

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KİSTİK FİBROZİS HASTALARININ ALEVLENME VE REMİSYON
DÖNEMLERİ PLAZMA SFİNGOMYELİN VE SERAMİD
DÜZEYLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE
SPEKTROMETRESİ İLE BELİRLENMESİ VE BAZI İNFLAMASYON
BELİRTEÇLERİYLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Elife Dilara BAL TOPÇU

**UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.**

**ANKARA
2018**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KİSTİK FİBROZİS HASTALARININ ALEVLENME VE REMİSYON
DÖNEMLERİ PLAZMA SFİNGOMYELİN VE SERAMİD
DÜZEYLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE
SPEKTROMETRESİ İLE BELİRLENMESİ VE BAZI İNFLAMASYON
BELİRTEÇLERİYLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Dr. Elife Dilara BAL TOPÇU
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Yeşim Er Öztaş
ORTAK TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. İncilay Lay**

**ANKARA
2018**

TEŞEKKÜR

Uzun öğrenim yaşamımda beni her konuda koşulsuz destekleyen anneme, babama, kardeşime ve zorlu uzmanlık eğitimim sürecinde beni hiç yalnız bırakmayan sevgili eşime, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimim süresince bana her konuda destek olan, tezimin tamamlanmasında bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan tez danışmanım Doç. Dr. Yeşim Er Öztaş'a, tez ortak danışmanım Prof. Dr. İncilay Lay'a, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri, Merkez ve Acil Biyokimya Laboratuvarlarındaki eğitimimizde klinik biyokimya ile ilgili bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Z. Günnur Dikmen ile Doç. Dr. Aslı Pınar'a ve Anabilim Dalımızın tüm öğretim üyelerine, tezim için gerekli örneklerin toplanması aşamasındaki yardımları dolayısıyla Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı ile Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı, Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı ekibine, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bize laboratuvarını açarak tecrübelerini paylaşan, yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mutay Aslan ile Dr. Filiz Özcan'a, istatistiksel analizlerde emeği geçen Dr. Ahmet Yalçınkaya'ya katkılarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

BAL TOPÇU, E. D., Kistik Fibrozis Hastalarının Alevlenme ve Remisyon Dönemleri Plazma Sfingomyelin ve Seramid Düzeylerinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Belirlenmesi ve Bazı İnflamasyon Belirteçleriyle İlişkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Ankara, 2018.

Kistik fibrozis (KF); beyaz ırkın en sık rastlanan otozomal resesif geçişli genetik hastalığıdır. KF’de multisistemik bir tutulum olmasına rağmen, akciğerlerde mukus viskozitesinin artması, mukosilyer klirensin bozulması ve buna bağlı meydana gelen kronik akciğer infeksiyonları mortalitenin en sık sebebidir. KF akciğer hastalığı patogenezi hakkında birçok hipotez vardır. Lipitlerle olan ilişkisi ise anlaşılammıştır. Sfingolipit metabolitlerinden olan sfingomyelin (SM) ve seramid (SER)’ler birçok hücrel olayda rol oynar. Lipit metabolizmasındaki bozukluklar birçok hastalığın patogeneziyle ilişkilendirilmiş ancak, SER ve SM’lerin hangi patofizyolojik süreçlerde ve nasıl rol aldıkları aydınlatılmamıştır. YKL-40, makrofajlardan salgılanan kitinaz benzeri bir glikoproteindir. Fizyolojik rolü tam bilinmemektedir. Kronik inflamasyonda rol aldığı düşünülmektedir. Kitotriozidaz da aktif makrofajlardan salgılandığı için inflamatuvar bir protein olarak değerlendirilebilir. KF tanısı almış hastalardan, pulmoner alevlenmeyle servise yatışı yapılan hastaların alevlenme, antibiyotik tedavisi sonrası taburculuk dönemi ile taburcu olduktan sonra ilk 3 ay içindeki kontrole geldiklerinde alınan tam kan örneklerinden elde edilen plazmalarda, hastalık seyri boyunca sfingolipit metabolitleri ile inflamasyon düzeyini değerlendirmek amacıyla YKL-40 ve kitotriozidaz aktiviteleri ölçüldü. Sonuçlar benzer yaş aralığındaki sağlıklı bireylerle kıyaslandı. Erişkin KF hastalarının alevlenme ve taburculuk dönemi tüm SM ve SER düzeyleri ile kontrol dönemi 16 SM hariç tüm SM ve SER düzeyleri sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulundu ($p<0,001$ ve $p<0,05$). Çocuk KF hastalarının alevlenme dönemi 16 SM, 18 SM, 24 SM, SER 22 ve SER 24, taburculuk dönemi 18 SM, 24 SM, SER 18, SER 20, SER 22 ve SER 24 ile kontrol dönemi 18 SM, 24 SM ve 24 SER düzeyleri sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulundu ($p<0,001$ ve $p<0,05$). Erişkin ve çocuk KF hastalarının YKL-40 düzeyleri tüm dönemlerde sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0,001$ ve $p<0,05$). Ayrıca erişkin KF hastalarının alevlenme dönemi FEV1 \leq 50 olanların FVC ($r:-0,64$ ve $p<0,05$) ve FEV1 ($r:-0,64$ ve $p<0,05$) değerleri ile çocuk hastaların alevlenme dönemi FVC ($r:-0,70$ ve $p<0,05$) ve FEV1 ($r:-0,72$ ve $p<0,05$) değerleri aynı dönem YKL-40 düzeyleri ile negatif yönde korele bulundu. Erişkin KF hastalarının kitotriozidaz aktiviteleri tüm dönemlerde sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek iken ($p<0,05$), çocuk KF hastalarının kitotriozidaz aktiviteleri tüm dönemlerde kontrole benzer bulundu. Hem çocuk hem de erişkin hastalarda, SER, SM ve YKL-40 düzeyleri ile kitotriozidaz aktiviteleri hastalığın dönemleri arasında anlamlı farklılık göstermedi. Verilerimize göre, kistik fibrozis transmembran regülatör (KFTR) mutasyonu sonucunda sfingolipit metabolizmasının değiştiği açıktır. KFTR bozukluğunun veziküler pH asidifikasyonunu bozduğu ve asidik pH’da etkin olan asidik sfingomyelinaz (aSMaz)’ın aktivitesini azalttığı bilinmektedir. Bu sebeple KF hastalarında SER ve SM üretimi kısıtlanmış olabilir. Ayrıca glutasyon (GSH) transportu KFTR bağımlıdır. KFTR mutant hücre hatlarında, normal hücrelere göre GSH düzeylerinin daha yüksek olduğu, yüksek GSH düzeylerinin ise akciğerlerde SER üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Literatüre göre KF’deki yüksek intraselüler GSH konsantrasyonları SMase yoluyla SER sentezinde azalmaya yol açıyor olabilir. SM ve SER türleri sağlıklı kontrole kıyaslandığında ortaya çıkan anlamlı farklılıklar, erişkin hastalarda, çocuk hastalara göre daha fazla ve daha belirgindir. Bu durum, erişkin hastaların yüksek yaş dolayısıyla kronik hastalık yükünü daha fazla taşımaları ve bu nedenle sfingolipit metabolizmalarının daha fazla etkilenmiş olabileceği ile açıklanabilir. Kitotriozidaz aktivitesi, erişkin hastaların tüm dönemlerinde sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek iken, çocuk hastalarla sağlıklı bireylerin arasında anlamlı farklılık olmaması, kitotriozidaz aktivitesinin, yaşça büyük hastalarda kronik inflamasyonu daha iyi yansıttığını düşündürmektedir. YKL-40’ın hem erişkin hem çocuk hastalarda her 3 dönemde de sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek olması ve solunum fonksiyon testleri ile negatif yönde korele olması, YKL-40’ın, KF hastalarında pulmoner fonksiyon takibinde değerli olabileceğini ortaya koymuştur. SER, SM ve YKL-40 düzeyleri ile kitotriozidaz aktivitelerinin hastalığın dönemleri arasında anlamlı farklılık göstermemesi, hastalık takibi açısından faydalı olmayacağı sonucunun yanısıra, araştırmanın daha çok hastayla yapılması gerekliliğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Kistik fibrozis, Seramid, Sfingomyelin, YKL-40, Kitotriozidaz aktivitesi

ABSTRACT

BAL TOPCU, E. D., Determination of Plasma Sphingomyelin and Ceramide Levels by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Investigation of the Relationship With Some Inflammatory Markers in Cystic Fibrosis Patients During the Pulmonary Exacerbation and Stable Period. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry Thesis. Ankara, 2018.

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disorder of caucasian population. Despite the multisystemic involvement in CF, increased mucus viscosity in the lungs, deterioration of mucociliary clearance and consequent chronic lung infections are the most common causes of mortality. There are many hypotheses about the pathogenesis of CF lung disease. CF's relationship with lipids is not understood. Sphingomyelin (SM) and ceramide (C) are sphingolipid metabolites which play a role in many cellular events. Disorders in lipid metabolism have been linked to the pathogenesis of many diseases, but it has not been elucidated in which pathophysiological processes and how C and SM are involved. YKL-40 is a chitinase-like glycoprotein secreted from macrophages. Its physiological role is not known yet. It is thought to have been involved in chronic inflammation. Chitotriosidase can also be evaluated as an inflammatory protein because it is secreted from active macrophages. Plasma samples were obtained from whole blood collected from CF patients who were hospitalized with pulmonary exacerbation during exacerbation, discharge after antibiotic treatment and control within the first 3 months after discharge period. In these plasma samples, YKL-40 and chitotriosidase activities were measured in order to evaluate the level of inflammation. C and SM levels were measured in order to observe changes of sphingolipid metabolites during disease course. The results were compared to healthy individuals of similar age range. Except the 16 SM level of the control of the adult CF patient group; all plasma SM and C levels in exacerbation, discharge and control were significantly lower when compared to healthy controls ($p < 0.001$ and $p < 0.05$). For the children with CF in exacerbation 16 SM, 18 SM, 24 SM, C 22, C 24, in discharge 18 SM, 24 SM, C 18, C 20, C 22, C 24 and control period 18 SM, 24 SM, C 24 levels were significantly lower than healthy controls ($p < 0.001/p < 0.05$). YKL-40 levels of adult and pediatric CF patients were significantly higher than healthy controls at all periods ($p < 0.001/p < 0.05$). In addition, FVC and FEV1 values of pediatric patients (FVC: $r: -0.70$, $p < 0.05$ /FEV1: $r: -0.72$, $p < 0.05$) and adult CF patients with $FEV1 \leq 50$ (FVC: $r: -0.64$, $p < 0.05$ /FEV1: $r: -0.64$, $p < 0.05$) in exacerbation period were found to correlate negatively with YKL-40 levels in the same period. The chitotriosidase activities of adult CF patients were significantly higher than healthy controls at all periods ($p < 0.001/p < 0.05$), the chitotriosidase activities of pediatric CF patients were not significantly different from healthy controls in any of the periods. C, SM and YKL-40 levels and chitotriosidase activities did not show any significant difference between the periods of the disease. According to our data, it is clear that the sphingolipid metabolism changes as a result of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutation. It is known that CFTR disorder impairs vesical pH acidification and reduces the activity of acidic sphingomyelinase (Smase), which is active at acidic pH. For this reason, C and SM production may be restricted in CF patients. The glutathione (GSH) transporter is CFTR dependent. In CFTR mutant cell lines GSH levels are shown to be higher than normal cells. Another study showed that high levels of GSH inhibited C production in the lungs. High intracellular GSH concentrations in CF according to the literature may be leading to a decrease in C synthesis via Smase pathway. Significant differences in SM and C types compared to healthy controls are more pronounced in adult patients than children. This can be explained by the fact that adult patients are more exposed to the burden of chronic illness due to their older age, and thus their sphingolipid metabolism may be more affected. Chitotriosidase activity was significantly higher in all periods of adult patients than in healthy controls, but not significantly different in children compared to healthy controls. This suggests that chitotriosidase activity reflects chronic inflammation better in older patients. YKL-40 was found to be significantly higher in both adult and pediatric patients than healthy control in all three periods, and negative correlation with pulmonary function tests suggests that YKL-40 may be valuable in following pulmonary function in CF patients. C, SM and YKL-40 levels and chitotriosidase activities do not differ significantly between the periods of the disease suggests that the research should be done with more patients besides the result that would not be beneficial for the follow-up of the disease.

Key words: Cystic fibrosis, Ceramide, Sphingomyelin, YKL-40, Chitotriosidase activity

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kistik Fibrozis (KF)	4
2.1.1. Kistik Fibrozis ile İlgili Genel Bilgiler	4
2.1.2. Pulmoner Semptomlar	6
2.1.3. Gastrointestinal Semptomlar	7
2.1.4. Kistik Fibrozis Geni	9
2.1.5. KFTR Proteini	10
2.1.6. KF'in Tanısı	13
2.1.7. KF Tedavisi	20
2.2. Sfingolipitler	27
2.2.1. Sfingolipitlerin sentezi	27
2.2.2. Seramidler	28
2.2.3. Sfingomyelinler	30
2.2.4. Lipit Raftları	31
2.3. Sfingolipitler ve Hastalıklar	32
2.3.1. Seramidler ve Apoptoz	33
2.3.2. Seramidler ve İnflamasyon	33
2.3.3. Seramidlerin Tedavideki Rolü	34
2.3.4. Likit kromatografi–Tandem Kütle Spektrometresi	36
2.4. Kitin	41
2.5. Kitinazlar ve Kitinaz Benzeri Proteinler	41
2.5.1. Kitotriozidaz Aktivitesi	42
2.5.2. YKL-40	42
3. GEREÇ ve YÖNTEM	44
3.1. Gereçler	44
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler	44

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Malzemeler	45
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	45
3.3. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması	47
3.4. Yöntemler	47
3.4.1. Seramid ve Sfingomyelinlerin Analizi	47
3.4.2. Kitotriozidaz Enzim Aktivite Tayini	53
3.4.3. YKL-40'ın Ölçüm Prensibi	55
4. BULGULAR	59
4.1. Demografik, Klinik ve Rutin Biyokimyasal Veriler	59
4.2. Seramid ve Sfingomyelinlerin LC-MS/MS ile Analiz Sonuçları	62
4.2.1. Erişkin KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları	62
4.2.2. Çocuk KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları	67
4.3. YKL-40 Sonuçları	72
4.3.1. Erişkin KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları	72
4.3.2. Çocuk KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları	73
4.4. Kitotriozidaz Aktivitesi Sonuçları	74
4.4.1. Erişkin KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları	74
4.4.2. Çocuk KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları	76
4.5. KF Hastalarının Alevlenme Dönemleri SER, SM ve YKL-40 Düzeyleri ile Kitotriozidaz Aktivitelerinin Klinik/Rutin Biyokimyasal Parametrelerle Korelasyon İlişkileri	77
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	88
7. KAYNAKLAR	89
EKLER	116
EK 1. Onam Formları	116
EK 2. Muayene Takip Formları	128
EK 3. Çalışmadan Hazırlanan Yazılı ve Sözlü Sunumlar	131

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABC	: ATP-bağlayıcı kaset proteini
ABC	: Avidin-biyotin peroksidaz kompleks
AMCaz	: Asidik memeli kitinazı
APCI	: Atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon
aSMaz	: Asit sfingomyelinaz
ATP	: Adenozin trifosfat
B. cepacia	: <i>Burkholderia cepacia</i>
BAL	: Bronkoalveoler lavaj
BKI	: Beden Kitle İndeksi
BLT-1	: Lökotrien B-4 Reseptör
C	: Karbon
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CFF	: Kistik Fibrozis Vakfı
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CHIT1	: Kitotriozidaz
Cl ⁻	: Klorür
COX-2	: Siklooksijenaz
CRMS	: KFTR-İlişkili Metabolik Sendrom
CRP	: C-reaktif protein
CSF	: Koloni stimule edici faktör
DİOS	: Distal intestinal obstrüksiyon sendromu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dSu	: Distile su
E. coli	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EI	: Elektron iyonizasyonu
ENaC	: Epitelyal sodyum kanalı
ER	: Endoplazmik retikulum

ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
FB1	: Fumonisin B1
FEV1	: 1. saniyedeki zorlu ekspiratuvar hacim
FVC	: Zorlu vital kapasite
GC	: Gaz kromatografi
GIS	: Gastrointestinal sistem
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni stimule edici faktör
GSH	: Glutasyon
GSSH	: Okside glutasyon
H. Influenzae	: <i>Haemophilus influenzae</i>
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HcGp-39	: İnsan kıkırdak glikoproteini
HCO ₃ ⁻	: Bikarbonat
HPLC	: Yüksek performanslı likit kromatografi
HRP	: Horse radish peroksidaz
IFN- γ	: İnterferon-gama
IL-1 β	: İnterlökin-1 beta
IRT	: İmmunreaktif tripsinojen
IS	: İnternal Standart
IV	: İntravenöz
KF	: Kistik fibrozis
KFTR	: Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör
LC	: Likit kromatografi
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi
LPS	: Lipopolisakkarit
LTB ₄	: Lökotrien B ₄
m/z	: Kütle/Yük
MA	: Molekül ağırlığı
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz

MBA	: Membran bağlayıcı alan
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1
MRSA	: Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
MS	: Kütle spektrometresi
MS/MS	: Tandem Kütle Spektrometresi
Na ⁺	: Sodyum
NAC	: N-asetilsistein
NaCl	: Sodyum klorür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBA	: Nükleotid bağlayıcı alan
NF-κβ	: Nükleer faktör kappa-beta
NK	: Doğal öldürücü hücre
NPF	: Nazal potansiyel farkı
NPLC	: Normal faz sıvı kromatografi
ODS	: Oktadesil silika
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
OR	: Otozomal resesif
ORMDL3	: Orosomukoid benzeri-3
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PG	: Prostaglandin
PKA	: Protein kinaz A
PKB	: Protein kinaz B
PKC	: Protein kinaz C
PMN	: Polimorfonükleer
PPAR	: Peroksizom proliferatör aktive reseptör
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
RPLC	: Ters faz sıvı kromatografi
RÜ	: Regülatuvar ünite
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
S1P	: Seramid-1-fosfat

SER	: Seramid
SerS	: Seramid sentaz
SERT	: Seramid transfer protein
SM	: Sfingomyelin
SMaz	: Sfingomyelinaz
Sph-1-P	: Sfingozin-1-fosfat
SPT	: Serin-palmitoil transferaz
TLR-2	: Toll-like reseptör 2
TMB	: Tetrametilbenzidin
TNF- α	: Tümör nekroz faktör-alfa
UV	: Ultraviyole
V-H ⁺ ATPaz	: Vakuolar tip Hidrojen ATPaz
Δ F508	: Fenilalanin delesyonu

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2. 1. KF Patofizyolojisi	5
Şekil 2. 2. Apikal plazma membranındaki KFTR'nin yapısı	11
Şekil 2. 3. KFTR'nin Cl ⁻ transportu sırasındaki konformasyonel değişiklikleri	12
Şekil 2. 4. Yenidoğan taramasında KF tanı algoritması	15
Şekil 2. 5. Sfingolipitlerin şematik görünümü	27
Şekil 2. 6. Sfingolipit metabolizması	28
Şekil 2. 7. Açıl zincir uzunluğuna göre SER türleri	29
Şekil 2. 8. Açıl zincir uzunluğuna göre bazı SM türleri	30
Şekil 2. 9. Kütle spektrometresinin bileşenlerinin şematik görünümü	37
Şekil 2. 10. Tandem MS (MS/MS)'in çalışma prensibinin şematik görünümü	37
Şekil 2. 11. Kuadripollerin şematik görünümü	38
Şekil 3.1. SM 16, 18 ve 24'ün standartları ile internal standart SER 16'nın LC-MS/MS kromatogramları	51
Şekil 3.2. SER 16, 18, 20, 22 ve 24 standartlarının LC-MS/MS kromatogramları	51
Şekil 3.3. SER ve SM standartlarına ait kalibrasyon eğrileri	51
Şekil 3.4. Bir hastanın örnek SER ve SM kromatogramları	52
Şekil 3.5. Kitotriozidaz aktivitesi kalibrasyon eğrisi	54
Şekil 3.6. YKL-40'ın şematik ölçüm protokolü	56
Şekil 4.1. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı kontrollerin SER düzeyleri kutu grafikleri	64
Şekil 4.2. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı kontrollerin SM düzeyleri kutu grafikleri	66
Şekil 4.3. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı kontrollerin SER düzeyleri kutu grafikleri	70
Şekil 4.4. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı kontrollerin SM düzeyleri kutu grafikleri	72
Şekil 4.5. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin YKL-40 düzeyleri kutu grafikleri	73

Şekil 4.6. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin YKL-40 düzeyleri kutu grafikleri	74
Şekil 4.7. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin kitotriozidaz aktiviteleri kutu grafikleri	75
Şekil 4.8. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin kitotriozidaz aktiviteleri kutu grafikleri	77

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. KF tanısıyla uyumlu fenotipik özellikler	14
Tablo 2.2. Tavsiye edilen KF tarama paneli	17
Tablo 3.1. SER ve SM standartlarının hazırlanması	48
Tablo 3.2. Analizi yapılan sfingolipitlerin öncül ve ürünlerinin m/z değerleri	49
Tablo 3.3. 4-MU sodyum tuzu standartlarının hazırlanması	54
Tablo 4.1. KF hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun demografik verileri	59
Tablo 4.2. KF hastalarının klinik ve rutin biyokimyasal verileri	61
Tablo 4.3. Erişkin KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması	62
Tablo 4.4. Erişkin KF hastalarının taburculuk dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması	63
Tablo 4.5. Erişkin KF hastalarının kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması	63
Tablo 4.6. Çocuk KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması	67
Tablo 4.7. Çocuk KF hastalarının taburculuk dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması	68
Tablo 4.8. Çocuk KF hastalarının kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması	68
Tablo 4.9. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri ile sağlıklı bireylerin YKL-40 düzeylerinin kıyaslanması	72
Tablo 4.10. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri ile sağlıklı bireylerin YKL-40 düzeylerinin kıyaslanması	73
Tablo 4.11. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri ile sağlıklı bireylerin kitotriozidaz aktivitelerinin kıyaslanması	75
Tablo 4.12. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri ile sağlıklı bireylerin kitotriozidaz aktivitelerinin kıyaslanması	76
Tablo 4.13. Erişkin KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi SER ve SM düzeylerinin, aynı dönem %FVC, %FEV1 ile CRP ve BK düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkileri	778

Tablo 4.14. Erişkin KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi YKL-40 düzeyleri ile kitotriozidaz aktivitelerinin aynı dönem %FVC, %FEV1 ile CRP ve BK düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkileri	78
Tablo 4.15. Çocuk KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi SER ve SM düzeylerinin, aynı dönem %FVC, %FEV1, CRP ve BK düzeyleri ile korelasyonları	79
Tablo 4.16. Çocuk KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi YKL-40 düzeyleri ile kitotriozidaz aktivitelerinin aynı dönem %FVC, %FEV1 ile CRP ve BK düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkileri	79
Tablo 5.1. KF’de yüksek SER düzeyleri raporlayan araştırmalar	81
Tablo 5.2. KF’de düşük SER düzeyleri raporlayan araştırmalar	82

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kistik fibrozis (KF), beyaz ırkta sık görülen otozomal resesif (OR) geçişli genetik bir hastalıktır. Görülme sıklığı 1/2000-3500 canlı doğumda bir, taşıyıcılık oranı ise 1/25 olarak bilinmekte ancak, hastalık insidansı popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir [1]. Ülkemizde akraba evliliklerinin sık olmasından dolayı insidansının daha yüksek olduğu düşünülmektedir. KF geni 7q31.3'de lokalizedir. KF geninden 1480 amino asitlik kistik fibrozis transmembran regülator (KFTR) olarak adlandırılan bir protein sentezlenmektedir [2]. KFTR proteini, epitel dokuda sıvı ve elektrolit transferi yapan ABC (ATP bağlayıcı kaset proteini) transporter ailesinin üyesidir [3] ve epitel hücrelerinin apikal membranında siklik adenozin monofosfat (cAMP) bağımlı bir iyon kanalıdır. Doğrudan klor (Cl^-) taşınmasının yanısıra, sodyum (Na^+) ve bikarbonat (HCO_3^-) transportunda da rol oynar [4, 5].

KFTR mutasyonları sonucunda akciğer, pankreas, karaciğer, bağırsak, ter bezi ve epididim gibi organları döşeyen epitel hücre membranında Cl^- transportu bozulur. Sekresyonların niteliği değişir. Dehidratasyona bağlı mukus viskozitesi artar, bu da duktuslarda obstrüksiyonlara sebep olur. Hiperviskoz materyal bakteri kolonizasyonuna zemin hazırlayarak, inflamasyon ve infeksiyonla sonuçlanan bir kısır döngüye neden olur [6]. KF'deki akciğer tutulumunun önemli bir özelliği de akciğerlerin bazı özel patojenlerle kolonize olmasıdır. Bu mikroorganizmalar kronik dönemde hasar yaratabilir ya da zaman zaman akut pulmoner alevlenme bulgularına neden olabilirler [1]. Giderek hasar gören akciğer dokusunda fibrozis ve bronşektazi gelişir. İleri dönemde solunum yetmezliği meydana gelir. Pulmoner yetmezlik, KF'e bağlı ölümlerin yaklaşık %80'ini oluşturur [7].

Biyokimyasal anormallikler, klinik bulgulardan sonra tedavi yanıtı ve hastalık izlemi için önem taşır. KF'deki pulmoner alevlenmenin tanı ve tanı kriterlerinde kesin kabul edilen ortak bir fikir birliği yoktur [8]. Bu nedenle hastalığın pulmoner alevlenme dönemleri ile remisyon dönemlerindeki olası biyokimyasal değişiklikleri saptayabilmek ve mekanizmasını anlamak, hem pulmoner alevlenmeyi tanımlama ve ayırt etmek ile ilaç tedavisinin takibinde hem de ilaç araştırmalarında yeni hedeflerin ortaya konmasında önemli olabilir.

Hücre zarı esas olarak sfingolipit, kolesterol ve gliserofosfolipitlerden oluşur. Sfingomyelinaz (SMaz)'lar sfingomyelin (SM)'i hidroliz ederek seramid (SER)'i oluşturur. Sağlıklı akciğerde sfingomyelin, asidik SMaz (aSMaz) ile SER'e dönüşürken, oluşan SER de asit seramidaz ile sfingozine dönüşmektedir. KF hastalarında, solunum yollarındaki aşırı mukus üretiminin sorumlusu olarak SER metabolizmasındaki değişimlerin önemli olduğu düşünülmektedir [9, 10]. KF'de aSMaz-SER disregülasyonu olduğu ve bunun kronik *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) infeksiyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [11]. KF'de sfingolipit metabolizması bozulmaktadır ancak, bu konuda yapılan araştırmaların birbiriyle çelişen yönleri vardır. KF'li insan ve hayvan solunum yolları epitel hücreleri veya akciğer dokularında SER düzeyleri çoğu çalışmada yüksek bulunmuş olsa da [12-16], normale göre düşük bulan çalışmalar [17, 18] da mevcuttur. SER'in fonksiyonları, dokuda birikimi veya plazmada düşüşü gibi bulguların mekanizması tam aydınlatılmadığı gibi, hangi SER türünün, hangi patofizyolojik süreçte ve nasıl rol aldığı bilinmemektedir.

YKL-40, glikozil hidrolaz ailesine ait kitinaz 3-benzeri protein 1 veya insan kıkırdak glikoproteini-39 (HcGP-39) olarak adlandırılan bir proteindir. Makrofajlar, kondrositler ve bazı kanser hücreleri tarafından salgılanır. Kronik inflamasyon, doku yenilenmesi ve hücre büyümesinde rol aldığı düşünülmektedir. YKL-40'ın aktif bölgesindeki mutasyondan dolayı kitinaz aktivitesi yoktur. Fizyolojik rolü henüz tam bilinmemektedir. Fakat inflamatuvar hastalıklarda rolü olduğu düşünülmektedir. KF hastalarında arttığını bildiren yayınlar vardır [19-21].

Kitin, 1,4- N-asetil glukozamin yapı taşından oluşan bir glikopolimerdir. Diğer adı glikozil hidrolaz olan kitinaz enzim ailesi ise, kitin ve kitin benzeri proteinlerin yıkımından sorumlu 18 üyeye sahiptir. Bunlardan insanda bulunanlar; kitotriozidaz, asidik memeli kitinaz, oviduktin, HcGP-39/YKL-40 ve YKL-39'dur. Kitotriozidaz, kitinaz protein ailesinin 18 üyesinden biridir ve aktif makrofajlardan salgılanarak kitini hidrolize eder. Araştırmalar kitotriozidaz aktivitesinin immün yanıtla ilişkili olduğunu desteklemektedir. Aktif nötrofiller kitotriozidaz enzimini ekstrasellüler sıvı ortamında açığa çıkarırlar. İnterferon-gama (IFN- γ) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ile aktive olan makrofajlardan salındığı için inflamatuvar bir protein olarak

değerlendirilebilir. Akut inflamatuvar fazda saptanmaz, bu nedenle kronik inflamatuvar yanıtta değerlendirilmelidir [22].

Bu çalışma ile KF tanısı almış çocuk ve erişkin hastalardan; pulmoner alevlenme endikasyonu ile servise yatırılıp yapılan hastaların alevlenme, antibiyotik tedavisi sonrası taburculuk ile taburcu olduktan sonra ilk 3 ay içinde kontrole geldikleri dönemde alınan tam kanlarından elde edilen plazmalarda, hastalık seyri boyunca, sfingolipit metabolizmasını anlamak ve inflamasyon düzeyini değerlendirmek amacıyla SER, SM, YKL-40 düzeyleri ile kitotriozidaz aktivitelerinin ölçülmesi ve sonuçların sağlıklı bireylerle kıyaslanması planlanmıştır. Böylece literatürden farklı olarak araştırmaya ilk kez hem çocuk hastalar dahil edilmiş hem de hastaların 3 farklı klinik sürecini değerlendirerek KF'deki sfingolipit metabolizması ve inflamatuvar biyobelirteçlerle olan ilişkisini daha iyi anlamak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kistik Fibrozis

2.1.1.Kistik Fibrozis ile İlgili Genel Bilgiler

KF, özellikle çocukları, giderek artan bir oranda erişkinleri de etkileyen multisistemik bir hastalıktır [23]. KF'deki esas morbidite ve mortalite nedeni, hava yollarındaki şiddetli obstrüksiyon, infeksiyon ve kronik inflamasyonun kısır döngüsü ile karakterize olan akciğer değişiklikleridir [24].

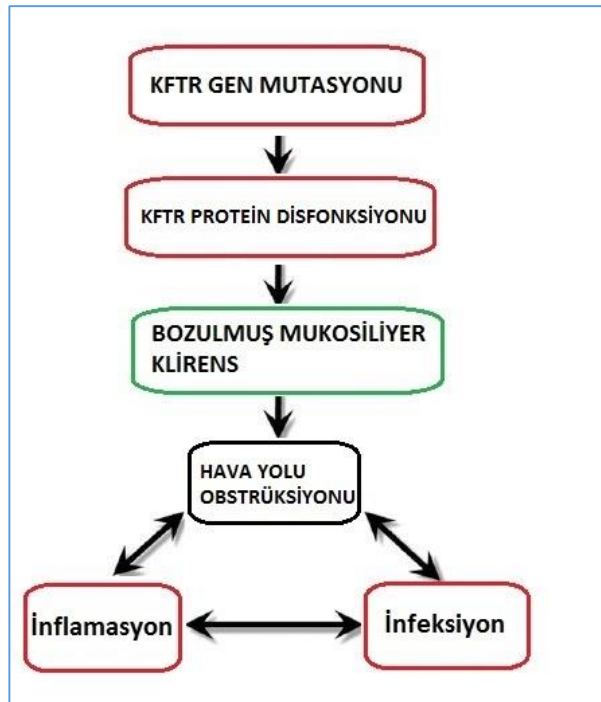
Çocukluk ve erken gençlik çağının ekzokrin pankreas yetmezliğinin ve bu yaş gruplarındaki nazal polip, pansinuzit, rektal prolapsus, non-ketotik insülin bağımlı hiperglisemi ve biliyer sirozun çoğunun sorumlusudur [25].

KF'in literatüre yayılması, 1650 başlarında, mekonyum ileusu olan yenidoğanlarla, karakteristik pankreas ve akciğer tutulumları olan çocuklara yönelik sayısız referanslarla başlamıştır [25]. Ancak ilk kez 1930'ların sonlarında belirgin bir klinik durum olarak tanımlanmıştır. 1938'de hastalık ilk rapor edildiğinde solunum yolları ve gastrointestinal sistem (GİS)'de bol miktarda visköz mukus gözlemlendiğinden hastalık ilk aşamada mukoviskozidozis olarak isimlendirilmiştir [26].

1949'da Lowe ve ark. KF'in OR kalıtımına dayanarak, hastalığın tek bir gen, dolayısıyla tek bir proteindeki defektten meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir [27]. Moleküler mekanizmanın karakterizasyonu ve bu proteinin tanımlanması için girişimlerde bulunulmuştur [28]. Quinton, KF hastalarının terlerindeki yüksek tuz miktarı ile ter bezlerindeki sıvı ve elektrolit transportundaki anormalliği ortaya koymuş, bu hastaların ter bezi kanallarının Cl^- 'e geçirgen olmadığını tespit etmiştir [29]. KF hastalarının havayolu epitel ve nazal epitel hücrelerinde yapılan araştırmalar, membran patch-clamp analizleri akciğerlerdeki plazma membran Cl^- geçirgenliğinde defekt olduğunu kesin bir şekilde kanıtlamıştır [30-33]. Dünya çapında birçok laboratuvar tarafından doğrulanan bu bulgular, akciğer yüzeyindeki apikal membran veya glandular epiteldeki defektif Cl^- kanallarının, KF'deki solunum yetmezliği ve diğer klinik bulguları açıklayabileceği hipotezine yol açmıştır [28]. KF'deki anormal Cl^- transportu keşfedildikten sonra, Collins, Riordan, Tsui ve ark. KF proteini yapısındaki herhangi bir ön bilgidен bağımsız olarak, hastalığa neden olan geni tespit

etmişlerdir [34-36]. Yapılan ölçümler sonucu, tahmin edilen protein dizisi, diğer iyon kanallarına benzemediği için bu gen ürünü KFTR olarak adlandırılmıştır [28]. KFTR, birçok organın epitel hücrelerinin apikal membranında cAMP bağımlı bir iyon kanalı olup, doğrudan Cl^- taşınmasında rol oynar. Cl^- haricinde Na^+ ve HCO_3^- transportunda da rol oynar [4, 5].

KF; KFTR proteini kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Şimdiye kadar 1500'den fazla KFTR mutasyonu tanımlanmıştır [37]. KFTR'deki yapısal ve fonksiyonel bozukluk sonucunda akciğer, karaciğer, pankreas, bağırsaklar, ter bezleri, vas deferens ve epididim gibi çeşitli organların epitel membranında iyon transportu bozulur [5]. Bunun sonucunda sekresyonların niteliği değişir. Dehidratasyona bağlı mukus viskozitesi artar, bu da duktuslarda obstrüksiyonlara sebep olur. Hiperviskoz materyal bakteri kolonizasyonuna zemin hazırlayarak, inflamasyon ve infeksiyonla sonuçlanan kısır döngüye neden olur (Şekil 2.1.) [6].



Şekil 2. 1. KF patofizyolojisi

2.1.2. Pulmoner Semptomlar

KF'li infantların akciğerleri doğumda normal görünür ancak, hızla infekte olur. *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) veya her ikisi ile birlikte hızlıca kolonize olurlar. Kısa bir süre içinde, hava yollarında *P. aeruginosa* baskın organizma haline gelir [38]. Enfeksiyonun çok hızlı bir şekilde oluşmasıyla birlikte, patojenlere verilen inflamatuvar yanıt da oldukça şiddetlidir [39]. Kronik hava yolu enfeksiyonu, bronşektazi, hava hapsi, hipoksemi ve hiperkarbi KF akciğerinin özellikleridir. Pulmoner yetmezlik KF'a bağlı ölümlerin yaklaşık %80'ini oluşturur [7].

İnatçı enfeksiyon, hava yollarına çok sayıda polimorfonükleer (PMN) hücre toplayan kemotaktik sitokinlerin üretilmesine ve salınmasına yol açar. *P. aeruginosa*, PMN hücrelerdeki kritik yüzey belirteçlerini parçalayan elastaz ve toksinleri serbest bırakarak enfeksiyon döngüsünü güçlendirir. Bu hücreler daha sonra kendi proteaz ve elastazlarını serbest bırakarak, ortamdaki diğer PMN hücrelerin hasarını arttırmaları. Hasar gören nötrofiller ve bakteriyel endotoksinler daha fazla PMN hücrenin toplanmasını sağlar ve böylece daha fazla inflamasyon ve doku hasarı meydana gelir. Yaşlanan PMN hücrelerden salınan deoksiribonükleik asit (DNA) ise balgam viskozitesini artırır [40].

Hava yolu serbest ve bağlı nötrofil elastazı, KF'li infantlarda çok erken tespit edilebilir ve yaşamın ilerleyen döneminde bronşektazinin gelişimini öngörür [41].

Hava yolu ve yüzey mukus tabakası kişiden ve çevreden gelen sinyallere yanıt olarak sürekli değişen dinamik ve karmaşık bir yapıdır. Hava yolu mukusunun başlıca işlevleri; patojenleri mukosilyer aktiviteyle temizlemek ve gerektiğinde toksik endojen ve ekzojen ürünlere karşı koruyucu bir bariyer sağlamaktır. Mukus tabakası, partikül ve patojenlerin atılmasını sağlamak için yeterince sıvı içermeli, koruyucu bariyer fonksiyonunu sağlayabilmek için de bol miktarda ve yapışkan özellikte olmalıdır [40].

KF'deki hava yolları hastalığının patogenezi çeşitli hipotezlere dayandırılmıştır. Bu hipotezlerin 3 tanesi, KFTR mutasyonu sonucunda havayolu yüzey sıvısı içeriğinin pH'ının, oksijenizasyonun veya iyonik içeriğinin değiştiği yönünde kurulmuştur.

Yüksek tuz hipotezine göre, normalde havayolu yüzey mukusunda düşük olması gereken sodyum klorür (NaCl) miktarı KF'de yüksektir. Bu ortam, defensin gibi endojen antimikrobik maddelerin aktivitesini inhibe eder [42-44]. Ayrıca defektif KFTR nedeniyle havayollarının Cl^- emilimi bozulmuştur. Bu hipoteze göre normal bireylerin hava yollarında düşük (<60 mM) olan Cl^- miktarı KF hastalarında yüksektir (>100 mM) [44].

Düşük pH hipotezine göre ise, KF'deki KFTR mutasyonundan dolayı HCO_3^- transportu bozular. Cl^- içeri alınmadığından HCO_3^- dışarı verilemez. Böylece hava yolu yüzey mukusu anormal asidik hale gelir. Bu durum mukosilyer klirens mekanizmasını inhibe etmektedir [44, 45].

Düşük oksijenlenme hipotezine göre, KF'deki hava yolu epitel hücrelerinin oksijen tüketimi artmış ve hava yolu yüzey mukusunun oksijen difüzyon kapasitesi azalmıştır. Bu durum, *P. aureginosa* kolonizasyonu ile biyofilm oluşumunun kolaylaşması ve bozulmuş mukosilyer klirens ile sonuçlanır [46].

Düşük hacimli hava yolu yüzey mukusu hipotezine göre, KF'deki epitelyal Na^+ kanalları (ENaC) hiperaktivite göstererek, Na^+ hiperabsorbsiyonuna sebep olur. Dehidrate ve visköz hale gelen hava yolu yüzey mukusu, mukosilyer klirensin bozulması ve bakteri adheransının kolaylaşmasına sebep olur [44, 47].

Kusurlu bez fonksiyonu hipotezine göre ise, KF'deki primer defekt, hava yolu submukoza bezlerinin miktarı azalmış ve içeriği değişmiş olan sekresyonudur [44, 48-50]. Su ve Na^+ 'un salınmamasına bağlı olarak sekresyon sıvısının volümü azalmış, protein konsantrasyonu ve viskozitesi artmıştır. Bu hipotezi destekleyen en önemli bulgu ise glandular asinusları döşeyen seröz epitel hücrelerinin, solunum yolları ve akciğerdeki diğer dokulara göre çok daha fazla KFTR eksprese etmesidir [51].

KF'deki pulmoner semptomlarla ilgili bu hipotezler birbirini dışlamadığı gibi, paralel ve birbiriyle ilişkili olarak işliyor da olabilir.

2.1.3. Gastrointestinal Semptomlar

KFTR geni tüm GİS'de eksprese edildiği için, KFTR fonksiyon kaybına bağlı pankreas ve bağırsak tutulumu fetal yaşamın başında bulgu verir [4]. KF'li infantların

yaklaşık %13-17'si, ince ve kalın bağırsaklardaki koyulaşmış materyale sekonder mekonyum ileusu ile doğarlar [52]. Uterus içindeyken bile KF'li infantlar, mukoprotein, albümin, kalsiyum düzeyleri yükselmiş, su içeriği azalmış hipervisköz bir mekonyum ile karakterizedir. Çünkü HCO_3^- salınım defekti bağırsak lümenini daha asidik ve dehidrate hale getirir [53, 54].

