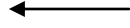


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**KİSTİK FİBROZİS HASTALARINDA NÖTROFİL
FONKSİYONLARI VE SİTOKİN DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ÜMİT ASLANHAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. ESİN ÇETİN**

**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Programında Yüksek Lisans öğrencisi Ümit ASLANHAN tarafından Prof. Dr. Esin ÇETİN'in danışmanlığında hazırlanan **“Kistik Fibrozis Hastalarında Nötrofil Fonksiyonları ve Sitokin Düzeylerinin Araştırılması”** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 13.12.2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Güher S. DİRESKENELİ
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Esin ÇETİN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji A.D.

Prof. Dr. Erkan ÇAKIR

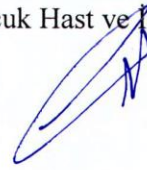
Bezmialem V. Üni. Tıp Fakültesi
Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı



Doç. Dr. Umut Can KÜÇÜKSEZER
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji A.D.

Doç. Dr. Elif K. AYDINER

Marmara Üni. Pendik Eğt. ve Araş. Hast.
Çocuk Hast ve İmmünoloji A.D.



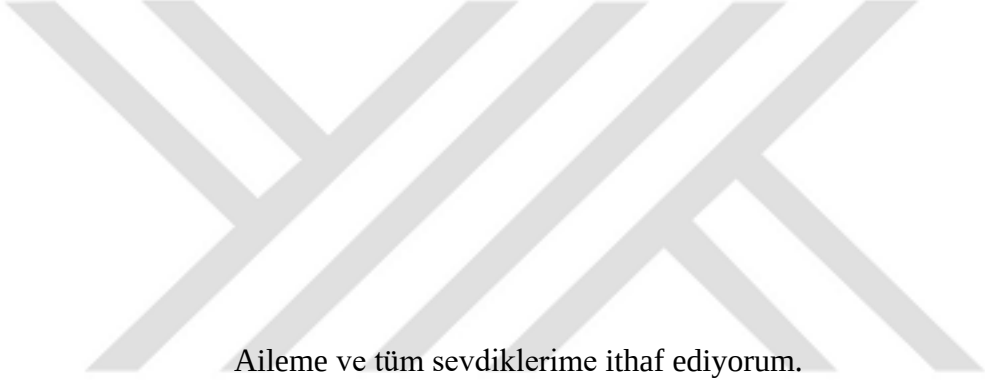
BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ümit Aslanhan



İTHAF



Aileme ve tüm sevdiklerime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca her konuda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, sabırlı, sıcakkanlı ve yardımsever tutumundan dolayı tez danışmanım ve değerli hocam Prof.Dr. Esin Aktaş Çetin'e,

Yardım ve destekleriyle yanımda olan sayın hocam Prof. Dr. Günnur Deniz'e, tezimin laboratuvar çalışmalarında ve istatistiksel hesaplamalarındaki yardım ve desteklerinden dolayı Dr.Leyla Pur Özyiğit'e, Dr.Yusuf Metin Gelmez'e ve Doç.Dr. Umut Küçüksezer'e, desteklerinden ve dostluklarından dolayı tüm İmmünoloji Anabilim Dalı ekibine,

Tezimin her aşamasında bana destek olan, klinik açıdan verdiği tüm emek ve yardımlardan dolayı Uzm. Dr.Mine Yüksel'e,

Yardımları, bilgi birikimleri ile bana yol gösteren ve her zaman destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Erkan Çakır, Doç.Dr.Ahmet Hakan Gedik'e,

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, başta Dr. Vuslat Yılmaz, Dr. Sibel Yentür ve Dr. Sema Bilgiç Gazioğlu olmak üzere tüm İmmünoloji Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarım ve hocalarımıza,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olduklarını bildiğim aileme, her konuda yanımda olan ve tez çalışmam süresince hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Merve Cebeci, Mahdi Behzad, Pınar Kasapoğlu, Deniz Turcan, Melih Özen, Gülce Özçit, Ayşe Engin, Bahar Eryaşar, Özden Özcan ve İlhanTahralı'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kistik Fibrozis Patogenezi	3
2.1.1. Akciğer Bronşlarında Mikrobiyal Çevre	6
2.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve Kistik Fibrozis	6
2.1.3. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A ve TNF- α 'nın Kistik Fibrozis Patogenezindeki Rolü	7
2.2. Nötrofillerin Genel Özellikleri	8
2.2.1. Nötrofillerin Enflamatuvar Alanlara Göçleri; Adezyon, Kemotaksi, Yuvarlanma ve Diapedez	11
2.3. Kistik Fibroziste Bozulmuş Nötrofil Fonksiyonları	13
2.4. D Vitamininin İmmünolojik Etkileri	15
2.5. Antimikrobiyal Peptidler ve İmmün Sistem İlişkisi	17
2.5.1. Solunum Sistemi ve LL-37 İlişkisi	18
2.5.2. Epitel ve İmmün Sistem Hücrelerinde LL-37'nin Etkileri	19
2.5.3. LL-37 Ekspresyonunun Vitamin D3 Tarafından Düzenlenmesi	20
2.5.4. LL-37'nin Hücre Ölümünü Düzenlenmesindeki Rolü	21
2.5.5. LL-37 ve Kistik Fibrozisteki Önemi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Çalışma Grubu	23
3.1.1. Hasta seçimi	23
3.1.2. Araştırmaya dahil edilme ve dışlanma (araştırmaya alınmama) kriterleri	23

3.1.2.1. Genel Dahil Etme Kriterleri.....	23
3.1.2.2. Genel Dışlama Kriterleri.....	23
3.2. <i>P. aureginosa</i> Bakterisinin Ultraviyole Işını İle İnaktivasyonu	24
3.3. Nötrofil Fonksiyonlarının Akan Hücre Ölçer Cihazında Analizi.....	24
3.4. Nötrofil Yüzey Antijenlerinin Akan Hücre Ölçer ile Tayini.....	26
3.5. Nötrofil Apoptozis Oranlarının Akan Hücre Ölçerde Tayini	27
3.6. Nötrofil Kültürleri.....	27
3.7. Nötrofillerde Hücre İçi Sitokin Salınımlarının Belirlenmesi.....	28
3.8. Kültür Üst Sıvılarında IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 Sitokinlerinin Luminex Yöntemiyle Belirlenmesi.....	29
3.9. İstatistiksel Değerlendirme	30
4. BULGULAR	31
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Genel ve Klinik Özellikleri.....	31
4.2. Kistik Fibroz Hastalarında Nötrofil Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi.....	32
4.3. Nötrofillerde CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD62L ve CXCR2 Molekül Ekspresyonları	33
4.4. Nötrofillerde Apoptotik İndeksin Değerlendirilmesi.....	35
4.5. Nötrofillerde Hücre İçi IL-8 Salınımının Tayini	36
4.6. Nötrofillerde Hücre İçi TNF- α Salınımının Belirlenmesi	38
4.7. Nötrofillerde Hücre İçi CAP-18 Ekspresyonunun Belirlenmesi	40
4.8. <i>P. aeruginosa</i> ve LPS Uyarımlı Kültür Üst Sıvılarında IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 Düzeylerinin Belirlenmesi	41
4.9. <i>P</i> (+) ve <i>P</i> (-) Hasta Gruplarında Nötrofillerde CD62L Ekspresyonu ve Kemotaktik Aktivite Arasındaki İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	43
4.9. Kistik Fibrozis Hastalarında LPS Uyarımı Sonrası Fagositik Aktivite ve CAP-18 Salınımı Arasındaki Korelasyonunun Değerlendirilmesi	43
5. TARTIŞMA.....	45
KAYNAKLAR.....	50
HAM VERİLER	57
FORMLAR.....	58
ETİK KURUL KARARI	61
PATENT HAKKI İZNİ	62
TELİF HAKKI İZNİ	63
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	64

ÖZGEÇMİŞ.....65



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Pro-enflamatuvar sitokinler ve özellikleri.....	8
Tablo 2. Adezyon molekülleri ve ligandları.....	12
Tablo 3. Nötrofil fonksiyon testlerinde kullanılan uyaranlar.	25
Tablo 4. Nötrofil yüzey antijenlerinin belirlenmesinde kullanılan monoklonal antikorlar.....	26
Tablo 5. Nötrofillerin hücre içi sitokin tayinleri aşamalarında kullanılan monoklonal antikorlar	29
Tablo 6. Hasta ve sağlıklı kontrol grubuna ait demografik bilgiler.....	31
Tablo 7. Kontrol ve hasta gruplarında nötrofil yüzey adezyon molekül ekspresyon analizleri.	34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kistik fibroziste akciğer bronşlarında bakteri enfeksiyonu ve enflamatuvar yanıt.	5
Şekil 2. Fagozomlarda reaktif oksijen üretimi ve oksidatif patlama.	10
Şekil 3. Nötrofillerde kemotaksi, yuvarlanma ve diapedez aşamaları.....	13
Şekil 4. Kistik fibroziste bakteri kolonizasyonu ve aşırı ROS salınımı.	15
Şekil 5. Vitamin D döngüsü.	16
Şekil 6. CAP-18 etkileşimi.	20
Şekil 7. Deney gruplarında yapılan deneysel akış şeması.	24
Şekil 8. Nötrofillerin farklı uyaranlarla yapılan kültür koşulları.....	28
Şekil 9. Nötrofillerde fagositoz fonksiyon indeksinin akan hücre ölçer analizi.....	32
Şekil 10. Kontrol ve hasta gruplarında nötrofillerin oksidatif patlama ve kemotaktik indeks değerleri.....	33
Şekil 11. <i>P</i> (+), <i>P</i> (-) ve sağlıklı kontrollerde nötrofillerde CD62L ve CXCR2 ekspresyon oranları	34
Şekil 12. <i>P</i> (+), <i>P</i> (-) ve sağlıklı kontrollerde nötrofillerde yüzey CD62L ve CXCR2 ekspresyon analiz akan hücre ölçer görüntüleri.	35
Şekil 13. Çalışma gruplarında erken ve geç apoptotik nötrofil oranlarının belirlenmesi.....	36
Şekil 14. Hasta ve sağlıklı gruplarda akan hücre ölçer analizi ile nötrofillerde apoptotik indeks dot plot görüntüleri.	36
Şekil 15. Deney gruplarında uyarımsız, <i>P. aeruginosa</i> ve LPS uyarımı sonrası nötrofillerde hücre içi IL-8 ekspresyonunun tayini.	37
Şekil 16. Nötrofillerde hücre içi IL-8 salınımının akan hücre ölçer dot plot görüntüleri.....	38
Şekil 17. Hasta ve kontrol grubunda stimülasyonsuz, <i>P. aeruginosa</i> ve LPS stimülasyonu sonrası nötrofillerde TNF- α salınımının tayini.....	39
Şekil 18. Nötrofillerde hücre içi TNF- α salınımının akan hücre ölçer analiz görüntüleri.....	39
Şekil 19. Deney gruplarında uyarımsız, <i>P. Aeruginosa</i> ve LPS uyarımı sonrası nötrofillerde hücre içi CAP-18 salınımının tayini.	40
Şekil 20. Nötrofillerde hücre içi CAP-18 salınımının akan hücre ölçer analiz görüntüleri	41
Şekil 21. Kistik fibrozis ve sağlıklılarda <i>P.aeruginosa</i> ve LPS tam kan kültür aşamaları sonrası kültür üst sıvısında saptanan IL-1 β , IL-6, IL-17 ve TNF- α düzeyleri.....	42
Şekil 22. <i>P</i> (+) hasta grubunda nötrofil CD62L ekspresyonu ve kemotaktik indeks arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.	43

Şekil 23. *P*(-) kistik fibrozisli hasta grubunda nötrofillerden CAP-18+ salınımı ve *E.coli*'ye karşı oluşan fagositoz indeks arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi. 44



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AMP:** Antimikrobiyal peptid
- BAL:** Bronkoalveolar lavaj sıvısı
- BP1:** Bakteriyel geçirgen protein
- Ca:** Kalsiyum
- CAP-18:** Kathelisin
- CR1:** Kompleman reseptör 1
- CD11a:** İntegrin alfa L
- CD11b:** İntegrin alfa M
- CD11c:** İntegrin alfa X
- CD18:** İntegrin beta-2
- CD62L:** L-selektin
- Cl:** Klor
- CXCR2:** İnterlökin-8 reseptör beta
- CYP27B1:** 1 α -hidroksilaz enzimini
- CRP:** C-reaktif protein:
- DHR-123:** Dihidro rodamin 123
- ENaC:** Epitelial sodyum kanal
- fMLP:** Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
- GAPHD:** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
- hBD:** İnsan β -defensin
- hBD2:** İnsan β -defensin 2
- HOCl:** Hipoklorik asite
- HNP:** İnsan nötrofil peptidleri
- H₂O₂:** Hidrojen peroksit
- ICAM-1:** Hücreler arası adezyon molekülü-1
- IFN- γ :** İnterferon-gamma
- IL-1:** İnterlökin 1
- IL-1 β :** İnterlökin 1 beta

IL-2: İnterlökin-2

IL-6: İnterlökin-6

IL-8: İnterlökin-8

IL-10: İnterlökin-10

IL-15: İnterlökin-15

IL-17: İnterlökin-17

KF: Kistik fibrozis

KFTR: Kistik fibrozis transmembran regülatör

LFA-1: Lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen

LL-37: Kathelisidin

LPS: Lipopoliksakkarid

LTB4: Löktrien B4

Mac-1: Makrofaj-1 antijen

MPO: Miyeloperoksidaz

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

NE: Nötrofil elastaz

NK: Doğal öldürücü hücreler

P(-): *Pseudomonas aeruginosa* üremesi negatif olan KF hastalar

P(+): *Pseudomonas aeruginosa* üremesi pozitif olan KF hastalar

PI: Prodiüm iyodür

PMA: Forbol miristat asetat

SCTE: Stratum korneum triptik enzim

Th: Yardımcı T hücre

Th1: Yardımcı T hücre 1

Th2: Yardımcı T hücre 2

Th17: Yardımcı T hücre 17

TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa

TLR: Toll benzeri reseptör

VDR: Vitamin D reseptörü

VDRE: Vitamin D cevap elemanı



ÖZET

Aslanhan U. (2017). '*Kistik Fibrozis Hastalarında Nötrofil Fonksiyonları ve Sitokin Düzeylerinin Araştırılması*' İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, 2017.

Kistik fibrozis (KF) beyaz ırkta çocuk ve genç yetişkinlerde görülen, daha çok akciğer tutulumuyla karakterize genetik bir hastalıktır. Bu hastalık epitel hücre membranındaki Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör klor kanal defekti sonucu oluşmakta, *P. aeruginosa* ve çeşitli patojenlerin kolonizasyonuna zemin hazırlamaktadır. KF'de havayolu enflamasyonunda yoğun nötrofilik infiltrasyon görülmektedir. Çalışmamızda kronik *P. aeruginosa* kolonizasyonlu KF'li hastalarda nötrofil fonksiyonları araştırılmıştır.

Balgam kültürlerinde *P. aeruginosa* üremesi pozitif (P+) ve negatif (P-) KF'li hastalar ve sağlıklı çocuklar çalışmaya dahil edilmiştir. Nötrofillerin adezyon molekül ekspresyon ve fonksiyonları, apoptotik indeksleri, *P. aeruginosa* ve LPS uyarımı sonrası hücre içi CAP-18, IL-8 ve TNF- α salınımları akan hücre ölçerde incelenmiştir. *P. aeruginosa* ve LPS uyarımlı kan kültürlerinde LUMINEX yöntemiyle plazma IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 düzeyleri değerlendirilmiştir.

P(+) ve P(-) hastalarda nötrofil CD62L, CD62L/CXCR2 ekspresyonları yüksek saptanmış, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı fagositik aktivite, oksidatif patlama, kemotaktik aktivitelerle erken ve geç apoptotik indeks yüzdeleri sağlıklı gruba göre artmıştır. Uyarımsız kültürde, P(+) ve P(-) hastalarda CD16⁺TNF- α ⁺, CD16⁺IL8⁺ nötrofil oranları sağlıklı gruba göre artarken, *P. aeruginosa* ve LPS uyarımı her iki hasta grubunda CAP-18⁺CD16⁺ ve CAP-18⁺CD16⁺CD66b⁺ oranlarını düşürmüştür. Uyarımsız şartlarda P(+) hasta grubunda plazma IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 düzeyleri, P(-) ve kontrol grubuna oranla yüksek saptanmıştır.

KF hastalarının nötrofillerinde adezyon molekülü, pro-enflamatuvar sitokin salınımlarıyla apoptotik indeks değerlerindeki artış dikkat çekicidir. *P. aeruginosa*'ya karşı artmış bulunan nötrofil fonksiyonları ve aktivasyonlarının apoptotik süreci etkileyerek nötrofillerin yaşam sürelerini kısaltabileceği düşünülmektedir. Lokal enflamasyonda sekonder nötrofil fonksiyon bozukluğunun mortalite risk faktörü olarak kabul edildiği KF'de, *P. aeruginosa* kolonizasyon mekanizmalarını aydınlatacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nötrofiller, kistik fibrozis, sitokinler, CAP-18

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 49604

ABSTRACT

Aslanhan U. “**Determination of Neutrophil Functions and Cytokine Levels in Patients with Cystic Fibrosis**” Istanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Msc Thesis. Istanbul, 2017.

Cystic fibrosis (CF) is a common and lethal genetic disease of Caucasians, resulting from CFTR gene mutations and affecting children and young adults. Respiratory system is chronically colonized with *P. aeruginosa*. Clinical outcome is defined through a neutrophil-guided chronic inflammation. This study investigated neutrophil functions of chronically *P. aeruginosa* colonized CF patients.

Patients with CF were grouped by *P. aeruginosa* sputum culture; positive (*P*+) and negative (*P*-), and compared with healthy controls. Neutrophil adhesion molecule expressions, apoptotic index and intracellular CAP-18, IL-8, and TNF- α levels of CD16⁺CD66b⁺/CD16⁺CD66b⁻ neutrophils following *P. aeruginosa* and LPS stimulation were analyzed by flow cytometry. IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-17 plasma levels were analyzed by LUMINEX.

Increased CD62L⁺, CD62L⁺CXCR2 levels were observed on neutrophils of (*P*+) and (*P*-) CF patients. Increased phagocytosis of *E. coli* and *P. aeruginosa*, oxidative burst, chemotactic capacity and increased ratio of early and late apoptotic neutrophils together with increased levels of CD16⁺TNF- α ⁺ and CD16⁺IL8⁺ neutrophils were determined in CF patients. Bacterial stimulation significantly decreased CAP-18 production on CD16⁺ and CD16⁺CD66b⁺ neutrophils of CF patients. Plasma levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-17 in *P*(+) patients were increased in comparison with *P*(-) patients and controls.

Increased adhesion molecules and pro-inflammatory cytokines, also increased apoptotic index values in neutrophils of CF patients was striking. Over-activation of neutrophilic activities against *P. aeruginosa* in patients may affect apoptotic process and shorten neutrophil lifespan. Intense studies are required for clarification of action mechanisms in *P. aeruginosa* colonization in CF.

Key Words: Neutrophiles, cystic fibrosis, cytokines, CAP-18

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 49604

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kistik fibrozis çocuk ve erişkinlerde yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan, otozomal resesif kalıtmalı genetik bir hastalıktır. Bu hastalık epitel hücre membranındaki Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör (KFTR) adlı klor kanalının defekti sonucu oluşmaktadır. Kistik fibrozis geni, 7. kromozomda, 1480 amino asit uzunluğunda 230 kb ağırlığında 27 ekson içeren ve KFTR olarak adlandırılan bir protein sentezlemektedir. Bu hastalığın görülme sıklığı 1/2000-3500 canlı doğumda bir, taşıyıcılık oranı ise 1/25 olarak görülmektedir [3]. Hastalığın insidansı populasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Epitelial hücrelerin apikal yüzeyinde yerleşim gösteren KFTR protein transepitelial iyon transportunda görev almakta ve aynı zamanda epitelial sodyum kanalı (ENaC) gibi diğer iyon kanallarını da regüle etmektedir [1,2,6].

KFTR'deki yapısal ve fonksiyonel bozukluk, akciğer, pankreas, karaciğer, bağırsaklar ve ter bezleri gibi organların epitel hücre membranında klor (Cl) transportunun bozulmasına neden olmaktadır [1,2]. Epitel hücrelerin kloru yeteri kadar absorbe edememesi ve yoğun miktarda ortamdan sodyumu emilimi akciğer hava yollarındaki mukus salgısının değişimine neden olmakta ve özellikle akciğer bronşlarında hücre işlevlerinin bozulmasıyla dokuda birtakım değişimler meydana gelmektedir. Özellikle mukus sıvısının değişimiyle beraber bölgeye *Pseudomonas (P.) aureginosa* yerleşip bu bölgede enflemasyona yol açmaktadır. *P. aeruginosa* kistik fibroziste solunum yollarında hastalığa yol açan en önemli patojen olup artan morbidite ve mortalite ile ilişkilendirilmektedir [31]. Kistik fibroziste enfeksiyon yokluğunda bile bronkoalveoler lavaj sıvısında enflamatuvar hücre alt grupları ve interlökin (IL)-8 düzeylerindeki artışa paralel olarak IL-10 ve enflamatuvar alanlara nötrofillerin göçünü inhibe eden lipoksin gibi anti-enflamatuvar lipid medyatörlerinin azaldığı gösterilmiştir [13].

