında, defektif (NADPH oksidaz aktivitesi

olmayan) nötrofil varlığına bağlanmıştır.^[11] Ancak, taşıyıcılarda görülen bulguları sadece nötrofil bozukluğuyla açıklamak mümkün değildir. Literatüre bakıldığında, taşıyıcılarda yapılan fonksiyonel çalışmaların tümüne yakını X'e bağlı olan tiptedir. Dolayısıyla, otozomal çekinik kalıtım gösteren taşıyıcı annelerde bu verilerin çalışılması önem kazanmaktadır.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızın amacı KGH'larda ve otozomal çekinik kalıtım gösteren taşıyıcı annelerde lenfosit alt tiplerindeki değişiklikleri ve T lenfosit fonksiyonlarını yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırmalı olarak belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi İnsan Etik Kurulu'nun 03.04.2015 tarih ve 09.20140347 protokol kodlu raporu ile onaylandı. Kronik granüloematöz hastalık tanısı almış hastaların ebeveynlerinden ve taşıyıcı annelerinden katılmayı kabul edenlere bilgilendirilmiş onam formu imzalatıldı ve onam vermiş kişiler çalışmaya dâhil edildi. Bu hastalığın tedavisinde kullanılabilen subkutan IFN- γ , uzun süreli steroid veya kök hücre nakli uygulanmış hastalar çalışmaya alınmadı. Hasta ve annelerden klinik durumunun iyi olduğu ve herhangi bir enfeksiyonun bulunmadığı dönemde kan alınarak tüm çalışmalar Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Olgular

Bu çalışmaya Marmara Üniversitesi Çocuk Allerji-İmmünoloji kliniğimizde takip edilmekte olan 11 KGH'li olgu (3/8 K/E, sekiz olgu otozomal çekinik, üç olgu X'e bağlı kalıtım gösteren ve ortalama yaş: 13,4 \pm 6,7) ve altı otozomal çekinik taşıyıcı anne (ortalama yaş: 33,7 \pm 4,7) alındı. Annelerde otoimmün hastalıklar için yapılan klinik sorgulama (endokrin, gastrointestinal ve romatolojik açıdan) ve gereğinde otoantikör testlerde pozitiflik saptanmadı. Hastalar daha önceden sonuçlanmış DHR değerleri normatif veri ile karşılaştırılarak^[12] ve genetik mutasyonlarına göre X'e bağlı veya otozomal çekinik kalıtım özelliğine göre sınıflandırıldı.

Lenfosit immünofenotiplendirilmesi

EDTA'lı tüpe alınan 2 mL kan örnekleri her tüpe 100 μ L olacak şekilde bölünerek florokrom-konjuge monoklonal

antikorlarla karıştırıldı. Bu monoklonal antikorlar şunlardır: CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), CD8-PE (phycoerythrin), CD3-PerCP (peridinin chlorophyll protein)/, CD4-PE, CD8-APC (allophycyanin), TCR alpha/beta-FITC, TCR gamma-delta-PE, CD45RA-FITC, CD45RO-PE, CD4-APC, CD14-PerCP, CD31-PE, CD27-APC, CD45RA-PE, CD8-PerCP, CD3-FITC, HLA-DR-PE, CD16+56-PE, CD19-PE, IgM-FITC, IgD-PE, CD21-PE, CD31-PE, CD19-PerCP, CD20-APC, CD38-APC. Tüm antikorlar Becton Dickinson (BD, ABD) firmasından elde edildi. Sonrasında tüpler 15 dakika süreyle karanlıkta inkübe edildi. Takibinde üzerlerine 2 mL lizat solüsyonu (BD FACS Lysing Solution, ABD, katalog: 349202) eklendi ve tekrar 10 dakika süreyle karanlıkta inkübe edildi. Ardından beş dakika 1500 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Hücreler yıkama solüsyonu (BD, ABD, katalog: 349524) içerisinde iki kez yıkandı. Yıkama sonrası hücreler üzerine 500 µL yıkama solüsyonu eklenerek akan hücre ölçer cihazında okuma ve analiz işlemleri gerçekleştirildi.

Olgularda ve aile bireylerinde lenfosit immün fenotiplendirilmesi 4-renkli FACS Calibur (Becton Dickinson, ABD) akan hücre ölçer cihazı kullanılarak yapıldı. Analizlerin yapılması ve kadran istatistiklerinin (ortalama değer, standart sapma ve yüzde değerler) belirlenmesi BD FACS CellQuest Pro yazılımı ile gerçekleştirildi.