Mekonyum ileusu basit ve kompleks olmak üzere sınıflandırılabilir. Basit tipte anormal özellikteki hipervisköz mekonyum ince barsak lümenini tıkar. Tıkanıklığın proksimalinin çapı artmıştır, gaz ve sıvı içerir [55]. Kompleks tip ise peritonit, volvulus, nekroz, perforasyon veya psödokist oluşumu gibi daha tehlikeli durumlarla sonuçlanabilir [56].

Distal intestinal obstrüksiyon sendromu (DIOS) ve kabızlık KF'de herhangi bir yaşta meydana gelebilen ve bebeklerdeki mekonyum ileusu ile benzer mekanizmaya sahip olduğu düşünülen komplikasyonlardır [57,58]. Yoğunlaşmış intestinal sekresyonlar, malabsorbsiyon ve azalmış barsak motilitesi altta yatan sebeplerdir [59].

İntestinal inflamasyon da DIOS gelişiminde doğrudan veya indirek olarak bağırsak hareketlerini azalttığı için önemli rol oynar. Mezenterik gangliozit ve miyozit intestinal dismotilite sebeplerindendir [52]. DIOS ayrıca KFTR sınıf 1 ve 3 mutasyonu olan hastalarda, muhtemelen pankreatik yetmezliğin daha ağır olmasından dolayı daha sık görülmektedir [60].

Kabızlık haftalarca sürebilir. Barsak hareketleri azalmıştır. Karın ağrısı, distansiyon ve yoğunluğu artmış gayta ile karakterizedir. Laksatiflerle semptomlar geriler [61]. Kabızlık, herhangi bir genotiple ilişkili değildir. Pankreatik yetmezlikle ise ilişkisi tartışmalıdır [60].

KF'li hastaların yaklaşık %90'ı gastroözefageal reflüden (GÖR) etkilenir [62]. Gecikmiş gastrik boşalma ve zayıf alt özefageal sfinkter altta yatan sebeplerdir. Öksürük semptomları daha da arttırır [63].

KF'in bir diğer intestinal komplikasyonu da karın ağrısı ve şişkinlikle sonuçlanan aşırı intestinal bakteri çoğalması durumudur. Uzun dönem geniş spektrumlu oral veya IV (intravenöz) antibiyotik alan hastalarda genellikle *Clostridium difficile* 'ye bağlı ishaller sık görülür [63].

Yakın zamanda, KF popülasyonunda GİS sistem boyunca malignite prevalansının arttığı tespit edilmiş, bu durum artmış kolonik polip prevalansı ile ilişkilendirilmiştir [64].

Ekzokrin pankreas yetmezliği ise KF'li hastaların %90'ında mevcuttur. Pankreatik yetmezlik KF genotipiyle (özellikle sınıf 1 ve 3 KFTR mutasyonları) de ilişkili bulunmuştur [65].

Pankreas yetmezliğinin, pankreatik sekresyonun düşük HCO_3^- konsantrasyonu içermesi ve volümünün az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yeterli pankreatik sıvı ve HCO_3^- olmadığı için, sindirim proenzimleri pankreatik kanallarda kalarak erken aktifleşir ve böylece doku tahribatı ve fibrozisine neden olur [66]. Pankreatik yetmezliğin tipik bulguları; steatore, gaz, abdominal şişkinlik ve yetersiz kilo alımıdır. Steatoreden dolayı, yağda çözünen vitaminlerin eksikliği ve malnutrisyon meydana gelir [7]. KF'in ilk tanındığı 1938'lerde malnutrisyondan dolayı, hastaların yaşam beklentisinin sadece aylarla sınırlı olduğu belirtilmiştir [67].

KF ilişkili diyabet ise KF'in en sık görülen ekstrapulmoner komplikasyonudur [68]. Bu durum, pankreatik yetmezliğe neden olan tahribat ve fibroze bağlı olarak adacık hücrelerinin zarar görmesi ve insülin salınımının azalmasından kaynaklanmaktadır [69].

KF'i olan hastalar aynı zamanda, intrahepatik safra yollarının obstrüksiyonuna bağlı fokal biliyer siroz açısından risk altındadır. Genellikle 15 yaş civarı hastaların %5'inde siroz ortaya çıkar [59]. Klinik prezentasyonu genellikle hepatosplenomegali ve portal hipertansiyondur. Portal hipertansiyonu olanlarda asit görülebilir, özefageal varis kanamaları hayatı tehdit edici olabilir [70].

2.1.4. Kistik Fibrozis Geni

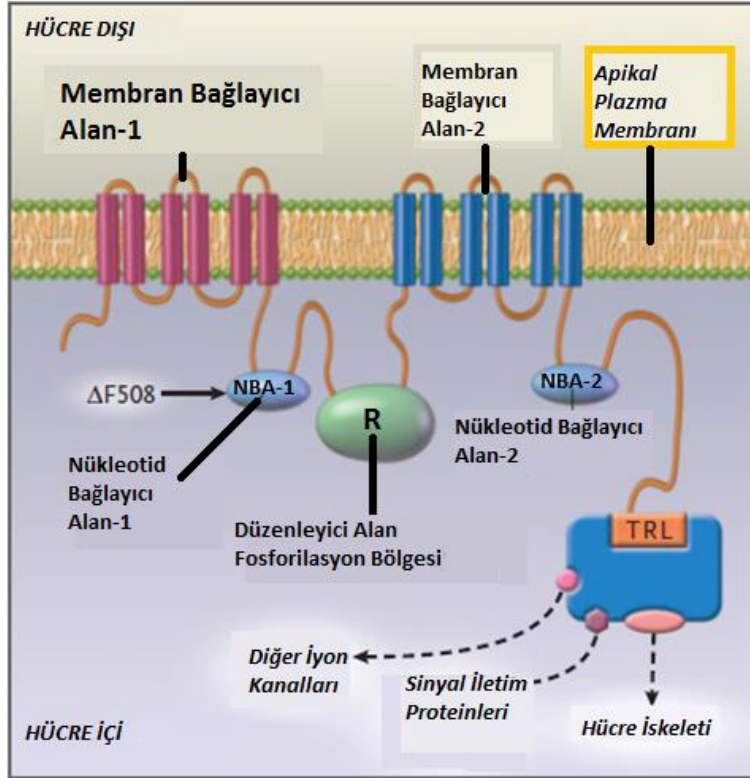
İnsan KF geni, 1989'da klonlanmış ve KFTR geni olarak adlandırılmıştır [34, 36]. Kromozomu 7q31.3'de lokalizedir [71]. 27 ekzon içeren, 250 kbazlık genomik DNA'yı kapsar [72]. mRNA ise 6.2 kbaz olup 1480 amino asitlik KFTR genini kodlar [34]. Bazı farklı dokularda mRNA'nın alternatif bağlanmaları olduğu kaydedilmiştir [73] ancak, bu alternatif bağlanma ürünlerinden herhangi birinin fizyolojik rolü bilinmemektedir [74].

2.1.5. KFTR Proteini

KF; KFTR proteinindeki şiddetli fonksiyonel eksiklikten kaynaklanır [34]. KFTR; en çok mukustan ve diğer proteinlerden zengin sıvı sekrete eden dokuların silindirik hücre hatlarını oluşturan epitelyal hücrelerin apikal membranlarında bulunur. Hava yolları, KFTR'nin en yüksek düzeylerde eksprese edildiği dokulardan biridir [75]. Epitelde tuz ve su hareketi için KFTR oldukça önemli bir role sahiptir [76].

KFTR proteini, fonksiyonu adenosin trifosfat (ATP) bağımlı kanal gibi olan, ABC transporter süper ailesinin bir üyesidir. ABC proteinlerinin büyük çoğunluğu ATP bağımlı işlev gören aktif transporterlar olup, transmembran proteinleridir [77]. ABC proteinleri, küçük iyonların, amino asitlerin, şekerlerin, ilaç ve proteinler gibi metabolitlerin transportu ile sinyal iletimi, protein sekresyonu ve antijen sunumu için gereklidir [78, 79]. Bu ailedeki mutasyonlar insanda KF [34], Stargardt makuler distrofisi [80] ve Tangier hastalığı gibi [81] birçok hastalığa sebep olur. ABC proteinleri ayrıca, bakteriyel antibiyotik direnci ve başarısız kemoterapideki rolleriyle de hastalıkları indirekt olarak destekler [82].

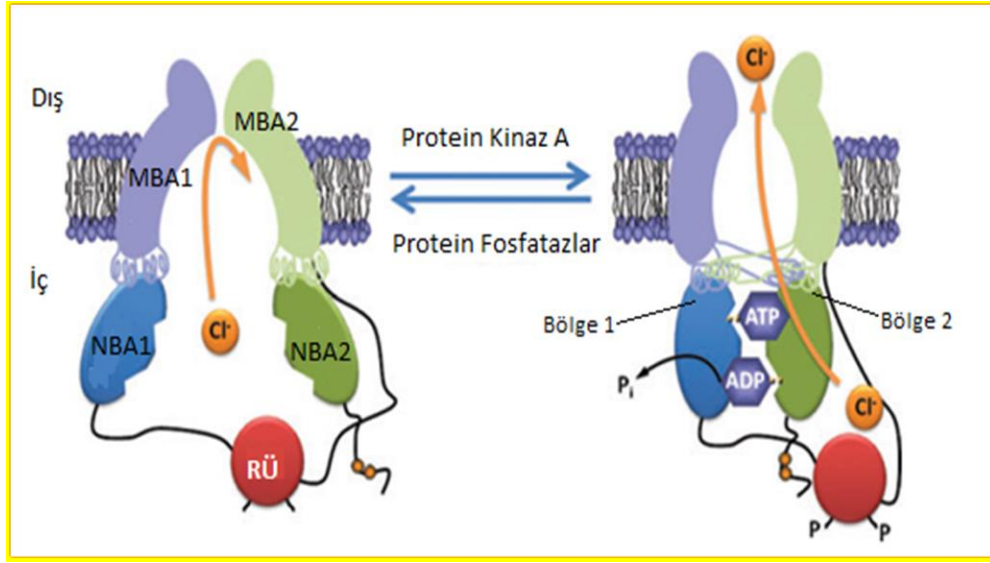
KFTR proteini yapısal olarak ABC transporterlara benzer ancak, fonksiyonel olarak farklıdır [83]. Porları çok selektif olmasa da, epitelyal apikal hücre membranlarında bulunur [84-86]. ABCC7 olarak da bilinen KFTR proteini, 1480 amino asit içeren geniş bir proteindir. ABC kanallarından B ailesi içinde olup, tipik ve benzersiz bir mimari taşır. Her biri 2'şer tane 6 transmembran heliks, membran bağlayıcı alan (MBA) içerir ve bunları nükleotid bağlayıcı alan (NBA) takip eder. Bu iki yapı heterodimerik organizasyonu (MBA1–NBA1 ve MBA2–NBA2) meydana getirmek için birbirleriyle kaynaşmışlardır. Ayrıca KFTR proteini, 195 amino asitten oluşan ve regüle edilebilir ünite (RÜ) adı verilen eşsiz bir üniteye sahiptir. Bu ünite proteinin 2 yarımını N-terminal ve C-terminal uzantıları aracılığıyla birbirine bağlar (Şekil 2.2.) [77].



Şekil 2. 2. Apikal plazma membranındaki KFRTR'nin yapısı [28].

RÜ; protein kinaz A (PKA) ve protein kinaz B (PKB)'nin hedefi olan birçok fosforilasyon ünitesi içerir ve Cl^- kanal trafiğiyle kapı kontrolünü sağlar [77]. Cl^- kanallarının açılması için, RÜ'nin cAMP bağımlı PKA ile fosforile olması gereklidir [76]. KFRTR aktivitesinin protein kinaz ve fosfatazlar tarafından kontrolü oldukça karmaşıktır. KFRTR fosforilasyonu farklı kinazlar tarafından da yapılabilir. Örneğin; aktivasyonun siklik guanozin monofosfat (cGMP) bağımlı protein kinaz 2 ile [87], inhibisyonun adenosin monofosfat-aktive protein kinaz ile [88], çift taraflı etkinin ise PKA ve protein kinaz C (PKC) ile olduğu gösterilmiştir [89, 90].

NBA'lar, dimer arayüzlerinde iki ATP bağlayıcı ünite ile baş-kuyruk dimerinden oluşur [91]. ATP, ATP-bağlayan bölgeye sıkıca bağlanır (Bölge 1), fakat hidrolizi bu bölgede olmaz. Aksine, hidroliz diğer ATP-bağlayan bölgede (Bölge 2) olur [92, 93]. KFRTR'nin porlarından anyon geçişinin, ATP'nin bölge 1 ve 2 deki etkileşimlerinin NMD dimerizasyonunu sağlaması ve böylece MBA'larda meydana gelen konformasyonel değişiklikler sayesinde gerçekleştiğine inanılmaktadır (Şekil 2.3.) [93].



Şekil 2. 3. KFTR'nin Cl^- transportu sırasındaki konformasyonel değişiklikleri [76].

KFTR'ye hücreSEL çok fazla fonksiyon yüklenmiştir. Özellikle ENaC'larda transepitelyal Na^+ transportu [30, 94] ile kalsiyumla aktive olan Cl^- ve potasyum kanallarının regülasyonunu sağlar. Ayrıca plazma membranındaki kompleks moleküllerin formasyonu ile ekzositozda önemli fonksiyonlarda rol alır [28]. KFTR'nin ekstrasellüler mukus özelliklerinde etkili olan HCO_3^- kanalı olarak işlev gördüğü ve $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ kotransportunu düzenlediği de gösterilmiştir [95, 96].

KFTR geninin 1500'den fazla mutasyonu tespit edilmiştir, ancak az bir kısmının fonksiyonel önemi bilinmektedir [7]. Mutasyonlar, tüm ekzonlarda ve yanındaki intron sekanslarında sessiz mutasyon, anlamsız mutasyon, çerçeve kayması, bağlantı noktası mutasyonları ile amino asit delesyon ve yer değiştirme mutasyonlarını kapsar. KF geninde, dünya genelinde %70 oranında en sık görülen mutasyon 508. pozisyondaki fenilalanin delesyonudur (ΔF508) [97]. ΔF508 mutasyonu, NBA1'in yüzeyinde meydana gelir [28]. Mutasyonun tipi genelde KFTR fonksiyonu için belirleyici değildir.

KFTR mutasyonları genel olarak 5 sınıfa ayrılabilir [98].

Sınıf 1: Gen mutasyonu sonucu intakt KFTR proteini ürünü oluşmaz (sessiz, çerçeve kayması veya eklenme mutasyonu).

Sınıf 2: Mutasyonlar (ΔF508 dahil), post-translasyonel aşamayı interfere eder. Protein maturasyonunda defekt ve erken bozunma vardır [28]. KFTR proteinleri, çoğu fonksiyonunu koruyor olmasına rağmen, apikal membrana ulaşamazlar [98, 99].

Sınıf 3: Bu gruptaki mutant KFTR proteinleri, apikal hücre yüzeyinde yerleşmişlerdir, ancak cAMP stimülasyonuna yanıt vermezler [98]. ATP'nin bağlanma ve hidrolizi gibi düzenleyici basamaklarda defekt vardır [28].

Sınıf 4: Apikal membrana ulaşan proteinler, cAMP aracılı Cl⁻ akışını sağlarlar. Ancak, akım miktarında azalmayla sonuçlanmış kanal değişiklikleri meydana gelmiştir [98].

Sınıf 5: Anormal eklenme veya kusurlu işlemlerden dolayı, KFTR'nin normal fonksiyonuna göre azalmış sentez mevcuttur. Sınıf 4 ve 5'deki mutasyonlar pankreatik yetmezlikle kuvvetli bir ilişkiye sahiptir [98].

Sınıf 6: Hücre yüzeyinde artmış turnover vardır [28].

2.1.6. KF'in Tanısı

KF tanısı, klinik olarak tipik fenotipik özellikler ile laboratuvar doğrulamasının kombinasyonunu gerektirmektedir [37]. 1996'da Kistik Fibrozis Vakfı (CFF) Paneli; KF tanısının, Tablo 2.1.'deki klinik özelliklerden bir veya daha fazlasının mevcudiyeti ile birlikte, kardeş öyküsü ve pozitif yenidoğan tarama testinin yanısıra, KFTR gen veya proteinindeki anormalliğin laboratuvar kanıtına dayanması gerektiğini tavsiye etmiştir [37, 100]. KF tanısıyla uyumlu fenotipik özellikler Tablo 2.1.'de listelenmiştir [100].

Tablo 2. 1. KF tanısıyla uyumlu fenotipik özellikler

Kronik sinopulmoner hastalık
<i>S. aureus</i> , sınıflandırılmayan <i>H. influenzae</i> , mukoid ve nonmukoid <i>P. aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ve <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>B. cepecia</i>)' yı içeren, tipik KF patojenlerinin neden olduğu hava yolu inflamasyonu
Kronik öksürük ve balgam üretimi
Tekrarlayan anormal göğüs radyografileri (örn: bronşektezi, atelektazi, infiltrasyon ve hiperinflasyon)
Wheezing ve hava hapsi ile karakterize hava yolu obstrüksiyonu
Nazal polipler, paranasal sinüslerin radyografik veya bilgisayarlı tomografi anormallikleri
Parmaklarda çomaklaşma
Gastrointestinal ve beslenme anormallikleri
İntestinal: mekonyum ileusu, DİOS, rektal prolapsus
Pankreatik: pankreatik yetmezlik, tekrarlayan akut pankreatit, kronik pankreatit, pankreas görüntülemelerinde anormallikler
Hepatik: uzamış yenidoğan sarılığı, kronik biliyer siroz veya multilobuler sirozun klinik veya histolojik bulgularıyla karakterize kronik karaciğer hastalığı
Beslenme: gelişme geriliği (protein-kalori malnutrisyonu), hipoproteinemi ve ödem, yağda çözünen vitaminlerin eksikliğine bağlı sekonder komplikasyonlar
Tuz kaybı sendromları: akut tuz tükenmesi, kronik metabolik alkaloz

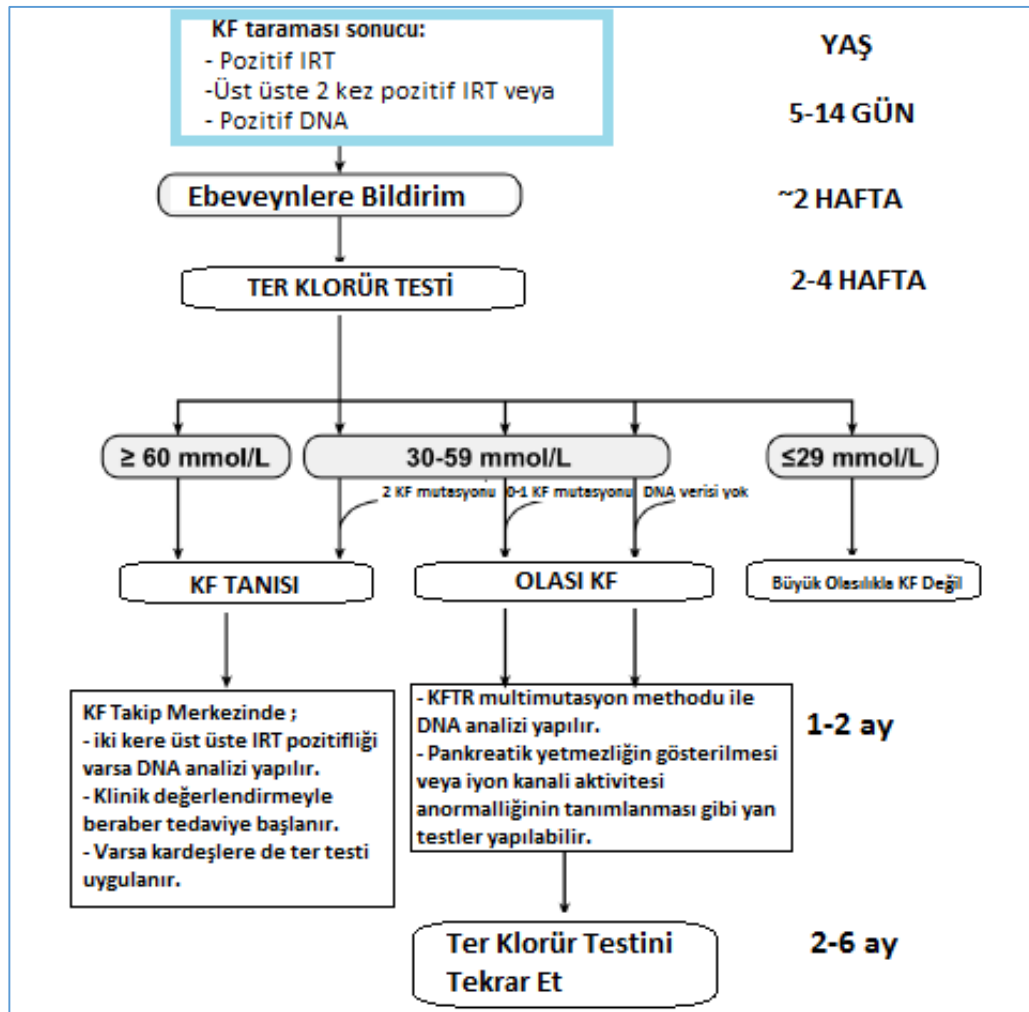
2.6.1.1. Yenidoğan Taraması

ABD'de Colorado, 1982'de KF için yenidoğan taramasını uygulamaya başlayan ilk eyalet olmuştur [101]. Yenidoğan taramaları sayesinde, çoğu Colorado ve Wisconsin'den gelen tarama programları verilerine göre, erken tespitin faydaları raporlanmıştır. Bunun üzerine 2004'de Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi ile CFF, KF için yenidoğan taramasının klinik faydalarını destekleyen bir rehber yayınlanmıştır [102].

Ülkemizde 01.01.2015 tarihinden itibaren KF taraması yenidoğan tarama programına eklenmiştir.

KF için tüm yenidoğan tarama yöntemleri, yenidoğan infantlardan toplanmış kuru kan örneklerinde immunreaktif tripsinojen (IRT) ölçümü ile başlar. IRT, pankreas

hasarının biyobelirteci olarak görev alan, pankreatik enzim prekürsörüdür. IRT, KF'de inutero pankreas kanalları tıkanığında en çok KF'i olan yenidoğanlarda artar. Yüksek IRT değeri belirlendikten sonraki aşama, ya DNA mutasyon analizi (IRT/DNA) yapmak ya da ikinci IRT (IRT/IRT) değerinde de aynı yüksekliğin kalıcı olup olmadığını saptamaktır. En az bir KFTR mutasyonu ile inatçı yüksek IRT değerleri olan infantlarda doğrulayıcı ter testine ihtiyaç duyulur. Böylece ter testi, KF tanısı ve yenidoğan tarama sürecinin tamamlanmasında temel rol oynar [37]. CFF Konsensus Komitesi detaylandırılmış bir algoritma yayınlamıştır (Şekil 2. 4.) [103].



Şekil 2. 4. Yenidoğan taramasında KF tanı algoritması [103].

2.1.6.1. Ter Testi

1959'da kurulmuş olan Gibson-Cooke metodu olarak bilinen prosedür standardize edildiğinden beri, ter elektrolit konsantrasyonları ölçümü, KF tanısı için temel dayanak noktası olmuştur [104]. Ter testi, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü tarafından da tanımladığı gibi; iyontoforez aracılığı ile transdermal pilokarpin uygulaması ve ter bezlerinin sekresyonunun stimüle edilmesi ile başlar. Ardından terin toplanması, gazlı bez, filtre kağıdı ya da Macroduct ter toplayıcı ile kantitasyonu ve Cl^- konsantrasyonu analizi işlemlerini kapsar [105]. Ter Cl^- değerinin 60 mmol/L den yüksek olması geleneksel olarak KF tanısını düşündürür. Fakat KF tanısı olup da daha düşük ter Cl^- düzeyleri olan bireyler ile başlangıçta terde Cl^- düzeyleri 60 mmol/L'nin altında olup, yenidoğan tarama programı sonucunda KF tanısı alan yenidoğanlar da vardır [37]. Bu bulgular referans değerlerin tekrar güncellenmesini sağlamıştır [103]. 6 aydan küçük bebeklerde ter Cl^- değeri 29 mmol/L'den düşük/eşit olduğunda veya 6 aydan büyük bebeklerde ter korür değeri 39 mmol/L'den düşük/eşit olduğunda KF'in pek olası olmadığı düşünülmektedir. Ara sonuçları olan bireyler (6 aydan küçük bebeklerde 30–59 mmol/L, 6 aydan büyük bebeklerde 40–59 mmol/L) ek bir değerlendirmeye tabi tutulmalı ve KF tanısında uzmanlaşmış bir KF bakım merkezine sevk edilmelidir [37].

2.1.6.2. KF Genotiplemesi

KF'i olan hastaların birçoğunda, ter Cl^- testi en iyi tanı testi olmaya devam etmektedir. Fakat, ter Cl^- düzeyleri ara değerde olan bireyler için de DNA analizi tanıda yardımcı olabilir [103]. Bunun yanısıra, KF tanısı almış olan bazı erişkin bireylerin ter Cl^- düzeyleri düşüktür. CFF kayıtlarındaki 53 çalışmanın sonuçlarına göre, KF tanısı almış erişkinlerin %13,85'inin ter Cl^- düzeyleri <60 mmol/L'dir [103]. Ter Cl^- düzeyleri normal ancak, KF'i destekleyen bulguları güçlü olan bireylerde de genetik test uygulanmalıdır. Çünkü bu bireylere nadiren de olsa KF tanısı konulabilir [37]. Bu nedenlerden dolayı, ter Cl^- analizi her zaman KF tanısı için tek başına yeterli olmayabilir.

KF genotip bilgisinin analizi ve yorumu uygun test tekniklerinin kullanımını gerektirmektedir. KFTR mutasyonları, KF'e neden olan mutasyonların tanımlanması

ve KF'in fenotipik çeşitliliğine, genotipik altyapısının etkisini anlamak amacıyla standardize edilmiştir. Genomik DNA'da saptanan 2 veya daha fazla KFTR mutasyonunun, 2 ayrı kromozomda trans üzerinde veya aynı kromozom üzerinde cis'de yer alabileceği unutulmamalıdır. İkinci durum genellikle hastalıkla ilişkili değildir. Çoğu ticari laboratuvarında bu ayırım yapılmaz, bu nedenle trans düzenin geçerli olduğu varsayılır. KF mutasyonlarını saptamak zor bir süreçtir [103]. KFTR mutasyonlarının saptanma oranı mutasyon paneli, test metodu ve etnik geçmişe bağlı olarak değişir [37]. Halen mevcut mutasyon tarama panelleri KFTR mutasyonlarının %90'ını tanımlayabilse de, CFF hasta kayıtlarındaki genotiplendirilmiş bireylerin %9,7'si en az bir tanımlanamayan mutasyona sahiptir [103]. Piyasadaki mevcut sekans testleri yalnızca genin kodlama bölgesi ve hemen bitişik intron dizileri hakkında bilgi sağlar. Büyük delesyonlar, insersiyonlar ile RNA sıralaması veya transkripsiyonel mutasyonlar kolayca tanımlanamaz. KF mutasyonlarının belirlenmesi bazı popülasyonlarda daha zorlayıcıdır. Örneğin; İspanik, Afrika veya Asya kökenli popülasyonlarda KF'e neden olan mutasyonların doğası, dağılımı ve sıklığı Kafkas ırkına göre belirgin farklılık gösterir. Bu nedenle Kafkas ırkının popülasyonu veya prenatal taraması için geliştirilen ve Amerikan Tıp Genetiği Koleji tarafından önerilen KFTR mutasyonlarını tarama paneli Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 2. Tavsiye edilen KF tarama paneli [103, 106].

Yanlış anlamlı (kayıp) , silinme ve anlamsız mutasyonlar			Eklenme ve çerçeve kayması mutasyonları	
G85E	I507del	R560T	62I+IG>T	2789+5G>A
R117H	F508del	R1162X	711+IG>T	3120+IG>A
R334W	G542X	W1282X	1717-IG>A	3659delC
R347P	G551D	N1303K	1898+IG>A	3849+10kbC>T
A455E	R553X		2184delA	

Genotip saptansa bile, KFTR mutasyonlarının çoğunun sonuçları bilinmemektedir. Mutasyon basitçe genin normal kabul edilen dizisinde ve kontrol elemanlarında meydana gelen değişikliktir. KF nedeni olarak düşünülebilmesi için mutasyonun bazı özelliklere sahip olması gerekir. Amino asit diziliminde yaptığı

değişiklikle, KFTR sentezini ve fonksiyonunu ciddi şekilde etkilemeli, erken sonlandırma sinyaline neden olmalı, intron birleşme yerlerinin değişmeyen nükleotidlerini değiştirmeli veya hastanın etnik grubundan en az 100 KF mutasyonu taşıyıcısı olan, normal KFTR genlerinde bulunmayan yeni bir amino asit dizilimine neden olmalıdır.

Şuanda, KF mutasyon veri tabanında (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>) 1547 mutasyon listelenmiş, bunların 225 tanesi klinik etki göstermeyen sekans varyantları olarak belirlenmiştir. Kalan 1322 potansiyel KF'e neden olan mutasyonun sadece 23 tanesinin (Tablo 2.2.) KF hastalığını değerlendirmek için yeterli KFTR kaybına neden olduğu, doğrudan veya ampirik kanıtlarla gösterilmiştir. Bu nedenle Tablo 2.2.'deki mutasyonlar tanısal amaçlı kesin genetik kanıt olarak tavsiye edilebilir. Bu mutasyonlar, KF popülasyonunun %85'inde her iki KFTR genindeki kusurları açıklar ve bu bireylerde ciddi KFTR fonksiyon kaybı, genellikle pankreatik yetmezlik ve pulmoner komplikasyonlarla sonuçlanır. KF'li bireylerin kalan %15'inin çoğunda, KFTR fonksiyonu üzerinde bilinmeyen etkileri olan mutasyonlar mevcuttur [103].

2.1.6.3. KFTR İlişkili Metabolik Sendrom (CRMS)

KFTR ilişkili metabolik sendrom; yenidoğan taraması pozitif, terde Cl^- düzeyi 60 mmol/L'nin altında, en az biri KF hastalığına neden olmayan, en fazla 2 KFTR mutasyonu olan infantlar için kullanılan bir terimdir [37]. CRMS'li infantlar, yenidoğan taraması aracılığıyla tanımlandıklarında, KFTR ilişkili hastalığı olan daha büyük bireylere göre asemptomatiklerdir [107]. Yenidoğan taramasında hipertripsinojenemi saptanan çoğu vakada, 2-4 hafta arasında, akredite edilmiş bir laboratuvar da ter Cl^- testi gerçekleştirilir ve çoğu, yenidoğan taramasının bir parçası olarak bazı KFTR mutasyonu testine tabi tutulur. Ter Cl^- değerleri ara değerde (30-59 mmol/L) olan infantlara, 2. ayda ara değeri teyid etme veya normal (<30 mmol/L) ya da anormal aralığı (≥ 60 mmol/L) ispat etmek amacıyla tekrarlanır. Tekrarlayan, sürekli ara değer ter Cl^- konsantrasyonu olan infantlar derinlemesine KFTR DNA analizine tabi tutulmalı, genetik danışmanlık almalı ve KF uzmanı tarafından değerlendirilmelidirler [107]. CRMS'li infantların klinik gidişatları hakkında çok az

bilgi olsa da, nüfus verileri CRMS'li bireylerin çoğunun sağlıklı kaldığı izlenimini uyandırmaktadır [37]. CFF, 2009 yılında CRMS'li infantların yönetimi hakkında rehber yayınlar yayınlamıştır [107] .

2.1.6.4. Nazal Potansiyel Farkı

Transepitelyal nazal potansiyel farkı (NPF), burun mukozasını kaplayan solunum yolu epitelindeki elektriksel potansiyel farkın ölçüldüğü elektrofizyolojik bir testtir. KFTR aktivitesini test eden bir metottur. KFTR fonksiyonu azalmış veya eksik olan bireylerde anormal aktif iyon taşınımı tespit edilir [37]. Na^+ iletkenliği amilorid ile perfüzyonla, KFTR fonksiyonu ise Cl^- içermeyen bir solüsyon ve isoproteronol perfüzyonuyla değerlendirilir [108]. Bu test, KF için bir tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Özellikle KF'e özgü olan GİS veya pulmoner semptomların daha az olduğu ve ter testi sonuçlarının normal veya sınırda olduğu atipik KF vakalarında başvurulmaktadır [1].

Normal koşullarda solunum yolu epiteli Na^+ ve suyu absorbe eder. Solunum yolu yüzey sıvısının konsantrasyonu izotoniktir [109]. Na^+ elektrokimyasal gradient sayesinde apikal zardan hücreye alınır, sonra bazolateral zardan hücre dışına pompalanır. Normal hava yolu epitelinde Cl^- absorpsiyonu, epitel hücresinden değil, parasellüler yoldan olur. Çünkü apikal zarda Na^+ için olduğu gibi, Cl^- için net bir elektrokimyasal sürücü kuvvet yoktur. Bu nedenle Cl^- etkisiyle, lümen interstisyuma göre daha negatiftir ve bir transepitelyal potansiyel farkı vardır [110]. KF'de bazal hava yolu transepitelyal potansiyel farkı normale göre 2-3 kat artar. KF'de de hava yolu yüzeyi sıvısı, normaldeki gibi izotoniktir. Ancak, KFTR yokluğu veya fonksiyon bozukluğu sonucunda ENaC'dan Na^+ absorpsiyonu artmıştır. KFTR aracılı Cl^- iletimi yoktur. Ancak akciğerlerde KFTR dışında başka yollardan da Cl^- iletiminin mümkün olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak; KF hastalarında Na^+ , Cl^- ve sıvı absorpsiyonu rölatif arttığından, NaCl hiperabsorpsiyonu meydana gelir. Epitelde Cl^- geçirgenliği, Na^+ geçirgenliğinden daha az olduğu için mukozal yüzey normalden daha negatif olur. Böylece KF'de bazal durumda transepitelyal potansiyel farkı normale göre yüksek bulunur [1].

Potansiyel fark, apikal ve bazolateral hücre zarlarındaki elektriksel potansiyel farkına eşittir. KFTR aktivitesinin, zar potansiyeli ölçülerek incelenebilmesi için, hücre dışı Cl^- miktarı voltaj değişikliği yapacak şekilde azaltılması gerekir. Böylece bir elektrokimyasal gradiyent oluşturulur [111]. Nazal potansiyel farktaki değişiklikler, burun deliği içine yerleştirilen küçük bir kataterle ölçülürken; nazal mukoza, amilorid, düşük iyon ve beta-agonist solüsyonlar ile yıkanır [37]. Amilorid apikal zarda Na^+ kanallarını bloke ederek, hücreye Na^+ alınımını inhibe eder. Böylece luminal yüzdeki zar potansiyeli hiperpolarize olur, NPF düşer [112]. Cl^- içermeyen solüsyon ile perfüzyon, luminal yüzde Cl^- sekresyonu için sürücü kuvveti artırır. cAMP ile aktive olan Cl^- kanallarından Cl^- akışının artması apikal hücre zarını depolarize eder, NPF artar. Apikal zardan Cl^- iletkenliğini daha fazla arttırmak amacıyla Cl^- içermeyen solüsyona isoproterenol eklenir. İsopterenol cAMP ile aktive olan KFTR kanallarını açar. Uyarılmış Cl^- sekresyonu, apikal zar potansiyelinin daha da azalmasına ve NPF'nin daha da artmasına sebep olur. KF'li hastalarda bazal potansiyel farkı kontrole göre yüksektir [1]. ENaC aracılı Na^+ absorpsiyonunun arttığı, KFTR aracılı Cl^- sekresyonunun azaldığı veya hiç olmadığı, ATP ile uyarılan Cl^- transportunun arttığı gösterilir. Bu tipik bulgular KF için tanı kriterlerini oluşturur [100, 112-114].

2.1.7. KF Tedavisi

KF takibi multidisipliner yaklaşım gerektirmektedir. Hastalık yönetiminde temel hedefler genel olarak beslenme durumunu düzeltmek, akciğer sağlığını optimize etmek, komorbiditeleri önlemek ve tedavi etmektir [37].

2.1.7.1. Pulmoner Semptomların Tedavisi

KF'de, mukusun distalden proksimal hava yollarına atılmasını sağlayarak, artmış yoğunluktaki havayolu sekresyonlarının azaltılması için kullanılan birçok yöntem vardır. Pulmoner rehabilitasyon programını oluşturan bu yöntemler arasında; perküsyon, vibrasyon, postural drenaj, otojenik drenaj, aktif solunum teknikleri döngüsü ile pozitif ekspiratuvar basınç aleti gibi cihazlarla, yüksek frekanslı göğüs

duvarı osilasyon tedavisi bulunur [7]. Çeşitli çalışmalar ve rehberlere göre göğüs fizyoterapisi KF hastalarının bakımına mutlaka dahil edilmelidir, fakat hangi yöntemin daha iyi olduğuna dair net bir bulgu yoktur [115, 116]. Bu nedenle metot seçiminde kullanım kolaylığı ve hasta memnuniyeti ön plandadır. Ancak GÖR ve aspirasyon riskinden dolayı hayatın erken dönemlerinde baş aşağı pozisyonda perküsyon ve postüral drenajdan kaçınılmalıdır [117].

Aerobik ve anaerobik egzersizin KF'li hastalarda yaşam kalitesini iyileştirdiğini ve akciğer fonksiyonunu bir dereceye kadar stabilize edebileceğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Ancak havayolu klirensini sağlamak için tek başına yeterli değildir [118].

KF takibinde genellikle üç ayda bir veya hastalık süreçlerinde rutin olarak kültür örnekleri alınır. Kültür örnekleri olarak; orofarengeal sürüntü, balgam veya bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı kullanılabilir. Tipik erken dönem KF patojenleri *S. aureus* ve *H. influenzae*'dir. KF solunum yollarından genellikle ilk izole edilen mikroorganizma ise *S. aureus*'dur [119]. Bazı ülkelerin klavuzlarında hayatın ilk yıllarında *S. aureus* enfeksiyonunu önlemek için proflaktik olarak flukloksasin önerilmektedir ancak, kullanımı tartışmalıdır [120].

Ergenlik ve erişkin yaşlarda ise *P. aeruginosa* primer patojen haline gelir. Başlangıçta KF hastalarında, aralıklı olarak mukoid olmayan suşlardan oluşan *P. aeruginosa* enfeksiyonları mevcuttur. Bu suşlar genellikle antibiyotik duyarlı olup, yoğun antimikrobiyal tedavi ile eradikasyon sağlanabilmektedir [121, 122]. Fakat zamanla mukoid fenotipli suşlara dönüşümlü doğal immuniteye ve antibiyotiklere karşı dirençli hale gelirler [123]. Mukoid suşun saptanması enfeksiyonun kronikleştiğinin önemli bir göstergesidir. *P. aeruginosa* solunum yollarında alginat adı verilen ekzopolisakkarit salgılayarak konak savunma sistemine ve antibiyotiklere direnç sağlayan biyofilm formasyonu oluşturur [124]. Mukoid *P. aeruginosa* enfeksiyonu taşıyan hastaların çoğunda, taşımayanlara göre daha fazla ve hızlı bir şekilde akciğer fonksiyonlarında azalma meydana gelir [119].

P. aeruginosa'nın tespitinden hemen sonra erken inhale tobramisin kullanımının kronikleşmeyi geciktirdiği gibi, hastaların %80'den fazlasında eradikasyon sağladığı gösterilmiştir [37]. 28 gün inhale tobramisin solüsyonu ile 3 aya kadar nebulize kolistin ve siprofloksasin kombinasyon tedavisi eradikasyon

sağlayabilir. Eradikasyonun kültürle doğrulanması gerekmektedir. Eradikasyon tedavisinin başarısız olması ve *P. aeruginosa* infeksiyonunun kronikleşmesi durumunda ise inhale tobramisin, aztreonam lizin veya kolistin içeren uzun süreli veya süresiz antibiyotik tedavisi tavsiye edilmektedir [120]. Ilımlı ve ağır *P. aeruginosa* kolonizasyonu olan hastalar için Amerikan CFF ve CFF rehberi inhale tobramisin yanısıra inhale dornaz alfa (rekombinant insan deoksiribonükleazı), inhale hipertonic tuz solüsyonu, azitromisin, ibuprofen ve bazı spesifik hastalara inhale β -agonistleri tavsiye etmektedir [7].

KF'de havayolu infeksiyonu nötrofil baskın olduğu için antiinflamatuvar ilaçlar da önem kazanmıştır. Oral veya inhale kortikosteroidler ve yüksek doz ibuprofen KF'de proinflamatuvar sitokinleri inhibe eden geniş spektrumlu antiinflamatuvarlardır [125, 126]. İkisi de klinik yarar sağlamış, ancak yan etkilerinden dolayı kullanımları kısıtlanmıştır. Bunların dışında rutinde tavsiye edilen ancak geleneksel antiinflamatuvar olarak düşülmeyen iki ajan, dornaz alfa ile makrolid grubu antibiyotik olan azitromisindir.