Enflamasyonun olduğu bölgelere çok sayıda nötrofil göç etmekte ve yoğun miktarda sitokin artışı gerçekleşmektedir [37-41]. Kistik fibroziste hava yollarının kronik olarak bakteriyel patojenler ile enfekte olduğu bilinmesine rağmen ortaya çıkan enflamatuvar yanıt, hem süre hem de ağırlık olarak patojenin yok edilmesi için gerekenden çok uzun sürmektedir [71]. Bunun nedenlerinden biri, hava yolunda fazla miktarlarda bulunan IL-8'in artmış sayıda nötrofilin bölgeye göçüne neden olmasıdır. Kistik fibroziste nötrofiller fagositozu gerçekleştirememekte ve geciken nötrofil apoptozisi ile birlikte akciğer dokularında yoğun nötrofil birikimi oluşmaktadır [76]. Aynı zamanda nötrofiller aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri salarak akciğer epitel hücrelerini olumsuz yönde etkilemektedir [74-75]. Bu olaylar

geri dönülemez akciğer hasarına, akciğer fonksiyonlarının kötüleşmesine ve bu hastaların zamansız ölümüne neden olmaktadır. Bu hastaların polimorfonükleer lökositleri, KFTR'daki mutasyon ya da kronik enfeksiyon nedeni ile sağlıklı kişilerden hem yapısal hem de fonksiyonel olarak farklılık göstermekte ve nötrofil fonksiyonlarında bozukluk oluşmaktadır [72]. Kistik fibrozis her ne kadar genetiksel bir hastalık olarak tanımlansa da, son yıllarda kistik fibrozisli hastaların immün sistem hücreleri ve fonksiyonları üzerine araştırmalar yapılmakla birlikte nötrofillerin hastalık patogenezindeki rolleri tam olarak aydınlığa kavuşturulmamıştır.

Bu çalışmada *P. aeruginosa* üremesi olan ve olmayan kistik fibrozisli hasta gruplarında doğal immün sistemin bir parçası olan nötrofillerin fonksiyonları ve enflamatuvar süreçteki rollerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla kistik fibrozisli hasta gruplarında nötrofillerin fagositoz, oksidatif patlama ve kemotaktik kapasiteleri ile birlikte kemotakside rol oynayan adezyon molekül ekspresyonları ve apoptotik indeksleri analiz edilmiştir. Ayrıca inaktif *P. aeruginosa* ve lipopolisakkarid (LPS) ile uyarılan nötrofillerden salgılanan hücre içi katelisin (CAP-18), IL-8 ve Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) düzeyleri ve tam kan kültür üst sıvılarında IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 düzeyleri sağlıklı olgularla karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kistik Fibrozis Patogenezi

Kistik fibrozis, epitel hücre membranındaki klorür kanallarının şeklini veren ve bu kanallardan klorür iyonlarının akışını regüle eden Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör (KFTR) adlı klor kanalının bozulma sonucu oluşmaktadır. KFTR'deki yapısal ve fonksiyonel bozukluklar akciğer, pankreas, karaciğer, bağırsaklar ve ter bezleri gibi organların epitel hücre membranındaki klor (Cl) transportunun bozulmasına neden olmaktadır. KFTR proteini akciğer, pankreas, ter bezleri ve barsak gibi birçok ekzokrin epitelde iyon transportunun dengelenmesinde rol oynamaktadır [1,2]. Kistik fibrozis hastalığına neden olan gen 7. kromozomun q31.2 bölgesine lokalize 230 kilobaz (kb) uzunluğunda 27 eksondan oluşmakta ve 1480 amino asit uzunluğunda KFTR olarak adlandırılan proteini sentezlemektedir. Hastalığın kalıtım modelinin otozomal resesif geçiş gösterdiği ve görülme sıklığı 1/2000-3500 canlı doğumda bir, taşıyıcılık oranının ise 1/25 olduğu bildirilmiştir [3]. Hastalığın insidansı popülasyonlar arasında farklılık göstermekte olup, İngiltere'de insidans 1/2500 ve taşıyıcılık 1/25 iken Asya ve Afrikalı'larda hastalık daha nadir görülmektedir [4].

KFTR proteini, anyonların epitel hücre membranın elektrokimyasal gradiyenti ile her iki yöne pasif olarak hareket edebildiği bir kanal oluşturmakta ve epitelial hücrelerin apikal yüzeyinde yerleşen bu protein transepitelial iyon transportunda görev almaktadır [5]. Bu protein sadece siklik adenozin monofosfat (cAMP) bağımlı bir kanal olarak işlev görmekle kalmaz, aynı zamanda epitelial sodyum kanalı (ENaC) gibi diğer iyon kanallarının fonksiyonlarını da düzenler [6]. İyon transportunun kistik fibrozis patogenezinin etkisi göz önüne alındığında, sodyum transportunun hastaların yetersiz beslenme ve akciğer fonksiyonları ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Sodyum transportundaki anormallik ne kadar az ise hastaların solunum yolu fonksiyonlarının ve beslenme durumlarının pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir [6]. KFTR proteini birçok hücrede bulunmasına rağmen bu proteindeki bozukluklar en çok akciğerler ve gastrointestinal sistem etkilemektedir. KFTR'nin hava yolu düz kas hücrelerinde de eksprese olduğu, kalsiyum salınımını düzenlediği ve aynı zamanda kistik fibrozisli hastalardaki hava yolu duyarlılığı ve astım benzeri klinik bulgular ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir [7].

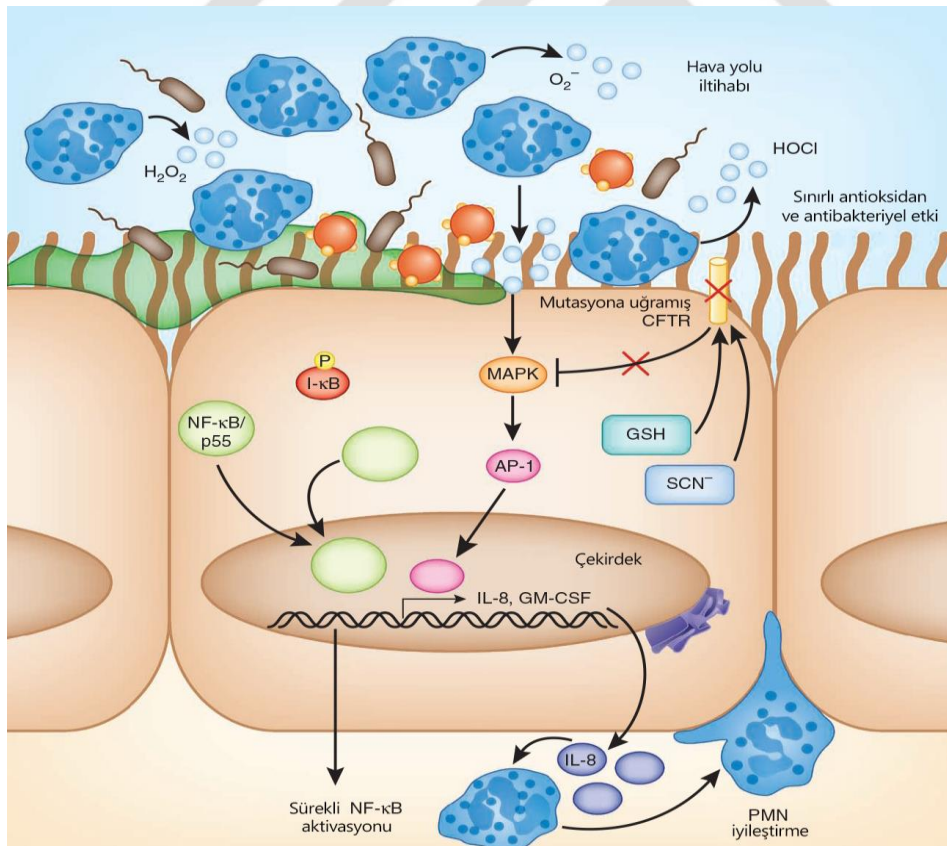
Mukus klirens sistemlerinin sağladığı mekanik temizleme, hava yolu savunma sisteminin önemli bir kısmını oluşturur [8]. Kistik fibroziste akciğerlerde hastalığa neden olduğu düşünülen hipotezlerden birisi “düşük hacim hipotezi” dir [9]. Bu hastalıkta KFTR fonksiyonundaki bozukluk nedeniyle sodyum Emilimi artmakta ve klor Emilimi bozulmaktadır. Hava yolu yüzeyinde oluşan dehidratasyon, siliyer fonksiyonları bozarak mukus birikimine neden olmakta ve kronik bakteriyel enfeksiyonu başlatmaktadır [9].

Hava yolunu kaplayan sıvı sisteminin üst tabakasını oluşturan mukus, yüksek molekül ağırlıklı müsinler tarafından oluşturulur [8]. Bu tabakanın viskoelastik özellikleri müsinlere, müsinlerin yapıştırıcı proteinler ile ilişkisine ve bu tabakanın hidrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Hidrasyon ENaC ve KFTR tarafından belirlenen sodyum Emilimi ve klor salgılama arasındaki dengeye bağlıdır ve aynı zamanda etkin siliyer aktivitede önemlidir. Bu tabakanın altında bulunan perisiliyer sıvı katmanı, polianyonik jel tabakası özelliği gösterir. Sağlıklı kişilerde solunum yolu epitelinde klorür iyonu dışarı salgılanırken sodyum iyonu absorbe edilmektedir. Kistik fibrozis hastalarında ise mutasyonlar sonucu sodyum iyonu fazla oranda absorbe edilmekte ve klor iyon salgılanması bloke edilmektedir. Böylece submukozal alana doğru suyun çekilmesiyle solunum yolundaki salgılar dehidrate olmaktadır. Kistik fibroziste dehidrate mukus nedeniyle mukus tabakasının viskozitesi artar, perisiliyer tabaka çöker ve mukus tabakası epitel hücre yüzeyi ile doğrudan temas eder. Hareketsiz olan mukus plaklarına oluşan müsin hipersekresyonu, plağın daha da kalınlaşmasına neden olarak hava yolunun tıkanmasına, koyu kıvamlı yapışkan mukus ise kalıcı biofilm oluşumuna neden olmaktadır [8]. Kistik fibroziste bikarbonat sekresyon bozukluğu da mukus koyuluğunun artmasına neden olmaktadır. ENaC’den sodyum Emiliminin yanı sıra, KFTR ve kalsiyum ile aktive olan klor kanallarından klor sekresyonu, hava yolu yüzey sıvısının hidrasyon dengesinin sağlanmasında temel mekanizmalardır. KFTR normal şartlarda ENaC’ı baskılar, ancak kistik fibrozis hastalığında bu baskılanma olmadığından sodyum transportu artarak fazla su Emilimine neden olur [10]. Kistik fibroziste mukusun aşırı miktarda salgılandığı ve epidermal büyüme faktör reseptörünün bu olayda rol oynadığı gösterilmiştir [11].

Kistik fibroziste akciğer hastalığı oluşumuna yol açtığı öne sürülen diğer bir hipotez “tuz fazlalığı hipotezi”dir. Bu hipoteze göre, KFTR’deki bozukluk sonucunda, solunum yolu sıvısında sodyum ve klor miktarı artmıştır. Solunum yolları sıvısındaki beta defensin, lizozim, lakoferrin gibi antibakteriyel koruyucu proteinlerin fonksiyonları bu sıvıda bulunan tuz konsantrasyonuna da bağımlıdır. Bu hastalıkta solunum yolu sıvısındaki tuz miktarı artmış

olduğundan, antimikrobiyal proteinlerin fonksiyonlarında bozulmaya bunun sonucunda da hastalarda kronik bakteriyel enfeksiyonlara yol açmaktadır [12].

Kistik fibroziste enfeksiyon olmadığı dönemlerde bile bronkoalveoler lavaj sıvısında enflamasyonda rol oynayan hücre oranları ile IL-8 ve IL-6 düzeyleri artmakta, IL-10 ve lipoksinler gibi anti-enflamatuvar ürünler azalmaktadır [13]. Akciğerlerde IL-6 ve IL-8 gibi enflamatuvar sitokinlerde artış sonucunda enfeksiyondan bağımsız olarak oluşan enflamasyon kistik fibrozisin tipik bulgularındandır [14, 15]. Ayrıca, oksidan ve anti-oksidanlar arasındaki dengesizliğin neden olduğu oksidatif stres de enflamatuvar yanıtta katkıda bulunmaktadır [15] (Şekil 1). Kistik fibroziste artan nötrofil birikimi ve fonksiyonel aktiviteden IL-17'nin sorumlu olduğu öne sürülmektedir [16, 17]. Bu hastaların solunum yollarında makrofajlar ile birlikte TNF- α 'nın arttığı da gösterilmiştir. Ayrıca nötrofillerin kemotaktik aktivite, adezyonunu önleyen ve anti-enflamatuvar etkileri olan lipoksin düzeylerinin de kistik fibrozisli hastaların solunum yolunda azaldığı bulunmuştur [18].



Şekil 1. Kistik fibroziste akciğer bronşlarında bakteri enfeksiyonu ve enflamatuvar yanıt.
(Cohen T.S. and A. Prince. Nat Med 2012. 18:509.)

2.1.1. Akciğer Bronşlarında Mikrobiyal Çevre

Kistik fibrozis olgularında görülen polimikrobiyal flora özelliğindeki solunum yolu enfeksiyonları morbidite ve mortaliteye neden olan en önemli klinik sorunu teşkil etmekte ve tedavi ile hastalık etmeni tamamen ortadan kaldırılamamaktadır. Solunum yollarında kolonizasyona ve enfeksiyona en sık yol açan mikroorganizmalar *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* iken respiratuvar sinsisyal virüs ve *Aspergillus fumigatus* enfeksiyonları daha az görülmektedir [19].

2.1.2. *Pseudomonas aeruginosa* ve Kistik Fibrozis

Kistik fibrozisli hastaların solunum yollarında kolonizasyona ve kronik akciğer enfeksiyonlarına yol açan bazı mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu bakteriler arasında *P. aeruginosa* ilk sırayı almakta ve bu hastaların yaklaşık olarak % 75-90'ında kronik akciğer enfeksiyonları gelişmektedir. *P. aeruginosa* doğada yaygın halde bulunan gram negatif bir bakteridir [20, 21]. Çeşitli ortam şartlarına uyum sağlayıp birçok farklı türü enfekte eden *P. aeruginosa* kistik fibroziste solunum yollarında hastalığa yol açan önemli bir patojendir. Doğada planktonik ve biofilm olarak iki formda bulunmaktadır [22]. *P. aeruginosa* özellikle biofilm oluşumuyla immün sistem yanıtlarına ve medikal tedaviye yüksek direnç oluşturmaktadır [23 - 25].

Kistik fibroziste solunum yollarında değişen mukozal yapı *P. aeruginosa*'nın bu bölgeye yerleşmesine olanak sağlar. Erken evre kistik fibrozis hastalarından izole edilen *P. aeruginosa*'nın planktonik karakterde olduğu ve bu evrede *P. aeruginosa* suşlarının nonmukoid koloni tipinde olup çoğu antibiyotiğe duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar hastalığın bu evresinde yoğun bir anti-mikrobiyal tedavinin hastalık etkenini tamamen ortadan kaldırılabileceğini ileri sürmektedirler [26]. İlerleyen süreçte immün sistem hücrelerinin saldırısı sonucu *P. aeruginosa* bakterisi flegallasını kaybetmekte ve buna paralel olarak aktivitesi azalmakta ve biofilm oluşmaktadır. Ancak zaman içinde olguların çoğu “mukoid” fenotipteki *P. aeruginosa* suşları ile kronik enfeksiyon geliştirmektedirler [23, 27-30]. Hastalarda mukoid suşun saptanması enfeksiyonun kronikleştiğinin en önemli göstergesidir. Mukoid suşlar solunum yolunda, bir tür ekzopolisakkarit olan aljinattan zengin biyofilmler şeklinde yaşamaktadırlar. Kistik fibrozis hastalarının solunum yollarında gelişen enflamatuvar yanıt sırasında oluşan oksijen radikallerinin bakteri genomunda mutasyonlara yol açarak aljinat sentezini indüklediği gösterilmiştir. Bakteriler ortam koşullarına bağlı olarak moleküler organizasyonlarını değiştirebilmekte ve böylelikle farklı patojenite seçeneklerine sahip olma

yeteneği kazanmakta ve bu durum bakteri açısından çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Biyofilmi oluşturan hücreler ekzopolisakkarit matriks sayesinde ortamdaki besin maddelerini kolaylıkla yakalayıp yoğunlaştırırlar. Biyofilm içinde üreme sayesinde *P. aeruginosa* hem antibiyotiklerin etkisinden hem de akciğerlerdeki immün yanıttan korunmaktadır [31].

2.1.3. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A ve TNF- α 'nın Kistik Fibrozis Patogenezindeki Rolü

IL-1 β IL-1 sitokin ailesinin bir üyesidir. IL-1 α ile minimal derecede homoloji göstermesine rağmen benzer biyolojik etkiler gösterir. Monosit, makrofaj, endotelial hücre, epiteliyal hücrelerden salınımı gerçekleşir [32]. IL-6 ailesine ait sitokin olan IL-6 endotelial hücreler, fibroblastlar, monosit ve makrofajlardan salgılanır. Multifonksiyonel özelliğe sahip olan bu sitokin immün cevap regülasyonu, akut faz yanıtı ve hematopoezde rol oynamakta ve başlıca T hücre proliferasyonu, B hücre farklılaşmasını sağlamaktadır [32]. CXC kemokin ailesine ait bir sitokin olan IL-8 aynı zamanda nötrofil spesifik kemotaktik faktör olarak tanımlanmaktadır. IL-8 endotelial ve epiteliyal hücreler, monosit ve makrofajlar, nötrofiller, lenfositler gibi birçok hücreden IL-1 α , IL-1 β , IL-17, TNF- α veya toll benzeri reseptör (TLR) uyarımı sonrası salgılanır. IL-8'in CXCR1 ve CXCR2 olmak üzere iki reseptörü bulunmaktadır. IL-8'in en büyük etkisi aktive olmuş nötrofillerin enfeksiyon bölgesine veya dokuya kemotaksilerinin sağlanmasıdır [33]. Aktive olmuş CD4⁺ yardımcı T (Th)17 hücreleri ise IL-17 eksprese etmektedir. Ayrıca CD8⁺ T hücreleri, $\gamma\delta$ T hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve nötrofillerden de IL-17 salgılandığı gösterilmiştir [34]. IL-17A enflamasyon olan dokularda nötrofil birikiminden esas sorumlu olan sitokindir [35].

TNF- α konak savunmasında viral, bakteriyel ve mantar gibi patojenlerine karşı önemli rol oynamakta ve Gram (-) bakteri LPS uyarımı sonrası salınımı gerçekleşmektedir. Aktive olmuş makrofajlar, T ve B hücreleri, NK hücreleri ve nötrofiller tarafından salgılanan bu sitokin nötrofil ve makrofaj göçünde rol oynamakta ve aynı zamanda kemokin salınımı ve endotel hücre yüzeyindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırmaktadır [36]. Kistik fibroziste akciğer bronşlarında *P. aeruginosa* ve benzeri patojenlerin üremesiyle beraber artan serbest oksijen radikalleri beraberinde IL-6 ve IL-8 artışına neden olur [37-41]. Oksidatif stresin artması ve KFTR mutasyonun etkisiyle NF- κ B sinyal iletim yolağı durdurulamamakta ve sürekli olarak uyarım sinyallerinin artması sonucu akciğer bronşlarında sitokin artışına neden olmaktadır [42]. Ayrıca kistik fibroziste enfeksiyon yokluğunda bile bronkoalveoler lavaj sıvısında IL-6 ve IL-8 artışı gözlenirken, IL-10 gibi anti-inflamatuvar ürünlerin azaldığı gözlemlenmiştir (Tablo 1) [13].

Tablo 1. Pro-enflamatuvar sitokinler ve özellikleri.

