

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VANKOMİSİNE BAĞLI KIRMIZI BOYUN SENDROMU GELİŞTİREN
HASTALARDA MRGPRX2 RESEPTÖR MUTASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

PINAR KARACAKAYA

Alerjik Hastalıkların Moleküler ve İmmünolojik Temelleri Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ankara
2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VANKOMİSİNE BAĞLI KIRMIZI BOYUN SENDROMU GELİŞTİREN
HASTALARDA MRGPRX2 RESEPTÖR MUTASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

PINAR KARACAKAYA

Alerjik Hastalıkların Moleküler ve İmmünolojik Temelleri Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. ÖZGE UYSAL SOYER

Ankara
2023

ONAY SAYFASI**VANKOMİSİNE BAĞLI KIRMIZI BOYUN SENDROMU GELİŞTİREN HASTALARDA
MRGPRX2 RESEPTÖR MUTASYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ****Öğrenci: Pınar KARACAKAYA****Danışman: Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER**

Bu tez çalışması 14.08.2023 tarihinde jürimiz tarafından "Alerjik Hastalıkların Moleküler ve İmmünolojik Temelleri Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Doç. Dr. Esra BİRBEN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Ayşegül ERTUĞRUL*
(Ankara Etlik Şehir Hastanesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

14/08/2023

PINAR KARACAKAYA

¹*“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”*

⁽¹⁾ Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

⁽²⁾ Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

⁽³⁾ Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

14/08/2023

PINAR KARACAKAYA

TEŞEKKÜR

Bu tezimin tamamlanmasında emeği geçen herkese en içten teŖekkürlerimi sunmak istiyorum. İlk olarak, tez danıŖmanım Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER'e kılavuzluğu, değerli önerileri ve destekleri için minnettarlığımı sunuyorum. Sizin değerli rehberliğiniz ve teŖvikleriniz sayesinde bu tez süreci çok daha verimli ve anlamlı oldu.

Ayrıca, hastaların belirlenmesi, verilerin toplanması ve analizi aŖamalarında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Bülent E. ŖEKEREL, Prof. Dr. Ümit M. ŖAHİNER ve Doç. Dr. Esra BİRBEN, baŖta olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ocuk Alerji Bilim Dalı'nda görev alan ve örneklerin toplanma aŖamasında desteklerini esirgemeyen, Dr. Deniz ILGIN GÜREL, Dr. Hilal ÜNSAL, Dr. Nadira NABIYEVA ÇEVİK ve tüm alıŖma arkadaşlarıma teŖekkürlerimi sunarım.

Tez ve ders dönemim boyunca beni her zaman motive eden, Damla YILDIZ'a, Deniz CEYLAN'a, Serpil SOLMAZ BAL'a, Doruk TAYLAN'a, Emine ATAYAR'a, Elif BALLIKAYA'ya Mustafa BARAN'a, Dilara ALIKER'e, Nagihan DUMLU'ya, Ahmet Gökhan KALIN'a, AyŖe BiçER'e, Aylin PEKİN'e, Fernuse DERELİ'ye, Ŗule DEMİR YILMAZ'a, Birsen ÖZER ALTAN ve tüm iŖ arkadaşlarıma,

Tez sürecimde bana moral veren ve desteğini esirgemeyen annem Hülya KARACAKAYA, babam Ahmet KARACAKAYA, kardeŖim Koray KARACAKAYA ve en büyük destekçim teyzem Serap SİVRİ'ye gönülden teŖekkür ederim. Sizlerin destekleri ve güveni beni motive etti ve bu alıŖmayı başarıyla tamamlamamı sağladı.

Son olarak, bu tezin gerekleŖtirilmesinde maddi desteklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel AraŖtırma Projeleri Koordinasyon Birimine teŖekkür etmek istiyorum.

Hepinize derin minnettarlığımı sunuyorum. Sizin varlığınız ve katkılarınız olmadan bu tez gerekleŖtirilemezdi.

ÖZET

Pınar KARACAKAYA Vankomisine Bağlı Kırmızı Boyun Sendromu Geliştiren Hastalarda MRGPRX2 Reseptör Mutasyonlarının Değerlendirilmesi Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Pediatrik Temel Bilimler Programı, Ankara 2023, Vankomisin, *Amycolatopsis orientalis* isimli bakteri türünden izole edilen, gram-pozitif bakterilere karşı etkili trisiklik glikopeptid bir antibiyotiktir. Vankomisin, kullanımı iki tür aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olabilir. Bunlar; Kırmızı Boyun Sendromu (KBS) ve anafilaksidir. Kırmızı boyun sendromu, mast hücrelerinin ve bazofillerin degranülasyonundan kaynaklanır. Mast hücreleri, Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2 de (MRGPRX2) dâhil olmak üzere geniş yüzey reseptörü yelpazesine sahiptir. Bu nedenle IgE'den bağımsız yollarla da mast hücre degranülasyonu olabilir. Yapılan çalışmalar, MRGPRX2'nin vankomisin ve bazı diğer ilaçların kullanımıyla aktive olduğunu ve doğrudan mast hücre degranülasyonunu ve anafilaktik reaksiyonları tetiklediği gösterilmiştir. Tez çalışmasında, vankomisin kullanımı sonucu KBS görülen hastalarda, genetik yatkınlık faktörlerinin rolünü değerlendirmek amacıyla, MRGPRX2'yi kodlayan gen bölgesindeki, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) incelenmiştir. Tek nükleotid polimorfizmleri, SNP'ler, MRGPRX2'nin yapısını değiştirerek bireyleri hiperaktivasyona yatkın hale getirebilecek MRGPRX2 varyantları ile bağlantılı olabilir. Tez çalışmasında 38 hasta ve 22 kontrol olmak üzere toplamda 60 numune kullanılmıştır. 38 hastanın 11'inde polimorfizme rastlanmıştır. Kontrol grubunda ise herhangi bir polimorfizme rastlanmamıştır. MRGPRX2'nin psödoalerjiler ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkisi göz önüne alındığında, gelecekte yapılacak çalışmaların MRGPRX2'nin işlevini daha detaylı bir şekilde aydınlatarak hastalıkların tedavisine ve ilaçlara olan duyarlılığın yönetimine yönelik yeni yaklaşımlar sunabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: MRGPRX2, tek nükleotid polimorfizmi, vankomisin, kırmızı boyun sendromu

ABSTRACT

Pınar KARACAKAYA, Evaluation Of MRGPRX2 Receptor Mutations In Patients With Vancomycin-induced Red Neck Syndrome Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Molecular and Immunological Basics of Allergic Diseases, Master's Thesis, Ankara 2023, Vancomycin is a tricyclic glycopeptide antibiotic effective against Gram-positive bacteria, isolated from the bacterial species *Amycolatopsis orientalis*. Vancomycin use can lead to two types of hypersensitivity reactions: Red Man Syndrome (RMS) and anaphylaxis. Red Man Syndrome is caused by degranulation of mast cells and basophils. Mast cells possess a wide range of surface receptors, including the Mas-related G-protein-coupled receptor element X2 (MRGPRX2), which can trigger mast cell degranulation via IgE-independent pathways as well. Studies have shown that MRGPRX2 is activated by vancomycin and some other drugs, directly triggering mast cell degranulation and anaphylactic reactions. In the thesis study, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the gene segment encoding MRGPRX2 were investigated to assess the role of genetic susceptibility factors in patients exhibiting RMS due to vancomycin use. Single nucleotide polymorphisms, SNPs, might be linked to MRGPRX2 variants that alter its structure and make individuals prone to hyperactivation. A total of 60 samples were used, including 38 patients and 22 controls in the thesis study. Polymorphisms were detected in 11 out of 38 patients, while no polymorphisms were found in the control group. Considering the potential relationship between MRGPRX2 and pseudoallergies as well as inflammatory disorders, it is believed that future studies could shed more light on the functionality of MRGPRX2. This could lead to novel approaches for the treatment of diseases and the management of drug sensitivities.

Key Words: MRGPRX2, single nucleotide polymorphism, vancomycin, red neck syndrome

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Vankomisin	3
2.2. Kırmızı Boyun Sendromu	7
2.3. Mast Hücreleri	9
2.4. G- proteinleri ve Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2	10
2.4.1. G proteinleri	10
2.4.2. Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2	11
2.5. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ve ilaç alerjileri ile olan ilişkisi	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Araştırma Yeri	26
3.2. Araştırmanın Evreni Örneklemi Araştırma Grubu	26
3.2.1. Araştırmaya Dahil Olma ve Olmama Kriterleri	26
3.2.2. Gönüllü ve/veya Hastanın Araştırmadan Çıkarılma Kriterleri ve Araştırmadan Çıkarılanların İzlenme Süresi	27
3.3. Çalışma Planı	27
3.3.1. Kandan DNA İzolasyonu	27

3.3.2. Mas ile İlişkili G-proteine Bağlı Reseptör Elemanı X2'nin Gen Mutasyon Analizi	28
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	29
3.3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi	31
3.3.5. PCR Ürün Pürifikasyonu	32
3.3.6. Sanger Dizileme ile Hedef Genlerin Dizilenmesi	33
3.3.7. DNA Dizileme Sonrası Ürünlerin Pürifikasyonu	35
4. BULGULAR	36
4.1. Klinik Bulgular ve Laboratuvar Bulguları	36
5. TARTIŞMA	47
6. KAYNAKLAR	58
7. EKLER	
Ek 1. ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU (Ebeveyn)	
Ek 2. ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ÇOCUK RIZA FORMU	
Ek 3. ETİK KURUL ONAYI	
Ek 4. DİJİTAL MAKBUZ	
Ek 5. ORJİNALLİK RAPORU	
8. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

AR	: Alerjik Rinit
FcεRI	: Yüksek afiniteli IgE reseptörü
GPCRs	: G proteinine bağlı reseptörler
Ig	: İmmünglobulin
IL	: İnterlökin
KBS	: Kırmızı Boyun Sendromu
MAF	: Minör Alel Frekansı
MC	: Mast Hücre
MRGPRX2	: Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2
MRSA	: Metisilin Dirençli Stafilokok Aureus
NMBA	: Nöromüsküler bloke edici ajanlar
PAR	: Proteaz ile aktive edilen reseptörler
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmleri
TLR	: Toll Like Reseptörler
TNF	: Tümör Nekrozis Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Vankomisinin kimyasal yapısı	3
2.2. Bakteri hücre duvarının çaprazlanmamış peptidoglikanında terminal D-Ala-D-Ala'e bağlı vankomisin yapısı	4
2.3. İnsanda Mas ile ilişkili G proteinine bağlı reseptör X2 ve bunun farelerde ve sıçanlarda işlevsel olarak yakın homologları için ligandlar	14
2.4. Ana reseptör sistemleri ve mast hücresi aktivasyonunda rol oynayan ligand örnekleri	19
3.1. MRGPRX2 geninde kullanılmak üzere dizayn edilen primerlerin dizi üzerinde gösterimi	29
4.1. MRGPRX2 geni üzerinde herhangi bir polimorfizme rastlanmayan bölge	45
4.2. MRGPRX2 geni üzerinde Asn62Ser (A → G değişimi) polimorfizmine rastlanan bölge (heterozigot)	45
4.3. MRGPRX2 geni üzerinde hem Asn62Ser (A → G değişimi) hem de Ser65Ser (T → G değişimi) polimorfizmine rastlanan bölge (heterozigot)	46
4.4. MRGPRX2 geni üzerinde Asn62Ser (A → G değişimi, homozigot) polimorfizmine rastlanan bölge	46
5.1. MRGPRX2'deki SNP'ler	53
5.2. MRGPRX2 aktivasyon sonrası sinyal yolunun şeması	55

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. İnsan MRGPRX2 lokusunun kodlama bölgelerindeki bazı SNP'lerin listesi	22
3.1. PCR koşulları	31
3.2. Pürifikasyon koşulları	33
3.3. Dizileme reaksiyonu koşulları	35
4.1. Hastaların cinsiyet ve yaş bilgileri, klinik bulguları ve aile öyküleri	38
4.2. Kontrol grubu cinsiyet ve yaş bilgileri, klinik bulguları ve aile öyküleri	42
4.3. Hasta bazında tek nükleotid polimorfizimleri	44

1. GİRİŞ

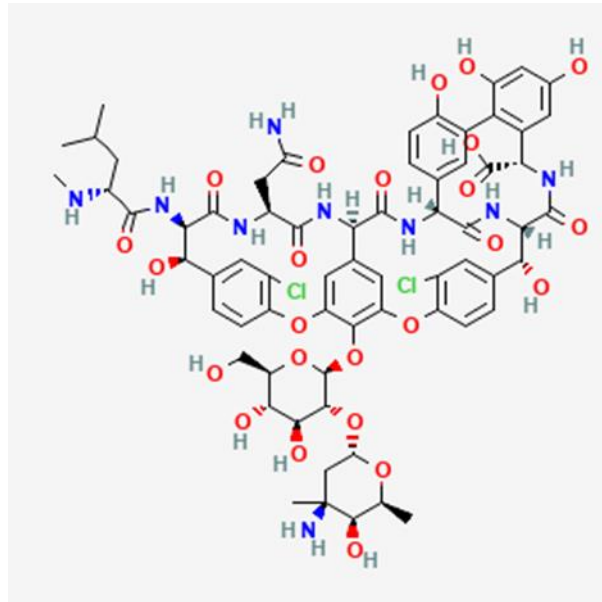
Vankomisin, gram-pozitif bakterilere, özellikle Metisilin Dirençli *Stafilokok Aureus* (MRSA) gibi zorlu enfeksiyon etkenlerine karşı etkili trisiklik glikopeptid bir antibiyotiktir. FDA tarafından 1958 yılında onaylanan ilaç sıklıkla *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılır ve bakteriyel hücre duvarının polimerizasyonunu inhibe ederek etkisini gösterir. Bununla birlikte, nefrotoksisite, ototoksisite ve venöz tolerans zorluğu gibi yan etkileri nedeniyle ilacın sistemik kullanımı sınırlıdır. Aşırı duyarlılık reaksiyonları da vankomisin yaygın yan etkilerindedir. Vankomisin kullanımı iki tür aşırı duyarlılık reaksiyonuna yol açabilir: Bunlar Kırmızı Boyun Sendromu (KBS) ve anafilaksidir. KBS, ilaca özgü antikorlarla ilişkilendirilmeyen idiyopatik bir infüzyon reaksiyonudur ve alerjik reaksiyonların aksine duyarlanma olmadan da meydana gelebilir. Genellikle yüz, boyun ve üst gövdede eritemli döküntü ve kaşıntı gibi belirtiler gözlenir. Ayrıca, daha az sıklıkla hipotansiyon ve anjiyoödem görülebilir. Hastalar genellikle yaygın yanma, kaşıntı ve genel rahatsızlık hissederler. Baş dönmesi, ajitasyon, ağız çevresinde ateş ve parestezi gibi semptomlar da ortaya çıkabilir. Ciddi vakalarda göğüs ağrısı ve nefes darlığı gibi semptomlar görülebilir. Yapılan çalışmalar, vankomisin kullanımının ardından bazı bireylerin, diğerlerine kıyasla daha fazla histamin salınımına yatkın olduğunu göstermektedir. Kırmızı boyun sendromu, MRGPRX2 reseptörü tarafından tetiklenen mast hücre ve bazofil degranülasyonundan kaynaklanır ve bu degranülasyonun semptomları ne şekilde tetiklediği henüz tam olarak anlaşılmış değildir. Bazı ilaçlar hem IgE aracılı hem de IgE aracılı olmayan aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olabilir. Nöromusküler bloke edici ajanların (NMBA'lar), genel anestezi sırasında meydana gelebilecek anafilaktik reaksiyonların çoğunu indüklediği düşünülmektedir. Benzer şekilde, bir glikopeptid antibiyotik olan vankomisin, sadece tipik IgE aracılı ani tip reaksiyonları değil, aynı zamanda KBS'yi de tetiklediği bilinmektedir. Mast hücre degranülasyonuna, alerjenler, glikoproteinler, proteinler, FcεR1 reseptörüne yönelik oto-antikorlar ve protein yapısında olmayan agonistler (ilaçlar gibi) neden olabilir. Bununla birlikte, mast hücreleri, Toll Like Reseptörler (TLR), Proteaz ile aktive edilen reseptörler (PAR) veya Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2

(MRGPRX2) dahil olmak üzere bir çok yüzey reseptörün sahiptir. Bu nedenle IgE'den bağımsız yollarla da mast hücre degranülasyonu olabilir. Bir anafilaktoid reaksiyon olan KBS, mast hücrelerinin ve bazofillerin degranülasyonundan kaynaklanır ve semptomlardan sorumlu olan mast hücre degranülasyonunun nasıl tetiklediği şimdiye kadar yeterince anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalar, MRGPRX2'nin vankomisin ve bazı diğer ilaçların kullanımıyla aktive olduğunu ve doğrudan mast hücre degranülasyonunu ve anafilaktik reaksiyonları tetiklediği gösterilmiştir. Bu bilgiler bize, vankomisin kullanımına bağlı kırmızı boyun sendromunu MRGPRX2 reseptöründe meydana gelen tek nükleotid polimorfizmlerinin de etkili olabileceğini düşündürmüştür. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), genetik varyasyonların en yaygın türlerinden biridir ve proteinlerin yapısını, etkileşimlerini ve özelliklerini etkileyebilir. MRGPRX2 genindeki SNP'ler, bu reseptörün yapısını değiştirerek hiperaktivasyona yatkın MRGPRX2 varyantlarıyla ilişkilendirilebilir. Bu bağlamda daha önce yapılan çalışmalarda pek çok amino asit değişikliği belirlenmiştir. Bu SNP'lerin MRGPRX2 reseptörünün ligand bağlanma özelliklerini nasıl etkileyebileceğini anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vankomisin

İlk olarak 1958'de FDA tarafından onaylanan ve *Amycolatopsis orientalis* isimli bakteri türünden izole edilen vankomisin, gram-pozitif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Penisiline alternatif olarak geliştirilen ve özellikle metsillin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi bakterilere karşı etkili olan bir trisiklik glikopeptiddir (Şekil 2.1). Ayrıca, vankomisin, endokardit, osteomyelit, pnömoni ve derin doku enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonların tedavisinde de tercih edilen bir antibiyotiktir (1,2).

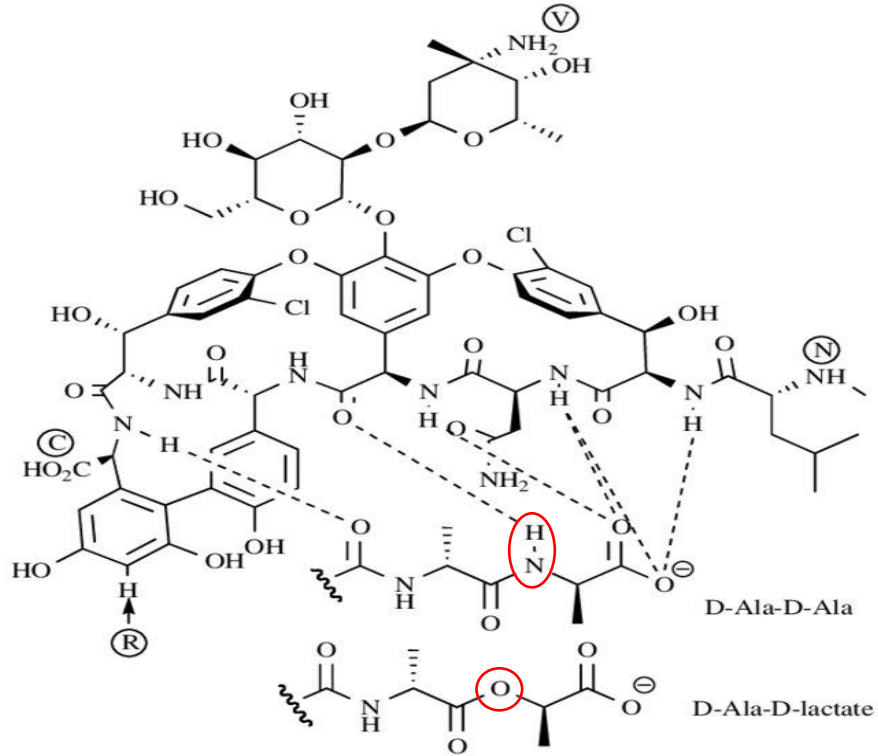


Şekil 2.1. Vankomisinin kimyasal yapısı (C₆₆H₇₅Cl₂N₉O₂₄). (2)

Vankomisin, tüm glikopeptid antibiyotikler gibi, bakteriyel hücre duvarında bulunan peptidoglikanın biyosentezi sırasında ara maddelere bağlanarak gram-pozitif bakterilerin gelişimini engeller. Peptidoglikanlar hücre duvarının temel yapı taşlarıdır ve hücre duvarının bütünlüğünü korumasına yardımcı olurlar (3,4).

Vankomisin, etkisini peptidoglikan sentezinde yer alan D-alanil-D-alanin (D-Ala-D-Ala) bağı engelleyerek gösterir. D-Ala-D-Ala, peptidoglikan sentezinde yer alan bir bileşendir ve vankomisin ile yüksek afinitesi olan bir moleküldür. Bu durum

vankomisinin D-Ala-D-Ala ile güçlü bir bağ oluşturmasını sağlar. Vankomisin, D-Ala-D-Ala'nın glikopeptit bağlayıcı bölgesine bağlandığında, peptidoglikan sentezinde yer alan transpeptidaz enzimiyle rekabet eder. Transpeptidaz enzimi normalde D-Ala-D-Ala'nın hücre duvarı peptidoglikan zincirine bağlanmasını katalizler, ancak vankomisin varlığında bu etkileşim engellenir. Bu durum, D-Ala-D-Ala içindeki amid N-H'nin, D alanil - D laktattaki bir oksijen atomu ile basit bir şekilde değiştirilmesinden kaynaklanır (Şekil 2.2). Böylece, hücre duvarını stabilize eden çapraz bağların oluşumunu engellenir ve zayıflamış hücre duvarı sonunda bakteri sitoplazmasının yüksek ozmotik basıncı altında yırtılarak bakterinin ölümüne sebep olur (3). Vankomisin ayrıca hücre zarı üzerinde de etkili olur. D-alanil-D-alanin'e bağlanarak, hücre zarının lipit bileşenleriyle etkileşime girer, zar geçirgenliğini değiştirir ve RNA sentezini seçici olarak inhibe edebilir. Bu etkiler sonucunda, vankomisin bakteriyel hücrelerin büyümesini engeller ve enfeksiyonların tedavi edilmesinde etkili olur (5,6).



