T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

LÖKOSİT ADEZYON DEFEKTİ TANISINDA GENETİK VE AKIM SİTOMETRİK TESTLERİN UYGULANMASI

Hazırlayan
Songül GÜNGÖR

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2022
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

LÖKOSİT ADEZYON DEFEKTİ TANISINDA GENETİK VE AKIM SİTOMETRİK TESTLERİN UYGULANMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Songül GÜNGÖR

Danışman
Prof.Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2020-10064 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2022
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmada tüm bilgilerin, akademik ve etik kurullara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Songül GÜNGÖR

İMZA

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

‘‘Lökosit Adezyon Defekti Tanısında Genetik Ve Akım Sitometrik Testlerin Uygulanması’’ adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tez Hazırlayan	**Danışman**
Songül GÜNGÖR	Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER
İmza	İmza

İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

İmza

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER danışmanlığında Songül GÜNGÖR tarafından hazırlanan ‘‘**Lökosit Adezyon Defekti Tanısında Genetik ve Akım Sitometrik Testlerin Uygulanması’**’ konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ İmza

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER.
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi ……
İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Prof. Dr. Ali ÜNAL
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi ……
İç Hastalıkları Anabilim DalıÖğretim Üyesi

Üye: Prof Dr.İnsu YILMAZ
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi ……
Göğüs Hastalıkları Anabilim DalıÖğretim Üyesi

Üye: Doç. Dr. Mustafa NİSARİ
Nuh Naci Yazgan Üniversitesi/ ……
Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Üye: Dr. Ögr. Üyesi Hüseyin AVCILAR
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi ……
İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ONAY

Bu tezin kabulü ERÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun …./…./….

Tarih ve …….. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

…../…../……

Prof.Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda bana her konuda yardımcı olan ve kolaylık sağlayan, öğrenim sürem boyunca desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER'e, deneyimlerinden yararlandığım ve birlikte İmmünoloji eğitimi aldığım tüm bölüm arkadaşlarıma, öğrenimim boyunca kişisel desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım Hemşire Yasemin KENDİR'e, bana her konuda destek olan ablam Betül KIYAK'a şevk veren babam H.Mehmet GÜNGÖR'e, kardeşlerim Onur GÜNGÖR ve Ali GÜNGÖR'e ve canım aileme gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Songül GÜNGÖR

Haziran 2022, Kayseri

LÖKOSİT ADEZYON DEFEKTİ TANISINDA GENETİK VE AKIM SİTOMETRİK TESTLERİN UYGULANMASI

Songül GÜNGÖR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
İmmünoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2022
Danışman: Prof.Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

ÖZET

Lökosit adezyon defekti, nötrofillerin enflamasyon bölgesine göçünde ve damar endotel yüzeyine yapışmasında rol alan adezyon moleküllerinin eksikliği ile karakterize otozomal resesif geçişli bir primer immün yetmezlik hastalığıdır. Adezyon moleküllerinden ITGB2 geni tarafından kodlanan β2 integrin (CD18) sentezinin olmaması veya fonksiyon kaybı lökosit adezyon defekti 1(LAD-1) olarak isimlendirilir. LAD-1 laboratuvar tanısında nötrofillerde CD18/CD11b ekspresyon kaybının akım sitometri ile gösterilmesi gereklidir.

Çalışmamız gerekli onamlar alındıktan sonra, ERÜ Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı İmmün Yetmezlik Araştırma Laboratuvarına, ülkemizdeki çeşitli merkezlerden gönderilen ve LAD-1 şüphesi bulunan (veya daha önce LAD-1 tanısı alan) 10 hasta ve 10 kontrol kan örneği ile yürütüldü. Örneklerde akım sitometri ile CD18 ve CD11b ölçümü yapılarak moleküler testler uygulandı.

Hastaların tamamında CD18 ve CD11b ekspresyon kaybı olduğu akım sitometri ile gösterildi. ITGB2 geni hedeflenerek yapılan moleküler çalışmalar sonucunda 10 hastada homozigot olarak 5 farklı mutasyonun yer aldığı ve ebevenylerde heterezigot taşıyıcılık olduğu gözlendi.

Nadir hastalıklar grubunda yer alan LAD-1 tanılaması yeterli alt yapı ve deneyimli personel bulunmaması nedeniyle sınırlı sayıda merkezde yapılabilir. Merkezimizde LAD-1 gibi nadir bir hastalıkta 10 hasta ile uygulamalı olarak fonksiyonel ve moleküler çalışma eşgüdüm içinde uygulandı ve diğer nadir hastalıkların tanısında da kullanılabilecek bir alt yapı oluşturulmuştur

Anahtar kelimeler: LAD-1, akım sitometri, nötrofil, dizi analizi.

DIAGNOSIS OF LEUKOCYTE ADHESION DEFICIENCY GENETIC AND FLOW CYTOMETRY TESTS

Songül GÜNGÖR

Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Immunology, Master of Science Thesis, June 2022
Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

ABSTRACT

Leukocyte adhesion deficiency is an autosomal recessive primary immunodeficiency disease characterised by the absence or malfunction of adhesion molecules involved in the migration of neutrophils to the inflammation site and their adhesion to the vascular endothelial surface. The adhesion molecules affected are integrin and selectin receptors. The absence and deficiency of β2 integrin (CD18) receptor synthesis from these molecules causes the disease called leukocyte adhesion defeciency 1 (LAD-1). For LAD-1 identification, loss of CD18/CD11b expression in neutrophils was determined by flow cytometry.

The study was conducted with 10 patients with suspected LAD-1 (or previously diagnosed with LAD) and 10 control blood samples sent from various centres in our country to the Immunodeficiency Research Laboratory of ERU Faculty of Medicine, Department of Immunology, after obtaining the necessary consents. In the samples, mutation screening was performed by measuring CD18 and CD11b by flow cytometry and DNA separation.

CD18 and CD11b expression loss was detected in all patients. As a result of molecular studies, it was observed that 5 different mutations were homozygous in 10 patients and heterozygous carriers were observed in the parents.

Since LAD-1 is in the rare diseases group, many centres cannot provide sufficient infrastructure for diagnostic studies. viort he first time in our centre, functional and molecular studies were applied for rare diseases such as LAD-1 in a coordinated manner in a wide range of patients.

Key words: LAD-1, flow cytometry, neutrophil, sequence analysis.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ii

KABUL VE ONAY iii

TEŞEKKÜR iv

ÖZET v

ABSTRACT vi

İÇİNDEKİLER vii

KISALTMALAR VE SİMGELER x

TABLOLAR LİSTESİ xii

ŞEKİLLER LİSTESİ xiii

1. GİRİŞ ve AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 2

2.1. Lökosit Adezyon Defekti 2

2.1.1. Lökosit Adezyon Defekti-1 4

2.1.2. Lökösit Adezyon Defekti II 7

2.1.3. Lökosit Adezyon Defekti III 8

2.2. Nötrofil 9

2.2.1. Nötrofil Kemotaksisi 10

2.2.3. İntegrinler 13

2.2.4. Kemokinler 15

2.2.5. Adezyon Kaskadı 18

2.3. Lökosit Adezyon Defektinde Tanı Testleri 19

2.3.1 Akım Sitometri Tanı Yöntemleri 20
2.3.2. Moleküler Tanı Yöntemleri 25
3. GEREÇ ve YÖNTEM 27
3.1. Gereçler 27
3.1.1. Demirbaş Malzemeler 27
3.1.2. Sarf Malzemeler 28
3.2. Kit ve Kimyasal Maddeler 28
3.2.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kit Ve Kimyasallar 28
3.2.2. PCR İşleminde Mix Hazırlamak İçin Kullanılan Kit Ve Kimyasallar 28
3.2.3. Jel Elektroforezi İşleminde Kullanılan Kimyasallar 29
3.2.4. Genetik Otoanalizör İçin Kullanılan Kit ve Kimyasallar 29
3.3. Yöntemler 29
3.3.1.Akım Sitometri ile ekspresyon analizi 29
3.3.2.DNA İzolasyonu 30
3.3.3.Sanger Analizi 31
3.3.3.1. PCR Protokolü 31
3.3.3.2.PCR Elektroferez İşlemi 32
3.3.3.3. PCR Ürününün Pürifikasyon Protololü 33
3.3.3.4. ExoSAP ile PCR Ürünü Saflaştırma Protokolü 33
3.3.3.5. Sekans Yükleme Solüsyonunun Hazırlanması 34
3.3.3.6. Sekans İşlemi için Cihazın Hazırlanması 35
3.3.3.7. Sonuçların Analizi ve Mutasyon Taranması 35
3.4. İstatistik 35
4.BULGULAR 36

4.1.Optimizasyonu Çalışmaları 36

4.2.Sağlıklı Kontrol Grubu 36

4.2.1. Sağlıklı Kontrol Grubunda Akım Sitometrik Analiz Sonuçları: ... 37

4.2.2. Sağlıklı Kontrol Grubunda Akım Sitometri Analiz Sonuçları ve Görüntüleri 38

4.3. LAD1 Hastalarının Akım Sitometrik Analiz Sonuçları 38

4.4.Hasta Grubunda Monoklonal Antikorların Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarının Görüntüleri 40

4.4. Hasta Grubunun Moleküler Analizler Verileri 42

5.TARTIŞMA VE SONUÇ 51

6.KAYNAKLAR 54

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR VE SİMGELER

Terimler

Marginasyon : Lökositlerin damar duvarına yaklaşması

Endotel aktivasyonu : Endotelde E-selektin ve P-selektin miktarının artması

Rolling : Lökositlerin gevşek tutunma ile birlikte yuvarlanmaya başlaması

Adezyon : Lökositlerin endotel yüzeyine bağlanması

Transmigrasyon : Lökositlerin endotel hücreleri arasına geçmesi

Kemotaksis : Lökositlerin enfeksiyonun olduğu dokuya göç etmesi

Kısaltmalar

LAD : Lökosit Adezyon Defekti

LAD 1 : Lökosit Adezyon Defekti tip 1

LAD 2 : Lökosit Adezyon Defekti tip 2

LAD 3 : Lökosit Adezyon Defekti tip 3

IL-1 : Interlökin-1

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

LPS : Lipopolisakkarit

SLEX : Sialil Lewis X

EGF : Epidermal Büyüme Faktör

PSGL-1 : P-selektin Glikoprotein Ligand 1

ESL-1 : E-selektin Ligand

GlyCAM-1 : Glikosilasyona Bağlı Hücre Adezyon Molekülü

MAdCAM-1 : Mukozal Hücre Adezyon Molekülü

NK : Natural Killer

VLA	: Very Late Antijen
LFA-1	: Lökosit Fonksiyon İlişkili Antijen
MAC-1	: Makrofaj Antijen 1
VCAM	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
ICAM	: Hücreler Arası Adezyon Molekülü
HEV	: High Endotelyal Venül
JAM	: Junctionel Adezyon Molekülü
PECAM	: Platelet Hücre Adezyon Molekülü
GPCR	: G-proteinine Bağlı Kemokin Reseptörleri
VWFA	: Von Willebrand Faktör tip A
GDP-fukoz	: Golgi Lokalize Guanozin Difosfat
SLC35C1	: Solute Taşıyıcı Aile 35 üye C1
ITGB2	: İntegrin Subunit Beta 2
FERMT3	: Fermitin Famıly Member 3

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.1. Lökosit Adezyon Defekti Tiplerine Göre Görülen Klinik ve Laboratuvar Özellikleri.....4

Tablo 2.1.1.1 ITGB2 (CD18) Gen Bilgileri 6

Tablo 2.2.2.1 Bazı Selektinler ve Eksprese Edildiği Bölgelerin Özellikleri 13

Tablo 2.2.3.1. Lökositlerce Kullanılan Bazı İntegrinler Ve Ligandları 14

Tablo 2.2.4.1 Adezyon Molekülleri, Liganları ve Fonksiyonları.....17

Tablo 3.1. PCR Master Miks karışım işlemleri.....31

Tablo 3.2. PCR işlemi ısı döngüleri ve süreleri.....32

Tablo 3.3. PCR mix ürünleri ve miktarları.....34

Tablo 4.1. Kontrol Grubu Verileri.....37

Tablo 4.2. Kontrol Grubunda Akım Sitometrik Analiz Sonuçları 37

Tablo 4.3. Hastaların verileri.....39

Tablo 4.4. Hasta grubunda Akım sitometrik analiz sonuçları. 39

Tablo 4.5. LAD1 ile tanıladığımız hastalarda tanımlanan ve doğrulanan mutasyon noktaları.....43

Tablo 4.6. Hasta ve kontrol grubuna ait nötrofil ve CD11(a, b, c), CD15, CD18 MFI değerlerının ortalamaları. 49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.1 Üç Farklı Vasküler Bölgede Lökosit Göçünün Gösterilmesi 3

Şekil 2.1.1.1. Vasküler Endotel Yüzeye Lökosit Adezyonu ve Bağlantı Ligandları..... 5

Şekil 2.1.1.2. ITGB2 Genindeki Mutasyonların Şematik Gösterimi. 6

Şekil 2.2.1.1. Nötrofil Kemotaksisinin Şekil Üzerinde Gösterimi, ... 10

Şekil 2.2.2.1 Selektin Domain Yapısı Yapısı 12

Şekil 2.2.4.1. Kemokin Reseptörleri Ve Ligant İlişki Diagramı, ... 16

Şekil 2.2.5.1: Lökosit Göçünün Adezyon Kaskadında Görünümü 19

Şekil 2.3.1.1. Akım Sitometri Cihazinin Çalışma Prensibi ve Bilgisayar Ortamına Aktarımının Şekil Üzeine gösterimi..... 21

Şekil 2.3.1.2. Nötrofil Adezyon parametreleri: CD45; CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD15 dir. 21

Şekil 2.3.1.3. LAD Tanısal Çalışmalarında Kullanılan Antikorların Akım Sitometri cihazında görüntüleri..... 24

Şekil 2.3.2.1. Sanger Dizi Analizi Sonuçlarının Mutasyonların Elektrofrogram ile Görüntülenmesi. 26

Şekil 4.1. Sağlıklı Kontrol-2 için Bakılan Hücre Yüzey Markerlarının Akım Sitometrik Ekspresyon Analizi. 38

Şekil 4.2. Hasta 1'e ait Akım Sitometri Analiz Sonuçları 40

Şekil 4.3. Hasta 2 ye ait Akım Sitometri Görüntüsü..... 40

Şekil 4.4. Hasta 4'e ait Akım sitometri Analiz Sonucu 41

Şekil 4.5. Hasta 5'e ait Akım Sitometrik Analiz Görüntüsü. 41

Şekil 4.6. Hasta 7, Akım sitometrik Analiz Sonuçları. 42

Şekil 4.7. Hasta 8'e ait Akım Sitometrik Analiz Sonuçları. 42

Şekil 4.8. ITGB2 Geninde Oluşan Mutasyonların Exonic Bölgelerdeki Yerleşimi. 43

Şekil 4.9. Hasta 3'e ait sekans analizi sonucunun elektroferogram görüntüsü..... 44

Şekil 4.10. Hasta 5'e ait sekans analizinin elektrogram görüntüsü 44

Şekil 4.11. Hasta ve Kontrol Grubunda Nötrofilsayılarının Karşılaştırması.....45

Şekil 4.12. Hasta ve Kontrol Grubunda CD11b MFI' lerinin Karşılaştırması 46

Şekil 4.13. Hasta ve Kontrol Grubunda CD15 MFI' lerinin Karşılaştırması 47

Şekil 4.14. Hasta ve Kontrol Grubunda CD18 MFI' lerinin Karşılatırması.....48

Şekil 4.15. CD18 Ekspresyon Düzeyinin Cinsiyet Değişkeni Bazında Karşılaştırması 49

Şekil 4.16. Hasta ve kontrol grubunun CD11b, CD15, CD18 spesifik monoklonal antikorlarının yüzey ekspresyonu ölçümünden elde edilen MFI değerlerinin ve nötrofil değerlerinin sütun grafiği kullanılarak gruplar arasında karşılaştırması. 50

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Lökosit Adezyon Defekti (LAD) nötrofillerin inflamasyonlu alana erişiminde gerekli olan ve adezyonu sağlayan moleküllerdeki doğumsal eksiklik sebebi ile oluşan, primer immün yetmezlik hastalığıdır. Nötrofiller enflamasyonlu bölgeye ulaşırken sırası ile; tutunma, yuvarlanma, aktivasyon, endotel hücresine adezyonu ve migrasyon ile sonuçlanır. Bu aşamalardan herhangi birinin eksikliği yetersiz inflamatuar yanıt oluşmasına neden olur. Herhangi bir adımda aksama ile ortaya çıkan bu hastalıkta yara iyileşmesinde gecikme, ağızda dirençli ülsere lezyonlar, tekrarlayan enfeksiyonlar, ve lökositoz sık rastlanan klinik bulgular arasındadır.LAD1, LAD2, LAD3 olmak üzere 3 alt tipi vardır. LAD tüm ülkelere oranla ülkemizde daha sık rastlanmaktadır. LAD tanısı akım sitometri ile hücre yüzey markırları ölçümü, uyarım testleri ve moleküler çalışmalarla gösterilebilmektedir. Akım sitometrik analiz ile yüzey markerlarının ölçümü LAD1 için tanı koydurucudur. LAD2 ve LAD3 için yüzey molekülü gösterilmesinin yanında çeşitli stimulanlarla adezyon testi yapılması gereklidir. LAD-1 için tanısal amaçlı akım sitometri kullanılır. Sanger sekans yöntemi ile hangi LAD-1 alt grubunun tayini yapılabilir, mutasyon bölgeleri ve çeşitleri belirlenebilir. Birçok merkezde nadir hastalıklar için yeterli laboratuvar alt yapısı olmadığından hastalığın tanılamasıda güçlük çekilmektedir. Akım sitometri yöntemi kullanarak CD18, CD11b, CD11a, CD11c ve CD15 ekspresyon düzeylerine bakıp hızlı bir şekilde hastalık tanılamasını yapılabilmektedir. Ayrıca moleküler testler ile de akım sitometri analizi sonrasında moleküler tanıların ve hastalığa ait genlerdeki mutasyonları belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Nadir hastalıklarda tanısal sürecin hızlandırılması ve deneyimli personel yetiştirilmesi hastaların hızlı bir şekilde tanısal süreci aşarak tedaviye ulaşmasına imkân vermektedir. Bu yolla kalıcı sekel oluşmadan kemik iliği transplantasyonu (KİT) ile tam tedaviye ulaşmak mümkün olabilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

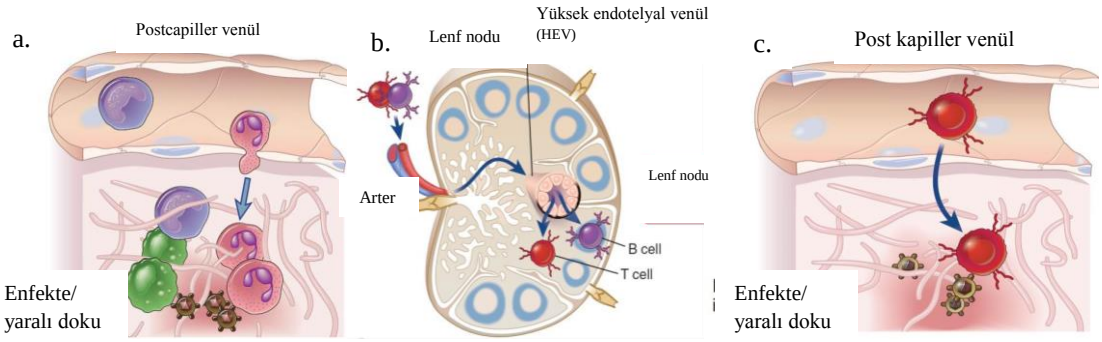
2.1. Lökosit Adezyon Defekti

Lökosit Adezyon Defekti (LAD) başta nötrofiller olmak üzere lökositlerin kan dolaşımından enfeksiyon olan dokuya erişiminin yetersizliği ile karakterize primer immün yetmezlik hastalığıdır.(Etzioni, 2009) Bu hastalıkta özellikle lökositlerin vasküler endotel hücrelerine yapışmasını sağlayan adezyon moleküllerinde (Integrin, selektin vb) bir yetersizlik ve bozukluk olduğu anlaşılmıştır. Çeşitli formları olan LAD otozomal resesif geçişlidir ve hasta kişilerde vasküler duvara lökositlerin yapışması ve enflamasyon bölgelerine göçü bozulur.(Hanna & Etzioni, 2012)

Vasküler endotel hücreleri ile lökositler arasındaki etkileşim doku yaralanmalarında ve enflamatuar yanıtta büyük öneme sahiptir. Normal koşullarda lökositler kan damarlarında hızla hareket ederler ve endotele yapışmazlar fakat lokal travma veya inflamasyon ile endotelium aktive olur.(Etzioni, 2010) Adezyon molekülleri nötrofiller ile damar endotel hücreleri arasında ilişkiyi sağlar. Bu ilişki lökositlerin yavaşlatarak damar duvarına tutunma ve yuvarlanmasını, aktivasyonunu, endotel hücresine adezyonu ve migrasyonunu sağlar.(Priel & Kuhns, 2019) Adezyon molekülllerinden selektinler ve ligandları tutunma ve yuvarlanmada rol alırken, integrinler lökositlerin bölgedeki endotele sıkı tutununarak (adezyon) transmigrasyonla dokuya geçmesi ve kemotaksisle enflamasyon alanına ilerlemesini sağlar. Lokal travma veya inflamasyon ile endotelyal aktivasyon gerçekleşir. Aktivasyon ile eksprese olan selektinler lökositleri karbonhidrat ligantlarına bağlar böylece lökositler yuvarlanmaya başlar. Bu bağlanma ile integrinler aktive olur ve lokal kemokinler salınmaya başlar. Bu sayede sıkı adezyon ile lökosit göçü başlamış olur (Etzioni, 2010).