Sitokin	Reseptörü	Salgılayan Hücreler	Hedef hücreleri	Fonksiyonu
IL-1β	IL-1 tip 1	makrofaj, lenfosit	T hücreleri, epitel ve	İndüklenen proinflamatuvar proteinler, Th17 hücre farklılaşması
	IL-1 tip 2	nötrofil, keranosit	endotelial hücreler	
IL-6	IL-6R	Endotelial hücreler, granulosit T ve B hücreler, monosit/makrofaj	T ve B hücreleri, hematopoietic hücreler	T ve B hücre farklılaşması, IgG, IgM ve IgA üretimi
IL-8	CXCR1	Endotelial ve epitelial hücreler	Nötrofiller, NK ve T hücreleri	Nötrofiller için kemokrant faktör Angiogenes
	CXCR2	monosit, makrofaj ve nötrofiller	monosit ve endotelial hücreler	
IL-17	IL-17R	Th 17, CD8 ⁺ T, NK, NKT hücreleri nötrofiller, ILCs	T ve B hücreleri, epitel, endotelial monosit/makrofaj, lenfositler	Nötrofil aktivasyonu, proinflamatuvar ve kemokinlerin indüklenmesi
TNF-α	CD120a	aktive olmuş makrofaj/monosit	Nükleer hücreler	Güçlü inflamatuvar cevap
	CD120b	T ve B hücreleri, nötrofiller, NK		İmmün sistem baskıycılarının limitlenmesi

2.2. Nötrofillerin Genel Özellikleri

Periferik kan lökositlerinin yaklaşık %50-70'ini oluşturan ve polimorfnükleer lökositler olarak da isimlendirilen nötrofiller beyaz kan hücrelerinin çoğunluğunu oluşturmakta ve enflamatuvar yanıtta mikrop giriş bölgelerine ilk olarak göç etmektedirler. Spesifik granüller lizozim, kollagenaz ve elastaz, azurofilik granüller ise enzimler, defensin ve katelisidin gibi mikrobiyal granüller içermektedir. Yaklaşık 7-15 μ m boyutlarında olan nötrofiller iki ile beş segmentli çekirdeğe sahiptirler. Ortalama yaşam süreleri 24-48 saattir. Nötrofiller enfeksiyon alanlarına göç ederler ve patojenleri fagosite ederek çeşitli mikrobisidal mekanizmalar ile öldürürler. Nötrofil granülleri çeşitli reaktif oksijen ve azot ürünleri yanı sıra çok sayıda antimikrobiyal peptidler ve hidrolitik enzimler de içermektedir [43]. Granülleri azurofilik (primer), spesifik (sekonder), jelatinaz ve sekretuvar granüller olmak üzere dört çeşittir. Azurofilik (primer) granüller miyeloperoksidaz (MPO) enzim içerikleri ile tanımlanmışlardır [44]. Çok sayıda hidrolitik enzimler ve bakterisidal proteinler içerirler. Bunların arasında bakteri öldürmede ve doku hasarında etkili olan elastaz ve kathepsin G gibi enzimler, defensinler, katelisidinler, bakteriyel geçirgen protein (BPI), lizozim ve proteinaz 3 gibi anti-mikrobiyal peptidler yer almaktadır. Spesifik (sekonder) granüller laktoferin içeriği ile karakterize edilmekle beraber enzim içeriğince de zengindirler. Bu granüller adezyon ve sinyal iletiminde rol oynayan reseptörler ve proteinler ile birlikte oksidatif patlamanın önemli bir yapı

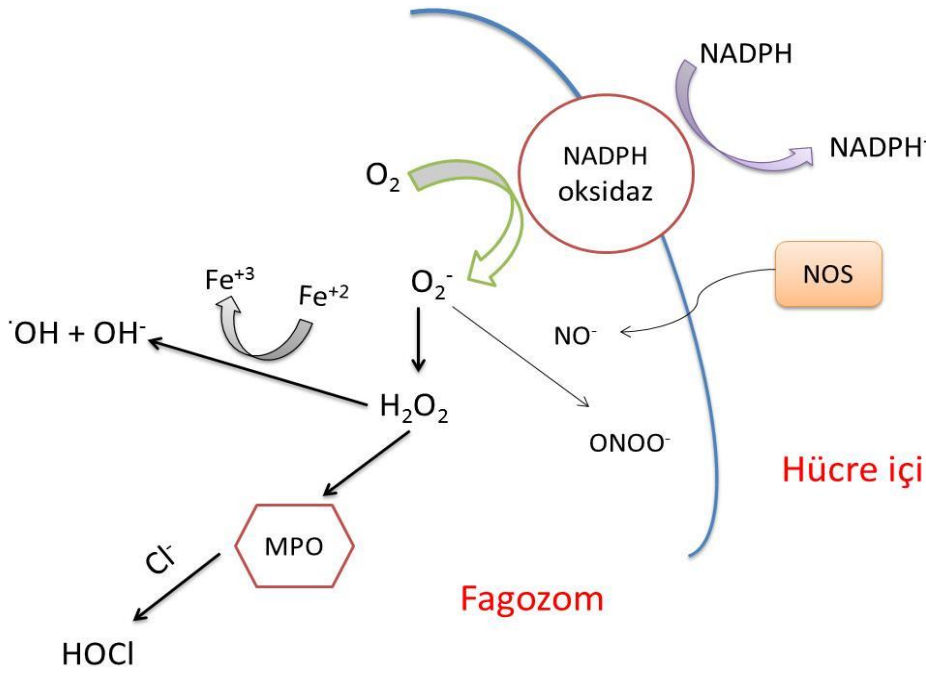
taşı olan sitokrom B içerirler. Oponize edilen bir antijenle temas gerçekleştiğinde bu granüller hücre membranı ile birleşmek üzere yüzeye taşınmaktadır. Jelatinaz granüller ise yüksek miktarda jelatinaz B içeriği ile karakterizedirler. Azurofilik granül ve spesifik granüllere nazaran daha çabuk harekete geçerler. Jelatinaz yanında %20-25 oranında sitokrom B içerirler. Jelatinaz granüller nötrofillerin enfeksiyon ve enflamasyon alanına hareketlerinde önemli rol oynamaktadır. Sekretuar vesiküler mobilizasyonu en çabuk sağlanan, enflamatuvar uyarı ile ekzositozları tetiklenebilen sekretuar vesiküllerdir. Bu membran vesikülleri β_2 -integrin CD11b/CD18 (Mac-1, CR3), kompleman reseptör 1 (CR1), formillenmiş bakteriyel peptidler (fMLP), metalloproteinaz lökolizin ve alkalın fosfataz içermektedir [45].

2.2.1. Nötrofillerin Fonksiyonları ve Öldürme Mekanizmaları

Nötrofiller makrofajlar gibi profesyonel olarak fagositoz yeteneğine sahip, patojenik mikroorganizmaları ve hücre artıklarını fagosit edebilen ve immün sistemin farklı hücreleri ile etkileşime giren doğal immün sistemin bir elemanıdır. Farklı tipte kemotaktik uyarılara karşı enflamatuvar alanlara göç eden nötrofiller fagositoz ile mikroorganizmaları hücre içine alarak oksidatif patlama yoluyla patojenlerin öldürülmesinde rol oynamaktadır [46]. Patojenleri tanımları ve bağlamalarında çok çeşitli patern tanıma reseptörleri görev almaktadır.

Nötrofiller yüzeylerinde TLR (Toll Benzeri Reseptör)1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 [47], hücre içinde (endozomlarda) ise TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 taşırlar [48]. Makrofajlara benzer şekilde hem opsonize olmuş hem de opsonize olmamış antijenleri fagositoz yetenekleri bulunmaktadır. Yüzeylerinde FcRIIa (CD32), FcRIIb (CD16) ve FCRI (CD64) gibi Fc reseptörleri taşırlar [49]. Nötrofil aktivasyonunu takiben C3b reseptörü olan kompleman reseptörü I (CR1) ve iC3b reseptörü olan CR3'ün ekspresyonu artmaktadır. Bu mekanizma ile hem nötrofil göçü ve fagositik kapasite hem de nötrofil adezyonu artmaktadır [46]. Nötrofillerde aktin polimerizasyonu ile hücre içi iskelet yapısı değişmektedir. Bunun sonucunda nötrofil yüzeyinde oluşan psödopodlar yüzeylerine bağlanan partikülleri sarmakta ve hücre membranı ile kaynaşarak partikülü hücre içine almaktadır. Bu partiküllerin hücre içine alınmasıyla sitoplazmada fagozom denilen vesiküller oluşmakta ve nötrofil granülleri ile birleşerek fagolizozom meydana gelmektedir. Sitoplazmadaki kalsiyum (Ca^{+}) iyon artışı ve tirozin kinaz fosfarilasyonu ile granüllerde yer alan lize edici maddeler fagolizozoma boşaltılır [50]. Polimorfnükleer nötrofiller sahip oldukları antimikrobiyal mekanizmalar sayesinde fagolizozomda bulunan mikropların öldürülmesinden sorumludurlar. Öncelikle kısa ömürlü reaktif moleküller, iyonlar ve moleküler oksijen türevlerini içeren reaktif oksijen ürünlerinin

(ROS) üretimi nötrofil aktivasyonunun bir göstergesidir [51]. Nötrofillerde eksprese edilen fagositik Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) oksidaz etkisiyle ROS'un birincil ürünleri olarak moleküler oksijenden süperoksit anyonları üretilir. Süperoksit dismutaz enziminin etkisiyle süperoksitten hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijen radikalleri oluşur. Oluşan H_2O_2 , nötrofillerin birincil granüllerinde bol bulunan miyeloperoksidaz (MPO) tarafından hipoklorik asite (HOCl) çevrilir (Şekil 2) [51]. Ayrıca nötrofillerden üretilen ROS, singlet oksijen, hidroksil radikali, kloraminler ve peroksinitritlerin oluşumundada rol alabilir [51, 52].



Şekil 2. Fagozomlarda reaktif oksijen üretimi ve oksidatif patlama.

Nötrofiller ROS'dan bağımsız olarak antimikrobiyal ürünler de barındırmaktadır. Primer granüller, bakteriyel geçirgen protein (BP1), nötrofil elastaz (NE), proteinaz 3, kathepsinler, defensinler ve lizozim içermektedir [45]. BP1 bakteriyel LPS'yi nötrolize eden, bakteriyel dış zar antijenlerinin dendritik hücrelere ulaşmasını sağlayan ve *P. aeruginosa*'ya karşı savunmada rol oynayan önemli bir proteindir [53, 54]. Bunlara ek olarak nötrofil elastaz, kathepsinler ve proteinaz 3 ise hücre dışı matriksi yok etme yeteneğine sahip mikrobiyal proteinleri yok eden diğer protein türleridir [55].

2.2.2. Nötrofillerin Enflamatuvar Alanlara Göçleri; Adezyon, Kemotaksi, Yuvarlanma ve Diapedez

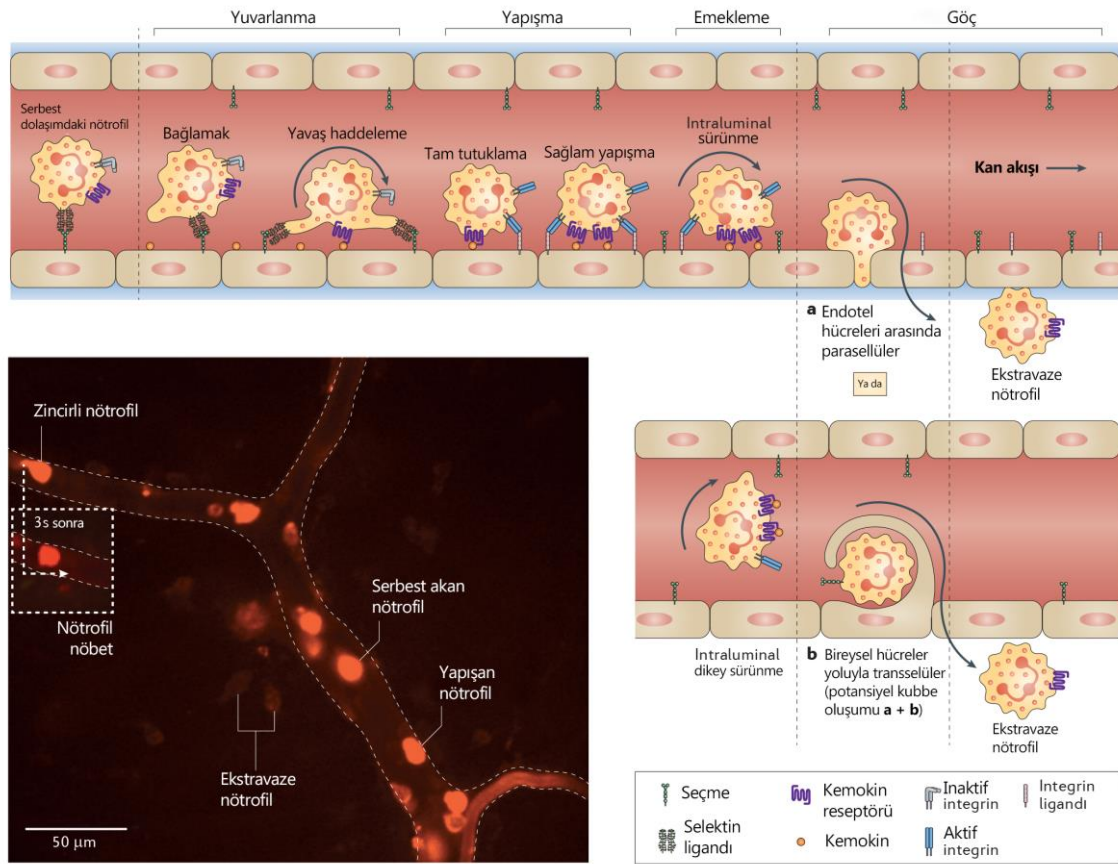
Kemik iliğinden ayrılan dolaşımdaki nötrofiller, kemotatik ürünlerin olduğu enflamatuvar alanlara göç ederler. Adezyon hücrelerin başka bir hücreye ya da hücreler arası matrikse yapışması olarak tanımlanır. Bu yapışma selektinler, integrinler, immonoglobülin süper ailesi, müsinler ve kadherin ailesi olarak gruplandırılan adezyon molekülleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu süreç, enflamatuvar alanlardaki endotel hücreleri üzerinde eksprese edilen adezyon moleküllerine bağlanma ve yuvarlanma ile gerçekleşir [56]. Nötrofiller enflamasyon bölgesindeki hücreler tarafından salınan kemokinlerin de etkisiyle kan damarları boyunca hızlı bir şekilde hareket ederek enflamasyonun olduğu dokuların çevresindeki kılcal damarlara göç ederler. Nötrofiller L-selektin, P-selektin ve E-selektin ligandları eksprese etmekte ve her üç selektin sitokinle aktive olmuş endotel hücreleri üzerinde yuvarlanma aşamasında rol oynamaktadır. Bu aşamada kan akışı ile nötrofiller endotel yüzeyinde yuvarlanmakta ve selektinler aracılığı ile endotele zayıf bir biçimde bağlanmaktadır (Tablo 2). Nötrofiller eksprese ettikleri lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen (LFA)-1 (CD11aCD18) ve makrofaj-1 antijeni (Mac-1(CD11bCD18)) integrinleri ile endotel hücrelerinde bulunan hücreler arası adezyon molekülü (ICAM)-1'e bağlanarak damar duvarında stabil şekilde durdurulmaktadır [57]. Integrinler ile sıkı bağlantı sağlanması sonrası nötrofillerin hücre içi iskelet yapısının değişikliğe uğraması ve endotel hücrelerinin arasından geçerek hücre dışı matrikse geçmesi diapedez olarak adlandırılmaktadır. Nötrofil diapedezinin sonraki basamaklarında β 2-integrinler ve hücreler arası adezyon molekülleri rol oynamaktadır (Şekil 3) [46].

Tablo 2. Adezyon molekülleri ve ligandları.

Aile	Molekül	Eksprese Eden Hücreler	Ligand
Selektin	<i>P-Selektin (CD62P)</i>	Histamin veya trombin ile aktive olan Endotelyum hücreler	<i>P-Selektin glucoprotein 1</i>
	<i>E-Selektin (CD62E)</i>	TNF ve IL-1 sitokinleriyle aktive olmuş Endotelyum hücreler	<i>Kutanoz lenfosit antijen 1</i>
	<i>L-Selektin (CD62L)</i>	Nötrofiller, monositler, naif B hücreler naif ve merkezi T hücreleri	<i>Yüksek endotelial venül</i>
İntegrin	<i>CD11a CD18</i>	Nötrofiller, monositler, naif B hücreler naif, efektör, hafıza T hücreleri	<i>CD54, CD102</i>
	<i>CD11b CD18</i>	Nötrofiller, monositler, Dendritik hücreler	<i>CD54, CD102</i>
	<i>CD11c CD18</i>	Nötrofiller, monositler, makrofajlar T ve B hücreleri	<i>iC3b</i>

Nötrofillerin kemotaktik maddelerin etkisiyle konsantrasyon gradienti boyunca enflamatuvar alanlara yönelmesi ve hareketleri kemotaksi olarak tanımlanır. Nötrofillerin göçleri kimyasal uyarının yoğunlaştığı enflamatuvar alanına doğru gerçekleşmekte ve IL-8, kemokinler, C5a gibi kompleman komponentleri, formil peptidler, fMLP gibi bakteri proteinleri ve lökotrien B4 gibi medyatörler kemotaktik aktiviteyi uyarmaktadır [46, 48, 58]. Kistik fibroziste hızlı ve tekrarlayan nötrofil kümelenmesi hava yolu iltihabının bir göstergesidir. Oluşan bu nötrofil kümelenmesinin devamlılığı ortamdaki lipid medyatörlerin, kemoatraktan maddelerin veya mikrobiyal kolonizasyonun sürekliliğine bağlıdır [59-61].

Kistik fibroziste solunum yolları kronik olarak bakteriyel patojenler ile enfekte olmakta ve oluşan immün yanıt patojenin yok edilmesi için gereken süreden çok daha uzun sürmektedir. Bunun nedenlerinden biri, hava yolunda fazla miktarlarda bulunan IL-8 ve lökotrien B4'ün fazla sayıda nötrofilin bölgeye göçüne neden olmasıdır [62]. Nötrofil kemotaksisi hem epiteliyal hem de immün sistemin hücreleri tarafından üretilen temel enflamatuvar medyatör olarak bilinen kemokin ailesine ait IL-8 tarafından düzenlenmektedir [63]. Lökotrien B4 ayrıca romotoid artirit, kronik bağırsak hastalığı ve kistik fibrozisli hastalarda bozulmuş nötrofil kemotaksisi ile de ilişkilendirilmiştir [64].



Şekil 3. Nötrofillerde kemotaksi, yuvarlanma ve diapedez aşamaları. (Kolaczowska, E. et al. Nat Rev Immunol 2013;13:159)

2.3. Kistik Fibroziste Bozulmuş Nötrofil Fonksiyonları

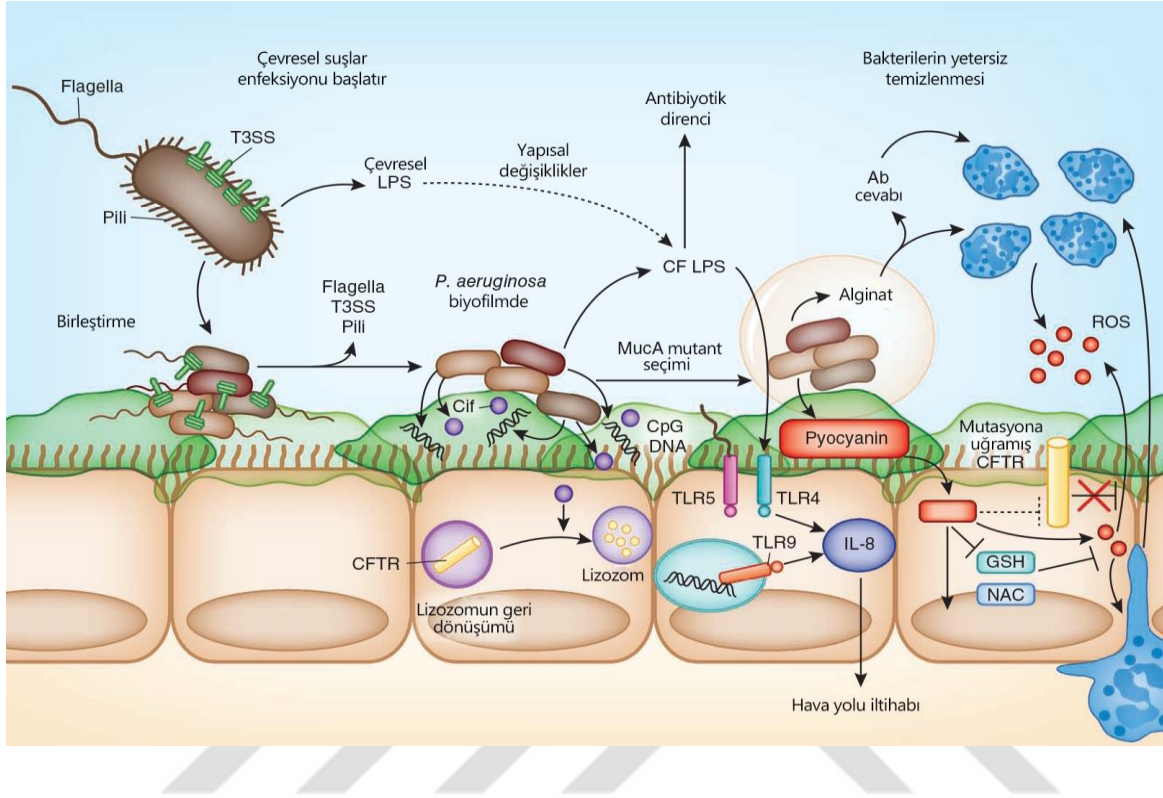
Kistik fibrozisli hastaların polimorfonükleer lökositleri, KFTR'deki mutasyon nedeni ile sağlıklı kişilerin hücrelerinden hem yapısal hem de fonksiyonel olarak farklılıklar gösterir [65]. Kistik fibroziste nötrofillerin hem fagositozu gerçekleştirememeleri hem de apoptozise uğramayıp nekrozla ölmeleri sonucunda hava yollarında DNA birikimi oluşmaktadır [66].