Şekil 2.2. Bakteri hücre duvarının çaprazlanmamış peptidoglikanında terminal D-Ala-D-Ala'e bağlı vankomisinin yapısı. (3)

Vankomisinin yaygın görülen yan etkilerinden biri aşırı duyarlılık reaksiyonlarıdır. Vankomisin kullanımı iki tür aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olabilir. Bu aşırı duyarlılık reaksiyonlarından biri, immüoglobulin tip E' nin (IgE) aracılık ettiği anafilaktik immünolojik, başka bir deyişle ani aşırı duyarlılıktır. Diğeri ise, Kırmızı Boyun Sendromu (KBS) olarak bilinen psödoalerjik reaksiyonlar olarak da adlandırılan IgE' den bağımsız anafilaktoid reaksiyondur (7,8). Alerjik olmayan ilaç aşırı duyarlılık reaksiyonu, ilaca ilk maruz kalındığında ortaya çıkabilir (9). Vankomisin, bağ dokusunun granüler hücreleri olarak da adlandırılan ve bir uyarıcıya maruz kaldıktan sonra daha duyarlı ve hızlı tepki verebilen öncü hücrelerini veya mast hücrelerini doğrudan aktive edebilir. Mast hücreleri, kemik iliğinin CD34+ öncü hücrelerinden gelir. Öncü hücrelerinin veya mast hücrelerinin granülleri, heparin, histamin ve triptaz gibi proteazlar içerir. Degranülasyon olarak bilinen, araçların hücre dışına salınımı; fiziksel faktörler, toksinler, endojen araçlar ve bağışıklık mekanizmaları tarafından indüklenir. Degranülasyon, IgE'ye bağımlı veya IgE'den bağımsız mekanizmalar aracılığıyla olabilir (10,11).

İlaç advers reaksiyonlarında, özellikle anafilaksiden şüphelenildiğinde, etki mekanizması hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir. İlacın infüzyon hızından bağımsız olarak vankomisin, IgE'nin aracılık ettiği ani aşırı duyarlılık reaksiyonu yoluyla anafilaksiyi indükler. IgE'nin Fc kısmının, öncü hücre veya mast hücre membranlarındaki yüksek afiniteli, FcεRI-α reseptörlerine veya bazofil hücre zarına bağlanması, histamin, triptaz, prostaglandinler, lökotrienler gibi enflamatuar mediatörlerin salınımını indükler (12).

Birçok anafilaksi vakası, histamin reseptörlerinin aktivasyonu, akut bronkospazma yol açabilen H1 ve H2 reseptörleri arasındaki etkileşime, bronşiyal düz kasların kasılması ve mukozal viskozitenin artmasına bağlı hırıltılı nefes darlığına neden olur. H1 ve H2 reseptörlerinin uyarılmasının kombinasyonu vasküler geçirgenliği, hipotansiyonu, taşikardiyi ve baş ağrısını arttırır. Histamin, anafilaksi semptomları neden olan tek mediyatör değildir. Prostaglandinler, lökotrienler ve trombosit aktive edici faktör de vasküler geçirgenliği artırarak ve vazodilatasyona

yardımcı olarak bronkospazmda da önemli bir rol oynar (13). Anafilaksinin erken teşhisi, kandaki histamin seviyesinin ölçülmesiyle sağlanabilir ancak, histaminin yarı ömrü kısadır bu nedenle öncü hücrelerinden veya mast hücrelerinden salınan triptaz ölçümü histamin ölçme yöntemine alternatif bir yaklaşım sağlar (14).

Triptaz, molekül ağırlığı yaklaşık 134 kDa olan serin tetramerik proteazdır. Enzimin dört alt birimi vardır ve her birimin aktif bölgesi vardır. Öncü hücreleri veya mast hücreleri esas olarak iki tip triptaz eksprese eder bunlar α ve β triptazlardır. β triptaz, öncü hücrelerinin veya mast hücrelerin aktivasyonunun bir işaretidir. Kan triptaz konsantrasyonunun ölçümü, anafilaktik ve anafilaktoid reaksiyonlar gibi, öncü hücrelerinin veya mast hücrelerinin aktivasyonuna bağlı reaksiyonları ayırt etmek için kullanılır (10).

Çeşitli ilaçlar, histaminin mast hücrelerinden doğrudan salınmasına sebep olur. Histamin salınmasını indükleyen tüm maddeler, hücre içindeki iyon konsantrasyonunu artırarak mast hücrelerinin veya bazofillerin degranülasyonunu aktive eder (15). Ayrıca, prototipik bir mast hücre degranülatörü olan vankomisin kısmen kalsiyuma (Ca^{++}) bağımlı olduğu ve PLC (Fosfolipaz C) ve PLA2 (Fosfolipaz A2) 'ye bağlı mekanizmalar yoluyla histamin ve triptaz salınımına neden olduğu bilinmektedir. Bu durum, vankomisin PLC ve PLA üzerindeki doğrudan etkisinin veya bilinmeyen bir reseptör mekanizmasının uyarılmasının bir sonucu olabilir (16).

Salınan histamin miktarı, vankomisin uygulama hızı ve kandaki konsantrasyonu ile ilişkilidir (7). Vankomisin, histamin metabolizmasından sorumlu bir enzim olan N-metiltransferazın etkisini inhibe ederek histamin salınımının sistemik etkisini uzatır (17). Yapılan çalışmalarda, kas gevşetici ilaçların ve morfinin vankomisin ile kombine edildiğinde histamin salınımını arttırdığı gözlenmiştir. Morfin uygulamasından sonra sıçanlara intravenöz vankomisin enjeksiyonunun (1.25 ila 10 mM / 30 dakika) kandaki histamin seviyesinde artışa neden olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar vankomisin doğrudan Ca^{++} kanallarını açtığını ve histamin salınımını indüklediğini göstermektedir. İndüklenen hücre içi Ca^{++} salınımı, mast hücreleri tarafından histamin salınımına sinerjik olarak katkıda bulunabilir (18).

2.2. Kırmızı Boyun Sendromu

Kırmızı adam sendromu olarak da adlandırılan kırmızı boyun sendromu, vankomisin alan çocuklarda sık görülen bir advers reaksiyondur. Son zamanlarda Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği, Amerika Sağlık Hizmetleri Epidemiyolojisi Derneği (SHEA) ve Pediatrik Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (PIDS) tarafından ortaya konulan teklif ile hastalık terminolojisi 'Vankomisin *Flushing* Sendromu' olarak yeniden adlandırılmıştır. Ancak elektronik sağlık kayıtları ve veri tabanlarında güncelleme yapılmamıştır.

IgE aracılı olmayan vankomisin aşırı duyarlılığı, tipik olarak vankomisin ile tedavi edilen hastaların % 4-47'sinde ortaya çıkan ve ağırlıklı olarak yüz, boyun, gövdenin üst kısmı ve üst ve alt ekstremiteleri etkileyen kaşıntılı, eritemli bir döküntü ile karakterizedir (19). Yan etkilere bazen kalp durmasına, ateş yükselmesine ve hipotansiyona yol açabilen taşikardi veya bradikardi eşlik edebilir. Histamin salınımından kaynaklı vazodilatasyona ve dolayısıyla hipotansiyona yol açar (20). Bu yan etkiler, ilk vankomisin dozunun parenteral uygulamasından 4-10 dakika sonra ortaya çıkabilir. Reaksiyon 20 dakika sonra kaybolabilir veya birkaç saat devam edebilir. Reaksiyonun şiddeti, uygulanan doz ve infüzyon hızı ile doğru orantılıdır (15). Daha önce herhangi bir olay olmaksızın 7 günden daha uzun süredir vankomisin tedavisi gören hastalarda 90 veya 120 dakikalık infüzyon sonucunda da gecikmiş reaksiyonlar görülebilir (15,21). Vankomisin ile ilişkili en yaygın aşırı duyarlılık reaksiyonu olan KBS'nin, enfekte hastalarda görülme sıklığı % 3,7 ile % 47 arasında değişmektedir ve en şiddetli reaksiyonlar 40 yaş altı hastalarda, özellikle çocuklarda meydana gelmektedir (15).

Bazı ilaçlar hem IgE aracılı hem de IgE aracılı olmayan aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olabilir. Nöromusküler bloke edici ajanların (NMBA), genel anestezi sırasında meydana gelebilecek anafilaktik reaksiyonların çoğunu indüklediği düşünülmektedir. İlginç bir şekilde, bu reaksiyonların % 85 kadarı daha önce NMBA'ya maruz kalmamış hastalarda meydana gelmektedir. Daha önce ilacı kullanmamış hastalarda ilaca bağlı anafilaktik reaksiyon, IgE çapraz duyarlılığı veya IgE'den

bağımsız bir mekanizmanın varlığıyla açıklanabilir. Florokinolon grubu ilaçlar, daha önce bu gruba ait her hangi bir ilaç kullanmamış hastalarda anafilaktik reaksiyonlara neden olabilen başka bir ilaç grubunu temsil eder (21).

Vankomisin mast hücrelerini IgE aracılı bir etki dışında aktive edebildiği, 1990'ların başında sıçan modelinde gösterilmiştir (22,23). IgE bağımsız aktivasyon in vitro olarak yapılan diğer çalışmalarda da gösterilmiş ve vankomisin MRGPRX2 yoluyla doğrudan mast hücre degranülasyonuna neden olabileceği düşünülmüştür (24).

Kırmızı boyun sendromuna benzer klinik özellikler, siprofloksasin ve atrakuryum ile sıklıkla gözlenirken, şaşırtıcı bir şekilde, vankomisine benzer bir glikopeptid antibiyotik olan teikoplanin ile gözlenmemektedir. Glikopeptitlerin geniş klinik etkileri ve kırmızı boyun sendromunun yükü göz önüne alındığında, vankomisin ve teikoplaninin MRGPRX2 ile etkileşimi, insan kökenli mast hücre hattında (LAD2) araştırılmış ve teikoplanin, MRGPRX2'yi aktive etmediği ve mast hücre degranülasyonunu indüklediği görülürken vankomisin MRGPRX2'yi aktive ettiği görülmüştür (24).

Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2'nin aktivasyonu, histamin, IL'ler, tümör nekrozis faktörü (TNF) ve prostaglandin D2 dahil olmak üzere birçok proinflatuar aracının salınımını indükler (25,26). Bu veriler, en azından stafilokok δ -toksin bağlamında MRGPRX2'yi iki spesifik kaşıntılı durum, vankomisin ile ilişkili kırmızı boyun sendromu ve atopik dermatit ile ilişkilendirir. Kırmızı boyun sendromu, mast hücrelerinin aracılık ettiği, akut semptomları kısmen antihistaminikler tarafından kontrol edilebilen IgE'den bağımsız bir reaksiyondur (24). Atopik dermatit ise mikrobiyom, bariyer kusurları ve mast hücreleri dahil olmak üzere farklı enflamatuar hücreleri içeren karmaşık bir patogenezi olan kronik enflamatuar bir deri hastalığıdır. Antihistaminikler, atopik dermatit semptomlarının tedavisinde veya kontrolünde sınırlı etkinliğe sahiptir (21). Bu gözlem, atopik dermatit patogenezi, mast hücre kaynaklı mediatörlerin katkısını desteklemektedir. MRGPRX2, mast hücreleri, duyuşal nöronlar ve keratinositlerde bulunur ve buralarda IL-6'nın

salınımına yol açar (27,28). Atopik dermatit ile ilişkili bir nöropeptit olan P maddesi, MRGPRX2'yi aktive eder ve farelerde Mrgprs aracılı kaşıntıya neden olur (29). Elde edilen bu veriler, vankomisin ve stafilokok δ -toksinin MRGPRX2 yoluyla mast hücrelerini aktive ettiğini göstererek, bu reseptörün kaşıntı ve eritem ile ilişkili enflamatuar durumlara katkılarını desteklemektedir. MRGPRX2 antagonistleri, kırmızı boyun sendromu ve atopik dermatit semptomlarını hafifletme veya tedavi etme potansiyeline sahiptir (30).

2.3. Mast Hücreleri

Mast hücreleri, çevresel faktörlere maruz kalan ilk hücrelerdir ve patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Başta deri, oral/gastrointestinal mukozalar ve solunum yolları gibi vücudun bariyer yüzeylerinde bulunan mast hücreleri, bu bölgelerdeki lokal doku homeostazını bozan eksojen veya fiziksel tetikleyiciler tarafından indüklenen lokal immün yanıtlara katkıda bulunurlar (31,32).

Yüksek afiniteli IgE reseptörleri (Fc ϵ RI) aracılığıyla mast hücrelerin aktivasyonu, önceden oluşmuş ve yeni sentezlenmiş aracı maddelerin salınımına neden olur ve aşırı duyarlılık ve alerjik hastalıklarla ilişkili belirtiler ve semptomlara katkıda bulunur. Mast hücreleri genellikle granüllerinin proteaz içeriğine göre 2 tipe ayrılır. İnsanlarda, deri gibi bağ dokularında bulunan çoğu mast hücresi, triptaz, kimaz, karboksipeptidaz ve katepsin içerir ve triptaz ve kimaz ifade eden mast hücreleri (MC_{TC}) olarak bilinir. Buna karşılık, akciğer ve bağırsakta bulunan çoğu mast hücresi sadece triptazı ifade eder ve triptaz ifade eden mast hücreleri (MC_T) olarak bilinir. Mast hücreleri, degranülasyonu tetikleyen endojen ve egzogen uyarıcılara karşı tepkilerinde de farklılık gösterir. Bu nedenle, her iki insan mast hücre türü de Fc ϵ RI'nın agregasyonu ile aktive edilirken, MC_{TC}, C3a, C5a ve bileşik 48/80'e yanıt verirken, MC_T bunlara yanıt vermez (21,31).

Mast hücreleri, histamin, tümör nekroz faktörü α (TNF- α), serotonin, heparin ve glikozaminoglikanlar içeren, kendilerine özgü çok çeşitli serin proteazlara sahip yoğun salgı granüllerini depolayan bağışıklık hücreleri olarak hizmet ederler.

Bakterilere, çok hücreli parazitlere ve ksenobiyotik toksinlere karşı konakçı direncinden sorumludurlar. Mast hücreleri, aktive olduklarında hızlı bir şekilde granüllerini salıverilir ve de novo sentezlenmiş inflamatuvar mediatörleri (sitokinler ve IL-4, 5 ve 13) gibi lipid mediatörler üretirler, bunlar da alerjik enflamasyonun devamında rol oynar (31).

Mast hücre degranülasyonuna, alerjenler, glikoproteinler, proteinler veya FcεRI reseptörüne yönelik oto-antikolar neden olur. Bununla birlikte, mast hücreleri, Toll Like Reseptörler (TLR), Proteaz ile aktive edilen reseptörler (PAR) veya Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2 (MRGPRX2) dahil olmak üzere geniş yüzey reseptörü yelpazesine sahiptir. Bu nedenle IgE'den bağımsız yollarla da mast hücre degranülasyonu olabilir. Bir anafilaktoid reaksiyon olan KBS, mast hücrelerinin ve bazofillerin degranülasyonundan kaynaklanır ve semptomlardan sorumlu olan mast hücre degranülasyonunun nasıl tetiklediği şimdiye kadar yeterince anlaşılamamıştır (21,25). Ancak MRGPRX2'nin keşfi, mast hücre biyolojisini anlamada önemli bir yere sahiptir. Bu keşif, edinsel bağışıklık sisteminden bağımsız olan mast hücre aktivasyonunu açıklamaya yardımcı olmuştur (33).

2.4. G- proteinleri ve Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2

2.4.1. G proteinleri

G proteinleri, hücre zarında bulunan ve hücre içi sinyal iletimini düzenleyen protein ailesidir. Bu proteinler, hücre dışındaki çeşitli uyarıcıların (hormonlar, nörotransmitterler, kemokinler vb.) hücre içi yanıtlarını başlatmak ve düzenlemek için kullanılırlar.

G proteinleri (GTP bağlayan proteinler), adlarını guanozin trifosfat (GTP) molekülüne bağlanma yeteneklerinden alırlar. Heterotrimerik G proteinleri, alfa (α), beta (β) ve gama (γ) olmak üzere üç alt birimden oluşur.

G proteinleri, G proteinle eşleşmiş reseptörler (GPCR) ile etkileşime girerek aktive olurlar. GPCR, hücre zarının dış ve iç yüzeylerinde bulunan bir reseptör tipidir ve çeşitli ekstraselüler sinyalleri algılamak için kullanılır. Bir GPCR, ekstraselüler

alandaki her hangi bir uyarana maruz kaldığında, reseptörün iç kısmında yer alan G proteinleri aktive olur.

Aktive olan GPCR, G proteinine bağlanır ve onu aktive eder. Aktivasyon, alfa alt biriminin GDP (guanozin difosfat) yerine GTP'yi bağlamasıyla gerçekleşir. Bu, alfa alt biriminin beta ve gama alt birimlerinden ayrılmasına ve hücre içinde diğer proteinleri etkinleştirmek için serbest kalmasına yol açar. Bu etkinleşmiş proteinler, ikincil haberciler ve farklı hücresel sinyal yollarını aracılığıyla hücreye yanıtı açar.

G proteinleri, hücre içi sinyalleşmede önemli bir rol oynar ve birçok biyolojik süreci düzenler. Örneğin, hormonların, nörotransmitterlerin ve diğer hücreye sinyallerin hücre içine iletimini düzenlerler. Sinir iletimi, hormon salınımı, hücre büyümesi ve çoğalması, hücre hareketi ve diğer biyolojik reaksiyonlar gibi çeşitli hücreye süreçler G proteinleri tarafından kontrol edilir.

G proteinlerinin disfonksiyonu, birçok hastalığın altında yatan mekanizmalardan biri olabilir. Örneğin, bazı kanserlerde ve nörolojik bozukluklarda G proteinleri ile ilgili anormallikler bulunmuştur.

Sonuç olarak, G proteinleri, hücre içi sinyal iletiminin temel düzenleyicilerinden biri olarak hayati öneme sahiptir ve hücrelerdeki çeşitli biyolojik süreçleri düzenlerler (34).

2.4.2. Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2

Mas ile ilişkili G proteinine bağlı reseptörler, rodopsin benzeri A sınıfı G proteinine bağlı reseptörlerin (GPCRs) δ dalında yer alır ve transmembran reseptörlerinin en büyük ailesini oluştururlar. MRGPRX alt ailesi, insanlarda 11p15.1 kromozomunda yer alan dört farklı gen içerir. Bu genler, dört reseptör alt tipini, yani MRGPRX1, MRGPRX2, MRGPRX3 ve MRGPRX4'ü kodlar. Özellikle MRGPRX2, anafilaktoid ilaç reaksiyonlarından sorumludur (35,36).

Mas ile ilişkili G proteinine bağlı reseptörler (MRGPRs), heterotrimerik G proteinlerine bağlı yedi transmembran alanı içeren G proteinine bağlı reseptörler

(GPCRs) olarak adlandırılan daha geniş bir reseptör ailesine aittir. Fakat GPCR ailesi içinde, birkaç reseptör alt ailesi henüz karakterize edilmemiştir. GPCR ailesi, fare, sıçan, insan, makak ve rhesus maymununda yaklaşık 50 üyeden oluşur ve birkaç alt aileye ayrılabilir. A, B, C, D, E, F ve H alt aileleri sadece kemirgenlerde bulunurken, X alt ailesi ise insanlara, makaklara ve rhesus maymunlarına özgüdür. İnsanlarda 4 adet MRGX geni bulunur (MRGPRX1-MRGPRX4). MrgprX alt ailesi içinde, makaklar ve rhesus maymunlarının aksine, insanlarda öncelikli olarak eksprese edilen reseptör, MRGPRX2 dir. MRGPRX2 hem fizyolojik hem de patolojik immün yanıtta önemli işlevlere sahiptir. Ayrıca, tip-2 bağışıklığın diğer anahtar efektör hücreleri olan bazofiller ve eozinofiller de bu reseptöre sahiptirler (21,37).

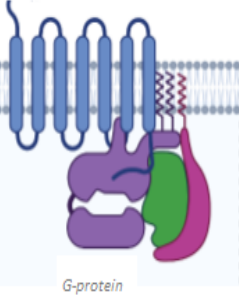

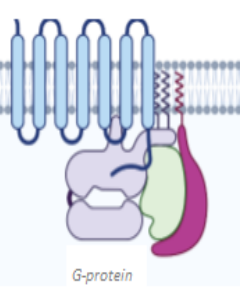
Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2, yalnızca MC_{TC}-tipi mast hücreleri tarafından ifade edilir ve bu hücreler ağırlıklı olarak deride bulunur. Buna karşılık, MC_T tipi mast hücreleri, MRGPRX2 ifadesinden yoksundur ve MRGPRX2 yoluyla aktive olan sekretagoglara, örneğin bileşik 48/80'e yanıt vermezler (33).

Reseptör konfigürasyonu hakkında sınırlı bilgiye sahip olunmasına rağmen, Mrgprb2 (farelerdeki homolog) ve Mrgprb3'ün (ratlardaki homolog) insan MRGPRX2'nin homologları olarak tanımlanmıştır. Bu da yeni araştırmalara ve spesifik ligandların tespiti ile ilgili yapılacak çalışmalara katkıda bulunmaktadır (38).