Lökosit göçü, adezyon kaskadındaki birbirini takip eden basamakları içerir. Bu adımlar, hızlı yanıt sağlamak için tam ve doğru olarak düzenlenir. Bu düzenlenmeye

adezyon molekülleri aracılık eder. Lökosit transmigrasyonuna kadar her adım farklı adezyon molekülü tarafından gerçekleştirilir.(Etzioni, 2007)(Aytekin ve ark., 2004)



Şekil 2.1.1 Üç Farklı Vasküler Bölgede Lökosit Göçünün Gösterilmesi
(a; postcapiller venül; nötrofil ve monositlerin kandan enfejsiyonel, tramvatize bölgeye göçü. b; lenf nodları naif T ve B hücrelerini kandan lenf nodlarına antijen aktivasyonu için, c;post kapiller venülde hafıza ve etkin t hücrelerını kandan enfekte bölgeye göçü)(Abbas, Abdul K., Lichtman, Andrew H., Pillai, 2018 çiziminden türkçeleştirildi).

Bu defekt lökositlerin enflamasyonlu bölgeye geçişini sağlayan adezyon moleküllerinin eksikliği veya fonksiyonel olmaması ile ortaya çıkan primer immün yetmezlik hastalığıdır. Şimdiye kadar LAD-I, LAD-II ve LAD-III olarak adlandırılan üç farklı LAD formu tanımlanmıştır. Hastalar tiplerine göre tekrarlayan, hayatı tehdit eden bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar, yara iyileşmesinin gecikmesi, göbek kordonunun geç düşmesi ve lökositoz başlıca görülen semptomlardır. (Tablo 2.1.1) Birçok LAD hastası yoğun antibiyotik tedavisine rağmen genç yaşta ölmektedir. Kemik iliği nakli tek temel tedavi yöntemidir.(Hanna & Etzioni, 2012)(Etzioni, 2007)

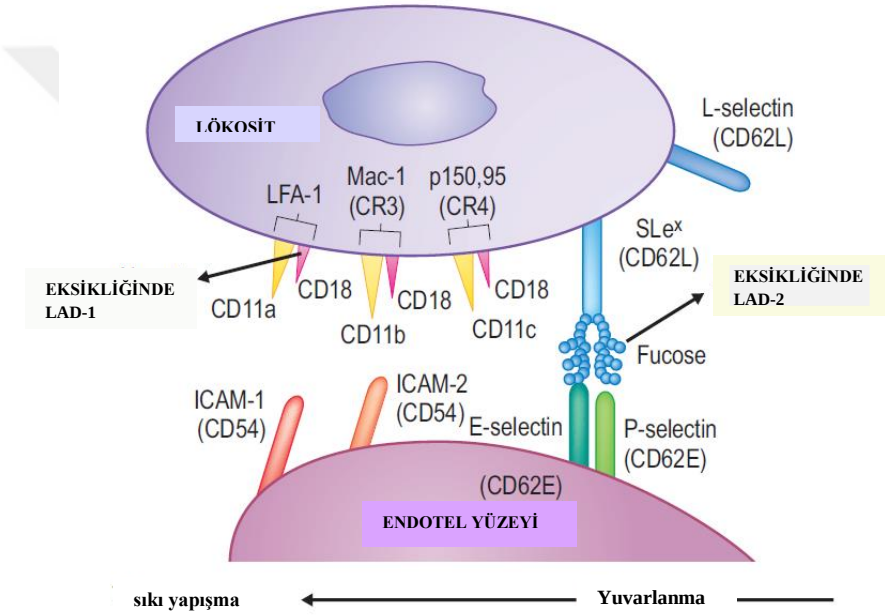
Tablo 2.1.1. Lökosit Adezyon Defekti Tiplerine Göre Görülen Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

	LAD1	LAD2	LAD3
Klinik özellikler			
Rekürren enfeksiyonlar	+++	+	+++
Nötrofili	+++	+++	+++
Periodontit	++++	++	?
Cilt enfeksiyonu	++	++	++
Göbek bağında geç ayrılma	++++	- -	+/-
Gelişimsel anomaliler	-	++	-
Kanamaya eğilim	-	-	+++
Laboratuvar bulguları			
CD18 ekspresyonu	Azalmış/yok	Normal	Normal
sLeX(CD15) ekspresyonu	Normal	Yok	Normal
İntegrinin aktivasyonu	-	-	Bozuk
Nötrofil motilitesi	Azalmış	Azalmış	Azalmış
Nötrofil rolling	Normal	Azalmış	Normal
Nötrofil adherensi	Azalmış	Hafif azalmış	Azalmış
T ve B hücre fonksiyonu	Hafif azalmış	Normal	Hafif azalmış

2.1.1. Lökosit Adezyon Defekti-1

LAD-I (OMIM # 116920), CD18 olarak adlandırılan β2 integrin ailesinin ortak β zincirini kodlayan 21q22.3 kromozomunda bulunan ITGB2 genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. En sık görülen LAD formudur. Bebeklik döneminde mortalite yüksektir.(Etzioni, 2007) Hastalığın ilk belirtilerinden biri göbek kordonunun geç ayrılmasıdır. Hastalar da bebeklik döneminde başlayan, tekrarlayan, yaşamı tehdit eden bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar yaygındır. Çoğu cilt ve mukozal yüzeylerde görülür. Pnömoni, sepsis ve menenjit gibi sistemik enfeksiyonlar da gelişebilir. En sık karşılaşılan bakteriler Staphylococcus aureus ve Gram negatif enterik

organizmalardır.(Cox & Weathers, 2008) Enfeksiyonlar, irin oluşumunun olmaması ile karakterizedir. Belirgin diş eti iltihabı ve periodontis de görülebilir.(Parvanehve ark., 2010) LAD-I'in bir başka özelliği de gecikmiş yara iyileşmesidir. Hastalar enfeksiyonun akut evrelerinde, nötrofil sayıları çarpıcı biçimde artar. Normal değerlerinin 20 katına kadar artış gösterebilir (lökositoz) ayrıca enfeksiyon olmadan da orta derecede notrofil yüksekliği görülebilir.(Etzioni, 2010) Enfeksiyonların şiddeti, CD18 eksikliğinin derecesi ile alakalıdır. Çok düşük CD18 ekspresyonu olan hastalar (<% 1) daha ciddi enfeksiyonlara sahiptir (van de Vijver ve ark., 2012)(Kumar ve ark, 2016)



Şekil 2.1.1.1. Vasküler Endotel Yüzeye Lökosit Adezyonu ve Bağlantı Ligandları

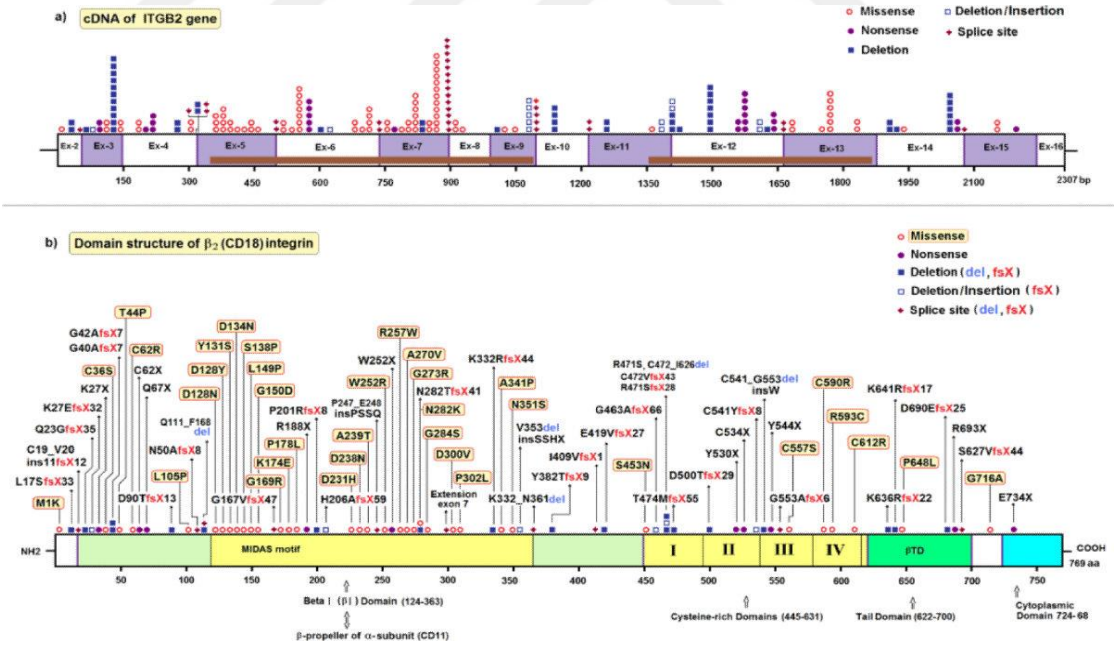
CD18 ekspresyonu. ≤%5 ise LAD-I^0 5% ve 20% arasında ise LAD-I^- ,ekspresyon ≥%20 LAD-I^+ olarak isimlendirilir. LAD-I^+ CD18 Ekspresyon normal fakat fonksiyonel değildir. Genel olarak, LAD-I^0 fenotipli hastalar bebeklik döneminde ölüme yol açan ciddi enfeksiyonlara daha duyarlıyken, LAD-I^- ve LAD-I^+ hastaları genellikle yetişkinliğe kadar hayatta kalırlar. Orta derecede LAD I fenotipi olan hastalar genellikle akut enfeksiyöz ataklar sırasında konservatif tedaviye ve antibiyotik kullanımına hızlı cevap verirler.(van de Vijver ve ark., 2012) Profilaktik antibiyotikler enfeksiyon riskini azaltabilir. Granülosit transfüzyonları hayat kurtarıcı olabilse de, donör tedarikindeki zorluklar ve allojenik lökositlere immün reaksiyonlar nedeniyle

kullanımları sınırlıdır. Şu anda, tek düzeltici tedavi kemik iliği transplantasyonudur. Konakçı da LFA-1'in yokluğu bu nakillerde avantajlı olabilir çünkü greft reddi kısmen CD18 kompleksine bağlı görülmektedir.(Celiksoy ve ark., 2021)

ITGB2'nin 17 ekzonu ve 16 intronu vardır. B2 integrinleri, α ve β alt biriminden oluşur. Ortak β2 alt birimine bağlanan dört α alt birimini (CD11) dört heterodimer protein oluşturur: LFA-I (CD11a/CD18), MAC-1 (CD11b/CD18), p150,95 (CD11c/CD18) ve CR4 (CD11d/CD18). (Madkaikar ve ark., 2015)

Tablo 2.1.1.1 ITGB2 (CD18) Gen Bilgileri

Gen	ITGB2
Alternatif İsim	Lökosit Hücre Adezyon Molekülü,Cd18
Sitogenetik Lokasyon	**21q22.3**
Genomik Kordinasyon	21:44,885,948-44,928,814
Genetik	17 Exon,86 Domain 623 Olıgo Prob,15270 Allel Varyantı



Şekil 2.1.1.2. ITGB2 Genindeki Mutasyonların Şematik Gösterimi.

(Van de Vijver ve ark., 2012 makalesinde Mustafa Yavuz KÖKER'e ait bir çizim, a-) mutasyona uğramış allellerin sayısı, mutasyon tipi ve ITGB2 ekson botunca konumları kahverengi olarak gösterilmiştir. b-) B2 integrinin (CD18) alan yapısı ve her mutasyonun yeri, aktif alanlar sarı, yeşil ve mavi olarak gösterilmiştir.)

LAD-1 neden olan mutasyonların çoğu ITGB2'nin 5-9 eksonları tarafından kodlanan yüksek oranda korunmuş Von Willebrand Faktör tip A (VWFA) bölgesinde meydana gelir. Yapılan çalışmalar, bu bozukluğu olan hastaların üç lökosit integrininin de(Mac-1, LFA-1, p150, 95) ekspresyonunda eşit derecede eksik olduğunu göstermiştir. (Hocdé ve ark., 2009)

Klinik bulgularının yanında tanıyı doğrulamak için β2(CD18) integrin kompleksinin α ve β alt birimlerinin akım sitometri ile uygun CD11 ve CD18 monoklonal antikorları kullanılarak düzeyi belirlenebilir. Ayrıca B2 alt birimindeki moleküler kusuru tanımlamak için genetik analizide yapılabilir. Lökositler CD18'i gebeliğin 20. haftasında eksprese ettiklerinden, bu trimesterda yapılan kordosentez ile doğum öncesi tanı koyabilir. Moleküler defektin daha önce tespit edildiği ailelerde, koryon biyopsisi ve mutasyon analizi ile doğum öncesi daha erken tanı mümkündür.

2.1.2. Lökösit Adezyon Defekti II

LAD-II(OMIM #266265) golgi'ye lokalize guanozin difosfat (GDP)-fukoz taşıyıcısını kodlayan SLC35C1 genindeki mutasyonlarının neden olduğu nadir bir hastalıktır.(Lühn ve ark., 2001) Golgi GDP-fukoz taşıyıcısı, GDP-fukozu endoplazmik retikulumdan (ER) golgi aparatına aktarır ve glikokonjugatların postranslasyonel fukosilasyonu için kullanılır. Fukoz metabo- lizmasındaki bu eksiklik nedeniyle E- ve P-selektinin ligandı olan PSGL-1'in fukosillenmesi bozulur.(Sperandio ve ark., 2009) Nötrofiller üzerindeki CD15 proteininin (sialil LewisX, SLeX) fukosilasyonu, lökositlerin tutunma ve yuvarlanmasından sorumludur.(Gazit ve ark., 2010) Fukoz metabolizmasındaki bu defekt ABO kan grubunun prekürsörü ve fukosillenmiş bir glikoprotein olan H antijenin de eksikliğine neden olur (Bombay fenotipi) GDP-fukoz taşıyıcısı santral sinir sistemini etkilediğinden, işlevsel kaybının klinik sonuçları olarak; çeşitli dismorfik bozukluklar , mental retardasyon, büyüme geriliği, boy kısalığı ve nörolojik bozukluklar (Gazit ve ark., 2010) hipotoni, nöbetler, şaşılık ve tipik yüz görüntüsü (kabarık göz kapakları, geniş burun ucu, uzun üst dudak, ince alt dudak, düşük saç çizgisi ve kısa perdeli boyun) ve ayrıca periodontitis, göbek kordonunun geç ayrılması, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar ve yüksek lökosit sayıları görülebılir. Kemokin ve T hücre reseptör yolu β2-integrin aktivasyonu için hala aktif olduğundan LAD-II hastalarında

enfeksiyöz ataklar genel olarak LAD-I hastalarında görülenlerden daha az şiddetlidir.(Muller, 2002)

1992 de ilk tanımlanan vakalarda ciddi zeka geriliği, boy kısalığı tipik yüz görüntüsü olup nadir görülen Bombay kan grubu, normal CD18 düzeyi olması LAD1 den farklı bir formunun olduğunu düşündürdü ve nötrofillerinin akım sitometri analizleri ile SLeX (CD15) ekspresyonu eksikliği olduğu bulundu(etzoni). Böylece Fukozun normal büyüme ve beyin gelişimi için gerekli olduğu ve sendromdaki anormalliklerin kendi başına yapışma kusuruna bağlı olmadığı anlaşıldı.(Phillips ve ark., 1995)

Bu protein, SLC35C1 (solute taşıyıcı aile 35 üye C1) veya FUCT1 (GDP-fukoz taşıyıcı 1) tarafından kodlanır. LAD II'de mutasyona uğramış spesifik fukoz taşıyıcısını kodlayan insan geni, kromozom 11'de bulunur (Lühn ve ark., 2001). Diğer nötrofil defektlerinde olduğu gibi antibiyotikler ana tedavi seçeneğidir. (Etzioni & Tonetti, 2000)Oral fukoz takviyeside tedavide faydalı olabilir.(Harris ve ark., 2013)

2.1.3. Lökosit Adezyon Defekti III

LAD-1 varyantı (LAD1/V) olarak da tanımlanan LAD-III (lökosit adezyon eksikliği-III), normal integrin ekspresyonuna rağmen lökosit ve trombosit β1-, β2-, β3-integrin ak-tivasyonundaki GPCR aracılı uyarımındaki defektle ortaya çıkan LAD formudur. İntegrinler, hücrelerin ana adezyon reseptörleridir.(Jurk ve ark., 2010) Lökositler LFA-1 (lökosit fonksiyonu ile ilişkili antijen 1) ve VLA-4 gibi integrinlerini kullanarak immün cevabı sağlar. Trombositlerde bulunan $\alpha_V\beta_3$ [glikoprotein (Gp) IIb/IIIa] integrinin de, aynı mekanizma ile aktive olur. Aktive olamayan trombositler fibrinojen bağlayamadığından Glanzmana trombositopenisi gibi kanama bozukluklarıda görülür.(Svensson ve ark., 2009)(Harris ve ark., 2013) İntegrinler dolaşımda ligandlarına zayıf bağlanır, ancak diğer membran reseptörleri aracılığıyla "inside-out" sinyali ile aktif hale gelirler. İntegrinler endotelyal kemokinleri stimüle etmek için, lökosit spesifik GPCR'ye bağlanmalıdır. Bu bağlanma ile GPCR'nin birlikte G proteinler tetiklenir böylece tirozin kinazlar aktifleşir ve ardından "inside-out" mekanizma ile integrinler aktive olur. Benzer aktivasyon, trombositlerin majör integrini olan Gp IIb/IIIa'da($\alpha_V\beta_3$) da görülür. (Metzemaekers ve ark., 2020)Trombin, ADP ve epinefrin ile trombosit GPCR hızla uyarılır ve bu da trombosit integrinini aktive eder.

Lökositlerin endotel yüzeyinde yuvarlanması normaldir fakat LAD1 gibi endotele adezyonu bozulmuştur. (Stepensky ve ark., 2015) KİNDLİN 3 (FERMT3) genindeki mutasyon bunun sebebidir.(McDowall ve ark., 2010) KİNDLİN-3 eksikliğinin tüm beta integrinlerinde anormal aktivasyona neden olduğu bildirilmiştir. Beta 3 integrinin kusurlu fonksiyonu, glanzmann trombositopenisin de görüldüğü gibi kanamaya neden olurken, beta 2 integrinin kusurlu aktivasyonu LAD I'e benzer bir immün yetmezliğe neden olur.(McDowall ve ark., 2010) (Etzioni, 2014) Tanımlanan hastalarda, rekürren bakteriyel infeksiyonlar, lökositoz ve kanamaya eğilim görülür. Bazı hastalar da ayrıca osteopetroz benzeri bir kemik defekti de görülür. Tedavide hastalar düzenli kan transfüzyonu, antibiyotiklere ihtiyaç duyarlar. Kemik iliği transplantasyonu tedavi seçeneğidir ancak transplantasyon sonuçları çok umut verici değildir (Stepensky ve ark., 2015).