İnfeksiyon sırasında solunum sistemi epitelinde biriken çok sayıdaki nötrofilin parçalanmasıyla açığa çıkan fazla miktardaki DNA, havayolu sekresyonlarının viskozitesini artırır. Rekombinant insan deoksiribonükleazı olan dornaz alfa, nebulizer aracılığıyla inhale olarak kullanıldığında, ekstrasellüler DNA'yı temizleyerek pulmoner alevlenmeleri azaltmakta ve pulmoner fonksiyonları iyileştirmektedir [127, 128]. *P. aeruginosa* gibi patojenlere yanıt olarak vücudun immün hücreleri tarafından üretilen Lökotrien B4 (LTB4) de nötrofil migrasyonu ve aktivasyonuna neden olarak, inflamasyon ve hava yolu hasarını artırır. Bu nedenle LTB4'ün antagonist ilaçlarla etkilerini inhibe etmek de kronik inflamasyonun neden olduğu irreversibl hasarı azaltabilir [129].

Makrolidler, KF'le ortak özellikler taşıyan diffüz panbronşiolitlerde yıllardır kullanılan antibiyotik türüdür [130]. Sitokin üretimini etkileyebilir ve PMN hücre fonksiyonunu değiştirerek, hem antibiyotik hem de antiinflamatuvar ajanlar olarak etkili olurlar [131]. Makrolidlerin etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da, KF'de kullanımına yönelik yapılan araştırmalarda, azitromisinin *P. aeruginosa* 'ya karşı biyofilm oluşturma aşamasında bakterisidal etkili olduğu, biyofilm üretimini ve virülans faktör üretimini azalttığı gösterilmiştir [132-135].

İnhale hipertonic tuz solüsyonu ve toz mannitol kullanımı, KF'in altta yatan defektinin semptomlarına yönelik tedavi yöntemlerinden sayılabilir. Hiperozmotik ajan olarak, KFTR mutasyonunda dahi havayollarına su çeker. Böylece perisilyer tabakanın rehidrasyonunu sağlayarak mukosilyer klirensin iyileşmesine yardımcı olur [7, 136].

KF, pulmoner alevlenme adı verilen akciğer fonksiyonların şiddetli olarak gerilediği akut periyodlarla karakterizedir. Kriterleri tam olarak standardize edilmemiş olsa da, artmış öksürük, balgam yapısındaki değişiklikler, nefes darlığı, azalmış iştahla beraber kilo kaybı ve spirometrik parametrelerin düşmesi ile klinik durumun bozulması durumu pulmoner alevlenme olarak kabul edilmektedir [137]. Pulmoner alevlenmelerin tedavisi ise tek başına antibiyotik tedavisi değildir. Multidisipliner yaklaşım gerektirmektedir. Tipik olarak KF patojenlerini hedef alan antibiyotiklerin evde veya hastanede IV olarak uygulanması tavsiye edilmektedir [138]. Oral veya inhale antibiyotik tedavisi de uygulanabilir, ancak IV uygulanan antibiyotiğin balgamdaki *Pseudomonas* türlerinin yoğunluğunu azalttığı, akciğer fonksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir [139]. Farklı etki mekanizmalarına sahip antibiyotiklerin kombine şekilde kullanılması, dirençli suşların ortaya çıkmasını önlemek için, tek ajanlı antibiyotik tedavisine göre tercih edilir. Tedavi yaklaşık 14 gün sürer [140]. Çoğu hastanın alevlenme sırasında hava yollarında *P. aeruginosa* olacağı için hastanedeki genel tedavi kombinasyonu, bakteri hücre duvarı sentezine yönelik bir beta laktam antibiyotik, bakteri ribozomal protein sentezine yönelik bir aminoglikozidden oluşur. Duruma göre gerek duyulduğunda *S. aureus*, *H. İnfluenze*, *Metisiline dirençli S. aureus* (MRSA) veya başka bir patojene spesifik antibiyotikler de eklenebilir [7]. IV antibiyotik tedavisi evde de uygulanabilir, ancak hastane tabanlı tedavi kadar etkili olmayabilir. Hafif alevlenmelerde ise, hastaneye yatış yapılmadan oral ve inhale antibiyotik kullanımı yeterli olabilir [7].

2.1.7.2. Akciğer Transplantasyonu

Akciğer transplantasyonu, son dönem akciğer hastalığı olan KF hastaları için son terapötik seçenektir. Doğru seçilmiş hastalarda hayat kalitesini arttırma ve önemli ölçüde iyileştirme potansiyeline sahiptir. Genellikle çocuk hastalarda 2 yıldan az

yaşam beklentisi olmadıkça akciğer transplantasyonu düşünülmez [141]. Çünkü transplantasyon sonrası 5 yıllık yaşam beklentisi, çocuklarda %50'nin altında iken, erişkinlerde daha iyidir [142, 143]. Erişkin hastalarda transplantasyon için, fonksiyonel ekspiratuvar volüm 1 (FEV1)'in beklenenin %30'unun altında olmasının yanısıra; yaş, cinsiyet, pulmoner infeksiyon ve kolonizasyon durumu da karar verme sürecini etkilemektedir [144].

2.1.7.3. Endokrin Hastalıkların Tedavisi

KF ilişkili diyabet, pankreatik beta hücrelerin harabiyetine bağlı meydana gelen ve erişkin hastalarda giderek artan bir problemdir. Tanısı 10 yaş üstü, klinik olarak stabil olan hastalarda rutin oral glukoz tolerans testi (OGTT) ile konulur. HbA1c glisemik monitarizasyonda kullanılır. Hastalara eğitim, özel diyet ve insülin tedavisi önerilir. İnsülin tedavi rejimi hastaya özeldir. Oral hipoglisemik ajanlar tavsiye edilmez [145].

Şiddetli akciğer hastalığı, beslenme ve fiziksel aktivite yetersizliği olan KF hastalarında, kemik yoğunluğu azalmış ve kırık oranları artmıştır [146]. Kemik dansitesi ölçümlerinin yılda 2 kez yapılması önerilir. Beslenme durumunu ve akciğer fonksiyonunu optimize etmek, düzenli egzersiz önermek önemli önleyici stratejilerdir. Azalmış kemik yoğunluğu tespit edildiğinde, sekonder osteoporoz sebeplerinden varsa D vitamini eksikliği ve hipogonadizm tespit edilip, tedavi edilmelidir. Ayrıca bifosfonatlar da gerek duyulduğunda tedaviye eklenebilir [147].

2.1.7.4. Fertilite Tedavisi

KF'li kadınlarda normal üreme potansiyeli olmasına rağmen, oligomenore ve anormal servikal mukusun sperm penetrasyonunu engellemesinden dolayı fertilite olumsuz etkilenebilir [148]. Uzman ekiplerce gebelik planlanabilir ve takibi yapılabilir [149].

KF'li erkeklerin % 98'inden fazlası vas deferens'in doğumsal bilateral yokluğu nedeniyle infertilidir. Testiküler epididimal sperm aspirasyonu ile intrasitoplazmik sperm injeksiyonu gibi teknikler tedavide seçenek haline gelmiştir [150].

2.1.7.5. Gastrointestinal Semptomların Tedavisi

GÖR tedavisinde proton pompa inhibitörleri tercih edilirken, daha ağır seyreden vakalarda prokinetik ajanlar kullanılabilir. Bebekler ve genç hastalarda çeşitli fizyoterapi yaklaşımları, GÖR semptomlarını ve uzun dönem pulmoner komplikasyonları azaltabilir [151].

Pankreatik enzim replasman tedavisi ile malnutrisyon kontrol edilebilir hale gelmiştir. Yağda emilen vitaminlerin (A, D, E ve K vitaminleri) eksikliği sonucunda; akrodermatit, anemi, nöropati, gece körlüğü, osteoporoz ve kanama bozuklukları meydana gelebilir [7]. Yeterli kalori alımı ve yağda çözünen vitaminlerin replasmanı hastalık kontrolü için önemli bileşenler olmaya devam etmektedir [152].

Mekonyum ileusunda adezyon ve DIOS gelişim riski artacağı için cerrahi yöntemlerden mecbur kalınmadıkça kaçınılmalıdır. Mekonyum, lavman ve N-asetilsistein ile boşaltılabilir [52].

İnkomplet DIOS tedavisinde oral rehidrasyonla birlikte lavman önerilir. Alternatif tedavi ise tıkaç haline gelmiş gaytayı yumuşatmak için oral, nazogastrik tüp veya lavman yoluyla N-asetilsistein uygulamasıdır [153]. Komplet DIOS ise hastanede tedavi edilmeli, yaklaşım obstrüksiyonun derecesine göre olmalıdır. İnkomplet tedavi protokolü uygulanabileceği gibi cerrahi seçenekler de uygulanabilir [153, 154].

Kabızlık tedavisinde de oral polietilen glikol gibi gayta yumuşatıcı ajanlarla lavman tercih edilebilir. Laktuloz yan etkilerinden dolayı tercih edilmez. Gerekli vakalarda terapötik kolonoskopi uygulanabilir. [52].

DİOS ve kabızlıkta pankreatik enzim replasman tedavisinin uygunluğu, tuz ve su kullanımı ile besinlerin lif içeriğiyle ilgili tavsiye edilen diyeteye uymak oldukça önemlidir [63].

KF'de artmış GİS malignite prevalansı nedeniyle bazı KF merkezleri 40 yaş üstündeki hastalara tarama amaçlı kolonoskopi önermektedir [155].

2.1.7.6. Beslenme

KF'deki beslenme tedavisinin amacı çocukluk döneminde normal büyüme hızını yakalamak ve erişkinlikte ise normal ağırlığı korumaktır [156]. Çalışmalar,

beden kitle indeksi (BKI)'nin, daha iyi akciğer fonksiyonları ve sağkalımla pozitif yönde ilişkili olduğunu göstermiştir [142].

KF hastalarının yaklaşık %85-90'ının da pankreatik yetmezlik bulunur. Bu hastalara, kompleks karbonhidrat, lipit ve proteinlerin absorpsiyonu için beslenmeden önce pankreatik enzim replasman tedavisi uygulanmalıdır [142].

KF hastaları malabsorpsiyondan dolayı, yağda emilen vitaminler ve çinko eksikliği riskini taşırlar. Bu nedenle her yıl yağda çözünen vitaminlerinin ölçümü yapılmalı ve KF hastalarına, KF'e spesifik multivitamin desteği sağlanmalıdır. Büyüme gelişme geriliği olan çocuklara ise çinko takviyesi yapılmalıdır [142].

KF hastalarında tuz kaybı sık karşılaşılan bir sorun olduğu için hiponatremik, hipokloremik dehidratasyon gibi elektrolit anormallikleri ve hipokloremik metabolik alkaloz gibi durumların meydana gelmesini önlemek için tuz desteği yapılmalıdır [142].

2.1.7.7. KF'de Yeni Tedavi Yaklaşımları

KFTR modülatörleri olarak adlandırılan yeni bir grup ilaç (İvacaftor, Lumocraftor, Orkambi) mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olsa da KF'deki temel defekti düzeltmek üzere tasarlanmıştır [157, 158].

Gen terapisi birçok doğumsal hastalık için küratif olsa da, KF için pek faydalı olmamıştır [159, 160]. KFTR geninin çok büyük olması nedeniyle onu taşıyıp bronş epitel hücrelerine aktarabilecek vektör bulmak zordur. Ayrıca vektörün hedefe ulaşmasını glikokaliks tabakası ve siliyer aktivite engeller. İmmun yanıt oluşturmeyen lipozom-DNA kompleksleri bu dezavantajlara sahip değildir ve inhalasyonla epitel hücrelerini infekte edebilirler [160]. Bu araştırmalar henüz deneme aşamalarında olup, gelecek vaad etmektedir.

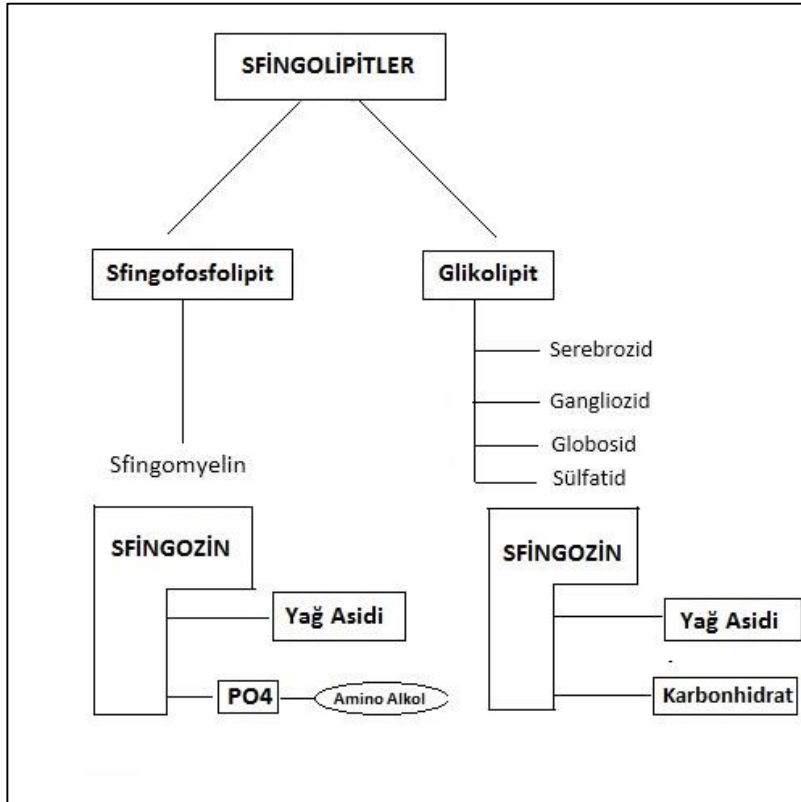
2.2. Sfingolipitler

2.2.1. Sfingolipitlerin sentezi

Uluslararası Lipid Sınıflandırma ve Adlandırma Komitesi'ne göre; yağ asitleri, gliserolipitler, gliserofosfolipitler, sfingolipitler, sterol lipitler, prenol lipitler, sakkarolipitler ve poliketidler olmak üzere 8 kategoriye ayrılmışlardır [1].

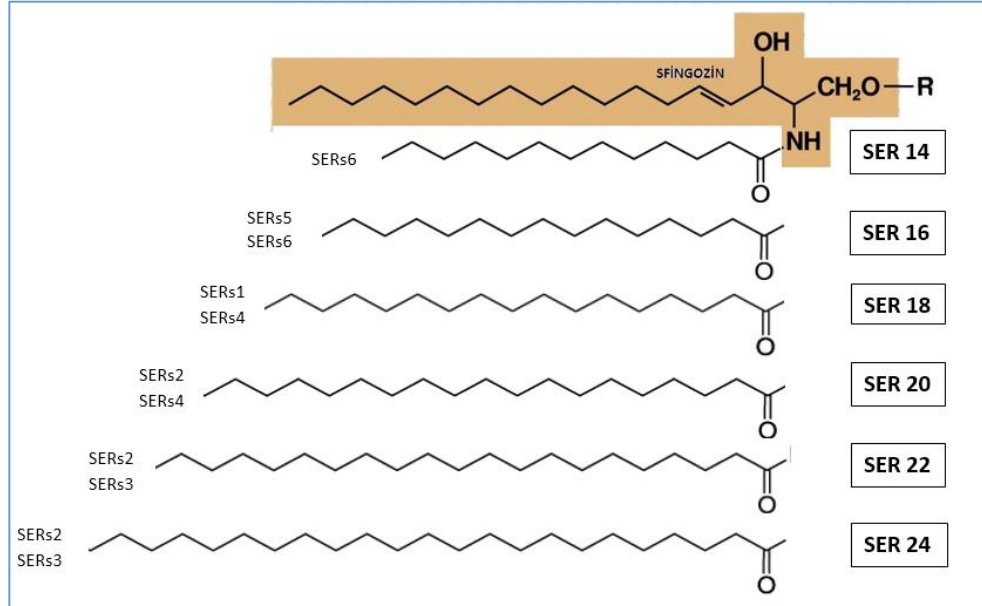
Sfingolipitler, fosfolipitler ve kolesterol ökaryotik hücre membranının major bileşenleridir [2]. İlk kez 1884'de adlandırılan sfingolipitler büyük bir lipid grubunu temsil eder. Membran akışkanlığı ve yapısının korunmasında rol alır, normal doku ve hücre homeostazında önemli yapıtaşdır.

Sfingolipitler amfipatik moleküllerdir. Çeşitli hidrofobik ve hidrofilik parçaları bulunur. Hidrofobik kısım, 18 karbon uzunluğunda, amid bağıyla yağ asidine bağlı, sfingoid bazdan (sfingozin veya sfinganin) oluşur. Hidrofilik kısım, en basit sfingolipitlerde sadece hidroksil grubundan oluşurken, daha kompleks sfingolipitlerde fosfat, alkol yapıda moleküller veya şeker birimlerinden oluşur (Şekil 2.5.) [161].



Şekil 2. 5. Sfingolipitlerin şematik görünümü

karbonlu doymuş, tekli veya çoklu doymamış açil zinciri kullanır ve dihidroseramid desaturaz ile SER'lere hidrojene edilirler [169]. Böylece, açil zinciri uzunluğuna göre SER'ler; SER 14, SER 16, SER 18, SER 20, SER 22, SER 24, SER 26 olarak adlandırılır (Şekil 2.7.) ve dokularda bu farklı formları bir arada bulunur.



Şekil 2. 7. Açil zincir uzunluğuna göre SER türleri

SER sentaz ailesi sadece SER biyosentezinin düzenlenmesinde değil, biyoaktif kompleks sfingolipitlerin kompozisyonunun belirlenmesinde de rol oynar [170].

SER'ler alternatif olarak iki ek yolak sonucunda da sentezlenebilir. Sfingomyelin (SM)'den asidik, nötral veya bazik sfingomyelinaz (SMaz) aktivitesi ile [171] veya kurtarma yolağı olarak da bilinen, kompleks sfingolipitlerin metaboliti olan sfingozinden derive olabilirler [162]. SER sentezinin dördüncü yolağının ise karaciğer mitokondrisinde gerçekleştiği bildirilmiştir. Reaksiyon iki basamakta gerçekleşir, sfingozin ve açil-koA'nın kondensasyonunu sağlayan anahtar düzenleyici enzim nötral seramidazdır [172].

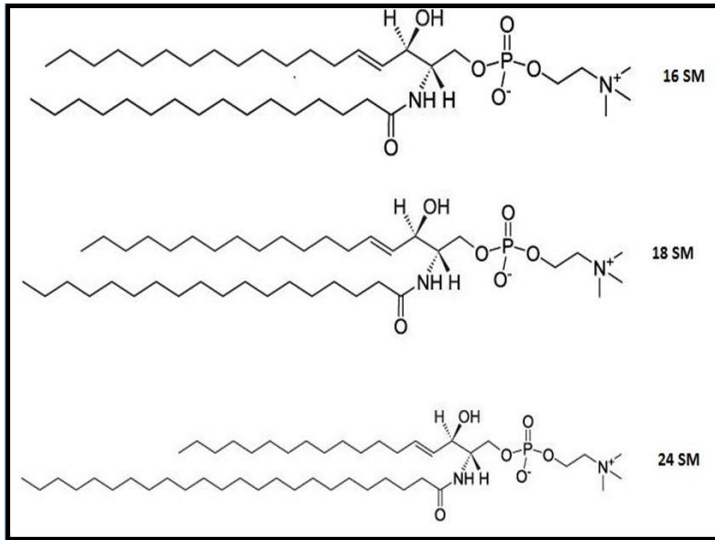
SER, SER kinaz tarafından fosforile edilerek seramid-1-fosfat (S1P)'ı veya seramidazla indirgenerek sfingozini oluşturabilir [173]. Benzer şekilde, sfingozin de sfingozin kinazlarla sfingozin-1-fosfat (Sph-1-P)'a fosforile edilebilir.

SER'ler, SM sentaz veya glukozilseramid sentaz aktiviteleri aracılığıyla SM veya glikosfingolipitler gibi kompleks sfingolipitlerin sentezinde kullanılır [162]. ER'da sentezlenen SER'den, sfingolipit ve SM sentezinin gerçekleşebilmesi için,

SER'in non-veziküler olarak seramid transfer protein (SERT) aracılığı ile golgiye taşınması gereklidir [162]. SERT sadece SER'lerden 14-20 karbon (C) içerenleri transfer edebilir [174]. Bu durum birçok dokuda ve hücrede 14C-20C'lu SM'lerin bulunmasıyla ilişkililiken, glukozilseramid sentezi için daha uzun zincirli yağ asitleri içeren SER'ler kullanılır [175].

2.2.3. Sfingomyelinler

SM, sfingoid bir omurgada, 4.pozisyonda trans-çift bağ ile 18 karbonlu (18C) aminoalkol ve buna bağlı hidrofobik yağ asidi zinciri ile polar fosfokolin veya nadiren fosfoetanolamin biriminden oluşmuştur. Doğal olarak oluşan SM'ler yağ asidi zinciri uzunluklarına (genellikle 16C-24C), doymuşluk oranına göre farklılık gösterirler (Şekil 2.8.) [176].



Şekil 2. 8. Açıl zincir uzunluğuna göre bazı SM türleri

SM biyolojik membranda en bol bulunan fosfolipitlerdendir. Plazma membranı dış zarı, önemli yapısal özellikleri olan SM'den oldukça zengindir. Lipit raft yapısına katılır [177]. Plazma membranı kaynaklı SM'in SER'e hidrolizi ise genellikle lizozomda aSMaz tarafından sağlanırken, sıklıkla patolojik süreçlerde rol alan nötral SMaz (nSMaz) ve sekreatuvar SMaz (sSMaz) tarafından da gerçekleştirilebilir. Ekzojen SM de barsaklarda lokalize olan alkali SMaz tarafından hidroliz edilir [176].

2.2.4. Lipit Raftları

Ökaryotik hücrelerin plazma membranları, gliserofosfolipitler, sfingolipitler ve steroller (özellikle kolesterol) olmak üzere önemli 3 büyük lipit grubunu içermektedir [178]. Çift tabakalı hücre zarı yapısında farklı lipit türleri, zarın sitoplazmik ve ekzoplazmik bölgelerinde asimetric olarak dağılmıştır. Hücre membranında, karakteristik olarak membranın diğer bölgelerinden ayrılan, kolesterol ve sfingolipitler açısından zengin, proteinlerin selektif olarak dahil edilebilip çıkarılabildiği mikro bölgeler gözlenmektedir. Bu özel bölgelere lipit raftları adı verilmektedir [179]. Düşük sıcaklıkta, iyonik olmayan deterjanlara karşı dirençli olduklarından, deterjana dirençli glikosfingolipit açısından zengin mikro alanlar olarak da adlandırılmışlardır [180]. Lipit raftların oluşumunda hidrofobik etkileşimler, Van der Waals ve hidrojen bağlarının rolleri etkindir [181].

Lipit raftları, endositoz, ekzositoz gibi membran işlevleri ile hücre içi sinyal iletiminde geçiş istasyonları olarak işlev görmektedirler [179, 182, 183]. Lipit raftlarındaki proteinler sıklıkla lipitlerle glikozilfosfatidilinozitol kancaları (GPI) gibi posttranslasyonel modifikasyonlar gösterirler [184] veya kolesterol ve fosfolipitleri direk bağlayarak kaveolin ve anneksinleri oluştururlar [185, 186]. Ayrıca raftlar, SM'i hidroliz ederek SER açığa çıkmasını sağlayan SMaz'ların birincil etki yeridir [187]. CD95 ve CD40 gibi moleküllerin raftlardaki reseptörleri uyarması sonucunda aSMaz aktive olur böylece SER açığa çıkar [180, 188-190].

Hidrofobik SER molekülleri, hidrofobik etkileşimlerle birbirlerine güçlü bir şekilde bağlanır ve böylece membrandaki diğer lipitlerden kendiliğinden ayrılırlar. SER moleküllerinin bu şekilde kendiliğinden birleşme eğilimi olması, platform adı verilen, fizyolojik özellikleri, hidrofobisitesi ve membran kalınlığı bakımından membranın diğer bölgelerinden oldukça farklı olan benzersiz bir mikro çevre; küçük 'SER-zengin membran alanlarını' ortaya çıkarır [191]. Bu platformlar lipit raftlarının oluşumunda kritik rol oynar. Ayrıca, reseptör ve hücre içi sinyal moleküllerini yakalar ve kümeler. Yakalama gücünün, hidrofobik transmembran alan uzunluğuyla orantılı olduğu düşünülmektedir. Böylece SER'ler zarın biyofiziğini değiştirerek, hücrelerdeki molekülleri yeniden düzenleyebilir, reseptör aracılı olan veya olmayan birçok hücreysel aktivasyon süreçlerini kontrol edebilir. Membranda SER üretiminin artması, zarın kimyasal yapısında değişikliklere sebep olur [180, 188, 192-194].

2.3. Sfingolipitler ve Hastalıklar

Sfingolipitler; hücrede proliferasyon, büyüme, farklılaşma, apoptoz gibi hücresel süreçlerde rol alırlar. Metabolik bozukluklar, kronik inflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi birçok patolojik durumda sfingolipit metabolizma bozukluğu da mevcuttur. Bu nedenle sfingolipitler yeni tedavi seçeneklerinde hedef olabilirler.

Sfingolipit metabolizmasının dengeli olması fizyolojik süreçlerin devamlılığı için oldukça önemlidir. Bir sfingolipit enziminin yanlış düzenlenmesi, bir veya daha fazla sfingolipit türünün belirli bir organelde birikmesine veya tükenmesine yol açabilir [195]. Hücre içinde sfingolipit birikmesi veya hücre sinyalinin değişmesi durumunda patolojik durumlar tetiklenebilir. Örneğin, Niemann-Pick hastalığında, aSMaz enzimi geninde mutasyon vardır ve enzimin defektif olması sonucunda fagositik hücrelerin lizozomlarında SM birikir. Bu durum, beyin, kemik iliği, akciğer, dalak ve karaciğer gibi birden fazla organın yetmezliği ile sonuçlanır [196].

Akciğer vasküler endoteli; akciğerin fizyolojik fonksiyonunu koruyan ve birden fazla homeostatik olayda rol alan kritik yapılardan biridir. Bunlar; damar tonusunun korunması, kan pıhtılaşması, inflamasyon, anjiogenez, hücre homeostazı ve akciğer sıvısı dengesinin korunmasıdır. Akciğer endoteli, yeterli gaz transferi ve doku oksijenasyonu için gereklidir [197].

Fetal akciğer gelişimi embriyonik dönemde başlar. Bu süreçte lipitler önemli rol oynar. Sürfaktan alveol kollapsını önleyen kompleks bir lipoproteindir. Fosfolipidler, proteinler ve kolesterolden oluşur. Fosfolipitler; fosfatidilkolin (lesitin) fosfatidilgliserol, fosfatidiletanolamin, sfingomyelin ve fosfatidilinositol'dür [198]. Amniyotik sıvıdaki lesitin/sfingomyelin oranı akciğer maturasyonu için geleneksel bir biyobelirteçtir [199]. Akciğerlerin fetal dönemden beri lipitlerle olan ilişkisi sadece matürasyonla sınırlı değildir. Lipidomiks çalışmalarının ilerlemesiyle, lipitlerin birçok akciğer hastalığında çeşitli süreçlerde rol aldıkları gösterilmiştir. Akciğer endotelinin bariyer fonksiyonunun bozulmasını engellemek, endotel bütünlüğünü korumak ya da bütünlüğün bozulmasıyla ortaya çıkan yıkıcı durumları azaltmak amacıyla klinik olarak etkili ajanlar geliştirme ilgisi oldukça arttırmış, bu da akciğer hastalıklarının lipitlerle olan ilişkisinin önemini ortaya koymuştur.

2.3.1. Seramidler ve Apoptoz

SER, tümör hücreleri dahil birçok hücrede apoptozu tetikler. Sitokinler, büyüme faktörleri, vitamin D, TNF- α , CD95/Fas, kemoterapötik ajanlar, toksinler, radyasyon, ultraviyole (UV) ışığı veya infeksiyon gibi herhangi bir stres uyararı varlığında SMaz veya de-novo yolak aracılığı ile sentezlenirler [200]. Hücreler bu ajanlara maruz bırakıldığında SER seviyelerinin arttığı gösterilmiştir [201].

Spesifik olarak aSMaz/SER sistemi; *S. aureus* ile infekte olmuş endotel hücrelerinde (pnömoni, yara infeksiyonu ve sepsis gibi nazokomiyal infeksiyonlarda) apoptozu indükler [202]. Endotel hücrelerinin *S. aureus* aracılı apoptozu bir dizi sinyalizasyon sonucu meydana gelir. aSMaz'ın aktivasyonu ile SER artışı ve sonra hücresel kaspazların ve Jun-N-terminal kinazın aktivasyonu ile mitokondriden sitozole sitokrom c geçişi olur. aSMaz'ın genetik eksikliği, *S. aureus* aracılı apoptozu önler [202]. Mitokondriyal sitokrom c salınımının SER ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur [203].

De-novo yoldan sentezlenen SER'in, ER stresine bağlı pankreatik beta hücre apoptozuna dahil olduğu gösterilmiştir [204, 205]. ER stresinin sorumlusu kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2'nin aktivasyonu, nSMaz'ı aktive eder. Böylece sekonder olarak SER birikimine sebep olur. Nötral SMaz'ın inhibisyonunun beta hücrelerini, ER stresinin indüklediği apoptozdan koruduğu gösterilmiştir [206].

Hücresel artmış SER düzeyleri, direk veya indirek olarak apoptotik süreçte rol alan, mitojen aktive protein kinaz (MAPK), serin-treonin fosfatase gibi enzimlerle, katepsin D, nükleer faktör kappa-beta (NF- κ B) ve ras'ın düzenlenmesinde rol alır [207-209]. SER'ler, apoptozdaki rolleri göz önüne alındığında, potansiyel bir anti kanser ilaç olabilirler.

2.3.2. Seramidler ve İnflamasyon

SER; sfingolipit metabolizmasının merkezi olup tüm diğer sfingolipitlerin oluşumu için bir öncüdür. Apoptoz, hücre büyümesi ve farklılaşması, yaşlanma, diyabet, insülin direnci, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar veya ateroskleroz gibi durumlarda canlı hücre fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlayan bir sinyal

molekölüdür [210]. Ayrıca radyasyon, iskemî, reperfüzyon, kemoterapotikler gibi çeşitli birçok uyarıcı için stres sinyali olarak işlev görür [199].

SER'lerin de-novo sentezinde rol alan bazı enzimler, proinflamatuvar olarak upregüle olurlar [211]. SMaz kaynaklı oluşan SER'ler de, proinflamatuvar agonistlerin tetiklediği çok sayıda inflamatuvar süreçte rol alırlar. Özellikle TNF- α , interferon-gama (IFN- γ) gibi sitokinler veya platelet aktive edici faktör (PAF) [212], interlökin-1 beta (IL-1 β) [213] gibi interlökinler SMaz aktivitesinin güçlü uyarıcılarıdır ve farklı hücre tiplerinde inflamasyonu uyardıkları gösterilmiştir [162, 191, 214].

SER'ler, sayısız birçok biyolojik süreçte yer almalarına rağmen, doğrudan hedeflerinden yalnızca birkaçı tarif edilmiştir. Bu örneklerden birisi; SER'in sentezlendikten sonra proinflamatuvar transkripsiyon faktörü NF- $\kappa\beta$ 'nin ekspresyon ve aktivasyonunu sağlamasıdır [163]. NF- $\kappa\beta$, memelilerde inflamatuvar genler de dahil olmak üzere 150'den fazla genin ekspresyonunu düzenler. Örneğin, IL-1 β , IL-6, IL-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi kemokinler ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi proinflamatuvar olan prostaglandinlerin (PG) sentezini sağlayan enzimlerin ekspresyonunu artırır [163, 215]. İlginç olarak TNF- α , nötral ve aSMaz'ları aktive eder, sadece aSMaz aktivasyonu NF- $\kappa\beta$ aktivasyonu ile sonuçlanır [216]. Ancak; bazı çalışmalarda da farklı hücrelerdeki (fibroblast, endotel ve makrofajlar) SMaz aktivitesi için, TNF- α 'nın indüklediği NF- $\kappa\beta$ 'a gerek olmadığı, SER'in kendisinin NF- $\kappa\beta$ gen transkripsiyonu ile inflamatuvar yolları aktive ettiği gösterilmiştir [217-219]. Ancak her ne kadar bu araştırmalar SER'lerin NF- $\kappa\beta$ 'yi aktive ettiğini belirtse de, aksine SER'in PKC üzerinden NF- $\kappa\beta$ 'nin aktivasyonunu inhibe ettiğini raporlayan bir araştırma da mevcuttur [220].

2.3.3. Seramidlerin Tedavideki Rolü

Sfingolipitler birçok araştırmaya göre, akciğer hastalıklarında kilit nokta oluşturan araçlar olarak tanınmaktadır. Özellikle SER'in inflamatuvar yanıt ve apoptozun düzenlenmesindeki rolü dikkat çekicidir. Bu işlevler göz önüne alındığında SER sentezinin inhibisyonunun çoklu etkiler ortaya çıkarması beklenmektedir. Bu nedenle SMaz inhibisyonu tedavi hedefi geliştirmek amacıyla çeşitli hayvan modellerinde denenmiştir.

Becker ve ark. KFTR \pm farelerde, SER düzeylerini normalize etmek amacıyla, aSMaz inhibitörleri ilaç panelini (amitriptilin, trimipramin, desipramin, amlodipin, sertralin, fluoksetin ve klorprotiksen) inhaler olarak uygulamış ve farelerin akciğer dokularındaki SER düzeylerini düşürmüşlerdir. Bu durumun fareleri *P. aeruginosa* infeksiyonundan koruduğunu ve akciğerlerindeki inflamasyonun derecesini düşürdüğünü göstermişlerdir [12].

KFTR \pm farelerde, SER'in de-novo sentezinin Fumonisin B1 (FB1) ile inhibisyonu denenmiş, *P. aeruginosa*-lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenmiş akciğer hasarı sonrası inflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve IL-1 β 'yı anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir. Ancak; amitriptilinle yapılan SER salınımını inhibisyonunun, FB1'e göre *P. aeruginosa*-LPS ile indüklenmiş akciğer inflamasyonundan koruyucu etkisi KFTR \pm farelerde, KFTR $+/+$ olanlara göre daha fazladır [221]. Bu bulguların yanısıra, KF'li hastalarda amitriptilin kullanımına yönelik yapılan faz II çalışmasına katılan bir KF hastasına, 21 ay boyunca oral amitriptilin tedavisi uygulanmış; hastanın son 21 aydaki akciğer fonksiyonunun (FEV1, FVC) %10'dan fazla arttığı, BKI'nin de pozitif yönde anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir [12].

Ziobro ve ark. KF'de biriken SER'in epitel hücre ölümünü artırarak, KF bronşioollerinde DNA birikimini tetiklediğini böylece asemptomatik inflamasyonla beraber *P. aeruginosa* infeksiyonuna yatkınlığı arttırdığını belirtmişlerdir [13]. Aynı zamanda SER'lerin akciğer fibrozisindeki rolünü araştırmak amacıyla KF'li farelere aSMaz inhibitörleri uygulanmış, SER düzeyleri normalize edilmiştir. aSMaz tedavisinin, akciğer fibrozisinden koruduğu gösterilmiştir [171].

Retinoidler, hücresel büyüme, farklılaşma ve hücre ölümünü düzenleyen vitamin A analoglarıdır [222]. Fenretinid (N-4-hidroksifenil-retinamid), peroksizom proliferatör-aktive reseptör (PPAR) agonisti olarak işlev gören yarı sentetik bir retinoiddir [223]. Fenretinid tedavisi, ROS ve reaktif azot türlerinin (RNS) oluşumuna neden olur. Retinoid reseptörleri ve reseptör aracılı olmayan SER indüksiyonu da dahil olmak üzere farklı yolların aktivasyonunda rol alır. ROS'un indüksiyonu, antiinflamatuvar homeostatik yolları tetikleyerek malign hücreleri ve bakteri infeksiyonunu ortadan kaldırmaya yardımcı olan önemli bir koruyucu konak savunma mekanizması olarak düşünülür [224-226]. Fenretinid, anti kanser tedavisi ve profilaksisinde yaygın olarak kullanılır [227] ancak, KF hava yolu epitelindeki etkileri

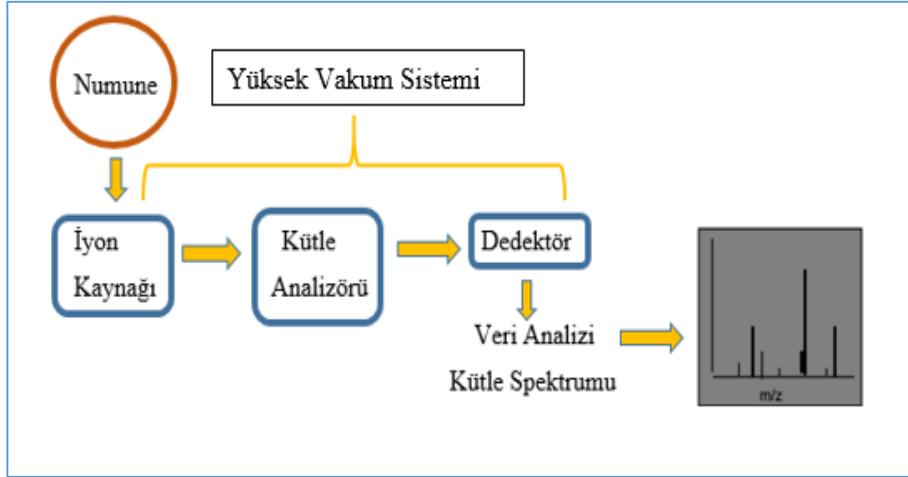
tam olarak bilinmemektedir. SER düzeylerini SMaz yolak aracılığı ile değil, de-novo yolla arttırdığı düşünülmektedir [228]. Bu nedenle hem de-novo yolak üzerinden etki ettiği için SMaz aktivitesini azaltması, hem de SER miktarını arttırması proinflatuvar etkileri azaltabilir [229].

KF'de düşük SER düzeyleri raporlayan araştırmacılar, normal lipit düzeyleri olan KF hastalarının daha hafif bir KF formu gösterebileceğini öngörmüşlerdir [230]. Bu nedenle KF hayvan modellerine uygulanan fenretinid tedavisi, yağ asidi dengesizliğini düzelterek, SER üretimini artırarak normalize etmiştir. Ayrıca KF ilişkili osteoporozdaki iyileştirici etkileri gösterilmiştir. Fenretinid tedavisiyle plazma SER düzeyinin artması, araşidonik asit düzeyinin azalması trabeküler kemik yoğunluğunun artmasıyla ilişkili bulunmuştur [231]. Hastalık şiddetini azaltma açısından fenretinid yeni bir tedavi ajanı olabilir.

2.3.4. Likit kromatografi–Tandem Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi (MS), maddenin moleküler yapısının ortaya konması, kantitatif veya hem kantitatif hem kalitatif olarak incelenmesini sağlayan, yüksek hassasiyetli analitik bir tekniktir. MS ile makromoleküller incelenebileceği gibi, çok düşük düzeydeki bileşikler de incelenebilir.

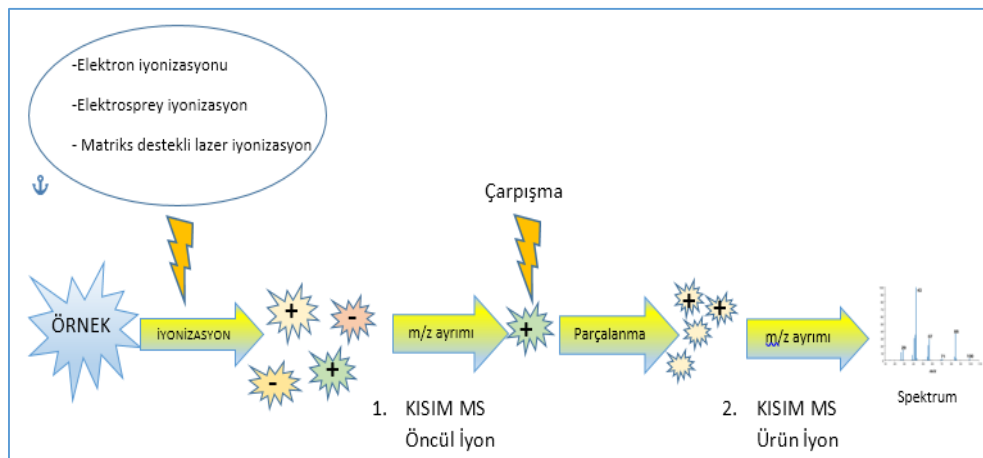
MS; iyon kaynağı, vakum sistemi, kütle analizörü, detektör ve bilgisayardan oluşmaktadır. MS ile hedef moleküller önce gaz fazına geçirilerek iyonize edilir [232]. Örnekteki moleküller, anoda doğru akan bir elektron akımı tarafından doğrudan veya dolaylı olarak iyonlaştırılırlar. Daha sonra molekülün ve parçalarının kütle/yük (m/z) oranları tespit edilir. Böylece iyonik moleküller m/z oranlarına göre tanımlanır. Çoğu zaman her iyon tek bir yüke ($m=z$) sahiptir. Bu durumda m/z kütleyle eşit olur [232].