Anafilaktoid reaksiyonlar, bir hastanın durumunu kötüleştirebilen ve yaşamı tehdit edebilecek etkiler üretebilen yaygın klinik akut advers ilaç reaksiyonlarıdır. Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonundan farklı olarak, anafilaktoid reaksiyonlarda ana mekanizma, mast hücreleri veya bazofiller üzerinde IgE reseptörlerinin doğrudan uyarılmasını veya alternatif bir yolla alerjenler tarafından komplemanın aktivasyonunu içerir. Bu reaksiyonlar, histamin ve β -heksosaminidaz gibi anafilaktik mediatörlerin salınmasına yol açar. Yapılan çalışmalar, insan mast hücrelerinde spesifik bir membran reseptörü olan MRGPRX2'nin de anafilaktoid reaksiyonları indüklediğini göstermiştir (19,39).

Son zamanlarda farklı dokularından izole edilen insan mast hücreleri üzerindeki MRGPRX2'nin ifadesinin ve işlevselliğinin değişebileceği gösterilmiştir. Cilt mast hücreleri en yüksek MRGPRX2 ifadesine sahipken, akciğer mast hücreleri MRGPRX2'yi ifade etmez (41). MRGPRX2'nin hormonlar, nöropeptitler, küçük moleküllü ilaçlar ve zehirli maddeler dahil olmak üzere birçok ligandı vardır (24). Bu ligandlardan birinin MRGPRX2'ye bağlanması mast hücre degranülasyonunu indüklediği, ancak mast hücreleri tarafından çok az sitokin üretimine neden olduğu veya degranülasyona hiç neden olmadığı kanıtlanmıştır (21,41).

Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2 veya homologları için tespit edilen ligandlar Şekil 2.3. 'de gösterilmiştir. İnsan MRGPRX2 reseptörü, katyonik ilaçlar, nöropeptitler ve psödoalerjik reaksiyonları tetikleyen nörojenik inflamasyona aracılık eden ve aynı zamanda antimikrobiyal savunmaları da içeren konak savunma peptitleri, P maddesi (SP), sinir büyüme faktörü (NGF), kalsitonin geni ile ilgili peptit (CGRP), vazoaaktif bağırsak polipeptiti (VIP), kortistatin 14, bileşik 48/80 ve E7 de (yapay bir C3a reseptör agonisti) dahil olmak üzere çok sayıda madde tarafından aktive edilir. Ayrıca katepsin S, antimikrobiyaller, altın klorür ve mucunain gibi diğer doğal ve sentetik bileşikler de bu reseptörü aktive edebilir (36,40). Bunların yanı sıra, MRGPRX2'nin, insan beta-defensinleri (hBD2 ve hBD3), katelisinidin LL-37, hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptid ve trombosit aktive edici faktör (PAF-4) gibi diğer peptidlere maruz kalmasının da mast hücre degranülasyonunu indüklediği gösterilmiştir (37).

MRGPRX2 (İnsan Reseptörü)	Mrgprb2 (Fare Homoloğu)	Mrgprb2 (Sıçan Homoloğu)
<ul style="list-style-type: none"> • Endojen • Kortistatin 14 • P Maddesi • Vazoaktif bağırsak peptidi • Sinir büyüme faktörü • Kalsitonin genine bağlı peptid • Yapay C3a reseptörü agonisti E7 • Majör temel protein • Eozinofil peroksidaz • Beta-defensinler (hBD2, hBD3) • KatelisidinLL-37 	<ul style="list-style-type: none"> • Eksojen • Morfin • Vankomisin • Sisatrakryum • Bilesik 48/80 • Mastoparan 	<ul style="list-style-type: none"> • Endojen • Kortistatin 14 • P maddesi • Kalsitonin genine bağlı peptid • Trombosit aktive edici faktör -4 • Hipofiz adenilat siklaz aktive peptid
 <p>G-protein</p>	 <p>G-protein</p>	 <p>G-protein</p>

Şekil 2.3. İnsanda Mas ile ilişkili G proteinine bağlı reseptör X2 ve bunun farelerde ve sıçanlarda işlevsel olarak yakın homologları için ligandlar (21).

G proteinine bağlı reseptör olan MRGPRX2, yüksek afiniteli IgE reseptörüne (FcεRI) kıyasla farklı bir aktivasyon biçimi kullanmaktadır. FcεRI ile tetiklenen aktivasyon, antijenin kendisi, antijene özgü IgE ve FcεRI'nin kendisi olmak üzere üç bileşen gerektirmekte ve bir dizi tirozin kinaz tarafından başlatılmaktadır. Ancak, MRGPRX2 nin egzositozu Gi ve/veya Gq' ya bir agonistin bağlanmasından hemen sonra tetiklenmektedir. Buna bağlı olarak granül eksositoz yolları da birbirinden farklıdır. FcεRI, granül-granül füzyonuna bağlı olarak daha düzensiz ve daha büyük granüllerle gecikmiş salgılamayı tetiklerken, MRGPRX2 küçük granüllerin hızlı bir şekilde salgılanmasına aracılık etmektedir. (33). Yapılan çalışmalar MRGPRX2 aktivasyonunun hücre içi kalsiyumu arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, bazı çalışmalarda FcεRI aktivasyonunda rol alan bir mekanizma olan stromal etkileşim molekülü 1 (STIM1) yoluyla kalsiyum girişinin, MRGPRX2 üzerinden mast hücre aktivasyonunu düzenleyebileceğini öne sürmektedir (30).

Tanımlanan ilk MRGPRX2 agonisti olan peptid CST-14, MRGPRX2'yi rekombinant olarak eksprese eden HEK hücrelerinde (insan embriyonik kök hücreleri) Ca^{++} mobilizasyonunu indüklemektedir (36). Daha sonra yapılan çalışmalarda PAMP-20 aracılı MRGPRX2 aktivasyonunun da Ca^{++} mobilizasyonunu indüklediği ayrıca PAMP-20 aracılı MRGPRX2 aktivasyonunun, MRGPRX2'yi rekombinant olarak eksprese eden HEK hücrelerinde forskolin kaynaklı cAMP birikimini de azalttığı gösterilmiştir (42). MRGPRX2 agonistleri, örneğin insan konak savunma peptidi, LL-37 ve hBD'lerin, PTx'e (*Bordetella pertussis* toksini) duyarlı G proteinine bağımlı bir yolla insan mast hücre degranülasyonunu indüklediği gösterilmiştir (43,44). PTx, agonist kaynaklı degranülasyonu inhibe eder, ancak kalsiyum sinyalini inhibe etmez dolayısıyla Gi-protein yolunun esas olarak mast hücre degranülasyonu ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, PTx ve YM-254890 (bir G α q protein inhibitörü), P maddesi kaynaklı Ca^{++} mobilizasyonunu ve sıçan mast hücre degranülasyonunu önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir (45). Benzer şekilde, hem G α q hem de G α i1'in insan deri mast hücrelerinin degranülasyonu için gerekli olduğu görülmüş, ancak G α i'nin bileşik 48/80 ve P maddesi kaynaklı mast hücre degranülasyonu ile daha alakalı olduğu düşünülmüştür (46).

Doğrudan G protein aktivasyonunu ölçen kimerik G proteini bazlı TGF α testi kullanılarak, CST-14 tarafından aktive edilen MRGPRX2'nin tüm G protein aileleri, G α s, G α i/o, G α q/11 ve G α 12/13 ile gelişigüzel bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir (47). Yapılan çalışmalarda, MRGPRX2'nin tüm G α protein ailelerine bağlandığı, ancak özellikle G α q ve G α i1 proteinleri ile güçlü bağ kurduğu gösterilmiştir (48).

Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2 aracılı degranülasyon, hücre içi Ca^{++} konsantrasyonundaki hızlı ve geçici bir şekilde tetiklenmektedir (49). Yapılan çalışmalar, MRGPRX2'nin fosfolipaz C- β (PLC β)'nin, G α q/11 ve G β γ yoluyla aktivasyonunun, MRGPRX2'ye bağlanan bir ligandın PIP2'nin (hücre zarında bulunan bir fosfolipit) hidrolizine neden olduğuna, bu hidroliz sonucu DAG (diasilgliserol) ve IP3'ün (hidroliz yoluyla üretilen bir ikinci haberci) oluştuğuna bunlarında endoplazmik retikulumdan Ca^{++} salınımına neden olduğu göstermiştir (50). PLC β 'nin G α q

proteinleri tarafından aktivasyonuna ek olarak, MRGPRX2'nin, tipik olarak tirozin kinazlar tarafından düzenlenen bir enzim olan PLC γ 'yı da aktive ettiği bilinmektedir. İnsan mast hücrelerinde MRGPRX2 aracılı aktivasyon sırasında PLC γ ve IP3R'nin fosforilasyonunun arttığı *western blot* yöntemi kullanılarak da gösterilmiştir (51).

PLC β 'nin G α proteinleri tarafından aktivasyonuna ek olarak, MRGPRX2'nin, tipik olarak tirozin kinazlar tarafından düzenlenen bir enzim olan PLC γ 'yı da aktive ettiği bilinmektedir. İnsan mast hücrelerinde MRGPRX2 aracılı aktivasyon sırasında PLC γ ve IP3R'nin fosforilasyonunun arttığı *western blot* yöntemi kullanılarak da gösterilmiştir (51).

Farklı PLC izoenzimlerinin, PLC β ve PLC γ 'nin katılımı, Fc ϵ RI aracılı mast hücre degranülasyonunun aksine, MRGPRX2 aracılı mast hücre degranülasyonunun neden hızlı olduğunu ve geçici Ca⁺⁺ mobilizasyonu tarafından tetiklendiğini açıklayabilir (52,53). Bileşik 48/80'in Lyn ve PLC γ fosforilasyonunu indükleyerek LAD2 hücrelerinde artan Ca⁺⁺ mobilizasyonuna yol açtığı görülmüştür (52). Hem fosfatidilinositol-3 kinazın (PI3K) LY294002 (bir PI3K inhibitörü) tarafından hem de PLC γ 'nin U73122 (bir PLC inhibitörü) tarafından inhibisyonunun, bileşik 48/80 kaynaklı Ca⁺⁺ sinyalini ve bunu takiben degranülasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (53,54). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, bileşik 48/80'in neden olduğu alerjik semptomlar, hem PI3K hem de PLC γ fosforilasyonunu inhibe ederek azaltılmıştır (56). Bu nedenle, PI3K/AKT ve PLC γ yollarının, MRGPRX2 aktivasyonunu takiben artan hücre içi Ca⁺⁺ seviyesi artışı ile sonuçlanan psödoalerjik reaksiyonlarda gözlenen mast hücre degranülasyonunda rol oynaması muhtemeldir. MRGPRX2 ile tirozin kinazların aktivasyonu arasındaki bağlantı halen belirsizliğini korumaktadır. Ancak hem G proteinlerini hem de reseptör tirozin kinazları (RTK) bağlayabilen bir protein olan G α proteini ile etkileşime giren vezikülle ilişkili protein (GIV; Girdin) ile açıklanabilir (55,56). GIV, G α i protein alt birimleri için bir sinyal dönüştürücü gibi davranır. Ancak, MRGPRX2 ve RTK arasındaki etkileşim hala aydınlatılmayı beklemektedir (57).

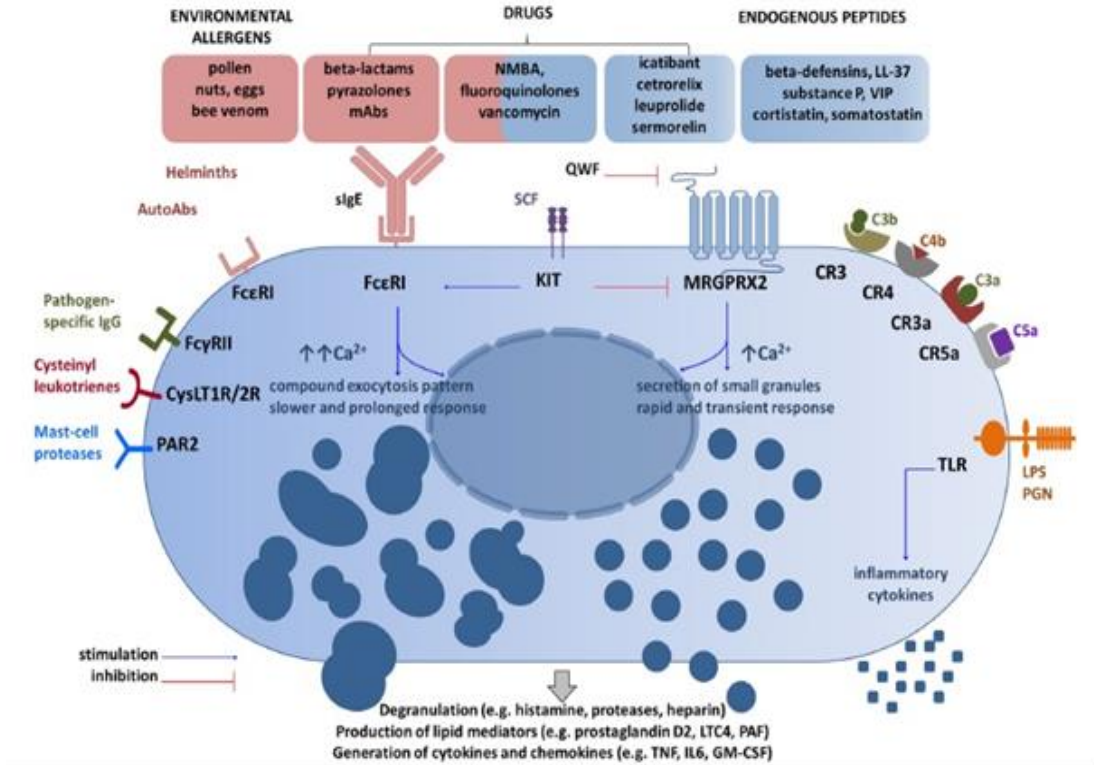
Son araştırmalar, MRGPRX2 aktivasyonunu degranülasyona ve granül sekresyonuna çeviren üç fonksiyonel kinaz kümesini ortaya çıkarmıştır (58). İlk küme,

granüllerin ekzositoz sürecinde rol oynayabilen I κ B kinaz (IKK) ve nükleer faktör k κ B (NF- κ B), mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz (MAPKK veya MEK), MAPK ve ERK1/2'yi içerir (58,59). Bu kinazların aktive edildiği mekanizma belirsizdir, ancak PKC bir dizi kinazın aktive edilmesinde rol alabilir. İkinci küme, yalnızca tipik olarak GPCR'ler tarafından etkinleştirilen PLC β 'yi değil, aynı zamanda PLC γ 'yi de içeren PLC sinyalidir. Üçüncü küme ise PI3K ve kinaz 1'i (ULK1) aktive eden otofaji ile ilgili sinyalleri içerir (58,60).

Yapılan çalışmalarda, insan MRGPRX2 ve fare ortoloğu olan Mrgprb2'nin bazı ilaçların kullanımıyla aktive olarak doğrudan mast hücre degranülasyonunu ve anafilaktik reaksiyonları tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca subkutan veya intramüsküler olarak verilen ve sıklıkla enjeksiyon bölgesinde kaşıntı ve eritemin eşlik ettiği lokal ödem indükleyen ve yaygın olarak kullanılan katyonik peptiderjik ilaçların da, mast hücrelerinin MRGPRX2'ye bağlı aktivasyonuna sebep olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, bir tetrahidroizokinolin motifi (THIQ) veya benzer bir yapıya sahip küçük molekül ağırlıklı intravenöz ilaçlarla, örneğin suksinilkolin dışındaki bazı NMBA'ların ve intravenöz kullanım için onaylanmış dört florokinolonun (siprofloksasin, moxifloksasin, levofloksasin, ofloksasin), mast hücrelerini MRGPRX2 ve Mrgprb2 aracılığıyla aktive ettiği görülmüştür (25).

Navines-Ferrer ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, opiatlar, NMBA'lar (sisatrakuryum, rokuronyum), iyotlu kontrast ajanlar (meglumin amidotrizoat, iohexol, iomeprol), antibiyotikler (vankomisin, teikoplanin, amoksisilin-klavulanik asit), nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler; diklofenak) ve anestezipler (propofol) gibi çeşitli ilaçlar test edilmiş ve bu ilaçlardan, sisatrakuryum, morfin, vankomisin, meglumin amidotrizoat ve iomeprol'ün MRGPRX2'nin aracılık ettiği LAD2 mast hücrelerinin degranülasyonunu tetiklediğini göstermişlerdir. Ayrıca, anestezi sırasında anafilaktoid reaksiyon geçiren hastalardan toplanan serumların MRGPRX2'ye bağımlı bir şekilde mast hücre degranülasyonuna neden olduğunu da göstermişlerdir (21,61).

Ayrıca yapılan çalışmalarda, QWF (glutaminyl- D-tryptophylphenylalanine) (MRGPRX2 antagonisti) olarak kısaltılan bir tripeptidin, bileşik 48/80 gibi temel sekretagoglar ve ayrıca atracurium ve ciprofloxacın aracılığıyla gerçekleşen insan MRGPRX2'nin aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (29). P maddesi ve bileşik 48/80'in mutasyona uğramamış Mrgpr'leri aktive ederken, tek bir amino asitin mutasyona uğradığı Mrgpr'leri aktive edemediği göstermiştir. Fakat LL-37'nin (katalisidin) hem doğal reseptörleri hem de mutasyona uğramış reseptörleri aktive ettiği görülmüştür. Bu bulgular, P maddesi ve 48/80 bileşiği için, Mrgpr aktivasyon sahasının LL-37' nin aktivasyon sahasından farklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bir Mrgpr antagonist olan QWF, P maddesi ve bileşik 48/80'in MRGPRX2 ile etkileşimini inhibe ederken LL-37 ile reseptör arasındaki etkileşimi inhibe etmediği bilinmektedir. Yine aynı grup tarafından yapılan başka bir çalışmada, vankomisin insan MRGPRX2'sini aktive ettiğini ve bu tür bir aktivasyonun QWF tarafından önlendiğini göstermiştir (Şekil 2.4). Ayrıca, tahmine dayalı moleküler modelleme deneyleri, MRGPRX2'deki tek amino asitlik bir mutasyonunun (Glu164Arg), reseptör ve genel sekretagoglar (P maddesi ve bileşik 48/80) arasındaki etkileşimi engellediğini doğrulanmıştır (21,62).



Şekil 2.4. Ana reseptör sistemleri ve mast hücresi aktivasyonunda rol oynayan ligand örnekleri (21).

İlaçlar hem sIgE' ye bağlı mekanizmalarla hem de MRGPRX2 reseptörü aracılığıyla mast hücrelerini aktive edebilir. Bu aktivasyon yolları birbirinden bağımsızdır. QWF, insan MRGPRX2'nin aktivasyonunu bir dizi temel sekretagog ve ilaçla inhibe eder. MRGPRX2 bağlantılı hücre yanıtı, FcεRI aracılı yanıttan farklıdır. CR, kompleman sistem reseptörleri; CysLT1R / 2R reseptörleri, sisteinil lökotrienler; FcγRII; düşük afiniteli IgG reseptörü; FcεRI, yüksek afiniteli IgE reseptörü; GM-CSF, granülosit / makrofaj koloni uyarıcı faktör; IL, interlökin; KIT, mast / kök hücre büyüme faktörü reseptörü (CD117); LPS, lipopolisakkarit; LTC4, lökotrien C4; Abs, antikorlar; MRGPRX2, Mas-ilişkili G proteinine bağlı reseptör-X2; NMBA, nöromusküler bloke edici ajanlar; PAR2, proteaz ile aktiveleşen reseptör 2; PGN, peptidoglikan; SCF, kök hücre faktörü; sIgE, spesifik IgE; TLR, Toll like reseptör; TNF, tümör nekroz faktörü; QWF-tripeptid (glutaminil-D-triptofenilalanin); VIP, vazoaaktif bağırsak peptidi (24).

2.5. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ve ilaç alerjileri ile olan ilişkisi

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), insan genomunda en yaygın genetik varyasyon türüdür. SNP'ler, DNA dizisinde belirli konumlarda meydana gelen tek nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. SNP, genomun belirli bir konumunda tek bir nükleotid bazının (A, T, C veya G) farklı olması durumunu temsil eder. Örneğin, referans bir genomdaki belirli bir konumda bulunan bir G nükleotidi A ile değiştirilebilir. Bir popülasyonun çoğunluğu bir nükleotid taşırken, azınlık farklı bir nükleotide sahip olabilir (63).

Tek nükleotid polimorfizmleri, genomun kodlanan ve kodlamayan bölgelerinde meydana gelebilir ve eşanlı (bir proteinin amino asit dizisini değiştirmeyen) veya eşanlı olmayan (bir proteinde amino asit dizisinde değişikliğine neden olan) olabilir. SNP'ler gen ekspresyonunu veya protein fonksiyonunu etkileyen düzenleyici bölgelerde de oluşabilirler. Örneğin, bir SNP'nin belirli bir gen üzerindeki konumu, protein yapısında veya regülasyonunda değişikliklere neden olabilir. SNP'lerin genom boyunca yaygın olarak bulunması ve dağılımı, kişiler arasındaki değişkenlikleri, hastalıkları, ilaç tepkilerini ve diğer kompleks fenotipleri belirlemede önemli bir rol oynar (63,64,).

Tek nükleotid polimorfizmleri, genetik araştırmalarda genotipleme veya dizileme yöntemleriyle tespit edilebilirler. SNP'lerin tespit edilmesi ve analizi, popülasyon genetiği, kompleks hastalıkların genetik temellerinin araştırılması ve kişiselleştirilmiş tıp alanlarında yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır (64).

Tek nükleotid polimorfizmleri, popülasyondaki frekanslarına göre sınıflandırılabilir. Yaygın SNP'ler, genellikle (minör alel frekansı (MAF)) %1 veya daha yüksek bir frekansa sahip olan SNP'leridir. Nadir SNP'ler ise daha düşük bir frekansa sahiptirler. Yaygın ve nadir SNP'ler arasındaki ayırım, popülasyon genetiği ve ilişki çalışmalar için oldukça önemlidir (64,65).