2.2. Nötrofil

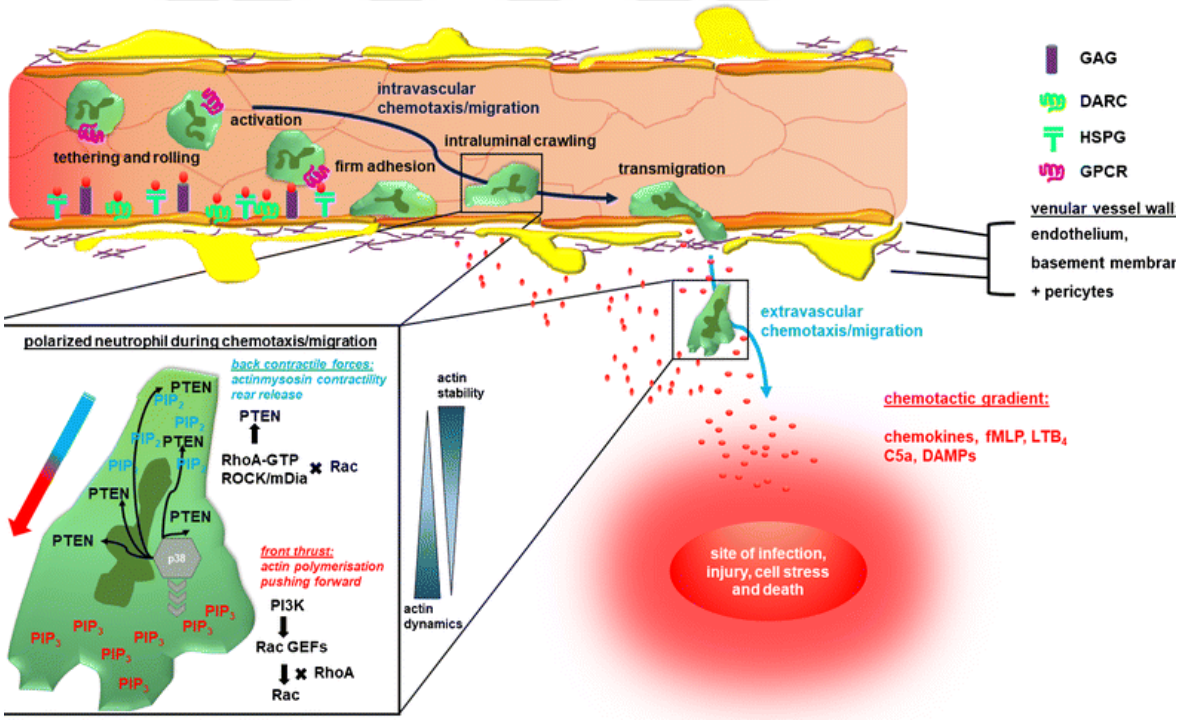
Nötrofiller, doku hasarına ve enfeksiyonlara karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisi olarak enflamatuar bölgelere alınan birincil hücrelerdir. İstilacı mikroorganizmalara özellikle bakteri ve mantarlara karşı savunmada büyük öneme sahiptirler. Sitoplazmik granüllerinin çok sayıda bulunması nedeniyle granülositler ve çok loblu çekirdeğe sahip olması nedeniyle Polimorfonükleer nötrofiller (pmn) olarak adlandırılırlar.(Petri & Sanz, 2018) Nötrofillerin %90 kemik iliğinde, %3 ü dolaşımda, %4 ü endotele yapışık, %3 ü dokularda bulunur. Periferik kanda normal olarak 3000-6000 hücre / mm3'te bulunurlar ve dolaşımdaki lökositlerin% 30-50'sini temsil ederler. Dolaşımda kısa bir ömre sahiptirler (1-8 saat), ancak dokuda 2-4 gün daha hayatta kalırlar. Çapı 10-15 µm ve hacmi 346 µm3'tür. Olgun nötrofilin çekirdeği, loblar arasında rastgele dağılmış kromozomlarla 3-5 loba bölünür. Nötrofiller ayrıca olgunlaşma sırasında farklılaşma aşamasında spesifik proteinlerle paketlenmiş depolama granüllerine sahiptir. Granüller azurofilik, spesifik, jelatinaz ve salgı granülleri olarak dört ayrı popülasyona ayrılır. Azurofilik granüller; miyeloperoksidaz, lizozim, antimikrobiyal peptitler, defensinler, proteazlar ve lizozomal asit hidrolazları içerir. Spesifik granüller laktoferrin, lizozim, B12 vitamini bağlayıcı protein ve ayrıca nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz veya Nox2 içerir. Jelatinaz granülleri, yüksek jelatinaz içeriğine

sahip spesifik granüllerin bir alt kümesidir. Salgı granülleri, alkalin fosfataz ve diğer yüzey antijenlerini içeren oldukça hareketli hücre içi veziküllerdir.

2.2.1. Nötrofil Kemotaksisi

Nötrofillerin enflamatuar bir durum sırasında konakçıyı etkili bir şekilde savunması için hedef bölgelere ulaşmaları gerekir. Enflamasyon alanlarına çok sayıda hızlı ve verimli bir şekilde harekete geçirilebilirler. Bu etkili yanıt için, hücre dışı kimyasal gradyanları kullanarak yüksek konsantrasyonlara doğru hareket ederler. Bu harekete kemotaksis adı verilir. Yönlendirilmiş nötrofil alımı kemoatraktanlar tarafından düzenlenir.(Petri & Sanz, 2018)

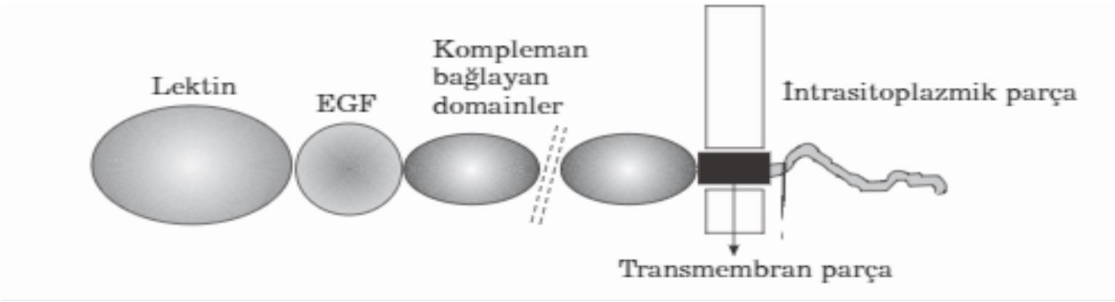
Vaskülatür içinde, kemokinler gibi kemoatraktanlar, özellikle endotel hücrelerinin lümen zarı üzerinde glikozaminoglikanlar (GAG'LER) veya heparan sülfat tarafından immobilize edilir (Priel & Kuhns, 2019)(Handel ve ark. 2005)



Şekil 2.2.1.1. Nötrofil Kemotaksisinin Şekil Üzerinde Gösterimi, (Petri & Sanz, 2018).

2.2.2. Selektinler

Dolaşımdaki lökositlerin, endotel hücrelerine düşük afiniteli yapışmasına aracılık eden karbonhidrat bağlayıcı plazma membran proteinleridir. Selektinler adezyon kaskadının ilk aşaması olan tutunma ve yuvarlanma fazında rol alırlar. E-selektin, P-selektin ve L-selektin olmak üzere 3 tip selektin bulunur.(Ley, 2003) Endotel hücreleri, P-selektin (CD62P) ve E-selektin (CD62E) olarak adlandırılan iki tip selektini eksprese eder.(Ley ve ark., 2007) İlk olarak trombositlerde(paletelet) bulunduğu için bu şekilde adlandırılan P(aletelet)-selektin endotel hücrelerinin sitoplazmik granüllerinde depolanır ve mast hücrelerinden histamin ve trombine yanıt olarak lümen yüzeyine hızlı bir şekilde yeniden dağıtılır. E(ndotel)-selektin, inflamasyona yanıt olarak doku makrofajları tarafından üretilen sitokinler, interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekroz faktörüne (TNF) yanıt olarak endotel hücre yüzeyinde eksprese edilir.(Steeber & Tedder, 2000) Lipopolisakkarit (LPS) gibi mikrobiyal ürünler de endotel hücrelerinde E-selektin ekspresyonunu uyarır. Selektinlere bağlanan lökositler üzerindeki ligandlar, Lewis X veya Lewis A ailesi ile ilişkili kompleks sialile karbonhidrat gruplarıdır. Bu kimyasal yapılar, granülositlerin, monositlerin ve önceden aktive edilmiş efektör ve bellek T hücrelerinin çeşitli yüzey glikoproteinlerinde bulunur. Bunlardan en iyi tanımlanmış olanı tetrasakkarit sialil Lewis X (SLEX)'dir. Selektin ailesinin diğer bir üyesi olan L-selektin (CD62L) lökositlerde eksprese edilir. Lökositler, mikrovilluslarının uçlarında P-selektin ve E-selektin için L-selektin veya karbonhidrat ligandlarını eksprese ederek, endotel hücre yüzeyindeki moleküllerle etkileşimi kolaylaştırır.(Phillips ve ark., 1995) L-selektin, lenfositlerin yüksek endotelyal venüller yoluyla sekonder lenfoid dokulara yönlendirilmesinde önemli bir role sahiptir (Ivetic ve Ridley, 2004). Selektinlerin yapısında reseptörlere bağlanmayı sağlayan lektin domaini, bir adet epidermal growth faktör (EGF) domaini, sayıları iki ile dokuz arasında değişen kompleman bağlayan domain, kısa bir transmembran parçası ve küçük bir intrasitoplazmik parça içerirler (Şekil 2.2.2.1).



Şekil 2.2.2.1 Selektin Domain Yapısı Yapısı (Aytekin ve ark., 2004)

Selektinler için birçok ligand tanımlanmıştır. Ancak PSGL-1 moleküler, hücresel ve fonksiyonel özelliklerinden dolayı büyük öneme sahiptir.(Ley, 2003) Sialize (sLeX) ve fukozile karbonhidrat yapılar içerirler. Nötrofil, monosit ve bazı lenfositlerin yüzeyinde bulunan PSGL-1 (P-selektin gliko-protein ligand 1) büyük oranda P-selektine bağlansa da 3 selektin üyesine de bağlanabilir. Nötrofillerde PSGL-1, endotel hücreleri ile ilk temasların başlatıldığı mikrovillus uçları etrafında yoğunlaşır.(Hocdé ve ark., 2009) E-selektin ligand olarak ESL-1 ve Cd44'ü (PSGL-1'in yanı sıra) de kullanır. PSGL-1'e E-selektin bağlanması lökosit yakalamaya aracılık ederken, ESL-1 ve CD44 lökositlerin E-selektin aracılı yavaş yuvarlanması için önemlidir (Hidalgo ve ark., 2007). (Steeber & Tedder, 2000)L-selektin ligandları, çoğunlukla PNAd olarak adlandırılan yüksek endotel venüllerinin lüminal yüzeyinde eksprese edilir. PNAds grubunun üyeleri arasında GlyCAM-1 (glikosilasyona bağlı hücre adezyon molekülü) CD34, podokaliksin ve endomusin bulunur (Rosen, 2004). Ek olarak, L-selektin ayrıca bağırsağın lenfatik dokusunun endotel hücrelerinde bulunan MAdCAM-1 (mukozal hücre adezyon molekülü) ile etkileşime girer (*Essential Clinical Immunology*, n.d.).

Tablo 2.2.2.1 Bazı Selektinler ve Eksprese Edildiği Bölgelerin Özellikleri

P-selektin (CD62P)	Trombin ve histamin ile aktive olmuş Endotel hücresi	sialyl lewis X on PsGl-1 ve diğer glikoproteinler; nötrofil, monosit, T hücre (efektor, hafıza)
E-selektin (CD62E)	Sitokin.(TNF, IL-1) ile aktive olmuş endotel hücresi	sialyl lewis X on PsGl-1 ve diğer glikoproteinler; nötrofil, monosit, T hücre (efektor, hafıza)
l-selektin (CD62L)	Nötrofil, monosit, T hücre(naive and hafıza), B hücre(naive)	sialyl lewis X/PNAd on GlyCAM-1, Cd34, MadCAM-1,

2.2.3. İntegrinler

İntegrinler, lökositler tarafından eksprese edilen ve hem vasküler endotele hem de diğer hücre-hücre etkileşimlerine bağlılığı kolaylaştıran iki polipeptit zincirden oluşan hücre yüzeyi proteinleridir (Kindt ve ark., 2007). İntegrinler birbirlerine nonkovalen olarak bağlanan, heterodimerik α ve β zincirlerinden oluşur. Lökosit alt kümeleri üzerinde eksprese edilen en az 25 farklı ab reseptörü oluşturmak üzere çiftler halinde bağlanan 19 farklı α ve 8 farklı β alt birimi vardır.(Takagi & Springer, 2002)(Calderwood, 2004) Doku içinde lökositler proliferasyon, farklılaşma, degranülasyon, süperoksit salınımı ve sitokin üretimini içeren hücre tipine özgü tepkilere maruz kalırlar. İntegrinler, hem doğuştan hem de adaptif bağışıklıkta lökosit aktivasyonunda önemli bir role sahiptir (Abram & Lowell, 2009).

İntegrinler β zincirlerine göre başlıca dört gruba ayrılır (Phillips ve ark., 1995) bunlar;

1. β_2 alt grubu içeren
   - LFA-1> ($\alpha_L\beta_2$: CD11a/CD18),
   - Mac-1 >($\alpha_M\beta_2$: CD11b/ CD18),
   - P150,90 >($\alpha_X\beta_2$: CD11c/CD18),
2. β_1 alt grubu

- VLA-4 >($\alpha_4\beta_1$: CD49d/CD29)

3. β_7 alt grubu
   - $\alpha_4\beta_7$'dir
4. β_3 alt grubu
   - gpIIb/IIIa

Tablo 2.2.3.1. Lökositlerce Kullanılan Bazı İntegrinler ve Ligandları

İntegrin	**Ligandları**	**Ekspresyonu**
VLA-1	kollajen	T hücreleri, fibroblastlar
VLA-2	kollajen	Aktive T hücre, plateletler
VLA-3	Laminin, kollajen, fibronektin	Böbrek, tiroid
VLA-4	VCAM-1,fibronektin	Lemfositler, bazı fagositler
VLA-5	fibronektin	Bazı lökositler, platelets
VLA-6	laminin	Yaygın
LPAM-1	MAdCAM-1 E-kadherin	Bazı T hücreleri, intraepidermal T hücresi
LFA-1	ICAM-1, ICAM2	Lökositler
CR3	C3b,C4b,ICAM-1	Mononükleer fagosit, nötrofil
CR4	C3b,C4b,ICAM-1	makrofaj
Lökointegrin	ICAM-3,VCAM-1	makrofaj

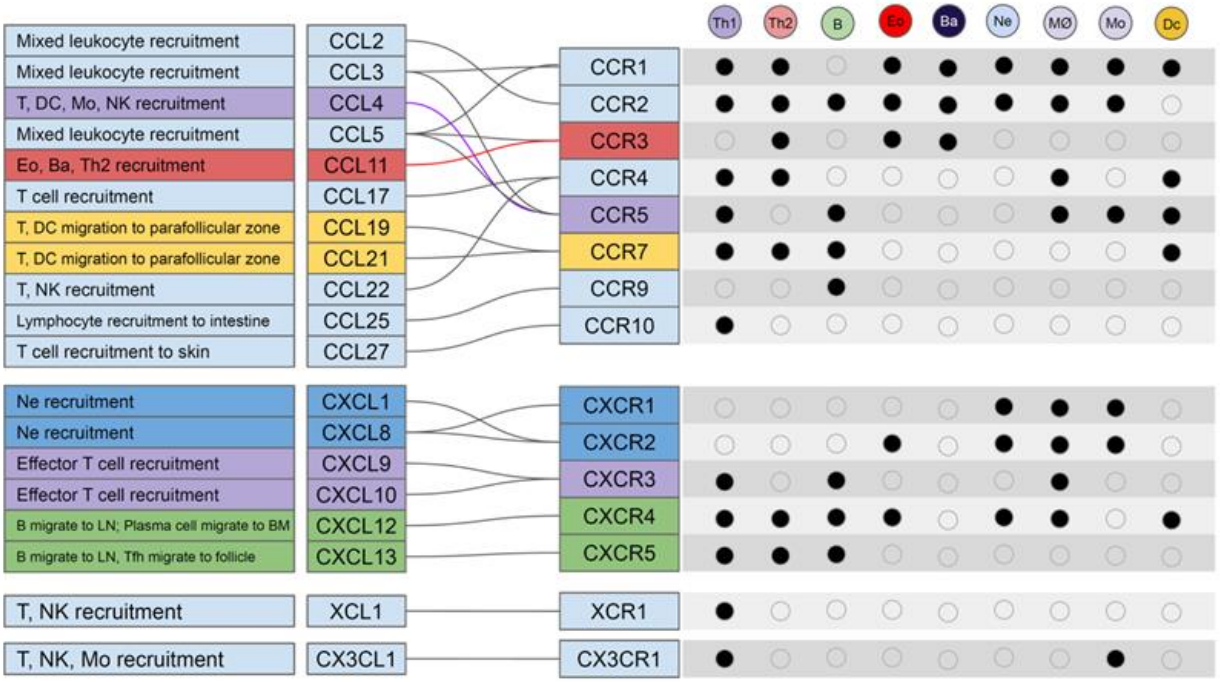
(Davida Male 2021 makalesindeki çizimden uyarlanmıştır)

β_2 integrinlerinden LFA-1 lenfosit, monosit ve nötrofillerden eksprese olurken, Mac-1 ve P150,95 miyeloid hücreler, bazı lenfositler ve natural killer (NK) hücrelerinden eksprese olur. Nötrofil ve monositlerin endotel hücresine adezyonundan başlıca LFA-1 ve Mac-1 sorumludur (Etzioni, 2010)(Aytekin ve ark., 2004). β_1 integrini olan VLA- 4 lenfosit, eozinofil, bazofil, NK hücresi ve monositlerden eksprese olurken, nötrofillerden eksprese olmazlar. β_7 integrin olan $\alpha_4\beta_7$ (LPAM- 1) başlıca lenfositlerden eksprese olur. Mukozal vasküler adressin hücre adezyon molekülüne

(MadCAM-1) bağlanarak lenfositlerin Peyer plaklarına yöneliminde rol oynar. İntegrinlerin endotel hücre yüzeyindeki ligandlarını im- münglobulin süperailesi üyeleri oluşturur. ICAM-1 ve ICAM-2, LFA-1 ve Mac-1 için, VCAM-1 ise VLA-4, $\alpha_d\beta_2$ ve $\alpha_4\beta_7$ için ligand görevi görür. Lökositlerin aktivasyonuyla hücre içinden dışına doğru (inside-out) sinyal iletimi ile integrinler aktifleşir.(Jurk ve ark., 2010) Aktifleşen integrinler endotel hücresi yüzeyindeki ligandlarına (ICAM-1,2) bağlanır.(Harjunpää ve ark., 2019) Bu ilişki ile hücre dışından içine doğru (outside-in) sinyal iletimi gerçekleşir. Hücre iskeletine ulaşan sinyaller ile lökositlerin hareketliliği artar. Tetraspaninler, β_1 integrinler ile kompleks yapılar oluşur ve hücre içi sinyal iletiminde rol oynar.(Sperandio ve ark.., 2009) Böylece lökosit adezyon ve migrasyonuna katkıda bulunmuş olur. β_2 (CD18) integrinler yardımı ile lökositler endotele sıkı bir şekilde tutunur. PECAM ve JAM hem endotel hücrede hem lökositlerde bulunup, kendi aralarında ve JAM-A'lar LFA-1 ile, JAM-B'ler VLA-4 ile, JAM-C'ler de Mac-1 ile bağlanarak transmigrasyonu gerçekleştirirler. (Calderwood, 2004)

2.2.4. Kemokinler

Lökosit hareketini uyaran ve lökositlerin kandan dokulara göçünü düzenleyen sitokin ailesinin bir üyesidir.(Etzioni, 2010) Kemokinler, dolaşımdaki lökositlerin kan damarlarından ekstravasküler bölgelere alınması için gereklidir. (Nuzzi ve ark., n.d.)Dokularda üretilen kemokinler, endotel hücreleri üzerindeki heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanır. (Murphy ve ark.,2017) Bağlanan kemokin reseptörlerinden gelen sinyaller, artmış integrin afinitesine yol açar, bu da lökositin sıkı bir şekilde yapışmasına neden olur. Ekstravasküler dokularda üretilen kemokinler, dolaşımdan çıkmış olan lökositler üzerinde etki eder ve lökositlerin hasarlı dokuya ve enfeksiyon bölgesine doğru göçünü sağlar.(Abbas, Abdul K., Lichtman, Andrew H., Pillai, 2018)



Şekil 2.2.4.1. Kemokin Reseptörleri ve Ligant İlişki Diagramı, (Middleton, 8th edition).

Tablo 2.2.4.1 Adezyon Molekülleri, Liganları ve Fonksiyonları

ADEZYON MOLEKÜL TÜRÜ	DAĞILIM	LİGAND	FONKSİYON
1. Selektin			
CD62E (E-selektin)	Endotel hücresı	PSGL-1'deki sialize, fukozile yapılar	Tutunma ve yuvarlanma
CD62P (P-selektin)	Endotel hücresi,palatelet	PSGL-1'deki sialize, fukozile yapılar	Tutunma ve yuvarlanma
CD62L (L-selektin)	lökosit	MAdCAM-1, CD34	Tutunma ve yuvarlanma
2. **Selektin Ligandları**			
ESL-1 (E-selektin ligand)	lökosit	selektinler	Tutunma ve yuvarlanma
PSGL-1 (P-selektin ligand-1)	lökosit	E-, P-, L-selektin	Tutunma ve yuvarlanma
3.İntegrinler			
β_1 ailesi $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)	Lenfosit, bazofil, NK eozinofil	Fibronektin, VCAM-1	Adezyon, migrasyon
β_2 ailesi			
$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1) (CD11a/CD18)	Lökositler	Fibrinojen, ICAM-1, -2	Adezyon, migrasyon
$\alpha_M\beta_2$ (Mac-1) (CD11b/CD18)	Nötrofil, monosit, NK, eozinofil	ICAM-1, -2, C3B1, fibrinojen	Adezyon, migrasyon
$\alpha_X\beta_2$ (P150,95) (CD11c/ CD18)	Miyeloid hücreler	ICAM-1, -2, C3B1, fibrinojen	Adezyon
$\alpha_d\beta_2$	Lökosit, eozinofil	VCAM-1, ICAM-3	Adezyon
β_3 ailesi			
$\alpha_v\beta_3$ (CD41/CD61	Trombositler	fibrinojen , fibronektin , PECAM-1	Trombosit proliferasyonu migrasyonu
β_7 ailesi			
$\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1)	Lenfosit, eozinofil, NK	MAdCAM-1, VCAM-1	Sıkı adezyon
4. **İmmünglobulin Süperailesi**			
CD54 (ICAM-1)	Endotel hücresi, lenfosit	LFA-1, Mac-1	Adezyon, migrasyon
CD102 (ICAM-2)	Endotel hücresi,	LFA-1, Mac-1	Adezyon
CD50 (ICAM-3)	Endotel hücresi, lökosit	LFA-1	Adezyon
CD31 (PECAM-1)	Endotel hücresi, lökosit, paletelet	PECAM-1, $\alpha_V\beta_3$	Adezyon, migrasyon
Mad-CAM-1	Mukozal HEV	$\alpha_4\beta_7$, L-selektin,	Yuvarlanma, adezyon
CD106 (VCAM-1)	Endotel hücresi	VLA-4, $\alpha_4\beta$	Adezyon
JAM-A	Endotel hücresi, lökosit	JAM-A, LFA-1	Migrasyon, adezyon
JAM-B	Endotel hücresi	JAM-B, JAM-C, VLA-4	Migrasyon, adezyon
JAM-C	Endotel hücresi, lökosit	Mac-1	Migrasyon, adezyon

VLA-4 : Very Late Antijen, LFA: Lökosit Fonksiyon İlişkili Antijen, VCAM-1: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1, ICAM-1, -2, -3:Hücreler Arası Adezyon Molekülü(1, -2, -3), PSGL-1: P-Selectin Glycoprotein Ligand-1, LPAM-1: Lenfosit Payer Plak Adezyon molekülü, MAdCAM-1: Mukozal Yanıt Hücresel Adezyon Molekülü, C3bi: İnaktif Form C3b, PECAM-1: Platelet Hücre Adezyon Molekülü, HEV: High Endotelyal Venül, JAM-A, -B, -C: Junctional Adezyon Molekul-A, -B, -C.