Periferik mononükleer kan hücreleri (PMKH) izolasyonu

Hastalardan, taşıyıcı annelerden ve sağlıklı kontrollerden 10 cc heparinli tüpe kan alındı. 50 mL'lik falkon tüpe boşaltılan kan, 1:1 oranında PBS ile sulandırıldı. Üç adet 15 mL'lik falkon tüpünün her birine 3 mL fikol konarak, sulandırılmış kan yavaşça fikol üzerine yayıldı. 2000 rpm'de 20 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, periferik mononükleer hücrelerin toplandığı interfaz kısmı pastör pipeti ile toplanarak, ayrı bir falkon tüpe aktarıldı. 5 mL PBS eklenerek, 1500 rpm'de 10 dak santrifüj edildi (yıkama işlemi iki kez tekrarlandı). Süpernatant döküldükten sonra, hücreler 1 mL komple RPMI besiyeri (RPMI 1640 besiyeri, %10 fetal inek serumu, %1 glutamin ve %1 antibiyotik) içerisinde çözüldü. Bir mililitredeki canlı lenfosit sayısı tayini için lenfosit süspansiyonunun 10 µL alınarak 10 µL Tripan mavisi ile karıştırıldı ve karışım 4–5 dakika bekletildikten sonra boyayı içine almamış ve şişmemiş lenfositler canlı olarak nitelendirilerek Thoma lamında 16 büyük kare $\times 40$ 'lık büyütme altında sayıldı.

Çıkan sayı 2×10^4 ile çarpılarak 1 mL'deki PMKH sayısı belirlendi.

Lenfosit proliferasyon tayini

Lenfosit proliferasyon tayini için, elde edilen PMKH hücreleri kullanıldı ve bu hücreler karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) (Invitrogen, ABD, katalog: C34554) ile işaretlendi. CFSE ile işaretleme için 2×10^6 hücre 1 mL RPMI 1640 besiyeri içerisinde sulandırılarak, 1 uL (5uM/L) CFSE eklendi ve pipetleme yapılarak karıştırıldı. Daha sonra süspansiyon $+4^\circ$ 'de 12 dak bekletildi. Üç mililitre PBS ile 800 g'de 3 dak'lık iki defa yıkama yapıldı. Süpernatant döküldü ve hücreler 1 mL komple RPMI kültür besiyeri içerisinde çözüldü. CFSE ile işaretlenen PMKH hücreleri ikiye bölündü ve 72 saat PMA (10ug/mL)+ ionomisin (I, 1 ug/mL) uyarımı ile 37°C , %5 CO_2 inkübatörüne koyuldu. Negatif kontrol olarak hücreler uyarımsız bir şekilde kültüre edildi. Kültür sonrası hücreler iki kez 2 mL yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bu işlemden sonra 500 uL yıkama solüsyonunda çözülerek, akan hücre ölçer cihazında proliferasyon FL1 filtresi kullanılarak belirlendi. Deneyler farklı günlerde yapıldığı için, elde edilen yüzde oranları o günkü sağlıklı kontrol değerlerine göre düzeltilti.

Hücre içi boyama yöntemi ile sitokin tayini

Hasta, anne ve kontrollerden heparinli tüplere 2 mL kan alındı ve bekletilmeden periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) izole edildi. 1 mL komple RPMI besiyeri (RPMI+BSA+L-glutamin+antibiyotik) içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde US ve PMA (50 ug/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) + ionomycin (1 ug/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) +brefeldin A (1 ug/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) uyarımı ile birlikte 37°C %5 CO_2 etüv içerisinde beş saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler 1 mL PBS solüsyonu içerisinde iki kez yıkandı ve hücreler üzerine 10 µL CD4-FITC (BD Biosciences, San Diego, ABD) antikoru eklendi ve oda sıcaklığında 15 dak inkübe edildi. 2 kez PBS ile yıkama sonrasında, hücreler 250 µL fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonu (BD Biosciences, San Diego, ABD) içerisinde 4°C 'de 20 dakika inkübe edildi. Hücrelerin iki kez perm/yıkama solüsyonu (BD Biosciences, San Diego, ABD) ile yıkanması sonrası, 100 µL perm/yıkama solüsyonu içerisinde beşer µL IL4-PE, IL10-PE ve IL17A-PE antikorları (eBioscience, CA, ABD) eklendi ve 4°C 'de 30 dakika bekletildi. Hücreler perm/yıkama solüsyonu ile iki kez yıkandı ve akan hücre ölçer cihazında analiz edildi.