Şekil 2. 9. Kütle spektrometresinin bileşenlerinin şematik görünümü

İyonların m/z oranlarının göreceli miktarı kütle spektrumunda izlenir [232].

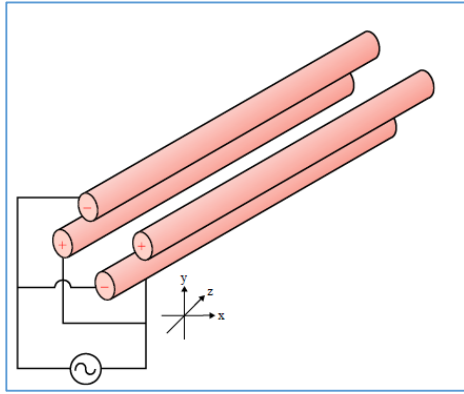
Tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ise isminden de anlaşılacağı gibi 2 aşamalı MS'den meydana gelmiştir. MS/MS'in ilk aşamasında istenilen m/z oranına sahip olan iyon, iyon kaynağından çıkan diğer iyonlardan ayrılır. Ana iyon veya öncül iyon olarak adlandırılan bu iyonlar MS/MS'in 2. aşamasında kütle ve yüklerinin değişeceği kimyasal bir reaksiyona girerek ürün iyonunu oluştururlar. Tipik olarak bu reaksiyonlar, neden oldukları çeşitli süreçlerle iyonların iç enerjilerinin artmasına ve böylece ayrışmalarına sebep olurlar [233]. Özgün molekülün parçalanmamış iyonuna moleküler iyon adı verilir. Moleküler iyonun daha küçük parçalara ayrılmasıyla fragman iyonlar meydana gelir (Şekil 2.10.).



Şekil 2. 10. Tandem MS (MS/MS)'in çalışma prensibinin şematik görünümü

İyonları farklı şekilde ölçen ve günümüzde kullanılan 4 farklı MS türü vardır. Bunlar, kuadripol, time-of-flight, iyon tuzağı ve Fourier dönüşümü-iyon siklotron rezonansı (FT-ICR veya FT-MS)'dir. Herbirinin analiz türüne göre avantaj ve dezavantajları vardır.

Kuadripol MS, kare şeklinde konumlandırılmış elektriksel olarak iletken 4 paralel çubuktan oluşur (Şekil 2.11.).



Şekil 2. 11. Kuadripollerin şematik görünümü [232].

Çubuklar, iyon demetinin geçtiği uzun bir kanalı çevrelemektedir. Çubuklara direk akım ve radyofrekans uygulanarak, elektromanyetik bir alan oluşturulur. Dörtlü kutup dizisine giren iyon demeti, çeşitli m/z değerlerine sahip iyonların bir karışımı içerir; ancak belirlenmiş m/z aralığında olan iyonlar başarıyla taşınarak detektöre ulaşabilirler. Bu dar aralığın dışındaki iyonlar ise dışarı atılır. Kuadripol MS'leri 2 farklı moda kullanılabilir. Bunlar, seçilmiş iyon modu (SIM) ve tarama modu (SCAN)'dur [232]. SCAN modunda belirli bir aralıktaki m/z değerine sahip olan iyonlar izlenir. SIM modu ise SCAN moduna göre çok daha sensitif olup, sadece belirlenmiş m/z oranlarına sahip birkaç iyonun izlenmesinde kullanılır. Ancak daha az iyon hakkında bilgi verir. SIM modu önceden belirlenmiş hedef bileşiklerin analizinde kullanılırken, SCAN modu analit kütlelerinin bilinmediği veya tüm iyonların taranmak istendiği durumlarda kullanılır [233].

MS veya tandem MS, gaz kromatografi (GC-MS veya GC-MS/MS) veya sıvı kromatografi (LC-MS veya LC-MS/MS) ile birleştirildiklerinde, kolon ayrımı da sürece katıldığından, hassas ölçüm özelliği olan ve kromatogram ayırt etme gücü ile özgüllüğü oldukça yüksek, çok yönlü, güçlü analitik cihazlar meydana gelir. Bu

nedenle klinik laboratuvarlarda protein, peptid, lipit, ilaç, oligonükleotid gibi organik analitlerin tanımlanması ve ölçülmesi amacıyla sık tercih edilirler [232].

İyonlar MS'de yüksek vakum altında analiz edilirler. Bu süreçteki en önemli reaksiyon tartışmasız analitlerin gaz fazındaki iyonlara dönüştürülmesidir. Elektron iyonizasyon işlemi tarihsel olarak basitçe 2 basamakla özetlenebilir. İlk basamak örneğin uçurulması, ikinci basamak ise iyonlaştırılmasıdır. Ancak bu yaklaşım uçuculuğu az, yüksek polariteli moleküllerin analizinde kısıtlayıcı olmuştur. Bu nedenle son 20 yılda büyük molekül ağırlıklı, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız bileşiklerin gaz fazı iyonuna dönüştürülebilmesi için yeni iyonizasyon teknikleri geliştirilmiştir [233]. Uçucu olmayan ve termal labil bileşiklerin analizi için birincil olarak elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve matriks destekli lazer iyonizasyon (MALDI) tercih edilmektedir. Bunların dışında, elektron iyonizasyonu (EI), atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI), atmosferik basınçlı fotoiyonizasyon (APPI), induktif işlenmiş plazma (ICP) ve gibi farklı iyonizasyon teknikleri mevcuttur [232, 233].

GC/MS'de en yaygın kullanılan iyonizasyon şekli elektron iyonizasyonu (EI)'dur. Bu yöntem tipik olarak 70eV elektrik potansiyelinin uygulandığı filament şeklinde bir elektron kaynağı gerektirir [234]. Moleküller yüksek enerjili elektronlar ile bombardıman edilir. Böylece yüklü moleküler iyonlar ve parçalar oluşur. Moleküller, moleküler yapılarına göre karakteristik parçalara ayrılır [235].

LC/MS'de ise en sık kullanılan iyonizasyon metotları, yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) aracılığıyla sağlanan, bu çalışmada da kullanılan elektrosprey iyonizasyon (ESI) veya atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI)'dur.

2.3.4.1. Elektrosprey İyonizasyon

ESI, LC/MS'de en yaygın kullanılan iyonizasyon yöntemidir. Küçük moleküller dahil çok fazla sayıda biyolojik makromoleküllere uygulanabilir. LC'den çıkan madde, voltaj uygulanan bir kapillerden geçirilir [234]. Enerjinin bu şekilde aktarılmasıyla çözücü damlacıkları yüklü hale gelir. Isı ve gaz ile çözücü buharlaştırılır, böylece damlacıkların boyutu azalır ve yüzey üzerindeki yük yoğunluğu artar [235].

ESI ve APCI yumuşak iyonizasyon teknikleridir. Yumuşak iyonizasyonda kaynaktaki moleküler iyonlar büyük ölçüde intakt bırakılır. Genelde molekülleri parçalamak, yavru iyon oluşturmak için kaynaktan sonraki teknolojiler kullanılır [235].

Son zamanlarda MS'in daha da geliştirilerek başka ayırma teknikleriyle birleştirilip kullanılması, özgün lipit moleküllerinin saptanmasına ve böylece yeni biyobelirteç araştırmalarına olanak sağlamıştır [236].

Lipid Maps konsorsiyumu tarafından biyolojik olarak lipitler genel olarak 8 kategoriye ayrılmışlardır. Her kategoride, omurga yapısındaki polar baş grubuna göre kendi altında farklı gruplara ve alt gruplara ayrılırlar [237]. Çeşitli yağ asidi zincirlerinin omurga yapısının farklı yerlerine bağlanmasıyla özgün birçok lipit molekülü meydana gelir. Plazmada çok fazla sayıda lipit türü belirlenmiş ve bunların 500'den fazlası ölçülmüştür [238].

Sfingolipit analizleri için, diaçilgliserol (DAG) kinaz yöntemi [171], ince tabaka kromatografisi [231], HPLC, GC, GC/MS, HPLC/MS [15, 239] gibi çok farklı metotlar kullanılmıştır. MS metodolojisi, kullanıcıların tüm sfingolipit türlerinin bileşimindeki değişiklikleri izlemelerine olanak tanır. Ancak; lipitlerin yapısal çeşitliliğinden dolayı, kapsamlı analizlerinin tek bir metotla yapılması yanıltıcı olabilir. Bu nedenle lipidomik çalışmalarında MS; gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografisi (LC) gibi farklı çeşitli ayırma teknikleri ile birleştirilmiştir [240, 241]. Yakın zamanda elektrosprey MS ve MS/MS'in geliştirilmesi ile moleküler tür analizi için, hızlı, hassas ve niceliksel bir yöntem sağlanmıştır. MS/MS ile sıvı kromatografisi kombinasyonundan meydana gelen, sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) sfingolipit metabolitlerinden SER gibi moleküler türlerin hücre içi seviyesinin belirlenmesini mümkün kılmıştır [242, 243]. Lipit analizlerinde en sık ters faz likit kromatografisi (RPLC) ile normal faz likit kromatografisi (NPLC) yöntemleri kullanılmaktadır [236]. NPLC'de sabit faz polar özellikli likit iken, mobil faz olarak göreceli olarak apolar bir solvent kullanılır. RPLC'de ise sabit faz apolar iken, mobil faz göreceli polardır. En popüler ters faz kolonu bizim de araştırmamızda kullandığımız oktadesil silika (ODS) veya C18 (18 karbonlu düz alifatik zincir) kolonudur [232]. XTerra C18 kolonu içinde bulunan partiküller hem organik (silika) hem de inorganik (organo siloksan) bileşenleri içererek, her ikisinin de avantajını

bir arada sağlar. Ayrıca, C18 kolonu apolar olduğundan, seramid ve sfingomyelin türlerinden açıl zinciri en uzun olan yani en apolar olanlar en geç elue olurken (örn. SER 24), açıl zinciri en kısa olanlar en erken elüe olurlar (örn. SM 16).

2.4. Kitin

Kitin; β -(1-4)-poli-N-asetil D-glukozaminin bir polimeri olup, selülozdan sonra doğada en çok bulunan 2. polisakkarittir. Mantarların, ev tozu akarlarının, yengeçlerin dış iskeletlerinin, karides ve böceklerin, parazit nematodların ve birçok böceğin sindirim sisteminin önemli bir bileşeni iken memelilerde bulunmaz [244]. Kitin yapısında bulunduğu organizmaları dış çevreden korur. Hücre içinde kitin sentaz tarafından sentezlenerek, plazma membranı yapısına katılır. Sert kristaller oluşturarak mikroorganizmanın sert kitinöz yapısını meydana getirir [245]. Biyosentezi ve yıkılması endojen kitinazlar vasıtasıyla gerçekleşir [22].

Kitin insanlarda bulunmasa da, günlük yaşamda kitin ve/veya kitin türevlerine maruziyet çok yaygındır. Memelilerin, kitin ve kitin türevlerine karşı immun reaksiyon gösterdikleri 1980'lerde keşfedilmiştir [246]. Bu çalışmalarda kitinin in-vivo ve eks-vivo önemli immünolojik etkiler meydana getirdiği gösterilmiş, daha sonraki çalışmalarda ise peritoneal ve alveoler makrofajlarla, doğal öldürücü hücre (NK)'lerden, IL-1 β , IFN- γ ve koloni stimule edici faktör (CSF) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyardığı kanıtlanmıştır [247]. Makrofajlardaki mannoz reseptör, toll-like reseptör 2 (TLR-2), C-tip lektin reseptör Dectin-1, Lökotrien B-4 reseptör (BLT-1) ile etkileşime girerek sitokin ve kemokinlerin salınmasına ve ortama nötrofil toplanmasına sebep olurlar [248]. Ayrıca kitinlerin doğal immune sistemi uyatarak alerjik tip 2 inflamasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir [249, 250].

2.5. Kitinazlar ve Kitinaz Benzeri Proteinler

Kitini parçalayan kitinaz olarak bilinen enzim, aktif kitinaz ve kitinaz benzeri proteinleri (enzimatik aktivitesi olmayan, ki-lektinler) kapsayan, insanlar ve memelilerde sentezlenen 18 glikozil hidrolaz ailesinin bir üyesidir. İnsanlarda, asidik

memeli kitinazı (AMCaz), kitotriozidaz (CHIT1), oviduktin, insan kıkırdak glikoproteini (HcGp)-39/YKL 40 ve YKL 39 tanımlanmıştır.

İnsanlar, asidik pH'da fonksiyonel olan ve kitini parçalayan 2 fonksiyonel kitinaz eksprese eder. Bunlar CHIT1 ve AMCaz'dır. [251-253]. Memelilerde kitinaz ve kitinaz benzeri proteinlerin salınımı makrofaj ve nötrofiller gibi fagositer hücrelerden gerçekleşir [21, 254, 255]. Salınımları, inflamasyon, infeksiyon ve doku yenilenmesi gibi durumlarda indüklenir. Bu proteinlerin antiinflamatuvar savuma ve onarım gibi yanıtlarda rol aldığı düşünülmektedir [22]. Kitinaz ve kitinaz benzeri proteinlerin, astım ve KF gibi kronik hastalıklardaki makrofajların alternatif aktivasyonlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [256, 257].

2.5.1. Kitotriozidaz Aktivitesi

Kitotriozidaz; nötrofil, matür monosit türevi makrofajlar, akciğer makrofajı gibi doku spesifik makrofajları içeren myeloid hücrelerde ve insanda esas akciğerlerde eksprese edilir [258]. Nötrofiller TLR stimülasyonu sonucunda, makrofajlar ise TLR stimülasyonu haricinde IFN- γ , TNF- α , granülosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) stimülasyonu sonucunda da kitotriozidaz salgırlar [255, 259].

Plazma kitotriozidaz aktivitesi lipit yüklü makrofajlarla karakterize olan Gaucher hastalığının tanı ve izleminde önemli bir belirteçtir [260]. Gaucher dışında diğer kalıtsal lizozomal depo hastalıklarında ve ayrıca aktif makrofajların rol aldığı ateroskleroz, hematolojik hastalıklar, kronik inflamatuvar hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, KF ve interstisyel akciğer hastalıklarında da yükseldiği gösterilmiştir [261-263].

2.5.2. YKL-40

İnsan kıkırdak glikoproteini (HcGp)-39 veya kitinaz 3 benzeri 1 (CHI3L1) olarak da bilinen YKL-40, kitine bağlanan ancak kitini hidroliz etme özelliği olmayan bir glikoproteindir. Geni, insanda 1q32.1 konumunda lokalizedir [264]. Yapısal olarak 18 kitolektinler veya 18 glikozil hidrolaz ailesinde yer alırlar [265]. YKL-40'ın enzimatik aktivitesi bulunmaz. Bu durum; enzimatik aktivitesi olan kitinazların

terminal glutamat kalıntısı taşınması, ancak YKL-40'da katalize katılan glutamat yerine lösin, aspartat yerine alaninin geçmiş olması ile açıklanabilir [266].

Nötrofil, makrofaj, kondrosit, fibroblast, vasküler düz kas hücreleri gibi çeşitli hücrelerden salgılanır. Salınımları IFN- γ , IL-6, IL-13, vazopressin, paratiroid ilişkili hormon gibi çeşitli sitokin ve hormonlarla ile uyarılır. [21, 267-271]. İnsan hücrelerinde apoptoz, proliferasyon, hücre sağkalımı, MAPK ve sitokin yollarını düzenlediği gösterilmiştir [271].

Serum YKL-40 düzeyleri, kanser, osteoartrit, kardiyovasküler hastalıklar, inflamasyonla seyreden hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, doku yenilenmesi ve fibrozisde biyobelirteç olarak araştırılmış [272-276], aynı zamanda astım, atopi ve immunité aracılı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [256, 277]. Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre; KF hastalarının artmış balgam YKL-40 düzeylerinin pulmoner fonksiyonlarla korele olduğu, serum düzeylerinin de sağlıklı kontrole göre yüksek olduğu raporlanmış, bu nedenle YKL-40'ın KF akciğer hastalığında faydalı bir biyolojik belirteç olabileceği savunulmuştur [19, 20].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler

1. Amonyum format 50 g (Sigma - 17843)
2. N-palmitoil-D-sfingozin 5 mg [(d18:1/16:0) Cambridge Isotope Lab.-CLM-9582-PK]
3. C 16 Seramid 5 mg [(d18:1/16:0) Avanti Polar Lipids-860516]
4. C 18 Seramid 5 mg [(d18:1/18:0) Avanti Polar Lipids-860518]
5. C 20 Seramid 5 mg [(d18:1/20:0) Avanti Polar Lipids-860520]
6. C 22 Seramid 5 mg [(d18:1/22:0) Avanti Polar Lipids-860501]
7. C 24 Seramid 5 mg [(d18:1/24:0) Avanti Polar Lipids-860524]
8. 16 SM 5 mg [(d18:1/16:0) Avanti Polar Lipids-860584]
9. 18 SM 5 mg [(d18:1/18:0) Avanti Polar Lipids-860586]
10. 24 SM 5 mg [(d18:1/24:0) Avanti Polar Lipids-860592]
11. İzopropanol (2-propanol) (Sigma-34965-2,5 L)
12. Kloroform (Sigma-650498)
13. Asetonitril (Sigma Aldrich 34851-2,5 L)
14. Formik asit (Merck 1002641000 %98)
15. Metanol (Sigma Aldrich 34885-2,5 L)
16. Human Chitinase 3-like 1/YKL-40 PicoKine™ 96 kuyucuklu elisa kiti (EK0974)
17. Sitrik asit monohidrat (Merck 100244)
18. Disodyum hidrojen fosfat (Merck 106586)
19. Glisin (Merck 104201)
20. 4-Metilumbelliferil Na⁺ tuzu (Sigma M 1381)
21. 4-Metilumbelliferil β-D-N,N',N''-triasetilkitotriosid (Sigma M 5639)
22. Sodyum hidroksit (Merck 106498)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Malzemeler

1. Analitik kolon [(X Terra C18 seçiciliği ters faz, 50 × 2.1 mm, partikül büyüklüğü 2.5 µm, akış hızı 0,450 mL/dk, injeksiyon hacmi 10 µL) Waters 186000594]
2. Ultra hızlı sıvı kromatografisi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan)
3. LCMS-8040 triple kuadrupole kütle spektrometresi (Shimadzu Corporation, Japan)
4. Fluorometre (Molecular Devices SpektraMax M2 Microplate Reader)
5. Vorteks (Velp Scientifica 2X³)(Heidolph Reax 2000 shaker)
6. Santrifüj (Nüve NF-1200R)
7. İnkübatör (Nüve EN 500)
8. pH metre (Mettler toledo MP220)
9. -80 °C derin dondurucu (MDF-U6086S)
10. Distile su cihazı (mpMinipure SUPER OTO-UP OTO)
11. Hassas terazi (Mettler Toledo AG204)
12. Sonikatör (Bandalin Sonorex)
13. Azot uçurucu (VLM GmbH 33689 Bielefeld 1302001)

3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışma grupları, bilgilendirilmiş onam formlarını (erişkin, çocuk, ebeveyn onam formları) okuyarak çalışmaya katılmayı kabul edenlerin dahil edilmesiyle oluşturuldu. Bu araştırma için etik kurul izni, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (GO 16/454-34). Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından da desteklenmiştir (proje kodu: THD -2016-12638).

Çalışmamız, vaka-kontrol tipi bir araştırma olup, üniversitemiz Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı tarafından KF tanısıyla izlenen, akut alevlenme sebebiyle yatışı yapılan, çalışmaya katılma ölçütlerini taşıyan, çalışmaya katılmayı kabul eden 18 yaş ve üzerindeki erişkin hastalar ile 6-17 yaş arasındaki çocuk hastaların ve kontrol grubu olarak sağlıklı bireylerin dahil edilmesiyle

gerçekleştirilmiştir. Çocuk hastalardan kendi onamları yanısıra ebeveynlerinden de onam alınmıştır.

Sağlıklı kontrol grubu, hastalara uygun yaş aralığında oluşturulmuştur. Erişkin kontroller sistemik akut üst solunum yolu ve alt solunum yolu enfeksiyonu olmayan, çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden, çocuk kontroller ise sistemik akut üst solunum yolu ve alt solunum yolu enfeksiyonu olmayan, kendisi ve velisi çalışmaya katılmayı kabul eden, çocuk sağlığı ve hastalıkları bölümüne diğer nedenlerle başvuran çocuklardan oluşturulmuştur.

KF tanısı hastalık ile uyumlu klinik bulguların yanısıra, farklı zamanlarda yapılan en az iki ter testinde Cl^- değerlerinin hastalık ile uyumlu yüksek değerlerde bulunması ($\geq 60 \text{ mEq/L}$) ve/veya genetik çalışma ile her iki allelde hastalığa neden olan mutasyonun gösterilmesi ile konulur.

KF hastalarında akut alevlenme ise; balgam hacim veya renginde değişiklik, öksürüğün artması, yorgunluk, halsizlikde artma, iştahsızlık ve kilo kaybı, solunum fonksiyon testlerinde %10 ve daha fazla azalma/radyolojik bulgular, dispnede artma belirteçlerinden en az ikisinin olması ile tanımlanmıştır.

Kendileri ve/veya aileleri onam vermeyen hastalar ile sağlıklı bireyler, sistemik steroid ve immunsupresif kullanan hastalar, çocuk hastalarda FEV1 düzeyi $\leq 40\%$ olanlar (erişkin hastalarda hastalık daha ilerlemiş seviyede olduğundan FEV1 düzeyi $\leq 40\%$ olanlar çalışmaya alınmıştır), 6 yaş altındaki çocuklar (solunum fonksiyon testleri değerlendirilemediğinden), balgam kültürlerinde *B. cepacia* üreyen hastalar ve alerjik bronkopulmoner aspergillozis tanısı olanlar çalışmaya dahil edilmemiştir. Alevlenme atağı döneminde çalışmaya alınan hastalardan yeterli tedavi almayan hastalar çalışmadan çıkarılmışlardır.

Akut pulmoner alevlenme kriterlerine uyan ve tedavi için yatışı yapılan, pulmoner alevlenme dışında inflamasyonu olmayan hastalardan alevlenme kanları, antibiyotik tedavisi akabinde taburcu olurlarken taburculuk dönemi kanları ve taburcu olduktan sonraki 3 ay içindeki kontrol başvurularında ise kontrol dönemi kanları etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'li tüplere alınmıştır.

Göğüs Hastalıkları AD'dan akut alevlenmeyle yatışı yapılan 15 erişkin hastanın alevlenme dönemi kanları, 13 hastanın taburculuk dönemi kanları, 11 hastanın ise taburcu sonrası kontrol dönemi kanları toplanmıştır.

Çocuk Sağlığı Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı'ndan akut alevlenmeyle yatışı yapılan 19 çocuk hastanın alevlenme dönemi kanları, 11 hastanın taburculuk dönemi kanları, 9 hastanın ise kontrol dönemi kanları toplanmıştır.

Sağlıklı kontrol grubu ise 15 erişkin ve 17 çocuktan alınan kanlarla oluşturulmuştur.

3.3. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

EDTA'lı tüplere alınan tam kan, aynı gün içinde 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi, plazma ayrıldı. Plazmalar birden fazla ependorfa bölünerek, analize kadar -80°C'de saklandı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Seramid ve Sfingomyelinlerin Analizi

3.4.1.1. Mobil Fazların Hazırlanması

Mobil Faz A: 400 mL su, 50 mL asetonitril ve 50 mL izopropanol (80: 10: 10 v/v içinde 10 mM amonyum format) içermektedir. Sonikasyon işlemi ile içerisinde 0,32 gr (10mM) amonyum format çözdürülerek oluşturulmuştur.

Mobil faz B: 450 mL asetonitril ile 50 mL izopropanol (90: 10 v/v içinde 10 mM amonyum format) içermektedir. Sonikasyon işlemi ile içerisinde 0,32 gr (10 mM) amonyum format çözdürülerek oluşturulmuştur.

3.4.1.2. SER ve SM Standartlarının Hazırlanması

HÜBAP projesi kapsamında satın almış olduğumuz ticari standartlar; 5'er mg'lık toz haldeki SER 16, 18, 20, 22, 24, döteryum işaretli internal standart (IS) SER 16 ve SM 16, 18, 24 idi. Prof. Dr. Mutay Aslan'ın modifiye ettiği protokole göre [278], 9 standardın her biri ayrı ayrı 3 mL etanolde çözüldü. 1,66 mg/mL (1660 ng/μL) konsantrasyonlu ana stok hazırlandı. Ana stoktan 30 μL alınarak metanol ile 1000 μL'ye tamamlandı. 50 ng/μL (50000 ng/mL) konsantrasyonlu 1. ara stok hazırlandı. 1. ara stoktan 100 μL alınarak metanol ile 1000 μL'ye tamamlandı. 5 μg/mL (5000

ng/mL) konsantrasyonda olan 2. ana stok oluşturuldu. IS hariç diğerlerinin 2. ana stoklarının her birinden 100 µL alınarak birleştirildi ve toplamda 800 µL olan standart karışımı oluşturuldu. Bu standart karışımına IS'ın 2. ana stoğundan tabloda belirtilen miktarlarda IS ve metanol eklenerek seri konsantrasyonlu standartlar elde edildi (Tablo 3.1.).

Tablo 3. 1. SER ve SM standartlarının hazırlanması

	Standart karışımı (µL) (625 ng/mL)	Metanol (µL)	IS (µL) (5000 ng/mL)	Konsantrasyon (ng/mL)
1. standart	196,6	-	3,4	625,000
2. standart	300,1	290,0	10,0	312,500
3. standart	150,0	440,0	10,0	156,250
4. standart	75,0	515,0	10,0	78,125
5. standart	37,5	552,5	10,0	39,062

3.4.1.3. Örneklerin Hazırlanması

1. -80 °C'lik buzdolabından çıkarılıp çözünen ve vortekslenen plazma örneklerinden 25 µL alınarak distile su ile 500 µL'ye tamamlandı. 20 kat dilüe edildi.
2. Her örneğe, IS stoğundan (5000ng/mL) 2 µL eklendi.
3. Üzerine 375 µL kloroform/metanol (1:2 v/v) eklendi.
4. Örnekler 30 sn sonike edildi.
5. 100 µL distile su (dSu) ilave edildi.
6. 5 dk boyunca tüm rak vortekslendi.
7. Oda ısısında 30 dk bekletildi.
8. 2000g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatantlar numarandırılmış yeni tüplere alındı.
9. 125 µL kloroform, 125 µL dSu eklendi.
10. Tüpler tek tek vortekslenerek oda ısısında 30 dk bekletildi.
11. Numune sayısı kadar konik tüp hazırlanarak numarandırıldı ve yaklaşık 500 µL kadar üst organik tabaka bu tüplere aktarıldı.

12. Azot altında uçurma işlemi yapıldı.
13. Örnek 100 µL metanol/ formik asit (99,1:0,1 v/v) ile çözüldü ve parafilmle kapatıldıktan sonra vortekslenerek tamamı viallere aktarıldı.

3.4.1.4. Standartların ve Örneklerin Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometre ile Çalışılması

Analizi yapılan sfingolipitlerin öncül ve ürünlerinin m/z değerleri tabloda verilmiştir.

Tablo 3. 2. Analizi yapılan sfingolipitlerin öncül ve ürünlerinin m/z değerleri

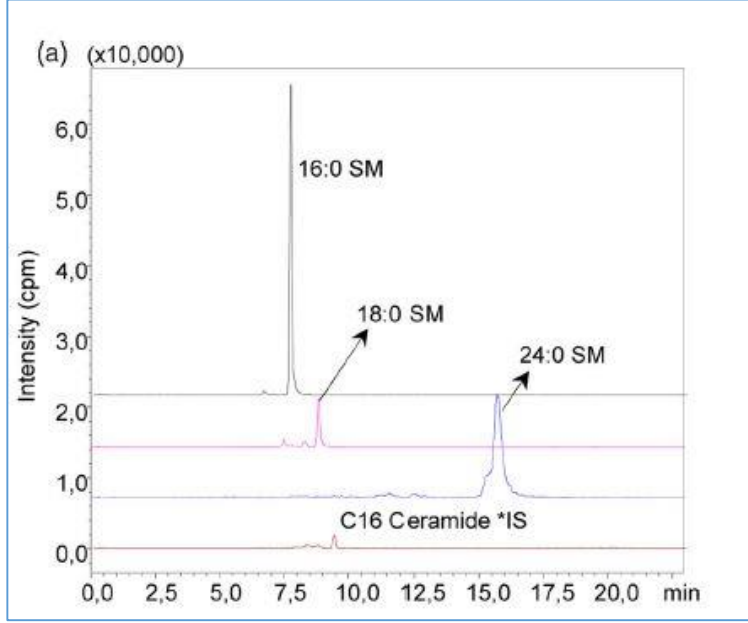
16:0 SM (d18:1/16:0)	703.30	→	184.20
18:0 SM (d18:1/18:0)	731.40	→	184.20
24:0 SM (d18:1/24:0)	815.50	→	184.20
C16 SER (d18:1/16:0)	538.50	→	264.40
C16 SER (d18:1/16:0) *IS	554.30	→	264.30
C18 SER (d18:1/18:0)	566.30	→	264.40
C20 SER (d18:1/20:0)	594.60	→	264.50
C22 SER (d18:1/22:0)	622.60	→	264.40
C24 SER (d18:1/24:0)	650.40	→	264.30

Kromatografik ayrımlar ultra hızlı sıvı kromatografisi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan) ile eşleşmiş LCMS-8040 triple kuadrupol kütle spektrometresi (Shimadzu Corporation, Japan) ile ters faz C18 kolon (X Terra, 50×2.1 mm, 2.5 µm; Waters 186000594) kullanılarak, 60°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. SER ve SM'ler akış hızı 0,450 ml/dk olan gradient elüsyon kullanılarak ayrılmıştır.

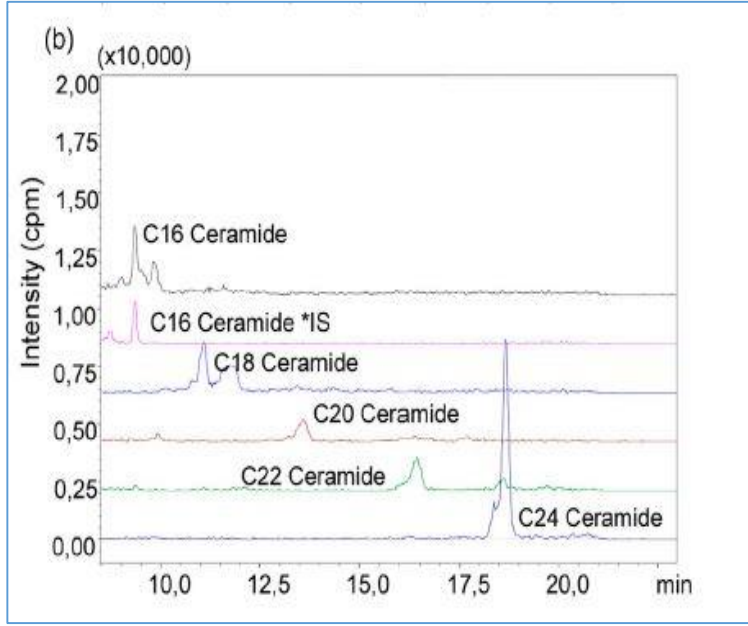
Mobil faz B'nin gradient programı %65 (0 dk), %65 (0-2 dk), %90 (2-7 dk), %90 (7-13 dk), %90 (13-30 dk), %65 (30-30.01 dk) ve %60 (30.01-60 dk) olarak kullanılmıştır.

SM ve SER'ler; 39,062 - 625,000 ng/mL lineer kalibrasyon aralığında optimize edilmiştir. İnjektion volümü 10 µL ve örnek ölçüm süresi 35 dakika olarak belirlenmiştir. Pozitif elektrosprey-iyonizasyon (ESI) modunda ölçüm yapılmıştır.

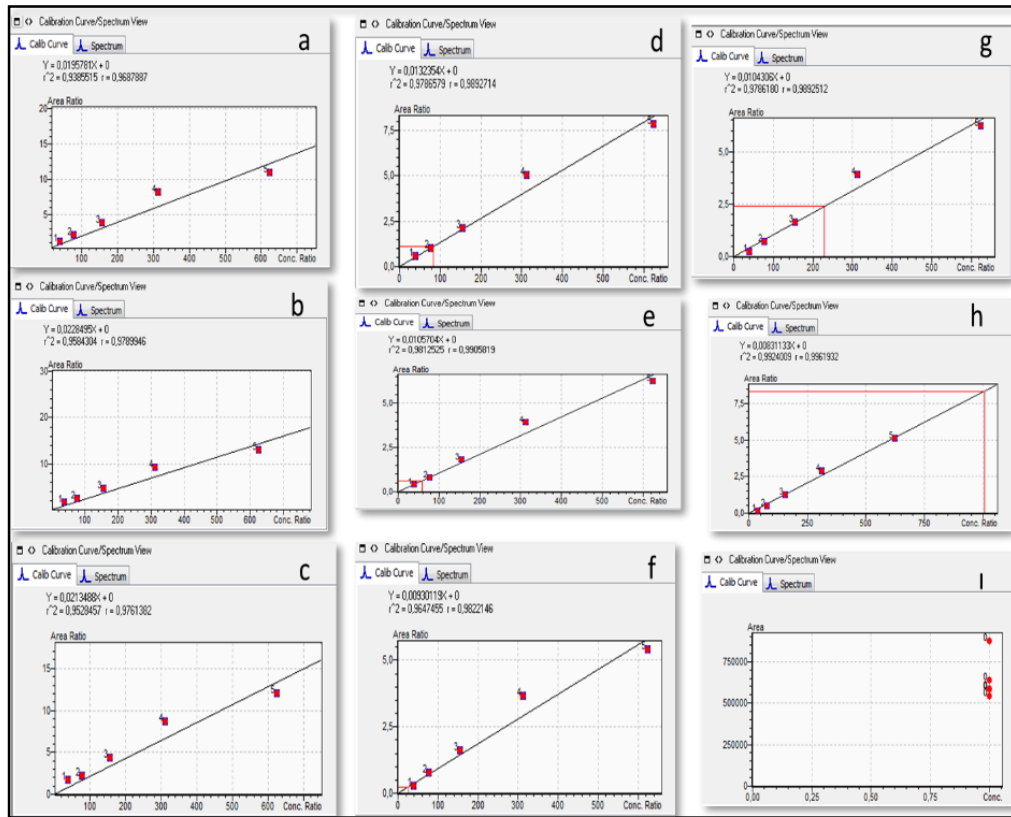
SER ve SM'lerin standart kromatogram örnekleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.).



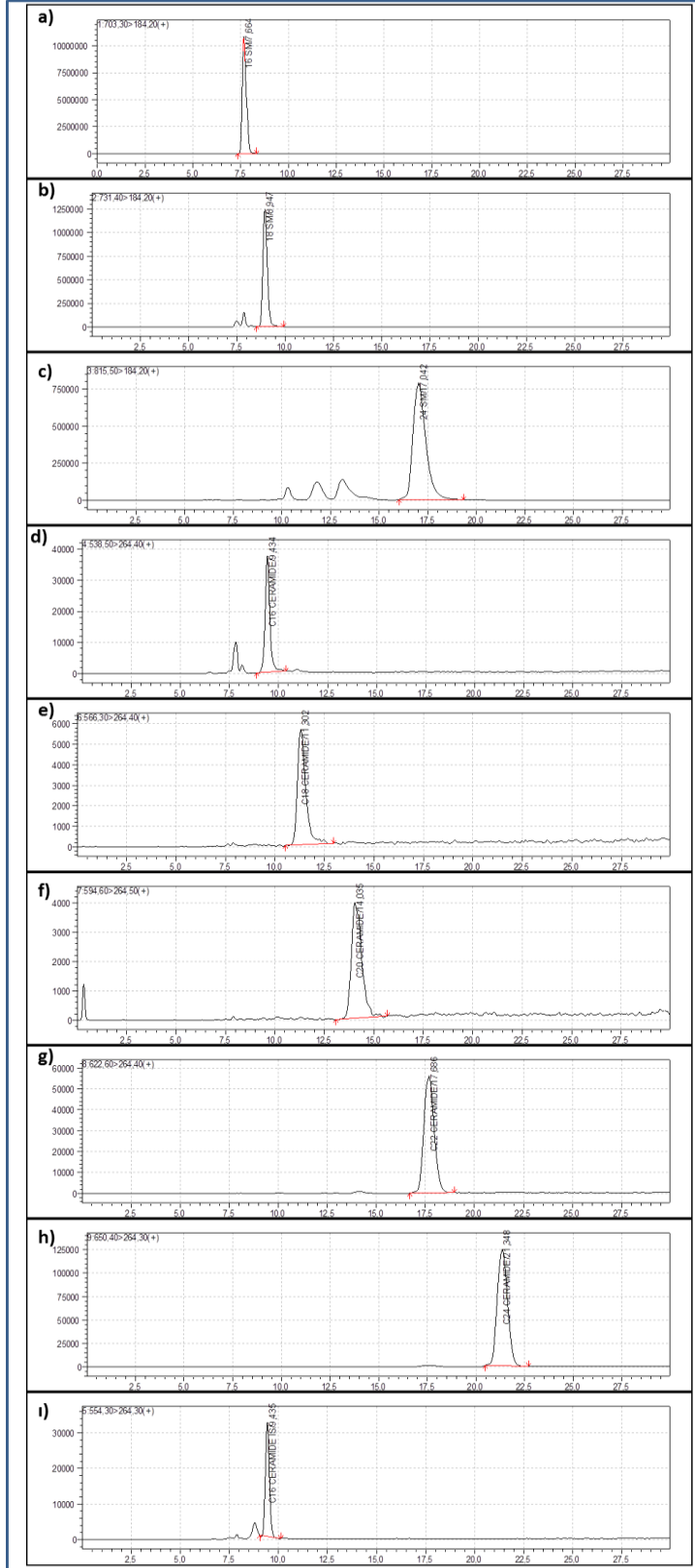
Şekil 3. 1. SM 16, 18 ve 24'ün standartları ile IS SER 16'nın LC-MS/MS kromatogramları [278].



Şekil 3. 2. SER 16, 18, 20, 22 ve 24 standartlarının LC-MS/MS kromatogramları [278].



Şekil 3. 3. SER ve SM standartlarına ait kalibrasyon eğrileri. a) 16 SM b) 18 SM c) 24 SM d) 16 SER e) 18 SER f) 20 SER g) 22 SER h) 24 SER i) 16 SER IS.



Şekil 3. 4. Bir hastanın örnek SER ve SM kromatogramları a) 16 SM b) 18 SM c) 24 SM d) 16 SER e) 18 SER f) 20 SER g) 22 SER h) 24 SER i) 16 SER IS

3.4.2. Kitotriozidaz Enzim Aktivite Tayini

Plazma kitotriozidaz enzim aktivitesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında florometrik yöntemle ölçülmüştür.

3.4.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Durdurucu tampon hazırlığı; 37,5 gr glisin [molekül ağırlığı (MA) 75,07 gr] tartıldıktan sonra üzerine 800 mL kadar dSu eklendi. Bu sırada %30'luk NaOH çözeltisi elde etmek için 30 gr NaOH tartılarak yaklaşık 80 mL dSu'da çözüldü. Çözüldükten sonra dSu ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden, glisin çözeltisine pH'ı 10,0 olacak şekilde ekleme yapıldı ve dSu ile 1000 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında ışıktan korunarak saklandı.

Sitrat ve fosfat tampon hazırlığı; 4,20 gr sitrik asit (MA 210,14 gr) tartılarak dSu ile çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı.

5,67 gr Na₂HPO₄ (MA 141,96 gr) tartılarak dSu ile çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı.

Hazırlanan sitrik asit çözeltisinden 23,3 mL sodyum fosfat dibazik çözeltisinden ise 26,7 mL alınarak pH 5,2 olacak şekilde ayarlanarak dSu ile 100 mL'ye tamamlandı. 4°C'de saklandı.