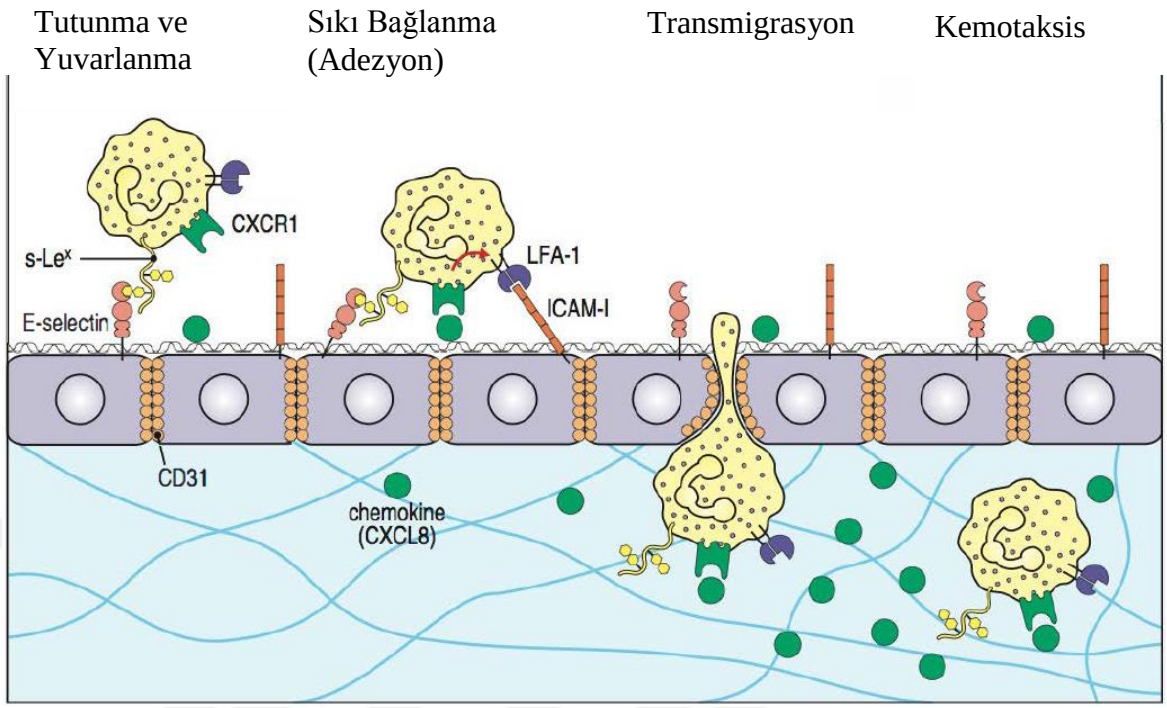
(Aytekin et al., 2004 Makalesinden Faydalanılarak Çizilmiştir)

Ayrıca bunlara ek olarak adezyondan sorumlu diğer moleküller Galaktinler: Yaklaşık 130 amino asitten oluşur. β-galaktoz tanıyan protein ailesinin bir üyesidir. İnflamasyon bağlamında hücre yapışmasını düzenler. Cadherinler: N-terminal hücre dışı alan, bir transmembran alan ve bir C-terminal sitoplazmik alandan oluşur. Endotel ve epitel hücrelerinde bulunur. Hücreler arası yapışma, hücre-hücre tanıma, sinyalizasyon, büyüme ve anjiyogenezde görev alır.

2.2.5 Adezyon Kaskadı

Lökositlerin dokuya alınması sıkı bir şekilde düzenlenmiştir. Genel olarak farklı moleküller yer alsada oldukça benzer aşamalardan gerçekleşir. Adezyon kaskadını sırası ile ; endotel hücresinin aktivasyonu , lökositlerin tutunma ve yuvarlanması (tethering ve rolling), lökosit sinyalizasyonu ve aktivasyonu ve lökosit adezyonu ve transmigrasyonu izler.(Etzioni, 2010)(Herter & Zarbock, 2013)

Hem tutunma hem de yuvarlanmaya, lökositler üzerindeki selektin ligandları ile etkileşime giren selektinler aracılık eder (Sperandio ve ark., 2003; Xia ve ark., 2002) Selektinler ve ligandları arasındaki geçici, düşük afiniteli yapışmalar lökosit hızını yavaşlatır ve iltihaplı endotel üzerindeki sinyalleri algılamalarını sağlar (Lawrence ve ark. 1997) Bu, endotel hücreleri üzerinde sunulan ve lokal makrofajlar tarafından salınan kemokinlere bağlanan lökosit üzeyindeki G-proteinine bağlı kemokin reseptörlerinin (GPCR) aktivasyonunu sağlar (Ley, 2003)Aktive edilmiş GPCR'LER ve selektin-selektin ligand etkileşimleri, integrin aktivasyonuna yol açan hücre içi sinyal olaylarını indükler. Bu sinyaller nötrofillerin yavaş yuvarlanmasına aracılık eden ß2 integrin aktivasyonuna sebeb olur. Kemokin sinyalleri ile tam integrin aktivasyonu sağlanmış olur. Bu yüksek afiniteli integrinler sıkı yapışmayı (adezyonu) sağlar. Böylece lökositler transmigrasyon için modifiye edilir. Bu modifikasyon ile lökositler endotelden paraselüler ve transelüler yoldan geçmek için en uygun yolu bulur.(Carr ve ark., 1992)



Şekil 2.2.5.1: Lökosit Göçünün Adezyon Kaskadında Görünümü,(Janeway ve ark).

LAD I, sağlam yapışma için gerekli olan ß2 integrinindeki mutasyonlardan, LADII, yuvarlanma fazını başlatmak için gerekli olan seçilmiş fukosile ligandların yokluğundan, LAD III, tüm integrin aktivasyonu için önemli bir bileşen olan KİNDLİN-3'teki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.(Hanna & Etzioni, 2012)

2.3. Lökosit Adezyon Defektinde Tanı Testleri

Lökosit sayısında ciddi yükseklik, tekrarlayan yumuşak doku enfeksiyonları, göbek kordonunda geç ayrılma gibi semptomları olan hastalar LAD-1 şüphesi ile akım sitometri de (flow sitometri) CD18 düzeyine bakılarak tanı konulur ayrıca sekans analizi ile kesin genetik tanı konulur. Ağır mental retardasyon, boy kısalığı, gelişim geriliği, tipik yüz görünümü, iskelet bozuklukları, yaşamın erken dönemlerinde tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar olması LAD-2'yi düşündürür. Bu hastalarda CD15 (sLeX) düzeyine akım sitometri ile bakılır ayrıca sekans analizi ile mutasyonlar belirlenir. LAD-3 hastalarında da sekans analizi akım sitometri ile tanı konulmaktadır.

2.3.1. Akım Sitometri Tanı Yöntemleri

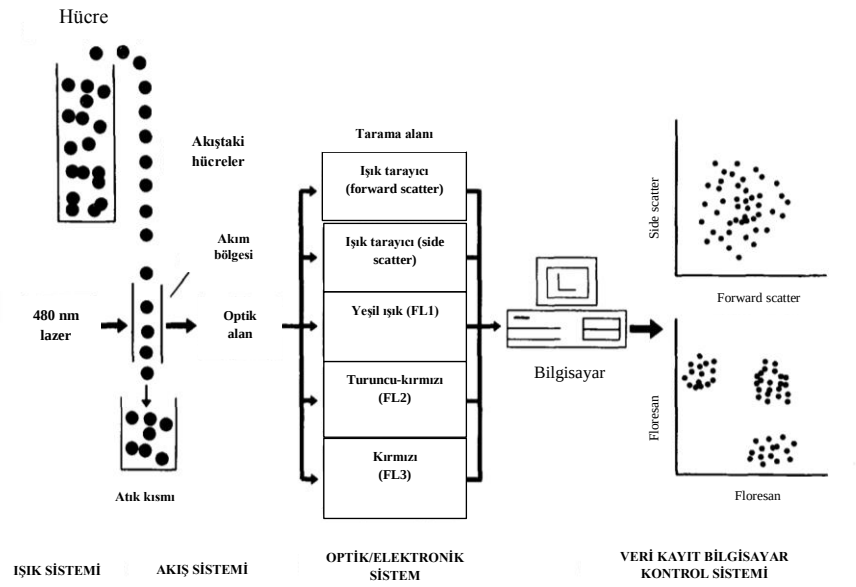
Flow (Akım) sitometri, parçacıkların özelliklerini ölçmek ve değerlendirmek için kullanılan lazer tabanlı bir yöntemdir. Hücrelerin yanı sıra çekirdekler ve organeller, hücresel bileşenler üzerinde ölçümler yapmak için kullanılır. Akış sitometrisi, uyaran bir ışık kaynağından geçen parçacıkları veya hücreleri tarar. Işık hareketli parçacıklara çarpınca dağılarak yayılırlar. Akış sitometrisinin temel prensibi, hücre ya da partiküllerin akışkan bir ortamda lazer ışığı önünden geçerken verdikleri sinyallerin toplanarak bilgisayar ortamına aktarılması ve analiz edilmesine dayanır. Analiz sonuçları parçacıkların çeşitli biyokimyasal, biyofiziksel ve moleküler yönlerini incelemek için kullanılabilir. Sinyallerin kaynağı büyüklük, granülite gibi fiziksel özellikleri olabileceği gibi hücrelere bağlanan fluoro-kromlar da olabilir. Böylece incelenen hücrelerin ya da partiküllerin eksiklikleri, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, membran potansiyelleri, canlılığı hakkında bilgi edinilebilir. Akış sitometrisi; boyalar ve monoklonal antikorlar gibi çok çeşitli ticari olarak temin edilebilen reaktiflerle, etiketlenmiş tüm hücrelerin ve hücresel bileşenlerin kalitatif ve kantitatif olarak incelenmesine olanak sağlar. Genel olarak çalışma prensibi;

1-Örnek tüpler sayesinde cihaza yerleştirilir.

2-Cihazın temel çalışma protokolüne göre yıkama solüsyonları yerleştirilir.

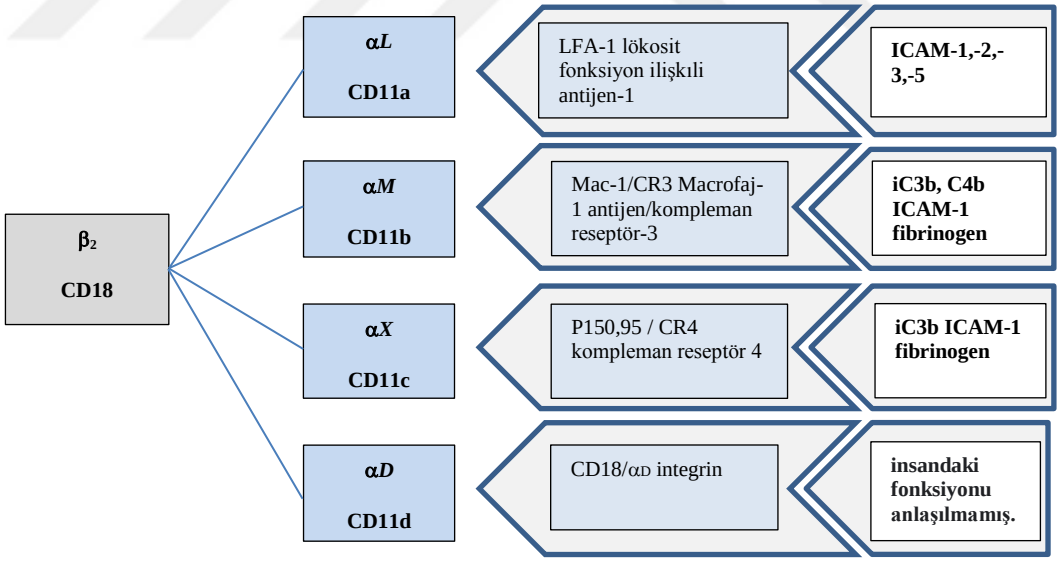
3-Akış şemasına göre lazer ışığının önünden geçen borudan akan hücreler ışığı dağıtır ve floresan vererek yüklerine göre ayrılırlar.

4- Bilgisayar ortamına aktarımı ve analizi yapılır.



Şekil 2.3.1.1. Akım Sitometri Cihazinin Çalışma Prensibi ve Bilgisayar Ortamına Aktarımının Şekil Üzerinde Gösterimi

Kullanilan Antikorlar



Şekil 2.3.1.2. Nötrofil Adezyon Parametreleri: CD45; CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD15 dir.

CD18; Beta2 integrinleri (CD11 / CD18) lökositlerin ana adezyon molekülüdür. Çoğu lökosit bu ailenin bir veya daha fazla üyesini ifade eder. CD18, dört α alt biriminden biriyle nonkovalent olarak bağlı heterodimerler oluşturan 95 kDa integrin β2 zinciridir.

Dört alfa alt birimi şunlardır: CD11a (αL) (tüm lökositler), CD11b (αM) (granülositler, monositler, bazı makrofajlar), CD11c (αX) (granülositler, monositler, dendritik antijen sunan hücreler), CD11d (αD) (CD8 T- dalak kırmızı pulpasında büyük granüler lenfositler, makrofajlar ve gama-delta T hücreleri dahil hücre alt popülasyonu). CD18, tüm lökositler tarafından (histoyositler-makrofajlar, Langerhan hücreleri ve dendritik hücreler dahil) eksprese edilir, ancak trombositler dahil değildir. Makrofajlar ve granülositler, lenfositlerden 10 kat daha fazla CD18 eksprese eder (Flow Cytometry 2020 Catalog-Outside Us Version, 2020)

CD11a: CD11a (AL integrin, LFA-1 α zinciri) integrin ailesinin bir üyesidir. Diğer bazı lökosit integrinleri (CD11b, CD11c, CD11d) gibi, CD11a da β2 integrin alt birimi CD18 ile nonkovalent bağlıdır. CD11a, esas olarak monositler, makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, B ve T lenfositleri dahil olmak üzere lökositler tarafından eksprese edilen 170 kda'lık bir transmembran glikoproteindir. Aktive trombositler ayrıca CD11a ve CD18'i eksprese eder. LFA -1 (CD11a / CD18) lenfoid hücreler arasındaki homotipik yapışmayı ve lökositlerin vasküler endotele heterotipik yapışmasını destekler.

LFA-1'in ligandları olan Hücreler Arası Adezyon Moleküleridir (ICAM):

-ICAM-1 (CD54)

-ICAM-2 (CD102)

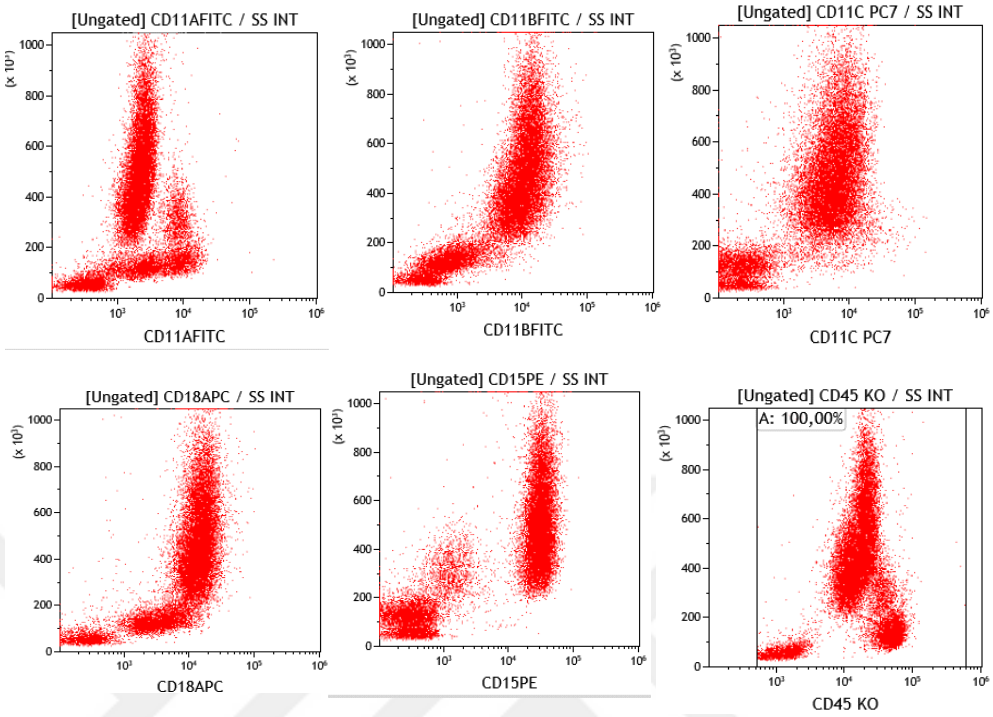
- ICAM-3 (CD50)'dür.

CD11b: CD11b antijeni integrin αM alt birimi olarak da bilinir. İntegrin Mac-1'i (CD11B / CD18, αMß2, CR3, ıC3bR, Mo-1) oluşturmak için CD18 antijeni (integrin β2 alt birimi) ile birleşir. CD11b, indirgeyici veya indirgeyici olmayan koşullar altında sırasıyla 170 veya 165 kDa'lık bir tip I transmembran glikoproteindir. CD11b, 19 potansiyel N-glikosilasyon bölgesini gösterir. CD11b zincirinin hücre yüzeyinde ekspresyonu, CD18 antijeninin (β2 integrin zinciri olarak da bilinir) varlığını gerektirir. Birlikte, bu iki alt birim, CD18 β zincirinin dört ayırt edici CD11 α zinciri ile ilişkilendirilmesiyle oluşturulabilen dört integrin heterodimerinden biri olan CD11b / CD18 integrini oluşturur. CD11b / CD18, NK Hücreleri, nötrofiller, monositler ve makrofajlar üzerinde yüksek oranda eksprese edilir

CD11c; CD11c (lökosit yüzey antijeni p150, Axb2 ve CR4 olarak da bilinen integrin αX alt birimi) integrin ailesinin bir üyesidir. Diğer lökosit integrinleri (CD11a, CD11b, CD11d) gibi, CD11c de β2 integrin alt birimi (CD18) ile nonkovalent olarak bağlıdır. CD11c, esas olarak monositler, makrofajlar ve NK hücreleri tarafından ve az ölçüde granülositler, dendritik hücreler ve T ve B hücrelerinin bazı alt kümeleri tarafından eksprese edilir. 145-150 kDa'lık bir transmembran glikoproteindir. CD11c / CD18, sitotoksik T hücresi öldürmede, monositlerin ve nötrofillerin endotele yapışmasında önemli bir role sahiptir ayrıca hücresel aktivasyonu indükler. CD11c, CD11b'nin sekans olarak 87 homoloğudur ve kompleman faktörü fragmanı IC3b, fibrinojen, CD54 ve bakteriyel lipopolisakkaritte dahil olmak üzere benzer ligandları tanır.

CD15; CD15 antijeni (Lewis x veya Lex) lakto-N- (neo) fukopentaoz III molekülüdür. Bu karbonhidrat epitopu, hücre zarı üzerinde eksprese edilen glikolipitler ve glikoproteinler tarafından taşınır. CD15 antijeni nötrofiller, eozinofiller, monositler, makrofajlar, mast hücreleri ve normal miyeloid öncü hücreler tarafından güçlü bir şekilde eksprese edilir. Normal eritrositler, trombositler veya lenfositler üzerinde eksprese edilmez. CD15, aktive edilmiş endotel ile temas eden monositlerde proinflamatuar olayları başlatabilen önemli bir sinyal molekülü olarak işlev görebilir.