Treg hücrelerin yüzdesinin belirlenmesi

Treg hücrelerin yüzdeleri İnsan Foxp3 Boyama Kiti kullanılarak gerçekleştirildi (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Lenfosit hücreleri (1×10^6 hücre) 100 uL %5 BSA içeren PBS içerisinde sulandırıldı ve üzerine 10'ar uL CD4 ve CD25 eklendi. Tüpler vorteks yardımıyla karıştırıldı ve 20 dak oda ısında inkübe edildi. İki mililitre %5 BSA içeren PBS ile yıkama yapıldı ve hücreler 250 g'de 10 dak santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve hücreler üzerine 2 mL FoxP3 A tamponu eklendi, kısaca vortex yapıldı ve 10 dak oda ısısında karanlıkta bekletildi. Beş yüz g'de 5 dak santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Yüzde 5 BSA içeren PBS ile yıkama yapıldı. Hücreler üzerine 2 mL FoxP3 C tamponu eklendi, 30 dak karanlıkta inkübe edildi ve iki kez yıkama yapıldı; 10 uL FoxP3 antikoru eklendi, yavaşça vorteks yapıldı ve 30 dak oda ısısında bekletildi. Yıkama yapıldı ve akım sitometri cihazında okuma gerçekleştirildi. Deneyler farklı günlerde yapıldığı için, elde edilen yüzde oranları o günkü sağlıklı kontrol değerlerine göre düzeltilti.

İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki farklılık GraphPad Prism 5 programı (GraphPad Software, Inc., CA, USA) kullanılarak analiz edildi. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student t testi kullanıldı. P-değeri 0,05'den küçük ise anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Değerlendirmede genel lenfosit alt tipleri ($CD3^+$ T hücreler, $CD19^+$ B hücreler, $CD16^+56^+$ NK hücreler), B-hücre alt tipleri ($CD19^+CD27^+IgD^+$ naif B hücreleri, $CD19^+CD27^+IgD^-$ sınıf dönüşümü yapmamış B hücreleri, $CD19^+CD27^+IgD^+$, $CD21^{low}38^{low}$ aktive B hücreleri, $CD19^+CD38^{++}IgM^{++}$ transiyonel B hücreler), $CD4^+$ T hücre alt tipleri ($CD4^+CD45RA^+$ naif $CD4^+$ T hücreler, $CD4^+CD45RO^+$ hafıza $CD4^+$ T hücreler), $CD8^+$ T hücre alt tipleri ($CD8^+CD45RA^+$ naif T hücreler, $CD8^+CD45RO^+$ hafıza T hücreleri), $CD3^+TCR\alpha/\beta^+$ ve $CD3^+TCR\gamma/\delta^+$ T hücreleri ve $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ recent thymic emigrant (RTE) hücrelerin yüzdeleri akan hücre ölçer cihazı ile belirlendi. Kronik granümatöz hastalarında X'e bağlı ya da otozomal çekinik kalıtım tiplerinde $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin sayılarında anlamlı fark olmadığı bilindiği için^[11], lenfosit alt grup

tayini için çalışmaya katılan tüm hastaların sonuçları birlikte değerlendirildi.

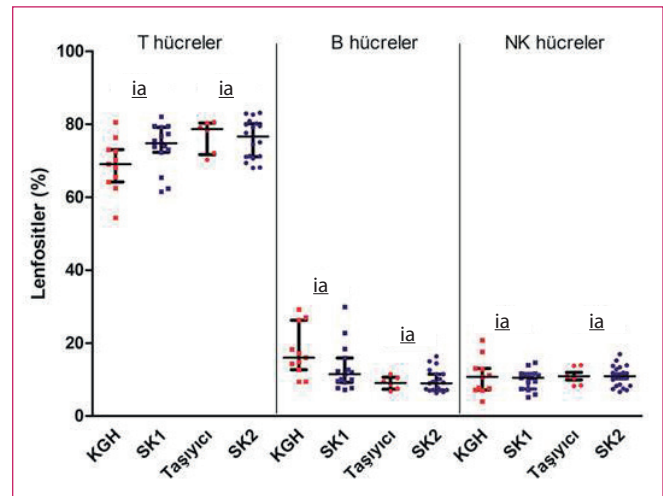
Hastalar ve taşıyıcı annelerde lenfosit yüzdeleri

Lenfosit alt grupları yüzdelere bakıldığında KGH'larda ve taşıyıcı annelerde yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında T hücresi, B hücresi ve NK hücresi yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 1).

