

Dihidrorhodamin Testi ile Oksidatif Patlama: Sağlıklı Kontrollerde Referans Değerleri

Oxidative Burst with Dihydrorhodamine Test: Reference Values in Healthy Controls

Dilek Çiçekkökü, İsmail Öğürlü, Elif Karakoç-Aydiner, Safa Barış, Ayça Kıykım, Ahmet Özen, Işıl Barlan

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

İletişim adresi:

Dr. Safa Barış
Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim
ve Araştırma Hastanesi, Pediatrik
Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı, 34899,
Üst Kaynarca, Pendik, İstanbul
Tel: 0216 - 625 45 45 / 7811

e-posta: safabaris@hotmail.com

©2015 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2015.426

Geliş tarihi: 08 Ağustos 2015
Kabul tarihi: 18 Ağustos 2015

Amaç: Bu çalışmada dihidrorhodamin (DHR) testinde stimülasyon indeksi (Sİ) ve varyasyon katsayısı (VK) verilerinin sağlıklı kontrollerdeki referans değerleri bildirildi.

Gereç ve yöntemler: Çalışmaya primer immün yetmezlik uyarıcı bulgusu ve kronik hastalığı olmayan 210 sağlıklı kontrol alındı. Veri analizleri tam olan 184 birey (67 kız, 117 erkek; ort. yaş 9.0±9.6 yıl; dağılım 0.3-59.2 yıl) değerlendirmeye alındı. Sağlıklı kontrollerden 2 mL'lik periferik kan örnekleri alındı ve akan hücre ölçer tüplerinde eritrositlerin lizisi sağlandı. Hücreler Hank tamponlu tuz solüsyonu (HBSS) ile iki kez yıkandı ve 50 ng/mL forbol miristat asetat (PMA) stimülasyonu ile 37 °C'de 14 dakika süreyle inkübe edildi. Hücreler bekletilmeden, BD FACS Calibur akan hücre ölçer cihazında granülositlerden kapı alınarak değerlendirme yapıldı. PMA uyarımlı nötrofillerden elde edilen floresan yoğunluğunun geometrik ortalamasına oranı, uyarımsız değerlere bölünerek SI hesaplandı. Akan hücre ölçer cihazında PMA uyarımlı hücrelerin histogramda X eksenindeki floresan yoğunluğunun VK değerleri elde edildi.

Bulgular: Sağlıklı kontrollerde, Sİ değerinin 20.1-125.2 (ort. 36.75±18.3) aralığında değiştiği gözlemlendi. Aynı seride, VK değeri 9.9-25.2 arasında (ort. 18.2±3.7) idi.

Sonuç: Dihidrorhodamin testi kronik granüloamatöz hastalık için tanısal bir test olmasının yanı sıra, bu hastalığın kalıtım şeklinin ve taşıyıcıların belirlenmesinde de yararlıdır. Hastaların ve taşıyıcıların değerlendirilmesinde burada sunulan değerler referans veri olarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Kronik granüloamatöz hastalık; dihidrorhodamin; oksidatif patlama.

Objectives: In this study, we report reference data of stimulation index (SI) and variation coefficient (VC) data in dihydrorhodamine test in healthy controls.

Materials and methods: Two hundred ten healthy controls without primary immunodeficiency warning signs and chronic disease were enrolled in this study. Evaluation was performed in 184 individuals (67 females, 117 males; mean age 9.0±9.6 years; range 0.3 to 59.2 years) with full data analysis. 2 mL peripheral blood samples were taken from healthy controls and lysis of erythrocytes was provided in flow cytometer tubes. The cells were washed twice with Hank's buffered salt solution (HBSS) and incubated at 37 °C for 14 minutes in the 50 ng/mL phorbol myristate acetate (PMA) stimulation. The cells were immediately evaluated using gating granulocytes in the BD FACS Calibur flow cytometer tool. The SI was calculated by dividing the ratio of geometric mean of fluorescence intensities obtained from PMA stimulated neutrophils to non-stimulated values. In flow cytometry, VC values of fluorescence intensity on the x-axis of histogram were obtained in PMA stimulated cells.