CD45; CD45, tüm hematopoietik hücrelerde eksprese edilen src-ailesi kinazları düzenleyen bir protein tirozin fosfatazdır. CD45, hücre dışı alanı oluşturan ekzonların alternatif eklenmesiyle en az beş izoformdan (180 ila 220 kDa) biri olarak ifade edilebilir. Kısıtlanmamış CD45, Lökosit Ortak Antijeni (LCA), tüm CD45 izoformları için ortak olan, zara yakın bir hücre dışı diziden oluşur. CD45 kümesine ait olan tüm monoklonal antikorlar, antijenin bu kısmı ile reaksiyona girer ve tüm CD45 izoformlarını tanıyabilir. Kısıtlanmamış CD45 epitopu, azalan ekspresyon düzeyi sırasına göre tüm insan lökositleri, lenfositleri, eozinofil monositleri, bazofiller ve nötrofillerin yüzeyinde bulunur. Eritrosit ve trombositlerde bulunmaz. Kemik iliğinde eritroid hücrelerin olgunlaşması sırasında kaybolur. CD45 antikorları, kemik iliğinde lökosit progenitörleri ile reaksiyona girer.



Şekil 2.3.1.3. LAD Tanısal Çalışmalarında Kullanılan Antikorlar Olan CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD15 ve CD45 in Akım Sitometride Görüntüleri

2.3.2. Moleküler Tanı Yöntemleri

DNA Dizileme Yöntemi

DNA dizi analizi (sekans analizi) nükleotid dizilerinin belirlenmesi anlamına gelmektedir. PCR yöntemi ile çoğaltılmış, ilgili DNA bölgesinin nükleotid düzeyinde analizine dayanan bu yöntem ile genetik yapı ve genlerin özellikleri daha kolay anlaşılmıştır. İlk DNA analizi 1960 larda Robert Holley'in 75 nükleotidlik tRNA'yı dizilemesi ile başlamıştır. Zamanla nükleotid dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ve Sanger'in dideoksi enzimatik yöntemidir. Her iki yöntemde dizi analizi yapılacak ekson spesifik DNA'nin hazırlanması, PCR ile sekansa uygun DNAnın çoğaltılması ve yüksek voltaj poliakrilamid jel elektroforezi ile DNAnın yürütülmesi olmak üzere temel aşaması bulunmaktadır.

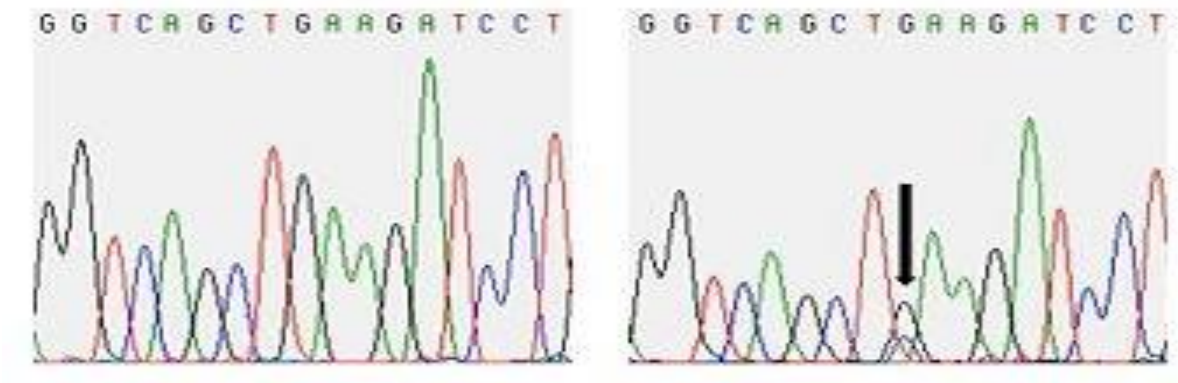
a) Maxam- Gilbert Yöntemi

Maxam ve Gilber tarafından geliştirilen yöntem P^{32} ya da floresan bir boya ile 5'ucundan işaretlenmiş DNA eşit hacimlerle dört parçaya bölünür. Her bir bölmeye farklı bir bazın kimyasal zincirini kıracak kimyasal eklenir. Piperidinin ile fosfodiester bağlarını kırması sağlanır. Birbirinden farklı uzunlukdaki işaretlenmiş DNA zincirleri elektroforez ile birbirinden ayrılır ve otoradyografi görüntülenir.

b) Sanger Dizileme Yöntemi

Fred Sanger tarafından geliştirilen Sanger yöntemi "dideoxy" veya "chain-terminator" yöntemi olarak bilinir. Araştırılan DNA ipliği, sentezlenecek DNA ipliğine kalıp görevi görmektedir. Asimetrik amlifikasyon ile çoğalan tek iplikli DNA, DNA polimeraz ve ddNTP ve biri radyoaktif olarak işaretlenmiş dNTP kullanılır. Ortama radyoaktif S^{35}, P^{33} ya da P^{32} eklenir. İşaretleme primerlere yapılabileceği gibi, ortama eklenen dNTP'lerden birisinin radyoaktif olması yeterli olabilmektedir. Burada en önemli nokta dideoksi nükleotitlerin (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP) eklenmesidir. 2',3' Dideoksiribonükleotid trifosfatların klasik dNTP'lerde farklılığı deoksiriboz'un 3' noktasında hidroksil grubunun bulunmamasıdır. Sentezlenen DNA zincirine, DNA polimerazlar aracılığı ile bağlanabilirler ve terminatör olarak görev yaparlar. Bu

bağlanma 5'trifosfat grupları aracılığı ile olur. Fakat 3' hydroxyl grubunun olmaması nedeniyle, ardından gelen dNTP'ler ile fosfodiester bağının oluşması engellenir. Doğal olarak DNA zincirinin daha fazla uzaması imkânsız hale gelir. ddNTP ile klasik dört dNTP bir reaksiyon karışımının içine konduğunda, DNA zincir uzaması için aralarında bir yarışma olur, seyrek fakat spesifik sonlanmalar oluşur. Bu reaksiyon sonucunda, primer sonundan başlayıp; prematüre sonlanmaların olduğu bölgeler kadar DNA parçaları ortaya çıkar. Dört farklı enzimatik reaksiyonda, dört farklı ddNTP kullanılarak (A,C,G,T için) birer reaksiyon elde edilir. Bu yöntem, rekombinant Taq polimerazlarin geliştirilmesi ile PCR ile de gerçekleştirilebilir hale gelmiş otomatik sekans sistemi adını almıştır. Bu yeni sistemde her farklı dideoksi bazı ayrı bir floresan boya ile işaretlenir ve primerlerle reaksiyona girer. Elde edilen veriler, floresan detektörlü bilgisayar sistemi ile kayıt edilip analizi yapılır. Bu yöntemle 10.000 bazdan fazla DNA dizisi analiz edilebilmektedir.



Şekil 2.3.2.1. Sanger dizi analizi sonuçlarının ABI3130 cihazında mutasyonların elektrofrogram ile görüntülenmesi.

.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 2019/768 nolu ve 13.11.2019 tarihli etik kurul onayı ile Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı İmmün Yetmezlik Araştırma Laboratuvarı'nda, yürütüldü. Çalışma, TYL-2020- 10064 numaralı proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklendi. Çeşitli merkezlere başvuran ve LAD şüphesi bulunan 10 hastanın kan örnekleri ile hasta grubunu ve sağlıklı 10 gönüllü örnekleri ile kontrol grubu oluşturuldu. Çalışma EDTA'lı tüplere alınan 4 ml periferik kan örneği kullanılarak akım sitometrik çalışmaları gerçekleştirildi. Ayrıca antikorlar kullanılarak tayini yapılan ya da yapılamayan hastaların periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak sekans analizi ve mutasyon taraması yapıldı.

3.1. Gereçler

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. Akım sitometri cihazı (Becman coulter navios)
2. +4^{o}C soğutucu (Samsung)
3. -20^{o} C Soğutucu (Arçelik)
4. Pipet Tabancası (Isolab)
5. Vorteksler – Heidolph
6. Santrifüj (ALC PK 110 ve Nüve NF 815)
7. Hassas terazi (Kern S 2000 ve Ohaus Pioneer)
8. Otomatik pipet
9. BIORAD C10000 PCR cihazı
10. Masaüstü Santrifüjler-Hettich
11. Distile su cihazı
12. Buz makinesi
13. CIEAVER scientific CS-300 Jel elektroforez cihazı

14. ABI 3500 genetik otoanalizör

15.Seqscape programının bulunduğu bilgisayar

16. Stratagene marka Robocyclergradient 40 model inkübatör,

17. UVP marka BioDoc-ıt system, transilluminatör jel görüntüleyicİ18. Plate karıştırıcı (MS3-MaxiThermo100)

3.1.2. Sarf Malzemeler

Alkol (%70'lık), distile su, tüplük, çeşitli cam malzemeler, enjektör, 10-200-1000 µl tip, 96 kuyucuk round bottom plate, falkon tüp (15 ve 50 ml), ependorf tüp, serolojik pipet, Bigdye boyası, Bigdye buffer, Anot buffer, Katot buffer, Polimer jel, ExoSap, ABİ Prism BigDye Primer v1.1 / ABİ Prism BigDye Terminatör v1.0 (Applied biosystems), Terminator solution (Applied biosystems), Sam solution (Applied biosystems), ExoSaP (Thermofisher), Basecaller 3100POP6SR.bcp KB.bcp , Dyeset/primer DP(BD21M13)v1 KB_BDTv1.mob, LAD1 Forward ve Reverse Primerler(sentebiloab), DNA izolasyon kiti (Geanaxxon), Agaroz (Sigma Aldirch)

Kullanılan Monoklonal Antikorlar: anti-mouse CD11a (ZS.3)(Biolegend) CD11b(Bear1), CD11c(BU15), CD15, CD18(7E4) (Beckman Coulter AB).

3.2. Kit ve Kimyasal Maddeler

3.2.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kit Ve Kimyasallar

DNA izolasyon kiti içeriğinde bulunan; RBC Lysis buffer, WBC Lysis buffer, Proteinaz K, BB buffer, BW buffer, Elisyon buffer, DNA, pürifikasyon kolonları ve İzolasyon tüpleri (2ml) (Genaxxon Bioscience)

3.2.2. PCR İşleminde Mix Hazırlamak İçin Kullanılan Kit Ve Kimyasallar

PCR işlemi için kullanılan Blue Master mix kiti içeriğinde bulunan MgCl2, dNTP ve DNA polimeraz Genaxxon Bioscience, Almanya'dan temin edildi. PCR işleminde ilgili gen bölgesini çoğaltmak için kullandığımız LAD1 tüm ekzonların forward primer ve revers primer SenteBioLab, dan temin edildi.

3.2.3. Jel Elektroforezi İşleminde Kullanılan Kimyasallar

Agaroz jel elektroforezi işleminde kullanılan Agaroz, TAE (10X), Jel Red boyasıve Loading Dye Biorad, ABD' dan temin edildi.

3.2.4. ABI 3500 Genetik Otoanalizör İçin Kullanılan Kit ve Kimyasallar

Fragment analizi için kullandığımız ABI 3500 Genetik Otoanalizörü için gerekli kit ve kimyasallar arasında yer alan Bigdye boyası, sekans buffer, Anot Buffer, Katot Buffer ve POP-7™ Polimer jel, sekans primerleri Thermo Fısher Scientific, ABD' den temin edildi.

3.3 Yöntemler

3.3.1 Akım Sitometri ile Ekspresyon Analizi

Bu amaçla hasta ve kontrol grubundan alınan periferik kan örnekleri kullanıldı. Nötrofil grubu akım sitometride seçilerek hücre yüzeyindeki adezyon parametreleri: CD45; CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD15 için ekspresyon analizi yapıldı.

Akım Sitometri Analiz İşlem Basamakları

Uygun antikor gruplarından analiz paneli oluşturuldu

a. Akım sitometri öncesi hücrelerin antikor ile işaretleme için hazırlandı,
b. İşaretleme işlemi sonrası akım sitometriden hücrelerin geçirilip okundu.
c. Akım sitometride okuma sonuçlarının her örnek için analizi yapıldı.
d. Hasta ve kontrol datal 53302arının gruplandırılarak karşılaştırılması yapıldı.
e. Datalar arasında istatistiksel bağlantınım araştırılması yapıldı

1. Her bir kontrol ve hastadan alınan 300 µL kan örneği ayrı flow tüplerine eklendi.
2. Her bir örnek için 2 flow tüpü kullanıldı. 5 'er µL eklendi. Her bir örnek sayısı kadar flow tüpünde hazırlandı. Solüsyonun tam karışabilmesi için iyice vortekslendi. 20 dk inkübasyon işlemi uygulandı.
3. Her bir örnekten alınan 300 µL kan örneği üzerine 10 kat dilüe lizis solüsyonundan 2 mL eklendi ve elde edilen karışım karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. Süre sonunda tüm örneklere 2 mL hücre yıkama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Üst faz uzaklaştırıldı. Aynı işlem üç kez tekrarlandı
6. Daha sonra hücreler bekletilmeden doğrudan akım sitometrede analiz yapıldı.
7. Analiz Beckman Coulter Navios model akım sitometri cihazı ve Kaluza yazılım programı kullanılarak yapıldı.
8. Kullanılan 2 tüpteki örnekler analiz edilirken uygun dedektör ayarları yapıldı ve FL1' de kompanzasyon sıfır olarak seçildi ve okuma 1.000.000 hücre sayımı ile yapıldı.
9. Akım sitometrik analiz sonrasında hematopoetik ve endotelyal kök hücreler seçilerek floresan yoğunluk histogram olarak gösterildi. Histogram görüntülerinde geometrik ortalama değerleri hesaplanarak SI değerleri elde edildi.
10. Kullanılan kontoller için de aynı işlem basamakları kullanıldı.

Akım sitometri verileri ile diğer laboratuvar sonuçlarının karşılaştırılması ve anlamlı bağlantıların araştırılması yapıldı

3.3.2.DNA İzolasyonu

LAD hastalarından ve kontrol örneklerinden tam kan alındı. 2ml lik ependorf tüpe 20µL proteinaz K +200µL kan + 200µL buffer AL eklendi. Vortekslendi. 56^{O} C 10 dk inübasyona bırakıldı.8000 rpm de 10 sn santrifüj edildi.200µL etanol eklendi. Vortekslendi. 8000 rpm de 10 sn kısa santrifül edildi. Elde edilen karışım içerisinde 2 ml toplama tüpü bulunan spin kolona aktarıldı.8000 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolona aktarılıp üzerine 500 µL Buffer AW1 eklendi. Santrifüj edildi.500 µL Buffer AW2 eklendi. 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. 200 µL Buffer AE eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakıldı.8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Alt kısım DNA'dır. Kullanılmak üzere saklandı.

Elde edilen DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve standardize edilmesi,

Tablo 3.1. PCR Master Miks karışım işlemleri

MADDE	HACİM(µl)
ddH2O (deiyonize distile su)	12,8
10XBUFFER MgCl2	2
DMSO (Dimetil sülfoksit	1,6
dNTPs	0,4
Taq DNA Polimeraz	0,2
FW Primer(10pm)	0,5
RV Primer (10pm)	0,5
DNA	2
TOPLAM HACİM 20	

3.3.3.Sanger Analizi

LAD hasta grubunun DNA dizisinin çıkarılıp bu dizinin tüm bölgeleri kontrol edildi. Mutasyonlu bölgeleri belirlendi. Sanger dizi analiz işlem basamakları aşağıda alt başlık halinde verilmiştir.

3.3.3.1. PCR Protokolü

DNA izolasyonunun ardından PCR işlemine geçildi.

PCR İşlemi İçin Mix Hazırlama

ITGB2 gen için

1. Blue Master Mix dondurucudan çıkarılıp çözdürüldü.
2. Blue Master Mix' ten örnek başına 7 µl miks tüpüne ilave edildi.
3. ITGB2 genlerinin ilişkili exonlarının forward ve revers primerlerinin her birinden 0,5 µl miks tüpüne eklendi.
4. Miks tüpü buzun üstüne alınıp pipetaj ile karıştırıldı.
5. Örnek tüplerinin her birine hazırlanan miskten 18 µl ilave edildi.
6. Hasta ve yakınlarının DNA larından 2'şer µl eklenerek pipetaj yapıldı.
7. Örnek PCR cihazına yüklendi.

Sıcaklıkları:

LAD hasta grubunda PCR işlemi için kullanılan sıcaklıklar ve programı Tablo 3.2. 'de verilmiştir.

Tablo 3.2. PCR İşlemi Isı Döngüleri Ve Süreleri

	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık Geçiş(^{O}C/Sn)
Denatürasyon	1	95^{O}C	10dk	4,4
Amplifikasyon	45	95^{O}C	10sn	4,4
		60^{O}C	10sn	2,2
		72^{O}C	15sn	4,4
Erime Eğrisi Analizi	1	95^{O}C	30sn	4,4
		40^{O}C	2dk	1,5
		75^{O}C	-	0,2
Soğuma	1	40^{O}C	30sn	1,5

3.3.3.2.PCR Elektroferez İşlemi

Reaktifler

Agaroz, TAE (10x), Distile su, Etidyum Bromür, Loading Dye

Protokol

1g agaroz tartıldı. Üzerine 25 mL TAE (1x) eklendi ve agaroz çözdürüldü. (TAE (10x) 2,5 ml alınır üzerine 22,5 ml distile su eklendi. Karışım 1 dk fırında ısıtıldı. Yeniden karıştırıldı.45 s daha fırında ısıtıldı. Fırından çıkarılan agaroz üzerine 25 ml daha TAE (1x) eklendi ve iyice karıştırıldı. Son karışımın üzerine 5 µl Etidyum Bromür eklendi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan jel cam tabakaya döküldü ve baloncuklar uzaklaştırıldı. Daha sonra taraklar elektroforez aparatının cam yüzeyine değmeyecek şekilde yerleştirilir. Jel +4°C'de 10 dakika bekletilir ve donması sağlanır. Jelin donması sırasında elektroforez tankına yaklaşık 400 mL TAE (1x) eklenir. (40 ml TAE (10X) + 360 ml distile su). Donan jeldeki taraklar yavaşça kaldırılır ve kuyucuklar oluşturulur. Jel tanka yerleştirilir ve tampon çözelti (TAE) içerisine tamamen batması sağlanır. PCR'dan çıkarılan tüpler kontrol edilir.

3.3.3.3. PCR Ürününün Pürifikasyon Protololü

PCR pürifikasyon protokolü

1. ExoSAP-IT™ reaktifini –20°C'lik dondurucudan çıkarılır ve buz üzerinde tutulur.
2. Her 5 µL PCR ürünü için 2 µl ExoSAPIT™ le karıştırılır.
3. 5 µL'den büyük PCR ürün hacimlerini kullanırken, ExoSAP-IT™ miktarını orantılı olarak artırılır.
4. Kalan primerleri ve nükelotidleri degrade etmek için 37°C'de 15 dakika inkübe edilir.
5. ExoSAP-IT™ reaktifini inaktive etmek için 80°C'de 15 dakika inkübe edilir

İlk Sekans PCR İçin

2 µl ddH_2O, 2 µl Buffer, 2 µl Big Dye Terminator, 2 µl Forward Primer (1pM), 2 µl Reverse Primer (1pM), 2 µl PCR sonrası DNA örneği, Hazırlanan mix pleate'ye dağıtıldıktan sonra **2 µl PCR ürünü** kuyucuklara yüklendi ve hafif pipetaj yapıldı. Üzeri **seal (şeffaf silikonlu kapatıcı)** ile kapatıldı, İlk uygulanacak olan sekans PCR'ına yerleştirildi.

Protokol (Bio-rad PTC 200 thermal cycler)

1. Denatürasyon 96˚C 1 dk, 2. Denatürasyon: 96˚C 10 s, 3. bağlanma: 50˚C 10 s

4.uzama: 60˚C 4sn 5. 4. adım (35 döngü), 6. sonlandırma

3.3.3.4. ExoSAP ile PCR Ürünü Saflaştırma Protokolü

ExoSAP-ITTM (Cat. No. 75002) Express reaktifi, boyutu 100 bp'den 20 kb'ye kadar olan PCR ürünlerini, kullanılmayan primerleri ve nükleotitleri çıkararak numune kaybını en aza indirgeyen bir saflaştırma ürünüdür.

1. 20°C'de donmayan bir dondurucuda saklanan ExoSAP-ITTM Express reaktifi dondurucudan çıkarıldı ve prosedür boyunca buz üzerinde tutuldu.
2. 5 µl PCR sonrası reaksiyon ürününü 2 µl ExoSAP-ITTM Express reaktifi ile karıştırıldı.
3. Hafifçe vartekslenerek içerik tüp dibinde toplanıldı.

4. Hızlı çevirerek iyice karıştırıldı.
5. Reaksiyon, ısıtılmış kapaklı bir termal döngüleyicide inkübe edildi.
6. Fazla primerleri ve nükleotidleri parçalamak için 37°C'de 15 dakika inkübe edildi
7. ExoSAP-ITTM Express reaktifini inaktive etmek için 80°C'de 15 dakika inkübe edildi.
8. PCR ürünü artık DNA dizileme işlemine hazır hale geldi.
9. İşlem görmüş PCR ürünleri çalışma başlanana kadar –20°C'de saklandı.

3.3.3.5. Sekans Yükleme Solüsyonunun Hazırlanması

ExoSaP ile purifikasyon sonrası aşağıda verildiği şekilde mix hazırlanıp paletlere yüklendi.

Tablo 3.3. PCR Mix Ürünleri ve Miktarları

Kimyasal / ürün	Miktar
PCR ürünü	2µl
Big dye yükleme buffer	2µl
Big dye boyası	2µl
dsu	2µl
Primerler (1pM)	1 er µl

Hazırlanan mix platlere aktarıldıktan sonra 2µl PCR ürünü kuyucuklara yüklendi ve pipetaj yapıldı. Üzeri seal (şeffaf silikonlu kapatıcı) ile kapatıldı. İkinci sekans PCR ına yerleştirildi.