Tek nükleotid polimorfizmleri, genetik araştırmalarda önemli bir role sahiptirler, çünkü biyolojik süreçlerdeki rolleri nedeniyle hastalık riski, ilaç tepkisi, popülasyon genetiği ve evrimsel genetik araştırmaları etkileyen önemli faktörlerdir. SNP'lerin keşfi ve karakterizasyonu için birçok kaynak ve veritabanı bulunmaktadır. Örneğin, Uluslararası HapMap Projesi ve 1000 Genom Projesi gibi büyük ölçekli projeler, insan popülasyonlarındaki SNP varyasyonlarını sistematik olarak incelemek için oluşturulmuştur. Ayrıca, dbSNP, Ensembl ve gnomAD gibi veritabanları, genetik varyasyonların kataloglanması ve erişimi için önemli kaynaklardır. SNP'lerin kaynakları genellikle doğal genetik değişimlerdir. Bunlar, spontan mutasyonlar, genetik rekombinasyonlar, çevresel faktörlerin etkisi, selektif baskılar ve genetik drift gibi faktörlerden kaynaklanabilir (66,67).

Tek nükleotid polimorfizmleri fonksiyonel etkilerini anlamak, genetik ve genomik araştırmalarda önemlidir. SNP'ler, gen ekspresyonunu, protein yapısını ve fonksiyonunu etkileyebilir ve hastalık duyarlılığına ve tedavi yanıtlarına katkıda bulunabilir. Genom çapında ilişkilendirme alışmaları (GWAS), belirli SNP'leri çeşitli kompleks hastalıklar ve özelliklerle ilişkilendirmiştir (67).

Tek nükleotid polimorfizmlerinin, proteinlerin yapısını, etkileşimlerini ve özelliklerini etkilediği bilinmektedir. SNP'ler, MRGPRX2'nin yapısını değiştirerek bireyleri hiperaktivasyona yatkın hale getirebilecek MRGPRX2 varyantları ile bağlantılı olabilir (68,69). Yang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, MRGPRX2 proteininde  spesifik amino asitte (Asn16His, Asn62Ser ve Phe78Leu) değişiklik meydana geldiğini bulmuşlardır (70). Yapılan alışmalar ve NCBI veri tabanı incelendiğinde, insan MRGPRX2 lokusunun kodlama bölgelerinde birçok SNP olduğu tespit edilmiş ve insan MRGPRX2 lokusunun kodlama bölgelerindeki SNP'lerin listesi Tablo 2.1 de verilmiştir (21,71).

Tablo 2.1. İnsan MRGPRX2 lokusunun kodlama bölgelerindeki bazı SNP'lerin listesi

SNP ID	Mutasyon	Nükleotid Varyasyonu	MAF	Amino Asit Değişikliği	MRGPRX2 domain	Ligandlara Yanıt
rs10833049	Yanlış anlamlı varyant	T > G / T > C	C = 0.3185	Asn62Thr Asn62Ser	CPD1	Belirsiz
rs11024970	Yanlış anlamlı varyant	T > G	G = 0.1130	Asn16His	ECD1	Değiştirmiyor (HK1, SP, IC, hBD3)
rs11823569	Yanlış anlamlı varyant	C > T	T = 0.0066	Val43Ile	TMD1	Değiştirmiyor (HK1, SP, IC, hBD3)
rs564668393	Yanlış anlamlı varyant	A > G	G = 0.0066	Ser284Pro	CPD4	Belirsiz
rs79763999	Yanlış anlamlı varyant	A > G	G = 0.0032	Phe78Leu	TMD2	Değiştirmiyor (HK1, SP, IC, hBD3)
rs60756581	Yanlış anlamlı varyant	G > A / G > C	A = 0.0022	Arg140Cys Arg140Gly	CPD2	Belirsiz
rs114017828	Yanlış anlamlı varyant	T > A / T > C	C = 0.0022	Met324LeuMet3 24Val	CPD4	Belirsiz
rs145992601	Yanlış anlamlı varyant	G > C	C = 0.0020	Leu31Val	TMD1	Değiştirmiyor (HK1, SP, IC, hBD3)
rs117328742	Yanlış anlamlı varyant	A > C	C = 0.0016	Ser313Arg	CPD4	Belirsiz
rs150365137	Yanlış anlamlı varyant	A > G	G = 0.0014	Trp243Arg	TMD6	Fonksiyon kaybı (HK1, SP, IC, hBD3)
rs75443524	Yanlış anlamlı varyant	T > A / T > C	C = 0.0010	Arg61Trp Arg61Gly	CPD1	Belirsiz
rs572320540	Yanlış anlamlı varyant	C > A / C > T	A = 0.0010	Ala74Ser Ala74Thr	TMD2	Belirsiz
rs118176470	Yanlış anlamlı varyant	A > G	G = 0.0006	Val108Ala	TMD3	Belirsiz
rs140862085	Yanlış anlamlı varyant	G > A	A = 0.0004	His259Tyr	ECD4	Fonksiyon kaybı (HK1, SP, IC, hBD3)
rs572101439	Yanlış anlamlı varyant	T > C	C = 0.0002	Thr224Ala	TMD6	Belirsiz
rs564709381	Yanlış anlamlı varyant	G > T	T = 0.0002	Pro6Thr	ECD1	Belirsiz
rs550191582	Yanlış anlamlı varyant	T > C	C = 0.0002	Ser103Gly	TMD3	Belirsiz
rs543158275	Yanlış anlamlı varyant	C > G	G = 0.0002	Val51Leu	TMD1	Belirsiz
rs531328060	Yanlış anlamlı varyant	C > T	T = 0.0002	Met196Ile	TMD5	Belirsiz
rs530355228	Yanlış anlamlı varyant	G > C	C = 0.0002	Pro322Ala	CPD4	Belirsiz
rs372986472	Yanlış anlamlı varyant	C > A	A = 0.0002	Asp252Tyr	ECD4	Belirsiz
rs201846837	Yanlış anlamlı varyant	C > G	G = 0.0002	Met119Ile	TMD3	Belirsiz
rs201177657	Yanlış anlamlı varyant	G > A	A = 0.0002	Pro142Leu	CPD2	Belirsiz
rs181882698	Yanlış anlamlı varyant	C > T	T = 0.0002	Asp75Asn	TMD2	Belirsiz
rs141141857	Yanlış anlamlı varyant	G > A / G > C	C = 0.0002	Pro238Ser Pro238Ala	TMD6	Belirsiz
rs111606529	Yanlış anlamlı varyant	G > A	A = 0.0002	Arg290Trp	CPD4	Belirsiz
rs141744602	Yanlış anlamlı varyant	C > T	T = 0.000008	Gly165Glu	ECD3	Fonksiyon kaybı (HK1, SP, IC, hBD3)
rs372988289	Yanlış anlamlı varyant	C > G	G = 0.000008	Asp184His	TMD5	Fonksiyon kaybı (HK1, SP, IC, hBD3)

En yaygın SNP'lerden ikisi, 0,3185 ve 0,1130'luk minör allel frekanslarına (MAF) sahip Asn62Thr (rs10833049) ve Asn16His (rs11024970) amino asit

değişikliğidir. Asn62Thr, MRGPRX2' nin sitoplazmik domainini (CPD1), Asn16His ise ekstrasellüler domainini (ECD1) ve Trp243Arg, MRGPRX2'nin transmembran domaini (TMD6) etkiler. Diğer SNP'ler ise nadir veya çok nadir allel frekansına sahiptir (MAF <0.01) (24). Bununla birlikte, G proteinine bağlı reseptörlerin (GPCR) ekstrasellüler domainleri genellikle ligand/reseptör ilişkisinde rol oynar (70). Tespit edilen SNP'lerin yalnızca beşi intasellüler domainler ile ilişkilidir (Pro6Thr, Asn16His, Gly165Glu, Asp252Tyr, His259Tyr). Yapılan çalışmalarda, Gly165Glu, Asp184His, Trp243Arg ve His259Tyr SNP'lerinden birini ifade eden RBL-2H3 hücrelerinin, P maddesi, hemokinin-1, insan β -defensin-3 ve icatibant dâhil olmak üzere MRGPRX2 ligandlarına yanıt vermediğini göstermiştir. Bu dört SNP'i barındıran hastalar, ilaca bağlı mast hücre degranülasyonundan ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarından etkilenmeyebilirler. SNP'lerin MRGPRX2'nin ligand bağlanma özelliklerini nasıl değiştirebileceğini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (71). Ayrıca bu çalışmalarda MRGPRX2 ve Mrgprb2 nin, temel sekretagolar ve nörokininler tarafından aktive edildiği, nöromusküler bloke edici ajanlar, florokinolonlar ve vankomisin gibi yaygın olarak kullanılan bazı küçük moleküllü ilaçların da bu reseptörleri in vitro koşullar altında aktive ettiğini göstermiştir (71).

Diğer ilaç alerjileri ve SNP ler arasındaki ilişkiyi gösteren farklı çalışmalar incelendiğinde; Yapılan bir çalışmada, β -laktamlara karşı ani gelişen alerjik reaksiyonları olan hastalarda genetik yatkınlık faktörlerinin rolünü değerlendirmek amaçlanmıştır ve Immünoglobulin (Ig)E sentez regülasyonunda rol oynayan proteinleri kodlayan genlerdeki 15 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) incelenmiştir. Bu çalışmada cinsiyet ve atopi açısından eşleştirilmiş 44 β -laktam alerjisi olan hasta ve 44 kontrol grubunu içeren bir vaka-kontrol çalışması yapılmıştır. Interlökin (IL)-4, IL-13, IL-4R α , sinyal transdüseri ve aktivatörü olan transkripsiyon 6 (STAT6), interferon (IFN)- γ R1, IFN- γ R2 ve Fc ϵ RI β gen polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi kullanılarak belirlenmiştir. IL-21R geni ve IL-10 promotör polimorfizmleri ise direkt sekanslama yöntemiyle belirlenmiştir. Analizler, alerjik hastalar ve kontrol grubu arasında 15 SNP'nin dağılımında farklılık ortaya koymamış ancak, atopik bireyler arasında, ani gelişen β -laktam alerjisi ile kadınlar arasında IL-

4R α geninin Ile75Val varyantı ve bağlantılı iki IL-10 promotör gen polimorfizmi olan -819C>T ve -592 C>A arasında iki farklı anlamlı ilişki bulunmuştur. Ancak, atopik erkek hastalarda alerjik bir ilişki gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, Guglielmi ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada IL-10 promotörü ve IL-4R α genlerindeki polimorfizmlerin, atopik kadın hastalarda β -laktam alerjilerini destekleyen genetik faktörler olduğunu düşündürmüştür (72).

Apter ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, penisilin alerjisi olan 23 vaka incelenmiştir. Bu hastalar bir doz penisilin alımından sonra ürtiker, anjiyoödem, hırıltı, hipotansiyon, kusma veya anafilaksi öyküsüne sahiptir. Yanak sürüntülerinden elde edilen DNA ile yapılan çalışmada, IL4, IL4R, IL10 ve penisilin metabolizması (LACTB) ile ilişkili aday genlerle ilişkili varyantlar için genotiplendirilmiştir. Çalışmada, IL4 tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) (rs11740584, rs10062446 ve rs2070874) penisilin alerjisi ile doğrudan ilişkilendirilmiş ve LACTB SNP rs2729835 penisilin alerjisi ile sınırlı ilişkilendirilmiştir (73).

Yine penisilin alerjisi ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, β -laktam alerjisinin genetik belirleyicilerini incelemek için genom çapında ilişki çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, İspanya'dan 387 hasta ve 1124 kontrol örneği kullanılmıştır ve sonuçlar İtalya'dan 299 hasta ve 362 kontrol örneği ile tekrarlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, rs4958427, rs17612, rs7754768 ve rs9268832 tek nükleotid polimorfizmleri ile anlamlı ilişkiler bulunmuştur ve sonuçlar; genetik yatkınlığın HLA tip 2 antijen sunumunun merkezi bir rol oynadığı karmaşık gen-çevre etkileşimlerini göstermiştir (74).

Aspirin ile yapılan bir çalışmada ise, interleukin-4 (IL-4) sentezini etkileyen aspirinin; IL-4'ün, aspirin hassasiyeti olan astımlı hastalardaki genetik rolü araştırılmış ve IL-4 genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) astımlılarda aspirin hassasiyeti üzerindeki genetik ve moleküler düzeydeki etkisini incelenmiştir. Araştırmada, aspirine duyarlı 103 ve aspirine toleranslı astımlı 270 hasta genotiplendirilmiş ve işlevsel promotör deneyleri yapılmıştır. Test edilen 15 SNP'den

yedisi (rs2243250, rs2070874, rs2243266, rs2243267, rs2243268, rs2243270, rs2243274) aspirine duyarlılık ile anlamlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir (75).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Yeri

Örnekler, Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Alerji Ünitesi tarafından temin edilmiş ve laboratuvar çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Alerji ve Astım Araştırma laboratuvarında yapılmıştır.

3.2. Araştırmanın Evreni Örneklemi Araştırma Grubu

GO 21/759 sayılı etik kurul kararının kriterlerine uygun şekilde 0-18 yaş aralığında olan, kırmızı boyun sendromu tanısı ile takip edilen 38 hasta ve 22 sağlıklı kontrole ait veriler ve kan örnekleri kullanılmıştır.

3.2.1. Araştırmaya Dahil Olma ve Olmama Kriterleri

Dahil edilme kriterleri:

- ✓ 0-18 yaş arasında olmak
- ✓ Doktor tanılı vankomisine bağlı kırmızı boyun sendromu tanısı olmak
- ✓ Ebeveynin araştırma amaçlı çalışma için onay vermesi (Ek 1.)
- ✓ Çocuğun araştırma amaçlı çalışma için onay vermesi (Ek 2.)

Araştırmaya alınmama kriterleri:

- ✓ Onam vermemek
- ✓ Vankomisin kullanımına bağlı herhangi bir reaksiyon geliştirmiş olmak
- ✓ Başka ilaç kullanımına bağlı kronik ürtiker, matositoz geliştirmemiş olmak

3.2.2. Gönüllü ve/veya Hastanın Araştırmadan Çıkarılma Kriterleri ve Araştırmadan Çıkarılanların İzlenme Süresi

Çalışmadan çıkmak isteyen gönüllü ve/veya hastalar araştırmadan çıkartılmış. Çocuk Alerji Bilim Dalında takibine devam etmek isteyen hastaların hastalıklarına yönelik rutin izlemlerine aynen devam edilmiştir.

3.3. Çalışma Planı

3.3.1. Kandan DNA İzolasyonu

1. Aşama:

Hücrelerin Parçalanması: 8-10 ml kan örneği 40-50 ml tampon çözelti (Tris-EDTA) ile yıkanarak (4000-rpm /4 dk x 3) eritrositler ve serum uzaklaştırılmış ve DNA' yı içeren lökositler toplanmıştır. Toplanan lökositleri parçalamak için 1,6 ml %10 SDS ve 1,8 ml yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltisi (1M NaCl) kullanılmıştır. Daha sonra DNA-protein komplekslerinin uzaklaştırılması ve proteinlerin parçalanması için 60 µl Proteinaz K eklenmiştir.

2. Aşama:

56°C de 2 saat veya 37°C de gece boyu bekletilerek hem hücrelerin parçalanması hemde proteinlerin parçalanması sağlanmıştır.

3. Aşama:

- ✓ DNA'nın proteinler, lipidler ve diğer makromoleküllerden uzaklaştırılması için üzerine 5 ml tris ile sature edilmiş fenol eklenmiş ve süt beyazı olana kadar karıştırılmıştır.
- ✓ Üzerine 5 ml kloroform eklenip karıştırılmış ve 2500-rpm de 3 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Berrak olan üst faz pipet yardımıyla falkon tüplere aktarılmıştır. Bu faz DNA yı içeren fazdır.

4. Aşama:

- ✓ Presipitasyon: Falkona aktarılan DNA'yı içeren fazın üzerine 15 ml ye kadar %100 soğuk etanol ilave edilmiştir. Alkol DNA ya bağlı olan su moleküllerini uzaklaştırır ve DNA'nın çökmesini sağlar bu nedenle izolasyonun bu evresinde DNA çıplak gözle görülebilir hale gelir.
- ✓ DNA'yı içeren falkon tüpü 10 dk -20°C de bekletildikten sonra 4000-rpm de 4 dk santrifüj edilmiş ve üstteki alkol uzaklaştırıldıktan sonra üzerine %70 lik soğuk etanol eklenmiş ve tekrar 4000-rpm'de 4 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Üstteki alkol tamamen uzaklaştırılıp falkon tüpünün içindeki alkol buharlaştıktan sonra, (1-1,5 saat) dipte kalan DNA'nın üzerine 0,5 ila 1ml siteril distile su eklenmiş ve DNA çözünene kadar oda ısısında bekletilmiştir.
- ✓ DNA çözüldükten sonra DNA konsantrasyonu ve saflığı *Thermo Scientific NanoDrop 2000c* ile ölçülmüştür.

3.3.2. Mas ile İlişkili G-proteine Bağlı Reseptör Elemanı X2'nin Gen Mutasyon Analizi

Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2 geninin protein kodlayan bölgesi aşağıda dizisi belirtilen primerler kullanılarak iki bölge olarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra DNA Dizi analizi yöntemi kullanılarak genetik varyasyonlar belirlenmiştir. MRGPRX2 geninde kullanılmak üzere dizayn edilen primerlerin dizi Şekil 3.1. de gösterilmiştir.

MRGPRX2 F1 5'-TCAGTGAACATGCAGCAGG-3'

MRGPRX2 R1 5'-TACCAGATGGGCCACAGG-3'

MRGPRX2 F2 5'-TGTGATGACCTGTGCCTAC-3'

MRGPRX2 R2 5'-ATCAGACAGACAGGGGCAAA-3'

```

TAAAACAGGGGCGGTAATTACCACATAACAGGCTGGTCATGAAAATCAGTGAACATGCAG
CAGGTGCTCAAGTCTTGTTTTTGTTTCAGGGCACCAGTGGAGGTTTTCTGAGCATGGA
TCCAACCACCCCGGCCTGGGGAACAGAAAGTACAACAGTGAATGGAATGACCAAGCCCT
TCTTCTGCTTTGTGGCAAGGAGACCCTGATCCCGTCTTCCTGATCCTTTTCATTGCCCT
GGTCGGGCTGGTAGGAAACGGGTTTGTGCTCTGGCTCCTGGGCTCCGCATGCCAGGAA
CGCCTTCTCTGTCTACGTCTCAGCCTGGCCGGGGCCGACTTCCTCTTCCTCTGCTCCA
GATTATAAATTGCCTGGTGTACCTCAGTAACTTCTTCTGTTCCATCTCCATCAATTTCCC
TAGCTTCTTCACCAC TGTGATGACCTGTGCCTACCTTG CAGGCCTGAGCATGCTGAGCAC
CGTCAGCACCGAGCGCTGCCTGTCCGT CCTGTGGCCATCTGGTATCGCTGCCGCCGCC
CAGACACCTGTCAGCGGTGTTGTGCTCTGCTCTGGGCCCTGTCCCTACTGCTGAGCAT
CTTGAAGGGAAGTTCTGTGGCTTCTTATTTAGTGATGGTGA CTGGTTGGTGTGAGAC
ATTTGATTTTCATCACTGCAGCGTGGCTGATTTTTTTTATT CATGGTTCTCTGTGGGTCCAG
TCTGGCCCTGCTGGT CAGGATCCTCTGTGGCTCCAGGGGTCTGCCACTGACCAGGCTGTA
CCTGACCATCCTGCTCACAGTGCTGGTGTTCCTCCTCTGCGGCCTGCCCTTTGGCATTCA
GTGTTCCCTAATATTATGGATCTGGAAGGATTCTGATGTCTTATTTGTGATATTCATCC
AGTTTCAGTTGTCTGTGTCATCTCTTAACAGCAGTGCCAACCCCATCATTTACTTCTTCGT
GGGCTCTTTTAGGAAGCAGTGGCGGCTGCAGCAGCCGATCCTCAAGCTGGCTCTCCAGAG
GGCTCTGCAGGACATTGCTGAGGTGGATCACAGTGAAGGATGCTTCCGTCAGGGCACCCC
GGAGATGTCGAGAAGCAGTCTGGTGTAGAGATGGACAGCCTCTACTTCCATCAGATATAT
GTGGCTTTGAGAGGCAACTTTGCCCTGTCTGTCTGATTTGCTGAACTTTCTCAGTCCGT

```

Şekil 3.1. MRGPRX2 geninde kullanılmak üzere dizayn edilen primerlerin dizi üzerinde gösterimi

3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), laboratuvar ortamında DNA'nın hızlı ve büyük miktarda çoğaltılması için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilmiş ve genetik araştırmalarda, teşhis amaçlı testlerde ve birçok diğer uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır.

PCR, DNA şablonunun belirli bir bölgesini milyonlarca kez çoğaltmak için DNA polimeraz adı verilen bir enzimi kullanır. PCR reaksiyonu, DNA şablonu, primer adı

verilen kısa DNA parçaları, nükleotitler ve bir DNA polimeraz enzimi içeren bir karışım gerektirir.

PCR, bir dizi ısıtma ve soğutma adımı kullanılarak gerçekleştirilir. Genellikle üç temel adımdan oluşur:

1. Denatürasyon: DNA şablonu, yüksek sıcaklıkta (genellikle 90-95°C) ısıtılarak çift sarmal yapısının ayrışmasını sağlar. Bu adımda, hidrojen bağları kırılarak DNA tek zincirli hale getirilir.
2. Primer Bağlanması: Reaksiyon karışımına eklenen primerler, hedef DNA bölgesine spesifik olarak bağlanır. Primerler, DNA şablonu üzerinde başlangıç noktaları olarak hareket eder ve DNA polimerazın bağlanması için bir şablon oluşturur. Bu adım, reaksiyonun belirli bir sıcaklığa soğutulması (genellikle 40-60°C) ile gerçekleşir.
3. Uzama: DNA polimeraz enzimi, primerlerin bağlandığı başlangıç noktasından itibaren DNA zincirini sentezler. Uzama adımında, DNA polimeraz, serbest nükleotitlerin şablonla eşleşmesiyle yeni bir DNA zinciri sentezler. Bu adım, belirli bir sıcaklıkta (genellikle 70-75°C) gerçekleştirilir ve her döngüde DNA zinciri ikiye katlanır.