Ayrıca nekroz sonucu serin proteazlar gibi hücre içindeki medyatörler de ortama salınmaktadır [67]. Yapılan çalışmalarda kistik fibrozisli hasta nötrofillerinde erken apoptotik yanıt ile birlikte ROS ve IL-8 üretiminin antibiyotik terapisi öncesi kistik fibrozisli hastalarında kontrol grubuna göre artmış olduğu bulunmuştur. Bu hastalarda uyarılmış periferik kan nötrofillerinin sağlıklı bireylerin nötrofillerine kıyasla daha fazla ROS açığa çıkardığı da gösterilmiştir [68]. Ayrıca hava yolunda bulunan nötrofillerden spontan olarak IL-8 salınımının arttığı ve IL-10 ile inhibisyona uğramadığı da gözlenmiştir [65]. Kistik fibrozisli hasta serumlarında IL-8 ile birlikte pro-enflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1 α/β , IL-6 düzeylerinin yüksek, IL-10 seviyelerinin ise sağlıklı kontrollere göre düşük olduğu gösterilmiştir [69, 70].

Proteazların fizyolojik koşullarda hücre içi ve hücre dışı bakterilerin öldürülmesinde önemli fonksiyonları olmasına karşın, kronik hastalık durumunda proteaz-antiproteazlar arasındaki dengenin bozulması akciğer hasarı ve amfizem tablosunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır [62]. Ayrıca nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan ve fagositoz aşamasında yabancı materyalin sindiriminde görev alan lökosit elastazın da akciğer mikro çevresine hasar verdiği gösterilmiştir [67]. Artmış enflamasyon süreci sonunda, akciğerlerde kronik hava yolu hasarı ve yeniden yapılanma süreci başlamaktadır [62]. Kistik fibrozisle ilişkili kronik akciğer hastalarında görülen uzamış endobronşiyal proteaz aktivitesi akciğere özgü immün yanıtın bir çok basamağına zarar vermektedir. Artmış lökosit elastaz aktivitesi doğal ve edinsel immüitenin birçok elemanını olumsuz yönde etkileyerek, hava yolunda pulmoner savunmayı azaltmakta ve doğal antimikrobiyal etkisini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu sebepten dolayı nötrofil elastazları dolaylı yoldan doğal savunma sistemini devre dışı bırakarak *P. aeruginosa* enfeksiyonun şiddetini arttırmaktadır [71]. Bu nedenlerden dolayı kistik fibrozisi sadece epiteliyal değil aynı zamanda bir nötrofil hastalığı olarak da değerlendirmek gerekmektedir [72].

Kistik fibrozis hasta nötrofillerinde KFTR mRNA ekspresyonu düşük saptanmıştır [73]. Son yıllarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, fare ve insanlarda kistik fibrozis hastalığında KFTR yokluğunun veya fonksiyonel bozukluğunun, bakterilerin ortadan kaldırılması ve hastalık gidişatını olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir [74, 75]. Hücre membranının dışında, fagolizozom membranlarında da bulunan KFTR'nin, klorür iyonu taşıması ve aynı zamanda fagositoz sırasında bakteriyel proteinleri klorlaması da gereklidir. Ayrıca KFTR eksikliği veya işlevsel bozukluğu, kistik fibroziste nötrofil fagolizozomlarında oluşan klor eksikliği ile de doğrudan bağlantılıdır. Bu nedenle hücre içi iyon dengesinin bozulması sonucunda HOCl

üretimi fagolizozomlarda yetersiz kalmakta ve böylece bakteri enfeksiyonu ortadan kaldırılamamaktadır (Şekil 4) [76].



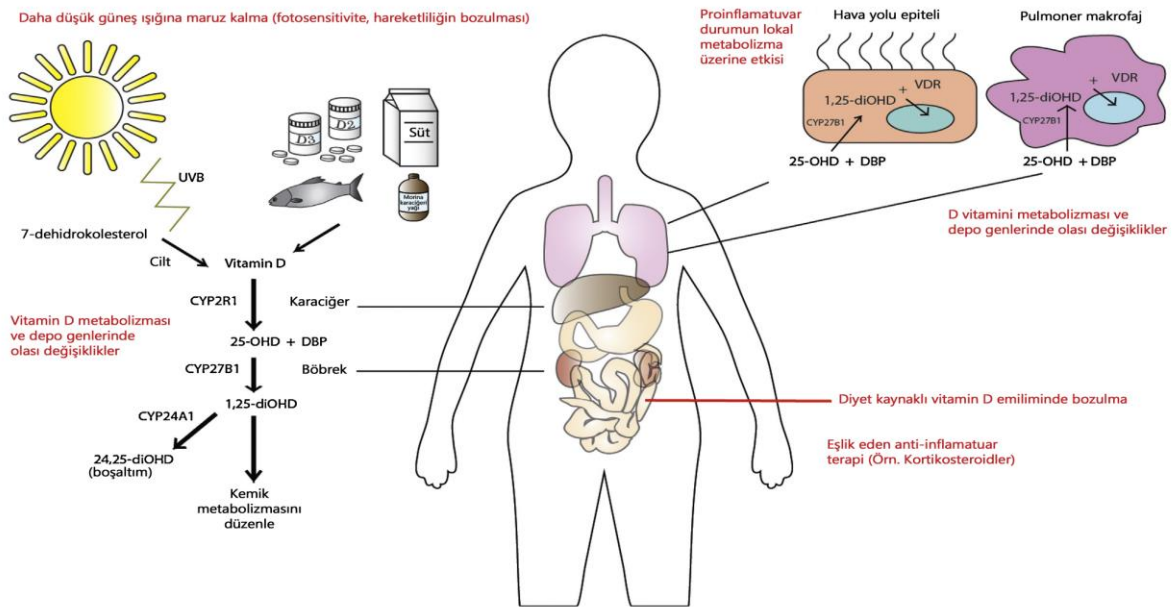
Şekil 4. Kistik fibroziste bakteri kolonizasyonu ve aşırı ROS salınımı. (Cohen TS et al. Nat Med 2012;18:509)

2.4. D Vitamininin İmmünolojik Etkileri

D vitamini, T ve B lenfositler, makrofaj, monosit, dendritik hücreler ve NK hücrelerinin farklılaşmasını düzenlenmesinin yanında *in vivo* ve *in vitro* şartlarda sitokin üretiminin regülasyonunda da rol oynamaktadır. D vitamininin IL-2, interferon gamma (IFN- γ) ve TNF- α üretimini azalttığı, IL-6 ekspresyonunu inhibe ettiği ve B lenfositler tarafından otoantikorların üretim ve sekresyonunu baskıladığı gösterilmiştir [77, 78].

D vitamini doğal immün sistemde, antimikrobiyal fonksiyonları desteklemekte ve enflamatuvar aktiviteyi baskılamaktadır. İnsanlarda 1,25 Dihidroksi (OH) vitamin D ile tedavi sonrası monositlerde TLR2 ve TLR4'ün ekspresyonu baskılanmaktadır. TLR'ler, erken dönemde enflamatuvar cevapların başlamasında önemlidir. 1,25 (OH)D ile monositlerdeki TLR ekspresyonunun azalması, özellikle TNF- α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltmaktadır. Ayrıca D vitamini insan antimikrobiyal peptid (AMP) sentezini uyarmaktadır.

İnsanlarda katelisin ailesinden AMP olan insan katelisin antimikrobiyal peptid-18'in (hCAP); nötrofillerde, alveolar makrofajlarda, epiteliyal hücrelerde ve keratinositlerde eksprese edildiği gösterilmiştir. hCAP geni, vitamin D reseptör (VDR) bağlama bölgesi de içermektedir. Böylece 1,25 (OH)D vitamini insan monosit, nötrofil, keratinosit ve solunum epitel hücrelerinde hCAP ekspresyonunu arttırmakta ve bu durum, D vitamininin enfeksiyonlar ile ilişkisini desteklemektedir (Şekil 5) [79].



Şekil 5. Vitamin D döngüsü. (Herscovitch K et al. Paediatr respir rev 2014;15:154)

Kistik fibrozisli hastalarda emilim bozukluğu nedeniyle destek tedavisi yapılmasına karşın yağda çözünen vitamin düzeyleri gibi 25 (OH)D düzeyleri de düşük seyretmektedir. Bu hastalarda ağır akciğer enfeksiyonları sıklıkla hastane yatışı gerektirmekte ve tedavide antibiyotik direnci önemli bir problem oluşturmaktadır. Antibiyotik tedavisinin etkinliğini arttırmak için bu hastalarda AMP kullanımı ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, 1,25 (OH)D vitamini ile bronşiyal epitel hücrelerinin antibakteriyel aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir [80].

D vitamin eksikliğinin değerlendirmesinde klinik bulgular yanında biyokimyasal parametreler de kullanılmaktadır. Bugün D vitaminin serum düzeylerinin belirlenmesinde biyokimyasal olarak 1,25(OH)2D vitamin ve 25(OH)D vitamin düzeyleri ölçülmektedir. Serumda 25(OH)D vitamin değerleri en uygun laboratuvar test olarak kabul edilmekte ve bu test aylar öncesinden D vitamin eksiklik durumunu gösterebilmektedir [81]. Bu ölçüm ile D

vitaminin diyetle veya güneş ışınların etkisi ile oluştuğu ayırt edilememektedir. Serum 25(OH)D vitamin düzeyleri mor ötesi ışınlar ile artarken endokrin sistem tarafından kontrol edilen 1,25(OH)2D vitamin düzeyleri ise ışınlardan etkilenmemektedir [82]. Serum 25-(OH) D vitamini düzeyinin; <20 ng/ml olması eksiklik, 20-32 ng/ml olması yetersizlik, 32-100 ng/ml arasında olması normal olarak kabul edilmektedir [82]. Ancak bazı otoriteler son zamanlarda yapılan yayınlarda bu değerleri <20 ng/ml eksiklik, 21-29 ng/ml arası yetersizlik, >30ng/ml normal olarak kabul etmektedir [83].

2.5. Antimikrobiyal Peptidler ve İmmün Sistem İlişkisi

Ökaryotik, bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarına karşı evrimsel olarak korunmuş önemli bir savunma mekanizması olan antimikrobiyal peptidler (AMP) doğal bağışıklık sisteminde enflamatuvar cevabın başlatılması ve mikroplara karşı savunmada kritik bir rol oynamaktadır. Epitelial hücreler ve lenfositler tarafından yüzlerce farklı AMP sentezlenmektedir. Memeli AMP'lerinin defensinler ve katelisidinler olmak üzere iki ana grubu bulunmaktadır. AMP'lerin birçok alt grupları bulunmasına karşın, katelisidin LL-37 insanlarda bulunan katelisidin ailesinin bir üyesidir. Bu peptid antimikrobiyal özelliklerine ek olarak, otoimmün hastalık gelişiminde immün düzenleyici olarak görev aldığından araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Defensinler ve LL-37'nin vücut savunmasında patojen çoğalmasının inhibisyonu ve doğal ve kazanılmış immün yanıtların düzenlenmesi gibi önemli fonksiyonları bulunmaktadır. AMP'lerden katelisidin ailesinin üyeleri korunmuş bir katelisidin bölgesi ve oldukça değişken bir anti-mikrobiyal bölge ile karakterize edilirler [84].

Katelisidinler birçok farklı türde tanımlanmıştır. İnsanlarda inaktif hCAP18 öncülünü kodlayan tek bir katelisidin geni eksprese edilmekte ve salındıktan sonra proteinaz 3 veya stratum korneum triptik enzim (SCTE) gibi proteazlar tarafından parçalanarak geniş ölçekte anti-mikrobiyal ve çeşitli immün yanıtı düzenleyici bir amfifatik alfa-helikal peptid yapısı içeren LL-37'yi oluşturmaktadır [85-89]. Kemotaktik ve proanjyogenik aktivite gösteren hCAP18/LL-37 nötrofiller, monositler ve dendritik hücreler, makrofaj alt grupları, mast ve epitelial hücrelerde de eksprese edilir [90]. LL-37 ekspresyonu endoplazmik retikulum stresi, bakteriyel ürünler, vitamin D3, çeşitli histon deasetilaz inhibitörü ve litokolik asitler tarafından uyarılabilmekte bunun aksine *Shigella* ve *Neisseria* gibi patojenler ve bakteriyel ekzotoksinler tarafından baskılanabilmektedir. LL-37 ekspresyonunun patojenler tarafından baskılanması bakteriyel virülans ile ilişkili olup bakteri enfeksiyonuna zemin hazırlayabilmektedir [91-99]. Patojenle ilişkili moleküler kalıplara yanıt veren TLR fonksiyonlarının LL-37 aracılığı ile

regüle edildiği ve anti-enflamatuvar etki gösterdiği bulunmuştur [100]. LL-37 LPS'ye yüksek afinite ile bağlanmakta ve biyolojik aktivitesini bloke edebilmektedir [101]. LL-37 LPS'ye bağlanarak TLR4 sinyal mekanizmasını azaltmaktadır. Aynı ortamda LL-37 ve LPS birbirine bağlanması enflamasyon sonrası sitokin üretimini azaltmaktadır [102, 103]. LL-37 aynı zamanda TLR3 ligandını stabilize ederek TLR3 reseptör aracılığı ile enfekte olmuş bronşiyal epitel hücrelerde viral yanıtları güçlendirebilmektedir [104].

2.5.1. Solunum Sistemi ve LL-37 İlişkisi

Doğal bağışıklık sistemi solunum yolu açısından önemli bir işleve sahiptir. Solunum epiteli çok geniş bir yüzeyi kaplamakta ve özellikle alveolar epitel tabakası havadan kana oksijen geçişini sağlamaktadır. Bu hassas mukoza toksinlere ve enfekte edici ajanlara karşı minimum enflamasyon sağlanarak korunmalıdır. Üst solunum yolu havayı düzenlemekte aynı zamanda partikülleri ve enfekte edici ajanları filtreleyip alveollere girmesini önlemektedir. Solunum yoluna göç eden immün sistem hücreleri ve solunum yolu epiteliyal hücreler tarafından defensinler ve katelisidinler üretilmekte ve bu sayede akciğer enfeksiyonları engellenmeye çalışılmaktadır [105].

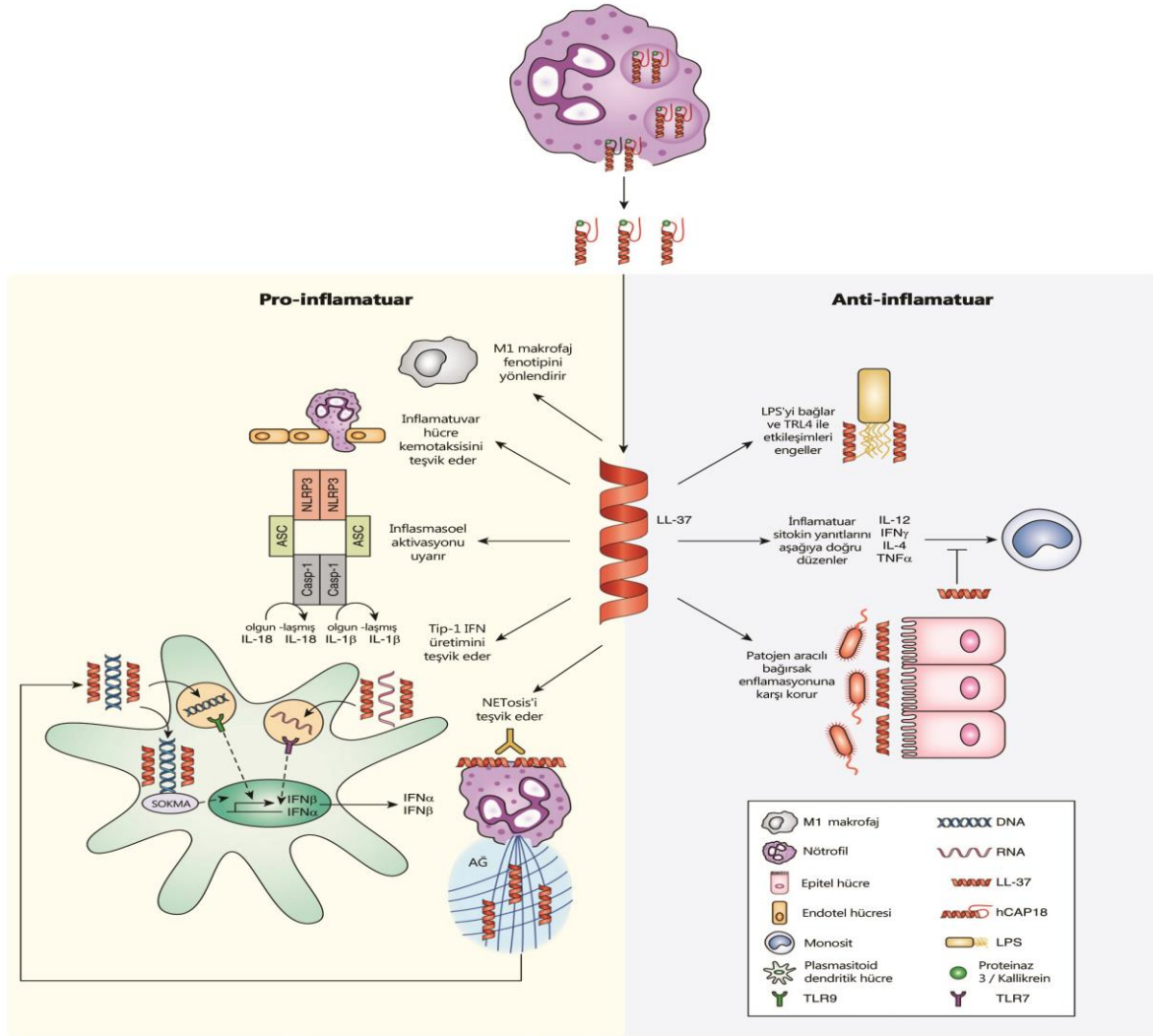
Son yıllarda D vitamininin LL-37 ekspresyonunun düzenlenmesindeki önemi gösterilmiştir. Solunum yolu epiteliyal hücreler tarafından D vitamini aktif metabolitlerine dönüştürülmekte ve aktif vitamin D'de doğal immün sistemde önemli görevleri olan katelisidin antimikrobiyal peptid ve CD14 genleri gibi vitamin D ile regüle edilen genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bundan başka vitamin D virüslere karşı üretilen enflamatuvar sitokinler ve antimikrobiyal peptid yanıtlarında değişimlere neden olmaktadır. İnsan β -defensinler (hBD) ve LL-37 antimikrobiyal ve antiviral aktivilerine ek olarak, enflamatuvar hücrelerin mukozaya göç etmesini uyarmak için alarminler olarak ta işlev görmektedir. Bu gözlemler lokal olarak solunum yolu epiteliyal hücreleri tarafından inaktif formdan aktif forma çevrilen vitamin D'nin akciğerlerde immün sistem fonksiyonlarını değiştirebileceğini desteklemektedir [106].

LL-37 fMLP aracılığı ile nötrofiller, monositler ve T hücrelerinde kemotaksiyi uyarırken, LPS ve diğer TLR ligandlarıyla uyarım sonrası monositlerde enflamatuvar sitokin üretimini baskılamaktadır [107, 108]. Son yıllarda, LL-37'nin ayrıca monositlerde gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaza (GAPDH) bağlanarak kemokin ve IL-10 üretimine yol açtığı da gösterilmiştir [109]. Bundan dolayı, bu peptidlerin sadece enfeksiyona karşı başlangıçta mukozal bariyerin güçlendirilmesine katkıda bulunmadıkları aynı zamanda ilerleyen süreçlerde doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemlerini düzenledikleri görülmektedir. Nötrofiller veya monositler

tarafından üretilen ve epidermal growth faktör reseptörleriyle (EGFR) etkileşime geçerek epiteliyal hücreleri aktive edebilen LL-37, IL-1 β varlığında makrofajlarda enflamatuvar yanıtları arttırabilmektedir [110, 111]. Buna karşın LL-37 LPS'ye bağlanarak monositlerde TLR aracılı aktivasyonu inhibe edebilmektedir [108, 112].