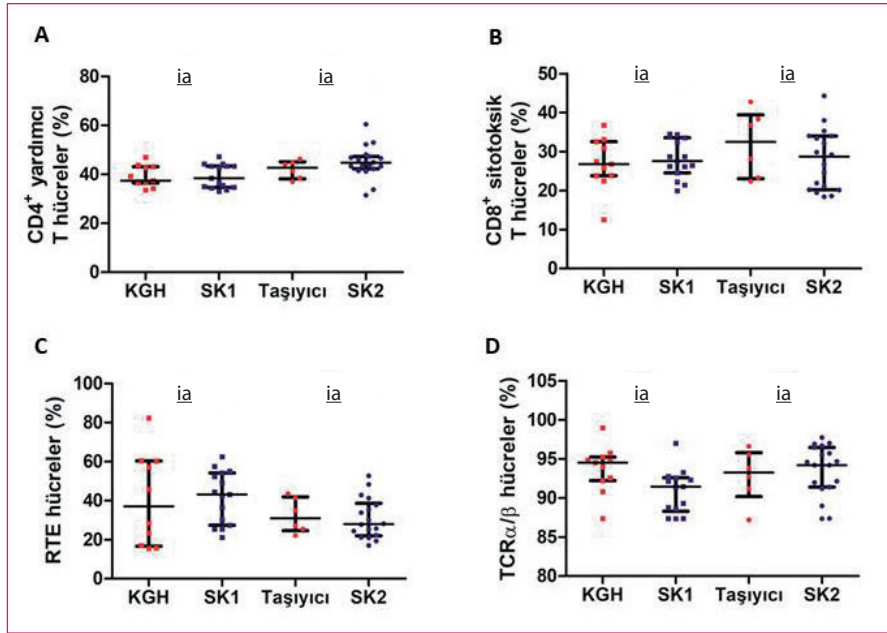
Hastalar ve taşıyıcı annelerde T hücre alt grup yüzdeleri

T hücre alt grup yüzdelere bakıldığında KGH'larda ve taşıyıcı annelerde yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında $CD4^+$ yardımcı T hücresi (Şekil 2A) ve $CD8^+$ sitotoksik T hücresi (Şekil 2B) yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Yine timusta lenfosit üretiminin göstergesi olan RTE hücreler (Şekil 2C) ve $TCR\alpha/\beta$ hücre (Şekil 2D) yüzdelere bakıldığında ve yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

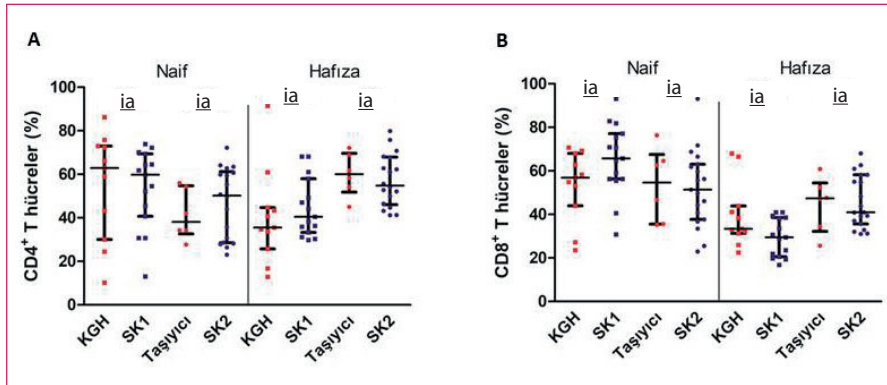
Ayrıca, hastalar, taşıyıcı anneler ve yaş uyumlu sağlıklı kontroller arasında $CD4^+CD45RA^+$ naif ve $CD4^+CD45RA^+$ hafıza T hücreleri (Şekil 3A) ve $CD8^+CD45RA^+$ naif ve $CD8^+CD45RA^+$ hafıza T hücreleri (Şekil 3B) yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 1. KGH hastalarında ve taşıyıcı annelerde lenfosit yüzdeleri (KGH, kronik granümatöz hastalık; SK1, KGH hastaları ile yaş uyumlu sağlıklı kontroller; SK2, taşıyıcı anneler ile yaş uyumlu sağlıklı kontroller; ia, istatistiksel olarak anlamsız)



Şekil 2. KGH hastalarında ve taşıyıcı annelerde CD4⁺ yardımcı T (A), CD8⁺ sitotoksik T (B), RTE (C) ve TCRα/β (D) hücre yüzdeleri (RTE, recent tymic emigrant; KGH, kronik granülomatöz hastalık; SK1, KGH hastaları ile yaş uyumlu sağlıklı kontroller; SK2, taşıyıcı anneler ile yaş uyumlu sağlıklı kontroller; ia, istatistiksel olarak anlamsız)