Results: In the healthy controls, SI values were observed to vary ranging between 20.1 and 125.2 (mean 36.75±18.3). In the same series, VC values were between 9.9-25.2 (mean 18.2±3.7).

Conclusion: Besides the use of a diagnostic test for chronic granulomatous disease, DHR test is useful in identifying the inheritance type of this disease and carriers. Values presented herein can be used as reference data for the assessment of patients and carriers.

Key words: Chronic granulomatous disease; dihydrorhodamin; oxidative burst

Kronik granülomatöz hastalık (KGH); bakteri ve mantarların neden olduğu yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar ve granülom oluşumu ile tanımlanan, bağışıklık sisteminin birincil hastalığıdır. Hastalık ilk kez 1954 yılında Janeway ve ark.^[1] tarafından tanımlanmıştır. Kronik granülomatöz hastalık doğal immün yanıtın bir elemanı olan fagosit hücrelerin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzim sistemindeki bozukluğuna bağlıdır ve dünyada 200.000-250.000'de 1 sıklıkta görülmektedir.^[2-4] Ülkemizdeki akraba evliliği oranlarının yüksek olması nedeni ile otozomal çekinik kalıtım daha sık (%60-70) görülmektedir.^[5]

Kronik granülomatöz hastalıklı olgularda hücre içi mikroorganizmaların öldürülememesi sonucu özellikle katalaz pozitif *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Burkholderia cepaci*, *Aspergillus*, *Candida* ve *Nocardia* enfeksiyonlarına yatkınlık oluşmaktadır. Tekrarlayan enfeksiyonlar dışında çeşitli otoimmün hastalıklar, kolit, lenfadenopati ve granülomlar kliniğe eşlik eder.

Kalıtım tipinin ayırt edilmesinde (X'e bağlı ya da otozomal resesif) hem pozitif aile öyküsü hem de ebeveyn ve kardeşlerin granülosit fonksiyon testleri önem kazanır. Nötrofillerde oksidatif patlama fonksiyonunun semikantitatif tayini olarak nitroblutetrazolium (NBT) testi, KGH tanısında basit bir test olup yerini akan hücre ölçerde enzim rezidüel aktivitesinin dihidrorhodamin (DHR) indirgenme testi tayinine bırakmıştır. Dihidrorhodamin testi ile X'e bağlı geçişin taşıyıcıları da saptanabilir. Otozomal resesif KGH'nin görüldüğü ailelerdeki taşıyıcıları saptamak ise sadece mutasyon analizi ile mümkündür.^[4,5]

Nötrofil oksidatif patlama aktivitesini belirlemek amacı ile yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan NBT testinde, normal nötrofillerin nitroblue tetrazoliumu formazana indirgemesi sonucu mikroskop üzerinde koyu mavi pigmentler gözlenmektedir. Kronik granülomatöz hastalıkta nötrofiller süperoksit üretmediğinden bu indirgenme gerçekleşemez ve boya sarı renkli olarak kalır.^[6] Nitroblutetrazolium testinde mikroskop aracılığı ile tanı konulmakta, dolayısı ile değerlendirmeyi yapan kişinin bu konuda deneyimli olması gerekmektedir. Dihidrorhodamin ise fagosit hücrelerde mitokondriye yerleşmekte ve uyarım sonrasında oksijen radikalleri ve peroksinitritin etkisi ile güçlü floresan özellikteki rhodamine indirgenmektedir. Rhodamin, 488 nm'de ışık yaydığı için güçlü floresan sonucu akan hücre ölçer cihazında histogramdaki değişikliğe göre analiz yapılmaktadır. Dihidrorhodamin testinin; hızlı, güvenilir ve NBT testine göre daha üstün bir test olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^[7,8]

Bu çalışmada amacımız, merkezimizde KGH'lerin ön tanısında rutin olarak kullanılan DHR testinin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere, sağlıklı bireylerdeki referans değerlerinin belirlenmesi ve sunulmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kan örnekleri ve kimyasallar