Bu üç adım, bir dizi tekrarlı ısıtma-soğutma döngüsüyle gerçekleştirilir. Her döngü, hedef DNA'nın kopya sayısını geometrik olarak artırır. Böylece, başlangıçta sınırlı bir miktarda olan DNA şablonu, milyonlarca kopyasına çoğaltılabilir.

Tez çalışmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), iki gen bölgesi için de malzemeler aynı oranda kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR öncesi, primer ana stoklarından primerlerin üzerinde yazan oranda alınarak dH₂O ile karıştırılmış ve ara stoklar elde edilmiştir. Yine DNA'lar da 50 ng/μl konsantrasyonda olacak şekilde dilüe edilerek ara stok elde edilmiş PCR reaksiyonunda bu ara stoklar kullanılmıştır.

PCR reaksiyonu her iki bölge için de;

- ✓ 2, 5 µl Taq Buffer (10X)
- ✓ 1, 5 µl MgCl₂ (25 mM)
- ✓ 0, 5 µl primer R (10pmol/µL)
- ✓ 0, 5 µl primer F (10pmol/µL)
- ✓ 0, 5 µl dNTP (10mM)
- ✓ 0,25µl Taq DNA polimeraz (5U/µL) kullanılmıştır.

Steril distile su ile son reaksiyon hacmi 25 µl 'ye tamamlanmıştır.

PCR reaksiyonu için Thermo Px2 Thermal Cycler kullanılmıştır. Her iki bölge için de PCR optimal thermal cycler koşulları aynıdır. Koşullara Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. PCR koşulları

Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
95	5 dakika	1
95	45 saniye	35
59	40 saniye	
72	45 saniye	
72	3 dakika	1

3.3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

Agaroz jel, genellikle biyolojik deneylerde ve moleküler biyolojide DNA ve RNA örneklerinin ayrıştırılması ve analiz edilmesi için kullanılan bir materyaldir. Agaroz jel, agaroz adı verilen bir polisakkaritten yapılır. Agaroz, alglerden elde edilen doğal bir polisakkarittir ve genellikle laboratuvar ortamında jel formunda kullanılır. Agaroz jel, elektroforez tankında bir matris olarak kullanılır. Bu matris, bir elektrik akımının geçtiği ve DNA veya RNA örneklerinin farklı boyutlarına göre ayrıştığı bir ortam sağlar. Agaroz jel elektroforezi, örneklerin jel üzerine yerleştirildiği ve ardından elektrik akımı uygulandığı bir yöntemdir. Elektrik akımı, örnekleri hareket ettirir ve agaroz jelin içindeki gözenekli yapıya göre farklı boyutlarda moleküllerin ayrılmasını sağlar. Daha büyük moleküller, daha yavaş hareket ederken, daha küçük moleküller daha hızlı hareket eder.

Agaroz jel elektroforezi, DNA analizi, PCR ürünlerinin boyut tayini, genotip tespiti, DNA dizileme gibi birçok moleküler biyoloji ve genetik araştırmada yaygın olarak kullanılan bir tekniktir.

Tez çalışmasında, PCR reaksiyonu sonrası ürün oluşumunun gözlenmesi, spesifik olmayan bantların saptanması, oluşan ürünlerin istenen uzunlukta olup olmadığının anlaşılması amacıyla jel elektroforezi yapılmıştır. Bu işlem için öncelikle agaroz jel hazırlanmıştır. Jel hazır hale geldikten sonra, ilk kuyucuğa 3 µl 100 baz çiftlik DNA ladder eklenmiştir. DNA ladder (DNA merdiveni) belirli boyutlarda olan DNA parçalarının karışımını içerir ve agaroz jel elektroforezi sırasında DNA örneklerinin boyutlarının belirlenmesi için kullanılan bir moleküler marker veya referans standardıdır. Diğer kuyucuklara ise 5 µl PCR ürünü ve 2 µl 5X Green Go Taq karıştırılarak yüklenmiştir. Örnekler 110 V'da 20-25 dakika boyunca yürütülmüştür. Güç kaynağı olarak Wealtec Elite 300 cihazı kullanılmıştır. Bu işlem sonrasında bant görüntülemesi Kodak EDAS 290 yardımı ile yapılmıştır.

3.3.5. PCR Ürün Pürifikasyonu

Elektroforezde istenen uzunlukta bant saptanmış olan ürünler için pürifikasyon aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada ExoSAP ve FastAP enzimleri kullanılmıştır. Bu enzimler, PCR sonrası pürifikasyon işlemlerinde kullanılan en yaygın enzimlerdir. Bu enzimler, PCR ürünlerinden artık türevlerin (primerler ve nükleotitler) temizlenmesi için kullanılır. İşlem, PCR ürününe eklenen dNTP'leri ve primerleri hedeflenen spesifik DNA ürününden ayırmak için ekzonükleaz ve fosfataz enzim aktivitelerinin kullanılmasına dayanır.

ExoSAP (Exonuclease I ve Shrimp Alkaline Phosphatase): ExoSAP, PCR ürünündeki serbest nükleotitlerin (dNTP'ler) ve primerlerin temizlenmesi için kullanılan bir karışımdır. Exonuclease I, 5' uçtan başlayarak nükleotitlerin dışarı doğru sindirilmesini sağlarken, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) ise fosfat grubunu kaldırır. Bu işlem, PCR ürününün direkt olarak DNA sekanslama veya klonlama gibi uygulamalara hazır hale gelmesini sağlar. FastAP (Fast Alkaline Phosphatase): FastAP,

sadece fosfat grubunu kaldıran bir alkalin fosfataz enzimidir. PCR ürünündeki fosfat gruplarını temizleyerek, dNTP'lerin ve primerlerin çoğaltma reaksiyonlarında engel oluşturmasını önler. Bu şekilde, PCR ürünü doğrudan sekanslama veya klonlama için hazır hale getirilir. PCR sonrası pürifikasyon işlemi, PCR ürünündeki istenmeyen artıkları temizlemek ve hedeflenen DNA'nın saf hale getirilmesi için önemlidir. ExoSAP ve FastAP gibi enzimler, bu işlemi hızlı ve etkili bir şekilde gerçekleştirmek için kullanılır.

Pürifikasyon için Thermo Scientific Marka Exonuclease I ve FastAP kullanılmıştır. Bu aşamada, 5 µl PCR 0,5 µl Exonuclease I ve 1 µl FastAP kullanılmıştır. Pürifikasyon reaksiyonu için Thermo Px2 Thermal Cycler kullanılmıştır. Her iki bölge için de pürifikasyon optimal thermal cycler koşulları aynıdır. Koşullara Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Pürifikasyon koşulları

Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
37	30 dk	1
85	15 dk	1

3.3.6. Sanger Dizileme ile Hedef Genlerin Dizilenmesi

Dizi analizi için Sanger'in Zincir Sonlanma Reaksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Sanger metodu, DNA dizisini belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, DNA'nın yapı taşı olan nükleotitlerin sıralamasını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. Sanger metodu, 1977'de Frederick Sanger tarafından keşfedilmiştir ve günümüzde hala yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Zincir sonlandırma metodu, bu yöntemi bulan bilim insanına ithafen, Sanger Metodu olarak da adlandırılır ve temelde zincirin sentezini sonlandırmaya yarayan dideksinükleotitler (ddNTP) kullanılmasına dayanır.

Sanger metodu, belirlenecek DNA'nın çoğaltılması ve daha sonra belirli nükleotitlerin sıralamasının belirlenmesi adımlarından oluşur. İlk adımda, DNA şablonu PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemiyle çoğaltılır. Daha sonra, elde edilen PCR ürünü, farklı reaksiyon karışımlarına bölünür.

Bu reaksiyon karışımlarında, normal nükleotit trifosfatlar (dNTP'ler) ve dideoksinükleotit trifosfatlar (ddNTP'ler) bulunur. ddNTP'ler, normal nükleotitlerden farklı olarak, DNA zincirine bağlandığında zincirin uzamasını durduran bir özelliğe sahiptir. Bu karışımlar, DNA zincirinin belirli bir noktasında uzamasını durduracak şekilde tasarlanır.

Sonraki adımda, her bir reaksiyon karışımı ayrı ayrı elektroforez yöntemiyle analiz edilir. Elektroforez, DNA parçalarını elektrik alanında hareket ettirerek farklı uzunluklarda olan parçaların ayrışmasını sağlar. Bu sayede, her reaksiyondaki DNA parçalarının uzunlukları belirlenebilir.

Elektroforez sonucunda elde edilen bantlar, bir jelleme sistemi kullanılarak incelenir. Bantlardaki DNA parçalarının sıralaması, dizileme yöntemiyle belirlenir. En kısa DNA parçası, DNA dizisinin başlangıcını temsil eder. Ardından, elektroforez sonucunda ayrılan bantlar üzerindeki DNA parçaları dikkate alınarak, her bir nükleotidin sırası belirlenir. Bu sayede tek bir reaksiyonla dizi analizi yapılabilir.

Tez çalışmasında pürifiye edilen PCR ürünleri "BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing" Kit kullanılarak dizilenmiştir.

Bu işlem için;

- ✓ 4 µl dH₂O
- ✓ 2 µl 5X sekans buffer
- ✓ 1 µl Big Dye Terminator
- ✓ 1 µl PCR ürünü (pürüfüye edilmiş)
- ✓ 1 µl direkt ya da ters primer kullanılmıştır.

Daha sonra reaksiyon, thermal cycler cihazına yüklenmiştir. Dizileme reaksiyonu için optimal koşullar Tablo 3.3.'de verilmiştir. Sanger dizileme sonrası ürünlerin pürifikasyonuna geçilmiştir.

Tablo 3.3. Dizileme reaksiyonu koşulları

Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
96	1 dakika	1
96	10 saniye	30
50	10 saniye	
60	4 Dakika	

3.3.7. DNA Dizileme Sonrası Ürünlerin Pürifikasyonu

1. Her bir sekans reaksiyonu (10 µl) üzerine 1 µl 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 etanol eklenmiş ve 10 sn vortekslenmiştir.
2. Tüpler - 20°C'de 30 dakika bekletildikten sonra 13.000-rpm'de 20 dk. santrifüj edilmiştir.
3. Üstte kalan sıvı faz mikropipet ile çekilip atıldıktan sonra, dibe çöken kısmın üzerine 125 µl %70 etanol eklenmiş ve 13.000-rpm'de 10dk. santrifüj edilmiştir.
4. Sıvı faz mikropipet ile alındıktan sonra dibe çöken kısım 37°C'de kurutulmuştur.
5. Çökeltinin üzerine 20µl distile su eklenip, tüpler 10 saniye vortekslenildikten sonra pürifiye ürünler, kapiller elektroforez cihazında yürütülecek hale getirilmiştir. Pürifiye ürünler, 96 well plak aracılığı ile ABI Prism 3500 Genetic Analyzer cihazına yüklenmiş ve kapiller elektroforez gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular ve Laboratuvar Bulguları

Tez kapsamında değerlendirilen 38 vakanın 15'si kız ve 23'ü erkek hastalardan oluşmaktadır. Hastalar değerlendirilirken gerekli laboratuvar parametreleri, klinik öykü ve bulguları ayrıntılı şekilde kaydedilmiştir.

Yaş ortalamasının 10 yaş 9 ay olduğu grupta, 20 hastada vankomisin ile geçirdiği reaksiyon sonrasında kendiliğinden iyileşme gözlenmiştir. 11 hastaya sadece antihistaminik verilmiş olup, 2 hastaya ise hem antihistaminik hem de sistemik kortikosteroid (KS) tedavisi uygulanmıştır. Bir hastada ise feniramin ve parasetamol kullanılmıştır.

Vankomisin alan hastaların diğer ilaçlarla ilişkili olarak gösterdiği alerjik reaksiyonlar incelendiğinde, aşağıdaki durumlar gözlemlenmiştir:

- Bir hastada, NMBA, linezolid ve sefotaksim kullanımı döküntüye neden olmuş ve Roküronyum kullanımı sonucunda anafilaksi gelişmiştir.
- Başka bir hastada, teikoplanin kullanımı anafilaksi reaksiyonuna yol açmıştır.
- Bir hastada soperOX kullanımı sonucunda döküntü meydana gelmiştir.
- Bir hastanın ailesi ise çocuklarının Anti-Tbc (tüberküloz) ilaçlarına alerjik reaksiyon gösterdiğini bildirmiştir.

Vankomisin kullanımı sonrasında hastalar genellikle yanma, kaşıntı, maküler döküntü, ürtiker, *flushing* (ani kızarıklık), döküntü gibi reaksiyonlar sergilemiştir. İki hastada makülopapüler döküntü, üç hastada anjiyoödem gözlenmiştir. Hastaların atopik hastalık hikayesi incelendiğinde, altı hastada sadece astım hikayesi mevcutken, bir hastada alerjik rinit (AR), astım ve besin alerjisi birlikte mevcuttur. Başka bir hastada ise, alerjik rinit ve astım birlikte mevcuttur.

Vankomisin alan hastaların ailelerinin hastalık geçmişleri incelendiğinde ise aşağıdaki durumlar gözlemlenmiştir:

- ✓ Bir hastanın birinci derece akrabalarında astım vardır.
- ✓ Bir hastanın birinci derece akrabasında polen ve besin alerjisi mevcuttur.
- ✓ Başka bir hastanın birinci derece akrabasında astım ve lateks alerjisi birlikte bulunmaktadır.
- ✓ Yine hastalardan birinin birinci derece akrabasında mevsimsel alerjik rinit vardır ve ot deri testi pozitifdir, başka bir hastanın birinci derece akrabasında egzama mevcuttur.

Vankomisine reaksiyon gösteren hastaların bazılarında kronik hastalıklar da mevcuttur. Bu bilgiler Tablo 4.1'de her bir hastaya özel olarak sunulmuştur.

Tablo 4.1. Hastaların cinsiyet ve yaş bilgileri, klinik bulguları ve aile öyküleri

Hasta Numarası	Cinsiyet	Yaş/Ay	Atopik Hastalık Hikayesi	Ailede Atopik Hastalık	Ailede İlaç Alerjisi	Eşlik Eden Kronik Hastalık	Vanko Rex. (doz)	Tedavi	Bulgular	Diğer İlaç Alerjisi
1	E	12/1	Astım/AR/Besin Al.	Besin Al./Polen Al.	X	X	Kırmızı Boyun (1)	Antihistamin	Yanma/Kızarıklık/Kaşıntı	X
2	K	14/6	X	X	X	X	Kırmızı Boyun (36)	Antihistamin Sistemik KS	Maküler Döküntü Makülopapüler Döküntü Kaşıntı	X
3	E	17/11	X	X	Klamoks ile döküntü	X	Kırmızı Boyun (1)	–	Maküler Döküntü	NMBA/Linezolid Sefotaksim Roküronyum (Anafaksi)
4	K	13/6	X	X	X	X	Kırmızı Boyun (1)	Antihistamin	Ürtiker	X
5	E	7/7	X	X	X	Anaplastik Ependimom	Kırmızı Boyun (1)	Antihistamin	Flushing (yüz)	X
6	K	1/10	X	X	X	X	Kırmızı Boyun (1)	–	Flushing (kafa)	X
7	E	5/2	X	X	X	X	–	–	–	X
8	K	10/6	Astım	Mevsimsel (AR) Ot Deri Testi +	X	Kistik Fibrozis	Kırmızı Boyun(1)	–	Maküler Döküntü	X
9	E	16/6	Astım/Alerjik Rinit (AR)	Astım/Lateks Al	X	MINGIE Sendromu	Kırmızı Boyun	–	–	X
10	E	11/6	X	X	X	X	Kırmızı Boyun(1)	–	Maküler Döküntü/Kaşıntı/Ürtiker	X
11	E	3/0	X	Astım	X	Hipotonik infant/ Tek. Akciğer Enf./Hipertrofik Kardiyomiyopati Serebral atrofi	Kırmızı Boyun (1)	Antihistamin	Maküler Döküntü Flushing	Teikoplanin (anafaksi)
12	K	9/6	Astım	X	X	Spina Bifida/Hifrosefali Epilepsi	Kırmızı Boyun (1)	Parasetamol Feniramin	Kaşıntı/Flushing	X
13	E	3/2	X	X	X	X	Kırmızı Boyun (1)	–	Maküler Döküntü	X

Tablo 4.1. (devam) Hastaların cinsiyet ve yaş bilgileri, klinik bulguları ve aile öyküleri

Hasta Numarası	Cinsiyet	Yaş/Ay	Atopik Hastalık Hikayesi	Ailede Atopik Hastalık	Ailede İlaç Alerjisi	Eşlik Eden Kronik Hastalık	Vanko Rex. (doz)	Tedavi	Bulgular	Diğer İlaç Alerjisi
14	K	14/0	X	Egzama	X	Spastik Parapleji Hereditör Sensori Otonomik Nöropati	Kırmızı Boyun (1)	–	Kaşıntı/ <i>Flushing</i> Kızarıklık	X
15	E	13/4	X	X	X	X	Kırmızı Boyun(80)	Sistemik KS	Maküler Döküntü	X
16	E	11/9	X	X	X	X	Kırmızı Boyun (1)	–		X
17	E	5/6	X	X	X	Embriyonel Rabdomyosarkom	Kırmızı Boyun (4)	Antihistamin	Maküler Döküntü Flushing/Ürtiker	X
18	E	8	Astım	X	X	X	Kırmızı Boyun (1)	–	Maküler Döküntü	X
19	K	0/11	X	X	X	Var	Kırmızı Boyun (1)	Antihistamin	Maküler Döküntü Anjiyoödem	X
20	K	14/7	X	X	X	Var	Kırmızı Boyun (1)	–	Maküler Döküntü	X
21	E	8 /4	X	X	X	X	Kırmızı Boyun	Antihistamin	Kızarıklık	X
22	E	6/4	X	X	X	Kistik Fibrozis	Kırmızı Boyun (5)	–	Maküler Döküntü Anjiyoödem	X
23	E	3/8	Astım	X	X	X	Kırmızı Boyun (12)	Antihistamin	Kaşıntı/Ürtiker	X
24	E	9/8	X	X	X	Gorham Sendromu	Kırmızı Boyun (4)	–	Maküler Döküntü	X
25	K	15/4	X	X	X	Var	Kırmızı Boyun (80)	Sistemik KS	Maküler Döküntü	X
26	K	3/9	X	X	X	X	Kırmızı Boyun	–		X
27	K	13/10	X	X	X	Serebral Palsi	Kırmızı Boyun (30)	Antihistamin		X
28	K	3/10	X	X	X	X	Kırmızı Boyun	–		X
29	E	6/4	Astım	X	X	Var	Kırmızı Boyun	–	Anjiyoödem / Kızarıklık Maküler D.	SoperOX (Döküntü)
30	E	3/9	X	X	X	Nöroblastom	Kırmızı Boyun	–		X
31	E	16/4	X	X	X	Var	Kırmızı Boyun (4)	Antihistamin	Ürtiker	X

Tablo 4.1. (devam) Hastaların cinsiyet ve yaş bilgileri, klinik bulguları ve aile öyküleri

Hasta Numarası	Cinsiyet	Yaş/Ay	Atopik Hastalık Hikayesi	Ailede Atopik Hastalık	Ailede İlaç Alerjisi	Eşlik Eden Kronik Hastalık	Vanko Rex. (doz)	Tedavi	Bulgular	Diğer İlaç Alerjisi
32	E	9/6	X	X	X	X	Kırmızı Boyun (8)	–	Maküler Döküntü Makülopapüler Döküntü	X
33	E	6/3	X	X	X	Sjögren Sendromu	Kırmızı Boyun (4)	–	Maküler Döküntü	Anti-Tbc İlaçlar
34	K	1/3	X	X	Var	Protein Kaybettiren Enteropati	Kırmızı Boyun (16)	Antihistamin Sistemik KS	<i>Flushing</i>	X
35	E	13/8	X	X	X	İleus	Kırmızı Boyun (1)	Antihistamin	Maküler Döküntü/ <i>Flushing</i>	X
36	E	0/11	Astım	X	Var	Tekrarlayan Akciğer Enfeksiyonu/Mikrosefali	Kırmızı Boyun	–	Maküler Döküntü/ <i>Flushing</i>	X
37	K	12/4	X	Var	X	X	Kırmızı Boyun (2)	Antihistamin	Ürtiker	X
38	K	16/7	X	X	X	X	Kırmızı Boyun (20)	Antihistamin	Kızarıklık	X

Tez kapsamında değerlendirilen 22 kontrol numunesinin 11'i kız ve 11'i erkek hastalardan oluşmaktadır. Hastalar değerlendirilirken gerekli laboratuvar parametreleri, klinik öykü ve bulguları ayrıntılı şekilde kaydedilmiştir.

Yaş ortalamasının 6 yaş 7 ay olduğu grupta, vankomisine veya diğer ilaçlara karşı hiçbir reaksiyon gözlemlenmemiştir. Vankomisin alan kontrol grubunun ailelerinin hastalık geçmişleri incelendiğinde, hasta grubunun aksine hiçbirinin ailesinde, kronik hastalık ve alerji öyküsü yoktur. Vankomisine reaksiyon göstermeyen grupta bulunan bazı kontrollerde kronik hastalıklar mevcuttur. Bu bilgiler Tablo 4.2'de her bir hastaya özel olarak sunulmuştur.