3.4.2.2. Substrat Hazırlığı

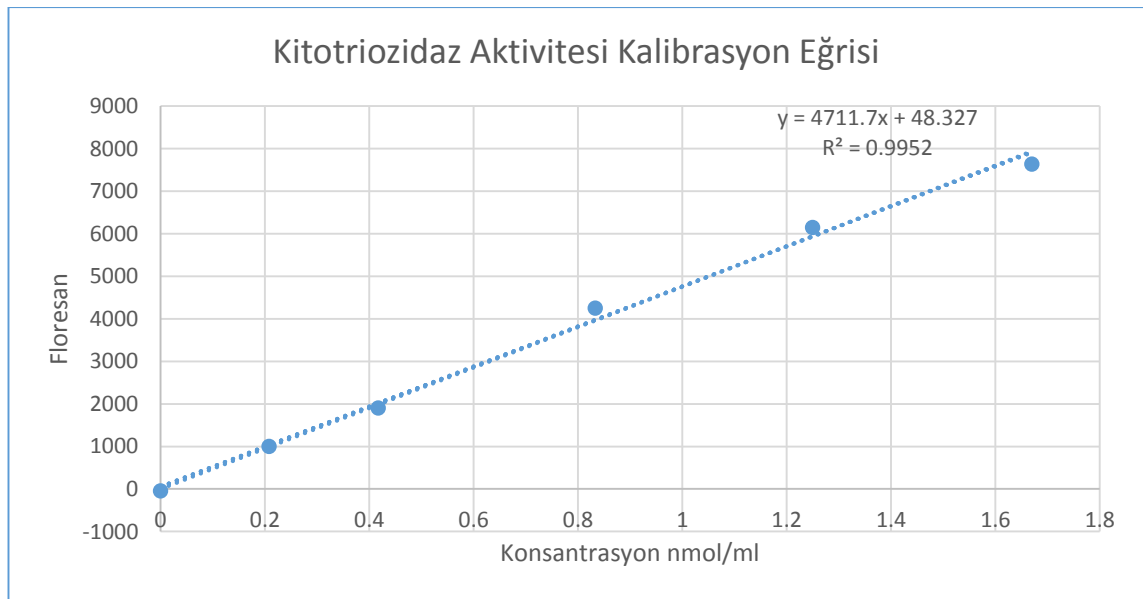
1 mg 4-Metilumbelliferil β -D-N,N',N''-triasetilkitotriosid (MA 785,8 gr) tartılarak 23 mL 100 mM sitrat ve 200 mM fosfat tamponunda çözdürüldü. 70 mL dSu'ya tamamlandı. -20°C'de saklandı.

3.4.2.3. Standartların Hazırlanması ve Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi

4-Metilumbelliferil sodyum tuzu (4-MU) (MA: 176,2 gr)'dan 1,762 mg tartılarak 10 mL durdurucu tamponda çözüldü (1000 μ M). Buradan 0,1 mL 1 mM stok alınarak 9,9 mL durdurucu tampon ile 100 kat dilue edildi (10 μ M=10000 nmol). Kalibrasyon eğrisi için 6 düzey 4-MU kullanıldı (Tablo 3.3.). Doğru denklemi $y=4711,7x + 48,327$ olan standart doğru elde edildi (Şekil 3.8.). Okumalar çift yapılarak ortalamaları alındı (Eksitasyon: 365 nm, emisyon: 445 nm).

Tablo 3. 3. 4-MU sodyum tuzundan standartlarının hazırlanması

	Standart konsantrasyonu (nmol/mL)	Standart (µL)	dSu (µL)	Durdurucu tampon (µL)
0. standart	0,000	0	200	1000
1. standart	0,208	25	175	1000
2. standart	0,417	50	150	1000
3. standart	0,833	100	100	1000
4. standart	1,250	150	50	1000
5. standart	1,670	200	0	1000

**Şekil 3. 5.** Kitotriozidaz aktivitesi kalibrasyon eğrisi

3.4.2.4. Örneklerin Hazırlanması

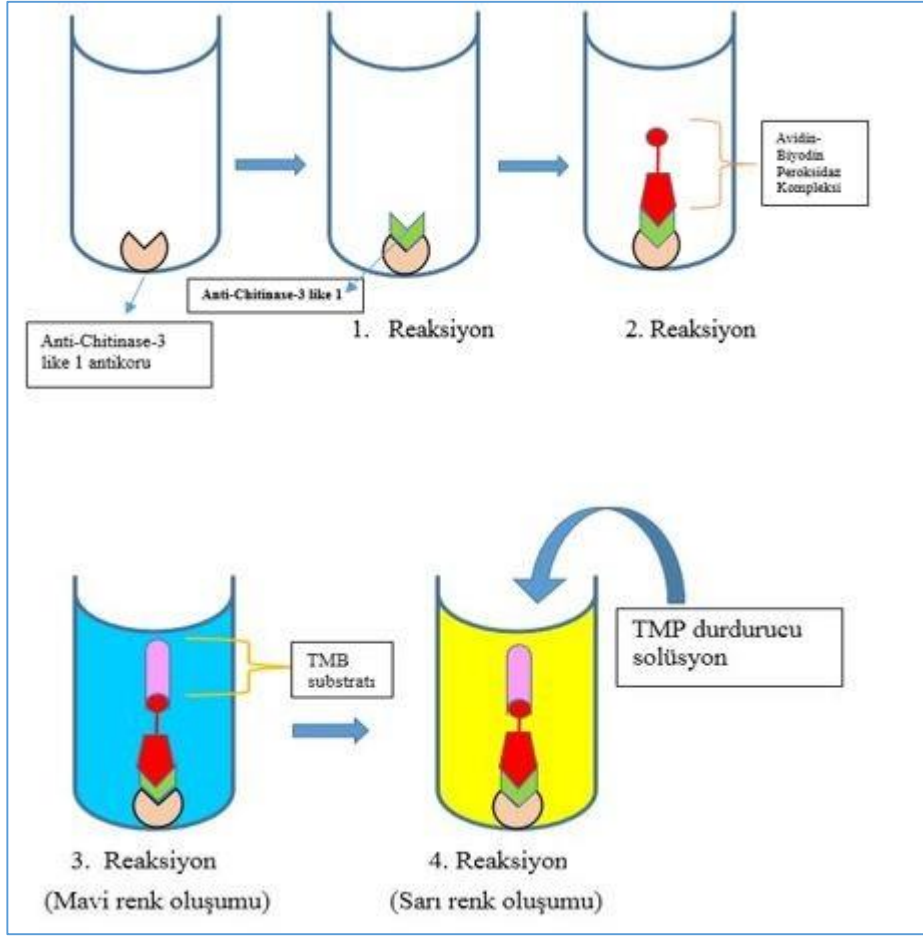
1. Plazma örnekleri 4 °C 5 dk 13000 rpm de santrifüj edildi.
2. Süpernatandan 45 µl ayrı bir ependorfa alınarak üzerine 5 µl sitrik asit eklendi. Bu aşamadan sonra deney çift yapıldı.
3. 5 µl plazma alınarak 100 µl substrat eklendi. Kör için plazma yerine dSu kullanıldı.

4. Vortekslenerek 37 °C'de inkübatörde 15 dk inkübe edildi.
5. 1000 µl glisin eklenerek reaksiyon durduruldu.
6. Floresan okuma opak plaka ile 365 nm eksitasyon, 445 nm emisyon dalga boyunda yapıldı.

İnkübasyon zamanı 0,25 saat, dilüsyon faktörü ise 243,1 olarak hesaplandı (nmol/mL/sa).

3.4.3. YKL-40'ın Ölçüm Prensibi

YKL-40 ölçümü plazma örneklerinde sandviç ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Human Chitinase 3-Like 1/YKL-40 Picokine Elisa Kit, Boster Biological Technology Co. Ltd. ABD). 96 kuyucuklu plaka, fareden elde edilmiş, Chitinase 3-like 1'e spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler kuyucuklara eklendikten sonra, keçiden elde edilmiş, biyotinlenmiş Chitinase 3-like 1'e spesifik poliklonal antikor eklenir ve kuyucuklar fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanarak bağlanmayan maddelerin ortamdan uzaklaşması sağlanır. Daha sonra kuyucuklara avidin-biyotin peroksidaz kompleks (ABC) eklenir ve bağlanmayan maddelerin atılması amacıyla PBS ile yıkama yapılır. Avidin, biyotine yüksek affinite gösterir ve genellikle irreversibl bağlanır. Avidin-biyotine bağlı olan peroksidaz ise yaban turpu peroksidazı, horseradish peroksidazı (HRP) olarak da bilinen ve biyokimyasal analizlerde sık kullanılan bir enzimdir [279]. HRP, kromojenik substratların renkli ürünlere dönüşmesini, kemilüminesan substratlarda ise ışık yayılmasını sağlar. Bu özelliğinden dolayı birçok ticari kitte kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan kitte HRP'nin enzimatik reaksiyonunu görünür hale getirmek amacıyla substrat olarak kuyucuklara 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) eklenmiştir. TMB, HRP tarafından katalize edilerek mavi renkli bir ürün oluşturur. Asidik durdurucu solüsyonun eklenmesiyle sarı renk oluşumu gözlenir. Plakadaki örneklerin bağlanmış Chitinase 3-like 1 miktarları sarı rengin yoğunluğu ile doğru orantılıdır.



Şekil 3. 6. YKL-40'ın şematik ölçüm protokolü

3.4.3.1. YKL-40'ın Ölçüm Protokü

Literatürde daha önceki çalışmalar incelenerek numunelerimizde 100 kat dilüsyon yapılmasına karar verildi.

Kit içerisinde çıkan tüpler kullanılmadan önce alt üst edildi ve solüsyonlar çalışmadan hemen önce hazırlandı.

Numuneler ve standartlar çift çalışıldı.

Yıkamalardan önce ve sonra plakaların tamamen kurumasına izin verilmedi.

Solüsyonlar kullanılmadan önce 30 dk 37°C'de bekletildi. Çalışma öncesi yapılan hazırlıklar aşağıda listelenmiştir.

1. Standart solüsyonunu hazırlamak için 10000 pg/mL olan chitinase 3-like 1 standart solüsyonuna 1 mL örnek dilüent tamponu eklendi. Vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.

2. 7 adet ependorf hazırlandı. Ependorfların 1.'sine 0,6 mL diğerlerine 0,3 mL örnek dilüent tamponu eklendi.

1. 1. Ependorfa hazırlanan standart solüsyondan 0,4 mL eklendi ve vortekslenerek konsantrasyonu 4000 pg/mL olan 1. standart elde edildi.

2. 1. Ependorftan 6. Ependorfa kadar herbirinden 0,3'er mL alınıp bir sonrakine eklendi. Daha önce pipetlenmiş olan 0,3 mL örnek dilüent tamponuyla karışması için vortekslendi ve böylece seri dilüsyon yapıldı. Konsantrasyonları 4000 pg/mL, 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL ve 62,5 pg/mL olan 7 adet standart solüsyon elde edildi.

3. Örneklerin 100 kat dilüsyonu için, örnek sayısı kadar ependorf hazırlandı. 3 µL örnek üzerine 297 µL örnek dilüent tamponu eklenerek vortekslendi.

4. Chitinase 3-like 1 antikör solüsyonunun hazırlanması için, bir tüpe chitinase 3-like 1 antikör solüsyonundan 100 µL alınarak üzerine 9900 µL antikör dilüent tamponu eklenerek vortekslendi. 100 kat dilüe edildi.

5. ABC solüsyonunun hazırlanması için, bir tüpe 100 µL ABC solüsyonu alınarak üzerine 9900 µL ABC dilüsyon tamponu eklenerek vortekslendi. 100 kat dilüe edildi.

6. Yıkama solüsyonunun hazırlanması için, kit içeriğinden çıkan toz halindeki karışım, 0,01 M PBS solüsyonu elde edilecek şekilde tartılarak 800 mL dSu'da çözüldü ve 1000 mL'ye tamamlandı.

Çalışma protokolü:

1. Plakaların her bir kuyucuğuna 0,1 mL ve çift olacak şekilde, kör, standartlar ve örnekler pipetlendi. Kör olarak örnek dilüent tamponu kullanıldı.

2. Plaka yapışkan jelatinle kapatılarak 37°C'de 90 dk inkübe edildi.

3. Jelatin çıkarılarak plaka içeriği lavaboya döküldü, kağıt havluyla tamamen kurummasına izin verilmeden nazikçe kurulandı.

4. Her bir kuyucuğa çok kanallı pipet yardımıyla 0,1 mL biyotinlenmiş chitinase 3-like 1 antikör solüsyonundan eklendi. Plaka yeni yapışkan jelatinle kaplanarak 37°C'de 60 dk inkübe edildi.

5. Yapışkan jelatin çıkarılarak plaka içeriği lavaboya döküldü, kağıt havluyla tamamen kurummasına izin verilmeden nazikçe kurulandı. Multichannel pipet kullanılarak her kuyucuğa 0,3 mL yıkama solüsyonu [0,01 M PBS] pipetlendi ve 1-2 dk beklendikten sonra plaka içeriği lavaboya döküldü, kağıt havluyla tamamen

kurumasına izin verilmeden kibarca kurulandı. Yıkama işlemi aynı prosedürler uygulanarak ard arda 3 kez gerçekleştirildi.

6. Her kuyucuğa 0,1 mL ABC solüsyonundan eklenerek, plaka yeni yapışkan jelatinle kaplandı. 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
7. Yapışkan jelatin çıkarılarak plaka içeriği lavaboya döküldü, kağıt havluyla tamamen kurumasına izin verilmeden nazıkçe kurulandı. PBS tamponu ile yıkama işlemi yukarıda açıklandığı gibi 5 kez art arda gerçekleştirildi.
8. Multichannel pipet ile her kuyucuğa 90 µL TMB renk oluşturucu ajan eklendi. Kuyucuklarda mavinin farklı tonlarının oluşumu gözlemlendi. Plaka yeni yapışkan jelatinle kapatılarak 37°C ve karanlıkta 15-20 dk inkübe edildi.
9. İnkübasyondan çıkarılan plaka kuyucuklarının her birinin üzerine çok kanallı pipet ile 0,1 mL TMB durdurucu solüsyon eklendi. Sarı renk oluşumu gözlemlendi.
10. Plağın 30 dk içinde SpektraMax M2 Microplate Reader ile 450 nm'de absorbansı okutuldu.
11. Standart ve örnekler çift çalışıldığından her birinin ortalaması alındı ve kör ortalaması herbirinden çıkarıldı. Standart eğri çizildikten sonra lineer eğri formülüne göre örneklerin YKL-40 konsantrasyonu hesaplandı. Örnekler başta 100 kat dilüe edildiklerinden her biri 100'le çarpıldı.

4. BULGULAR

4.1. Demografik, Klinik ve Rutin Biyokimyasal Veriler

Çalışmaya 15 erişkin KF hastası ile 19 çocuk KF hastası dahil edilmiştir. Pulmoner alevlenme sebebiyle yatışı yapılan ve takip edilen erişkin hastaların 15'inden alevlenme, 13'ünden taburculuk ve 11'inden kontrol dönemi, çocuk hastaların ise 19'undan alevlenme, 11'inden taburculuk ve 9'undan kontrol dönemi kanları toplanmıştır. Sağlıklı kontrol grubu ise 15 erişkin ile 17 çocuk bireyden oluşturulmuştur. Çalışmaya dahil edilen bireylerin demografik verileri, BKİ değerleri ve sigara kullanım oranları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4. 1. KF hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun demografik verileri

Değişken	Erişkin Kistik Fibrozis Hastaları	Erişkin Sağlıklı Bireyler	Çocuk Kistik Fibrozis Hastaları	Çocuk Sağlıklı Bireyler
N	15	15	19	17
E	11	6	6	12
K	4	9	13	5
Yaş (yıl)	26,3±5,8	25,4±3,2	10,8±3,4	11,8±2,5
BKI (kg/m ²)	16,9±2,5	22,6±3,6	14,8±2,6	18,8±2,9
Sigara kullanımı (%)	13,3	26,7	0,0	0,0

‡ N: Belirtilen kategorilerdeki toplam çalışma grubunu temsil etmektedir.

E: erkek, K: kadın

BKI: Beden Kitle İndeksi

%: Belirtilen değişkene sahip olanların, çalışma grubunun tamamına oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

Yaş ve BKİ ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Erişkin hastalar ile erişkin sağlıklı bireyler ve çocuk hastalar ile çocuk sağlıklı bireyler arasındaki yaş farklılığını saptamak amacıyla Student's t testi kullanılmış, yaşlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,746/p=0,312$).

Erişkin hastalar ile erişkin sağlıklı bireyler ve çocuk hastalar ile çocuk sağlıklı bireyler arasındaki cinsiyet farklılığını araştırmak amacıyla Pearson's Chi-Square testi yapılmış, erişkin hastalar ile erişkin sağlıklı bireyler arasında cinsiyet açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,065$). Çocuk grupta ise hasta ve sağlıklı bireyler arasında cinsiyet açısından anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,019$).

Erişkin KF hastaları ile sağlıklı bireylerin BKİ'leri Mann Whitney-U testi ile kıyaslanmış, erişkin KF hastalarının BKİ'leri sağlıklı bireylere göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p=0,0002$). Çocuk KF hastaları ile sağlıklı bireylerin BKİ'leri Mann Whitney-U testi ile kıyaslandığında, çocuk KF hastalarının BKİ'leri sağlıklı bireylere göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p=0,0002$).

Çalışmaya dahil edilen hastaların rutin takip verileri Tablo 4.2.'de verilmiştir. Parametrik dağılıma uyan veriler ortalama \pm standart sapma, uymayan veriler ise medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edilmiştir. Yüzde (%) değerler, belirtilen değişkene sahip olanların, tüm araştırma grubuna oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

Tablo 4. 2. KF hastalarının klinik ve rutin biyokimyasal verileri

Değişken	Erişkin Kistik Fibrozis Hastaları (n=15)		Çocuk Kistik Fibrozis Hastaları (n=19)	
Pankreas yetmezliği (%)	93,0		100,0	
Diabetes Mellitus (%)	6,7		5,2	
Pulmoner Hipertansiyon (%)	13,3		0,0	
Astım (%)	13,3		5,3	
<i>P. aeruginosa</i> kolonizasyonu (%)	69,2		66,7	
<i>S. aureus</i> kolonizasyonu (%)	53,8		61,1	
Bronşektazi (%)	100,0		100,0	
Atelektazi (%)	20,1		100,0	
-	Pulmoner Alevlenme Dönemi	Kontrol Dönemi	Pulmoner Alevlenme Dönemi	Kontrol Dönemi
%FVC	42,6±20,2 (N=12)	45,4±18,4 (N=11)	56,0±22,4 (N=13)	57,0 (34,0-71,0) (N=5)
%FEV	34,8±14,7 (N=12)	35,5±13,7 (N=11)	61,0±26,9 (N=13)	57,0 (32,0-68,0) (N=5)
CRP (mg/dL)	CRP erişkin referans değer: 0-0,8		CRP çocuk referans değer: 0-0,8	
	7,7±4,7 (N=11)	3,8±4,0 (N=8)	3,1 (0,8-19,0) (N=15)	1,5 (0,1-5,9) (N=8)
Hb (gr/dL)	Hb erişkin referans değer: 13,6-17,2		Hb çocuk referans değer: 11,7-15,5	
	13,3±1,7 (N=11)	13,5±1,9 (N=8)	12,6±1,3 (N=17)	14,0 (10,7-14,0) (N=9)
BK (10 ³ /μL)	BK erişkin referans değer: 4,1-11,2		BK çocuk referans değer: 4,3-10,3	
	12,1±5,18 (N=11)	12,8±4,7 (N=8)	12,1±4,7 (N=17)	10,6±2,8 (N=9)
Plt (10 ³ /μL)	Plt erişkin referans değer: 159-388		Plt çocuk referans değer: 159-388	
	412,6±198,4 (N=11)	381,3±204,6 (N=7)	394,1±124,8 (N=17)	398,9±78,5 (N=8)

%FVC: Zorlu vital kapasite (%: beklenen değer in yüzdesi)

%FEV1: Zorlu ekspirasyonun 1. saniyesinde atılan volüm (%: beklenen değer in yüzdesi)

CRP: C-reaktif protein

HB: Hemoglobün

BK: Beyaz küre sayısı

Plt: Platelet sayısı

Referans değerler, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı referans değerleri baz alınarak verilmiştir.

4.2. Seramid ve Sfingomyelinlerin LC-MS/MS ile Analiz Sonuçları

4.2.1. Erişkin Kistik Fibrozis Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları

Erişkin hastaların alevlenme (N=15), taburcu (N=13) ve taburcu olduktan sonra 3 ay içindeki ilk kontrol dönemi (N=11) alınan kanlarından elde edilen plazmalarda SM türlerinden SM 16, 18, 24, SER türlerinden SER 16, 18, 20, 22 ve 24 düzeyleri LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, erişkin sağlıklı kontrol (N=15) ile Graphpad Prism 6 aracılığıyla, Mann Whitney-U testi ile kıyaslanmıştır. Dönemler arası farklılık ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir.

Erişkin KF hastalarının alevlenme dönemi; tüm SM ve SER türleri, sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p < 0,001$ ve $p < 0,05$) (Tablo 4.3.).

Tablo 4. 3. Erişkin KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması ve p değerleri

	Erişkin KF Pulmoner Alevlenme Dönemi Medyan (minimum-maksimum) N=15	Erişkin Sağlıklı Kontrol Medyan (minimum-maksimum) N=15	p
16 SM $\mu\text{g/mL}$	248,3 (139,4-370,4)	450,1 (196,2-1887,0)	<0,0001
18 SM $\mu\text{g/mL}$	46,0 (18,0-116,0)	111,0 (56,0-398,0)	<0,0001
24 SM $\mu\text{g/mL}$	36,4 (8,9-93,6)	136,1 (50,5-316,2)	<0,0001
16 SER ng/mL	1263,0 (681,8-3442,0)	1998,0 (1381,0-6624,0)	0,0014
18 SER ng/mL	637,3 (185,5-1575,0)	1034,0 (519,1-3292,0)	0,0017
20 SER ng/mL	418,6 (177,7-1111,0)	958,6 (420,7-2865,0)	<0,0001
22 SER ng/mL	2455,0 (1448,0-5566,0)	10749,0 (4167,0-29886,0)	<0,0001
24 SER ng/mL	10069,0 (3195,0-18892,0)	27800,0 (12240,0-89319,0)	<0,0001

Erişkin KF hastalarının taburculuk dönemi tüm SM ve SER türleri, sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p < 0,001$ ve $p < 0,05$) (Tablo 4.4.)

Tablo 4. 4. Erişkin KF hastalarının taburculuk dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması ve p değerleri

	Erişkin KF Taburculuk Dönemi Medyan (minimum-maksimum) N=13	Erişkin Sağlıklı Kontrol Medyan (minimum-maksimum) N=15	p
16 SM µg/mL	282,5 (125,0-514,0)	450,1 (196,2-1887,0)	0,0022
18 SM µg/mL	43,2 (24,8-108,4)	111,0 (56,0-398,0)	0,0001
24 SM µg/mL	37,5 (14,4-77,8)	136,1 (50,5-316,2)	<0,0001
16 SER ng/mL	1412,0 (847,9-1956,0)	1998,0 (1381,0-6624,0)	0,0015
18 SER ng/mL	429,5 (163,4-952,9)	1034,0 (519,1-3292,0)	<0,0001
20 SER ng/mL	352,5 (155,1-688,7)	958,6 (420,7-2865,0)	<0,0001
22 SER ng/mL	2872,0 (1595,0-5543,0)	10749,0 (4167,0-29886,0)	<0,0001
24 SER ng/mL	10627,0 (6313,0-17157,0)	27800,0 (12240,0-89319,0)	<0,0001

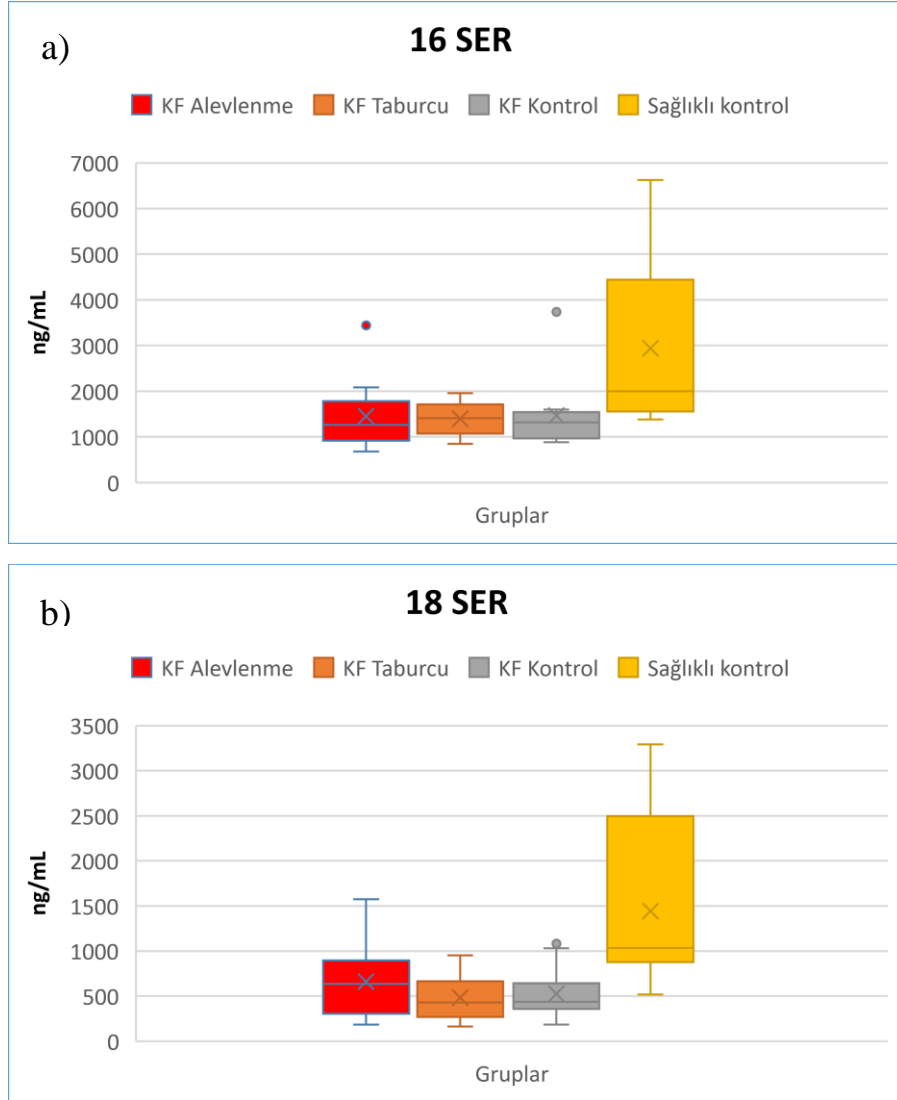
Erişkin KF hastalarının taburcu olduktan sonra ilk 3 ay içindeki kontrol dönemi 16 SM düzeyi hariç tüm SER ve SM düzeyleri sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p<0,05$) (Tablo 4.5).

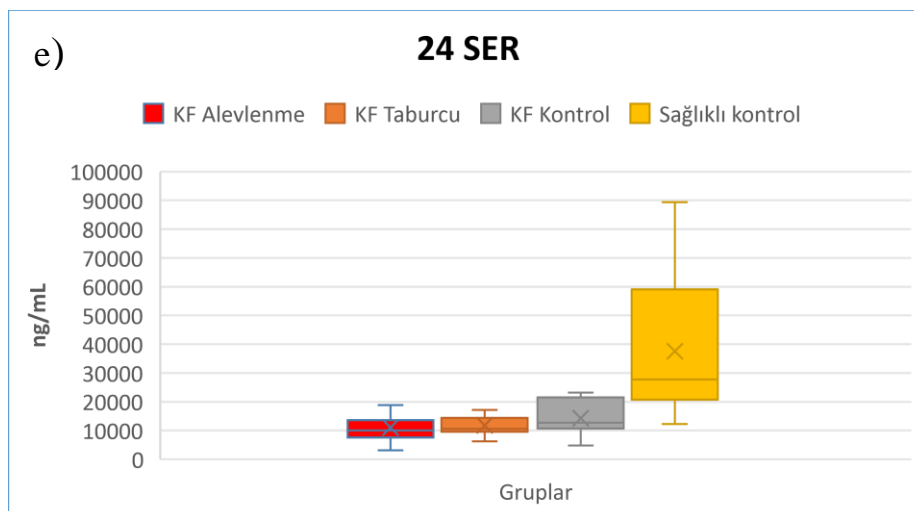
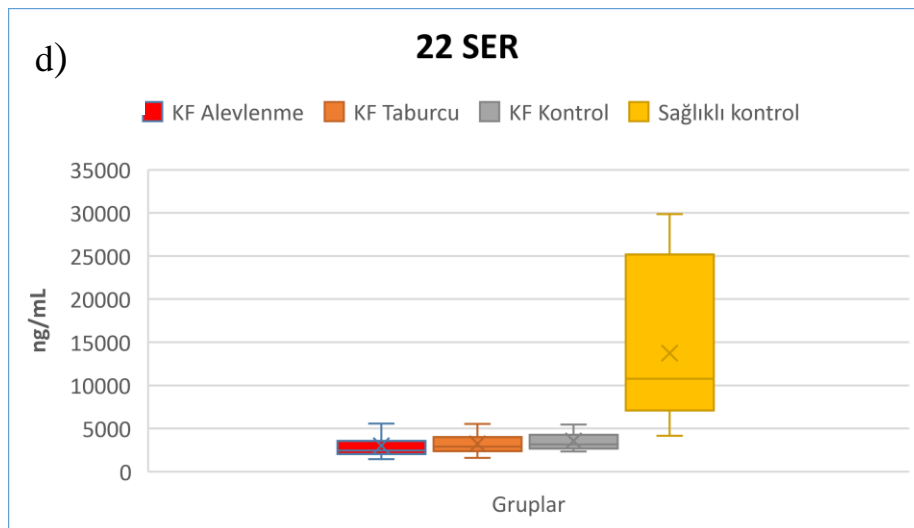
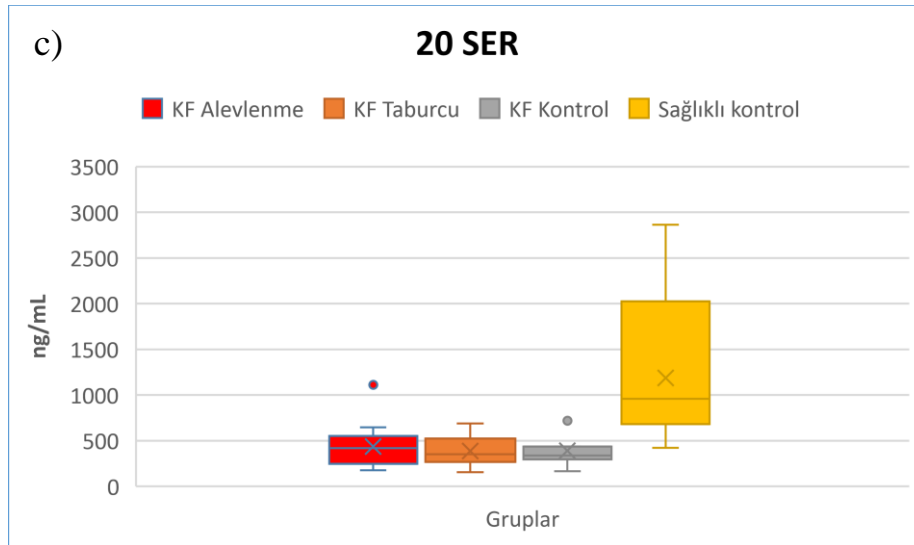
Tablo 4. 5. Erişkin KF hastalarının kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması ve p değerleri

	Erişkin KF Kontrol Dönemi Medyan (minimum-maksimum) N=11	Erişkin Sağlıklı Kontrol Medyan (minimum-maksimum) N=15	p
16 SM µg/mL	306,6 (211,5-941,3)	450,1 (196,2-1887,0)	0,0764
18 SM µg/mL	66,3 (38,4-187,6)	111,0 (56,0-398,0)	0,0062
24 SM µg/mL	36,6 (16,4-115,1)	136,1 (50,5-316,2)	<0,0001
16 SER ng/mL	1315,0 (883,8-3737,0)	1998,0 (1381,0-6624,0)	0,0013
18 SER ng/mL	435,2 (183,9-1084,0)	1034,0 (519,1-3292,0)	0,0003
20 SER ng/mL	338,7 (165,3-767,1)	958,6 (420,7-2865,0)	<0,0001
22 SER ng/mL	3136,0 (2339,0-5442,0)	10749,0 (4167,0-29886,0)	<0,0001
24 SER ng/mL	12745,0 (4805,0-23237,0)	27800,0 (12240,0-89319,0)	0,0006

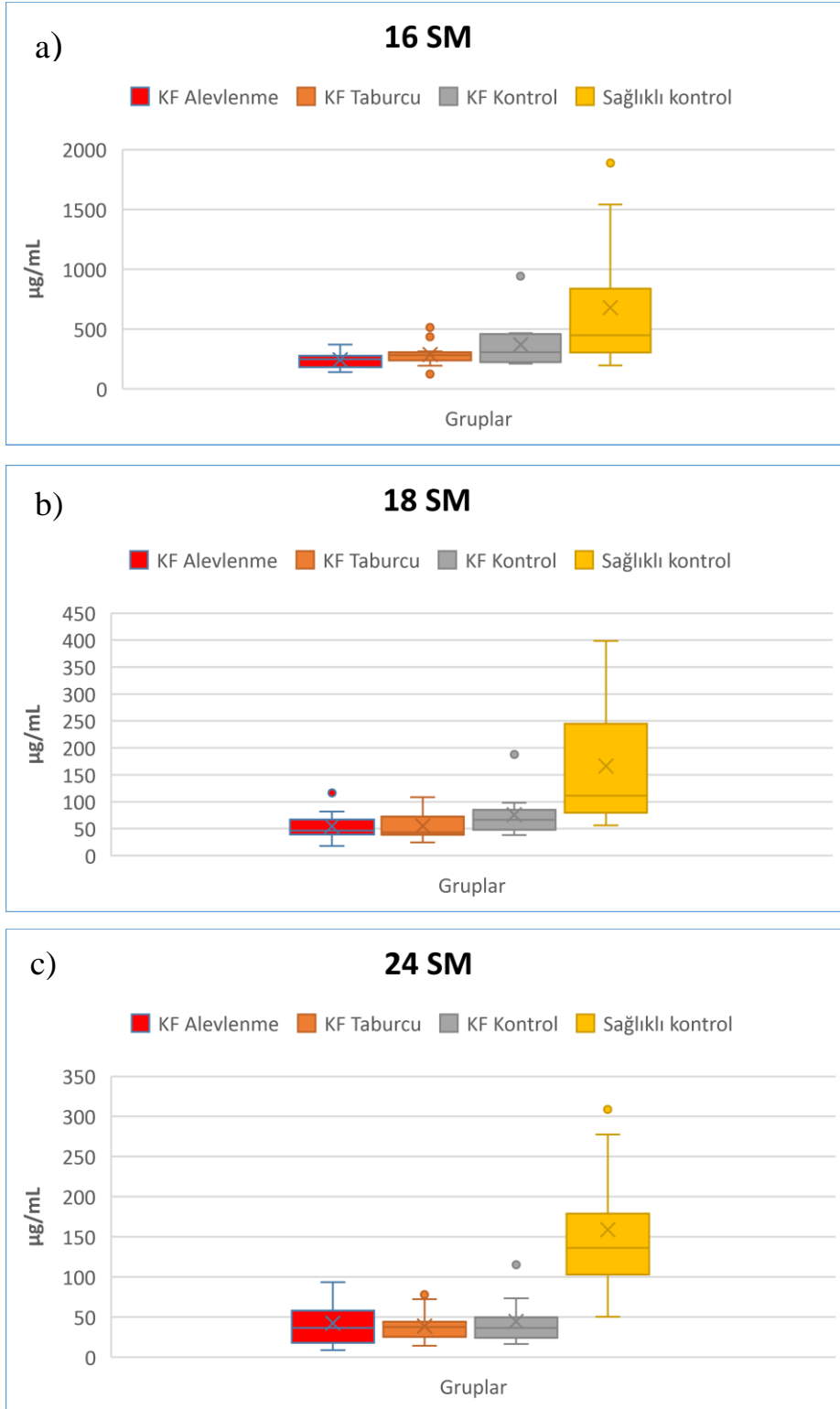
Alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri arasında farklılık saptanmamıştır.

Şekil 4. 1. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı kontrollerin SER düzeyleri kutu grafikleri a) 16 SER b) 18 SER c) 20 SER d) 22 SER e) 24 SER





Şekil 4. 2. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı kontrollerin SM düzeyleri kutu grafikleri a) 16 SM b) 18 SM c) 24 SM



4.2.2. Çocuk KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları

Çocuk hastaların alevlenme (N=19), taburcu (N=11) ve taburcu olduktan sonra ilk 3 ay içindeki kontrol dönemi (N=9) alınan kanlarından elde edilen plazmalarda SM türlerinden SM 16, 18, 24, SER türlerinden SER 16, 18, 20, 22 ve 24 düzeyleri LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, çocuk sağlıklı kontrol (N=17) grubu ile Graphpad Prism 6 aracılığıyla, Mann Whitney-U testi ile kıyaslanmıştır. Dönemler arası farklılık ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir.

Çocuk KF hastalarının alevlenme dönemi; 16 SM, 18 SM, 24 SM, SER 22 ve SER 24 düzeyleri, sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p<0,05$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4. 6. Çocuk KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması ve p değerleri

	Çocuk KF Pulmoner Alevlenme Dönemi-Medyan (minimum-maksimum) N=19	Pediyatrik Sağlıklı Kontrol-Medyan (minimum-maksimum) N=17	p
16 SM $\mu\text{g/mL}$	225,1 (15,0-885,1)	287,6 (234,1-425,0)	0,0019
18 SM $\mu\text{g/mL}$	40,0 (3,1-203,0)	70,0 (51,3-111,0)	<0,0001
24 SM $\mu\text{g/mL}$	29,4 (4,8-133,6)	93,6 (55,1-207,6)	<0,0001
16 SER ng/mL	1337,0 (204,7-5043,0)	1409,0 (1059,0-1695,0)	0,3764
18 SER ng/mL	505,7 (69,4-2752,0)	672,0 (472,8-1008,0)	0,0918
20 SER ng/mL	444,0 (52,2-1826,0)	485,7 (375,6-717,9)	0,2062
22 SER ng/mL	3507,0 (630,1-12134,0)	4757,0 (2927,0-8152,0)	0,0176
24 SER ng/mL	10849,0 (2131,0-33311,0)	17669,0 (11151,0-25313,0)	0,0002

Çocuk KF hastalarının taburculuk dönemi 18 SM, 24 SM, SER16, SER18, SER 20, SER 22 ve SER 24 düzeyleri, sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p<0,05$) (Tablo 4.7.).