2.5.2. Epitel ve İmmün Sistem Hücrelerinde LL-37'nin Etkileri

Kalın bağırsakta epiteliyal hücreler LL-37 ile direk olarak uyarıldıklarında koruyucu musin salgılanması uyarılmakta, bu olay bağırsak bariyer bütünlüğünün korunması ve epitele hücre göçünün artmasına katkıda bulunmaktadır [113, 114]. LL-37 aynı zamanda hava yolu epiteliyal hücrelerin çoğalmasına ve hava yolundaki hasarların onarımına da katkıda bulunmaktadır [115]. LL-37 bronşiyal epitel hücrelerin bağlantılarını arttırır ve epiteliyal hücre geçirgenliğini azaltarak *P. aeruginosa* bağlanmasının azalmasına yol açar [116]. Buna karşın, bakteri varlığında LL-37 enfekte olmuş hava yolu epitelinin apoptotik sürecini hızlandırmaktadır. Araştırmacılar pulmoner epiteliyal hücre apoptozunun *P. aeruginosa*'nın akciğerden temizlenmesinde önemli rol oynadığını ve bu mekanizmanın bakteri temizlenmesi için alternatif bir yol olduğunu öne sürmektedir [117, 118]. Bundan başka, LL-37 bronşiyal ve alveolar epiteliyal hücreler tarafından enflamatuvar süreç sonrası sitokin salınımını da uyarmaktadır (Şekil 6) [119, 120].



Şekil 6. CAP-18 etkileşimi. (Kahlenberg JM et al. J Immunol 2013;191:48959)

2.5.3. LL-37 Ekspresyonunun Vitamin D3 Tarafından Düzenlenmesi

İmmün sistem hücrelerinde IFN- β , TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinler 1 α -hidroksilaz enzimini (CYP27B1) uyarmakta ve böylece monositlerde katelisinidin ekspresyonunu arttırmaktadır [121, 122]. Makrofajların TLR2/1 ligandları ile uyarımı sonrasında VDR'yi (V ve CYP27B1) kodlayan genlerin uyarıldığı ve bunun sonucunda LL-37 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [123]. CYP27B1 ve VDR'lerin TLR2/1 ligandları ile uyarımının IL-15 aracılığı ile düzenlendiği daha sonraki araştırmalarda bulunmuştur [124].

Vitamin D3 işlevlerini birçok dokularda, nötrofil, monosit, dendritik hücreler ve T hücreleri gibi bazı lökositler tarafından ekprese edilen VDR'ne bağlanarak gösterir [125]. VDR

sitoplazmada vitamin D3'e bağlanmakta, nukleusa nakledilen bu kompleks hedef genin promotörüne bağlanarak insan genomunda en az 200 genin aktivasyonunda rol oynamaktadır [126]. LL-37'yi kodlayan katelisidin antimikrobiyal peptid (CAMP) geni, 3 tane D vitamini cevap elemanı (VDRE) gen promotörü içerir [127-129]. Bundan dolayı vitamin D3 bronşiyal epiteliyal hücreler, keratinositler ve myeloid hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücrede LL-37 ekspresyonunu uyarmakta ve bu da vitamin D3'ün insanlarda LL-37 ekspresyonunun en büyük düzenleyicisi olduğunu kanıtlamaktadır [92, 128, 130, 131].

2.5.4. LL-37'nin Hücre Ölümünü Düzenlenmesindeki Rolü

LL-37'nin hücre ölümünün düzenlenmesinde işlevleri bulunduğu gösterilmiştir. Nötrofillerde kaspaz 3 ve 8'in aktivasyonu ile birlikte apoptotik mekanizmalar LL-37 tarafından inhibe edilebilmekte ve aynı zamanda bu peptidin yüksek konsantrasyonu nötrofillerde nekrotik hücre ölümünü de uyatabilmektedir [117]. LL-37'nin nötrofil apoptozunu inhibe ettiği gösterilmesine karşın daha sonraki araştırmalar LL-37'nin enflamatuvar makrofaj yanıtı oluşmadan önce nötrofil apoptozunu inhibe ederek nekroza teşvik ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, LL-37'nin akut enflamatuvar yanıtın sonlandırılmasında rol olabileceğini göstermektedir [100, 103, 132]. Ayrıca, enflamasyon sırasında nötrofillerin LL-37 tarafından uyarılması, oluşan pro-enflamatuvar sitokin üretimini azaltmakta ve aynı zamanda nötrofillerde ROS üretimi ve bakteriyel fagositozu arttırmaktadır [133].

2.5.5. LL-37 ve Kistik Fibrozisteki Önemi

Kistik fibrozisli çocukların doğduklarında normal akciğer fonksiyonlarına sahip olmalarına rağmen tekrarlayan solunum yolu bakteriyel ve viral enfeksiyonlar ile birlikte akciğerlerde görülen kronik *P. aeruginosa* ve *B. cenocepacia* gibi bakteri enfeksiyonları sonucu klinik tabloları bozulmaktadır. Bu hastalardan alınan bronkoalveolar lavaj sıvısında antibakteriyel aktivitenin azaldığı ve bu durumun kısmen yüksek tuz konsantrasyonu, defensin ve LL-37 aktivitesinin inhibe edilmesi sonucu oluştuğu düşünülmektedir [134]. Buna ek olarak, kistik fibrozisli hastaların BAL sıvısında bulunan kathepsinlerin insan β -defensinleri, LL-37'nin ise proteinaz 3 tarafından proteolitik olarak parçalandığı gösterilmiştir. Bu enzimlerin kistik fibroziste yoğun miktarda salgılanması β -defensin ve LL-37'yi etkisiz hale getirmektedir [135].

Kistik fibroziste akciğer bronşlarında iyon yapısının değişmesi beraberinde kimyasal değişimler ve bunun sonucunda da mikro çevreyi oldukça etkilemektedir. Böyle bir ortamda *P. aeruginosa* LPS'leri antimikrobiyal peptidlere karşı direnç kazanmaktadır [136]. Ayrıca *P.*

aeruginosa bakterisinin biofilm oluşturması sonucu bakteride oluşan mutasyonlar LL-37'nin *P. aeruginosa* 'ya karşı antimikrobiyal etkisini azaltmaktadır [136].

Kistik fibrozis tanılı hastalarda doğal immün yanıtın bir parçası olan nötrofillerin patojenleri yok edememe mekanizmaları ve enflamatuvar süreçteki rolleri henüz tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. Çalışmamızda *P. aeruginosa* üremesi olan ve olmayan kistik fibrozisli çocuk hastalarda doğal immün sistemin bir parçası olan nötrofillerin fagositoz, oksidatif patlama ve kemotaktik indeks kapasiteleri, enflamatuvar alanlara göç etmede rol oynayan adezyon molekül ekspresyonları ve apoptotik indeksleri analiz edilmiştir. Ayrıca *P. aeruginosa* uyarımlı kùltürlerde nötrofillerin IL-8, TNF- α ve CAP-18 salınımları ve kùltür üst sıvılarında IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 düzeyleri sağlıklı olgularla karşılaştırılmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

3.1.1. Hasta seçimi

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine rutin kontrolleri sırasında gelen kistik fibrozis tanısı almış *P. aeruginosa* üremesi pozitif mukoid formda hastalar ($n=8$, yaş ortalaması $10.125 \pm 3,2$), *P. aeruginosa* ve bakteri üremesi olmayan hastalar ($n=8$, $11 \pm 2,8$) ve sağlıklı çocuk olgular ($n=8$, yaş ortalaması $11,125 \pm 4,36$) çalışmaya alınmıştır. Tüm olgulardan 10 ml heparinli periferik kan alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm olguların ailelerine çalışmanın prensibi, yapılma amacı, elde edilecek verilerin ne şekilde kullanılacağı ve herhangi bir durumda kiminle iletişime geçileceği açık bir şekilde ifade edilmiş ve onam formları imzalı olarak alınmıştır.

Fenotipik özellikleri kistik fibrozis ile uyumlu (persistan solunum yolu problemleri, sık tekrarlayan akciğer infeksiyonları, kronik öksürük, balgam çıkarma, büyüme-gelişme geriliği, radyolojik anormallikleri ve metabolik problemleri (hiponatremik, hipopotasemik, hipokloremik metabolik alkaloz) olan hastalar) en az 2 ter testi yüksek bulunan (terde Cl 60 mEq/l ve terde $NaCl$ 90 mEq/l üstü) hastalara, KFTR gen mutasyon analizleri yapılmıştır. KFTR gen bölgesinde mutasyon saptanan çocuklarda klinik bulgular doğrultusunda kistik fibrozis tanısı doğrulanmıştır.

3.1.2. Araştırmaya dahil edilme ve dışlanma (araştırmaya alınmama) kriterleri

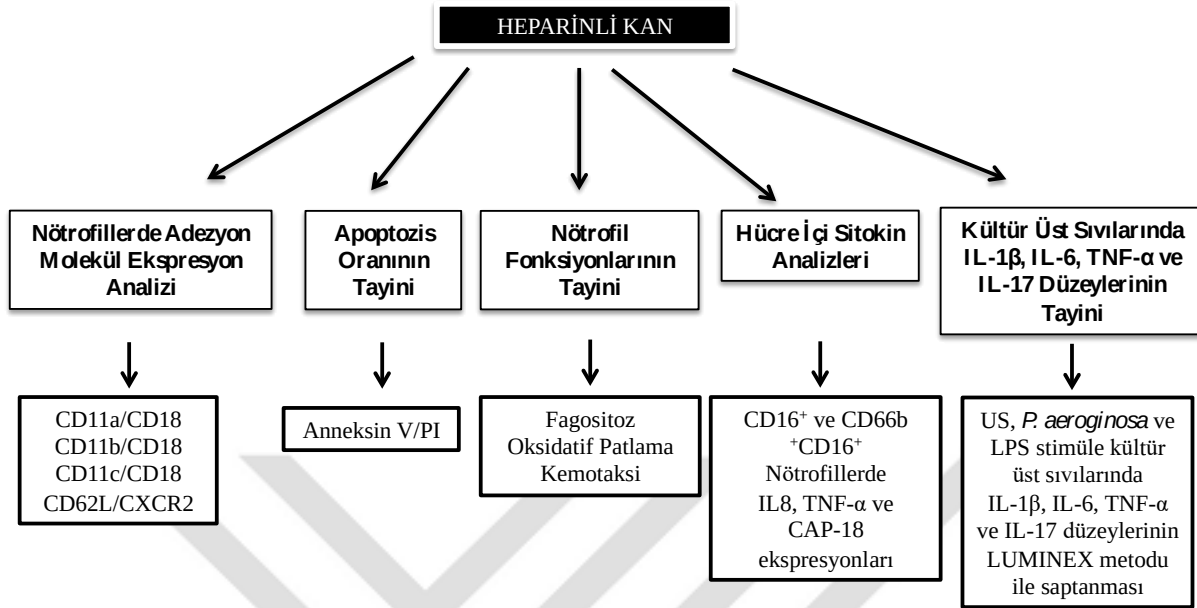
3.1.2.1. Genel Dahil Etme Kriterleri

1. 0-16 yaş arası hastalar
2. Kistik fibrozis tanısı ile takipli
3. Balgamında *P. Aeruginosa* üremesi olması

3.1.2.2. Genel Dışlama Kriterleri

1. İmmün yetmezliği olması
2. *P. aeruginosa* dışı üremelerin olması
3. İmmün baskılayıcı ilaç kullanımı

Kistik fibrozis hastaları ve sağlıklı çocuklarda periferik kan temini sonrasında yapılan deney aşamaları aşağıda özetlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Deney gruplarında yapılan deneysel akış şeması.

3.2. *P. aeruginosa* Bakterisinin Ultraviyole Işını İle İnaktivasyonu

Enfeksiyon sırasında bakteriyel antijen maruziyetine karşı bağışıklık cevabı kistik fibrozis hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* (İsveç Göteborg Üniversitesi Kültür Koleksiyonu) preparatları kullanılarak irdelenmiştir. Bakteriler Lennox L. broth veya kanlı agara ekilerek bir gece boyunca kültürde bekletilmiş ve devamında fosfat tuz çözeltisinde (PBS) toplanarak yıkanmıştır. Ardından hücre sayısı 10^9 /ml olacak şekilde ayarlanmış, 15 dakika ultraviyole ışığında öldürülüp, inaktivasyon uygun büyüme medyumunda bakteri çoğalmaması şeklinde doğrulanmıştır.

3.3. Nötrofil Fonksiyonlarının Akan Hücre Ölçer Cihazında Analizi

Hasta ve sağlıklı kontrollerden alınan 2 ml heparinli periferik kan nötrofillerin izole edilmesi amacıyla yavaşça 2:1 oranında Ficoll/Hypaque (Biochrom AG, Berlin, Germany) solüsyonu üzerine yayılmış ve bunu takiben nötrofil fraksiyonu içeren plazma sıvısının ayrışması için 15-20 dakika oda ısısında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpün en üst kısmında ayrılan plazma eritrosit kontaminasyonu olmadan pastör pipeti yardımıyla toplanıp yeni bir tüpe aktarılmıştır. Bu aşamayı takiben nötrofillerde fagositöz, oksidatif patlama ve kemotaktik aktivitenin belirlenmesi amacıyla 5 ml'lik 5 adet tüpe 1 ml (PBS (pH=7.4) (Sigma-

Aldrich Co., St. Louis, MA) konulmuş ve her tüpe 10 mg/ml Dihidrorodamin 123 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) ve polimorf nükleer hücre içeren plazma örneğinden 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde pipetlenmiştir. Her tüp 37°C 'deki etüvde 5 dakika inkübe edilmiştir. Bunu takiben tüplere uyarıcılar konulmuş ve kontrol tüpüne ise herhangi bir uyarıcı konulmamıştır. Tüplere sırasıyla fagositik aktiviteyi uyarmak için *Escherichia coli* (5×10^9 *E.coli*/ml), *P. aeruginosa* (5×10^9 *P. aeruginosa* /ml), oksidatif patlatmayı uyarmak için 10 mg/ml forbol miristat asetat (PMA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) ve kemotaktik aktiviteyi uyarmak için de 10 µl formil-metiyonil-lösil-fenilalanin (fMLP) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) konulmuştur (Tablo 3).

Uyarıcıların konulması sonrası tüpler 15 dakika 37°C deki etüvde inkübe edilmiştir. 15 dakikalık inkübasyon sonra tüpler akan hücre ölçer (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) cihazında okutulmuştur. Histogramda X mean değerleri alınarak 20. Dakika/0. dakika oran hesaplaması yapılmıştır. Ortaya çıkan oran 1'den büyük ve eşit ise fonksiyon normal, küçük ise fonksiyon anormal diye kabul edilmiştir. Verilerin analizi CellQuest (BD Biosciences, San Diego, USA) programı ile yapılmıştır.

% X mean değeri (20.dk)

----- İndeks değeri ≥ 1 = normal nötrofil fonksiyonu

% X mean değeri (0.) dk

Tablo 3. Nötrofil fonksiyon testlerinde kullanılan uyarıcılar.

	FONKSİYON	UYARICILAR
1.Tüp	Kontrol	-
2. Tüp	Fagositoz	İnaktif <i>E.coli</i>
3. Tüp	Fagositoz	İnaktif <i>P. aeruginosa</i>
4. Tüp	Oksidatif Patlama	PMA
5. Tüp	Kemotaksi	fMLP

3.4. Nötrofil Yüzey Antijenlerinin Akan Hücre Ölçer ile Tayini

Periferik kanda nötrofil adezyon molekül ve yüzey reseptörlerinin belirlenmesi amacıyla ilk tüpe anti human-IgG2a-Florescein İzotiyosiyanat (FITC)/ anti human-IgG1-Fikoeritrin (PE) (tümü BD Biosciences, San Diego, USA) , ikinci tüpe anti human-CD11a-PE (BD Biosciences, San Diego, USA) ve anti human-CD18-FITC (BD Biosciences, San Diego, USA), üçüncü tüpe anti human-CD11b-PE (BD Biosciences, San Diego, USA) ve anti human-CD18-FITC (BD Biosciences, San Diego, USA), dördüncü tüpe anti human-CD11c-PE (BD Biosciences, San Diego, USA) ve anti human-CD18- FITC (BD Biosciences, San Diego, USA) ve beşinci tüpe anti human-CD62L-PE (Diacclone, France) ve anti human-CXCR2-FITC (BD Biosciences, San Diego, USA) monoklonal antikorları pipetlenmiştir. (Tablo 4). Bunu takiben her tüpe 100 µl (5×10^5 hücre/tüp) periferik kan 5 farklı tüpe pipetlenmiş ve vortekslenmiştir. Hücrelerin 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübasyonunu takiben hücrelerin üzerine eritrositlerin patlatılarak ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla 2 ml eritrosit lize edici solüsyon olan FACS lysing (BD Biosciences, San Diego, USA) solüsyonu konulmuş ve tüpler 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplere izotonik bir tampon çözelti olan 2 ml PBS eklenerek bir kez 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvının dökülmesi ile beraber hücrelerin üzerine 500 µl %1 paraformaldehitli PBS ilave edilip tüpler FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) akan hücre ölçer cihazında BD CellQuest™ Pro (BD Biosciences) programında okutulup nötrofil yüzey moleküllerinin analizleri FlowJo™10.2 (Tree Star Inc., USA) kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 4. Nötrofil yüzey antijenlerinin belirlenmesinde kullanılan monoklonal antikorlar.

	FITC	PE
1. tüp	IgG2a	IgG1
2. tüp	CD18	CD11a
3. tüp	CD18	CD11b
4.tüp	CD18	CD11c
5. tüp	CXCR2	CD62L

3.5. Nötrofil Apoptozis Oranlarının Akan Hücre Ölçerde Tayini

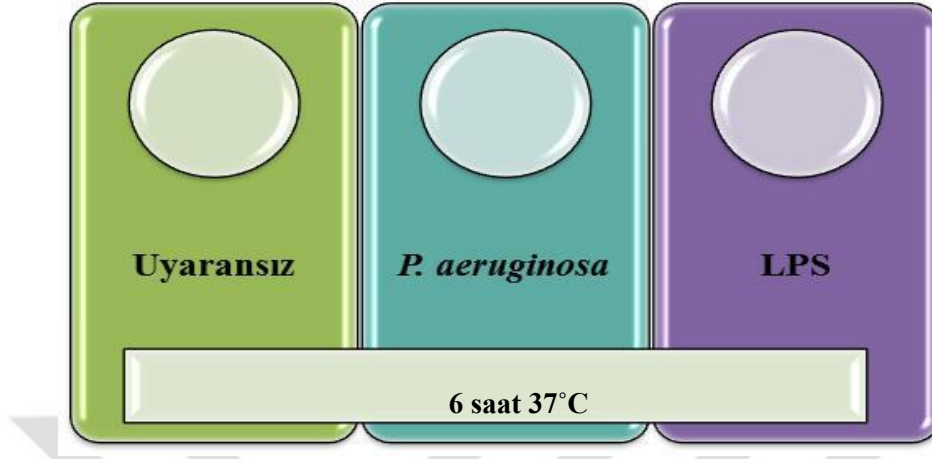
Annexin V apoptozis deteksiyon kiti apoptotik indeksin akan hücre ölçerde tayininde kullanılan bir kittir. Apoptozisin erken safhasında hücreler membran asimetrisini kaybetmeye başlamakta, apoptotik hücrelerde ise bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserin plazma membranının dışında belirmektedir. Kalsiyuma bağımlı fosfolipit bağlayıcı annexin V fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlanmakta ve böylece apoptotik hücre oranı belirlenebilmektedir. Bu amaçla deneylerimizde FITC Annexin V Apoptosis Deteksiyon Kit I (BD Biosciences, San Diego, USA) kullanılmıştır.

Nötrofil izolasyonu için heparinize kan 2:1 oranında Ficoll/Hypaque (Biochrom AG, Berlin, Germany) solusyonu üzerine yayılmış ve yeni çökmeye başlayan nötrofil içeren plazma örneğinden 50 µl akan hücre ölçer tüpüne aktarılmıştır. Tüpün içerisine 2 ml Binding Buffer eklenerek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üst sıvı dökülüp ve tekrardan tüplere 100 µl Binding Buffer eklenmiştir. Bunu takiben tüplere 5 µl Annexin V-FITC ve ortamdaki ölü nötrofillerin belirlenebilmesi amacıyla 5 µl prodium iyodid (PI) pipetlenerek 15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnek tüplerine 500 µl Binding Buffer eklenip BD FACS Calibur cihazında analiz edilmiştir. PI ve Annexin V ile boyanmayan hücreler canlı, sadece Annexin V ile boyananlar erken faz apoptoza giden hücreleri, Annexin V ve PI ile boyanan hücreler apoptozun son aşamalarında nekroza giden nötrofilleri temsil edilmiştir. Veri analizleri FlowJoTM10.2 (Tree Star Inc., USA) analiz programı kullanılarak yapılmıştır.