Şekil 3. KGH hastalarında ve taşıyıcı annelerde CD4⁺CD45RA⁺ naif ve hafıza T hücreleri (A) ve CD8⁺CD45RA⁺ naif ve hafıza T hücreleri (B) yüzdeleri (KGH, kronik granülomatöz hastalık; SK1, KGH hastaları ile yaş uyumlu sağlıklı kontroller; SK2, taşıyıcı anneler ile yaş uyumlu sağlıklı kontroller; ia, istatistiksel olarak anlamsız)

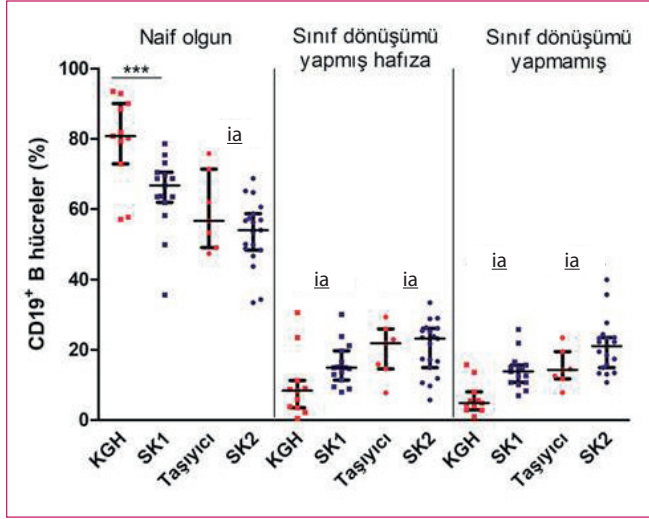
Hastalar ve taşıyıcı annelerde B hücre alt grup yüzdeleri

B hücresi alt grupları açısından, yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında hastaların naif olgun B hücrelerinin istatistiksel olarak yüksek sayıda olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$). KGH hastalarında sağlıklı kontrollere göre hafıza B hücreleri sayısında azalma eğilimi belirlendi, fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Şekil 4). Taşıyıcı annelerde ise yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında B hücresi alt

tiplerinin hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 4).

Hastalar ve taşıyıcı annelerde lenfosit proliferasyonu

Hastalar, taşıyıcı anneler ve sağlıklı kontroller arasında PMA ve ionomisin uyarımı sonrasında uyarılmış lenfosit proliferasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 5A).



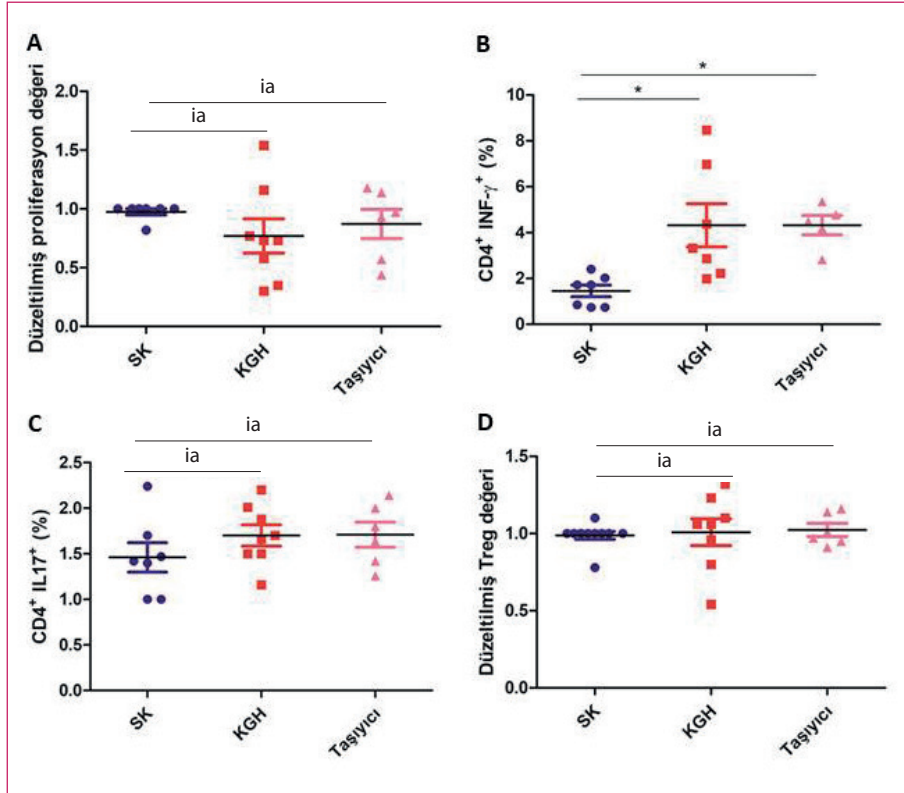
Şekil 4. KGH hastalarında ve taşıyıcı annelerde naif olgun B hücresi, sınıf dönüşümü yapmış hafıza B hücresi ve sınıf dönüşümü yapmamış B hücresi yüzdeleri (KGH, kronik granümatöz hastalık; SK1, KGH hastaları ile yaş uyumlu sağlıklı kontroller; SK2, taşıyıcı anneler ile yaş uyumlu sağlıklı kontroller; ***, $p < 0,001$; ia, istatistiksel olarak anlamsız)