Çalışmada 210 sağlıklı kontrolden 2 mL kan örnekleri EDTA'lı (etilen diamin tetra asetik asit) tüpler içerisinde toplandı ve 12 saat içerisinde örnekler kullanıldı. 1 mg DHR (Sigma Aldrich, Poole, UK.) 1 mL dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, Poole, UK.) içerisinde çözülerek, DHR stok solüsyonu hazırlandı ve -80 °C'de saklandı. Çalışma solüsyonu olarak 29 mM DHR kullanıldı. Dihidrorhodamin testi içerisinde nötrofilleri aktive edici uyarıcı olarak forbol miristat asetat (PMA) (çalışma solüsyonu: 5 ng/mL) (Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Germany) kullanıldı. 10X lizis solüsyonu; 500 mL distile su, 41.5 g amonyum klorid, 4.2 g sodyum bikarbonat, 10 mL 0.5 M EDTA karıştırılarak elde edildi. Çalışmada 1000 U/mL konsantrasyonda kullanılan katalaz (Sigma Aldrich, Poole, UK.) solüsyonu, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) tampon kullanılarak seyreltilti. Elde edilen sonuçlardan Sİ<20 ve VK>25 olan değerleri içeren 26 kişi değerlendirme dışında bırakıldı. Değerlendirme, 184 bireyde (67 kız, 117 erkek; ort. yaş 9.0±9.6 yıl; dağılım 0.3-59.2 yıl) yapıldı.

Fagositik hücrelerin hazırlanması

5 mL'lik akan hücre ölçer tüplerine 200 µL EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden eklendi. Üzerine 1:10 oranında 2 mL lizis çalışma solüsyonu ilave edildi ve oda ısısında beş dakika inkübe edildi. Solüsyon oda ısısında 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler iki kez HBSS çalışma solüsyonu ile yıkandı ve fagositik hücreler teste hazır hale getirildi.

Hücrelerin PMA ile stimülasyonu

Hücelere 400 µL HBSS tampon çözeltisi içerisinde DHR ve katalaz çalışma solüsyonları eklendi ve tüpler 37 °C'de beş dakika su banyosu içerisinde inkübe edildi. Katalaz, hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürerek etkisizleştirmekte ve bu şekilde reaktif oksijen ara ürünleri miktarını kontrol ederek, konak dokuyu ve hücreleri korumaktadır. Daha sonra hücreler 200'er µL olarak, iki ayrı akan hücre ölçer tüpüne bölündü. Tüplerden bir tanesine uyarıcı olarak PMA, diğerine ise HBSS tampon çözeltisi eklendi ve tüpler 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi.

Akan hücre ölçer analizi

Analiz için BD FACS Calibur cihazı ve Cellquest yazılım programı kullanıldı (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA). Canlı nötrofiller etrafında oluşturulan kapılama ile hücre dağılımı histogram olarak görüntüldü. Histogram görüntülerinde X eksenini floresan yoğunluğunu, Y eksenini ise hücre sayılarını göstermektedir. Histogramlarda nötrofil gruplarının sınırları belirlenerek analizler yapıldı.

Stimülasyon indeksi (Sİ) ve varyasyon katsayısı (VK)

Stimülasyon indeksi, PMA ile uyarılan örneklerde elde edilen floresan yoğunluğu geometrik ortalamasının, uyarılmayan örneklerde elde edilen floresan yoğunluğu geometrik ortalamasına oranlanması ile hesaplandı. Ayrıca, PMA ile uyarılan hücrelerin X eksenini üzerindeki floresan yoğunluğunun VK'si elde edildi. Elde edilen histogram görüntüleri, Sİ değerleri ve VK değerleri sağlıklı kişilerdeki standart referans aralıklarının belirlenmesinde kullanıldı.