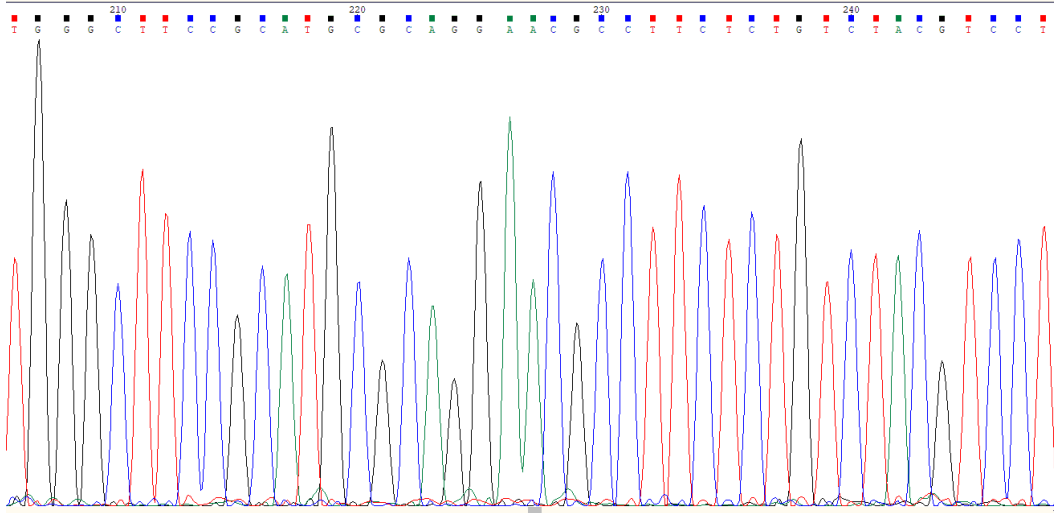
Tablo 4.2. Kontrol grubu cinsiyet ve yaş bilgileri, klinik bulguları ve aile öyküleri

Kontrol Numarası	Cinsiyet	Yaş/Ay	Atopik Hastalık Hikayesi	Ailede Atopik Hastalık	Ailede İlaç Alerjisi	Eşlik Eden Kronik Hastalık	Vanko Rex. (doz)	Tedavi	Bulgular	Diğer İlaç Alerjisi
1	K	0/2	X	X	X	Sol Gözde Retinablastom	X	X	X	X
2	E	11/2	X	X	X	X	X	X	X	X
3	E	1/6	X	X	X	Kalp Yetmezliği/ Dilate KMP	X	X	X	X
4	K	1/3	X	X	X	VSD/ASD/SVO atağı öyküsü	X	X	X	X
5	E	15/1	X	X	X	Hermansky-Pudlak	X	X	X	X
6	K	0/4	X	X	X	PrematüreJejunal/ Jejunal Atrezi (opere)	X	X	X	X
7	E	1/1	X	X	X	Var	X	X	X	X
8	E	2/4	X	X	X	NBAS eksikliğine bağlı KC yetmezliği yetmezliği Ensefalit evre 3	X	X	X	X
9	K	10/5	X	X	X	Var	X	X	X	X
10	E	15/3	X	X	X	Ewing Sarkonu	X	X	X	X
11	K	7/2	X	X	X	Kistik Fibrozis	X	X	X	X
12	E	14/4	X	X	X	Orbitomi sonrası PEComa	X	X	X	X
13	E	8/3	X	X	X	Epilepsi/Hidrocefali Metilmalomik Asidemi	X	X	X	X
14	K	9/0	X	X	X	Ritim Bozukluğu öyküsü/ ablasyon öyküsü	X	X	X	X
15	K	2/4	X	X	X	AESD	X	X	X	X
16	E	0/4	X	X	X	X	X	X	X	X
17	K	4/5	X	X	X	Glukokortikoid ilişkili adrenal yetmezlik	X	X	X	X
18	E	17/5	X	X	X	X	X	X	X	X
19	K	6/1	X	X	X	Kistik Fibrozis	X	X	X	X
20	K	10/5	X	X	X	Desmoplastik küçük hücreli tümör	X	X	X	X
21	E	0/4	X	X	X	X	X	X	X	X
22	K	8/3	X	X	X	Cerebral Palsi, Hidrocefali, Prematüre REninopatis	X	X	X	X

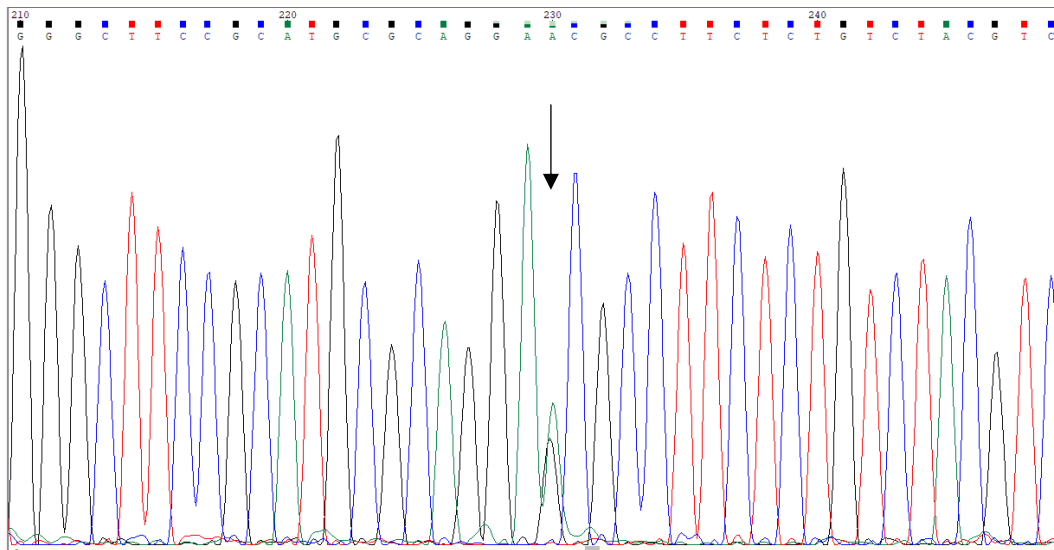
Tez çalışmasında, vankomisin kullanımı sonucu kırmızı boyun sendromu görülen hastalarda, genetik yatkınlık faktörlerinin rolünü değerlendirmek amaçlanmıştır ve vankomisine bağlı kırmızı boyun sendromunda rol oynayan proteinleri kodlayan gendeki, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) incelenmiştir. 38 hasta ve 22 kontrol grubunun incelendiği çalışmada, etik kuralları gereği hastalar rakamlar ile ifade edilmiştir. Buna göre, 3, 4, 5, 11, 12, 34, 37, 38 numaralı hastalarda tek nükleotid polimorfizmi rs10833049 görülmüş iken 8, 13 ve 18 numaralı hastada hem rs10833049 hem de rs11024969 polimorfizmleri birlikte görülmüştür. rs10833049'da meydana gelen polimorfizm 34 numaralı hasta hariç tüm hastalarda heterozigottur. rs11024969'da meydana gelen polimorfizm tüm hastalarda heterozigottur. Bu bilgiler Tablo 4.3'de her bir hastaya özel olarak sunulmuştur. Kontrol grubunda ise herhangi bir polimorfizme rastlanmamıştır. Ayrıca bazı hastalar için sekans sonuçları Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Hasta bazında tek nükleotid polimorfizimleri

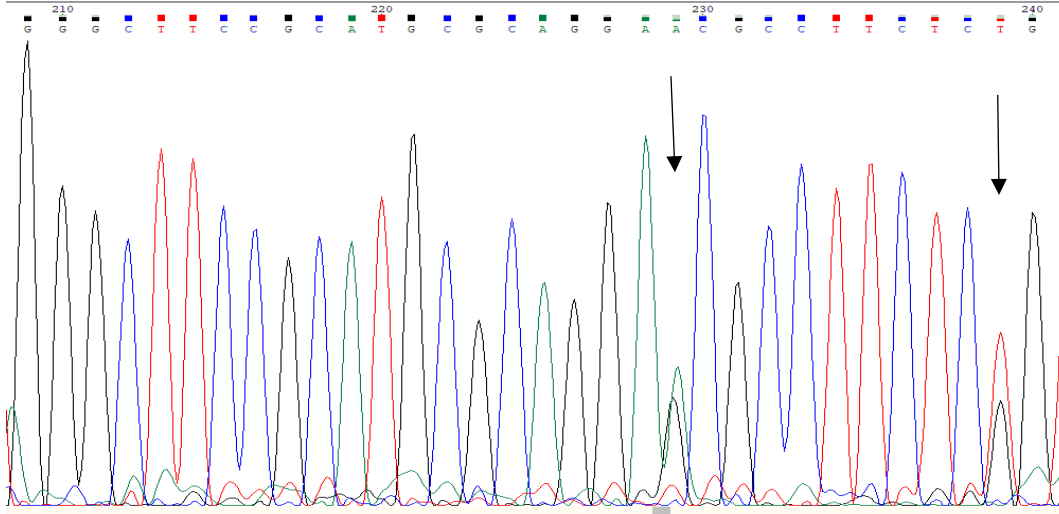
Hasta Numarası	Varyant ID	Mutasyon	Nükleotid Varyasyonu	Amino asit Değişikliği	MRGPRX2 Domain	Hasta Numarası	Varyant ID	Mutasyon	Nükleotid Varyasyonu	Amino asit Değişikliği	MRGPRX2 Domain
1	X	X	X	X	X	20	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	21	X	X	X	X	X
3	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1	22	X	X	X	X	X
4	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1	23	X	X	X	X	X
5	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1	24	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	25	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	26	X	X	X	X	X
8	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1	27	X	X	X	X	X
	rs11024969	Eş anlamlı variant	T>G heterozigot	Ser65Ser							
9	X	X	X	X	X	28	X	X	X	X	X
10	X	X	X	X	X	29	X	X	X	X	X
11	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1	30	X	X	X	X	X
12	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1	31	X	X	X	X	X
13	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1	32	X	X	X	X	X
	rs11024969	Eş anlamlı variant	T>G heterozigot	Ser65Ser							
14	X	X	X	X	X	33	X	X	X	X	X
15	X	X	X	X	X	34	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G homozigot	Asn62Ser	CPD1
16	X	X	X	X	X	35	X	X	X	X	X
17	X	X	X	X	X	36	X	X	X	X	X
18	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1	37	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1
	rs11024969	Eş anlamlı variant	T>G heterozigot	Ser65Ser							
19	X	X	X	X	X	38	rs10833049	Yanlış anlamlı variant	A>G heterozigot	Asn62Ser	CPD1



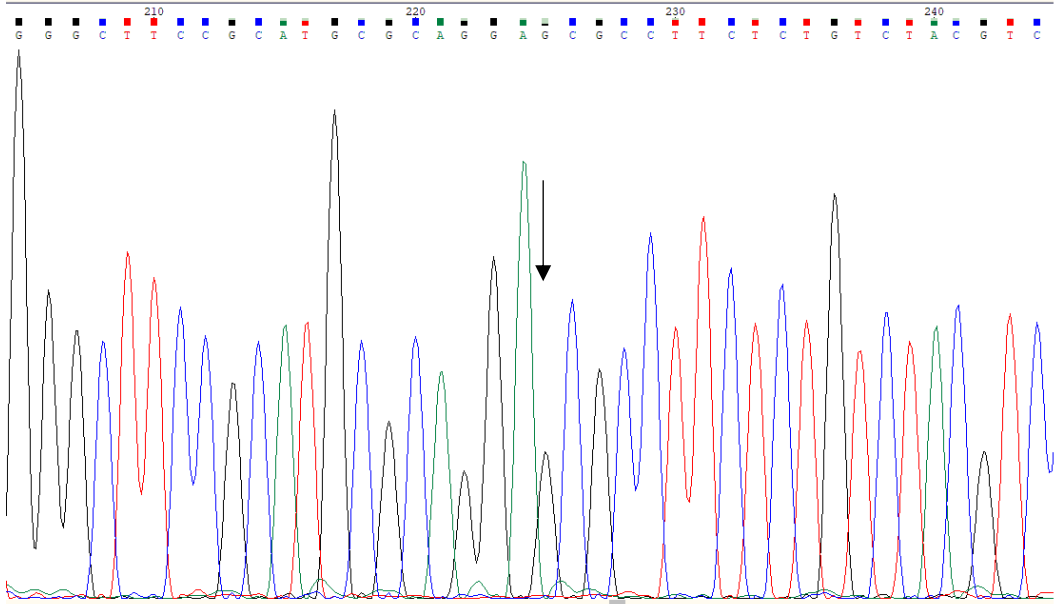
Şekil 4.1. MRGPRX2 geni üzerinde herhangi bir polimorfizme rastlanmayan bölge



Şekil 4.2. MRGPRX2 geni üzerinde Asn62Ser (A → G değişimi) polimorfizmine rastlanan bölge (heterozigot)



Şekil 4.3. MRGPRX2 geni üzerinde hem Asn62Ser (A → G değişimi) hem de Ser65Ser (T → G değişimi) polimorfizmine rastlanan bölge (heterozigot)



Şekil 4.4. MRGPRX2 geni üzerinde Asn62Ser (A → G değişimi, homozigot) polimorfizmine rastlanan bölge

5. TARTIŞMA

Mas ile ilişkili G-proteine bağı reseptör elemanı X2'nin keşfi, ilaca özgü ilaç duyarlılığı reaksiyonlarını anlama konusunda yeni fırsatlar sunmuştur. Bununla birlikte, birçok cevapsız soru halen bulunmaktadır. Literatür taramaları kırmızı boyun sendromu yaşayan hastaların mas ile ilişkili G- proteinine bağı reseptör elemanı X2'yi kodlayan gen bölgesinde ülkemizde ve dünyada SNP çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışma bizim Türk popülasyonundaki sıklığı anlamamıza yardımcı olacaktır. Spesifik IgE ve MRGPRX2 aracılı ilaç duyarlılığı reaksiyonları klinik benzerlikler gösterse de, bu iki tür reaksiyonun doğru bir şekilde ayırt edilmesinin gelecekteki tedavi yöntemleri açısından önemli olabileceği düşünülmektedir (76).

Mas ile ilişkili G-proteine bağı reseptör elemanı X2 aracılı reaksiyonların sağlığını için sorumlu ilacın daha düşük bir hızda veya dozda yeniden uygulanması gibi bir yaklaşım düşünülebilir. Ayrıca, bu reaksiyonların değerlendirilmesi, çapraz reaktiviteyi de içerecek şekilde gerçekleştirilmelidir. sIgE aracılı reaksiyonlar için araştırmalar, yapısal homologlara odaklanırken, MRGPRX2 aracılı reaksiyonlar için odak noktası G proteinleri üzerinde etki gösterebilen ve doğrudan veya dolaylı olarak hücre sel sinyal iletimini modüle edebilen moleküllere yönelmek olabilir (76).

Ani tip ilaç reaksiyonları, genellikle mast hücrelerinin degranülasyonunu içerir ve bu durum, serum triptaz seviyelerinin yükselmesine neden olur. Bazı ilaçlar, spesifik IgE aracılı olarak mast hücrelerini aktive edebilir. Ancak mast hücre degranülasyonu, FcεR1/IgE çapraz bağlanması olmaksızın da meydana gelebilir. MRGPRX2, deri mast hücrelerinde yoğun olarak ifade edilir ve aktive edilmesi IgE'den bağımsız bir degranülasyona yol açar. MRGPRX2, P maddesi, majör bazik protein ve eozinofil peroksidaz gibi çeşitli endojen ligandlara bağlanır. Bir grup katyonik peptidergik ilaç, MRGPRX2 aracılığıyla mast hücre degranülasyonuna neden olabilir ve enjeksiyon bölgesi reaksiyonları ile ilişkilendirilir. Ayrıca, MRGPRX2'nin ilaç duyarlılığındaki rolü, *knockdown* modelleri, inhibitörler ve siRNA sessizleştirme deneyleriyle kanıtlanmıştır (77).

Mas ile ilişkili G-proteine bağılı reseptör elemanı X2 aracılı ilaç reaksiyonlarına yatkınlığı artırabilecek faktörler mevcuttur ve bu faktörler arasında eşlik eden hastalıklar da yer almaktadır. Kronik ürtiker ve prurigo (kaşıntılı cilt lezyonları) hastalarında, MRGPRX2 pozitif hücre sayıları ve/veya ifade yoğunluğu, kontrol grubuna kıyasla artmıştır (80). Bizim çalışmamızda, hasta grubunun eşlik eden atopik hastalıkları incelendiğinde bu hastalıklar arasında, astım, alerjik rinit ve besin alerjisine rastlanmıştır. Ayrıca bazı hastaların ailelerinde, egzama, astım, lateks alerjisi ve alerjik rinit varlığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda ise, herhangi bir atopik hastalık bildirilmemiştir (78).

Yayınlanan yeni bir çalışmada alerjik astım ve MRGPRX2 arasındaki ilişki incelenmiş olup alerjik astımı olan hastaların %11.4'ünün akciğer mast hücrelerinde pozitif MRGPRX2 boyanmasının görüldüğü ifade edilmiştir. Ancak daha önce yapılan çalışmalar, insan akciğer mast hücrelerinin MRGPRX2'yi ifade etmediği yönündedir. Son zamanlardaki bulgular, astım hastalarında düşük düzeyde MRGPRX2 ifadesine sahip akciğer mast hücreleri ve MRGPRX2 pozitif akciğer mast hücrelerinin sayısının ve ifade düzeyinin artmış olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hemokinin-1 (HK-1) adlı nöropeptidin, MRGPRX2'yi endojen olarak ifade eden LAD2 insan mast hücre hattında degranülasyonu indüklediği gösterilmiştir. HK-1, aynı zamanda NK-1R'nin bir agonisti ve P maddesi ile aynı aileye aittir. Astımda bronkokonstriksiyonla ilişkilendirilmiş ve alerjik astımın, alerjenin mast hücre/FcεR1 aktivasyonuna adjuvan etkisi olduğu düşünülmüştür. Bu bulgular, akciğer mast hücrelerini NK-1R aracılığıyla aktive eden nöropeptid P maddesine ek olarak, kronik hava yolu iltihabı durumunda astımda, HK-1 adlı nöropeptidin insan mast hücrelerini NK-1R yerine MRGPRX2 aracılığıyla aktive etmesinin olası olduğunu düşündürmektedir (78). Çalışmamızda 38 hastanın 8'inde (%21) astım bulunmaktaydı, bu hastalarda eşlik eden atopik dermatit veya kronik ürtiker bulunmamaktaydı.

Bir diğer çalışma, Hemokin-1'in (HK-1) insan bronş hücreleri ve makrofajlar tarafından üretildiğini ve bronşların kasılmasına yol açtığını göstermektedir. Aynı

zamanda, fare mast hücreleri tarafından da üretildiği ve farelerde kronik alerjik hava yolu inflamasyonuna, nörokinin reseptörü-1 (NK-1R) aracılığıyla katkı sağladığı bulunmuştur. Çalışmada, astım nedeniyle hayatını kaybeden bireylerin akciğerleri ile diğer nedenlerle ölen bireylerin akciğerleri karşılaştırıldığında, astım vakalarında mast hücre sayısının daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Ayrıca, Mas ile ilişkili G proteinine bağlı reseptör X2 (MRGPRX2) adlı yeni bir G proteinine bağlı reseptörün, özellikle insan mast hücreleri üzerinde ifade edildiği belirtilmiştir. Astım olmayan akciğerlerde MRGPRX2 düzeyinin düşük olduğu ancak astım vakalarında ise bu reseptörün ifadesinin belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir. HK-1'in, insan mast hücre hattı (LAD2) ve MRGPRX2 ifadesine sahip RBL-2H3 hücrelerinde degranülasyona neden olduğu belirtilmiştir. Bu degranülasyon tepkisi, NK-1R antagonistine karşı direnç göstermektedir. Bununla birlikte, LAD2 hücrelerinde MRGPRX2 ifadesinin baskılanması, HK-1'e bağlı degranülasyon üzerinde önemli bir engel oluşturmaktadır.

Bu bulgular, farelerdeki mast hücrelerinde HK-1'in astım gelişimine NK-1R aracılığıyla katkı sağladığını, insan bronşiyal kasılmada ise HK-1'in akciğer mast hücrelerinde MRGPRX2'nin aktivasyonunu yansıttığını düşündürmektedir. Bu nedenle, özel MRGPRX2 antagonistlerinin geliştirilmesinin, astımın tedavisinde yeni bir hedef olarak kullanılabilmesi önerilmektedir (79).

Foer ve arkadaşlarının kinolonlar, morfin, nöromusküler blokan ajanlar, vankomisin ve löprolide karşı MRGPRX2 aracılı ilaç reaksiyonlarında risk faktörlerini değerlendirdiği çalışmasında astım varlığı, MRGPRX2'e bağlı ani tip reaksiyon riskini [OR 1.81, %95 GA (1.68-1.94)] artırdığını göstermiştir. İlaçlar tek tek incelendiğinde, hastada bir atopik hastalık bulunması vankomisine bağlı MRGPRX2 ilişkili ilaç reaksiyon riskini önemli ölçüde [OR 2.75, %95 GA (2.27-3.32)] artırdığı da rapor edilmiştir. Alerjik hastalığı olan kişilerde, olmayan kişilere göre MRGPRX2 ilişkili istenmeyen ilaç reaksiyonları %21 daha fazla gözlenmiştir (80).

Bizim yaptığımız çalışmada ise, vankomisin kullanımı sonucu kırmızı boyun sendromu ile başvuran 38 hastanın 8'inde (%21) astım bulunmaktadır ve bu 8 hastanın da 3'ünde (%37,5) Asn62Ser polimorfizmi gözlenmiştir. Astım hastalarının akciğerlerinde MRGPRX2 reseptörleri daha fazla eksprese olmakla birlikte deri veya başka organlardaki ekspresyon ile ilgili veri literatürde bulunamamıştır. Bu durumu açıklayacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Özellikle astım hastalarında vankomisin tedavisi sırasında kırmızı boyun sendromu riskinin sağlıklılara göre daha fazla olduğu akılda tutulmalı ve gerekli önlemler alınmalıdır (80).