Hastalar ve taşıyıcı annelerde IFN- γ ve IL-17 düzeyleri

Hastalarda (ortanca (min-maks): 3,32 (1,99–8,47) ve kontrol ortanca (min-maks): 1,72 (0,74–2,40); $p=0,030$) ve taşıyıcı annelerde (ortanca (min-maks): 4,49 (2,82–5,35) ve kontrol ortanca (min-maks): 1,72 (0,74–2,40); $p=0,038$) yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında IFN- γ düzeylerinin anlamlı derecede artmış olduğu bulundu (Şekil 5B). IL-17 düzeyi açısından ise hasta, taşıyıcı anne ve sağlıklı kontrollerde anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$) (Şekil 5C).

Hastalar ve taşıyıcı annelerde Treg hücre değeri

Hastalar, taşıyıcı anneler ve sağlıklı kontroller arasında uyarılmış $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg oranları açısından bir fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 5D).



Şekil 5. KGH hastaları, taşıyıcı anneler ve sağlıklı kontrollerde düzeltilmiş lenfosit proliferasyonu değerleri (A), $CD4^+$ T hücrelerinde salgılanan IFN- γ yüzdesi (B), $CD4^+$ T hücrelerinde salgılanan IL-17 yüzdesi (C), düzeltilmiş $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg hücre değeri (D) (SK, sağlıklı kontrol; * $p < 0,05$; ia, istatistiksel olarak anlamsız)

Tartışma

Çalışmamızda kronik granüloamatöz hastalarda ve taşıyıcı annelerde yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında T hücresi, B hücresi ve NK hücresi ve T ve B hücresi alt tip oranları benzer bulundu. KGH hastalarında sadece naif olgun B hücre yüzdesinin sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu gösterildi. Hastalarda ve taşıyıcı lenfosit proliferasyonu, Treg hücre oranları, hücre içi IL-17 açısından fark saptanmazken, IFN- γ düzeylerinin artmış olduğu gösterildi.

Heltzer ve ark. (2002) KGH hastalarının T hücresi sayılarında yaş uyumlu sağlıklı kontrollere göre azalma eğilimi olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, bu hastalarda üç yaşına kadar T hücrelerinin yüksek olduğunu, fakat üç yaşından itibaren sayılarının azalmaya başladığı rapor edilmiştir.^[13] Yakın zamanda yapılan bir araştırmada ise erişkin X'e bağlı kalıtımdaki KGH hastalarının T hücresi havuzlarında azalma olduğu ve bu hastaların tedavilerinde T hücrelerindeki değişikliklerin genellikle ihmal edildiği belirtilmiştir.^[14] Literatürdeki çalışmalara benzer olarak çalışmamızda T lenfosit yüzdesinin hastalarda bir miktar azaldığı, fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, yapılan detaylı immünofenotipleme ile her iki kalıtım tipinde T hücresi alt tiplerinde sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında yüzde olarak bir fark bulunmamıştır. Taşıyıcı annelerde, yine KGH hastalarına benzer olarak, T hücresi alt tiplerinin yaş uyumlu sağlıklı kontrollere benzer sayılara sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum, otozomal çekinik kalıtım tipi taşıyıcılarında T hücrelerin yaşla birlikte azalma göstermediğini, fakat hastalarda tedavi sürecinde bu hücre tiplerinin hep kontrol altında olması gerektiğini düşündürmüştür.