3.6. Nötrofil Kültürleri

Hasta ve kontrol grubundan alınan heparinli periferik kan örneklerinin kan sayım cihazında (RAYTO (RT7600), China) nötrofil sayıları belirlenmiştir. 24 kuyucuklu doku kültürü plaklarında her bir kuyucuğa 1×10^6 nötrofil olacak örnekler kültüre alınmıştır. Bu amaçla steril şartlarda heparinli kan zenginleştirilmiş RPMI-1640 (%10 fetal calf serum, 1mM sodyum pirüvat, %1 MEM (Minimal essential medium) non esansiyel aminoasit ve vitamin solusyonu, 2mM L-glutamin, 100U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 50µm 2 merkaptetanol, (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) medyumunu varlığında 24 kuyucuklu doku kültürü plaklarında 6 saat 37°C %5 CO₂'li inkübatörde kültüre alınmıştır. Kültür aşamalarında uyaransız, antijen uyarımı olarak 6×10^5 CFU/ml konsantrasyonunda inaktif formdaki *P. aeruginosa* bakteri suşu ve pozitif kontrol uyarımı olarak 100 ng/ml lipopolisakkarit (LPS)

(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) olmak üzere 3 farklı şart kullanılmıştır (Şekil 8). Kültürün son 4 saatinde Brefeldin A (x1000) solusyonu (eBioscience, San Diego, USA) ilave edilmiştir.



Şekil 8. Nötrofillerin farklı uyaranlarla yapılan kültür koşulları.

3.7. Nötrofillerde Hücre İçi Sitokin Salımlarının Belirlenmesi

Nötrofillerde hücre içi CAP-18, TNF- α ve IL-8 sitokin ekspresyonları total ve CD66b eksprese eden aktive olmuş nötrofillerde analiz edilmiştir. Bu amaçla, nötrofillerin uyaransız, *P. aeruginosa* ve LPS uyaranlarıyla 6 saat kültürleri yapılmış ve sonrasında kültür plaklarından 100 μ l kan tüplere pipetlenmiştir. Yüzey moleküllerinin boyanma aşamaları için Tablo 5’de belirtilen şekilde izotipik kontrol antikoru ve yüzey moleküllerine ait anti-human CD66b-Allofikosyanin (APC) (BD Biosciences, San Diego, USA), anti-human CD16-Peridinin klorofil protein (PerCP) (eBioscience, San Diego, USA), ve anti-human CD66b-FITC (eBioscience, San Diego, USA) antikorları kullanılmıştır. Örneklerin 20 dakika karanlık ortamda oda ısısında inkübasyonunu takiben 2 ml FACS lysing (BD Biosciences, San Diego, USA) solüsyonu ile 15 dakika karanlıkta inkübe edilip, bir kez 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücrelerin yüzey boyamasını takiben sonra tüplere 200 μ l Cytofix Perm (BD Biosciences, San Diego, USA) eklenmiş ve 15 dakika +4°C’de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası tüplere 1 ml PermWash solüsyonu (BD Bioscience, San Diego, USA) ilave edilip 5 dakika 2000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst sıvıların uzaklaştırılmasını takiben tüplere 150 μ l PermWash solüsyonu (BD Bioscience, San Diego, USA) eklenmiştir. Bu işlemi takiben hücre içi sitokin ölçümü için 3 farklı uyaranla kültüre edilmiş hücreler Tablo 5’de belirtilen sırayla – FITC ve –PE işaretli izotipik kontrol antikoru ile anti human IL-8-FITC (eBioscience, San Diego, USA), anti-human TNF- α -PE (Diacclone, France), anti human CAP-18-PE (eBioscience, San Diego, USA) monoklonal antikoru konularak +4°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası tüplerin 1 ml PermWash solusyonu ilave edilip 5 dakika 2000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Bunu takiben tüplere 500 µl %1 paraformaldehitli PBS ilave edilip BD FACSCalibur cihazında analiz edilmiştir. FlowJo™10.2 (Tree Star Inc., USA) programı ile veri analizi yapılmıştır.

Tablo 5. Nötrofillerin hücre içi sitokin tayinleri aşamalarında kullanılan monoklonal antikolar.

	FITC	PE	PerCP	APC
1. tüp	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1
2. tüp	IL-8	TNF- α	CD16	CD66b
3. tüp	CD66b	CAP-18	CD16	

3.8. Kültür Üst Sıvılarında IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 Sitokinlerinin Luminex Yöntemiyle Belirlenmesi

Kistik fibrozis hasta grupları ve sağlıklı gruptan alınan periferik kan örnekleri her bir kuyucukta 1×10^6 nötrofil olacak şekilde uyaransız, *P. aeruginosa* (6×10^5 CFU/ml) ve LPS (100 ng/ml) ile 18 saat 37°C %5 CO₂’li inkübatörde kültüre alınmıştır. Kültür sonrası hücre üst sıvıları toplanmış ve LUMINEX tayinine kadar -80° C’de muhafaza edilmiştir. LUMINEX kiti olarak insan IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 Magnetic Luminex® Assay kiti (RnDSsystems, USA) kullanılmıştır. IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 antikor boncukları 1 dakika vortekslenmiş, 50 µl mikroboncuk karışımı mikropiğin her bir kuyusuna eklenmiştir Her bir kuyucuğa 50 µl standart ve örnekler pipetlenmiş 2 saat oda ısısında 800 $\pm$ 50 rpm’ e ayarlanmış horizontal orbital mikropiğin karıştırıcısında inkübe edilmiştir. Plate, karıştırıcıdan alındıktan sonra magnetik mekanizma üzerine konarak 100 µl wash buffer ilave edilmiş 1 dakika bekletildikten sonra yıkama işlemi 2 kez tekrarlanmıştır. Yıkama işlemini takiben her kuyuya 50 µl biotin antikor kokteyli eklenmiş ve deney plağı 800 $\pm$ 50 rpm şiddetindeki karıştırıcıda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası önce bahsedilen şekilde plaklar 2 kez yıkanmış ve her bir kuyucuğa 50 µl Streptavidin-PE eklenmiştir. Plak oda ısısında karıştırıcıda 800 $\pm$ 50 rpm’de 30 dakika inkübe edilmiş yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Her kuyuya 100 µl wash buffer eklenerek deney plağı oda ısısında karıştırıcıda 800 $\pm$ 50 rpm olacak şekilde 2 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında ise örnekler 90 dakika içinde Luminex® MAGPIX® system (Thermo Fisher Scientific, USA)’da okutulmuştur. Sitokinlerin deteksiyon limitleri, IL-1 β için 0,8 pg/ml, IL-6 için 1,7 pg/ml, TNF- α için 1,2 pg/ml ve IL-17 için 1,8 pg/ml olarak belirtilmiştir.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm immünofenotiplendirme analizleri, hücre içi sitokin ve apoptozis ölçümlerinde bağımsız ve normal dağılıma uygunluk göstermeyen ikiden fazla değişkenin karşılaştırması Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Anlamlı çıkan sonuçlar için ikili Post-Hoc karşılaştırma Bonferroni düzeltmeli *Mann Whitney U* testi ile yapılmıştır. Moleküller arasındaki korelasyonlar Spearman sıra korelasyon testi ile yapılmış ve gruplar arasında ilişki gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık, p değerinin 0,05'den küçük olması olarak tanımlanmıştır.

Analizler MedCalc Statistical Software version 12.7.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2013) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Grafikler için GraphPad Prism 5 programı (GraphPad Software CA, USA) kullanılmıştır. Tüm değerler metinde ve şekillerde ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Genel ve Klinik Özellikleri

Çalışmaya kistik fibrozis tanılı çocuk hastalar (0-16 yaş) ve sağlıklı çocuklar (0-16 yaş) dahil edilmiştir. Kistik fibrozis tanılı hastalar çalışmaya alınmadan önce balgam kültürleri değerlendirilmiş, balgam kültüründe *P. aeruginosa* üremesi pozitif ($P(+)$), mukoid formda kistik fibrozis tanılı hastalar ($n=8$, yaş ortalaması $10.125 \pm 3,2$) ve *P. aeruginosa* ve bakteri üremesi olmayan kistik ($P(-)$) fibrozis tanılı hastalar ($n=8$, yaş ortalaması $11 \pm 2,8$) olacak şekilde hasta grupları belirlenmiştir. Hastaların genetik olarak KFTR mutasyonları da analiz edilmiştir. Çalışmamızda hastalara taşıdıkları KFTR mutasyon alt tiplerine göre gruplama yapılmak istenilmiş fakat her bir hastada farklı bir tip mutasyon tespit edildiğinden herhangi bir gruplama yapılamamıştır. Kontrol grubu olarak sağlıklı çocuklar ($n=8$, yaş ortalaması $11,125 \pm 4,36$) çalışmaya dahil edilmiştir. Sağlıklı çocuklar, otoimmünitesi ve immün yetmezliği olmayan, enfeksiyon geçirmemiş ve immün supresif ilaç almayan bireylerden oluşmuştur. Yaş, nötrofil yüzdesi ve C-reaktif protein (CRP) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Çalışma gruplarında hem vitamin D düzeyleri hem de nötrofil sayıları $P(+)$ kistik fibrozis grubunda $P(-)$ ($p=0,009$ ve $p=0,003$, sırasıyla) ve kontrol grubu ($p=0,012$ ve $p=0,0207$ sırasıyla) ile kıyaslandığında istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Hasta ve sağlıklı kontrol grubuna ait demografik bilgiler.

	<i>P(+)</i> Grup	<i>P(-)</i> Grup	Kontrol	p değeri
E/K	4/4	4/4	5/3	
Yaş	10,125 (6-16)	11 (6-14)	11,125 (2-16)	0,552
Nötrofil Sayısı (ml/10⁶)	5,6 (3,7- 9,5)	3 (1,2- 4,7)	3,7 (2,4-7,4)	0,007
Nötrofil Yüzdesi	52,5 (18-62)	43,3 (12,5-55,2)	40,6 (21,9-49,2)	0,17
CRP(mg/L)	0,4 (0,4-4)	0,08 (0,02-0,31)	0,04 (0,03-0,41)	0,119
Vitamin D (ng/ml)	28,2 (12-72)	13,2 (2-24)	14,1 (7-21)	0,011

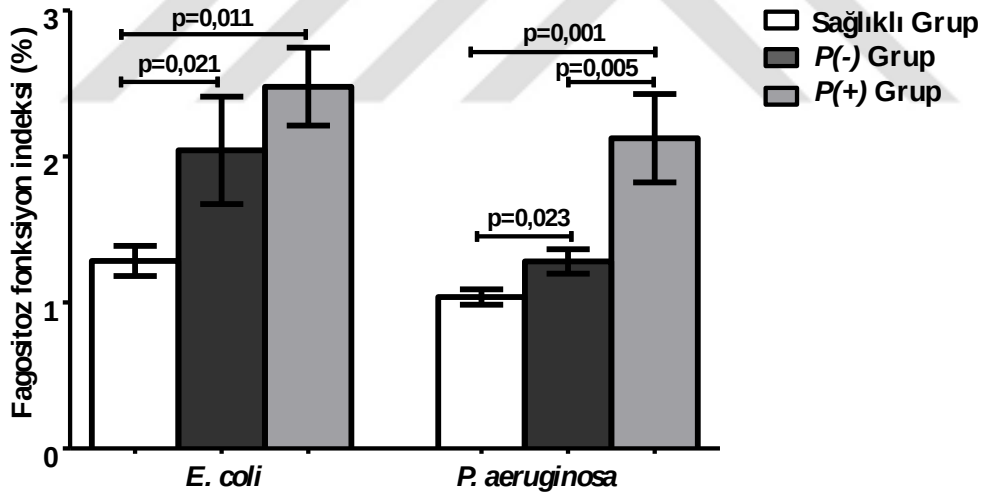
p değerleri gruplar arası Kruskal Wallis test değerlerini göstermektedir.

4.2. Kistik Fibrozis Hastalarında Nötrofil Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Hasta ve sağlıklı kontrollerden alınan heparinli periferik kan örneklerinden nötrofil izolasyonunu takiben nötrofillerin fagositoz, oksidatif patlama ve kemotaktik indeks kapasiteleri akan hücre ölçerinde analiz edilmiştir.

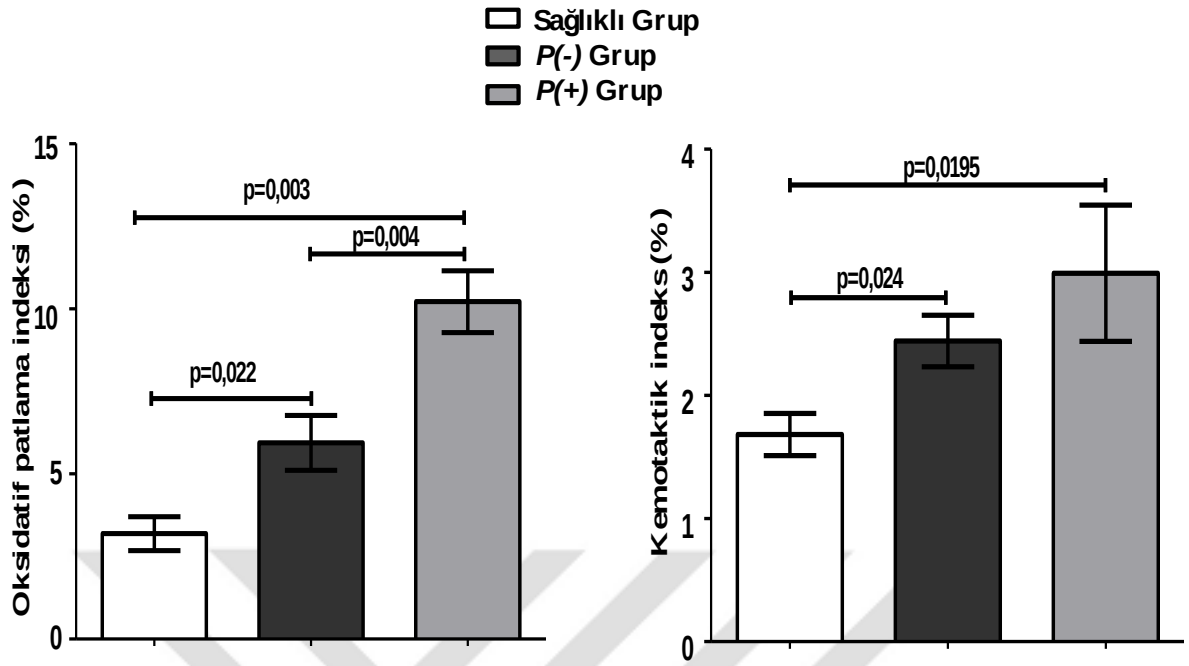
$P(+)$ ve $P(-)$ kistik fibrozis hasta gruplarında *Escherichia coli* bakterisine karşı oluşan fagositoz indeks değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır ($p=0,011$ ve $p=0,021$ sırasıyla). $P(+)$ ve $P(-)$ kistik fibrozis grupları arasında *Escherichia coli*'ye oluşturulan fagositoz fonksiyon indeksleri karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 9).

$P(+)$ hastaların *P. aeruginosa*'ya karşı oluşturdukları fagositoz indeksleri, $P(-)$ ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,005$ ve $p=0,001$ sırasıyla). Ayrıca $P(-)$ olan hastaların *P. aeruginosa* fagositoz indeks düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır ($p=0,023$) (Şekil 9).



Şekil 9. Nötrofillerde fagositoz fonksiyon indeksinin akan hücre ölçer analizi.

$P(+)$ hastaların oksidatif patlama indeksi, $P(-)$ ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek görülmüştür ($p=0,003$ ve $p=0,004$ sırasıyla) (Şekil 10). $P(-)$ hastaların oksidatif patlama indeksleri kontrol grubuna göre daha yüksek saptanmıştır ($p=0,022$). Kistik fibrozis hasta gruplarında kemotaksik indeks değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0195$ ve $p=0,024$ sırasıyla) (Şekil 10).



Şekil 10. Kontrol ve hasta gruplarında nötrofillerin oksidatif patlama ve kemotaktik indeks değerleri.

4.3. Nötrofillerde CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD62L ve CXCR2 Molekül Ekspresyonları

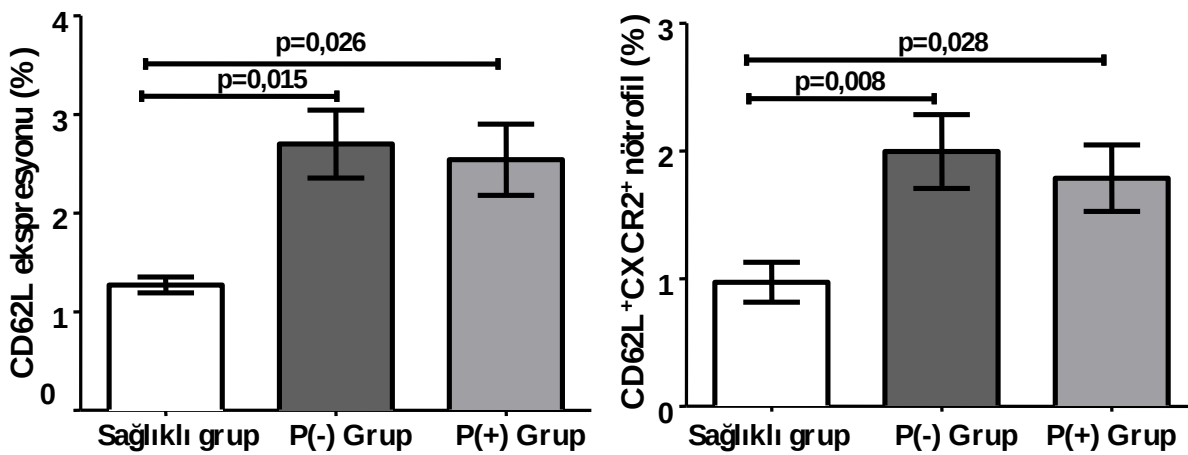
Hasta ve kontrol grubundan alınan heparinli kan örnekleri, anti human-CD11a-PE, anti human-CD11b-PE, anti human-CD11c-PE, anti human-CD18-FITC monoklonal antikoları ile boyanmış ve akan hücre ölçerde analiz edilmiştir. Nötrofil yüzeyinde CD11a, CD11b, CD11c, ve CD18 ekspresyon oranları fluoreсан şiddet değeri olarak (MFI) olarak analiz edilmiştir. Sonuçlarımıza göre, P(-) ve kontrol grubu P(+) gruba kıyasla, CD11b ($p=0,009$ ve $p=0,005$ sırasıyla), CD11c ($p=0,03$ ve $p=0,017$ sırasıyla), CD18 ($p=0,015$ ve $p=0,03$ sırasıyla) MFI değerleri açısından istatistiksel olarak yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 7).

Tablo 7. Kontrol ve hasta gruplarında nötrofil yüzey adezyon molekül ekspresyon analizleri.