1	96°C 1 dk (denatürasyon)
2	96°C 30 sn (denatürasyon)
3	50°C 10 sn (bağlanma)
4	40°C 4dk (uzama)
5	35 döngü
6	Sonlandırma
Ürün	**Miktar**
Sam solüsyonu	45µl
Terminator solüsyonu	10µl

Yukarıda oluşturulan sekans PCR işleminden sonra plate üzerindeki seal dikkatlice kaldırıldı ve plate içindeki DNA örneklerinin üzerine ürün eklendi.

Yukarıdaki miktarlar bir örnek başına olacak şekilde mix hazırlayıp plateye dağıtıldı. Plate karıştırıcı cihazına yerleştirildi ve 2200 RPM 30 dk karıştırma işlemi yapıldı. Platedeki DNA ürünü ardından 1000 RPM 2dk soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Son olarak DNA dizilemesi işleimöi yapılması için plate dikkatli bir şekilde ABİ- 3500 cihazına yerleştirildi.

3.3.3.6. Sekans İşlemi için Cihazın Hazırlanması

ABİ 3500 pre-run da çalıştırıldıktan sonra analiz yapılacak örneklerin listesi yapılıp analiz protokolü hazırlandı. Standart sekans 53 işlemi 50 cm lik kapiller seçilerek yapıldı. Sekans işlemi 2.5 saatte tamamlanarak sonuçları analiz aşamasına geçildi.

3.3.3.7. Sonuçların Analizi ve Mutasyon Taranması

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

3.4. İstatistik

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

4.BULGULAR

4.1.Optimizasyonu Çalışmaları

Akım Sitometrik Çalışmalar

Çalışmamızda öncelikle LAD alt tipleri için akım sitometrik okuma paneli oluşturuldu. Panel üzerinden akım sitometrik hücre analizi yaparak ilgili markerlerin yüzey ekspresyon ölçümleri yapıldı. Paneli LAD hastaları için optimize hale getirildi. Analizlerde mean flouresan intense (MFI) değeri kullanıldı. Bu değerlere göre değerlendirmeler yapıldı.

Genetik Testler

PCR çalışmasının optimizasyonu için ITGB2 gen primerlerin TM değerleri dikkate alınarak çalışma protokolü hazırlandı. Kontrol ve hastalardan EDTA' lı tüpe alınan periferik kan numunelerinden, DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. PCR çalışmasında optimizasyon sağlamak için birçok kez deneme yapıldı. Optimizasyon sağlandıktan sonra PCR ürünlerinin pürifikasyon işlemleri gerçekleştirildi. Pürifikasyon işlemini takiben sekans PCR'ı için gerekli kimyasallar eklenerek sekans PCR işlemi gerçekleştirildi. ABI3500 platformunda DNA dizi analiz işlemi yapılarak mutasyon taraması yapıldı.

Kontrol Grubu: Çalışmada yer alan kontrol için gerekli onamlar alındı 4 cc kan örneği alınarak akım sitometrik ve genetik analizler yapıldı.

Hasta Grubu: LAD1 klinik özellikleri gösteren ve çeşitli merkezlere başvuran 11 hastanın kendisi ve ailesinden onam alındıktan sonra 4 cc kan örneği alınarak akım sitometrik ve genetik analizler yapıldı.

4.2.Sağlıklı Kontrol Grubu

Çalışmanın kontrol grubu 20-45 yaşları arasında 4 erkek ve 6 kadın olmak üzere 10 sağlıklı kişiden oluştu (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Kontrol Grubu Verileri

Kontrol No	Cinsiyet	Nötrofil (10^3µl)	CD18
K1	E	2,82	1.14
K2	K	2,89	1.37
K3	K	3,15	1.47
K4	K	3,99	1.25
K5	K	3,27	1.43
K6	E	2,55	1.65
K7	E	3,91	1.17
K8	K	2,55	1.52
K9	K	3.76	1.64
K10	E	2.34	1.36

4.2.1. Sağlıklı kontrol grubunda Akım Sitometrik Analiz Sonuçları:

Çalımada yer alan herbir kontol grubu ailesinden gerekli izinler alınarak 2 cc kan örneği alındı ve akım sitometrik analiz ve genetik analiz bu örneklerle yapıldı. Kontrol grubundan elde edilen akım sitometrik test sonuçları (Tablo 4.2.) de verildi. Akım sitometri ile 2ml kan örneği incelenmiş ve CD18/CD11b MFI değerlerinin normal aralıkta olduğu belirlendi.

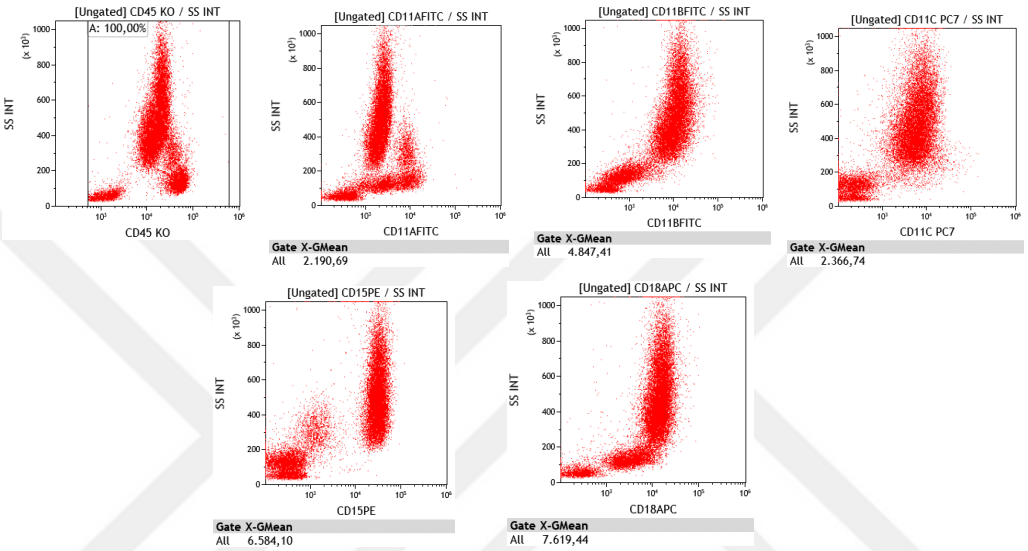
Tablo 4.2. Kontrol Grubunda Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

Hasta No	Kontrol Akım Sitometrik Aanaliz Sonuçları				
	CD11a MFI	CD11b MFI	CD11c MFI	CD15 MFI	CD18 MFI
K1	2.18	8.45	2.26	5.25	5.41
K2	3.18	7.45	1.82	4.25	5.42
K3	2.19	9.48	2.36	5.36	7.61
K4	5.87	3.77	4.25	3.90	6.51
K5	4.69	3.67	5.25	6.16	3.65
K6	6.25	4.92	5.87	4.29	20.54
K7	5.36	4.05	5.72	5.21	18.56
K8	6.85	7.48	6.58	6.23	12.36
K9	7.16	6.28	6.95	8.66	21.92
K10	4.32	4.55	5.63	5.71	8.67

MFI (Mean Fluorescence Intensity): hücre popülasyonunun floresan yoğunluğundaki değişimdir.

4.2.2. Sağlıklı Kontrol Grubunda Akım Sitometri Analiz Sonuçları ve Görüntüleri

Kontrol grubunda yer alan sağlıklı bireyler için CD45, CD11a, CD11b, CD11c, CD15, CD18 monoklonal antikorların akım sitometrik analizi ile elde edilen görüntülerden K2'ye ait analiz görüntüsü örnek teşkil etmesi bakımından şekıl 4.1. de verildi. Ekspresyon düzeylerinin referans aralığında olduğu görüldü.



Şekil 4.1. Sağlıklı Kontrol-2 için Bakılan Hücre Yüzey Markerları Olan CD11a, CD11b, CD11c, CD15 ve CD18'in Akım sitometrik Ekspresyon Analizi.

4.3. LAD1 Hastalarının Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

Çalışmaya 5'i erkek ve 5'i kız (Hasta 1-postHSCT, Hasta 2-postHSCT, Hasta 3-postHSCT, Hasta 4-EX, Hasta 5-postHSCT, Hasta 6-postHSCT, Hasta 7-postHSCT, Hasta 8-, Hasta 9-, Hasta 10-preHSCT) özelliklere sahip toplam 10 hasta dahil edilmiştir. Ayrıca 10 kontrol örneği de hasta grubu ile birlikte akım sitometride çalışıldı (Tablo 4.3). Hasta grubundan elde edilen akım sitometrik test sonuçları (Tablo 4.4) verildi.

Tablo 4.3. Hastaların Verileri

Hasta adı	Cinsiyet	Nötrofil sayısı(10^3µl)	Cd18
H1	E	14,78	<%1
H2	E	13,50	<%1
H3	K	13,81	<%1
H4	E	15,30	<%1
H5	E	14,60	<%1
H6	K	14,31	<%1
H7	K	13,34	<%1
H8	E	14,71	<%1
H9	K	14,40	<%1
H10	K	11,74	<%1

Tablo 4.4. Hasta Grubunda Akım Sitometrik Analiz Sonuçları.

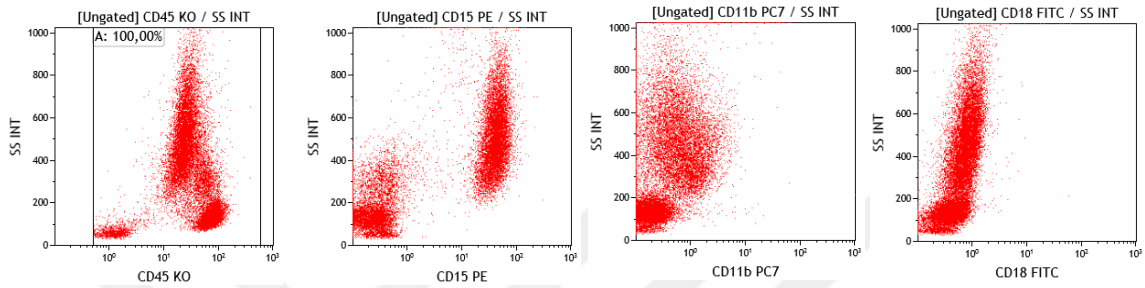
NO	Hasta adı	LAD Akım Sitometrik Antikor Sonuçları				
		CD11a MFI	CD11b MFI	CD11c MFI	CD15 MFI	CD18 MFI
1	H1	0,65	0,34	0,20	2,37	0,59
2	H2	0,87	0,42	0,35	1,80	0,72
3	H3	0,70	0,18	0,19	1,93	0,23
4	H4	0,67	0,52	0,42	0,58	2,02
5	H5	0,85	0,25	1,21	3,09	5,26
6	H6	0,72	0,35	0,90	4,02	4,83
7	H7	0,59	0,59	0,72	4,97	1,88
8	H8	0,62	0,78	0,56	9,90	0,37
9	H9	0,71	0,65	0,84	2,50	2,42
10	H10	0,83	0,56	0,54	3,75	0,82

MFI;Ortalama ışıma yoğunluğu (Mean Fluorescence Intensity)

Periferik kan örnekleri ile çalışılan akım sitometrik analiz sonucuna göre CD18 düzeyinde LAD1 ile uyumlu anlamlı bir azalma görüldü. CD18 ≤1 düzeyinde idi. Akım sitometrik analiz histogramında ekspresyon kaybı olduğu görüldü, Hasta grubuna ait hücre yüzeylerindeki CD11a, CD11b, CD11c, CD15 ve CD18'in Akım sitometrik analiz sonucunda ekspresyon düzeyleri belirlenerek hesaplanan MFI değerleri hesaplandı..

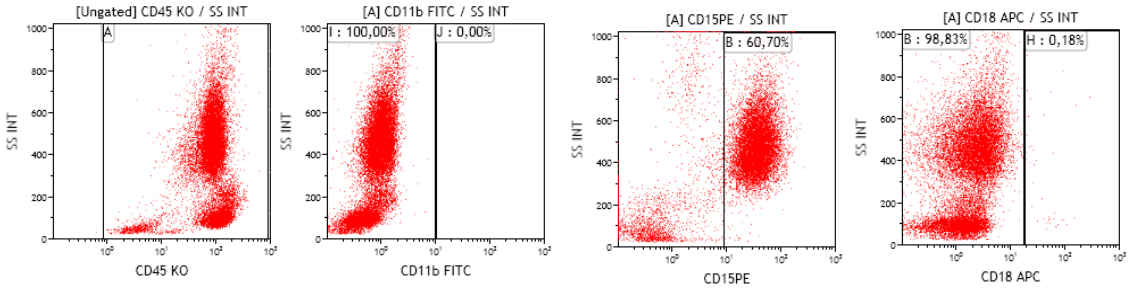
4.4.Hasta Grubunda Monoklonal Antikorların Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarının Görüntüleri

H1 ile H10 arasında isim verdiğimiz hastalar için CD45, CD11b, CD15, CD18 monoklonal antikorları düzeylerine ait akım sitometrik analiz sonuçları örnek olması açısından şekil 4.2. 'de verilmiştir.



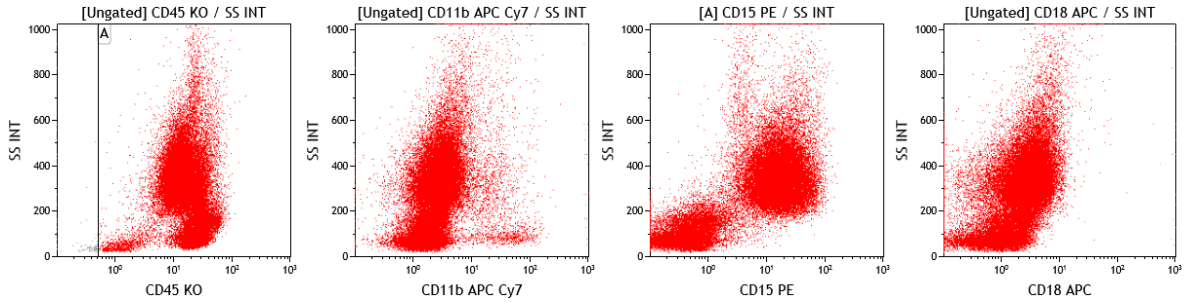
Şekil 4.2. Hasta 1'e Ait Akım Sitometri Analiz Sonuçları

Yapılan analiz sonucuna göre CD15 ekspresyonunda azalma görülmez iken LAD-1 ile uyumlu olarak CD18 düzeyinde anlamlı bir azalma görüldü; ayrıca CD11b ekspresyonunda da kayıp görüldü (şekil 4.2)



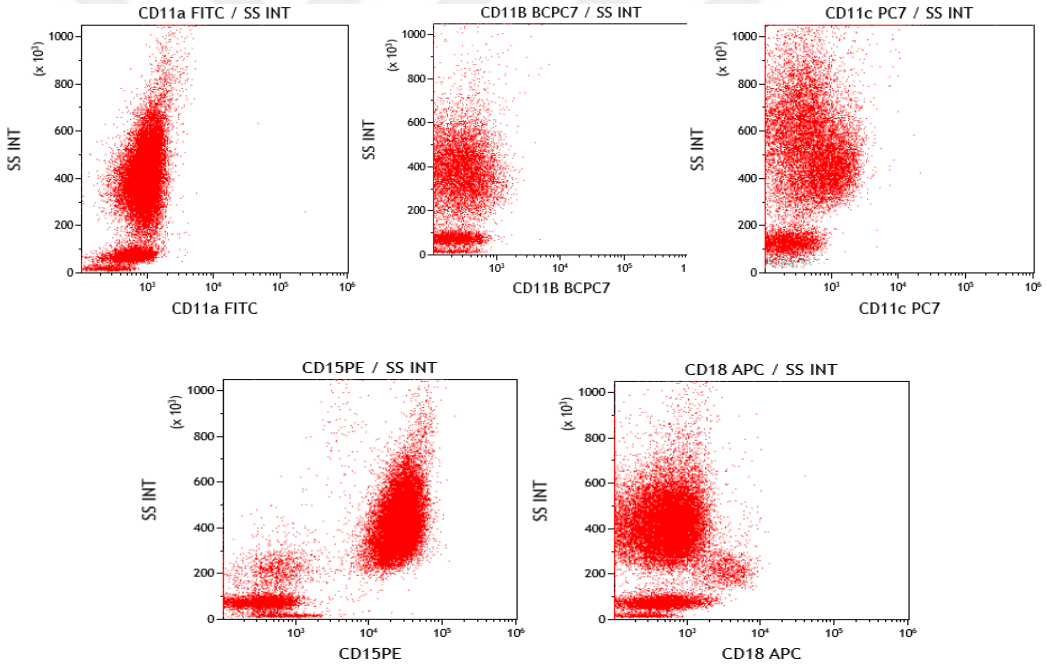
Şekil 4.3. Hasta 2'ye ait Akım Sitometri Görüntüsü

Yapılan değerlendirmede hasta 2 de CD45, CD15 ekspresyonlarında azalma görülmezken CD18, CD11b ekspresyon düzeylerinde LAD-1 ile uyumlu kayıp görüldü. (Şekil.4.3)



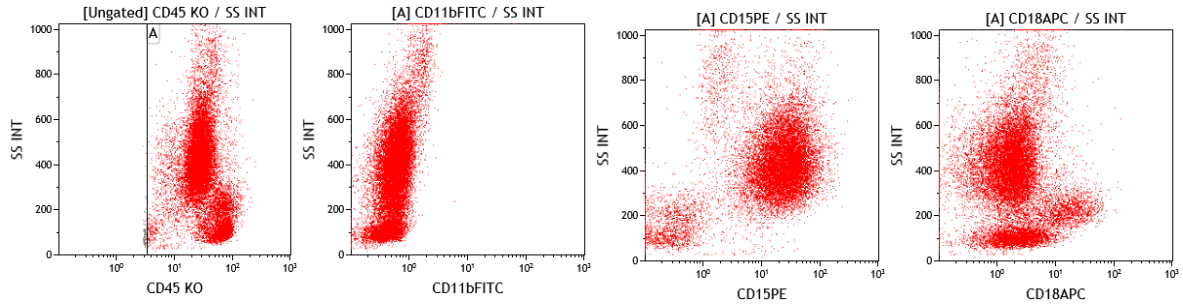
Şekil 4.4. Hasta 4'e Ait Akım Sitometri Analiz Sonucu

Hasta 4'e ait analiz de CD15 ekspresyonu normal aralıkta olup CD11b ve CD18 düzeylerinde de ekspresyon kaybı vardı. Akım sitometri analizine ek olarak yapılan sekans analizinde de LAD-1 ile uyumlu olduğu görüldü. (şekil.4.4)



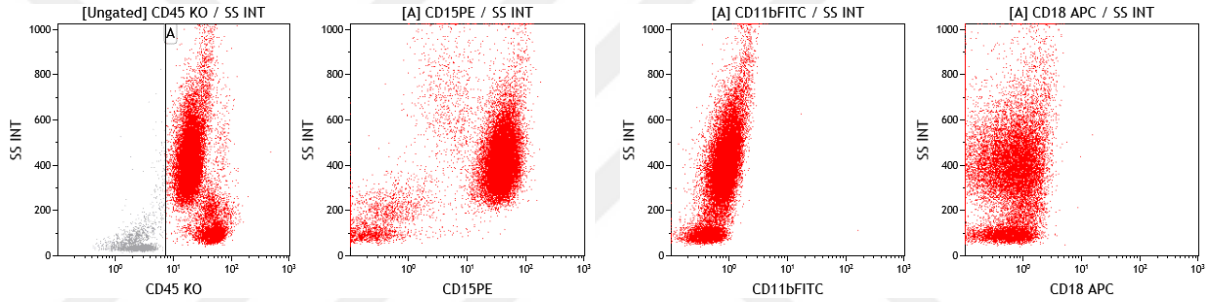
Şekil 4.5. Hasta 5'e ait CD11a, CD11b, CD11c, CD15 ve CD18 Antikorları Kullanılarak Yapılan Akım Sitometrik Analiz Görüntüsü.

Analiz sonucuna göre CD15 ekspresyon düzeyi normal iken, CD11a, CD11b, CD11c ve CD18 düzeylerinde anlamlı bir azalma görüldü. Hasta LAD-1 ile uyumlu bulundu. (şekil.4.5).



Şekil 4.6. Hasta 7'ye Akım Sitometrik Analiz Sonuçları.

Analiz sonucuna göre CD15, CD45 ekspresyonları normal sınırlarda iken, CD11b ekspresyonunda anlamlı bir kayıp görüldü.CD18 düzeyindeki bariz derecedeki kayıp vardı. (şekil 4.6).



Şekil 4.7. Hasta 8'e Ait Akım Sitometrik Analiz Sonuçları.