Robas ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı bir çalışmada, G-protein bağlı reseptörlerin (GPCR'ler) en büyük ve en çeşitli transmembran protein ailesi olduğu belirtilmiş ve bu reseptörlerin, biyogenik aminler, peptitler, biyoaktif lipitler, hormonlar ve ışık gibi çeşitli uyarılara yanıt verdiğinden bahsedilmiştir. Bu reseptörlere agonistlerin bağlanması, G-proteinleri aracılığıyla hücre içi sinyalleşme olaylarını adenilat siklazın modülasyonu veya Ca^{++} mobilizasyonu gibi, aktive eder. İnsan genom dizileme projesinin tamamlanması ile ligandı ve işlevi bilinmeyen 140 "orphan" GPCR tespit edilmiştir. Robas ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, potansiyel terapötik öneme sahip olan bu "orphan" reseptörleri önceliklendirmek için biyoinformatik ve doku dağılım analizleri kullanılmış ve ardından "ters farmakoloji" yaklaşımıyla uygun ve yedek ligandlar tespit edilmiştir. Bu çalışma, "orphan" reseptörlerden MRGX2'nin, insanlarda 5, farelerde 31 ve sıçanlarda 2 kodlama dizisi ile ilişkili olan Mas1 onkogeninin bir üyesi olduğunu belirtmektedir. Bu genler grubu, Mrg (Mas ile ilişkili genler) veya SNSR (duyu siniri özgül G-protein bağlı reseptörler) olarak adlandırılmıştır. Doku dağılım çalışmaları, bu reseptörlerin özellikle dorsal kök ganglionunun küçük duyu sinirlerinde ifade edildiğini göstermektedir, bu da ağrı algısında rol oynayabileceklerini düşündürmektedir (81).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), genetik çeşitlilik içinde en yaygın olan tiplerden biridir. Yanlış anlamlı SNP'lerin, proteinlerin yapısı, etkileşimleri ve

özellikleri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. SNP'ler, MRGPRX2 varyantları ile ilişkilendirilebilir ve bu varyantlar, MRGPRX2'nin yapısını değiştirerek bireyleri hiperaktivasyona yatkın hale getirebilir (68, 69). Yang ve arkadaşları, MRGPRX2 proteininde Asn16His, Asn62Ser ve Phe78Leu şeklinde üç belirli amino asit değişimini tespit etmişlerdir (70).

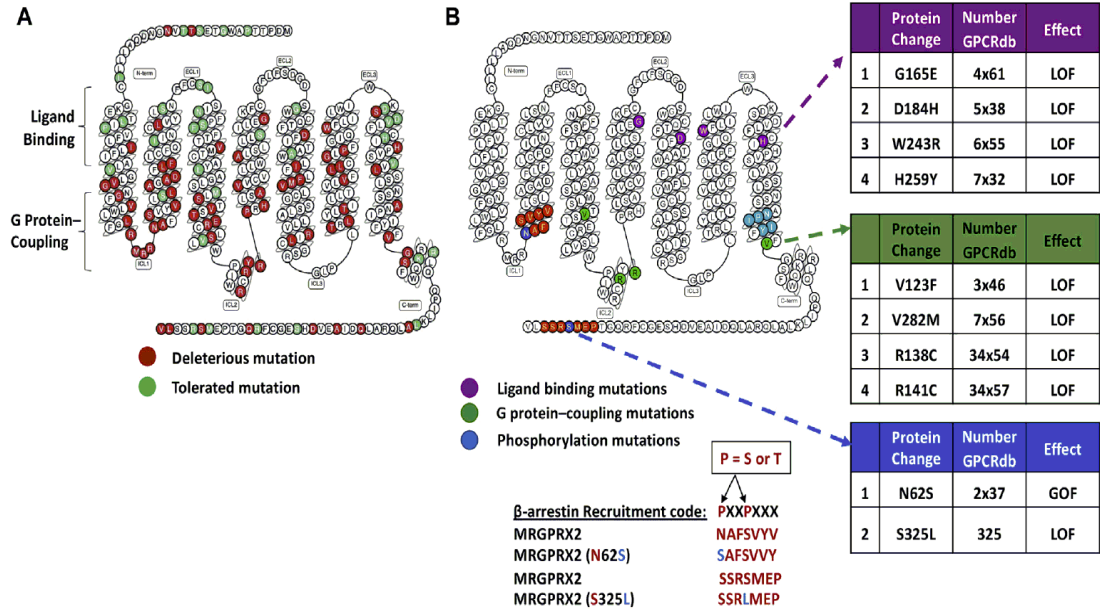
Bizim çalışmalarımızda, insan MRGPRX2 lokusu kodlama bölgelerinde iki SNP tespit edilmiştir. Bunlardan biri 0,3185 değerinin ise 0,11 minör alel sıklığına (MAF) sahiptir ve sırasıyla asparajinden serine (Asn62Ser) ve serinden serine (Ser65Ser) amino asit değişimine yol açar. Asn62Ser, MRGPRX2'nin sitoplazmik bölge 1'i (CPD1) etkiler. Diğer SNP'ler nadir veya çok nadirdir (MAF< 0.01) (62).

Bizim çalışmamızda ise, asparajin amino asidinin serin amino asidi ile yer değiştirdiği rs10833049 numaralı SNP için AA, AG ve GG genotip sayıları ile alel frekansları, kırmızı boyun sendromu tanısı konulan hastalar için değerlendirilmiş olup aynı prosedür kontrol grubu için de uygulanmıştır. A aleli için alel frekansı 0,843 G aleli için alel frekansı ise 0,157 olarak hesaplanmıştır. Karşılaştırma sonucunda, rs10833049 polimorfizminin dağılımı Hardy- Weinberg dengesi açısından değerlendirildiğinde, popülasyonda genotip frekansları dağılımının dengede olduğu ($P>0.05$) gözlenmiştir. Serin amino asidinin yine serin amino asidi ile yer değiştirdiği rs11024969 numaralı SNP için de, TT, TG ve GG genotip sayıları ile alel frekansı değerlendirildiğinde T aleli frekansı,0,96 ve G aleli frekansı ise 0,04 olarak hesaplanmıştır ve rs11024969 polimorfizminin dağılımı Hardy- Weinberg dengesi açısından değerlendirildiğinde ise popülasyonda genotip frekansları dağılımının dengede olduğu ($P>0.05$) gözlenmiştir.

Çalışmada minör alel frekansı düşük olan diğer varyantların görülmemesi sebebi, çalışmaya katılan hasta sayısı ile bağlantılı olabilir. Asparajin (N) amino asidinin serin (S) amino asidi ile değiştiği bölge (rs10833049), yanlış anlamalı bir varyanttır ve potansiyel hastalık ilişkisini tahmin etmek zordur. Bir amino asit değişimi, bir gen ürününün biyolojik işlevini birçok farklı şekilde etkileyebilir. Örneğin, bu değişim, proteinin kritik bölgelerini bozarak katalitik kalıntıları veya

ligand bağlanma bölgelerini etkileyebilir ve böylece proteinin işlevini değiştirebilir. Ayrıca, yanlış anlamlı varyantlar protein ürününün yapısını, katlanmasını veya stabilitesini değiştirerek, proteinin işlevini engelleyebilir veya değiştirebilir. Ancak, her amino asit değişimi protein fonksiyonunu her zaman etkilemez. Bu nedenle, yanlış anlamlı varyasyonların etkilerinin tahmin edilmesi zordur. Bu tür değişimlerin potansiyel etkilerini doğru bir şekilde değerlendirilmesi için deneysel çalışmalar ve hesaplama yöntemleri kullanılabilir (82). Serin (S) amino asidinin tekrar Serin (S) ile değiştiği bölge (rs11024969) ise, bir eş anlamlı varyanttır. Eş anlamlı varyantların transkripsiyonu, hücrelerdeki gen ifadesinin düzenlenme sürecini (splicing), ko-translasyonel katlanmayı, mRNA stabilitesini ve işlevsel olarak önemli diğer birçok değişikliği etkileyebilir. Ayrıca, eş anlamlı varyantlar, protein kodlama bölgelerindeki transkripsiyon ve splicing düzenleyici faktörleri etkileyerek gen ekspresyonunu da düzenleyebilir (83).

Roy ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, GPCR'lerdeki yanlış anlamlı SNP'lerin, GPCR'lerin yapısını etkileyebileceği ve bu etkinin reseptörlerin ifadesi ve işlevsel özelliklerinde farklılıklara yol açabileceği konusunda bahsetmişlerdir. MRGPRX2'deki GPCR veritabanı analizi, 107 yanlış anlamlı SNP'nin varlığını ortaya çıkarmış ve bunların 72'sinin potansiyel olarak zararlı olabileceği öngörülmüştür (Şekil 5.1). Yayımlanan makalede, kendi çalışmamızda gözlemlediğimiz, asparajinin serin amino asidi ile değiştiği bölgedeki SNP'yi (rs10833049) zararlı olabilecek bölgeler arasında listelemişlerdir (84).



Şekil 5.1. MRGPRX2'deki SNP'ler (84).

A) MRGPRX2'nin ikincil yapısının Yılan Diyagramı, her bir dairede amino asitler tek harfli kodla temsil edilmiştir. Kırmızı dolgulu arka plan, MRGPRX2'de zararlı ve yeşil dolgulu arka plan tolere edilebilen SNP'leri belirtir. B) Ligand bağlanma bölgesinde olan SNP'ler (mor), G protein-bağlama bölgesi (yeşil) ve β-arrestin bağlanma bölgesinde (mavi) olan SNP'ler gösterilmiştir. MRGPRX2'deki β-arrestin bağlanması için korunmuş dizi içinde tanımlanan mutasyonlar da gösterilmiştir.

Chen ve ekibinin 2021 yılında gerçekleştirdiği çalışma, insan ülseratif kolit hastalığında mast hücre aktivasyonu ve MRGPRX2 mekanizmalarını ayrıntılı bir şekilde araştırmayı hedeflemiştir. Elde edilen sonuçlar, inflamasyonlu ülseratif kolit hastalarında mast hücrelerinin spesifik mediatörler ve ADM (adrenomedullin, MRGPRX2 agonisti olan PAMP-12'nin proteolitik öncüsü) ifadesinin, inflamasyon olmayan bölgelere kıyasla anlamlı bir şekilde yükseldiğini göstermiştir. Ayrıca, MRGPRX2 uyarımının, inflamasyonlu ülseratif kolitte karboksipeptidaz salınımına neden olduğu keşfedilerek bu mekanizmanın önemi vurgulanmıştır. Bu çalışmada, proteinin yapısını değiştiren tüm GPCR alelleri arasında, asparajinin serin ile değiştiği (rs10833049) varyantın, MRGPRX2 varyantının ülseratif kolit ile bağlantılı varyantlar arasından en güçlüsü olduğu belirlenmiştir. Biyoinformatik analizler, bu varyantın

β-arrestin rekrütmanını değiştirdiğini ortaya koymuştur. Yapılan deneylerle, serin alelinin MRGPRX2 agonistleri ile β-arrestin rekrütmanını artırdığı, IP-1'i azalttığı ve fosfoERK'yi artırdığı doğrulanmıştır.

Yine aynı çalışmada, MRGPRX2'deki Asn62Ser'de serin alelinin ülseratif kolite karşı koruma sağladığından ve G α s sinyalini azalttığından da bahsedilmiştir.

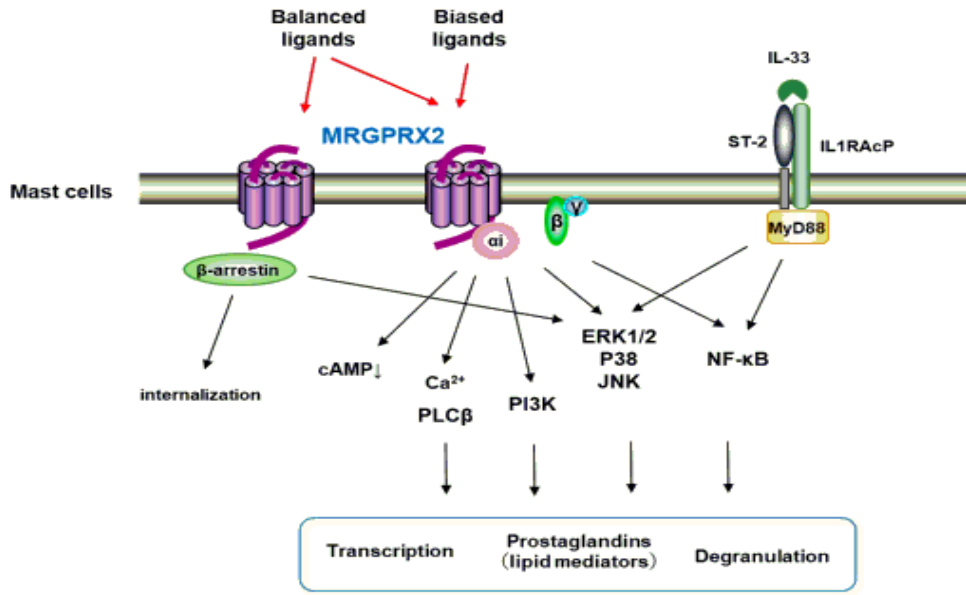
Bu sonuçlar, hastalığın patofizyolojisinde MRGPRX2'nin önemli bir rol oynadığını ve genetik varyantların hastalık riski ve tedaviye yanıt üzerinde etkili olabileceğini düşündürmüştür (85).

Jean ve ekibinin gerçekleştirdiği bir çalışmada G protein bağımlı reseptörler, sinyal aktivasyonu veya inaktivasyonları nedeniyle neredeyse tüm fizyolojik yolları etkileyen öncelikli terapötik hedefler olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca β -arrestinlerin, çeşitli GPCR sinyal iletim modüllerinin merkezinde yer aldığı ve genellikle aktive edilen reseptör kompleksine bir dizi proteinin bağlanarak destek sağlayan geniş bir yelpazede etkili olduğu belirtilmiştir. Aktive edilen GPCR'lar ile etkileşime girdiğinde, β -arrestin moleküllerinin farklı aktive konformasyonları benimseyebileceği ortaya konmuştur. Bu β -arrestin konformasyonları, reseptör kuyruğunun GRK'lar tarafından işaretlenmesi veya bir agonist tarafından indüklenen β -arrestinlerin posttranslasyonel modifikasyonlar gibi faktörler tarafından belirlendiğini düşünmüşlerdir.

Çalışmada ayrıca iki tür agonistten bahsedilmektedir: *balanced* agonistler ve *biased* agonistler. *Balanced* agonistler, hem G proteinine bağlı sinyal hem de β -arrestin'e dayalı sinyal verilmesini sağlar. Bu iki tür sinyal farklı etkililik ve hızlarla gerçekleşebilir. *Biased* agonistler ise, reseptörleri etkin duruma getirir, ancak ilginç bir şekilde ya G proteinleri ya da β -arrestinler üzerinden sinyal göndermelerine izin verir. Bu da belirli sinyal yollarını güçlendirirken diğerlerini zayıflatabilir. Yani, *biased* agonistler reseptörü sinyal iletiminde tercihli bir yol seçmeye zorlar.

Bu çalışmanın sonuçları, GPCR sinyallemesinin karmaşıklığını ve β -arrestinlerin işlevselliğindeki önemli rolü vurgulamaktadır. Ayrıca, *biased* agonizmin potansiyelini tam anlamıyla değerlendirebilmek için hücre özgül sinyal iletim ağlarını haritalamanın ve *biased* sinyalleme düzenleyen moleküler mekanizmaları daha ayrıntılı olarak anlamının kritik olduğunu göstermektedir (86).

Başka bir çalışmada ise, G protein bağımlı reseptörlerin, hücrel tepkilere yol açan ana terapötik hedefler olduğundan ve bu tepkilerin genellikle, β -arrestinler ve *downstream*'e neden olan sinyaller aracılığıyla gerçekleştiğinden bahsetmiştir. Özellikle, β -arrestinler GPCR'ların aktive olduğu bölge olan ekstraselüler döngüler ve transmembran bölgeler arasında oluşan hidrofobik ceplere etki ettiğinden ve bu sayede GPCR'ların hücrel yanıtlarını yönlendirdiğinden bahsedilmiştir. GPCR'ların hücrel yanıtları G proteinleri, β -arrestinleri ve diğer sinyal etkileyicilerini içeren karmaşık bir ağ aracılığıyla gerçekleşir. Bu çalışmada özellikle MRGPRX2'nin sinyal mekanizmaları incelenmiş, bu reseptörün uyarılmasının çeşitli sinyal yollarını harekete geçirdiği ve mast hücrelerin sitokin üretimini etkilediği ortaya konulmuştur (Şekil 5.2) (31).



Şekil 5.2. MRGPRX2 aktivasyon sonrası sinyal yolunun şeması (31).

MRGPRX2 ligandları G_i proteinini aktivasyonunu tetikler, bu da cAMP seviyesinin düşmesine, Ca⁺⁺ mobilizasyonuna ve aynı zamanda MAPK'ların, PI3K'nın ve NF- κ B yolunun etkinleşmesine yol açar. Bu da degranülasyonu, transkripsiyon indüksiyonunu ve prostaglandin üretimini başlatır. *Balanced* MRGPRX2 ligandları yalnızca G_i proteinini aktivasyonunu değil aynı zamanda β -arrestin rekrütasyonunu da içerir, bu da içselleştirmeyi tetikler. Ancak *biased* MRGPRX2 ligandları β -arrestin rekrütasyonu sağlayamaz. Ayrıca, IL-33, MAPK'ları ve NF- κ B'yi etkinleştirerek MRGPRX2 sinyallemesini artırır (34).

Psödoalerjik reaksiyonlar; peptidik ilaçlar, nöromusküler blokaj ajanları, fluorokinolonlar, vankomisin ve radyografik kontrast ajanlar gibi ilaçların mast hücrelerini aktivasyonunun sonucu olarak ortaya çıkar. MRGPRX2 reseptörüne bağlanan agonistlerin tipi (*balanced* veya *biased*) polimorfizme bağlı olarak yolağı etkileyebilir. Örneğin *biased* ligandlardan olan kontrast maddeye bağlı psödoalerjilerde polimorfizm varlığı, riski arttırmamıştır. Ancak vankomisinin nasıl bir ligand olduğuna dair bilgi literatürde bulunmamaktadır. MRGPRX2'de böyle bir mutasyona sahip olmak kontrast maddeler için riski arttırmayabilir ancak vankomisine bağlı psödoalerji riskini arttırabilir.

Alkanfari ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, rat bazofilik lösemi hücre hattı olan RBL-2H3 hücrelerinde aşırı ifade edilen MRGPRX2'nin birkaç yanlış anlamalı varyantını test etmişlerdir ve bu varyantlardan herhangi birinin normalden farklı bir fonksiyon sergileyip sergilemediğini incelemişlerdir. Araştırma sonuçları, G165E, D184H, W243R ve H259Y gibi dört farklı MRGPRX2 varyantının, MRGPRX2'nin doğal ligandlarından olan P maddesi, hemokin-1, β -defensin-3 ve ikatibant gibi maddelere karşı RBL-2H3 hücre degranülasyonunu bozduğunu göstermiştir (71).

Başka bir çalışmada ise, V123F, R138C, R141C ve V282M gibi dört MRGPRX2 varyantının reseptörde fonksiyon kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Bu varyantlar, RBL-2H3 hücrelerinde P maddesine yanıt olarak kalsiyum mobilizasyonunu ve degranülasyonu bozmaktadır. Bu sonuçlar, bu yanlış anlamalı mutasyonları taşıyan bireyleri MRGPRX2 aracılığında oluşan psödoalerjiden ve kronik inflamatuvar hastalıklardan koruyabileceği düşündürmektedir. Ayrıca, araştırmacılar, S325L ve L329Q gibi iki MRGPRX2 varyantını da tanımlanmıştır, bu varyantlar P maddesi uyarısına karşı mast hücrelerinde normalden daha güçlü bir MRGPRX2 aktivasyonuna yol açtığını görmüşlerdir. (85). Bu çalışma, MRGPRX2'deki yanlış anlamalı mutasyonların, mast hücrelerinin tepkisini değiştirerek psödoalerji ve kronik inflamatuvar hastalıklara olan yatkınlığı etkileyebileceğini göstermektedir (45).

Sonuç olarak, MRGPRX2 genindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), genetik çeşitlilik içinde yaygın olan varyantlardan biridir ve protein yapısı ve işlevi

üzerinde etkili olabilir. Ayrıca, MRGPRX2'nin bazı yanlış anlamalı varyantları, özellikle Asn62Ser varyantı, hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabilir ve MRGPRX2'nin hiperaktivasyona yatkın hale gelmesine neden olabilir.