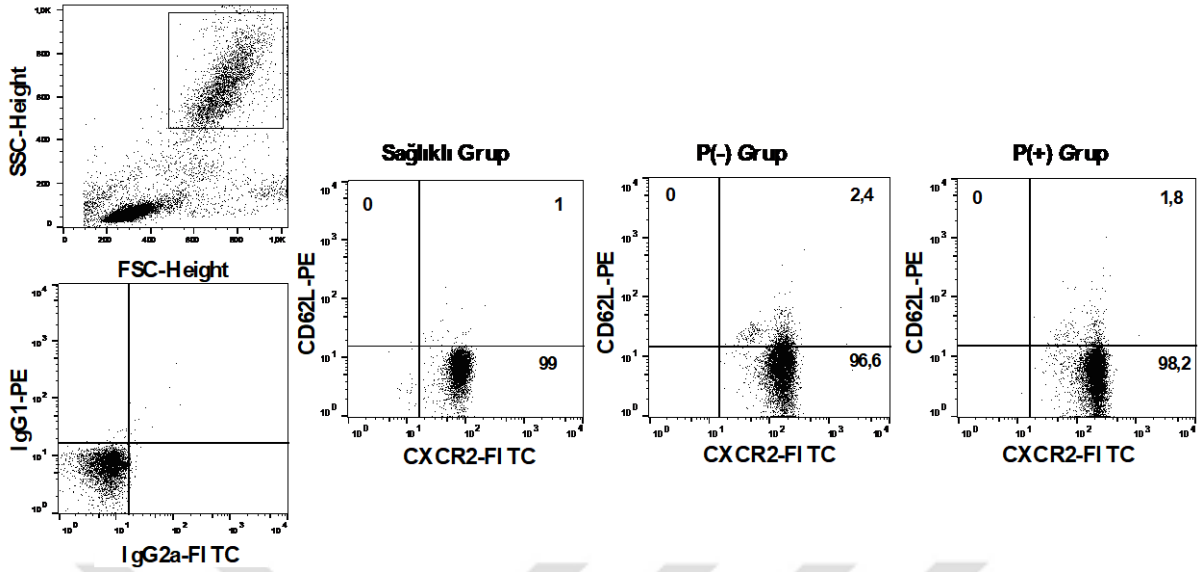
	<i>P(+)</i> Grup		<i>P(-)</i> Grup		<i>Kontrol Grubu</i>	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI
<i>CD11a</i>	99,8	258 (200-304)	99,7	276 (200-460)	99,6	291 (235-380)
<i>CD11b</i>	99,7	183,5 (111-472)	99,8	468 (330-900)*	98	451 (340-810)**
<i>CD11c</i>	98	53 (35-117)	99,5	105 (35-113)***	99	98 (43-135)****
<i>CD18</i>	98	39 (33-70)	99	75 (32-149)*****	98	73,5 (49-135)***

(* p=0,009 ve ** p=0,005, *** p=0,03 ve **** p=0,017, ***** p=0,015 ve *** p=0,03)

Gruplar arasında CD62L ve CXCR2 ekspresyonları incelendiğinde, *P(-)* ve *P(+)* hasta grubunda CD62L⁺ (p=0,015 ve p=0,026 sırasıyla) ve CXCR2⁺CD62L⁺ (p=0,008 ve p=0,028, sırasıyla) yüzdelерinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11, Şekil 12).



Şekil 11. *P(+)*, *P(-)* ve sağlıklı kontrollerde nötrofillerde CD62L ve CXCR2 ekspresyon oranları.

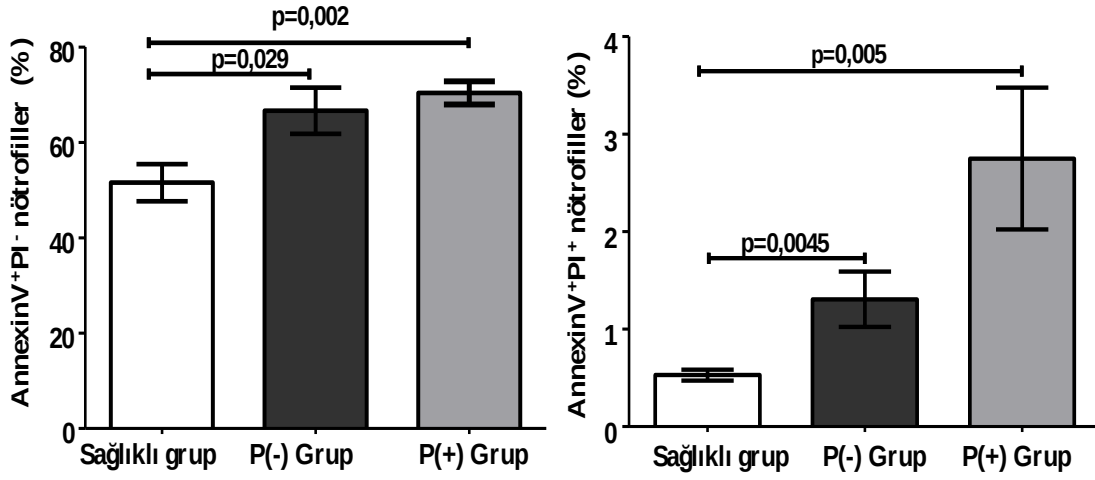


Şekil 12. *P*(+), *P*(-) ve sağlıklı kontrollerde nötrofillerde yüzey CD62L ve CXCR2 ekspresyon analiz akan hücre ölçer görüntüleri.

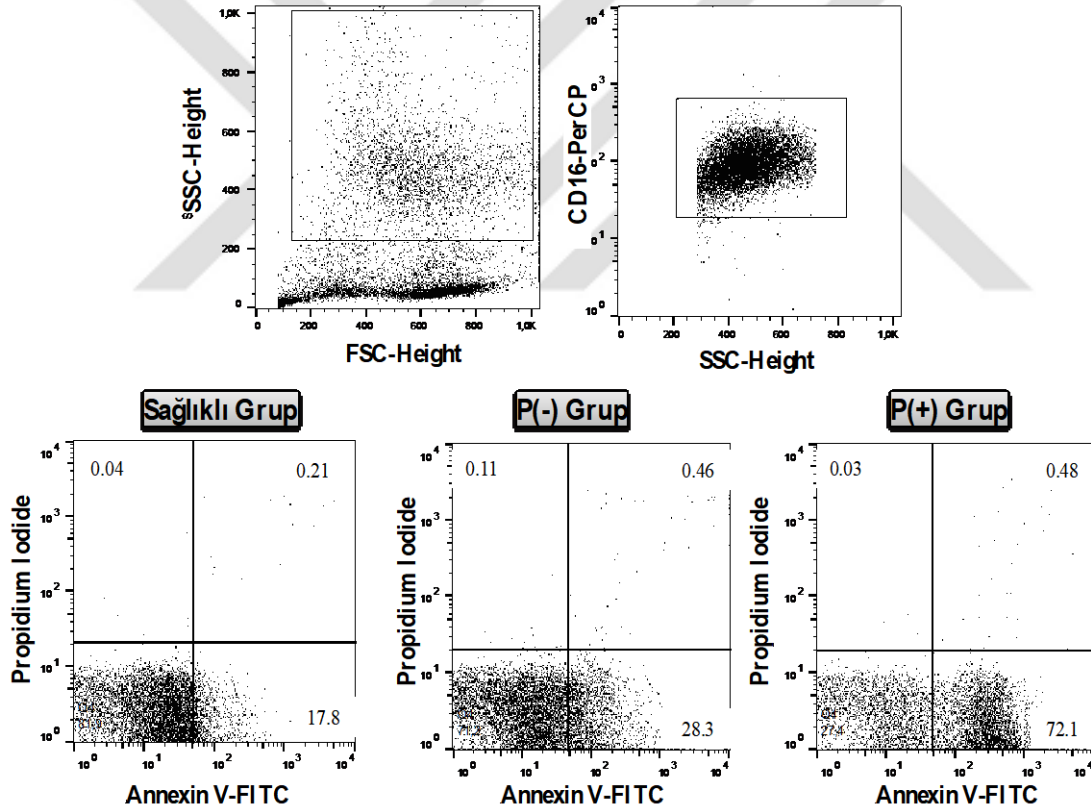
4.4. Nötrofillerde Apoptotik İndeksin Değerlendirilmesi

Apoptozisin erken safhasında hücreler membran asimetrisini kaybetmeye başlamakta ve fosfatidilserin plazma membranının dışında belirlemektedir. Deneylerimizde kullanılan kalsiyuma bağımlı fosfolipit bağlayıcı olan Annexin V fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlanmakta ve böylelikle akan hücre ölçer cihazında Annexin V antikor ve PI kullanılarak apoptotik hücre oranı belirlenebilmektedir. Böylece nötrofillerde PI ve Annexin V ile boyanmayan hücreler canlı, sadece Annexin V ile boyananlar erken faz apoptozisi, Annexin V ve PI ile boyanan hücreler apoptozisin son aşamalarını sadece PI pozitif olan hücreler ölü hücreleri temsil etmektedir.

Analiz sonuçlarımıza göre *P*(+) ve *P*(-) hastalarda erken apoptotik ($p=0,002$ ve $p=0,029$ sırasıyla) ve geç apoptotik ($p=0,005$ ve $p=0,0045$ sırasıyla) nötrofil oranları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. *P*(+) ve *P*(-) hasta grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan bir fark görülmemiştir (Şekil 13, Şekil 14).



Şekil 13. Çalışma gruplarında erken ve geç apoptotik nötrofil oranlarının belirlenmesi.



Şekil 14. Hasta ve sağlıklı gruplarda akan hücre ölçer analizi ile nötrofillerde apoptotik indeks dot plot görüntüleri.

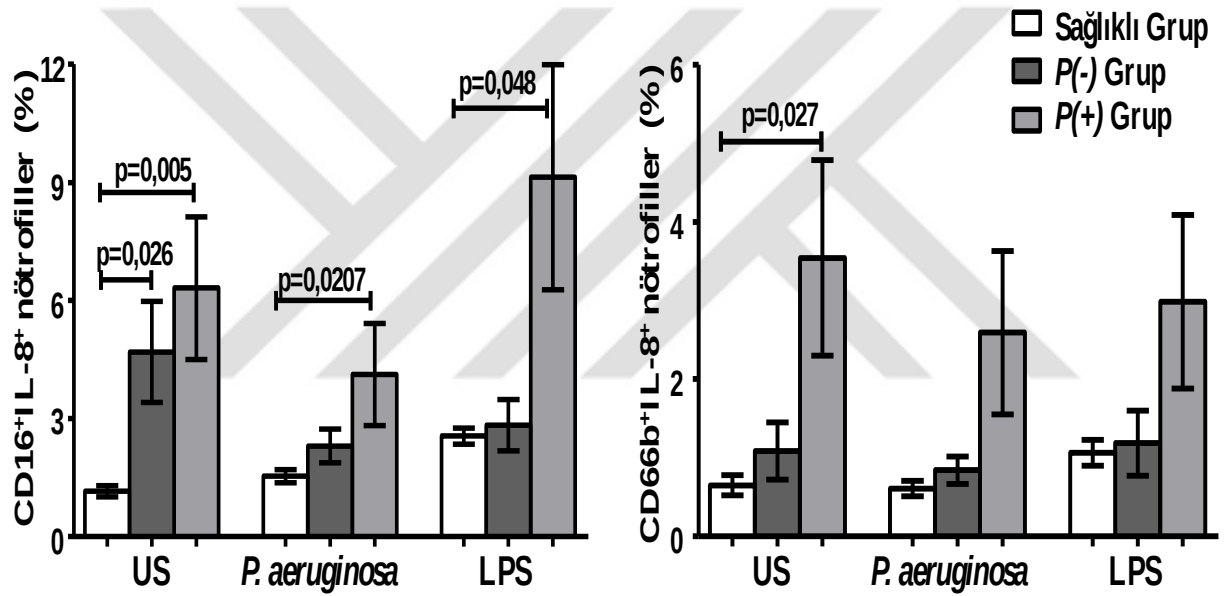
4.5. Nötrofillerde Hücre İçi IL-8 Salınımının Tayini

Uyarımsız koşullarda, P(+) ve P(-) hasta gruplarında CD16⁺IL-8⁺ nötrofil yüzdelерinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0,005 ve p=0,026, sırasıyla). Aktive

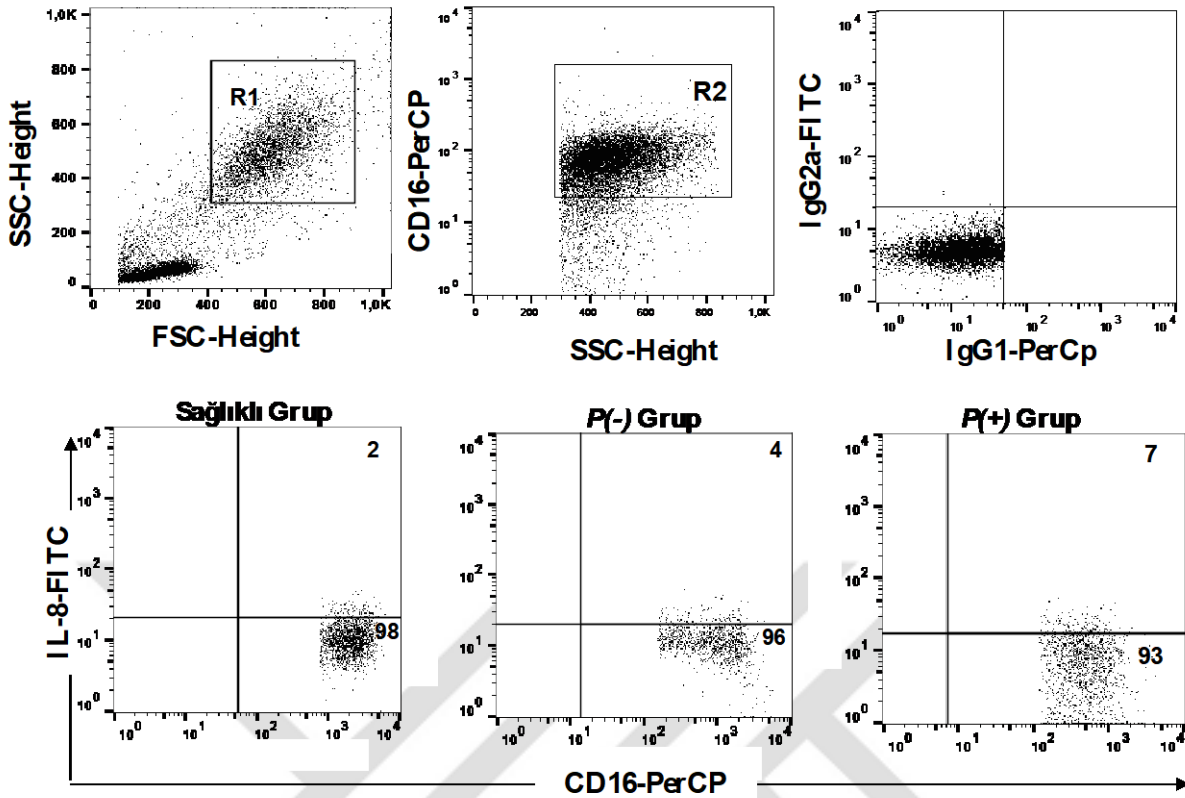
olmuş $CD66b^+IL8^+$ eksprese eden nötrofil yüzdelерinde ise $P(+)$ hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış tespit edilmiştir ($p=0,027$).

İnaktif formdaki *P. aeruginosa* bakteri suşu ile uyandırılan koşullarda, $P(+)$ hastaların $CD16^+IL8^+$ seviyesi kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülürken ($p=0,0207$), aktive olmuş $CD66b^+ IL8^+$ eksprese eden nötrofillerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

LPS uyarımı yapılan koşullarda, $P(+)$ hastaların $CD16^+IL-8^+$ düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülürken ($p=0,048$), $CD66b^+$ nötrofillerde ise IL-8 salınım düzeyinde anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 15, Şekil 16).



Şekil 15. Deney gruplarında uyarımsız, *P. aeruginosa* ve LPS uyarımı sonrası nötrofillerde hücre içi IL-8 ekspresyonunun tayini.

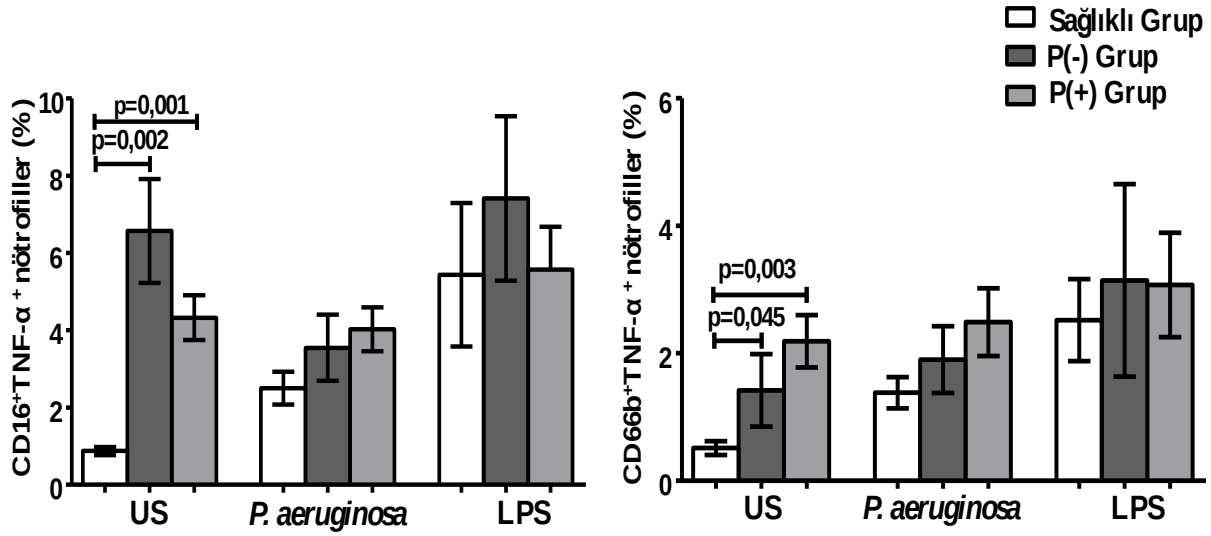


Şekil 16. Nötrofillerde hücre içi IL-8 salınımının akan hücre ölçer dot plot görüntüleri. Kistik fibrozis hasta grupları ve sağlıklı bireyde uyarımsız, bakteri ve LPS uyarımlı tam kan kültür deneyleri sonrası hücre içi CD16⁺IL-8⁺ hücre oranları akan hücre ölçerde analiz edilmiştir. Şekilde her bir gruptan tek kişinin uyarımsız şartlarda IL-8 salgılayan nötrofillerin dot plot histogram görüntüsü görülmektedir.

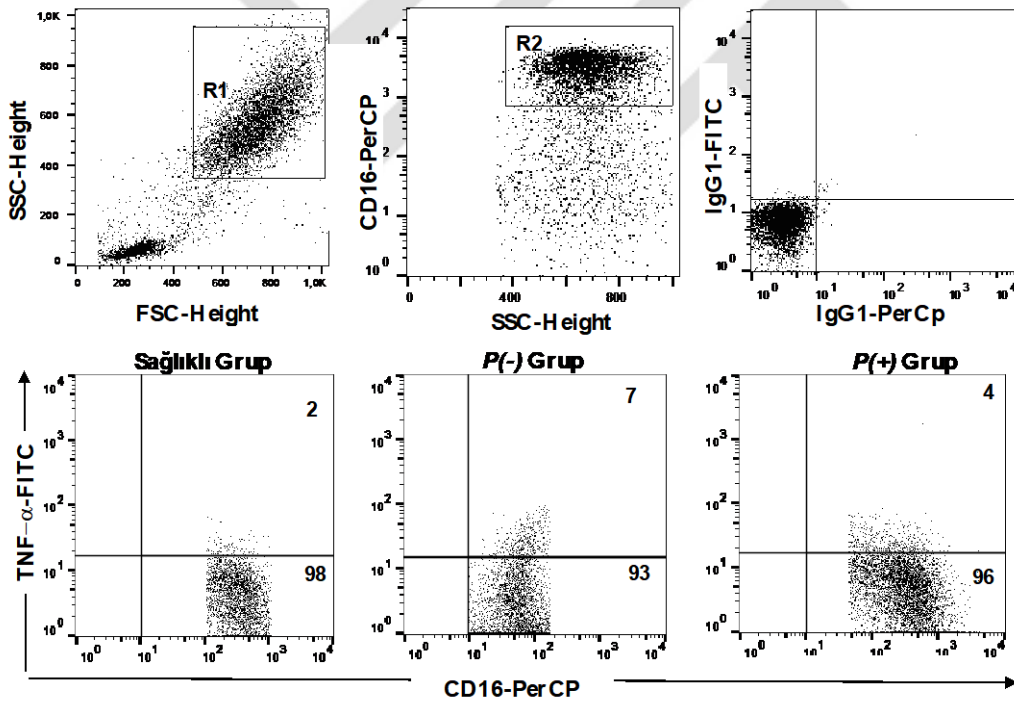
4.6. Nötrofillerde Hücre İçi TNF- α Salınımının Belirlenmesi

Uyarımsız koşullarda, P(+) ve P(-) hastaların CD16⁺TNF- α ⁺ salınım seviyelerinin kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu görülürken (p=0,001 ve p=0,002 sırasıyla) inaktif formdaki *P. aeruginosa* bakteri suşu ve LPS uyarımlı koşullarda ise CD16⁺TNF- α ⁺ salınım seviyelerinde anlamlı bir değişkenlik görülmemiştir (Şekil 17 ve 18).

Aktive olmuş CD66b⁺ nötrofillerde TNF- α seviyesinin uyarımsız koşullarda, P(+) ve P(-) hasta gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür (p=0,003 ve p=0,045 sırasıyla). CD16⁺CD66b⁺TNF- α ⁺ nötrofil oranlarında ise *P. aeruginosa* ve LPS uyarımı gruplar arasında anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır (Şekil 17).



Şekil 17. Hasta ve kontrol grubunda stimülasyonsuz, *P. aeruginosa* ve LPS stimülasyonu sonrası nötrofillerde TNF- α salınımının tayini.