Yapılan analizde CD15 ekspresyon düzeyi normal sınırlarda iken CD11b ve CD18 ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak azaldı. LAD-1 ile uyumludur. (Şekil 4.7)

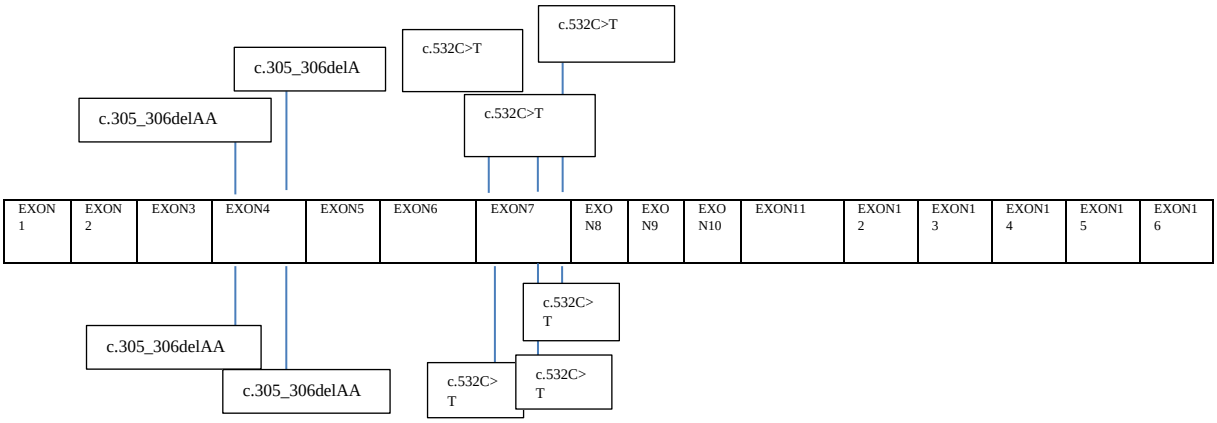
4.4. Hasta Grubunun Moleküler Analizler Verileri

Çalışmamızda LAD1 ile uyumlu klinik bulguları olan hastaların akım sitometrik analizi yapıldıktan sonra moleküler testlerden sekans analizi ile mutasyon taramaları yapıldı. Hastalara ait verilerde mutasyonun bulunduğu exon bölgeleri, nükleotid değişim bölgeleri ve aminoasitlerdeki değişiklikler aşağıda verilmiştir.

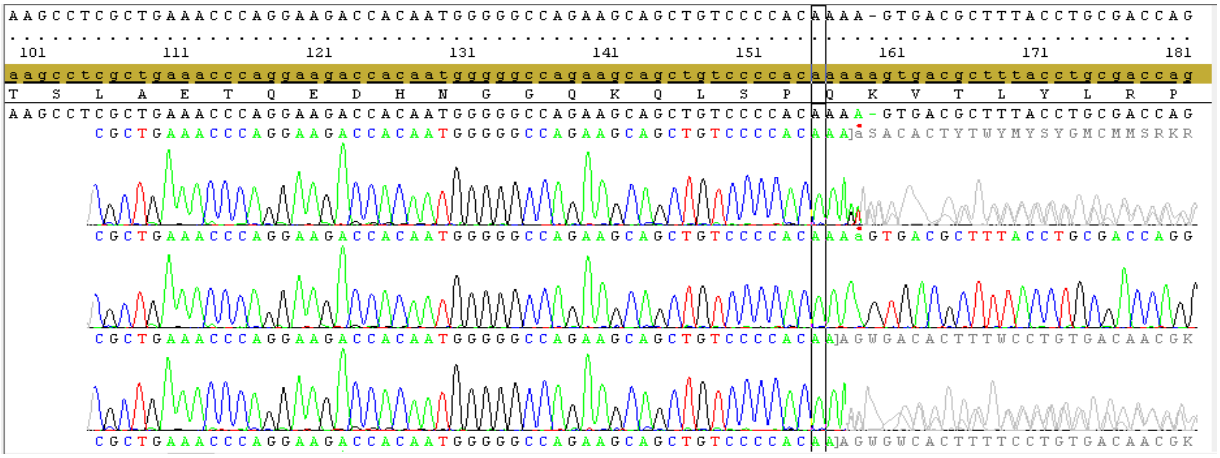
Tablo 4.5. LAD1 İle Tanıladığımız Hastalarda ITGB2 Geninde Tanımlanan Ve Doğrulanan Mutasyon Noktaları

Hasta	Exon	Nükleotid değişimi	Amino asit değişimi
H1	4	c.305_306delAA	p.(Lys102Serfs*39)
H2	4	c.305_306delAA	p.(Lys102Serfs*39)
H3	4	c.305_306delAA	p.(Lys102Serfs*39)
H4	4	c.305_306delAA	p.(Lys102Serfs*39)
H5	7	c.532C>T	p.Pro178Ser
H6	7	c.532C>T	p.Pro178Ser
H7	7	c.532C>T	p.Pro178Leu
H8	7	c.532C>T	p.Pro178Leu
H9	7	c.532C>T	p.Pro178Leu
H10	7	c.532C>T	p.Pro178Leu

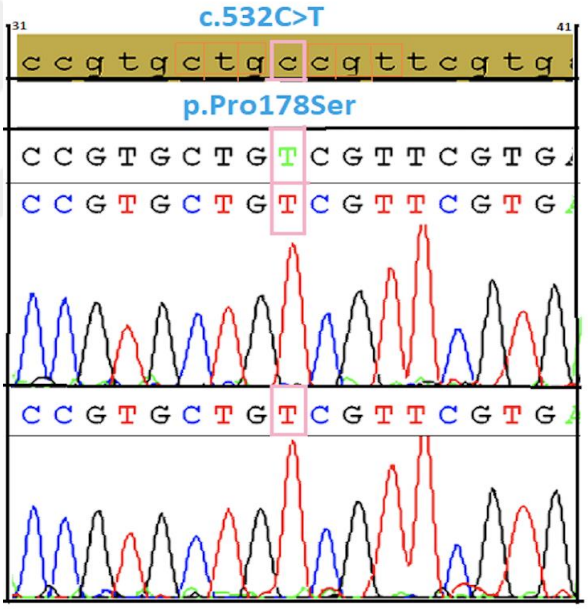
ITGB2 ye ait 16 exon bulunmaktadır. Farklı exon bölgelerinde mutasyonlar görülsede sekans analizi yaptığımız hastalarda mutasyonlar exon 4 ve exon 7 de bulunmaktaydı. Silinme ve missens mutasyonlar şeklindeydi.



Şekil 4.8. ITGB2 Geninde Oluşan Mutasyonların Exonic Bölgelerdeki Yerleşimi.



Şekil 4.9. Hasta 3'e Ait Sekans Analizi Sonucunun Elektroferogram Görüntüsü

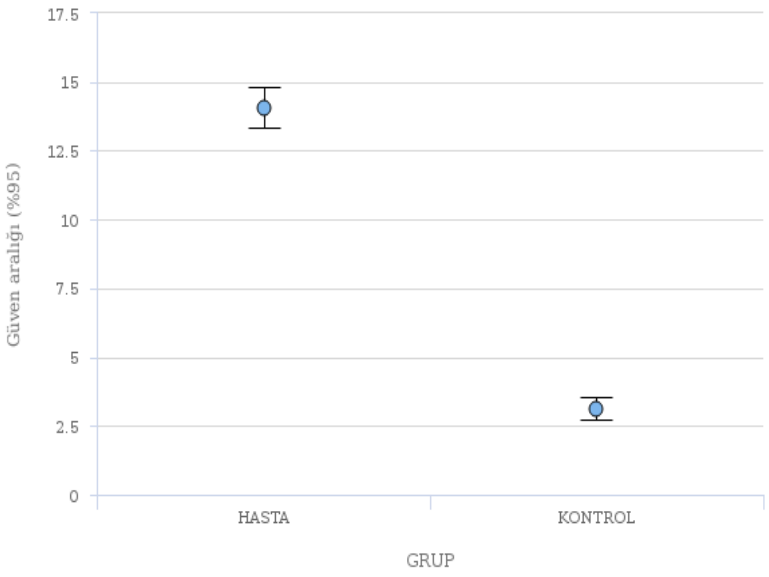


Şekil 4.10. Hasta 5'e ait sekans analizinin elektrogram görüntüsü. ITGB2 geninde yerleşik mutasyon noktası c.532C>T. (MH Celiksoy ve Ark., 2021)

4.5. Hasta ve Kontrol Grubunda Nötrofil Yüzdeleri Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

LAD1 hasta ve sağlıklı kontrol grubunda periferik kan örnekleri ile yapılan çalışmalarda: monoklonal antikor yüzey ekspresyonu ölçüm çalışmalarında elde edilen

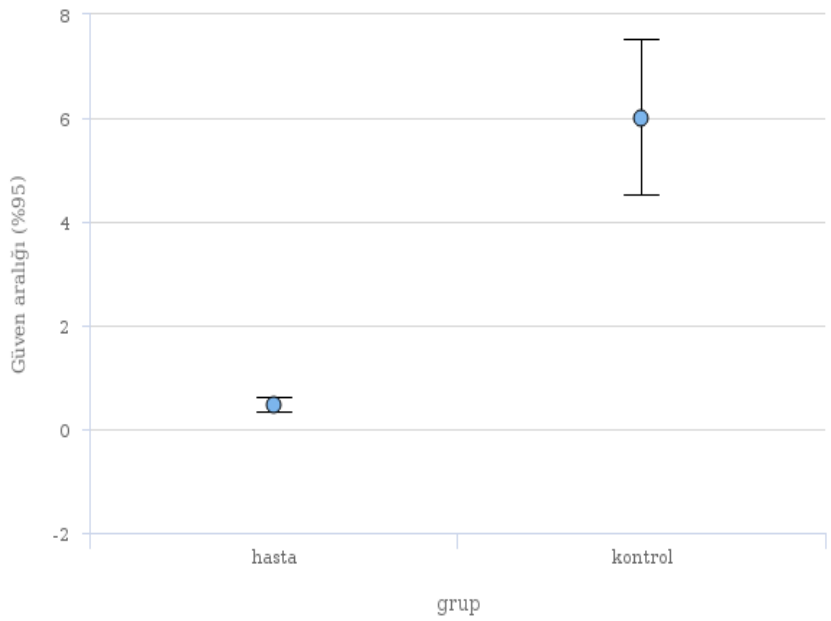
sonuçlar birbiri arasında karşılaştırıldı. Yapılan analizlerde, hasta ve kontrol grubunda nötrofil oranlarının her iki yöntemde istatistiksel açıdan birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. Gruplar arasında nötrofil ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. Nötrofil ortalama değeri hasta (14.049), kontrol (3.123) grubunda göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Nötrofil değerlerinin grup bazında karşılaştırmalı grafiği Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Hasta ve Kontrol Grubunda Nötrofil Sayılarının Karşılaştırması

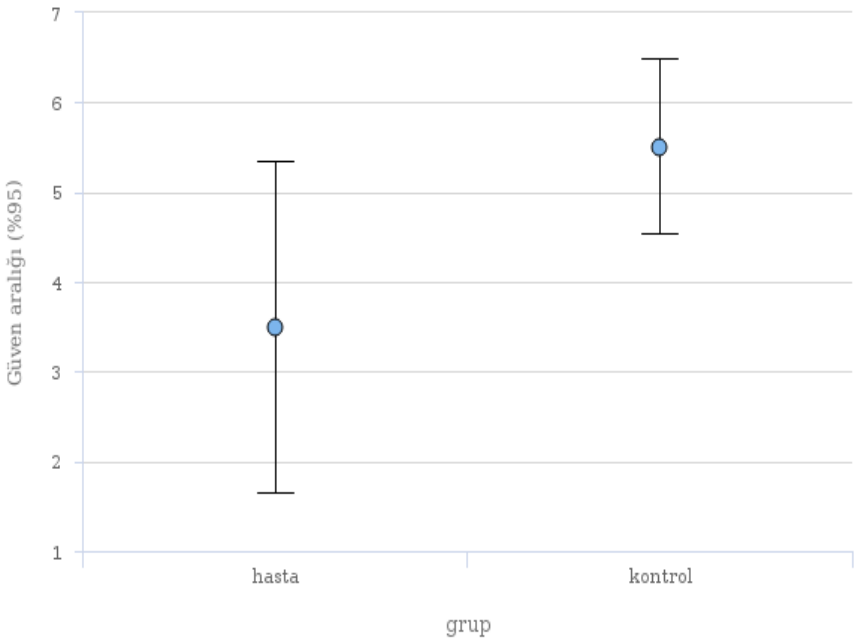
4.5.2. CD18 MFI değerlerinin hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması

LAD1 hasta ve sağlıklı kontrol grubunda periferik kan örnekleri ile yapılan çalışmalarda: monoklonal antikor yüzey ekspresyonu ölçüm çalışmalarında elde edilen sonuçlar birbiri arasında karşılaştırıldı. Yapılan analizlerde, hasta ve kontrol grubunda nötrofil oranlarının her iki yöntemde istatistiksel açıdan birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. Gruplar arasında CD11b MFI ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. CD11b MFI ortalama değeri kontrol (6.0108) grubunda, hasta (0.464) grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) CD11b MFI değerlerinin grup bazında karşılaştırmalı grafiği Şekil 4.12.'de verilmiştir.



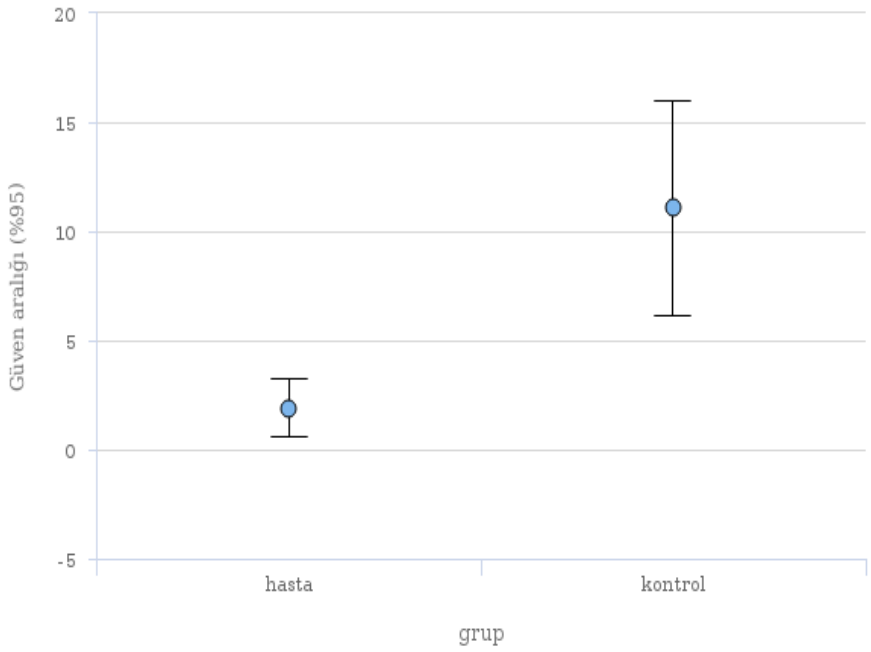
Şekil 4.8. Hasta ve Kontrol Grubunda CD11b MFI' lerinin Karşılaştırması

LAD1 hasta ve sağlıklı kontrol grubunda periferik kan örnekleri ile yapılan çalışmalarda: monoklonal antikor yüzey ekspresyonu ölçüm çalışmalarında elde edilen sonuçlar birbiri arasında karşılaştırıldı. Yapılan analizlerde, hasta ve kontrol grubunda nötrofil oranlarının her iki yöntemde istatistiksel açıdan birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. Gruplar arasında CD15 MFI ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. CD15 MFI ortalama değeri kontrol (B) (5.5026) grubunda, hasta (A) (3.491) grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (p=0.043). CD15 MFI değerlerinin grup bazında karşılaştırmalı grafiği Şekil 4.13.'de verilmiştir.



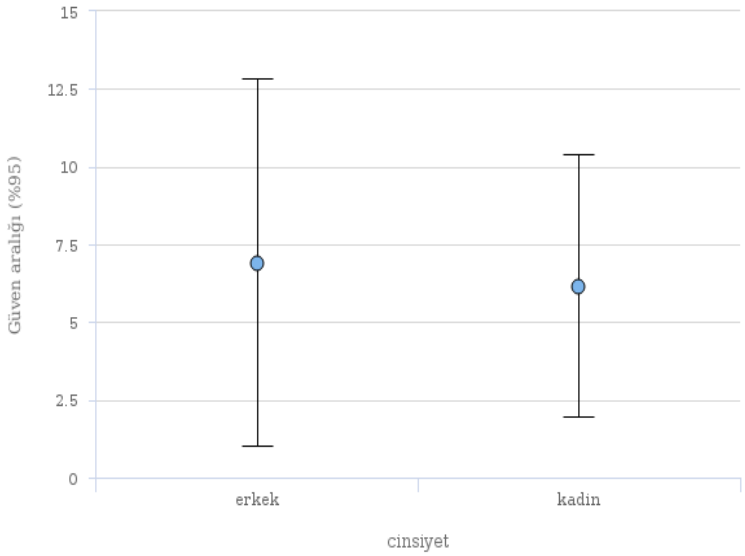
Şekil 4.9. Hasta ve Kontrol Grubunda CD15 MFI' lerinin Karşılaştırması

LAD1 hasta ve sağlıklı kontrol grubunda periferik kan örnekleri ile yapılan çalışmalarda: monoklonal antikor yüzey ekspresyonu ölçüm çalışmalarında elde edilen sonuçlar birbiri arasında karşılaştırıldı. Yapılan analizlerde, hasta ve kontrol grubunda nötrofil oranlarının her iki yöntemde istatistiksel açıdan birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. Gruplar arasında CD18 MFI ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. CD18 ortalama değeri kontrol (B) (11.0673) kategoride, hasta (A) (1.914) kategorisine göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) CD18 MFI değerlerinin grup bazında karşılaştırmalı grafiği Şekil 4.5.6.'de verilmiştir.



Şekil 4.14. Hasta ve Kontrol Grubunda CD18 MFI' lerinin Karşılatırması

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda yapılan çalışmalarda CD18 ekspresyonu ölçüm çalışmalarında elde edilen sonuçlar birbiri arasında karşılaştırıldı. Yapılan analizlerde, cinsiyet kategorisinde CD18 MFI ortalamaları açısından istatiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. (p =0.812) CD18 ekspresyon düzeyinin cinsiyet değişkeni bazında karşılaştırılmasına ait grafik Şekil 4.15. de verilmiştir.

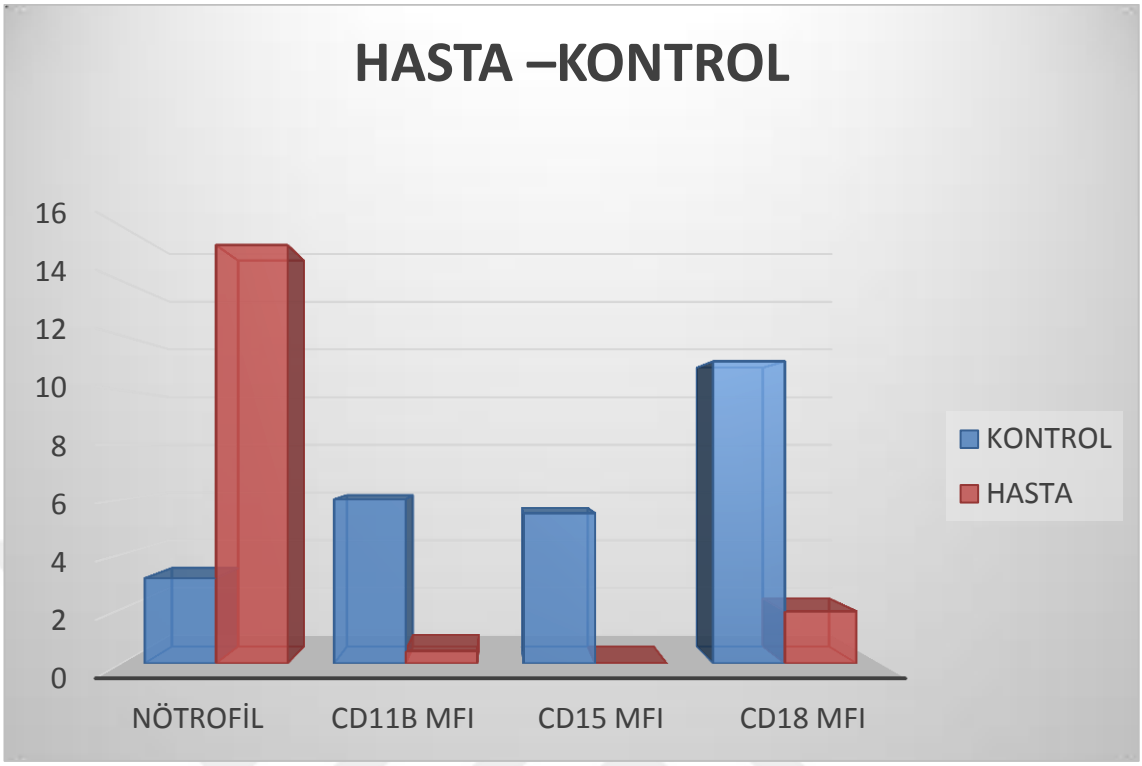


Şekil 4.10. CD18 Ekspresyon Düzeyinin Cinsiyet Değişkeni Bazında Karşılaştırması

LAD1 hasta ve sağlıklı kontrol grubunda periferik kan örnekleri ile yapılan çalışmalarda: CD11b, CD15, CD18 spesifik monoklonal antikorlarının yüzey ekspresyonu ölçümünden elde edilen MFI değerlerinin gruplar arası karşılaştırmasının ortalama değerlerinin (tablo 4.6.) sütun grafiği şeklinde gösterimi şekil 4.16. da verilmiştir.