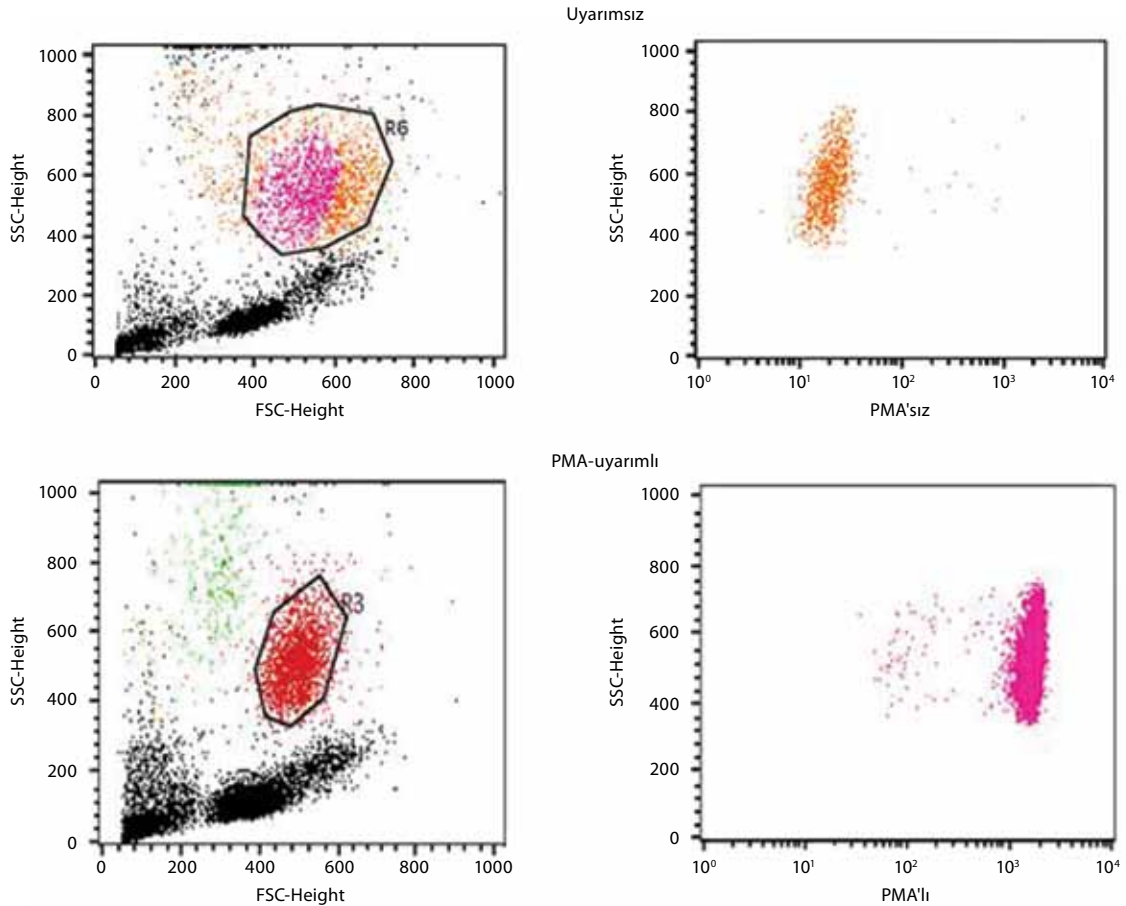
BULGULAR

Dihidrorhodamin testi yapılan tüm kontrol grubunun nötrofil hücrelerinin sağlıklı nötrofil grubunda