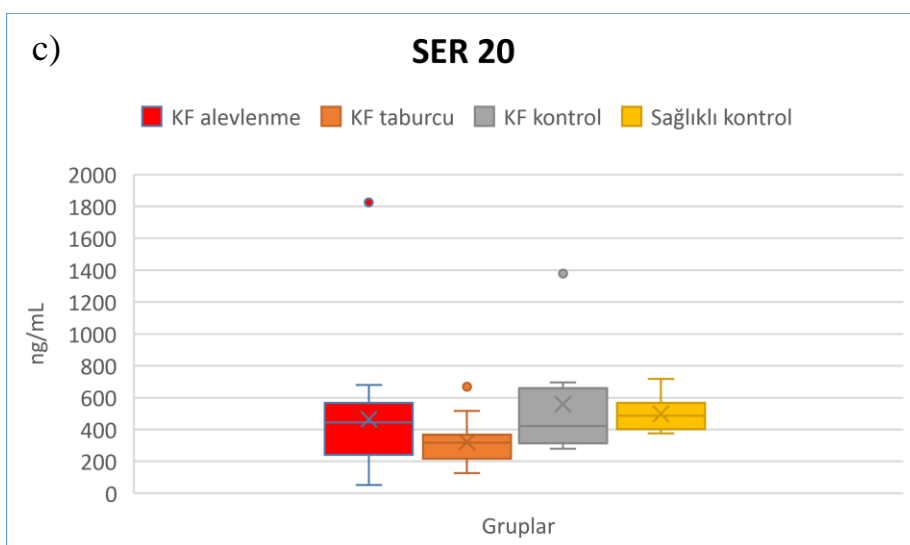
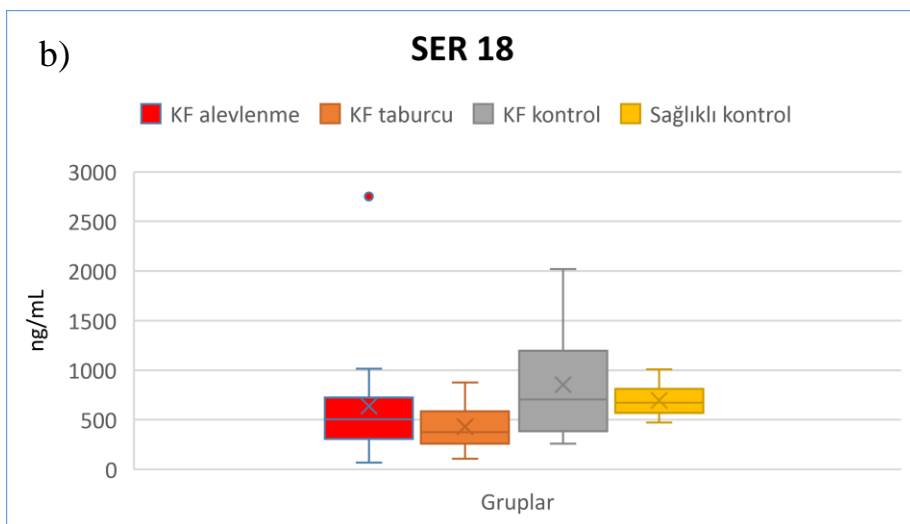
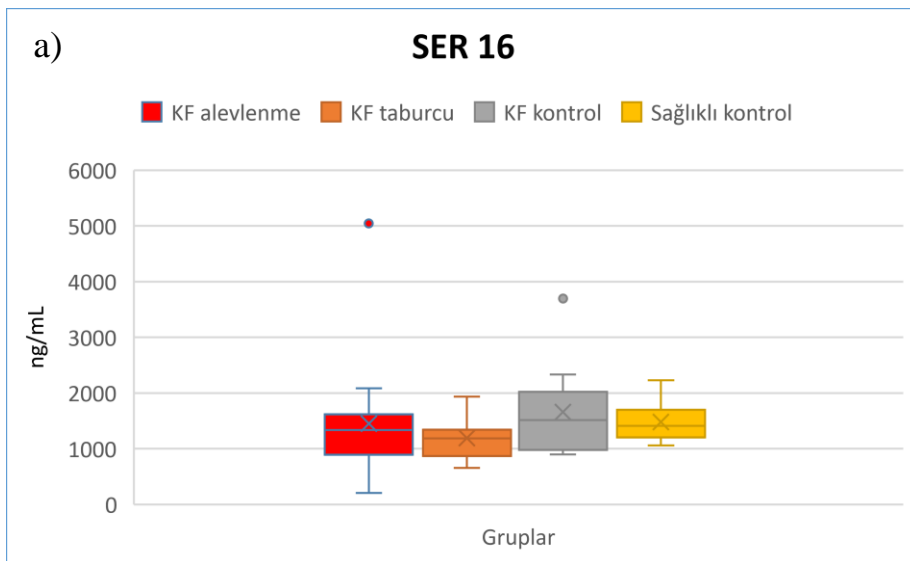
Tablo 4. 7. Çocuk KF hastalarının taburculuk dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması ve p değerleri

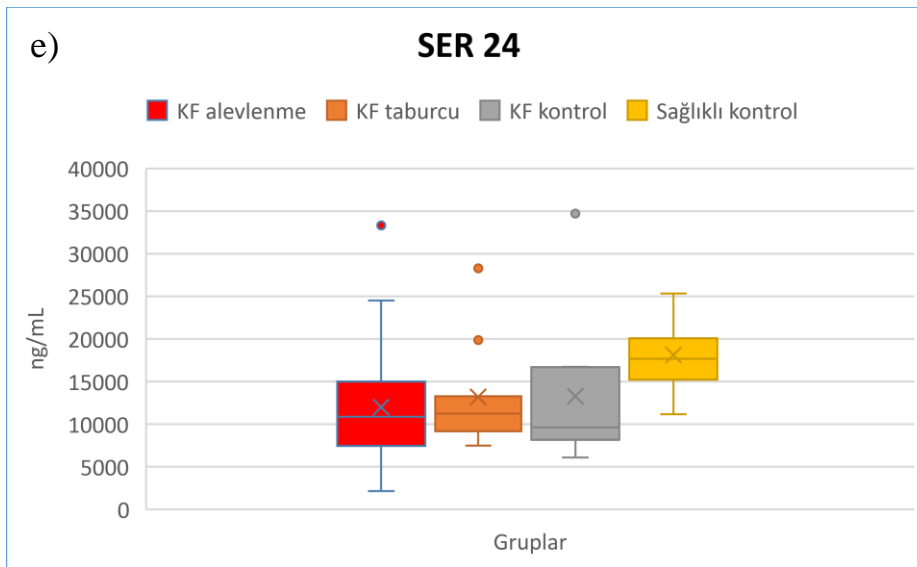
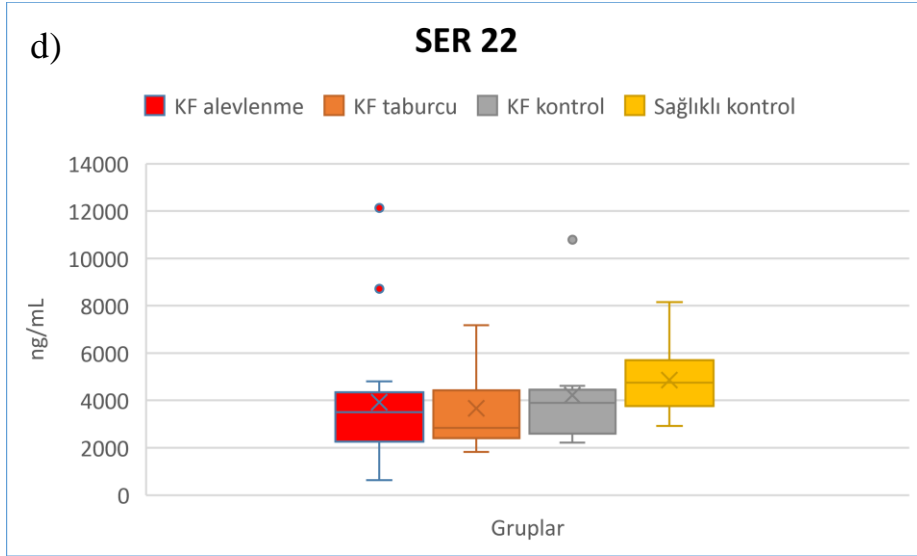
	Çocuk KF Taburculuk Dönemi-Medyan (minimum-maksimum) N=11	Çocuk Sağlıklı Kontrol-Medyan (minimum-maksimum) N=17	p
16 SM µg/mL	282,0 (180,0-398,0)	287,6 (234,1-425,0)	0,2997
18 SM µg/mL	42,3 (23,8-71,3)	70,0 (51,3-111,0)	0,0014
24 SM µg/mL	27,7 (17,1-98,1)	93,6 (55,1-207,6)	<0,0001
16 SER ng/mL	1184,0 (657,1-1933,0)	1409,0 (1059,0-1695,0)	0,0284
18 SER ng/mL	374,5 (106,9-877,0)	672,0 (472,8-1008,0)	0,0035
20 SER ng/mL	317,1 (126,1-669,4)	485,7 (375,6-717,9)	0,0007
22 SER ng/mL	2843,0 (1829,0-7182,0)	4757,0 (2927,0-8152,0)	0,0284
24 SER ng/mL	11249,0 (7478,0-28281,0)	17669,0 (11151,0-25313,0)	0,0035

Çocuk KF hastalarının taburcu olduktan sonra ilk 3 ay içindeki kontrol dönemi 18 SM, 24 SM ve 24 SER düzeyleri sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p<0,05$).

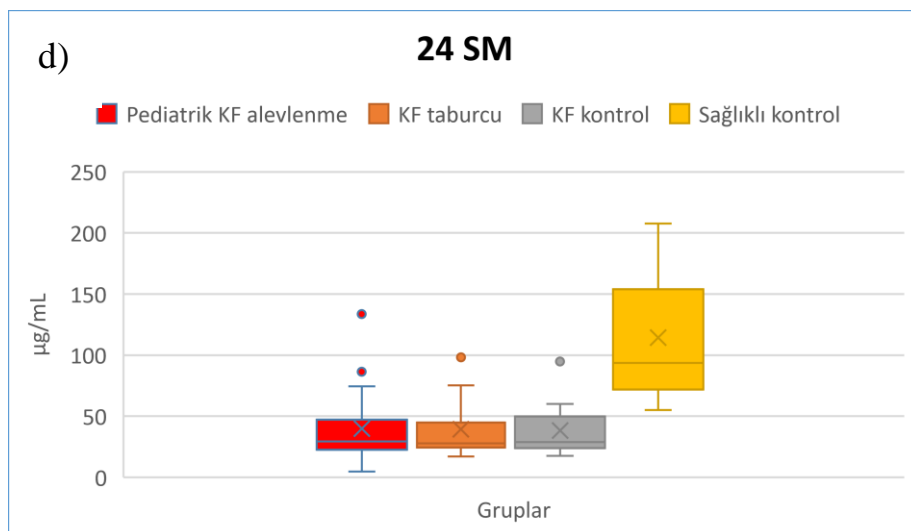
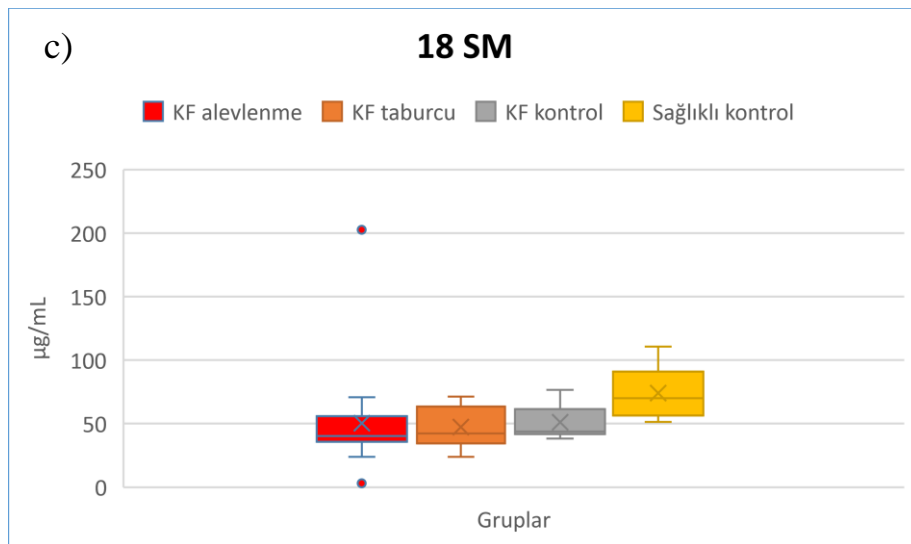
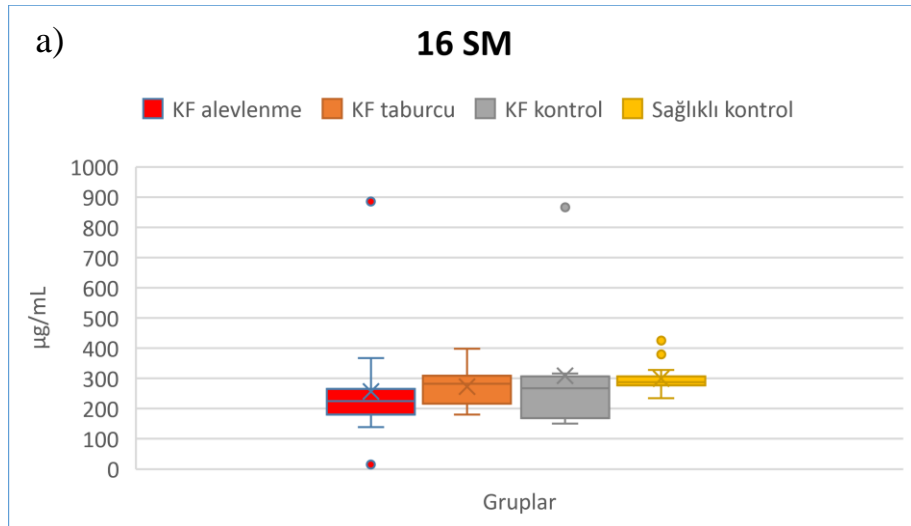
Tablo 4. 8. Çocuk KF hastalarının kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin SER ve SM düzeylerinin kıyaslanması ve p değerleri

	Çocuk KF Kontrol Dönemi Medyan (minimum-maksimum) N=9	Çocuk Sağlıklı Kontrol Medyan (minimum-maksimum) N=17	p
16 SM µg/mL	267,0 (150,0-865,8)	287,6 (234,1-425,0)	0,2339
18 SM µg/mL	43,9 (38,3-76,5)	70,0 (51,3-111,0)	0,0028
24 SM µg/mL	28,8 (17,7-94,9)	93,6 (55,1-207,6)	0,0002
16 SER ng/mL	1516,0 (895,6-3693,0)	1409,0 (1059,0-1695,0)	0,9332
18 SER ng/mL	703,1 (257,6-2019,0)	672,0 (472,8-1008,0)	0,8688
20 SER ng/mL	422,9 (279,2-1379,0)	485,7 (375,6-717,9)	0,8506
22 SER ng/mL	3896,0 (2223,0-10793,0)	4757,0 (2927,0-8152,0)	0,0826
24 SER ng/mL	9626,0 (6068,0-34712,0)	17669,0 (11151,0-25313,0)	0,0091





Şekil 4. 3. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı kontrollerin SER düzeyleri kutu grafikleri a) 16 SER b) 18 SER c) 20 SER d) 22 SER e) 24 SER



Şekil 4. 4. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı kontrollerin SM düzeyleri kutu grafikleri a) 16 SM b) 18 SM c) 24 SM

Alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri arası farklılık saptanmamıştır.

4.3. YKL-40 Sonuçları

4.3.1. Erişkin KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları

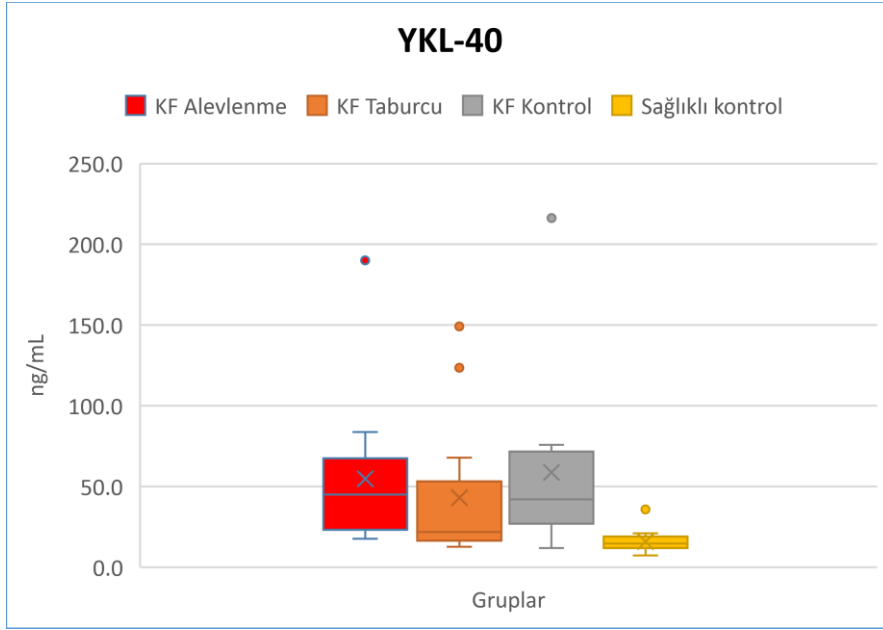
Erişkin KF hastalarının alevlenme (N=15), taburcu (N=13) ve taburcu olduktan sonra 3 ay içindeki ilk kontrol dönemi (N=11) plazmalarında YKL-40 düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, erişkin sağlıklı kontrol grubunun (N=15) sonuçları ile Graphpad Prism 6 aracılığıyla, Mann Whitney U testi ile kıyaslanmıştır. Dönemler arası farklılık ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir.

Erişkin KF hastalarının YKL-40 düzeyleri tüm dönemlerde sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p<0,05$).

Alevlenmeden, kontrol dönemine kadar 3 dönemde, dönemler arası farklılık saptanmamıştır.

Tablo 4. 9. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri ile sağlıklı bireylerin YKL-40 düzeylerinin kıyaslanması ve p değerleri

	YKL-40 ng/mL Medyan (minimum- maksimum)	p
KF pulmoner alevlenme dönemi (N=15)	45,0 (17,6-190,0)	<0,0001
KF taburculuk dönemi (N=13)	21,9 (12,8-149,1)	0,0025
KF kontrol dönemi (N=11)	42,1 (11,9-216,4)	0,0002
Sağlıklı kontrol (N=15)	14,6 (7,4-35,7)	-



Şekil 4. 5. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin YKL-40 düzeyleri kutu grafikleri

4.3.2. Çocuk KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları

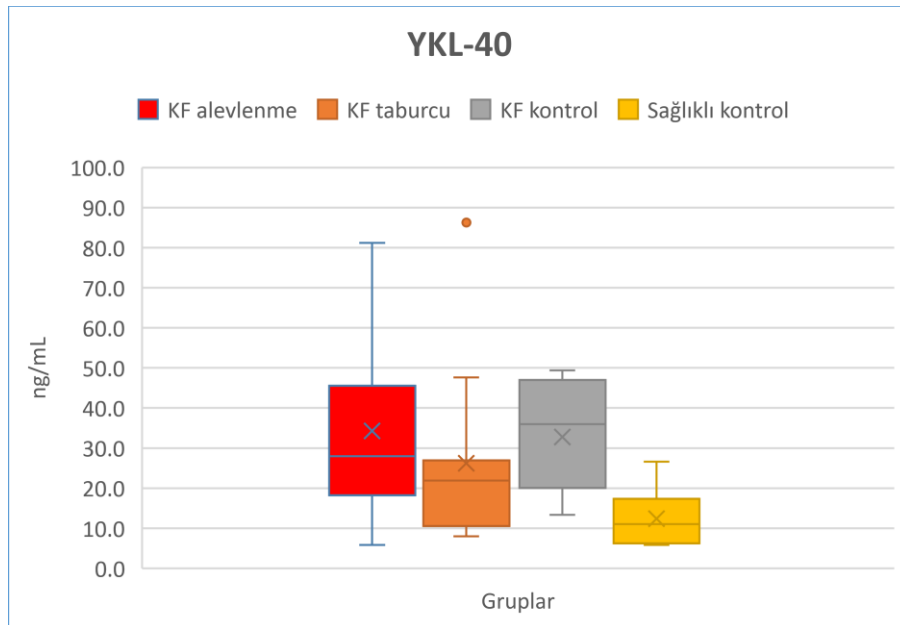
Çocuk hastaların alevlenme (N=19), taburcu (N=11) ve taburcu olduktan sonra 3 ay içindeki ilk kontrol dönemi (N=9) plazma YKL-40 düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, çocuk sağlıklı kontrol grubunun (N=17) sonuçları ile Graphpad Prism 6 aracılığıyla, Mann Whitney U testi ile kıyaslanmıştır. Dönemler arası farklılık ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir.

Çocuk KF hastalarının YKL-40 düzeyleri tüm dönemlerde sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$ ve $p < 0,05$).

Alevlenmeden, kontrol dönemine kadar 3 dönemde, dönemler arası farklılık saptanmamıştır.

Tablo 4. 10. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri ile sağlıklı bireylerin YKL-40 düzeylerinin kıyaslanması ve p değerleri

	YKL-40 ng/mL Medyan (minimum- maksimum)	p
KF pulmoner alevlenme dönemi (N=19)	28,0 (5,8-81,2)	<0,0001
KF taburculuk dönemi (N=11)	21,9 (8,0-86,3)	0,0162
KF kontrol dönemi (N=9)	36,0 (13,3-49,4)	0,0003
Sağlıklı kontrol (N=17)	11,0 (5,8-26,6)	-



Şekil 4. 6. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin YKL-40 düzeyleri kutu grafikleri

4.4. Kitotriozidaz Aktivitesi Sonuçları

4.4.1. Erişkin KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları

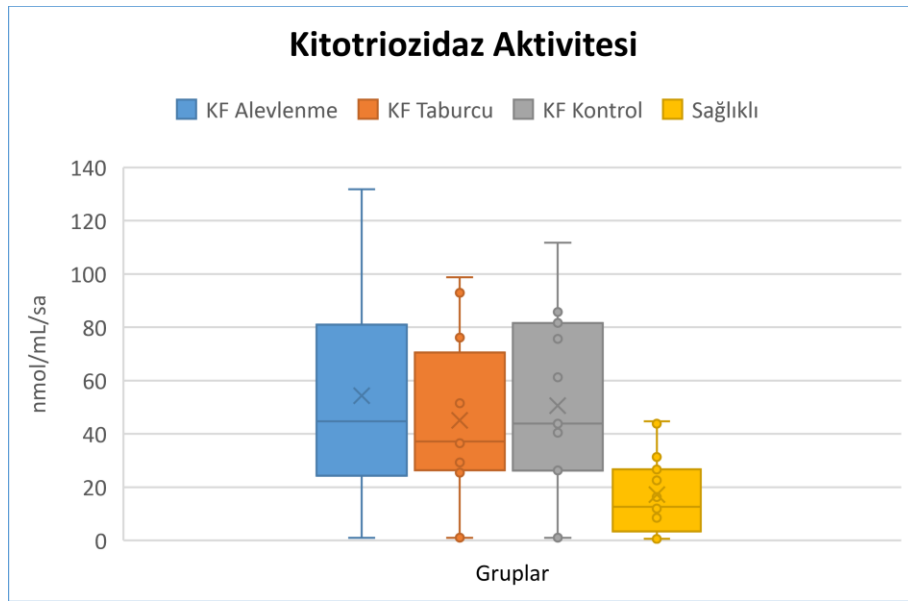
Erişkin hastaların alevlenme (N=15), taburcu (N=13) ve taburcu olduktan sonra 3 ay içindeki ilk kontrol dönemi (N=11) plazma kitotriozidaz aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, erişkin sağlıklı kontrol grubunun (N=15) sonuçları

ile Graphpad Prism 6 aracılığıyla, Mann Whitney-U testi ile kıyaslanmıştır. Dönemler arası farklılık ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir.

Erişkin KF hastalarının kitotriozidaz aktiviteleri tüm dönemlerde sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4. 11. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri ile sağlıklı bireylerin kitotriozidaz aktivitelerinin kıyaslanması ve p değerleri

	Kitotriozidaz aktivitesi nmol/mL/sa medyan (minimum-maksimum)	p
KF pulmoner alevlenme dönemi (N=15)	42,9 (1,0-131,8)	0,0013
KF taburculuk dönemi (N=13)	36,6 (1,0-98,7)	0,0070
KF kontrol dönemi (N=11)	43,8 (1,0-111,7)	0,0132
Sağlıklı kontrol (N=15)	12,7 (0,6-44,7)	-



Şekil 4. 7. Erişkin KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin kitotriozidaz aktiviteleri kutu grafikleri

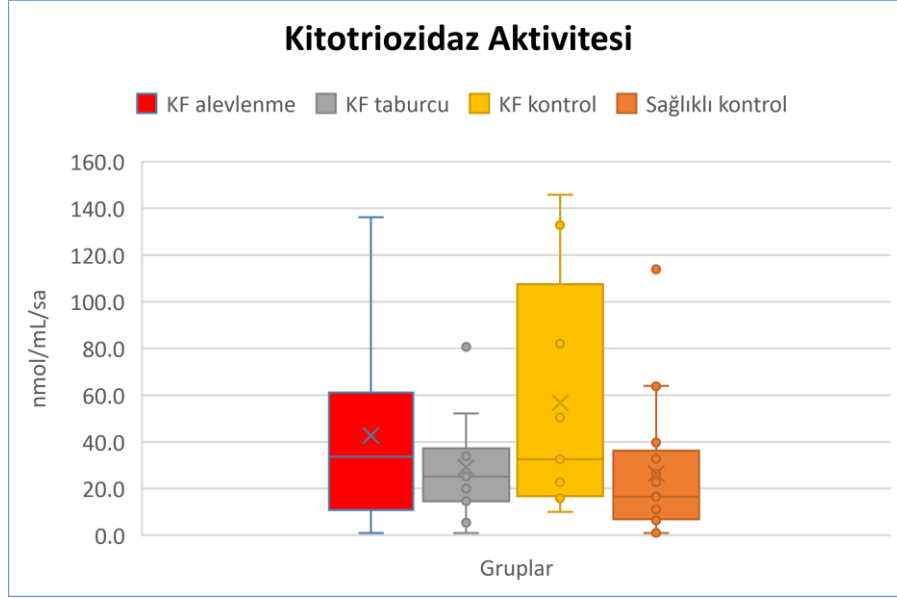
4.4.2. Çocuk KF Hastaları ile Sağlıklı Bireylerin Sonuçları

Çocuk hastaların alevlenme (N=19), taburcu (N=11) ve taburcu olduktan sonra 3 ay içindeki ilk kontrol dönemi (N=9) plazma kitotriozidaz aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, pediatrik sağlıklı kontrol grubunun (N=17) sonuçları ile Graphpad Prism 6 aracılığıyla, Mann Whitney-u testi ile kıyaslanmıştır. Dönemler arası farklılık ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir.

Çocuk KF hastalarının kitotriozidaz aktiviteleri, dönemlerin hiçbirinde sağlıklı kontrole göre anlamlı farklı değildir ($p>0,05$).

Tablo 4. 12. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemleri ile sağlıklı bireylerin kitotriozidaz aktivitelerinin kıyaslanması ve p değerleri

	Kitotriozidaz aktivitesi nmol/mL/sa medyan (minimum-maksimum)	p
KF pulmoner alevlenme dönemi (N=19)	33,7 (1,0-136,1)	0,1871
KF taburculuk dönemi (N=11)	25,2 (1,0-80,7)	0,4646
KF kontrol dönemi (N=9)	32,6 (10,1-145,8)	0,0844
Sağlıklı kontrol (N=17)	16,5 (1,0-113,9)	-



Şekil 4. 8. Çocuk KF hastalarının alevlenme, taburcu ve kontrol dönemi ile sağlıklı bireylerin kitotriozidaz aktiviteleri kutu grafikleri

Hem erişkin hem de pediatrik KF hastalarının alevlenme, taburcu ve taburcu olduktan sonraki ilk kontrol dönemlerinin kitotriozidaz aktiviteleri arasında dönemsel farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

4.5. KF Hastalarının Alevlenme Dönemleri SER, SM ve YKL-40 Düzeyleri ile Kitotriozidaz Aktivitelerinin Klinik/Rutin Biyokimyasal Parametrelerle Korelasyon İlişkileri

Erişkin KF hastalarının alevlenme dönemi sfingolipit metabolitlerinin beklenen %FVC, %FEV1 ile CRP ve BK düzeyleri arasında korelasyonu bulunamadı.

Tablo 4. 13. Erişkin KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi SER ve SM düzeylerinin, aynı dönem beklenen %FVC, %FEV1 ile CRP ve BK düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkileri

Pulmoner Alevlenme Dönemi	FVC		FEV1		CRP		BK	
	r	p	r	p	r	p	r	p
16 SM µg/mL	-0,07	0,827	-0,191	0,550	-0,347	0,296	-0,461	0,153
18 SM µg/mL	-0,264	0,406	-0,309	0,328	-0,190	0,576	-0,260	0,439
24 SM µg/mL	-0,459	0,132	-0,464	0,129	-0,098	0,772	-0,345	0,298
16 SER ng/mL	-0,430	0,162	-0,367	0,241	0,285	0,395	-0,297	0,375
18 SER ng/mL	-04,20	0,173	-0,317	0,316	0,368	0,266	-0,183	0,590
20 SER ng/mL	-0,492	0,104	-0,371	0,316	0,257	0,445	-0,154	0,650
22 SER ng/mL	-0,450	0,141	-0,370	0,237	-0,159	0,640	-0,07	0,837
24 SER ng/mL	-0,393	0,206	-0,426	0,167	-0,296	0,377	-0,153	0,694

Tablo 4. 14. Erişkin KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi YKL-40 düzeyleri ile kitotriozidaz aktivitelerinin aynı dönem beklenen %FVC, %FEV1 ile CRP ve BK düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkileri

Pulmoner Alevlenme Dönemi	FVC*		FEV1*		CRP		BK	
	r	p	r	p	r	p	r	p
YKL-40 (ng/mL)	-0,641	0,046	-0,643	0,045	-0,280	0,078	-0,219	0,518
Kitotriozidaz Aktivitesi (nmol/mL/sa)	-0,132	0,683	-0,090	0,779	-0,656	0,029	-0,190	0,576

*: Erişkin hastalardan %FVC ve %FEV1 değeri ≤ 50 olanlar korelasyon analizine dahil edilmişlerdir.

Erişkin KF hastalarının alevlenme dönemi kitotriozidaz aktivitesi, aynı dönem CRP düzeyi ile negatif yönde korele idi. Ayrıca alevlenme dönemi YKL-40 düzeyleri de aynı dönem beklenen %FVC ve %FEV1 ile negatif yönde korele bulunmuştur (Tablo 4.14).

Tablo 4. 15. Çocuk KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi SER ve SM düzeylerinin, aynı dönem %FVC, %FEV1, CRP ve BK düzeyleri ile korelasyonları

Pulmoner Alevlenme Dönemi	FVC		FEV1		CRP		BK	
	r	p	r	p	r	p	r	p
16 SM µg/mL	0,077	0,802	0,140	0,649	-0,156	0,579	0,190	0,466
18 SM µg/mL	-0,367	0,217	-0,251	0,409	-0,036	0,898	-0,278	0,280
24 SM µg/mL	-0,161	0,026	-0,060	0,845	0,006	0,984	-0,010	0,970
16 SER ng/mL	-0,002	0,995	-0,000	0,998	0,211	0,450	0,113	0,666
18 SER ng/mL	-0,310	0,303	-0,322	0,283	0,064	0,820	-0,232	0,371
20 SER ng/mL	-0,210	0,491	-0,234	0,441	-0,032	0,911	-0,029	0,913
22 SER ng/mL	-0,016	0,958	0,044	0,887	-0,087	0,759	0,405	0,107
24 SER ng/mL	0,070	0,820	0,167	0,585	-0,032	0,909	0,439	0,078

Çocuk KF hastalarının alevlenme dönemi sfingolipit metabolitleri ile aynı dönem beklenen %FVC, %FEV1 ile CRP ve BK düzeyleri arasında korelasyonu bulunamadı (Tablo 4.15).

Tablo 4. 16. Çocuk KF hastalarının pulmoner alevlenme dönemi YKL-40 düzeyleri ile kitotriozidaz aktivitelerinin aynı dönem beklenen %FVC, %FEV1 ile CRP ve BK düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkileri

Pulmoner Alevlenme Dönemi	FVC		FEV1		CRP		BK	
	r	p	r	p	r	p	r	P
YKL-40 (ng/mL)	-0,697	0,008	-0,720	0,006	-0,401	0,139	-0,328	0,199
Kitotriozidaz Aktivitesi (nmol/mL/sa)	0,502	0,081	0,536	0,059	0,116	0,681	-0,338	0,185

Çocuk KF hastalarının alevlenme dönemi sfingolipit metabolitleri ile aynı dönem kitotriozidaz aktiviteleri arasında korelasyon bulunmadı. Ancak, alevlenme dönemi YKL-40 düzeyleri ile aynı dönem beklenen %FEV1 ve %FVC ile negatif yönde korele bulunmuştur (Tablo 4.16).

5. TARTIŞMA

KF, KFTR genindeki mutasyonlar sonucu meydana gelen OR geçişli bir hastalıktır. Bu mutasyonlar şiddetli pulmoner ve GİS semptomlara neden olur. Pulmoner problemlerden özellikle *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. aureus* ve *H. influenzae*'nin sebep olduğu akut ve kronik infeksiyonlar klinikteki en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. KF hastalarının %80'den fazlası *P. aeruginosa* ile enfektedir [194]. KFTR'nin bir klor kanalı aktivitesi sergilediği bilindiğinden beri, solunum yolu epitel hücrelerinde bulunan mukusun su emiliminin değiştiği, viskozitesinin arttığı, bunun da azalmış mukosilyer klirens nedeniyle olduğu ve böylece *P. aeruginosa* eliminasyon yeteneğinin azaldığı öngörülmüştür [191, 280, 281]. Mukus viskozitesindeki artış, nötrofillerin alana göç etmesini ve solunum yollarındaki patojenleri yok etmesini engelliyor olabilir [280]. Ancak KF hastalarının pulmoner infeksiyonlara olan yüksek duyarlılığı ve kronik solunum yolu inflamasyonlarının nedenleri tam olarak bilinmemektedir [194].

Sfingolipitler doğal immunitede rol oynar ve yeni antimikrobiyal tedavi seçenekleri için önemli bir potansiyele sahiptir. Özellikle SER'lerin; memeli hücrelerinin, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *Listeria monositogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* (*E. coli*), mikobakteri, kızamık virusu, rinovirus ve sindbis virus gibi bakteriyel ve viral patojen infeksiyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [194, 202, 282-289]. Ayrıca akciğer hastalıklarından; astım, amfizem, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, pulmoner fibrozis ve KF'de özellikle SER'lerin fonksiyonu önem kazanmıştır [194, 290].

Akciğer endotel hücresi anjiyogenez, yaşlanmış, hasarlı veya infekte hücrelerin dokudan uzaklaştırılması için programlanmış özel apoptotik bir süreç sahiptir. Düzensiz veya bozulmuş bir apoptotik süreç, *P. aeruginosa* gibi solunum yolu patojenlerine karşı inflamatuvar yanıtı tetikleyebilir ve morbiditeyi artırabilir [239].

İnfeksiyonlar, UV ışık, kemoterapötikler gibi çeşitli uyarılar sonucunda, SER'den zengin membran bölgelerinde bazı değişiklikler olur. Epitel hücrelerinin infeksiyonu, CD95, CD40 gibi moleküllerin aSMaz'ı aktive etmesi ve SER konsantrasyonunun artması ile sonuçlanır [188, 194, 291]. Epitel hücrelerinin veya makrofajların, *P. aeruginosa* ile enfekte olmasından sonra, aSMaz membranının dış bölgesine geçerek aktive olur. Böylece SER salınımını artırır [193, 292]. SER,

nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz, CD95 ve KFTR gibi çeşitli moleküllerin membranda kümelenmesini sağlar. *P. aeruginosa*'nın elimine edilebilmesi için, NADPH'nin reaktif oksijen türlerini (ROS) salması gereklidir. CD95 ise konakçı epitelyal hücrelerin *P. aeruginosa* aracılı ölümüne neden olmaktadır. Çünkü CD95 eksikliğinde *P. aeruginosa* aracılı epitel ölümünün azaldığı gösterilmiştir. Ancak infekte olmuş hücrelerin bu şekilde organizmadan uzaklaştırılması, hücre içi patojenlerin eliminasyonunu sağlayarak, konağın kendini savunması için gerekli olabilir. aSMaz eksik farelerin ve aSMaz inhibitörleri verilmiş farelerin, IL-8 salınımının arttığı, *P. aeruginosa* ile infekte hücrelere apoptoz yanıtının azaldığı ve böylece *P. aeruginosa*'ya daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir [193]. Bu defektif aSMaz yanıtı, *P. aeruginosa*'nın öldürülmeden kaçmasına ve sonuç olarak KF'de sonlanmayan bir inflamatuvar yanıtı sebep oluyor olabilir [17]. Diğer yandan, membran raftlarının farmakolojik olarak harap edilmesinin apoptoz indüksiyonu ve *P. aeruginosa* infeksiyonunu azalttığını raporlayan çalışmalar da mevcuttur [293].

KF'de sfingolipit metabolizmasının bozulduğu açıktır, ancak bu konuda yapılan araştırmaların birbiriyle çelişen yönleri vardır. KF'li insan ve hayvan solunum yolları epitel hücreleri veya akciğer dokularında SER düzeyleri çoğu çalışmada yüksek bulunmuş olsa da [12-16] (Tablo 5.1.), aksine normale göre düşük bulan çalışmalar [17, 18] da mevcuttur (Tablo 5.2.).

Tablo 5. 1. KF'de yüksek SER düzeyleri raporlayan araştırmalar

Araştırma	Kullanılan Model	Yöntem
[13]	KF'li fare akciğer dokusu KF'li insan akciğer dokusu KF'li insan nazal epitel hücresi	Floresan konfokal mikroskopi Flow stiometri İmmunogold elektron mikroskopisi
[12]	KF'li fare akciğer dokusu	Kütle spektrometresi Floresan mikroskopisi Diaçilgliserol kinaz metodu
[294]	KF'li fare akciğer dokusu ve bronşial epitel hücreleri	Diaçil gliserol kinaz metodu Floresan mikroskopi
[14]	KF'li insan akciğer dokusu	İmmunofloresan

[292]	Fare alveolar makrofajı	Diaçil gliserol kinaz metodu
[15]	KF'li insan akciğer dokusu	İmmunofloresan HPLC/MS
[171]	KF'li fare akciğer dokusu	Diaçilgliserol kinaz metodu

KFTR geni eksik farelerin, bronşiyal, intestinal ve trakeal epitel hücrelerinde, KF'li hastaların ise nazal epitel hücrelerinde SER birikimi olduğu gösterilmiştir [12, 13, 16, 295]. Brodli ve ark. çeşitli SER türlerinin akciğerde birikimi ile ilgili detaylı kütle spektrometresi verileri sağlamış ve KF'li hastaların akciğerlerinde SER 16, 18 ve 20'nin önemli birikimlerini göstermiştir [15]. KF'li insan veya farelerin akciğer doku ve hücrelerinde SER biriktiği Tablo 5.1.'de belirtilmiş olan başka birçok çalışmayla da desteklenmiştir [14, 15, 221, 296, 297].

Tablo 5. 2. KF'de düşük SER düzeyleri raporlayan araştırmalar

Araştırma	Kullanılan Model	Yöntem
[229]	KFTR mutant epitel hücre hattı	HPLC
[231]	KF'li fare plazması	ELISA ve İnce tabaka kromatografisi
[239]	KFTR kanalı inhibitörü ile muamele edilmiş insan ve fare akciğer entodel hücreleri	LC-MS/MS
[17]	KFTR defektif bronş epitel hücre hattı	ESI-MS/MS
[18, 230]	KF'li insan ve fare plazması	ELISA ve İnce tabaka kromatografisi

KF'de veziküler pH düzenlenmesinde defekt olduğunu düşünülmektedir. KFTR'nin trans-golgi veziküllerinin pH kontrolüne katıldığı bilinmektedir [42].

Ayrıca KFTR makrofajlardaki fagolizozomların asidifikasyonunu sağlamaktadır [298]. Lizozomlara Cl^- geçişini sağlayarak gradiyent farkı oluşturur. Böylece Vakuolar tip Hidrojen ATPaz (V-H⁺ ATPaz) kanallarının fagolizozomlara proton pompalamasını sağlayarak asidifikasyonu gerçekleştirir. KF'deki disfonksiyonel immün yanıtın temeli tam olarak anlaşılammış olsa da, KFTR'deki defekt fagositik veziküllerin asidifikasyonunun bozulması ile sonuçlanmaktadır. Bu da alveolar makrofajların lizozomal enzimlerinin bakterisidal özelliklerini kaybetmesine sebep olur [298]. Bu bağlamda; apikal lipit raflarda lokalize olan KFTR'nin; doğal ve edinsel immün yanıtın kontrolünde de kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir [13, 16, 221, 299-301].

Yu ve ark.'nın yaptığı çalışmada, KF'li fare bronş epitelinde, KFTR'deki defektin lizozomal pH'yı bozduğu, bu nedenle lizozomal enzim olan aSMaz'ın aktivitesinin azaldığı (defektif aktivite artışı) dolayısıyla SER miktarının azaldığı gösterilmiş, sonuç olarak KF'li farelerin aSMaz/SER yolağının bozulmuş olabileceği belirtilmiştir [17].

SER düzeylerini yüksek bulan araştırmacılar ise, hücre içi veziküllerin alkalizasyonun; aSMaz ve seramidaz aktivitesini azalttığını ancak, seramidaz aktivitesinin, aSMaz'dan daha fazla azaldığı için SER'lerin biriktiği görünüşünü savunmuşlardır [13]. SER; SM ve kolesterol içeren lipit raflarını değiştirir ve membran platformunu oluşturur. KFTR yokluğundaki SER birikiminin; SM ve kolesterolden zengin lipit raflarının kompozisyonunu değiştirerek, membrandaki proteinlerin fonksiyonlarını değiştirdiğini belirtmişlerdir [221].

SER'in fonksiyonları, dokuda birikimi veya plazmada düşüşü gibi bulguların mekanizması tam aydınlatılamadığı gibi, hangi SER türünün, hangi patofizyolojik süreçte ve nasıl rol aldığı bilinmemektedir.

Bizim araştırmamızda literatürden farklı olarak çalışma grubuna erişkin KF hastalarının yanısıra, çocuk hastalar da dahil edildi. Hastaların pulmoner alevlenme, taburculuk ve taburcu olduktan sonraki kontrol dönemlerini kapsayan 3 farklı klinik döneminin plazma SER ve SM düzeyleri değerlendirildi. Sonuçlar benzer yaş aralığındaki sağlıklı bireylerle kıyaslandı.

Erişkin KF hastalarının alevlenme ve taburculuk dönemi tüm SM ve SER düzeyleri ile kontrol dönemi 16 SM hariç tüm SM ve SER düzeyleri sağlıklı kontrole

göre anlamlı düşük bulundu ($p<0,001$ ve $p<0,05$). Çocuk KF hastalarının alevlenme dönemi; 16 SM, 18 SM, 24 SM, SER 22 ve SER 24, taburculuk dönemi 18 SM, 24 SM, SER 18, SER 20, SER 22 ve SER 24 ile kontrol dönemi 18 SM, 24 SM ve 24 SER düzeyleri sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulundu ($p<0,001$ ve $p<0,05$).

Hastaların alevlenme dönemi SER ve SM düzeylerinin, aynı dönem solunum fonksiyon testleri (%FVC, %FEV1), beyaz küre ve erişkin hariç CRP düzeyleri ile korelasyonu yoktu. Klinik dönemler arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Verilerimize göre, sfingolipit metabolitlerinin inflamasyonla ve klinik süreçle doğrudan bir ilişkisi olmadığı söylenebilir. Dönemler arası anlamlı farklılık olmasa da, genel olarak SER ve SM düzeylerinin alevlenme döneminden kontrol dönemine kadar göreceli olarak arttığı ama sağlıklı kontrol düzeyine erişemediği söylenebilir.