Mas ile ilişkili G-proteine bağlı reseptör elemanı X2 'nin psödoalerji ve kronik inflamatuvar hastalıklarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bazı yanlış anlamalı varyantların reseptör fonksiyonunu değiştirerek mast hücre degranülasyonunu ve kalsiyum mobilizasyonunu etkileyebileceği de yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Bu bulgular, MRGPRX2'nin genetik varyasyonlarının bireylerin hastalık yatkınlığını ve ilaç reaksiyonlarını etkileyebileceğini ve daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır. İleride yapılacak çalışmalar, MRGPRX2'nin rolünü daha iyi anlamak ve bu bilgilerin hastalıkların tedavisine ve ilaçlara olan duyarlılığın yönetimine katkıda bulunmasını sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Pacheco, Hernando, et al. "Tissue engineering scaffold for sequential release of vancomycin and rhBMP2 to treat bone infections." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 102.12 (2014): 4213-4223.
2. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vancomycin> [Erişim Tarihi 18 Nisan 2023]
3. Mitchell, Miguel O. "Antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE)." *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)* 6.4 (2007): 243-247.
4. KORZENIOWSKI, OKSANA, and MERLE A. SANDE. "Combination antimicrobial therapy for *Staphylococcus aureus* endocarditis in patients addicted to parenteral drugs and in nonaddicts: a prospective study." *Annals of Internal Medicine* 97.4 (1982): 496-503.
5. Levine, Donald P., Barbara S. Fromm, and B. Ramesh Reddy. "Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis." *Annals of internal medicine* 115.9 (1991): 674-680.
6. Zhou, Huan, Joseph G. Lawrence, and Sarit B. Bhaduri. "Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review." *Acta biomaterialia* 8.6 (2012): 1999-2016.
7. Riedl, Marc A., and Adrian M. Casillas. "Adverse drug reactions: types and treatment options." *American family physician* 68.9 (2003): 1781-1790.
8. Farnam, Kevin, et al. "Nonallergic drug hypersensitivity reactions." *International archives of allergy and immunology* 159.4 (2012): 327-345.
9. Brown, Anthony FT. "Current management of anaphylaxis." *Emergencias* 21.3 (2009): 213-223.
10. Payne, V., and P. C. A. Kam. "Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance." *Anaesthesia* 59.7 (2004): 695-703.
11. Rosa, Eugenia Reyes R., et al. "Vancomycin as a risk factor for anaphylactoid reaction (Red Man Syndrome): Literature review." *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 7.27 (2013): 1854-1859.
12. Bischoff, Stephan C. "Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data." *Nature Reviews Immunology* 7.2 (2007): 93-104.
13. Bertolissi, Massimo, et al. "Pruritus: a useful sign for predicting the haemodynamic changes that occur following administration of vancomycin." *Critical Care* 6.3 (2002): 1-6.

14. Laroche, Dominique, et al. "Biochemical markers of anaphylactoid reactions to drugs. Comparison of plasma histamine and tryptase." *Anesthesiology* 75.6 (1991): 945-949.
15. Sivagnanam, Soupramanien, and Dirk Deleu. "Red man syndrome." *Critical care* 7.2 (2002): 1-3.
16. Veien, Mette, et al. "Mechanisms of nonimmunological histamine and tryptase release from human cutaneous mast cells." *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 92.4 (2000): 1074-1081.
17. Myers, Angela L., et al. "Defining risk factors for red man syndrome in children and adults." *The Pediatric infectious disease journal* 31.5 (2012): 464.
18. Shuto, Hideki, et al. "Potentiation of vancomycin-induced histamine release by muscle relaxants and morphine in rats." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43.12 (1999): 2881-2884
19. De Luca, Joseph F., Natasha E. Holmes, and Jason A. Trubiano. "Adverse reactions to vancomycin and cross-reactivity with other antibiotics." *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 20.4 (2020): 352-361.
20. Kupstaitė, Rūta, et al. "Severe vancomycin-induced anaphylactic reaction." *Medicina* 46.1 (2010): 31
21. Porebski, Grzegorz, et al. "Mas-related G protein-coupled receptor-X2 (MRGPRX2) in drug hypersensitivity reactions." *Frontiers in immunology* 9 (2018): 3027.
22. Horinouchi Y, Abe K, Kubo K, Oka M. Mechanisms of vancomycin-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions* 1993; 40:28–36.
23. Williams PD, Laska DA, Shetler TJ, et al. Vancomycin-induced release of histamine from rat peritoneal mast cells and a rat basophil cell line (RBL-1). *Agents Actions* 1991; 32:217–223.
24. Azimi E, Reddy VB, Lerner EA. Brief communication: MRGPRX2, atopic dermatitis and red man syndrome. *Itch (Phila)* 2017; 2:e5
25. McNeil, Benjamin D., et al. "Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions." *Nature* 519.7542 (2015): 237-241.
26. Gaudenzio, Nicolas, et al. "Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies." *The Journal of clinical investigation* 126.10 (2016): 3981-3998.
27. Kiatsurayanon, Chanisa, et al. "Angiogenic peptide (AG)-30/5C activates human keratinocytes to produce cytokines/chemokines and to migrate and proliferate via MrgX receptors." *Journal of Dermatological Science* 83.3 (2016): 190-199.
28. Bader, Michael, et al. "Mas and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs." *Pharmacological reviews* 66.4 (2014): 1080-1105.

29. Azimi, Ehsan, et al. "Dual action of neurokinin-1 antagonists on Mas-related GPCRs." *JCI insight* 1.16 (2016).
30. Occhiuto, Christopher J., et al. "Store-operated calcium entry via STIM1 contributes to MRGPRX2 induced mast cell functions." *Frontiers in immunology* 10 (2019): 3143.
31. Ogasawara, Hiroyuki, and Masato Noguchi. "Therapeutic potential of MRGPRX2 inhibitors on mast cells." *Cells* 10.11 (2021): 2906.
32. Huber, Michael, et al. "Regulation of the pleiotropic effects of tissue-resident mast cells." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 144.4 (2019): S31-S45.
33. Wang, Zhao, and Magda Babina. "MRGPRX2 signals its importance in cutaneous mast cell biology: Does MRGPRX2 connect mast cells and atopic dermatitis?." *Experimental Dermatology* 29.11 (2020): 1104-1111.
34. Neves, Susana R., Prahlad T. Ram, and Ravi Iyengar. "G protein pathways." *Science* 296.5573 (2002): 1636-1639.
35. Solinski, Hans Jürgen, Thomas Gudermann, and Andreas Breit. "Pharmacology and signaling of MAS-related G protein-coupled receptors." *Pharmacological reviews* 66.3 (2014): 570-597.
36. Robas, Nicola, Emma Mead, and Mark Fidock. "MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion." *Journal of Biological Chemistry* 278.45 (2003): 44400-44404.
37. Quan, Paola Leonor, et al. "The multifaceted mas-related G protein-coupled receptor member X2 in allergic diseases and beyond." *International Journal of Molecular Sciences* 22.9 (2021): 4421.
38. Premzl, Marko. "Comparative genomic analysis of eutherian Mas-related G protein-coupled receptor genes." *Gene* 540.1 (2014): 16-19.
39. Han, Shengli, et al. "Use of the relative release index for histamine in LAD2 cells to evaluate the potential anaphylactoid effects of drugs." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-9.
40. Hermans, Maud AW, et al. "Human mast cell line HMC1 Expresses functional Mas-related G-protein coupled receptor 2." *Frontiers in immunology* 12 (2021): 625284.
41. Al Hamwi, Ghazl, et al. "Mas-related G protein-coupled receptors X (MRGPRX): Orphan GPCRs with potential as targets for future drugs." *Pharmacology & Therapeutics* (2022): 108259.
42. Kamohara, Masazumi, et al. "Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides." *Biochemical and biophysical research communications* 330.4 (2005): 1146-1152.
43. Subramanian, Hariharan, et al. "Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast

- cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization." *Journal of Biological Chemistry* 286.52 (2011): 44739-44749
44. Roy, Saptarshi, et al. "Angiogenic host defense peptide AG-30/5C and bradykinin B2 receptor antagonist icatibant are G protein biased agonists for MRGPRX2 in mast cells." *The Journal of Immunology* 202.4 (2019): 1229-1238.
 45. Chompunud Na Ayudhya, Chalutip, et al. "Identification of gain and loss of function missense variants in MRGPRX2's transmembrane and intracellular domains for mast cell activation by substance P." *International Journal of Molecular Sciences* 20.21 (2019): 5247.
 46. Wang, Zhao, et al. "MRGPRX2-Mediated Degranulation of Human Skin Mast Cells Requires the Operation of $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, Ca^{++} Channels, ERK1/2 and PI3K—Interconnection between Early and Late Signaling." *Cells* 11.6 (2022): 953.
 47. Inoue, Asuka, et al. "Illuminating G-protein-coupling selectivity of GPCRs." *Cell* 177.7 (2019): 1933-1947.
 48. Cao, Thi Bich Tra, et al. "Elevated MRGPRX2 levels related to disease severity in patients with chronic spontaneous urticaria." *Allergy, Asthma & Immunology Research* 13.3 (2021): 498.
 49. Ali, Hydar. "Emerging roles for MAS-related G protein-coupled receptor-X2 in host defense peptide, opioid, and neuropeptide-mediated inflammatory reactions." *Advances in immunology* 136 (2017): 123-162.
 50. Cai, Yi, et al. "G-protein-activated phospholipase C- β , new partners for cell polarity proteins Par3 and Par6." *Oncogene* 24.26 (2005): 4293-4300.
 51. Liu, R., Che, D., Zhao, T., Pundir, P., Cao, J., Lv, Y., ... He, L. (2017). Mrgprx2 is essential for formylated peptide induced anaphylactoid reactions. *Biochemical Pharmacology* 146, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.09.017>.
 52. Ding, Yuanyuan, et al. " α -Linolenic acid attenuates pseudo-allergic reactions by inhibiting Lyn kinase activity." *Phytomedicine* 80 (2021): 153391.
 53. Zhang, Fan, et al. "MrgprX2 regulates mast cell degranulation through PI3K/AKT and PLC γ signaling in pseudo-allergic reactions." *International Immunopharmacology* 102 (2022): 108389.
 54. Niyonsaba, François, et al. "Antimicrobial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5 activates mast cells via Mas-related G protein-coupled receptor X2." *Allergy* 75.1 (2020): 203-207.
 55. Garcia-Marcos, Mikel, Pradipta Ghosh, and Marilyn G. Farquhar. "GIV/Girdin transmits signals from multiple receptors by triggering trimeric G protein activation." *Journal of Biological Chemistry* 290.11 (2015): 6697-6704.
 56. Ghosh, Pradipta. "G protein coupled growth factor receptor tyrosine kinase: no longer an oxymoron." *Cell Cycle* 14.16 (2015): 2561-2565.

57. Garcia-Marcos, Mikel, Pradipta Ghosh, and Marilyn G. Farquhar. "GIV is a nonreceptor GEF for G α i with a unique motif that regulates Akt signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.9 (2009): 3178-3183.
58. Lazki-Hagenbach, Pia, Hydar Ali, and Ronit Sagi-Eisenberg. "Authentic and ectopically expressed MRGPRX2 elicit similar mechanisms to stimulate degranulation of mast cells." *Cells* 10.2 (2021): 376.
59. Franke, Kristin, et al. "Cytokines stimulated by IL-33 in human skin mast cells: Involvement of NF- κ B and p38 at distinct levels and potent co-operation with Fc ϵ RI and MRGPRX2." *International Journal of Molecular Sciences* 22.7 (2021): 3580.
60. Ushio, Hiroko, et al. "Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127.5 (2011): 1267-1276.
61. Navinés-Ferrer, Arnau, et al. "MRGPRX2-mediated mast cell response to drugs used in perioperative procedures and anaesthesia." *Scientific reports* 8.1 (2018): 1-11.
62. Reddy, Vemuri B., et al. "A single amino acid in MRGPRX2 necessary for binding and activation by pruritogens." *The Journal of allergy and clinical immunology* 140.6 (2017): 1726.
63. Brookes, Anthony J. "The essence of SNPs." *Gene* 234.2 (1999): 177-186.
64. HapMap International Consortium. "A haplotype map of the human genome." *Nature* 437 (2005): 1299-1320.
65. 1000 Genomes Project Consortium. "A global reference for human genetic variation." *Nature* 526.7571 (2015): 68.
66. Karczewski, Konrad J., et al. "The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans." *Nature* 581.7809 (2020): 434-443.
67. Peter, M. Visscher, et al. "Five years of GWAS discovery." *Am J Hum Genet* 90.1 (2012): 7-24.
68. Zao, Nan, et al. "Determining effects of non-synonymous SNPs on protein-protein interactions using supervised and semi-supervised learning." *PLoS Comput Biol* 10.5 (2014): e1003592
69. Shastry, Barkur S. "SNPs: impact on gene function and phenotype." *Single Nucleotide Polymorphisms* (2009): 3-22.
70. Yang, Su, et al. "Adaptive evolution of MRGX2, a human sensory neuron specific gene involved in nociception." *Gene* 352 (2005): 30-35.
71. Alkanfari, Ibrahim, et al. "Naturally occurring missense MRGPRX2 variants display loss of function phenotype for mast cell degranulation in response to substance P, hemokinin-1, human β -defensin-3, and icatibant." *The Journal of Immunology* 201.2 (2018): 343-349.

72. Guglielmi, L., et al. "IL-10 promoter and IL4-R α gene SNPs are associated with immediate β -lactam allergy in atopic women." *Allergy* 61.8 (2006): 921-927.
73. Apter, Andrea J., et al. "Clinical and genetic risk factors of self-reported penicillin allergy." *Journal of allergy and clinical immunology* 122.1 (2008): 152-158.
74. Guéant, Jean-Louis, et al. "HLA-DRA variants predict penicillin allergy in genome-wide fine-mapping genotyping." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135.1 (2015): 253-259.
75. Kim, Byung Soo, et al. "Effect of single nucleotide polymorphisms within the interleukin-4 promoter on aspirin intolerance in asthmatics and interleukin-4 promoter activity." *Pharmacogenetics and genomics* 20.12 (2010): 748-758.
76. Sabato, Vito, et al. "Allergenic and mas-related G protein-coupled receptor X2-activating properties of drugs: resolving the two." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 11.2 (2023): 395-404.
77. Kolkhir, Pavel, et al. "MRGPRX2 in drug allergy: What we know and what we do not know." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 151.2 (2023): 410-412.
78. Baldo, Brian A. "MRGPRX2, drug pseudoallergies, inflammatory diseases, mechanisms, and distinguishing MRGPRX2-and IgE/Fc ϵ RI-mediated events." *British Journal of Clinical Pharmacology* (2023).
79. Manorak, Wichayapha, et al. "Upregulation of Mas-related G Protein coupled receptor X2 in asthmatic lung mast cells and its activation by the novel neuropeptide hemokinin-1." *Respiratory research* 19.1 (2018): 1-5.
80. Foer, Dinah, et al. "Patient Characteristics Associated With Reactions to Mrgprx2-Activating Drugs in an Electronic Health Record–Linked Biobank." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 11.2 (2023): 492-499.
81. Robas, Nicola, Emma Mead, and Mark Fidock. "MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion." *Journal of Biological Chemistry* 278.45 (2003): 44400-44404.
82. Thusberg, Janita, Ayodeji Olatubosun, and Mauno Vihinen. "Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants." *Human mutation* 32.4 (2011): 358-368.
83. Zeng, Zishuo, and Yana Bromberg. "Predicting functional effects of synonymous variants: a systematic review and perspectives." *Frontiers in genetics* 10 (2019): 914.
84. Roy, Saptarshi, et al. "Multifaceted MRGPRX2: New insight into the role of mast cells in health and disease." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 148.2 (2021): 293-308.
85. Chen, Ernie, et al. "Inflamed ulcerative colitis regions associated with MRGPRX2-mediated mast cell degranulation and cell activation modules, defining a new therapeutic target." *Gastroenterology* 160.5 (2021): 1709-1724.

86. Jean-Charles, Pierre-Yves, Suneet Kaur, and Sudha K. Shenoy. "GPCR signaling via β -arrestin-dependent mechanisms." *Journal of cardiovascular pharmacology* 70.3 (2017): 142.

7. EKLER

Ek 1. ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU (Ebeveyn)

(Hekimin Açıklaması)

Vankomisin alerjisi ile ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “Vankomisine Bağlı Kırmızı boyun sendromu geliştiren hastalarda MRGPRX2 Reseptör Mutasyonlarının değerlendirilmesi”dir. Çocuğunuzun da Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER’in sorumlu araştırmacısı olduğu bu araştırmaya katılmasını öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız. Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Alerji Bilim Dalı tarafından yapılacaktır. Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz çocuğunuz Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayene edilecek ve bulgular kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. Yine izniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için çocuğunuzun kolundan 3-4 ml (1 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Alınan kan örneğinden, hastada MRGPRX2 reseptör mutasyonlarının olup olmadığına bakılacaktır. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Alerji Bilim Dalı tarafından gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:

1. İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz.
2. Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak; ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Çalışmaya katılmanız durumunda, çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER tarafından Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Alerji Bilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

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

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

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

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

Katılımcı:

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Görüşme tanığı:

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim:

Adı soyadı, ünvanı:

Adres/Tel:

İmza

Ek 2. ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ÇOCUK RIZA FORMU

Sevgili Arkadaşım,

Benim adım Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER

Seni “Vankomisine Bağlı Kırmızı boyun sendromu geliştiren hastalarda MRGPRX2 Reseptör Mutasyonlarının değerlendirilmesi” isimli çalışmaya davet ediyoruz.

Biliyoruz ki bazı ilaçları aldıktan sonra oldukça rahatsız oluyorsun. Bizim bu çalışmayı yapmak istememizin nedeni bazı ilaçları aldıktan sonra rahatsız olan senin gibi çocuklarda bu durumun neden ortaya çıktığını araştırmak. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Alerji Bilim Dalı'nda gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımın araştırmanın başarısı için önemlidir.

Sorumlu Araştırmacısı olduğum bu araştırmayı ben Dr. Özge UYSAL SOYER, Dr. Bülent E. ŞEKEREL, Dr. Ümit Murat ŞAHİNER ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursan senden küçük bir miktarda kan örneği alacağız. Çalışma sana ve ailene mali bir yük getirmeyecektir. Ayrıca canını yakacak işlem yapılmayacak.

Bu araştırmanın sonuçları senin gibi, bazı ilaçlara alerjisi olan çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz, sonuçları bildireceğiz ama senin adını söylemeyeceğiz.

Bu araştırmaya katılıp katılmamak için karar vermeden önce anne ve baban ile konuşup onlara danışmalısın. Onlara da bu araştırmadan bahsedip onaylarını/izinlerini alacağız. Anne ve baban tamam deseler bile sen kabul etmeyebilirsin. Bu araştırmaya katılmak senin isteğine bağlı ve istemezsen katılmazsın. Bu nedenle hiç kimse sana kızmaz ya da küsmez. Önce katılmayı kabul etsen bile sonradan vazgeçebilirsin, bu tamamen sana bağlı. Kabul etmediğin durumda da doktorlar muayene ve diğer işlemlerde sana önceden olduğu gibi iyi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğin zaman bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim bu kâğıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan aşağıya lütfen adını ve soyadını yaz ve imzanı at. İmzaladıktan sonra sana ve ailene bu formun bir kopyası verilecektir.

(KATILIMCI/Hastanın Beyanı)

Dr. Özge UYSAL SOYER, Dr. Bülent E. ŞEKEREL ve Dr. Ümit Murat ŞAHİNER tarafından Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Alerji

Bilim Dalı'nda yapılacak bu araştırma ile ilgili bilgiler bana anlatıldı. Bana anlatılan bilgileri anladım ve bu çalışmaya katılmak istiyorum.

Çocuğun adı, soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırmacının adı, soyadı, ünvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

EK 3. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557- 1661

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 07 EYLÜL 2021 SALI
Toplantı No : 2021/14
Proje No : GO 21/759(Değerlendirme Tarihi: 29.06.2021)
Karar No : 2021/14-03

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Özge Uysal SOYER'in sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Bülent E. ŞEKEREL, Prof. Dr. Ali Bülent CENGİZ, Prof. Dr. Ümit Murat ŞAHİNER, Doç. Dr. Esra BİRBEN, Doç. Dr. Yasemin ÖZSÜREKÇİ ile birlikte çalışacakları ve Biyolog Pınar KARACAKAYA'nın yüksek lisans tezi olan, GO 21/759 kayıt numaralı "*Vankomisin'e Bağlı Kırmızı Boyun Sendromu Geliştiren Hastalarda MRGPRX2 Reseptör Mutasyonlarının Değerlendirilmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 08 Eylül 2021-08 Nisan 2023 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Başkan)	8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK	(Üye)
2. Prof. Dr. G. Burça AYDIN	(Üye)	9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	10. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM	(Üye)
4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	11. Doç. Dr. Merve BATUK	(Üye)
5. Prof. Dr. Sibel PEHLIVAN	(Üye)	12. Doç. Dr. Gülten KOÇ	(Üye)
6. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN	(Üye)	13. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
7. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAYINDAR	(Üye)	IZINLI	
		14. Av. Serap MORALIOĞLU	(Üye)

Ek 4. DİJİTAL MAKBUZ

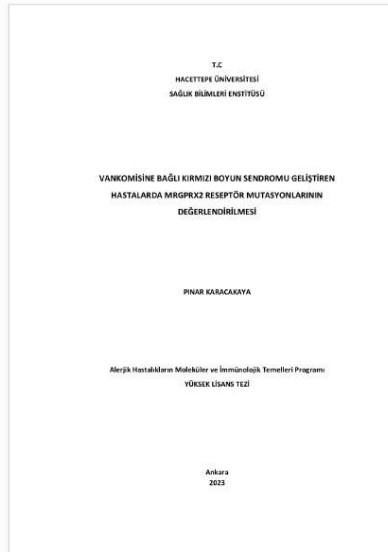


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Pınar Karacakaya
Ödev başlığı: tez
Gönderi Başlığı: VANKOMİSİNE BAĞLI KIRMIZI BOYUN SENDROMU GELİŞTİRE...
Dosya adı: STALARDA_MRGPRX2_RESEPT_R_MUTASYONLARININ_DE_ERL...
Dosya boyutu: 1.37M
Sayfa sayısı: 57
Kelime sayısı: 11,940
Karakter sayısı: 80,454
Gönderim Tarihi: 18-Ağu-2023 12:25ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2147488873



Ek 5. ORJİNALLİK RAPORU

VANKOMİSİNE BAĞLI KIRMIZI BOYUN SENDROMU GELİŞTİREN HASTALARDA MRGPRX2 RESEPTÖR MUTASYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 9	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 3
2	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	% 2
3	www.tugem.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	sundhedsdatastyrelsen.dk İnternet Kaynağı	% 1
5	www.coursehero.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.biyologlar.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.medrxiv.org İnternet Kaynağı	<% 1

sideeffects.embl.de

8. ÖZGEÇMİŞ