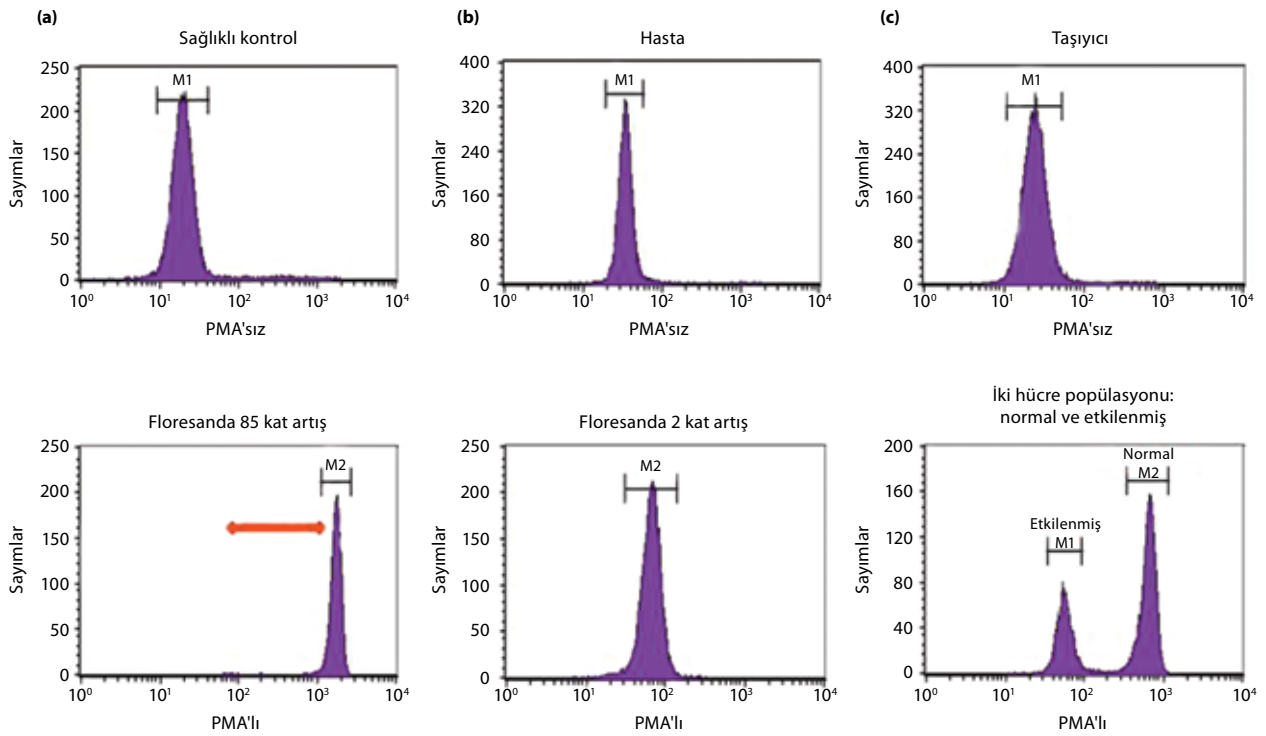
olduğu gözlemlendi (Şekil 1). Çalışmada elde edilen sağlıklı kontrol histogram görüntüsü örneği ve merkezimizde rutin olarak yapılan DHR testlerinde hasta ve taşıyıcı olarak belirlenen bireylerin histogram görüntü örnekleri Şekil 2'de verildi. Sağlıklı bireylerde, Sİ değerinin 20.1-125.2 (ort. 36.8 ± 18.3) aralığında değiştiği gözlemlendi. Aynı seride, VK değeri 9.9-25 arasında (ort. 18.2 ± 3.7) bulundu (Tablo 1).

TARTIŞMA

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz enziminin katalitik merkezi, fagosit oksidazın 91 kDa glikoprotein alt ünitesinin (gp91^{phox}) içinde bulunmaktadır. X kromozomu üzerindeki CYBB geni tarafından kodlanan gp91^{phox} proteinindeki bozukluk X'e bağlı KGH'ye yol açar. gp91^{phox} proteininin maksimum stabilizasyonunun sağlanması için CYBA geni tarafından kodlanan p22^{phox} adı verilen başka bir integral proteine gereksinim duyulmaktadır. Enzimin aktivasyonu için sitozolik bileşenler olan, NCF1 (neutrophil cytosolic factor 1) geni tarafından kodlanan p47^{phox} ve NCF2 geni tarafından kodlanan p67^{phox} proteinlerinin, gp91^{phox} ve gp22^{phox} proteinlerinden oluşan heterodimerik zar kompleksi ile bir araya gelmesi



Şekil 1. Kontrol grubundaki nötrofil hücrelerin PMA uyaranlı ve uyarısız şartlardaki hücre grubu. SSC: Yana saçılım; FSC: İleri saçılım; PMA: Forbol miristat asetat.