SM ve SER türleri sağlıklı kontrole kıyaslandığında ortaya çıkan anlamlı farklılıklar; erişkin hastalarda, çocuk hastalara göre daha fazla ve daha belirgindir. Bu durum; erişkin hastaların yüksek yaş dolayısıyla kronik hastalık yükünü daha fazla taşımaları ve bu nedenle sfingolipit metabolizmalarının daha fazla etkilenmiş olabileceği ile açıklanabilir.

Sağlıklı bireylere göre hasta grubumuzun SER ve SM türlerinin düşük olması ise 3 farklı hipotezle açıklanabilir.

1. KFTR'nin trans-golgi veziküllerinin pH kontrolüne katıldığı bilinmektedir [42]. Ayrıca KFTR makrofajlardaki fagolizozomların asidifikasyonunu sağlamaktadır. KFTR'deki defekt fagositik veziküllerin asidifikasyonunun bozulması ile sonuçlanmaktadır. Bu da alveolar makrofajların lizozomal enzimlerinin bakterisidal özelliklerini kaybetmesine sebep olur [298]. Ayrıca KFTR'deki defektin lizozomal pH'yı bozduğu, bu nedenle lizozomal enzim olan aSMaz'ın aktivitesinin azaldığı (defektif aktivite artışı) dolayısıyla SER miktarının azaldığı gösterilmiştir [17]. Bu bulgular araştırmamızdaki KF hastalarının düşük SER ve SM düzeylerini açıklayabilir.

2. Hücre içi indirgenme ve oksidasyon (redoks) reaksiyonları, hücre membranındaki SM'in nSMaz ile hidroliz edilerek SER açığa çıkmasında anahtar rol oynar [302]. KF'deki yüksek intraselüler GSH konsantrasyonları, SMaz yoluyla SER sentezinde azalmaya yol açıyor olabilir [229].

Hücre dışı TNF- α , IFN- γ , LPS veya hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi uyarıların da SMaz yolağı aktive etmesi SER'in ana kaynağıdır [303]. Hücrelerin TNF- α ile muamesesi, bu hücrelerde SMaz aktivasyonuna neden olur. Bu aktivasyon, GSH'ın da sürece dahil olduğu kaspaz 8'in aktivasyonunu izleyen apoptotik süreci başlatır [229, 304]. Fagositlerden TNF- α veya H₂O₂ salgılanması, normal hücrelerin, inflamasyonu bastırmak veya nekrotik hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlamak için geliştirmiş olduğu bir savunma mekanizması olabilir [229]. Ancak hücrenin GSH ve GSH öncülü N-asetilsistein ile muamelesinin, TNF- α , IL-1 β , hipoksi gibi oksidatif stres uyarılarıyla indüklenen SER üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir [229, 304, 305]. GSH, magnezyum bağımlı nSMaz'ı inhibe ederek SER üretimini baskılar [304]. Akciğer SER üretimi için hücre içi GSH düzeylerinin düşük olması gerektiği, yüksek GSH düzeylerinin SER üretimini inhibe ettiği ise bir araştırmada gösterilmiştir [306]. Ayrıca KF hücrelerinde GSH'ın yüksek olduğu öne sürülmüştür [307]. Çünkü KFTR klor dışında büyük organik iyonlarla, GSH ve okside glutatyon (GSSH)'a da geçirgendir [308]. KFTR mutasyonu olan hastalarda GSH transportunun bozulduğu ve bu nedenle KF hastaları akciğer epitel hücrelerinde GSH düzeylerinin arttığı, hücre dışındaki havayolu yüzey sıvısında ise azaldığı gösterilmiştir [307]. Sonuç olarak mutant KFTR taşıyan hücrelerin, GSH salınımının azalması ve buna bağlı SER üretiminin azalmasıyla birlikte, oksidatif stresle indüklenen apoptoza yatkınlığı azalmıştır [308]. KFTR defektinden dolayı, apoptoz sürecinde meydana gelen bu kusur, *P. aeruginosa* ile infekte hücrelerin apoptoza uğratılmayıp elimine edilmesine engel oluyor olabilir. Bu durum KF'deki akciğer patogenezinin altta yatan sebebi olarak düşünülebilir [309].

3. KF hastalarında sitokinler yüksek seviyelerde seyrediyor. Hayvan modellerinde infeksiyon yokluğunda dahi bu yüksekliğin devam ettiği gösterilmiştir [310]. İnflamatuvar genlerin anormal ekspresyonunun infeksiyondan önce de var olup olmadığı bilinmemektedir. Yüksek inflamasyon seviyeleri KF'li infantlarda gösterilmiş [311, 312], hatta bir araştırma KF'li fetusun yüksek sitokin seviyeleri olduğunu raporlamıştır [313]. KF'de inflamasyon göstergeleri, artmış IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α iken azalmış IL-10 seviyeleridir [314-316]. KF'de fosforilasyonu artmış olan NF- κ B, sitokinlerin artmış transkripsiyonundan sorumludur. Normal fonksiyon gösteren KFTR, NF- κ B'nin negatif düzenleyicisidir [299]. Bu durum KF'deki NF-

$\kappa\beta$ 'nin yüksek aktivasyonunu açıklar [317]. Bir araştırma SER'lerin NF- $\kappa\beta$ 'yi inhibe ettiğini raporlamıştır [318]. KF'deki yüksek NF- $\kappa\beta$ 'nin artmış aktivasyonu, düşük SER seviyeleri ile de ilişkili olabilir.

Kitinaz 3 benzeri protein olarak da bilinen YKL-40, ilk kez fare meme kanseri hücrelerinde tespit edilmiş, sağlıklı insanda ise nötrofil, makrofaj, monosit ve sinovyal hücrelerde üretilen, hücre proliferasyonu ve canlılığını sağlayan kitinaz benzeri bir proteindir. İnsanlarda inflamatuvar birçok hastalıkta arttığı gösterilmiştir [272]. Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre; KF hastalarının artmış balgam YKL-40 düzeylerinin pulmoner fonksiyonlarla korele olduğu, serum düzeylerinin de sağlıklı kontrole göre yüksek olduğu raporlanmış, bu nedenle YKL-40'ın KF akciğer hastalığında faydalı bir biyolojik belirteç olabileceği savunulmuştur [19, 20].

Bizim araştırmamızda literatürden farklı olarak çalışma grubuna erişkin KF hastalarının yanısıra, ilk kez çocuk hastalar da dahil edildi. Ve ilk defa hastaların pulmoner alevlenme, taburculuk ve taburcu olduktan sonraki kontrol dönemlerini kapsayan 3 farklı klinik döneminin plazma YKL-40 düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar benzer yaş aralığındaki sağlıklı bireylerle kıyaslandı. Hem erişkin hem de çocuk KF hastalarının YKL-40 düzeyleri tüm dönemlerde sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0,001$ ve $p<0,05$). Bununla birlikte hastalara ait YKL-40 düzeylerinde alevlenmeden, kontrol dönemine kadar 3 dönemde, dönemler arası farklılık saptanmamıştır.

Erişkin ve çocuk KF hastalarının, alevlenme dönemi YKL-40 düzeylerinin alevlenme dönemi CRP ve BK düzeyleri ile korelasyonu bulunmadı. Ancak erişkin KF hastalarının alevlenme dönemi YKL-40 düzeyleri, aynı dönem %FVC ve %FEV1 \leq 50 olanların %FVC ($r=-0,64$ ve $p<0,05$) ve %FEV1 ($r=-0,64$ ve $p<0,05$) değerleri ile negatif yönde korele bulundu. Erişkin hasta grubunda, çocuk hastalara göre hastalık daha da ilerlemiş olduğundan %FVC ve %FEV1 \leq 50 olanlar istatistiksel değerlendirmeye alınmıştır. Çocuk KF hastalarının alevlenme dönemi YKL-40 düzeyleri, alevlenme dönemi %FVC ($r=-0,70$ ve $p<0,05$) ve %FEV1 ($r=-0,72$ ve $p<0,05$) ile negatif yönde korele bulunmuştur.

KF'li erişkin hastalarda yapılan bir çalışmaya göre hem balgam hem de serum YKL-40 düzeylerinin sağlıklı bireylere göre yüksek ve birbiriyle pozitif yönde korele oldukları bulunmuş ancak, akciğer hasarında, balgam YKL-40 düzeylerinin seruma

göre daha sensitif olduğu belirtilmiştir [20]. Bizim araştırmamızda hem erişkin hem de çocuk hastalarda alevlenme dönemi YKL-40 düzeylerinin solunum fonksiyon testlerinden %FVC ve %FEV1 ile korele olması, YKL-40'ın değerli bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

Kitotriozidaz aktivitesi, erişkin hastaların tüm dönemlerinde sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek iken, çocuk hastalarda sağlıklı bireylere göre anlamlı farklılık olmaması, kitotriozidaz aktivitesinin, yaşça büyük hastalarda kronik inflamasyonu daha iyi yansıttığını düşündürmektedir. Bu nedenle erişkin hastalarda daha değerli olabilir.

Erişkin hastaların rutin biyokimyasal verilerden alevlenme dönemi CRP düzeyleri, (median değerleri referans aralığın üzerinde olmasına rağmen) aynı dönem dönem kitotriozidaz aktivitesi ile negatif yönde korele bulunmuştur. Hem kitotriozidaz enzim aktivitesinin hem de CRP'nin inflamatuvar yanıtla ilişkili olmaları pozitif yönde korele olmaları beklentisi yaratsa da, sonuçlarımız bu inflamasyon belirteçlerinin farklı mekanizmalarla düzenlenmiş olabileceğini düşündürmüştür. CRP'nin plazma yarı ömrünün 19 saat olması [319] veya KF hastalarının antiinflamatuvar etki gösteren steroid ilaç kullanımları inflamatuvar parametreler üzerinde farklı etkiler yaratmış olabilir. Başka hasta gruplarını içeren çalışmalarda ise kitotriozidaz aktivitesi ile CRP korelasyonu bulunmamıştır [320, 321].

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamız, hem çocuk hem de erişkin KF hasta grubunu dahil eden, aynı zamanda hastaların 3 farklı klinik dönemini içeren ve birçok analitin değerlendirildiği özgün bir araştırma olmuştur.

Verilerimiz KF'de sfingolipit metabolizmasının bozulduğunu, YKL-40 düzeyleri ile erişkin hastalarda kitotriozidaz aktivitesinin arttığını ortaya koymuştur. Çocuk KF hastalarında ise bu analitler ilk defa araştırılmıştır.

YKL-40 düzeylerinin hem çocuk hem de erişkin grupta %FVC ve %FEV1 ile negatif korele çıkmış olması, akciğer fonksiyonlarını göstermesi açısından değerli bir biyobelirteç olabileceğini ortaya koymuştur.

SER, SM, YKL-40 düzeyleri ile kitotriozidaz aktiviteleri hastalarda dönemsel olarak anlamlı farklılık göstermese de, bizim tarafımızdan ilk kez yapılmış ve araştırmamıza özgünlük katmıştır. Ancak takip edilen ve 3 dönemi de yakalanan hasta sayımızın az olması, dönemler arası istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulamama sebebi olabilir. Daha çok hastayı kapsayan ve daha uzun süreli prospektif bir çalışma ile, olası dönemsel farklılıklar ortaya konulması mümkün olabilecektir.

SER ve SM düzeylerinin yanısıra KF'deki sfingolipit metabolizmasını moleküler düzeyde daha iyi anlamak ve hipotezlerimizi aydınlatmak amacıyla SMaz aktivitesi, seramid 1-fosfat ve glutatyon düzeyleri ölçülebilir.

YKL-40'ın düzeyleri plazma örnekleri dışında balgam örneklerinde de araştırılabilir.

Rutin ve biyokimyasal parametrelerden dönemsel olarak eksiklerin olması, özellikle çocuk KF hastalarında solunum fonksiyon testi uygulaması zorluğu, bu nedenle beklenen %FEV ve %FVC verilerimizin eksik olması sonuçlarımızı olumsuz yönde etkilemiş olabilir.

Örneklerimiz çalışılana kadar -80 derecede beklediğinden dolayı kitotriozidaz aktivite kaybı yaşanmış olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Ersöz, D.D., et al., Türk Toraks Derneği Kistik Fibrozis Tanı ve Tedavi Rehberi. Turkish Thoracic Journal, 2011. 12.
2. Bradbury, N.A., et al., Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. Science, 1992. 256(5056): p. 530-2.
3. Collaco, J.M. and G.R. Cutting, Update on gene modifiers in cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med, 2008. 14(6): p. 559-66.
4. Castellani, C. and B.M. Assael, Cystic fibrosis: a clinical view. Cell Mol Life Sci, 2016.
5. Castellani, S., et al., Emerging relationship between CFTR, actin and tight junction organization in cystic fibrosis airway epithelium. Histol Histopathol, 2017. 32(5): p. 445-459.
6. Hoffman, L.R. and B.W. Ramsey, Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead. Chest, 2013. 143(1): p. 207-213.
7. O'Sullivan, B.P. and S.D. Freedman, Cystic fibrosis. Lancet, 2009. 373(9678): p. 1891-904.
8. Giron-Moreno, R.M., et al., Role of C-reactive protein as a biomarker for prediction of the severity of pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis. BMC Pulm Med, 2014. 14: p. 150.
9. Gulbins, E., Lipids control mucus production in cystic fibrosis. Nat Med, 2010. 16(3): p. 267-8.
10. Kolesnick, R.N., F.M. Goni, and A. Alonso, Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. J Cell Physiol, 2000. 184(3): p. 285-300.
11. Grassme, H., et al., CFTR-dependent susceptibility of the cystic fibrosis-host to *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Med Microbiol, 2010. 300(8): p. 578-83.
12. Becker, K.A., et al., Acid sphingomyelinase inhibitors normalize pulmonary ceramide and inflammation in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. 42(6): p. 716-24.
13. Teichgraber, V., et al., Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. Nat Med, 2008. 14(4): p. 382-91.

14. Ulrich, M., et al., Alveolar inflammation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2010. 9(3): p. 217-27.
15. Brodlie, M., et al., Ceramide is increased in the lower airway epithelium of people with advanced cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 182(3): p. 369-75.
16. Zhang, Y., et al., Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cfr-deficient macrophages on infection. *J Immunol*, 2010. 184(9): p. 5104-11.
17. Yu, H., et al., Defective acid sphingomyelinase pathway with *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. 41(3): p. 367-75.
18. Guilbault, C., et al., Fenretinide corrects newly found ceramide deficiency in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. 38(1): p. 47-56.
19. Hector, A., et al., The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. *PLoS One*, 2011. 6(9): p. e24399.
20. Leonardi, S., et al., YKL-40 as marker of severe lung disease in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, 2016. 15(5): p. 583-6.
21. Volck, B., et al., YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998. 110(4): p. 351-60.
22. Mack, I., et al., The role of chitin, chitinases, and chitinase-like proteins in pediatric lung diseases. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 2015. 2: p. 3.
23. Davis, P.B., M. Drumm, and M.W. Konstan, Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 154(5): p. 1229-56.
24. Dhooghe, B., et al., Lung inflammation in cystic fibrosis: pathogenesis and novel therapies. *Clin Biochem*, 2014. 47(7-8): p. 539-46.
25. Mason, R.J., et al., Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. 5th ed. cystic fibrosis. Vol. 1.
26. Farber, S., H. Shwachman, and C.L. Maddock, PANCREATIC FUNCTION AND DISEASE IN EARLY LIFE. I. PANCREATIC ENZYME ACTIVITY AND THE CELIAC SYNDROME. *Journal of Clinical Investigation*, 1943. 22(6): p. 827-838.

27. Lowe, C.U., C.D. May, and S.C. Reed, Fibrosis of the pancreas in infants and children; a statistical study of clinical and hereditary features. *Am J Dis Child*, 1949. 78(3): p. 349-74.
28. Rowe, S.M., S. Miller, and E.J. Sorscher, Cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 2005. 352(19): p. 1992-2001.
29. Quinton, P.M., Missing Cl conductance in cystic fibrosis. *Am J Physiol*, 1986. 251(4 Pt 1): p. C649-52.
30. Knowles, M., J. Gatzky, and R. Boucher, Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest*, 1983. 71(5): p. 1410-7.
31. Welsh, M.J. and C.M. Liedtke, Chloride and potassium channels in cystic fibrosis airway epithelia. *Nature*, 1986. 322(6078): p. 467-70.
32. Welsh, M.J., An apical-membrane chloride channel in human tracheal epithelium. *Science*, 1986. 232(4758): p. 1648-50.
33. Schoumacher, R.A., et al., Phosphorylation fails to activate chloride channels from cystic fibrosis airway cells. *Nature*, 1987. 330(6150): p. 752-4.
34. Riordan, J.R., et al., Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989. 245(4922): p. 1066-73.
35. Kerem, B., et al., Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 1989. 245(4922): p. 1073-80.
36. Rommens, J.M., et al., Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 1989. 245(4922): p. 1059-65.
37. Martiniano, S.L., et al., Advances in the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Adv Pediatr*, 2014. 61(1): p. 225-43.
38. Rosenfeld, M., B.W. Ramsey, and R.L. Gibson, Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med*, 2003. 9(6): p. 492-7.
39. Muhlebach, M.S., et al., Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. 160(1): p. 186-91.

40. Chernick, W.S. and G.J. Barbero, Composition of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas and bronchiectasis. *Pediatrics*, 1959. 24: p. 739-45.
41. Sly , P.D., et al., Risk Factors for Bronchiectasis in Children with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 2013. 368(21): p. 1963-1970.
42. Goldman, M.J., et al., Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 1997. 88(4): p. 553-60.
43. Smith, J.J., et al., Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*, 1996. 85(2): p. 229-36.
44. Verkman, A.S., Y. Song, and J.R. Thiagarajah, Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 284(1): p. C2-15.
45. Coakley, R.D. and R.C. Boucher, Regulation and functional significance of airway surface liquid pH. *Jop*, 2001. 2(4 Suppl): p. 294-300.
46. Worlitzsch, D., et al., Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*, 2002. 109(3): p. 317-25.
47. Boucher, R.C., Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. *J Physiol*, 1999. 516 (Pt 3): p. 631-8.
48. Jayaraman, S., et al., Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal [Na(+)] and pH but elevated viscosity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. 98(14): p. 8119-8123.
49. Nadel, J.A., B. Davis, and R.J. Phipps, Control of mucus secretion and ion transport in airways. *Annu Rev Physiol*, 1979. 41: p. 369-81.
50. Trout, L., et al., Inhibition of airway liquid secretion and its effect on the physical properties of airway mucus. *Am J Physiol*, 1998. 274(2 Pt 1): p. L258-63.
51. Engelhardt, J.F., et al., Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet*, 1992. 2(3): p. 240-8.

52. van der Doef, H.P.J., et al., Intestinal Obstruction Syndromes in Cystic Fibrosis: Meconium Ileus, Distal Intestinal Obstruction Syndrome, and Constipation. *Current Gastroenterology Reports*, 2011. 13(3): p. 265-270.
53. Quinton, P.M., Role of epithelial HCO₃⁻ transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2010. 299(6): p. C1222-C1233.
54. Quinton, P.M., Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *The Lancet*. 372(9636): p. 415-417.
55. Escobar, M.A., et al., Surgical considerations in cystic fibrosis: A 32-year evaluation of outcomes. *Surgery*. 138(4): p. 560-572.
56. Carlyle, B.E., D.S. Borowitz, and P.L. Glick, A review of pathophysiology and management of fetuses and neonates with meconium ileus for the pediatric surgeon. *Journal of Pediatric Surgery*. 47(4): p. 772-781.
57. Subhi, R., et al., Distal intestinal obstruction syndrome in cystic fibrosis: presentation, outcome and management in a tertiary hospital (2007-2012). *ANZ J Surg*, 2014. 84(10): p. 740-4.
58. Assis, D.N. and S.D. Freedman, Gastrointestinal Disorders in Cystic Fibrosis. *Clinics in Chest Medicine*. 37(1): p. 109-118.
59. Wilschanski, M. and P.R. Durie, Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. *Gut*, 2007. 56(8): p. 1153-63.
60. Demeyer, S., et al., Beyond pancreatic insufficiency and liver disease in cystic fibrosis. *Eur J Pediatr*, 2016. 175(7): p. 881-94.
61. Houwen, R.H., et al., Defining DIOS and constipation in cystic fibrosis with a multicentre study on the incidence, characteristics, and treatment of DIOS. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2010. 50(1): p. 38-42.
62. Blondeau, K., et al., Gastro-oesophageal reflux and aspiration of gastric contents in adult patients with cystic fibrosis. *Gut*, 2008. 57(8): p. 1049-55.
63. Chin, M., S.D. Aaron, and S.C. Bell, The treatment of the pulmonary and extrapulmonary manifestations of cystic fibrosis. *Presse Med*, 2017. 46(6 Pt 2): p. e139-e164.

64. Maisonneuve, P., et al., Cancer Risk in Cystic Fibrosis: A 20-Year Nationwide Study From the United States. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2013. 105(2): p. 122-129.
65. Lai, H.J., et al., Association between Initial Disease Presentation, Lung Disease Outcomes, and Survival in Patients with Cystic Fibrosis. *American Journal of Epidemiology*, 2004. 159(6): p. 537-546.
66. Ratjen, F. and G. Döring, Cystic fibrosis. *The Lancet*. 361(9358): p. 681-689.
67. Andersen, D.H., Cystic Fibrosis Of The Pancreas And Its Relation To Celiac Diseasea Clinical And Pathologic Study. *Am J Dis Child*, 1938. 56(2): p. 344-399.
68. Moheet, A. and A. Moran, CF-related diabetes: Containing the metabolic miscreant of cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 2017. 52(S48): p. S37-S43.
69. Elborn, J.S., Cystic fibrosis. *Lancet*, 2016. 388(10059): p. 2519-2531.
70. Rowland, M., et al., Outcome in Cystic Fibrosis Liver Disease. *The American Journal Of Gastroenterology*, 2010. 106: p. 104.
71. Heng, H.H., X.M. Shi, and L.C. Tsui, Fluorescence in situ hybridization mapping of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene to 7q31.3. *Cytogenet Cell Genet*, 1993. 62(2-3): p. 108-9.
72. Zielenski, J., et al., Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*, 1991. 10(1): p. 214-28.
73. Chu, C.S., et al., Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *EMBO J*, 1991. 10(6): p. 1355-63.
74. Delaney, S.J., et al., Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nat Genet*, 1993. 4(4): p. 426-31.
75. Cantin, A.M., et al., Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*, 2015. 14(4): p. 419-30.

76. Hwang, T.C. and D.N. Sheppard, Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J Physiol*, 2009. 587(Pt 10): p. 2151-61.
77. Callebaut, I., et al., Molecular modelling and molecular dynamics of CFTR. *Cell Mol Life Sci*, 2017. 74(1): p. 3-22.
78. Klein, I., B. Sarkadi, and A. Varadi, An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1461(2): p. 237-62.
79. Higgins, C.F., ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 1992. 8: p. 67-113.
80. Allikmets, R., et al., A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet*, 1997. 15(3): p. 236-46.
81. Rust, S., et al., Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*, 1999. 22(4): p. 352-5.
82. Tiwari, A.K., et al., Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011. 12(4): p. 570-94.
83. Cant, N., N. Pollock, and R.C. Ford, CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014. 52: p. 15-25.
84. Anderson, M.P., et al., Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am J Physiol*, 1992. 263(1 Pt 1): p. L1-14.
85. Frizzell, R.A., Ten years with CFTR. *Physiol Rev*, 1999. 79(1 Suppl): p. S1-2.
86. Linsdell, P., Relationship between anion binding and anion permeability revealed by mutagenesis within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Physiol*, 2001. 531(Pt 1): p. 51-66.
87. French, P.J., et al., Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 1995. 270(44): p. 26626-31.
88. Hallows, K.R., et al., Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J Clin Invest*, 2000. 105(12): p. 1711-21.

89. Wilkinson, D.J., et al., CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Am J Physiol*, 1997. 273(1 Pt 1): p. L127-33.
90. Chappe, V., et al., Stimulatory and inhibitory protein kinase C consensus sequences regulate the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(1): p. 390-5.
91. Lewis, H.A., et al., Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J Biol Chem*, 2005. 280(2): p. 1346-53.
92. Lewis, H.A., et al., Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J*, 2004. 23(2): p. 282-93.
93. Vergani, P., et al., CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature*, 2005. 433(7028): p. 876-80.
94. Kunzelmann, K., et al., Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch*, 2000. 440(2): p. 193-201.
95. Quinton, P.M., Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet*, 2008. 372(9636): p. 415-7.
96. Choi, J.Y., et al., Cl⁻-dependent HCO₃⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *JOP*, 2001. 2(4 Suppl): p. 243-6.
97. Griesenbach, U., D.M. Geddes, and E.W. Alton, Genetics and Pathogenesis of Cystic Fibrosis in *Textbook of Respiratory Cell and Molecular Biology*
98. Wilschanski, M., et al., Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *J Pediatr*, 1995. 127(5): p. 705-10.
99. Denning, G.M., et al., Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*, 1992. 358(6389): p. 761-4.
100. Rosenstein, B.J. and G.R. Cutting, The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*, 1998. 132(4): p. 589-95.

101. Hammond, K.B., et al., Efficacy of statewide neonatal screening for cystic fibrosis by assay of trypsinogen concentrations. *N Engl J Med*, 1991. 325(11): p. 769-74.
102. Grosse, S.D., et al., Newborn screening for cystic fibrosis: evaluation of benefits and risks and recommendations for state newborn screening programs. *MMWR Recomm Rep*, 2004. 53(RR-13): p. 1-36.
103. Farrell, P.M., et al., Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*, 2008. 153(2): p. S4-S14.
104. Gibson, L.E. and R.E. Cooke, A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, 1959. 23(3): p. 545-9.
105. Clinical Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Sweat testing: sample collection and quantitative analysis. Approved Guideline. Document C34-A2, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000. Third ed. Vol. 29. 2009.
106. Watson, M.S., et al., Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med*, 2004. 6(5): p. 387-91.
107. Borowitz, D., et al., Cystic Fibrosis Foundation Practice Guidelines for the Management of Infants with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Metabolic Syndrome during the First Two Years of Life and Beyond. *The Journal of Pediatrics*, 2009. 155(6, Supplement): p. S106-S116.
108. Naehrlich, L., et al., Nasal potential difference measurements in diagnosis of cystic fibrosis: An international survey. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2014. 13(1): p. 24-28.
109. Knowles, M.R., et al., Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest*, 1997. 100(10): p. 2588-95.
110. Boucher, R.C., Human airway ion transport. Part one. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. 150(1): p. 271-81.

111. Moran, O. and O. Zegarra-Moran, On the measurement of the functional properties of the CFTR. *J Cyst Fibros*, 2008. 7(6): p. 483-94.
112. Knowles, M.R., A.M. Paradiso, and R.C. Boucher, In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther*, 1995. 6(4): p. 445-55.
113. Standaert, T.A., et al., Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr Pulmonol*, 2004. 37(5): p. 385-92.
114. Clancy, J.P., et al., No detectable improvements in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by nasal aminoglycosides in patients with cystic fibrosis with stop mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007. 37(1): p. 57-66.
115. Bradley, J.M., F.M. Moran, and J.S. Elborn, Evidence for physical therapies (airway clearance and physical training) in cystic fibrosis: an overview of five Cochrane systematic reviews. *Respir Med*, 2006. 100(2): p. 191-201.
116. McCool, F.D. and M.J. Rosen, Nonpharmacologic airway clearance therapies: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 2006. 129(1 Suppl): p. 250s-259s.
117. Button, B.M., et al., Chest physiotherapy in infants with cystic fibrosis: to tip or not? A five-year study. *Pediatr Pulmonol*, 2003. 35(3): p. 208-13.
118. Bradley, J. and F. Moran, Physical training for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008(1): p. Cd002768.
119. Döring, G. and N. Hoiby, Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2004. 3(2): p. 67-91.
120. Smyth, A.R., et al., European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *J Cyst Fibros*, 2014. 13 Suppl 1: p. S23-42.
121. AbdulWahab, A., et al., The emergence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients on inhaled antibiotics. *Lung India : Official Organ of Indian Chest Society*, 2017. 34(6): p. 527-531.
122. Doring, G. and N. Hoiby, Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros*, 2004. 3(2): p. 67-91.

123. Li, Z., et al., Longitudinal development of mucoid pseudomonas aeruginosa infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA*, 2005. 293(5): p. 581-588.
124. Owlia, P., et al., Antimicrobial susceptibility differences among mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *GMS Hygiene and Infection Control*, 2014. 9(2): p. Doc13.
125. Konstan, M.W., et al., Effect of High-Dose Ibuprofen in Patients with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 1995. 332(13): p. 848-854.
126. Eigen, H., et al., A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics*, 1995. 126(4): p. 515-523.
127. Cimmino, M., et al., Dornase alfa as postoperative therapy in cystic fibrosis sinonasal disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005. 131(12): p. 1097-101.
128. Mainz, J.G., et al., Sinonasal inhalation of dornase alfa in CF: A double-blind placebo-controlled cross-over pilot trial. *Auris Nasus Larynx*, 2011. 38(2): p. 220-7.
129. Konstan, M.W., et al., A randomized double blind, placebo controlled phase 2 trial of BIIL 284 BS (an LTB4 receptor antagonist) for the treatment of lung disease in children and adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2014. 13(2): p. 148-55.
130. Koyama, H. and D.M. Geddes, Erythromycin and diffuse panbronchiolitis. *Thorax*, 1997. 52(10): p. 915-918.
131. Schultz, M.J., Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*, 2004. 54(1): p. 21-8.
132. Ordonez, C.L., et al., Effect of clarithromycin on airway obstruction and inflammatory markers in induced sputum in cystic fibrosis: a pilot study. *Pediatr Pulmonol*, 2001. 32(1): p. 29-37.
133. Equi, A., et al., Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled crossover trial. *Lancet*, 2002. 360(9338): p. 978-84.

134. Wolter, J., et al., Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. *Thorax*, 2002. 57(3): p. 212-6.
135. Saiman, L., et al., Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *Jama*, 2003. 290(13): p. 1749-56.
136. Nolan, S.J., et al., Inhaled mannitol for cystic fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2015. 10: p. CD008649.
137. Goss, C.H. and J.L. Burns, Exacerbations in cystic fibrosis · 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax*, 2007. 62(4): p. 360-367.
138. Flume, P.A., et al., Cystic fibrosis pulmonary guidelines: treatment of pulmonary exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 180(9): p. 802-8.
139. Regelman, W.E., et al., Reduction of sputum *Pseudomonas aeruginosa* density by antibiotics improves lung function in cystic fibrosis more than do bronchodilators and chest physiotherapy alone. *Am Rev Respir Dis*, 1990. 141(4 Pt 1): p. 914-21.
140. Doring, G., et al., Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*, 2000. 16(4): p. 749-67.
141. Liou , T.G., et al., Lung Transplantation and Survival in Children with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 2007. 357(21): p. 2143-2152.
142. Goldberg, H.J. and A. Deykin, Advances in Lung Transplantation for Patients Who Have Cystic Fibrosis. *Clinics in Chest Medicine*, 2007. 28(2): p. 445-457.
143. Taylor, D.O., et al., Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report--2007. *J Heart Lung Transplant*, 2007. 26(8): p. 769-81.
144. Murray, S., et al., Impact of burkholderia infection on lung transplantation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 178(4): p. 363-71.
145. Moran, A., et al., Clinical Care Guidelines for Cystic Fibrosis–Related Diabetes. A position statement of the American Diabetes Association and a clinical practice guideline of the Cystic Fibrosis Foundation, endorsed by the Pediatric Endocrine Society, 2010. 33(12): p. 2697-2708.

146. Buntain, H.M., et al., Bone mineral density in Australian children, adolescents and adults with cystic fibrosis: a controlled cross sectional study. *Thorax*, 2004. 59(2): p. 149-155.
147. Sermet-Gaudelus, I., et al., European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2011. 10: p. S16-S23.
148. Neinstein, L.S., et al., Menstrual dysfunction in cystic fibrosis. *Journal of Adolescent Health Care*, 1983. 4(3): p. 153-157.
149. Edenborough, F.P., et al., Guidelines for the management of pregnancy in women with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2008. 7: p. S2-S32.
150. James, G., et al., Pregnancy and cystic fibrosis: Approach to contemporary management. *Obstetric Medicine*, 2014. 7(4): p. 147-155.
151. Freitas, D.A., et al., Standard (head-down tilt) versus modified (without head-down tilt) postural drainage in infants and young children with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015(3): p. Cd010297.
152. Borowitz, D., R.D. Baker, and V. Stallings, Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002. 35(3): p. 246-59.
153. Morton, J.R., et al., Distal intestinal obstruction syndrome (DIOS) in patients with cystic fibrosis after lung transplantation. *J Gastrointest Surg*, 2009. 13(8): p. 1448-53.
154. Colombo, C., et al., Guidelines for the diagnosis and management of distal intestinal obstruction syndrome in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, 2011. 10 Suppl 2: p. S24-8.
155. Billings, J.L., et al., Early Colon Screening of Adult Patients With Cystic Fibrosis Reveals High Incidence of Adenomatous Colon Polyps. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2014. 48(9): p. e85-e88.
156. Stallings, V.A., et al., Evidence-based practice recommendations for nutrition-related management of children and adults with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency: results of a systematic review. *J Am Diet Assoc*, 2008. 108(5): p. 832-9.
157. Rafeeq, M.M. and H.A.S. Murad, Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine*, 2017. 15: p. 84.

158. Kerem, E., Mutation specific therapy in CF. *Paediatr Respir Rev*, 2006. 7 Suppl 1: p. S166-9.
159. Sueblinvong, V., B.T. Suratt, and D.J. Weiss, Novel therapies for the treatment of cystic fibrosis: new developments in gene and stem cell therapy. *Clin Chest Med*, 2007. 28(2): p. 361-79.
160. Kolb, M., et al., Gene therapy for pulmonary diseases. *Chest*, 2006. 130(3): p. 879-84.
161. Yang, Y. and S. Uhlig, The role of sphingolipids in respiratory disease. *Ther Adv Respir Dis*, 2011. 5(5): p. 325-44.
162. Gomez-Munoz, A., et al., Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog Lipid Res*, 2016. 61: p. 51-62.
163. Nixon, G.F., Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *Br J Pharmacol*, 2009. 158(4): p. 982-93.
164. Levy, M. and A.H. Futerman, Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life*, 2010. 62(5): p. 347-56.
165. Gulbins, E. and I. Petrache, Sphingolipids in Disease. Vol. 2016. 2013: Springer-Verlag Wien.
166. Zhang, Y., et al., Ceramide-enriched membrane domains--structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1788(1): p. 178-83.
167. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, Many ceramides. *J Biol Chem*, 2011. 286(32): p. 27855-62.
168. Zitomer, N.C., et al., Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 causes accumulation of 1-deoxysphinganine: a novel category of bioactive 1-deoxysphingoid bases and 1-deoxydihydroceramides biosynthesized by mammalian cell lines and animals. *J Biol Chem*, 2009. 284(8): p. 4786-95.
169. Maceyka, M. and S. Spiegel, Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*, 2014. 510(7503): p. 58-67.
170. Mullen, T.D., Y.A. Hannun, and L.M. Obeid, Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J*, 2012. 441(3): p. 789-802.
171. Ziobro, R., et al., Ceramide mediates lung fibrosis in cystic fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 434(4): p. 705-9.

172. Novgorodov, S.A., et al., Novel pathway of ceramide production in mitochondria: thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA. *J Biol Chem*, 2011. 286(28): p. 25352-62.
173. Hannun, Y.A. and R.M. Bell, The sphingomyelin cycle: a prototypic sphingolipid signaling pathway. *Adv Lipid Res*, 1993. 25: p. 27-41.
174. Kumagai, K., et al., CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J Biol Chem*, 2005. 280(8): p. 6488-95.
175. Mencarelli, C. and P. Martinez-Martinez, Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cell Mol Life Sci*, 2013. 70(2): p. 181-203.
176. Bienias, K., et al., Regulation of sphingomyelin metabolism. *Pharmacol Rep*, 2016. 68(3): p. 570-81.
177. Ramstedt, B. and J.P. Slotte, Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett*, 2002. 531(1): p. 33-7.
178. Meer, G.v., Lipid Traffic in Animal Cells. *Annual Review of Cell Biology*, 1989. 5(1): p. 247-275.
179. Simons, K. and E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997. 387(6633): p. 569-572.
180. Bock, J. and E. Gulbins, The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts. *FEBS Lett*, 2003. 534(1-3): p. 169-74.
181. Nicolson, G.L., Cell membrane fluid-mosaic structure and cancer metastasis. *Cancer Res*, 2015. 75(7): p. 1169-76.
182. Gagescu, R., J. Gruenberg, and E. Smythe, Membrane dynamics in endocytosis: structure--function relationship. *Traffic*, 2000. 1(1): p. 84-8.
183. Salaun, C., D.J. James, and L.H. Chamberlain, Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*, 2004. 5(4): p. 255-64.
184. Melkonian, K.A., et al., Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem*, 1999. 274(6): p. 3910-7.
185. Kurzchalia, T.V. and R.G. Parton, Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11(4): p. 424-31.

186. Babiychuk, E.B., et al., Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *Faseb j*, 2002. 16(10): p. 1177-84.
187. Bollinger, C.R., V. Teichgräber, and E. Gulbins, Ceramide-enriched membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2005. 1746(3): p. 284-294.
188. Grassme, H., et al., CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 2001. 276(23): p. 20589-96.
189. Cremesti, A., et al., Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem*, 2001. 276(26): p. 23954-61.
190. Liu, P. and R.G. Anderson, Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J Biol Chem*, 1995. 270(45): p. 27179-85.
191. Becker, K.A., et al., The role of sphingolipids and ceramide in pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Open Respir Med J*, 2010. 4: p. 39-47.
192. Nurminen, T.A., et al., Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *J Am Chem Soc*, 2002. 124(41): p. 12129-34.
193. Grassme, H., et al., Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med*, 2003. 9(3): p. 322-30.
194. Seitz, A.P., et al., Ceramide and sphingosine in pulmonary infections. *Biol Chem*, 2015. 396(6-7): p. 611-20.
195. Ferreira, N.S., et al., Accumulation of ordered ceramide-cholesterol domains in farber disease fibroblasts. *JIMD Rep*, 2014. 12: p. 71-7.
196. Lopez, A.M., et al., Systemic administration of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin to symptomatic *Npc1*-deficient mice slows cholesterol sequestration in the major organs and improves liver function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014. 41(10): p. 780-7.
197. Grassmé, H., J. Riethmüller, and E. Gulbins, Sphingolipids in Inflammation, Infection and Lung Diseases, in *Sphingolipids in Disease*, E. Gulbins and I. Petrache, Editors. 2013, Springer Vienna: Vienna. p. 199-403.
198. KİMYA, Y. and C. CENGİZ, Diabetes Mellitus ve Fetal Akciğer Matürasyonu. *Perinatoloji Dergisi*, 1993. 1: p. 101-104.

199. Tibboel, J., et al., Sphingolipids in lung growth and repair. *Chest*, 2014. 145(1): p. 120-8.
200. Mullen, T.D. and L.M. Obeid, Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012. 12(4): p. 340-63.
201. Nagahashi, M., et al., High levels of sphingolipids in human breast cancer. *J Surg Res*, 2016. 204(2): p. 435-44.
202. Esen, M., et al., Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis*, 2001. 6(6): p. 431-439.
203. Huang, C. and C. Freter, Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(1): p. 924-49.
204. Boslem, E., et al., A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6 beta-cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking. *Biochem J*, 2011. 435(1): p. 267-76.
205. Veret, J., et al., Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipotoxicity-induced apoptosis of INS-1 beta-cells. *Biochem J*, 2011. 438(1): p. 177-89.
206. Lei, X., S.E. Barbour, and S. Ramanadham, Group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A2 (iPLA2beta) and its role in beta-cell programmed cell death. *Biochimie*, 2010. 92(6): p. 627-37.
207. Saddoughi, S.A. and B. Ogretmen, Diverse functions of ceramide in cancer cell death and proliferation. *Adv Cancer Res*, 2013. 117: p. 37-58.
208. Uchida, Y., Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1841(3): p. 453-62.
209. Chalfant, C.E., et al., The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases. *J Lipid Res*, 2004. 45(3): p. 496-506.
210. Arana, L., et al., Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease. *Lipids Health Dis*, 2010. 9: p. 15.
211. Bikman, B.T. and S.A. Summers, Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011. 121(11): p. 4222-4230.