X'e bağlı KGH'larda, Cotugno ve ark. 2014 yılında yayımladıkları bir araştırmada, B hücresi proliferasyonunda kusur ve kızamık antikor yanıtının uzun dönemde korunamadığını göstermiştir. Ayrıca özgün antikor üretiminde görevli sınıf değişimi gerçekleşmiş B hücrelerinin sayısının düşük olduğu gözlenmiştir.^[15] Literatürde otozomal çekinik hastaların T hücresi proliferasyonları hakkında bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda otozomal çekinik KGH hastalarının T hücresi proliferasyonunda bir kusur bulunmamıştır. Ayrıca, benzer olarak bu kalıtım tipindeki taşıyıcılarda da T hücresi proliferasyonunun normal olduğu gösterilmiştir. Literatüre benzer olarak, hastalarımızda naif B hücresi yüzdelerinin yüksek olduğu belirlenmiş, fakat sınıf çevrimi gerçekleşmiş B hücresi yüzdelerinde ise anlamlılığa ulaşmayan azalma eğilimi olduğu saptanmıştır.

Sağlıklı bireylerde Treg hücreleri efektör T hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu baskılayabilir ve böylece immün yanıtları azaltır. Bu nedenle otoimmünite, hatalı Treg sisteminin sonucu olarak ortaya çıkabilir.^[16] ve otoimmün hastalıkların Treg ile başarılı bir şekilde tedavisi fare modellerinde bildirilmiştir.^[17,18] Düzenleyici T hücreleri ve IL-17 üreten hücreler ters etki göstermektedir. IL-17 G-CSE, GM-CSF, TNF- α ve enflamasyon bölgelerine nötrofil göçünü düzenleyen kemokinlerin üretimini uyarır. IL23/IL-17 ekseninin deneysel otoimmün bozukluklara aracılık ettiği belirlenmiştir.^[19] X'e bağlı KGH taşıyıcılarının az bir kısmında artmış otoimmünite görülebilmektedir. Bu bireylerde tekrarlayan oral aftlar, fotosensitivite, diskoid lupus, artrit ve artralji, egzema, lupus benzeri malar döküntü, sistemik lupus eritematozis ve koryoretinit gözlenebilir.^[20-23] 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.^[23] Enfeksiyonlara eğilim ve artmış otoimmünite yalnızca X'e bağlı KGH taşıyıcılarında saptanmış olup, otozomal çekinik geçişli KGH'ı taşıyıcı bireylerinde böyle bir ilişki görülmemektedir.^[4] Yakın zamanda grubumuzun yaptığı bir çalışmada otozomal çekinik taşıyıcı annelerde yapılan sistematik klinik ve laboratuvar taramada otoimmünite bulgularına rastlanmamış olması literatürü destekler niteliktedir.^[24] Çalışmamızda otozomal çekinik KGH'lı hasta ve taşıyıcılarının IL-17 düzeylerinin ve Treg yüzdelerinin normal olduğu bulunmuştur. Bu durum özellikle otozomal çekinik KGH taşıyıcılarında otoimmünite gözlenmemesi nedenini açıklayabilecek durumlardan bir tanesidir.

Sistemik otoimmünitenin gelişimi ve şiddetinde, özellikle sistemik lupus eritematozusta, interferon- γ önemli bir rol oynamaktadır. Bu durum yapılmış hayvan modeli çalışmalarında da gösterilmiştir.^[25] Çalışmamızda KGH hastaları ve otozomal çekinik KGH taşıyıcı annelerde hücresel düzeyde artan IFN- γ yanıtları belirlenmiştir. Bu da taşıyıcılarda klinik olarak saptanabilen otoimmünite olmasa dahi, bunların otoimmünite riski ile karşı karşıya kalabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bu grup hasta ve taşıyıcılardaki IFN- γ değeri yüksekliğinin geniş serilerde yapılmış çalışmalarla doğrulanmaya ihtiyacı vardır. Ayrıca taşıyıcıların uzun dönemde klinik olarak otoimmünite bulguları açısından yakın takip edilmesi gerekliliği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda KGH hastaları ve otozomal çekinik KGH'ı taşıyıcı anneleri yaş uyumlu sağlıklı kontroller ile karşılaştırmalı olarak T ve B lenfositlerinin ve alt tiplerinin dağılımları belirlenmiş, sadece hastalarda naif B hücresi yüzdesinin anlamlı olarak artmış olduğu gözlenmiştir. Taşıyıcıların Treg yüzdelinde ve IL-17 düzeylerinde farklılık saptanmaması bu bulguların otozomal geçişli KGH hastalarının taşıyıcı annelerinde otoimmünite gözlenmemesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, *in vitro* IFN- γ değeri yüksek olan fakat klinik olarak otoimmünite gözlenmeyen hasta ve taşıyıcıların, otoimmünite bulgularının ortaya çıkma ihtimaline karşı takip edilmesi gerekmektedir.