Şekil 2. (a) Sağlıklı kontrol, (b) hasta ve (c) taşıyıcı bireylerin dihidrorhodamin testinde gözlemlenen histogram görüntüleri. PMA: Forbol miristat asetat.

gerekir. gp22^{phox}, p47^{phox} ve p67^{phox} proteinlerini kodlayan bu genlerdeki mutasyonlar otozomal çekinik KGH'ye yol açar. Nadiren, NADPH enziminin pozitif ve negatif regülatörü olan sitoplazmik bileşenlerinden gp40^{phox} proteinindeki herhangi bir eksiklik de otozomal resesif KGH'de gözlenir. X'e bağlı geçiş tüm KGH hastalarının %60-70'inde gözlenir iken özellikle akraba evliliğinin sık olduğu toplumlarda otozomal çekinik tiplerin sıklığı artar.^[3,4,9,10] Dihidrorhodamin testi KGH tanısında pratik olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu test ile elde edilen histogram özelliklerine göre X'e bağlı veya otozomal çekinik tipler arasında ayırım yapılabilmesinin yanında, taşıyıcılık durumu da saptanabilmektedir.^[11] Gerek tanısal amaçlı, gerekse aile için hastalık taraması açısından DHR testinin yapılması bu hastalıkta büyük yarar sağlamaktadır.

Fagositer hücrelerdeki oksidaz sistemi NADPH'den moleküler oksijene elektron geçişini, böylece süperok-

sit ve diğer reaktif oksijen radikallerinin (ROS: reactive oxygen species) oluşumunu sağlar. Oksijen tüketimi ile süperoksit ve metabolitlerinin oluşumu solunumsal patlama olarak adlandırılır.^[12] Sağlıklı bireylerde PMA ile uyarılan nötrofillerde oluşan bu ROS'ler, DHR'nin güçlü floresan özellikteki rhodamine indirgenmesini sağlamaktadır ve akan hücre ölçer cihazında gerçekleştirilen DHR testinin temelini oluşturmaktadır. Reaktif oksijen radikallerinin üretildiği durumda, histogram görüntüsünde floresan etki ile sağa kayma gerçekleşecektir (Şekil 2a). Bu ara ürünlerin bir bozukluk sonucu üretilemediği durumda ise akan hücre ölçerde sağlıklı bireylerde gözlenen DHR'nin rhodamine indirgenmesi gerçekleşmediği için sağlıklı bireylerde gözlenen floresan etki oluşmaz ve histogram görüntüsü solda kalır (Şekil 2b).

Dihidrorhodamin yönteminde hasta, taşıyıcı ve sağlıklıların birbirinden ayrılmasında histogram görüntüsünün yanında Sİ ve VK değerleri de kullanılmaktadır. Stimülasyon indeksi değeri olarak hasta ve sağlıklı bireyler arasında 100 kata kadar varan bir farklılık bulunabilmektedir,^[7] bununla birlikte farklı laboratuvarlarda yapılan DHR testlerinde farklı Sİ değerleri elde edilebilmektedir. Bu farklılık testlerin farklı merkezlerde optimize edilmesi sırasında gerçekleşebilecek bir durumdur. Örneğin, Hacettepe Üniversitesi'nde gerçekleştirilen çalışmada, sağlıklı kontrollerin Sİ değeri

TABLO 1

Sağlıklı bireylerde stimülasyon indeksi ve varyasyon katsayısı değerleri

	Ort.±SS	Minimum-Maksimum
Stimülasyon indeksi	36.8±18.3	20.1-125.2
Varyasyon katsayısı	18.2±3.7	9.9-25

Ort.±SS: Ortalama ± standart sapma.