212. Goggel, R., et al., PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med*, 2004. 10(2): p. 155-160.
213. Jenkins, R.W., et al., Regulated secretion of acid sphingomyelinase: implications for selectivity of ceramide formation. *J Biol Chem*, 2010. 285(46): p. 35706-18.
214. Manna, S.K. and B.B. Aggarwal, IL-13 suppresses TNF-induced activation of nuclear factor- κ B, activation protein-1, and apoptosis. *Journal of Immunology*, 1998. 161(6): p. 2863-2872.
215. Xiao, C. and S. Ghosh, NF-kappaB, an evolutionarily conserved mediator of immune and inflammatory responses. *Adv Exp Med Biol*, 2005. 560: p. 41-5.
216. Wiegmann, K., et al., Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell*. 78(6): p. 1005-1015.
217. Kuno, K., et al., Acid sphingomyelinase is not essential for the IL-1 and tumor necrosis factor receptor signaling pathway leading to NFkB activation. *Int Immunol*, 1994. 6(8): p. 1269-72.
218. Slowik, M.R., et al., Ceramide is not a signal for tumor necrosis factor-induced gene expression but does cause programmed cell death in human vascular endothelial cells. *Circ Res*, 1996. 79(4): p. 736-47.
219. Manthey, C.L. and E.H. Schuchman, Acid sphingomyelinase-derived ceramide is not required for inflammatory cytokine signalling in murine macrophages. *Cytokine*, 1998. 10(9): p. 654-61.
220. Signorelli, P., C. Luberto, and Y.A. Hannun, Ceramide inhibition of NF-kappaB activation involves reverse translocation of classical protein kinase C (PKC) isoenzymes: requirement for kinase activity and carboxyl-terminal phosphorylation of PKC for the ceramide response. *Faseb j*, 2001. 15(13): p. 2401-14.
221. Bodas, M., et al., Critical modifier role of membrane-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent ceramide signaling in lung injury and emphysema. *J Immunol*, 2011. 186(1): p. 602-13.

222. Lippman, S.M., J.F. Kessler, and F.L. Meyskens, Jr., Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents (Part I). *Cancer Treat Rep*, 1987. 71(4): p. 391-405.
223. Harris, G., et al., PPAR activation and decreased proliferation in oral carcinoma cells with 4-HPR. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005. 133(5): p. 695-701.
224. Sun, S.Y., P. Yue, and R. Lotan, Induction of apoptosis by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and its association with reactive oxygen species, nuclear retinoic acid receptors, and apoptosis-related genes in human prostate carcinoma cells. *Mol Pharmacol*, 1999. 55(3): p. 403-10.
225. Castillo, S.S., et al., Nitric oxide-enhanced caspase-3 and acidic sphingomyelinase interaction: a novel mechanism by which airway epithelial cells escape ceramide-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 2007. 313(4): p. 816-23.
226. Miller, R.A. and B.E. Britigan, Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev*, 1997. 10(1): p. 1-18.
227. Ulukaya, E. and E.J. Wood, Fenretinide and its relation to cancer. *Cancer Treat Rev*, 1999. 25(4): p. 229-35.
228. Erdreich-Epstein, A., et al., Ceramide signaling in fenretinide-induced endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*, 2002. 277(51): p. 49531-7.
229. Vilela, R.M., et al., Inhibition of IL-8 release from CFTR-deficient lung epithelial cells following pre-treatment with fenretinide. *Int Immunopharmacol*, 2006. 6(11): p. 1651-64.
230. Guilbault, C., et al., Cystic fibrosis fatty acid imbalance is linked to ceramide deficiency and corrected by fenretinide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. 41(1): p. 100-6.
231. Saeed, Z., et al., Fenretinide prevents the development of osteoporosis in Cfr-KO mice. *J Cyst Fibros*, 2008. 7(3): p. 222-30.
232. Burtis, C.A. and D.E. Bruns, *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Molecular Diagnostics and Laboratory Medicine*. 7th ed. Mass spectrometry, ed. A.L. Rockwood, T.M. Annesley, and N.E. Sherman. 2015.

233. Glish, G.L. and R.W. Vachet, The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. 2(2): p. 140-50.
234. Karasek, F.W. and R.E. Clement, *Basic gas chromatography - mass spectrometry : principles and techniques*. 1988, Amsterdam: Elsevier.
235. Bishop, M.L., E.P. Fody, and L.E. Schoeff, *Clinical chemistry : principles, procedures, correlations*. 7th ed. *Chromatography and Mass Spectrometry*, ed. J.C. Drees, M.S. Petrie, and B.H.A. WU. Vol. 7th. 2013. 739.
236. Sonomura, K., et al., Plasma lipid analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2015. 38(12): p. 2033-7.
237. Fahy, E., et al., A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*, 2005. 46(5): p. 839-61.
238. Quehenberger, O., et al., Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res*, 2010. 51(11): p. 3299-305.
239. Noe, J., et al., CFTR regulation of intracellular pH and ceramides is required for lung endothelial cell apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. 41(3): p. 314-23.
240. Sullards, M.C., et al., Analysis of mammalian sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and tissue imaging mass spectrometry (TIMS). *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1811(11): p. 838-53.
241. Imai, H., et al., Determining double-bond positions in monoenoic 2-hydroxy fatty acids of glucosylceramides by gas chromatography-mass spectrometry. *Lipids*, 2000. 35(2): p. 233-6.
242. Yano, M., et al., Quantitative analysis of ceramide molecular species by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res*, 1998. 39(10): p. 2091-8.
243. Gu, M., et al., Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1997. 244(2): p. 347-56.
244. Lee, C.G., et al., Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Curr Opin Immunol*, 2008. 20(6): p. 684-9.
245. Cohen, E., Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci*, 2001. 57(10): p. 946-50.

246. Nishimura, K., et al., Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, 1984. 2(1): p. 93-9.
247. Shibata, Y., et al., Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice. *Infect Immun*, 1997. 65(5): p. 1734-41.
248. Patel, S. and A. Goyal, Chitin and chitinase: Role in pathogenicity, allergenicity and health. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017. 97: p. 331-338.
249. Reese, T.A., et al., Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*, 2007. 447(7140): p. 92-6.
250. Van Dyken, S.J., et al., Fungal chitin from asthma-associated home environments induces eosinophilic lung infiltration. *J Immunol*, 2011. 187(5): p. 2261-7.
251. Boot, R.G., et al., Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem*, 1995. 270(44): p. 26252-6.
252. Boot, R.G., et al., Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem*, 2001. 276(9): p. 6770-8.
253. Bleau, G., et al., Mammalian chitinase-like proteins. *Exs*, 1999. 87: p. 211-21.
254. van Eijk, M., et al., Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol*, 2005. 17(11): p. 1505-12.
255. van Eijk, M., et al., TLR- and NOD2-dependent regulation of human phagocyte-specific chitotriosidase. *FEBS Letters*, 2007. 581(28): p. 5389-5395.
256. Hartl, D., et al., Novel biomarkers in asthma: chemokines and chitinase-like proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2009. 9(1): p. 60-6.
257. Hector, A., et al., The Chitinase-Like Protein YKL-40 Modulates Cystic Fibrosis Lung Disease. *PLOS ONE*, 2011. 6(9): p. e24399.
258. Boot, R.G., et al., Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem*, 2005. 53(10): p. 1283-92.

259. Malaguarnera, L., et al., Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal*, 2005. 19(3): p. 128-32.
260. Guo, Y., et al., Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*, 1995. 18(6): p. 717-22.
261. Cho, S.J., M.D. Weiden, and C.G. Lee, Chitotriosidase in the Pathogenesis of Inflammation, Interstitial Lung Diseases and COPD. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2015. 7(1): p. 14-21.
262. Malaguarnera, L., Chitotriosidase: the yin and yang. *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63(24): p. 3018-29.
263. Shou-Ping, G., et al., Chitinases: Biomarkers for Human Diseases. *Protein & Peptide Letters*, 2009. 16(5): p. 490-498.
264. Johansen, J.S., et al., Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. 15(2): p. 194-202.
265. Bussink, A.P., et al., Evolution of Mammalian Chitinase(-Like) Members of Family 18 Glycosyl Hydrolases. *Genetics*, 2007. 177(2): p. 959-970.
266. Fusetti, F., et al., Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39. *J Biol Chem*, 2003. 278(39): p. 37753-60.
267. Kirkpatrick, R.B., et al., Induction and expression of human cartilage glycoprotein 39 in rheumatoid inflammatory and peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Exp Cell Res*, 1997. 237(1): p. 46-54.
268. Nielsen, A.R., et al., IL-6, but not TNF-alpha, increases plasma YKL-40 in human subjects. *Cytokine*, 2011. 55(1): p. 152-5.
269. Hakala, B.E., C. White, and A.D. Recklies, Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem*, 1993. 268(34): p. 25803-10.
270. Lee, C.G., et al., Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med*, 2009. 206(5): p. 1149-66.

271. Lee, C.G., et al., Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol*, 2011. 73: p. 479-501.
272. Johansen, J.S., N.A. Schultz, and B.V. Jensen, Plasma YKL-40: a potential new cancer biomarker? *Future Oncol*, 2009. 5(7): p. 1065-82.
273. Huang, K. and L.D. Wu, YKL-40: a potential biomarker for osteoarthritis. *J Int Med Res*, 2009. 37(1): p. 18-24.
274. Mathiasen, A.B., et al., YKL-40: a new biomarker in cardiovascular disease? *Biomark Med*, 2010. 4(4): p. 591-600.
275. Mygind, N.D., et al., The inflammatory biomarker YKL-40 at admission is a strong predictor of overall mortality. *J Intern Med*, 2013. 273(2): p. 205-16.
276. Olsson, B., et al., Microglial markers are elevated in the prodromal phase of Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Alzheimers Dis*, 2013. 33(1): p. 45-53.
277. Ober, C. and G.L. Chupp, The Chitinase and Chitinase-Like Proteins: A Review of Genetic and Functional Studies in Asthma and Immune-Mediated Diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 2009. 9(5): p. 401-408.
278. Unal, B., et al., Inhibition of neutral sphingomyelinase decreases elevated levels of nitrative and oxidative stress markers in liver ischemia-reperfusion injury. *Redox Rep*, 2017. 22(4): p. 147-159.
279. Bratthauer, G.L., The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods Mol Biol*, 2010. 588: p. 257-70.
280. Matsui, H., et al., Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces. *J Immunol*, 2005. 175(2): p. 1090-9.
281. Boucher, R.C., Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med*, 2007. 58: p. 157-70.
282. Grassme, H., et al., Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell*, 1997. 91(5): p. 605-15.

283. Hauck, C.R., et al., Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Letters*, 2000. 478(3): p. 260-266.
284. Pfeiffer, A., et al., Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol*, 2001. 31(11): p. 3153-64.
285. Utermohlen, O., et al., Severe impairment in early host defense against *Listeria monocytogenes* in mice deficient in acid sphingomyelinase. *J Immunol*, 2003. 170(5): p. 2621-8.
286. Esen, M., et al., Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis*, 2001. 6(6): p. 431-9.
287. Gassert, E., et al., Induction of Membrane Ceramides: A Novel Strategy to Interfere with T Lymphocyte Cytoskeletal Reorganisation in Viral Immunosuppression. *PLOS Pathogens*, 2009. 5(10): p. e1000623.
288. Avota, E., E. Gulbins, and S. Schneider-Schaulies, DC-SIGN Mediated Sphingomyelinase-Activation and Ceramide Generation Is Essential for Enhancement of Viral Uptake in Dendritic Cells. *PLOS Pathogens*, 2011. 7(2): p. e1001290.
289. Simonis, A., et al., Differential activation of acid sphingomyelinase and ceramide release determines invasiveness of *Neisseria meningitidis* into brain endothelial cells. *PLoS Pathog*, 2014. 10(6): p. e1004160.
290. Y., Y. and U. S., The role of sphingolipids in respiratory disease, O.o.t.m.o. sphingolipids, Editor. 2011, Therapeutic Advances in Respiratory Disease.
291. Grassme, H., et al., Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol*, 2002. 168(1): p. 298-307.
292. Zhang, Y., et al., Acid sphingomyelinase amplifies redox signaling in *Pseudomonas aeruginosa*-induced macrophage apoptosis. *J Immunol*, 2008. 181(6): p. 4247-54.
293. Kowalski, M.P. and G.B. Pier, Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *J Immunol*, 2004. 172(1): p. 418-25.

294. Becker, K.A., et al., Role of CD95 in pulmonary inflammation and infection in cystic fibrosis. *J Mol Med (Berl)*, 2012. 90(9): p. 1011-23.
295. Becker, K.A., et al., Accumulation of ceramide in the trachea and intestine of cystic fibrosis mice causes inflammation and cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 403(3-4): p. 368-74.
296. Caretti, A., et al., Anti-inflammatory action of lipid nanocarrier-delivered myriocin: therapeutic potential in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1840(1): p. 586-94.
297. Itokazu, Y., et al., Reduced GM1 ganglioside in CFTR-deficient human airway cells results in decreased beta1-integrin signaling and delayed wound repair. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014. 306(9): p. C819-30.
298. Barasch, J., et al., Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, 1991. 352(6330): p. 70-3.
299. Vij, N., S. Mazur, and P.L. Zeitlin, CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS One*, 2009. 4(2): p. e4664.
300. Hunter, M.J., et al., Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PLoS One*, 2010. 5(7): p. e11598.
301. Jacquot, J., et al., Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(9): p. 1703-15.
302. Andrieu-Abadie, N., et al., Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2001. 31(6): p. 717-28.
303. Chan, C. and T. Goldkorn, Ceramide path in human lung cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000. 22(4): p. 460-8.
304. Liu, B., et al., Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *J Biol Chem*, 1998. 273(18): p. 11313-20.
305. Lavrentiadou, S.N., et al., Ceramide-mediated apoptosis in lung epithelial cells is regulated by glutathione. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. 25(6): p. 676-84.
306. Lavrentiadou, S.N., et al., Ceramide-Mediated Apoptosis in Lung Epithelial Cells Is Regulated by Glutathione. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2001. 25(6): p. 676-684.

307. Linsdell, P. and J.W. Hanrahan, Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol*, 1998. 275(1 Pt 1): p. C323-6.
308. Jungas, T., et al., Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 2002. 277(31): p. 27912-8.
309. Cannon, C.L., et al., *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. 29(2): p. 188-97.
310. Guilbault, C., et al., Distinct pattern of lung gene expression in the *Cftr*-KO mice developing spontaneous lung disease compared with their littermate controls. *Physiol Genomics*, 2006. 25(2): p. 179-93.
311. Khan, T.Z., et al., Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. 151(4): p. 1075-82.
312. Noah, T.L., et al., Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis*, 1997. 175(3): p. 638-47.
313. Verhaeghe, C., et al., Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *J Cyst Fibros*, 2007. 6(4): p. 304-8.
314. Rottner, M., J.-M. Freyssinet, and M.C. Martínez, Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respiratory Research*, 2009. 10(1): p. 23-23.
315. Berube, J., et al., Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 2010. 285(29): p. 22299-307.
316. Dean, T.P., et al., Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. *Pediatr Res*, 1993. 34(2): p. 159-61.
317. Bodas, M. and N. Vij, The NF-kappaB signaling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential. *Discov Med*, 2010. 9(47): p. 346-56.

318. Chao, M.D., I.S. Chen, and J.T. Cheng, Inhibition of protein kinase C translocation from cytosol to membrane by chelerythrine. *Planta Med*, 1998. 64(7): p. 662-3.
319. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, C-reactive protein: a critical update. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. 111(12): p. 1805-1812.
320. Żurawska-Płaksej, E., et al., Increased chitotriosidase activity in plasma of patients with type 2 diabetes. *Archives of Medical Science : AMS*, 2016. 12(5): p. 977-984.
321. Kundak, A.A., et al., Serum chitotriosidase activity: is it a new inflammatory marker in obese children? *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2012. 25(1-2): p. 63-7.

EKLER

EK 1. Onam formları

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ÇOCUK RIZA FORMU–KF (6-12 yaş/12-17 yaş)

Sevgili kardeşim, benim adım Dr. Gökçen Tuğcu. ‘Kistik Fibrozis Hastalarının Alevlenme ve Remisyon Dönemleri Plazma Sfingomyelin ve Seramid Düzeylerinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Belirlenmesi ve Bazı İnflamasyon Belirteçleriyle İlişkisinin İncelenmesi’ isimli bir çalışma yapacağız. Kistik fibrozis, genlerdeki bozukluğa bağlı ortaya çıkan ve akciğerleri etkileyen bir hastalıktır. Bu hastalar ağır akciğer enfeksiyonları geçirmekte, solunum sıkıntısı ve benzer nedenlerle hastaneye yatmakta, ağır antibiyotik tedavisine ihtiyaç duymaktadır. Bu hastaların akciğerlerinde seramid ve sfingolipit adı verilen yağlar birikmekte ve mikropların yerleşmesini kolaylaştırmaktadır. Ardından da ağır akciğer hastalığı gelişmektedir. Bu yağların artışı anlamak için akciğerlerin içini inceleyen testler zor ve zahmetlidir. Bu yağların kan dolaşımına geçtiğini biliyoruz, bu nedenle kanında bu maddelerin artışı incelemek istiyoruz. Ayrıca vücudunun savunma sisteminin tepkisini anlamak için de kanında bazı maddelerin düzeyini ölçmek istiyoruz. Hastaneye yattığın sırada ve de taburculuğundan bir ay sonra senden kan örneği alacak, kanında yukarda belirttiğimiz maddelerin düzeyini ölçerek iki farklı dönemi karşılaştıracacağız. Özellikle solunum sisteminin çalışması ile kanındaki maddelerin düzeyi arasındaki ilişkiyi araştıracağız. Amacımız kistik fibrozis hastalığının hastaneye yatış ve iyileşme dönemindeki farklılıkları anlayarak, hastalarımıza daha iyi tanı koymak, takip etmek ve yeni tedaviler önermektir.

Araştırmayı ben, Dr. Yeşim Öztaş ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursan senden 3 kere 1'er tüp (toplam 10-12 ml) kan alacağız. Kan alınırken canın biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir. Araştırmaya katılma süren üç günlüktür. Hastaneye yattığın, taburcu olduğun ve iyileşip bir ay sonra kontrole geldiğin dönemleri kapsamaktadır. Fizik muayene ve kan alınması işlemlerinden oluşur. Senden alınan kan örneği yurt dışına gönderilmeyecektir.

Bu araştırmanın sonuçları senin gibi kistik fibrozis hastalığı olan çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da

söyleyeceğiz, 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 vazgeçebilirsiniz, 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 kağıtta 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.

Bu formdaki tüm açıklamaları okudum. Bu araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman sebepli veya sebepsiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Alınan kan örneklerinin kullanılmasıyla ilgili size uyan durumu belirtin;

‘Yalnızca bu araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.....’

‘İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum....’

‘Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum....’

Çocuğun adı, soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Araştırmacının adı, soyadı, ünvanı: Gökçen Tuğcu, Arş. Gör. Dr.

Adres: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak Hast. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Göğüs Hastalıkları BD, Tel: 05320628390

İmza:

Tarih:

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN VELİ RIZA FORMU - KF

Değerli Anne/Baba, benim adım Dr. Gökçen Tuğcu. ‘Kistik Fibrozis Hastalarının Alevlenme ve Remisyon Dönemleri Plazma Sfingomyelin ve Seramid Düzeylerinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Belirlenmesi ve Bazı İnflamasyon Belirteçleriyle İlişkisinin İncelenmesi’ isimli bir çalışma yapacağız. Kistik fibrozis genlerdeki bozukluğa bağlı ortaya çıkan ve akciğerleri etkileyen bir hastalıktır. Bu hastalar ağır akciğer enfeksiyonları geçirmekte, solunum sıkıntısı ve benzer nedenlerle hastaneye yatmakta, ağır antibiyotik tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Bu hastaların akciğerlerinde seramid ve sfingolipit adı verilen yağlar birikmekte ve mikropların yerleşmesini kolaylaştırmaktadır. Ardından da ağır akciğer hastalığı gelişmektedir. Bu yağların artışı anlamak için akciğerlerin içini inceleyen testler zor ve zahmetlidir. Bu yağların kan dolaşımına geçtiğini biliyoruz, bu nedenle çocuğunuzun kanında bu maddelerin artışı incelemek istiyoruz. Ayrıca vücudunun savunma sisteminin tepkisini anlamak için de kanında bazı maddelerin düzeyini ölçmek istiyoruz. Çocuğunuzdan; hastaneye yattığı sırada ve de taburculuğundan bir ay sonra kan örneği alınarak, kanında yukarıda belirttiğimiz maddelerin düzeyini ölçerek iki farklı dönemi karşılaştıracaktır. Özellikle solunum sisteminin çalışması ile kanındaki maddelerin düzeyi arasındaki ilişkiyi araştıracağız. Amacımız kistik fibrozis hastalığının hastaneye yatış ve iyileşme dönemindeki farklılıkları anlayarak, hastalarımıza daha iyi tanı koymak, takip etmek ve yeni tedaviler önermektir.

Araştırmayı ben, Dr. Yeşim Öztaş ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Çocuğunuz bu araştırmaya katılacak olursa 3 kere 1'er tüp (toplam 10-12 ml) kan alacağız. Kan alınırken canı biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir. Çocuğunuzun araştırmaya katılma süresi üç günlüktür, fizik muayene ve kan alınması işlemlerinden oluşur. Hastaneye yattığı, taburcu olduğu ve iyileşip bir ay sonra kontrole geldiği dönemleri kapsamaktadır. Çocuğunuzdan alınan kan örneği yurt dışına gönderilmeyecektir.

Bu araştırmanın sonuçları kistik fibrozis hastalığı olan çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçları başka doktorlarla paylaşılacak, ama çocuğunuzun adı geçmeyecektir. Bu araştırmaya katılmak sizin iznimize bağlıdır. Çalışmaya katılmayı kabul etmediğiniz durumda da doktorlar muayene ve diğer

işlemlerde size ve çocuğunuza önceden olduğu gibi iyi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklınıza şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğiniz zaman bana sorabilirsiniz. Telefon numaram ve adresim bu kağıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsanız aşağıya lütfen adınızı ve soyadınızı yazıp imzalayınız. İmzaldıktan sonra size bu formun bir kopyası verilecektir.

Bu formdaki tüm açıklamaları okudum. Bu araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Çocuğumun araştırmaya katılmasına izin veriyorum, istediğim zaman sebepli veya sebepsiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimizi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla çocuğumun katılmasını kabul ediyorum.

Alınan kan örneklerinin kullanılmasıyla ilgili size uyan durumu belirtin;

‘Yalnızca bu araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.....’

İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum....’

‘Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum....’

Çocuğun adı, soyadı:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırmacının adı, soyadı, ünvanı: Gökçen Tuğcu, Arş. Gör. Dr.

Adres: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak Hast. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Göğüs Hastalıkları BD, Tel: 05320628390

İmza:

Tarih:

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ÇOCUK RIZA FORMU –
Sağlıklı Kontrol (6-12 yaş/12-17 yaş)

Sevgili kardeşim, benim adım Dr. Gökçen Tuğcu. ‘Kistik Fibrozis Hastalarının Alevlenme ve Remisyon Dönemleri Plazma Sfingomyelin ve Seramid Düzeylerinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Belirlenmesi ve Bazı İnflamasyon Belirteçleriyle İlişkinin İncelenmesi’ isimli bir çalışma yapacağız. Kistik fibrozis, genlerdeki bozukluğa bağlı ortaya çıkan ve akciğerleri etkileyen bir hastalıktır. Bu hastalar ağır akciğer enfeksiyonları geçirmekte, solunum sıkıntısı ve benzer nedenlerle hastaneye yatmakta, ağır antibiyotik tedavisine ihtiyaç duymaktadır. Bu hastaların akciğerlerinde seramid ve sfingolipit adı verilen yağlar birikmekte ve mikropların yerleşmesini kolaylaştırmaktadır. Ardından da ağır akciğer hastalığı gelişmektedir. Bu yağların artışı anlamak için akciğerlerin içini inceleyen testler zor ve zahmetlidir. Bu yağların kan dolaşımına geçtiğini biliyoruz, bu nedenle kanında bu maddelerin artışı incelemek istiyoruz. Ayrıca vücudunun savunma sisteminin tepkisini anlamak için de kanında bazı maddelerin düzeyini ölçmek istiyoruz. Hastaneye yattığın sırada ve de taburculuğundan bir ay sonra senden kan örneği alacak, kanında yukarıda belirttiğimiz maddelerin düzeyini ölçerek iki farklı dönemi karşılaştıracız. Özellikle solunum sisteminin çalışması ile kanındaki maddelerin düzeyi arasındaki ilişkiyi araştıracağız. Amacımız kistik fibrozis hastalığının hastaneye yatış ve iyileşme dönemindeki farklılıkları anlayarak, hastalarımıza daha iyi tanı koymak, takip etmek ve yeni tedaviler önermektir.

Araştırmayı ben, Dr. Yeşim Öztaş ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursan senden 3 kere 1'er tüp (toplam 10-12 ml) kan alacağız. Kan alınırken canın biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir. Araştırmaya katılma süren üç günlüktür. Hastaneye yattığın, taburcu olduğun ve iyileşip bir ay sonra kontrole geldiğin dönemleri kapsamaktadır. Fizik muayene ve kan alınması işlemlerinden oluşur. Senden alınan kan örneği yurt dışına gönderilmeyecektir.

Bu araştırmanın sonuçları senin gibi kistik fibrozis hastalığı olan çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz, 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 kağıtta 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.

Bu formdaki tüm açıklamaları okudum. Bu araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman sebepli veya sebepsiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Alınan kan örneklerinin kullanılmasıyla ilgili size uyan durumu belirtin;

‘Yalnızca bu araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.....’

‘İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum....’

‘Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum....’

Çocuğun adı, soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Araştırıcının adı, soyadı, ünvanı: Gökçen Tuğcu, Arş. Gör. Dr.

Adres: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak Hast. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Göğüs Hastalıkları BD, Tel: 05320628390

İmza:

Tarih:

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN VELİ RIZA FORMU – Sağlıklı
Kontrol

Değerli Anne/Baba, benim adım Dr. Gökçen Tuğcu. ‘Kistik Fibrozis Hastalarının Alevlenme ve Remisyon Dönemleri Plazma Sfingomyelin ve Seramid Düzeylerinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Belirlenmesi ve Bazı İnflamasyon Belirteçleriyle İlişkisinin İncelenmesi’ isimli bir çalışma yapacağız. Kistik fibrozis genlerdeki bozukluğa bağlı ortaya çıkan ve akciğerleri etkileyen bir hastalıktır. Bu hastalar ağır akciğer enfeksiyonları geçirmekte, solunum sıkıntısı ve benzer nedenlerle hastaneye yatmakta, ağır antibiyotik tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Bu hastaların akciğerlerinde seramid ve sfingolipit adı verilen yağlar birikmekte ve mikropların yerleşmesini kolaylaştırmaktadır. Ardından da ağır akciğer hastalığı gelişmektedir. Bu yağların artışı anlamak için akciğerlerin içini inceleyen testler zor ve zahmetlidir. Bu yağların kan dolaşımına geçtiğini biliyoruz, bu nedenle çocuğunuzun kanında bu maddelerin düzeyini incelemek istiyoruz. Ayrıca vücudunun savunma sisteminin tepkisini anlamak için de kanında bazı maddelerin düzeyini ölçmek istiyoruz. Özellikle solunum sisteminin çalışması ile kanındaki maddelerin düzeyi arasındaki ilişkiyi araştıracağız. Amacımız sizin çocuğunuz gibi sağlıklı çocuklarla, kistik fibrozis hastalığı olan çocukların sonuçlarını karşılaştırmak ve onların hastaneye yatış ve iyileşme dönemindeki farklılıkları anlayarak, hastalarımıza daha iyi tanı koymak, takip etmek ve yeni tedaviler önermektir.

Araştırmayı ben, Dr. Yeşim Öztaş ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya çocuğunuz katılacak olursa bir tüp (toplam 4-5ml) kan alacağız. Kan alınırken canı biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir. Çocuğunuzun araştırmaya katılma süresi bir günlüktür, fizik muayene ve kan alınması işlemlerinden oluşur. Çocuğunuzdan alınan kan örneği yurt dışına gönderilmeyecektir.

Bu araştırmanın sonuçları kistik fibrozis hastalığı olan çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçları başka doktorlarla paylaşılacak, ama çocuğunuzun adı bahsedilmeyecektir. Bu araştırmaya katılmak sizin iznimize bağlıdır. Çalışmaya katılmayı kabul etmediğiniz durumda da doktorlar muayene ve diğer işlemlerde size ve çocuğunuza önceden olduğu gibi iyi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklınıza Şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğiniz zaman bana sorabilirsiniz. Telefon numaram ve adresim bu kağıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsanız aşağıya lütfen adınızı ve soyadınızı yazıp imzalayınız. İmzaladıktan sonra size bu formun bir kopyası verilecektir.

Bu formdaki tüm açıklamaları okudum. Bu araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Çocuğumun araştırmaya katılmasına izin veriyorum, istediğim zaman sebepli veya sebepsiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimizi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla çocuğumun katılmasını kabul ediyorum.

Alınan kan örneğinin kullanılmasıyla ilgili size uyan durumu belirtin;

‘Yalnızca bu araştırmada kullanılmasına izin veriyorum....’

‘İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum....’

‘Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum....’

Çocuğun adı, soyadı:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

AraŐtırıcının adı, soyadı, ünvanı: Gökçen Tuğcu, Arş. Gör. Dr.

Adres: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak Hast. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Göğüs Hastalıkları B, Tel: 05320628390

İmza:

Tarih:

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ERİŞKİN RIZA FORMU - KF
(18 yaş ve üzeri)

Değerli Katılımcı, benim adım Dr. Berrin Er. . ‘Kistik Fibrozis Hastalarının Alevlenme ve Remisyon Dönemleri Plazma Sfingomyelin ve Seramid Düzeylerinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Belirlenmesi ve Bazı İnflamasyon Belirteçleriyle İlişkisinin İncelenmesi’ isimli bir çalışma yapacağız. Kistik fibrozis genlerdeki bozukluğa bağlı ortaya çıkan ve akciğerleri etkileyen bir hastalıktır. Bu hastalar ağır akciğer enfeksiyonları geçirmekte, solunum sıkıntısı ve benzer nedenlerle hastaneye yatmakta, ağır antibiyotik tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Bu hastaların akciğerlerinde seramid ve sfingolipit adı verilen yağlar birikmekte ve mikropların yerleşmesini kolaylaştırmaktadır. Ardından da ağır akciğer hastalığı gelişmektedir. Bu yağların artışı anlamak için akciğerlerin içini inceleyen testler zor ve zahmetlidir. Bu yağların kan dolaşımına geçtiğini biliyoruz, bu nedenle kanında bu maddelerin artışı incelemek istiyoruz. Ayrıca vücudunun savunma sisteminin tepkisini anlamak için de kanında bazı maddelerin düzeyini ölçmek istiyoruz. Hastaneye yattığınız sırada ve de taburculuğunuzdan bir ay sonra sizden kan örneği alacak, kanınızda yukarıda belirttiğimiz maddelerin düzeyini ölçerek iki farklı dönemi karşılaştıracacağız. Özellikle solunum sisteminizin çalışması ile kanınızdaki maddelerin düzeyi arasındaki ilişkiyi araştıracağız. Amacımız kistik fibrozis hastalığının hastaneye yatış ve iyileşme dönemindeki farklılıkları anlayarak, hastalarımıza daha iyi tanı koymak, takip etmek ve yeni tedaviler önermektir.

Araştırmayı ben, Dr Yeşim Öztaş ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursanız sizden 3 kere 1'er tüp (topla 10-12 ml) kan alacağız. Araştırmaya katılma süreniz üç günlüktür, fizik muayene ve kan alınması işlemlerinden oluşur. Hastaneye yattığınız, taburcu olduğunuz ve iyileşip bir ay sonra kontrole geldiğiniz dönemleri kapsamaktadır. Sizden alınan kan örneği yurt dışına gönderilmeyecektir. Bu araştırmanın sonuçları sizin gibi kistik fibrozis hastalığı olan erişkinler için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçları, başka doktorlarla da paylaşılacak, ancak sizin adınız söylenmeyecektir. Bu araştırmaya katılmak sizin isteğinize bağlı ve istemediğiniz takdirde katılmazsınız. Önce katılmayı kabul etseniz bile sonradan vazgeçebilirsiniz, bu tamamen size bağlı. Kabul

etmediğiniz durumda da doktorlar, muayene ve diğer işlemlerde size önceden olduğu gibi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklınıza şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğiniz zaman bana sorabilirsiniz. Telefon numaram ve adresim bu kağıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsanız aşağıya lütfen adınızı ve soyadınızı yazarak ve imza atınız. İmzaladıktan sonra size bu formun bir kopyası verilecektir.

Bu formdaki tüm açıklamaları okudum. Bu araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman sebepli veya sebepsiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Alınan kan örneklerinin kullanılmasıyla ilgili size uyan durumu belirtin;

‘Yalnızca bu araştırmada kullanılmasına izin veriyorum....’

‘İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum....’

‘Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum....’

Katılımcının adı, soyadı:

Tarih:

Katılımcının imzası:

Tarih:

Araştırmacının adı, soyadı, ünvanı: Berrin Er, Arş.Gör. Dr.

Adres: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak Hast., Göğüs Hastalıkları ABD, Tel:
05324154123

İmza:

Tarih:

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ERİŞKİN RIZA FORMU -
Sağlıklı Kontrol (18 yaş ve üzeri)

Değerli Katılımcı, benim adım Dr. Berrin Er. ‘Kistik Fibrozis Hastalarının Alevlenme ve Remisyon Dönemleri Plazma Sfingomyelin ve Seramid Düzeylerinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Belirlenmesi ve Bazı İnflamasyon Belirteçleriyle İlişkisinin İncelenmesi’ isimli bir çalışma yapacağız. Kistik fibrozis genlerdeki bozukluğa bağlı ortaya çıkan ve akciğerleri etkileyen bir hastalıktır. Bu hastalar ağır akciğer enfeksiyonları geçirmekte, solunum sıkıntısı ve benzer nedenlerle hastaneye yatmakta, ağır antibiyotik tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Bu hastaların akciğerlerinde seramid ve sfingolipit adı verilen yağlar birikmekte ve mikropların yerleşmesini kolaylaştırmaktadır. Ardından da ağır akciğer hastalığı gelişmektedir. Bu yağların artışı anlamak için akciğerlerin içini inceleyen testler zor ve zahmetlidir. Bu yağların kan dolaşımına geçtiğini biliyoruz, bu nedenle kanınızda bu maddelerin seviyesini incelemek istiyoruz. Ayrıca vücudunun savunma sisteminin tepkisini anlamak için de kanında bazı maddelerin düzeyini ölçmek istiyoruz. Amacımız kistik fibrozis hastalığının hastaneye yatış ve iyileşme dönemindeki farklılıkları, sizin gibi sağlıklı bireylerle kıyaslayarak, hastalarımıza daha iyi tanı koymak, takip etmek ve yeni tedaviler önermektir.

Araştırmayı ben, Dr Yeşim Öztaş ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursanız sizden 1 tüp (toplam 4-5 ml) kan alacağız. Araştırmaya katılma süreniz bir gündür, fizik muayene ve kan alınması işlemlerinden oluşur. Sizden alınan kan örneği yurt dışına gönderilmeyecektir. Bu araştırmanın sonuçları, başka doktorlarla da paylaşılacak, ancak sizin adınız söylenmeyecektir. Bu araştırmaya katılmak sizin isteğinize bağlı ve istemediğiniz takdirde katılmazsınız. Önce katılmayı kabul etseniz bile sonradan vazgeçebilirsiniz, bu tamamen size bağlı. Kabul etmediğiniz durumda da doktorlar, muayene ve diğer işlemlerde size önceden olduğu gibi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklınıza şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğiniz zaman bana sorabilirsiniz. Telefon numaram ve adresim bu kağıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsanız aşağıya lütfen adınızı ve soyadınızı yazarak ve imza atınız. İmzalıktan sonra size bu formun bir kopyası verilecektir.

Bu formdaki tüm açıklamaları okudum. Bu araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman sebepli veya sebepsiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Alınan kan örneğinin kullanılmasıyla ilgili size uyan durumu belirtin;

‘Yalnızca bu araştırmada kullanılmasına izin veriyorum....’

‘İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum....’

‘Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum....’

Katılımcının adı, soyadı:

Tarih:

Katılımcının imzası:

Tarih:

Araştırmacının adı, soyadı, ünvanı: Berrin Er, Arş. Gör. Dr.

Adres: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak Hast., Göğüs Hastalıkları ABD, Tel:
05324154123

İmza:

Tarih:

EK 2. Muayene Takip Formları

İzlem Formu 1.

Kistik Fibrozis Tanılı Hastalar için-Akut Alevlenme Dönemi

Formun doldurulduğu tarih: Kistik fibrozis hastalığı tanı tarihi:

Hasta Adı-soyadı:

Telefon:

Cinsiyet, Doğum tarihi:

VA:

Boy:

Beden-Kitle İndeksi:

Doğum Yeri/Yaşadığı Yer:

Ter testi sonucu ve tarihi:

Genetik mutasyon testi sonucu :

Meslek:

Okul durumu:

Sigara öyküsü: Kendisi içiyor ()

Pasif içicilik ()

Pankreas yetmezliği: Var () Yok ()

Kronik kolonizasyon: Var () Yok () kolonize olan mikroorganizma:

Komorbidite durumu: (Alerjik Bronko Pulmoner Aspergillozis, Diabetes mellitus

Siroz, Pulmoner hipertansiyon, Astım, Diğer:()

Devamlı kullandığı ilaçlar:

Sistemik Steroid kullanıyor mu?: Evet () Hayır ()

İhale steroid kullanıyor mu?: Evet () Hayır ()

Oksijen saturasyonu:

Akciğer grafisi: Bronşektazi Var () Yok (), Atelektazi Var () Yok (), İnfiltrasyon

Var () Yok (), Diğer:

Solunum fonksiyon testi sonucu ve tarihi:

FVC:

FEV1:

FEV1/FVC:

FEF25-75:

C-reaktif protein:

Sedimentasyon hızı:

Tam kan sayımı: Hg:

BK:

Tr:

Formül:

Karaciğer fonksiyon testleri sonuçları:

Kan lipit profili:

Kültür sonucu ve tarihi:

Akut atak tedavisi: Evde () Hastanede ()

Akut atakta kullanılan ilaçlar:

İzlem Formu 2.

Kistik Fibrozis Tanılı Hastalar için- Alevlenme Dönemi Sonrası Kontrol

Formun doldurulduğu tarih:

Hasta Adı-soyadı:

VA:

Oksijen saturasyonu:

Akciğer grafisi:

Akut atağa göre düzelme var mı?:

Solunum fonksiyon testi sonucu ve tarihi:

FVC:

FEV1:

FEV1/FVC:

FEF25-75:

Kullandığı ilaçlar:

C-reaktif protein:

Sedimentasyon hızı:

Tam kan sayımı: Hg:

BK:

Tr:

Formül:

Kültür sonucu ve tarihi:

Sağlıklı Kontrol İzlem Formu

Formun doldurulduğu tarih:

Hasta Adı-soyadı:

Telefon:

Cinsiyet, Doğum tarihi:

VA:

Boy:

Beden-Kitle İndeksi:

Doğum Yeri/Yaşadığı Yeri:

Meslek:

Okul durumu:

Sigara öyküsü: Kendisi içiyor ()

Pasif içicilik ()

Devamlı kullanılan ilaçlar:

EK 3. Çalışmadan Hazırlanan Yazılı ve Sözlü Sunumlar

- 1) Uluslararası 17. Klinik Biyokimya Kongresi 4-7 Mayıs 2017 Girne-KKTC, Yazılı Bildiri (Burslu): Kistik Fibrozis Hastalarında Plazma Sfingomyelin, Seramid Düzeyleri ve Kitotrioidaz Aktiviteleri
- 2) 1. Lipit Araştırmaları Çalıştayı 26 Ağustos 2016 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sıhhiye/Ankara: Yazılı Bildiri: Kistik Fibrozis Hastalarında Plazma Sfingomyelin, Seramid Düzeyleri ve Kitotrioidaz Aktiviteleri:
- 3) Uluslararası Biyokimya Kongresi-2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi 19-23 Eylül Atatürk Üniversitesi Erzurum, Sözlü Bildiri (Burslu): Kistik Fibroziste Düşük Plazma Sfingomyelin ve Seramid Düzeyleri
- 4) Uluslararası Biyokimya Kongresi-2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi 19-23 Eylül Atatürk Üniversitesi Erzurum, Yazılı Bildiri (Burslu): Primer Siliyer Diskinezi Hastalarında Artmış Plazma Seramid ve Sfingomyelin Düzeyleri
- 5) 2. Lipit Araştırmaları Çalıştayı 7 Ekim 2017 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Sıhhiye/Ankara: Sözlü Bildiri: Primer Siliyer Diskinezi Hastalarında Seramid, Sfingomyelin ve YKL-40 Düzeyleri
- 6) 41. European Cystic Fibrosis Conference 6-9 June 2018 Belgrade, Serbia, Sözlü Bildiri: Plasma YKL-40 Levels and Chitotriosidase Activity in Cystic Fibrosis Patients
- 7) 41. European Cystic Fibrosis Conference 6-9 June 2018 Belgrade, Serbia, Yazılı Bildiri: Plasma Sphingomyelin and Ceramide Levels of Cystic Fibrosis Patients
- 8) European Respiratory Society International Congress 2018, PARIS, France, 15-19 Semptember- Yazılı Bildiri (Burslu): Plasma Ceramides and Sphingomyelins Increase in Primary Ciliary Dyskinesia but Decrease in Cystic Fibrosis