Etik Kurul Onayı: Marmara Üniversitesi İnsan Etik Kurulu 03.04.2015 tarihi ve 09.20140347 protokol kodlu raporu ile onaylandı.

Hasta Onamı: Katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız

Yazar Katkıları: Fikir: İÖ, AÖ, SB, EKA; Tasarım: İÖ, AÖ, SB, EKA; Veri Toplanması veya İşlenmesi: İÖ, EB, AK, DB, GA; Analiz-Yorum: İÖ, EKA; Literatür Taraması: İÖ; Yazıyı Yazan: İÖ, EKA; Eleştirel İnceleme: AÖ, SB.

Çıkar çatışması: Bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Teşekkür: Bu çalışma SAG-A-110915-0410 numara ile Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPKO) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Segal BH, Leto TL, Gallin JL, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine* 2000;79:170–200. [CrossRef]
- O'Neill S, Braut J, Stasia MJ, Knaus UG. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol* 2015;6:135–56. [CrossRef]
- 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;132:1156–63.e5. [CrossRef]
- Barış S, Özen AO, Kiyıkım A, Onat EG, Karakoç Aydın E, Barlan I. The evaluation of our patients with chronic granulomatous disease. *Asthma Allergy Immunol* 2014;12:26–34. Erişim: <http://aai.org.tr/index.php/aai/article/viewFile/135/79>
- Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine* 2000;79:155–69. [CrossRef]
- van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One* 2009;4:e5234. [CrossRef]
- De Ravin SS, Naumann N, Cowen EW, Friend J, Hilligoss D, Marquesen M, et al. Chronic granulomatous disease as a risk factor for autoimmune disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:1097–103. [CrossRef]
- 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;73:591–9. [CrossRef]
- Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol* 2004;5:818–27. [CrossRef]
- Kraaij MD, Savage ND, van der Kooij SW, Koekkoek K, Wang J, van den Berg JM, et al. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:17686–91. [CrossRef]
- 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;148:79–84. [CrossRef]
- Çiçekkökü D, Ögülür İ, Karakoç-Aydiner E, Barış S, Kiyıkım A, Özen A, Barlan I. Dihidrorhodamin testi ile oksidatif patlama: Sağlıklı kontrollerde referans değerleri. *Türk J Immunol* 2015;3:49–53. [CrossRef]
- Heltzer M, Jawad AF, Rae J, Curnutte JT, Sullivan KE. Diminished T cell numbers in patients with chronic granulomatous disease. *Clin Immunol* 2002;105:273–8. [CrossRef]
- Albuquerque AS, Fernandes SM, Tendeiro R, Cheynier R, Lucas M, Silva SL, et al. Major CD4 T-cell depletion and immune senescence in a patient with chronic granulomatous disease. *Front Immunol* 2017;8:543. [CrossRef]
- Cotugno N, Finocchi A, Cagigi A, Di Matteo G, Chiriaco M, Di Cesare S, et al. Defective B-cell proliferation and maintenance of long-term memory in patients with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:753–61.e2. [CrossRef]
- Adeegbe D, Matsutani T, Yang J, Altman NH, Malek TR. CD4+ CD25+ Foxp3+ T regulatory cells with limited TCR diversity in control of autoimmunity. *J Immunol* 2010;184:56–66. [CrossRef]
- Bluestone JA, Tang Q. Therapeutic vaccination using CD4+ CD25+ antigen specific regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:14622–6. [CrossRef]
- Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, et al. In vitro expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1455–65. [CrossRef]
- Kuijpers T, Lutter R. Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:7–15. [CrossRef]
- 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;141:365–71. [CrossRef]
- 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;140:628–30.e6. [CrossRef]
- Battersby AC, Cale AM, Goldblatt D, Gennery AR. Clinical manifestations of disease in X-linked carriers of chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol* 2013;33:1276–84. [CrossRef]

- 23.** 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;148:79–84. [[CrossRef](#)]
- 24.** Baris E, Kiykim A, Nain E, Akgun G, Ogulur I, Baser D, et al. Mothers of autosomal recessive chronic granulomatous disease patients do not Show autoimmune findings in contrast to X-linked patients. Poster numarası: ESID8-0582 18th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies; 2018, Ekim 24–27; Lizbon, Portekiz.
- 25.** Pollard KM, Cauvi DM, Toomey CB, Morris KV, Kono DH. Interferon-g and systemic autoimmunity. *Discov Med* 2013;16:123–31.