60-107 (ort. 79.6 ± 15.4) arasında bulunmuştur.^[8] Bu çalışmada ise sağlıklı kontrol örneklerimizin 20.1-125.2 (ort. 36.8 ± 18.3) arasında olduğu bulundu. Histogram görüntülerinin yanında kullanılan diğer bir parametre ise VK değeridir. Çalışmamızda bu değer, yine diğer merkezlere göre farklı olarak bulundu ve 9.9-25 arasında (ort. 18.2 ± 3.7) hesaplandı.

Çalışmamıza, sağlıklı kontrollerde referans aralığı oluşturmak üzere, ilk olarak primer immün yetmezlik uyarıcı bulgusu ve kronik hastalığı olmayan 210 kişi alındı. Yapılan değerlendirmelere ve Sİ ve VK değerlerine göre, Sİ<20 ve VK>25 olan 26 kişi çalışmadan çıkarıldı ve tüm analiz ve hesaplamalar kalan 184 kişi için yapıldı. Çalışmadan çıkarılan 26 kişiye, KGH taşımadığının ispatlanması için, laboratuvarımızda rutin olarak uygulanan NBT testi ve tekrar DHR testi uygulandı. Yapılan testler sonucu bu kişilerin sonuçları normal olarak bulundu, fakat verilerin güvenliği için yapılan analizlere tekrar eklenmedi ve ilk sonuçları göz önünde tutuldu.

Sonuç olarak, merkezimizde elde ettiğimiz referans verileri, KGH'li olguların değerlendirilmesinde yardımcı olacaktır. Ayrıca yapılacak ve referans verilerimize göre değerlendirilecek DHR testi ile X'e bağlı ve otozomal resesif alt tiplerin belirlenmesi sağlanacaktır. Kronik granülatöz hastalığının alt gruplarının değerlendirilmesinde Sİ değerleri önemli derecede bilgi vermektedir, fakat tek başına yeterli olmamaktadır. Stimülasyon indeksinin çok düşük olmadığı bazı otozomal resesif kalıtılan alt tiplerde VK'de artışın uyarıcı olduğu unutulmamalıdır.

Teşekkür

Merkezimizde DHR testinin optimizasyonu için bizden yardımlarını esirgemeyen, Erciyes Üniversitesi'nden Doç. Dr. Yavuz Köker'e ve doktora öğrencisi Berkay Saraymen'e teşekkürlerimizi sunarız.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Janeway CA, Craig J, Davidson M, Downey W, Gitlin D, Sullivan JC. Hypergammaglobulinemia associated with severe, recurrent and chronic non-specific infection. *Am J Dis Child.* 1954;88:388-392.
2. Roos D, Kuijpers TW, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, editors. *Primary immunodeficiency diseases.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2007. p. 525-49.
3. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis* 2010;45:246-65.
4. Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, et al. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 2010;363:2600-10.
5. Köker MY, Camcıoğlu Y, van Leeuwen K, Kılıç SŞ, Barlan I, Yılmaz M, et al. Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1156-1163.e5.
6. Baehner RL, Nathan DG. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science* 1967;155:835-6.
7. Emmendörffer A, Nakamura M, Rothe G, Spiekermann K, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. *Cytometry* 1994;18:147-55.
8. Köker Y. Kronik granülatöz hastalık ve alt gruplarının tanısında DHR 123 testi ve anti-NADPH oksidaz komponent antikorlarla akım sitometrik analizinin yeri. [Doktora Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2006.
9. Roos D, Kuijpers TW, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, editors. *Primary immunodeficiency diseases.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2007. p. 525-48.
10. Zarembek KA, Soule BP, Gallin JI. Chronic granulomatous disease: From lethal pediatric mystery to complex chronic disease". In: *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH.* Springer; 2010. p. 319-52.
11. Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, Niemela JE, Brown MR, Anderson-Cohen M, et al. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:374-9.
12. Stasia MJ, Li XJ. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol* 2008;30:209-35.