Tablo 4.6. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Nötrofil,CD11(a, b, c), CD15, CD18 MFI Değerlerının Ortalamaları.

Ortalama	Nötrofil	Cd11a(Mfı)	Cd11b(Mfı)	Cd11c(Mfı)	Cd15(Mfı)	Cd18(Mfı)
H	15,31	0,721	0,464	0,593	3,491	1,914
K	3,12	4,32	4,55	5,63	5,71	8,67



Şekil 4.11. Hasta ve kontrol grubunun CD11b, CD15, CD18 spesifik monoklonal antikorlarının yüzey ekspresyonu ölçümünden elde edilen MFI değerlerinin ve nötrofil değerlerinin sütun grafiği kullanılarak gruplar arasında karşılaştırması.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Konakçının patojenlere karşı savunması için enfeksiyon bölgesine lökosit göçü gereklidir. Enfeksiyon bölgesinden salınan sitokin ve kemokinler bu süreci tetikler. Kan dolaşımından dokulara lökosit göçünde adezyon molekülleri de rol alır. Özellikle nötrofillerin damar endotel yüzeyine tutunması ve dokulara penetrasyonunda selektin ve integrin gibi adezyon molekülleri görev alır (Suhair Hanna and Amos Etzioni). Damar endotel yüzeyinde yer alan adezyon reseptörlerinin sentezinde ya da fonksiyonunda oluşabilecek bir kusur lökosit adezyon eksikliği (LAD) olarak tanımlanan otozomal resesif geçişli primer immün yetmezlik hastalığının oluşmasına neden olur. ITGB2 geni tarafından kodlanan β2 (CD18) integrin bozukluğunda LAD-1 olarak tanımlanan hastalık tablosu ortaya çıkar. Bu hastalarda periferik kanda lökosit (nötrofil) düzeyi arttığı halde enfeksiyon enfeksiyon odağına ulaşamadığı için bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı yeterli bağışıklık tepkisi ortaya konamaz. Beraberinde 20-50 bin düzeyinde lökosit sayısı, ağır enfeksiyon tablosu, göbek kordonunun geç ayrılması, periodontitis gibi klinik bulgular ön plana çıkar.

LAD-1 tanısal çalışmalarında birinci basamak laboratuvar testi WBC sayımı ve akım sitometri ile CD18/CD11b ekspresyon düzeyinin ölçümüdür. Hastalarda belirgin düzeyde>%90 dan fazla CD18 ekspresyonunda kayıp izlenir (Şekil4.3, 4.4).

Çalışmamızda 5 erkek ve 5 kız olmak üzere toplam 10 hasta ve 10 kontrol örneğinde integrin ekspresyonunun belirlenmesi için akım sitometri ile ITGB2 gen ürünü olan CD18 düzeyi ölçüldü. CD18 düzeyleri yanında tanımlayıcı olması için CD11a, CD11b, CD11c ve CD15 düzeyleride ölçüldü. Yaptığımız çalışmada hasta ve kontrollerin CD15 ekspresyon düzeyi normal bulundu. CD18 ekspresyonu hastalarda %1 den düşük bulundu. CD18 ekspresyonu ≤1 olan hastalar LAD1 yönünden izleme alındı.

Akım sitometride CD18 ekspresyon kaybı izlenen 10 hastada moleküler tanı için 21q22.3 kromozomun üzerinde bulunan, 17 ekzondan oluşan ITGB2 geninde Sanger sekanslama ile mutasyon taraması yapıldı. Sanger sekanslama sonucunda 5 hastada 4. ekzonda ve 5 hastada ise 7.ekzonda mutasyon tespit edildi. Ekson 7 de tespit edilen mutasyon. c.532C>T missense mutasyon olarak bulundu. Bu mutasyon daha önce Tako Kuijpers ve ark tarafından gerçekleştirilen çalışmada gösterilmiştir. Hastalarımızdan 5'inde ise 4. ekzon üzerinde ise c.305_306delAA mutasyonuna rastlandı.

Zhanga ve ark. 2019 yılında yaptığı çalışmada Itgb2 ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6pd) proteinlerinin protein ekspresyon seviyeleri sırasıyla akış sitometrisi ve glukoz-6-fosfat (G6P) substrat yöntemi ile değerlendirilmiş ve hasta ile ebeveynlerinin genetik varyasyonlarını araştırılmış, tüm ekzon dizilimi yapılmıştır. Bu çalışmanın Hematolojik inceleme sonucunda lökositler seviyelerinin artmış olduğu ve hastanın ITGB2 geninde, c.1537-1538 (c.1537-1538delGT) bölgesinde iki nükleotid delesyonu olduğu belirlenen ve p'den 24 amino asitlik bir çerçeve kaymasına neden olan yeni bir homozigot mutasyon tespit edilmiştir. Sonuç olarak hastaya orta düzeyde LAD-1 tanısı konulmuş.

Ocak 2015 yılında Madkaikar ve ark. Hintli 30 hastadan ve ebeveynlerinden yaptıkları LAD-I'nin altında yatan moleküler kusurları belirlemeyi yönelik ve klinikle ilişkilendirmeyi amaçlayan çalışmaları mutlak nötrofil sayısı, akım sitometrisi ile CD18 ekspresyonu ve sekans analizi ile ITGB2 geninde mutasyon karakterizasyonu yapmışlar ve 30 hasta da d LAD-I için fenotipik ve genotipik olarak değerlendirme yapmışlardır. Fenotipik olarak, 22 hasta LAD-I(0), 1 hasta LAD-I(-) ve 7 hasta sırasıyla CD18 ekspresyonu göstermeyen ve azalmış ekspresyon gösteren LAD-I(+) çıkmıştır.

E Van De Vijver ve arkadaşlarının Ocak 2012'de yayınlamış oldukları derlemede, ITGB2 geni için moleküler analizler sonucuna göre mutasyona uğramış alellerin sayısını, mutasyon tiplerini ve hangi ekzon bölgeleri üzerinde konumlandığını göstermişler, LAD-1 fenotiplerini listelemişlerdir. Ayrıca CD18/CD11 düzeylerinin akım sitometri ile tanısal çalışmalardan bahsetmişlerdir.

2021 yılında yayınlamış olduğumuz olgu sunumunda LAD-1 tanılı üç kardeş için akım sitometri ile CD11(a.b.c) ve CD18 düzeylerine bakılmış ve moleküler analiz yöntemi ile mutasyon taraması yapılmıştır.Sanger sekans analizinde , ITGB2 geninde c.532C>

T'de homozigot ve heterozigot missense varyantı olduğu ve pro178ser'in amino asit değişimin ile sonuçlandığı belirtilmiştir.

LAD1 hastalık tanısal sürecinde akım sitometrik analiz en önemli erken ve hızlı tarama testidir. Moleküler analizde son yıllarda gelişen teknolojiye bağlı olarak NGS yöntemi ile de hızla sonuca ulaşmak mümkün olabilmektedir.

Sonuç olarak laboratuvarımızda hastaların akım sitometri ve sanger sekans ile LAD-1 tanısı gerçekleştirldi. Moleküler tanı öncesi immün yetmzliklerde akım sitometri ile tarama yapılması, işlem maliyetini azaltarak daha ekonomik sonuca ulaşmaya fırsat vermektedir. Laboratuvarımızın akım sitometri uygulama birikimi birçok nadir hastalığın tanısal uygulamaları ve araştırmalarında kullanılacak ve yeni donanımlı insanların yetişmesine katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

Abbas, Abdul K., Lichtman, Andrew H., Pillai S. Cellular And Molecular Immunology Ninth Edition. Vol 53.; 2018.

Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. Annu Rev Immunol. 2009;27:339-362. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132554

Aytekin C, İkincioğullari A, Üniversitesi A, et al. Lökosit Adezyonu ve Lökosit Adezyon Defekti Sendromları Leukocyte Adhesion and Leukocyte Adhesion Deficiency Syndromes •. Vol 2.; 2004.

Calderwood DA. Integrin activation. J Cell Sci. 2004;117(5):657-666. doi:10.1242/jcs.01014

Carr R, Pumford D, Davies JM. Neutrophil Chemotaxis and Adhesion in Preterm Babies. Vol 67.; 1992. http://adc.bmj.com/

Celiksoy MH, Köker MY, Gezdirici A, Ozsoy S, Malbora B, Gungor S. A novel ITGB2 variant with long survival in patients with leukocyte adhesion defect type-I. Immunol Res. 2021;69(5):461-466. doi:10.1007/s12026-021-09222-3

Cox DP, Weathers DR. Leukocyte adhesion deficiency type 1: an important consideration in the clinical differential diagnosis of prepubertal periodontitis. A case report and review of the literature. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. 2008;105(1):86-90. doi:10.1016/j.tripleo.2007.02.026

Etzioni A, Tonetti M. Immunological Reviews Leukocyte adhesion deficiency II-from A to almost Z. Immunol Rev. 2000;178:138-147.

Etzioni A. Defects in the leukocyte adhesion cascade. Clin Rev Allergy Immunol. 2010;38(1):54-60. doi:10.1007/s12016-009-8132-3

Etzioni A. Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects. Curr Opin Immunol. 2009;21(5):481-486. doi:10.1016/j.coi.2009.07.005

Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies: Molecular basis, clinical findings, and therapeutic options. Adv Exp Med Biol. 2007;601:51-60. doi:10.1007/978-0-387-72005-0_5

Etzioni A. Leukocyte Adhesion Deficiency III - When Integrins Activation Fails. J Clin Immunol. 2014;34(8):900-903. doi:10.1007/s10875-014-0094-4

Flow Cytometry 2020 Catalog-Outside US Version.; 2020. www.beckman.com/home

Gazit Y, Mory A, Etzioni A, et al. Leukocyte adhesion deficiency type II: Long-term follow-up and review of the literature. J Clin Immunol. 2010;30(2):308-313. doi:10.1007/s10875-009-9354-0

Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. Ann N Y Acad Sci. 2012;1250(1):50-55. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06389.x

Harjunpää H, Asens ML, Guenther C, Fagerholm SC. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. Front Immunol. 2019;10(MAY). doi:10.3389/fimmu.2019.01078

Harris ES, Weyrich AS, Zimmerman GA. Lessons from rare maladies: Leukocyte adhesion deficiency syndromes. Curr Opin Hematol. 2013;20(1):16-25. doi:10.1097/MOH.0b013e32835a0091

Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. J Immunol. 2013;190(9):4451-4457. doi:10.4049/jimmunol.1203179

Hocdé SA, Hyrien O, Waugh RE. Cell adhesion molecule distribution relative to neutrophil surface topography assessed by TIRFM. Biophys J. 2009;97(1):379-387. doi:10.1016/j.bpj.2009.04.035

Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology, 5th Ed.

Jurk K, Schulz AS, Kehrel BE, et al. Novel integrin-dependent platelet malfunction in siblings with leukocyte adhesion deficiency-III (LAD-III) caused by a point mutation in FERMT3. Thromb Haemost. 2010;103(5):1053-1064. doi:10.1160/TH09-10-0689

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Kuby immunology, Sixth edition. In: Immunology. ; 2007.

Kumar A, Gupta A, Rawat A, Ahuja C, Suri D, Singh S. Brain Abscess in a Child with Leukocyte Adhesion Defect: An Unusual Association. J Clin Immunol. 2016;36(7):624-626. doi:10.1007/s10875-016-0315-0

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev Immunol. 2007;7(9):678-689. doi:10.1038/nri2156

Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. Trends Mol Med. 2003;9(6):263-268. doi:10.1016/S1471-4914(03)00071-6

Lühn K, Wild MK, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R, Vestweber D. The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. Nat Genet. 2001;28(1):69-72. doi:10.1038/ng0501-69

Madkaikar M, Italia K, Gupta M, et al. Molecular characterization of leukocyte adhesion deficiency-I in Indian patients: Identification of 9 novel mutations. Blood Cells, Mol Dis. 2015;54(3):217-223. doi:10.1016/j.bcmd.2015.01.012

McDowall A, Svensson L, Stanley P, et al. Two mutations in the KINDLIN3 gene of a new leukocyte adhesion deficiency III patient reveal distinct effects on leukocyte function in vitro. Blood. 2010;115(23):4834-4842. doi:10.1182/blood-2009-08-238709

Metzemaekers M, Gouwy M, Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. Cell Mol Immunol. 2020;17(5):433-450. doi:10.1038/s41423-020-0412-0

Muller WA. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response.; 2002.

Murphy K, Weaver C, Janeway C. Janeway ’s Immunobiology 9Th Edition.; 2017.

Nuzzi PA, Lokuta MA, Huttenlocher A. Analysis of Neutrophil Chemotaxis 23 23 Analysis of Neutrophil Chemotaxis. Vol 370. Adhesion Protein Protocols

Parvaneh N, Mamishi S, Rezaei A, et al. Characterization of 11 new cases of leukocyte adhesion deficiency type 1 with seven novel mutations in the ITGB2 gene. J Clin Immunol. 2010;30(5):756-760. doi:10.1007/s10875-010-9433-2

Petri B, Sanz MJ. Neutrophil chemotaxis. Cell Tissue Res. 2018;371(3):425-436. doi:10.1007/s00441-017-2776-8

Phillips ML, Schwartz BR, Etzioni A, et al. Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2. J Clin Invest. 1995;96(6):2898-2906. doi:10.1172/JCI118361

Priel DL, Kuhns DB. Assessment of Neutrophil Function. In: Clinical Immunology. Elsevier; 2019:1273-1282.e1. doi:10.1016/b978-0-7020-6896-6.00094-6

Sperandio M, Gleissner CA, Ley K. Glycosylation in immune cell trafficking. Immunol Rev. 2009;230(1):97-113. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00795.x

Steeber DA, Tedder TF. Selectin Integrin Adhesion Leukocyte Vascular Endothelium Migration Inflammation Deficient Mice Adhesion Molecule Cascades Direct Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Migration During Inflammation.; 2000.

Stepensky PY, Wolach B, Gavrieli R, et al. Leukocyte Adhesion Deficiency Type III: Clinical Features and Treatment With Stem Cell Transplantation. Vol 37.; 2015. www.jpho-online.com

Svensson L, Howarth K, McDowall A, et al. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. Nat Med. 2009;15(3):306-312. doi:10.1038/nm.1931

Takagi J, Springer TA. Integrin activation and structural rearrangement. Immunol Rev. 2002;186:141-163. doi:10.1034/j.1600-065X.2002.18613.x

van de Vijver E, Maddalena A, Sanal Ö, et al. Hematologically important mutations: Leukocyte adhesion deficiency (first update). Blood Cells, Mol Dis. 2012;48(1):53-61. doi:10.1016/j.bcmd.2011.10.004

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 96681246/
Konu :

14.11.2019

Sayın Prof. Dr. Mustafa Yavuz Köksal
İmmunoloji

Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 13.11.2019 tarihinde yapılan toplantıda çalışmanız ile ilgili alınan Etik Kurul Kararı ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

Eki: ..... adet

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Lökosit adezyon defektinde genetik ve patogenez arasındaki ilişkinin fonksiyonel testler ile araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI		Açıklama
SİGORTA	[ ]	
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	[ ]	
BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	[ ]	
İLAN	[ ]	
YILLIK BİLDİRİM	[ ]	
SONUÇ RAPORU	[ ]	
GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	[ ]	
DİĞER	[ ]	

KARAR BİLGİLERİ

Karar No : 2019/768 Tarih : 13.11

Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Sema Kader KÖSE

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma İle İlişki		Katılım (*)	
Prof. Dr. Sema Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E [ ]	K [x]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı.	E.Ü. Tıp Fak..	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Prof.Dr.Murat SİPAHİOĞLU	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Prof.Dr.Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Doç. Dr. Yusuf SEVİM	Genel Cerrahi	Kayseri Eğitim Hast.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek.Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Doç. Dr. Mehmet DOLANBAY	Kadın Hast. ve Doğum	E.Ü. Tıp Fak..	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Doç. Dr. Fatih KARDAŞ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak..	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Doç. Dr. Serpil TAHERİ	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak..	E [ ]	K [x]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Doç.Dr.Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Doç. Dr. Adnan BAYRAM	Anest ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Dr.Öğr.Üyesi Kemal Erdem BAŞARAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Av. Tuğba TANRIVERDİ	Avukat	E.Ü. Tıp Fak.	E [ ]	K [x]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E [ ]	K [x]	E [ ]	H [x]	E [x]	H
Sevtap KOÇER	Sivil Üye	Serbest	E [ ]	K [x]	E [ ]	H [x]	E [ ]	H

*: Toplantıda Bulunma

VE MÜZAKERE DEFTERİ

No.

KARAR SIRA NO.	KARARA ESAS OLAN EVRAKIN TARİHİ	NO.	NEREDEN GÖNDERİLDİĞİ	GÜNDEM
37	10.10.2019			

Toplantı Tarihi : 10 10 2019

Başkan : Prof Dr. Mustafa Yavuz Köksal

Üyeler : Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Avcılar

Etik kurul başvurusu

KARAR

Prof Dr. Mustafa Yavuz Köksal'ın yürütücüsü olduğu, "Lokasit Adezyon defektinde genetik ve patogenez arasındaki ilişkinin fonksiyonel testler ile araştırılması" adlı çalışması için Etik Kurul başvurusu yapılması uygun bulunmuştur.

VE MÜZAKERE DEFTERİ

No.

KARAR SAYFA NO	KARARA ESAS OLAN EVRAKIN TARİHİ	NO.	NEREDEN GÖNDERİLDİĞİ	GÜNDEM
63				

Toplantı Tarihi: 13 01 2020.
Başkan: Prof. Dr. Mustafa Yavuz Köker
Üyeler: Dr. Öğ. üyesi Hüseyin Avcılar

Yüksek Lisans öğrenci Sanpal Günpar Tez başlama

KARAR

Danışmanlığını Prof. Dr. Mustafa Yavuz Köker'in yürütçü immünoloji yüksek lisans öğrencisi Sanpal Günpar'ın tez konusu "Lokasit aktivasyon defektinde tanısında genetik ve akım sitometrik testlerin uygulanması" karar verilmiş tez önerisi kabul edilmiştir. Öğrenciye başarılar dileriz.

LÖKOSİT ADEZYON DEFEKTİ TANISINDA GENETİK VE AKIM SİTOMETRİK TESTLERİN UYGULANMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%3	%3	%1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.aai.org.tr İnternet Kaynağı	%2
2	X. Lu, D. Lu, M. Scully, V. Kakkar. "The Role of Integrin-Mediated Cell Adhesion in Atherosclerosis: Pathophysiology and Clinical Opportunities", Current Pharmaceutical Design, 2008 Yayın	<%1
3	S.A. Khajehoddin, A. Bakhshai, P.K. Jain. "A Current Flow Model for m-Level Diode-Clamped Multilevel Converters", IECON 2006 - 32nd Annual Conference on IEEE Industrial Electronics, 2006 Yayın	<%1
4	export.arxiv.org İnternet Kaynağı	<%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	retinavitreus.dergisi.org İnternet Kaynağı	<%1

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Songül GÜNGÖR

Uyruğu: Türkiye (T.C)

Doğum Tarihi ve Yeri:

Medeni Durumu:

Email:

EĞİTİM

Derece Kurum Mezuniyet Tarihi

Lisans: Erciyes üniversitesi/ Sağlık Bilimleri Fakültesi /Hemşirelik /2013

Lisans: Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi **/Fen Fakültesi /** Moleküler Biyoloji ve Genetik /2019

İŞ DENEYİMLERİ

2014-…: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi/Dermatoloji Servisi/ Hemşire

YABANCI DİL: İngilizce

Tez İle İlişkili Yayınımız;

https://link.springer.com/article/10.1007/s12026-021-09222-3

Immunologic Research
https://doi.org/10.1007/s12026-021-09222-3

BRIEF REPORT

A novel *ITGB2* variant with long survival in patients with leukocyte adhesion defect type-I

Mehmet Halil Celiksoy[1] · Mustafa Yavuz Köker[2] · Alper Gezdirici[3] · Sevil Ozsoy[2] · Baris Malbora[4] · Songul Gungor[2]

Received: 6 July 2021 / Accepted: 23 July 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract
Leukocyte adhesion deficiency is an autosomal recessive primary immunodeficiency that has been divided into three types: LAD1 (beta-2 integrin (CD18) family deficiency/defect), LAD2 (absence of fucosylated carbonhydrate ligands for selectins) and LAD3 (defective activation of all beta integrins). However, recently LAD4 has been described in cystic fibrosis patients, with a defect in integrin activation reported in monocytes. LAD-I is the most common type and prevalence of 1 in 1,000,000 live births. Clinical features of LAD patients are recurrent bacterial and fungal infections, omphalitis with delayed umbilical stump separation, significant leukocytosis especially neutrophilia during infection periods, impaired pus formation, and delayed traumatic or surgical wound healing. Flow cytometry is considered a useful tool for rapid diagnosis of the disease. The study of CD18 and CD11 (a, b, c) expression patterns in peripheral blood leukocytes helps to distinguish different phenotypes of LAD-I. In general, patients with $\geq 2\%$ CD18 expression tend to have a less severe infection and often survive until adulthood, whereas $< 2\%$ CD18 expression often results in death in infancy. In this case report, three siblings, 10, 15, and 17 years old, diagnosed with leukocyte adhesion defect type 1 in adolescence age group, are presented.

Keywords Leukocyte adhesion defect · Children · Immunodeficiency · Adolescence