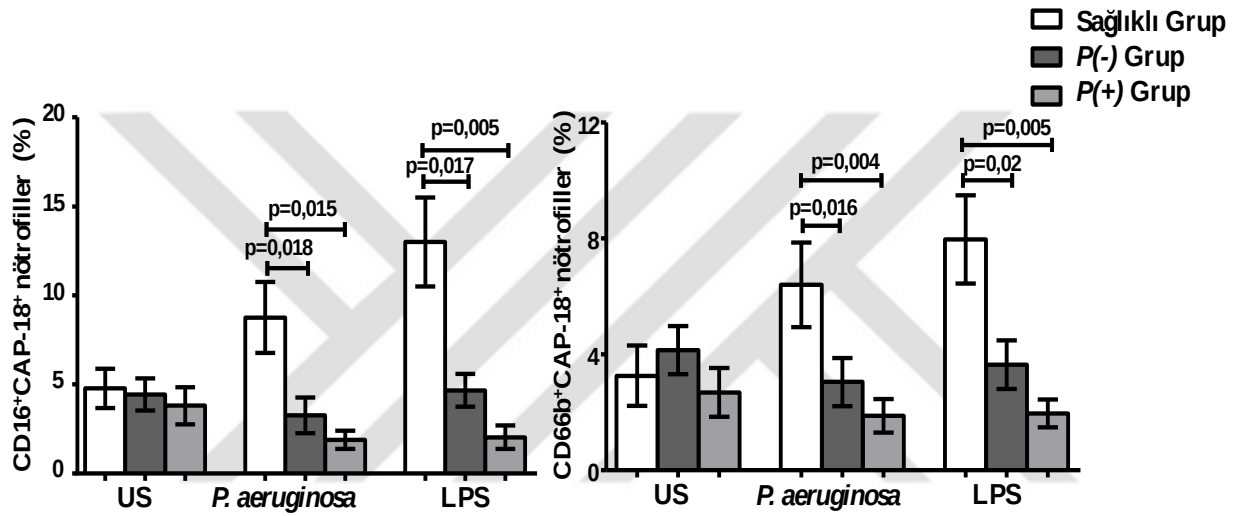


Şekil 18. Nötrofillerde hücre içi TNF- α salınımının akan hücre ölçer analiz görüntüleri.

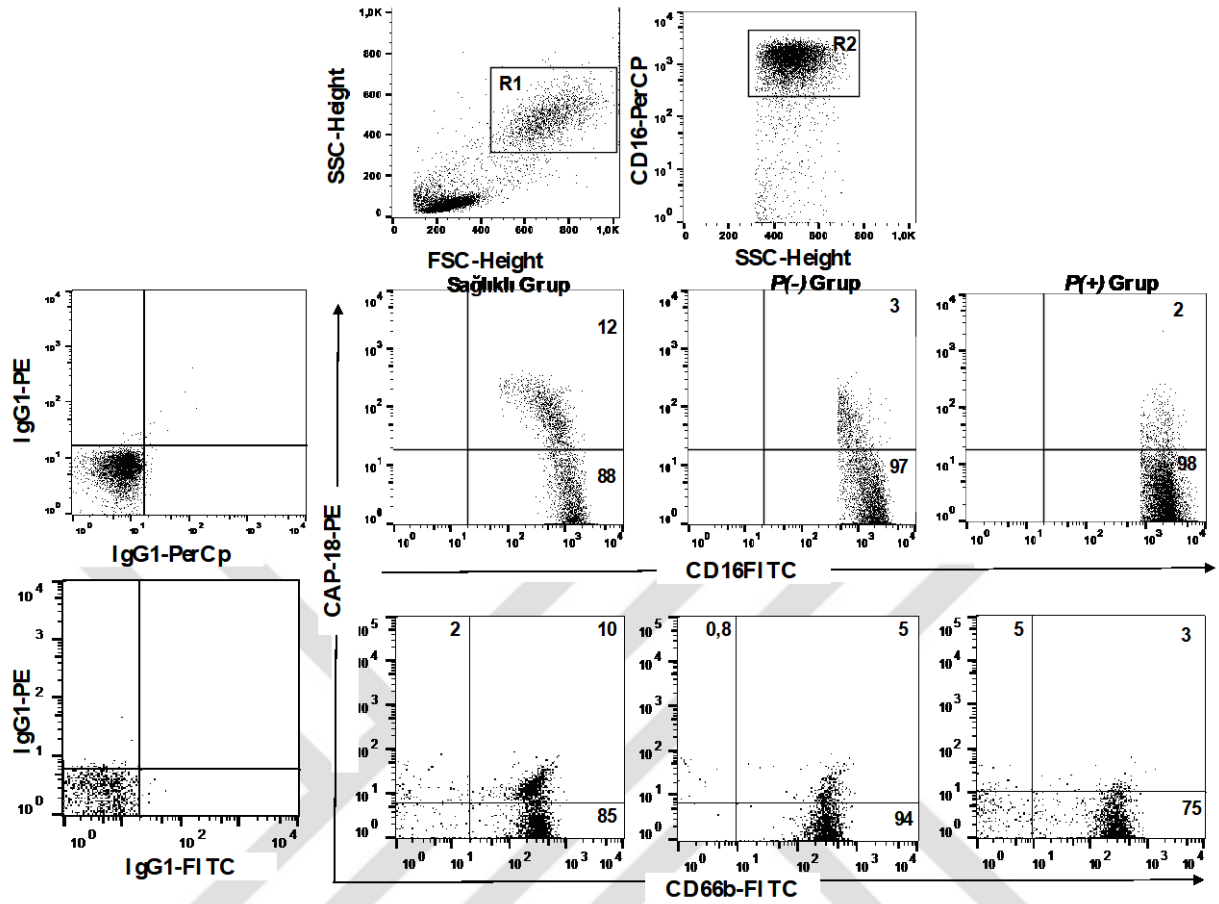
Kistik fibrozis hasta grupları ve sağlıklı bireyde farklı uyarılarla yapılan tam kan kültür aşamaları sonrası CD16⁺TNF- α ⁺ ve CD16⁺ CD66b⁺TNF- α ⁺ nötrofil yüzdeleri akan hücre ölçerde tespit edilmiştir. Yukarıda sağlıklı, P(+) ve P(-) grubundan temsili olarak tek bir hastada uyarımsız kültür şartında tespit edilen CD16⁺TNF- α ⁺ dot plot analiz görüntüleri görülmektedir.

4.7. Nötrofillerde Hücre İçi CAP-18 Ekspresyonunun Belirlenmesi

İnaktif formdaki *P. aeruginosa* bakteri suşu ile uyarım yapılan koşullarda *P*(+) ve *P*(-) kistik fibrozisli hastalarda kontrol grubuna göre $CD16^+CAP-18^+$ ($p=0,015$ ve $p=0,018$ sırasıyla) ve aktive olmuş $CD66b^+CAP-18^+$ nötrofil ($p=0,004$ ve $p=0,016$ sırasıyla) yüzdelерinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Bu bulgulara benzer şekilde LPS uyarımı yapılan koşullarda, *P*(+) ve *P*(-) hasta grubunda hem $CD16^+CAP-18^+$ ($p=0,005$ ve $p=0,017$ sırasıyla) hem de $CD16^+CD66b^+CAP-18^+$ oranlarının ($p=0,005$ ve $p=0,02$ sırasıyla) kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 19, Şekil 20).



Şekil 19. Deney gruplarında uyarımsız, *P. Aeruginosa* ve LPS uyarımı sonrası nötrofillerde hücre içi CAP-18 salınımının tayini.



Şekil 20. Nötrofillerde hücre içi CAP-18 salınımının akan hücre ölçer analiz görüntüleri. Sağlıklı bireyler ve kistik fibrozis hasta gruplarından temin edilen ve farklı uyarımlarla yapılan tam kan kültür aşaması sonrası $CD16^+CAP-18^+$ ve $CD16^+CAP-18^+TNF-\alpha^+$ nötrofil yüzdeleri akan hücre ölçerde tespit edilmiştir. Yukarıda sağlıklı, $P(+)$ ve $P(-)$ grubundan temsili olarak tek bir hastada LPS uyarımlı kültür şartlarında tespit edilen $CD16^+CAP-18^+$ ve $CD16^+CAP-18^+TNF-\alpha^{++}$ dot plot analiz görüntüleri görülmektedir.

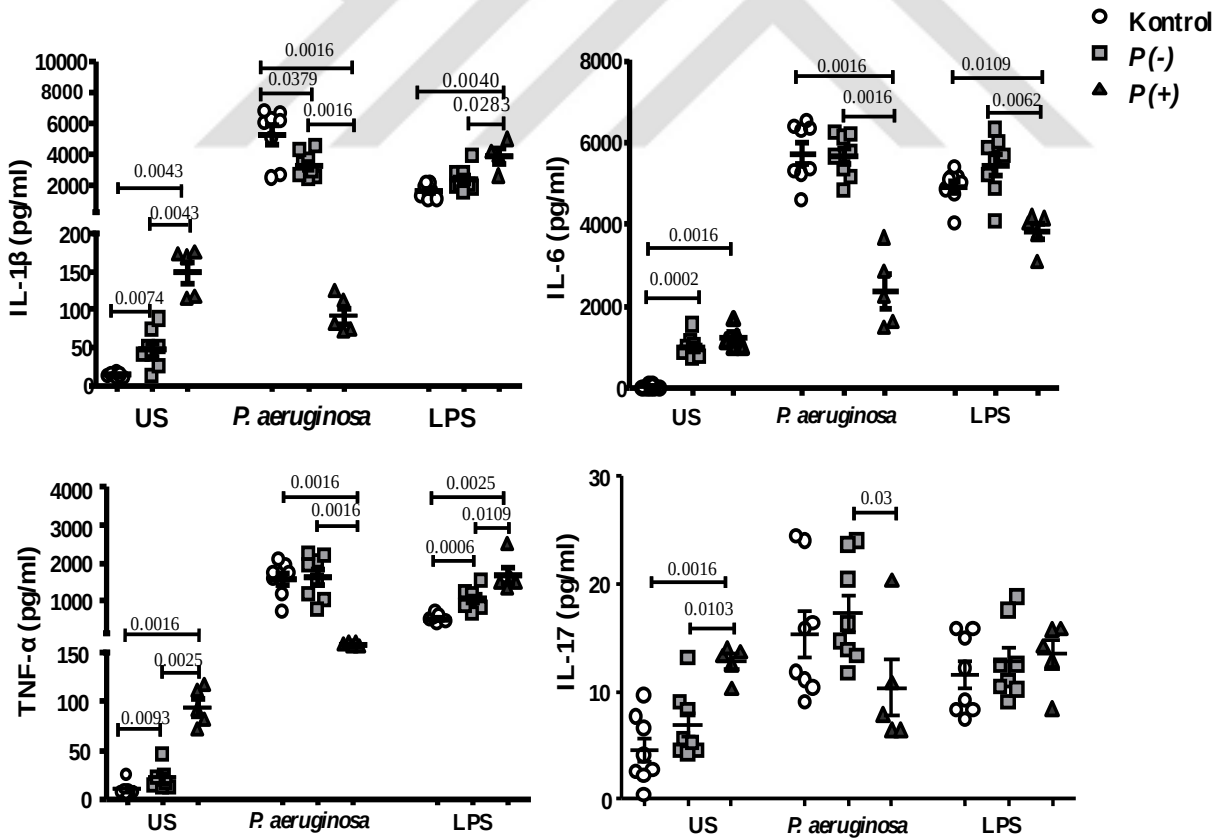
4.8. *P. aeruginosa* ve LPS Uyarımlı Kültür Üst Sıvılarında IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 Düzeylerinin Belirlenmesi

Hasta ve sağlıklı gruptan temin edilen tam kan örneklerinin stimulasjonsuz, *P. aeruginosa* ve LPS'li şartlarda tam kan kültürleri yapılmış, inkübasyon sonrası toplanan kültür üst sıvılarında LUMINEX yöntemiyle IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 düzeylerine bakılmıştır. Uyarımsız koşullarda toplanan kültür üst sıvılarında IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 seviyeleri karşılaştırıldığında, $P(+)$ hasta grubunun IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 salınım miktarlarının $P(-)$ ($p=0,0043$, $p=0,0025$ ve $0,0101$, sırasıyla), ve kontrol grubuna ($p=0,0043$, $p=0,0016$,

$p=0,0016$ ve $p=0,0016$, sırasıyla) oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca $P(-)$ hasta grubunda salgılanan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyesinin kontrole kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür ($p=0,0074$, $p=0,0002$ ve $0,0093$, sırasıyla) (Şekil 21).

Bakteri uyarımı sonrası IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 düzeylerinin $P(+)$ hastalarda, $P(-)$ ($p=0,0016$, $p=0,0016$, $p=0,0016$ ve $p=0,03$, sırasıyla) ve kontrol gruplarına ($p=0,0016$, $p=0,0016$ ve $p=0,0016$, sırasıyla) oranla anlamlı bir biçimde düştüğü görülmüştür. Buna ek olarak kontrol grubunun IL-1 β seviyesi $P(-)$ hasta grubunun IL-1 β seviyesine göre daha yüksek salgılandığı görülmüştür ($p=0,0379$) (Şekil 21).

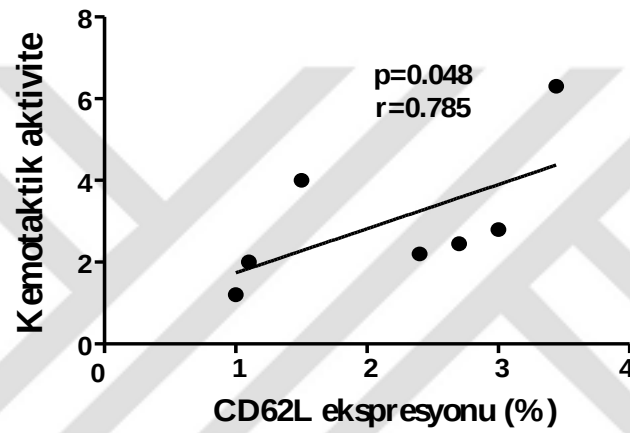
LPS uyarımı sonrasında karşılaştırıldığında ise, $P(+)$ hasta grubunda IL-1 β ve TNF- α sitokin seviyeleri $P(-)$ ($p=0,0283$ ve $p=0,0109$ sırasıyla) ve kontrol grubuna ($p=0,004$ ve $p=0,0025$, sırasıyla) oranla daha yüksek görülürken, IL-6 sitokin düzeyinin ise $P(-)$ ($p=0,0062$) ve kontrol grubuna ($p=0,0019$) oranla daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 21).



Şekil 21. Kistik fibrozis ve sağlıklılarda *P.aeruginosa* ve LPS tam kan kültür aşamaları sonrası kültür üst sıvısında saptanan IL-1 β , IL-6, IL-17 ve TNF- α düzeyleri.

4.9. *P*(+) ve *P*(-) Hasta Gruplarında Nötrofillerde CD62L Ekspresyonu ve Kemotaktik Aktivite Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

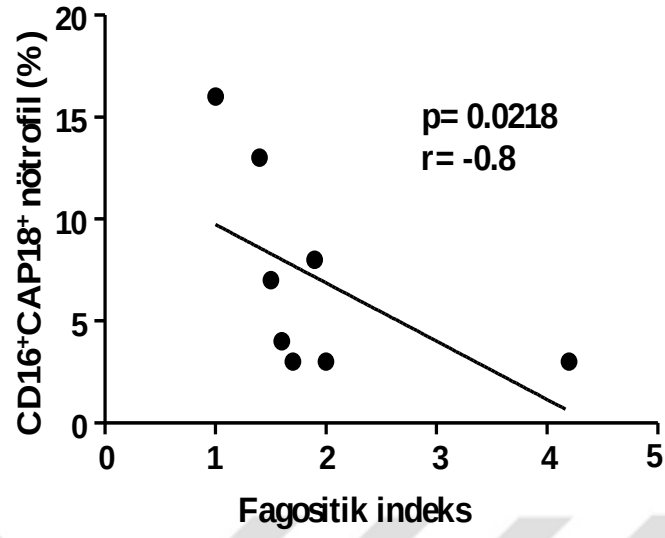
Gruplar arasında yaptığımız analizler sonrası *P*(-) ve *P*(+) hasta grubunda nötrofil adezyonunda önemli rolü bulunan CD62L ekspresyonu ($p=0,015$ ve $p=0,026$, sırasıyla) yüksek saptanmış ve kistik fibroziste CD62L yüksekliğinin kemotaktik aktivite ile ilişkisi olup olmadığı Spearman korelasyon testi ile değerlendirilmiştir. *P*(-) hasta grubunda anlamlı bir korelasyon saptanmamasına rağmen, *P*(+) hastalarda CD62L ekspresyonu ile kemotaktik aktivite arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p=0,048$, $r=0,785$) (Şekil 22).



Şekil 22. *P*(+) hasta grubunda nötrofil CD62L ekspresyonu ve kemotaktik indeks arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.

4.9. Kistik Fibrozis Hastalarında LPS Uyarımı Sonrası Fagositik Aktivite ve CAP-18 Salınımı Arasındaki Korelasyonunun Değerlendirilmesi

Gruplar arası yapılan analizler sonrası *P*(-) ve *P*(+) hasta gruplarında nötrofil fagositozunda rolü bulunan hücre içi CAP-18 düzeylerinin düşük olması ve aynı zamanda hasta gruplarında fagositik aktivitenin yüksek olması aralarında bir ilişki olmayacağı sorusunu beraberinde getirmiştir. Buna göre yaptığımız Spearman korelasyon testi ile LPS uyarımı sonrasında *P*(-) hastalarda nötrofillerde *E. Coli*'ye karşı oluşan fagositik aktivite ve CAP-18 sekresyonu arasında negatif korelasyon bulunurken, *P*(+) hasta grubunda herhangi bir korelasyon bulunmamıştır. ($p=0,0218$ $r=-0,8$) (Şekil 23). Bakteri uyarımının nötrofillerde CAP-18 salınımı ve kemotaktik aktiviteye olan ilişkisi *P*(+) hasta ve sağlıklı grupta analiz edildiğinde herhangi bir korelasyon tespit edilmemiştir.



Şekil 23. *P*(-) kistik fibrozisli hasta grubunda nötrofillerden CAP-18 salınımı ve *E.coli*'ye karşı oluşan fagositoz indeks arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi.

5. TARTIŞMA

KFTR proteini kodlayan genler çeşitli mutasyonlar sonucunda yapı olarak değişmektedir. Bu yapısal değişiklikler *Cl* kanalının işlevini tam yerine getirememesine neden olmakta ve bunun sonucunda başta epitel hücreleri olmak üzere birçok hücre alt gruplarında ve hücresel işlevlerde anormallikler oluşturmaktadır [1, 2]. Özellikle akciğer bronşlarında hücresel fonksiyonların bozulmasıyla dokuda bir takım değişiklikler meydana gelmekte ve bu alanlarda çeşitli bakteriler tarafından oluşturulan enflamasyon alanlarında yoğun nötrofil birikimi görülmektedir. Kistik fibrozis hastalarında nötrofil fonksiyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda granüler enzim aktivitesi ve reaktif oksijen ürünlerinin artışı ile birlikte nötrofillerin apoptoza gitmeyip nekrozla ölmeleri sonucunda hava yollarında DNA birikimi olduğu gösterilmiştir [66].

Çalışmamızda kistik fibrozis hastalarında nötrofillerin erken ve geç apoptotik indeksleri değerlendirildiğinde *P*(+) ve *P*(-) kistik fibrozis hasta gruplarında erken ve geç apoptozis oranlarının sağlıklı bireylere oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Enfeksiyon süresince birçok bakteriyel patojene karşı oluşan immün yanıtta farklı hücrelerde Fas ligand (FasL) ve TNF- α reseptör ekspresyon artışının nötrofilleri apoptoza götürdüğü gösterilmiştir [137]. Verilerimiz kistik fibroziste meydana gelen KFTR mutasyonu sonucunda oluşan *Cl* iyon kanallarındaki işlevsel değişikliklerin nötrofillerin hücre siklusunu değiştirebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular kistik fibrozisli hasta alt gruplarında nötrofil yaşam döngüsündeki değişikliklerin ve artmış nötrofil fonksiyonlarının apoptotik sürece etki ederek nötrofillerin yaşam sürelerini kısaltabileceği yönündedir. Poliklinik değerlendirmede, kistik fibrozisli çocuk hastaların hipoksemileri olmamasına rağmen, nokturnal hipoksemi varlığının rutin tetkiklerde değerlendirilememesi nötrofillerde tespit edilen apoptoza yatkınlıkta olası bir nokturnal hipokseminin etkili olup olmadığını açıklayamamaktadır. Bu bağlamda hastalarda nokturnal hipoksemi ve artmış apoptotik indeks ilişkisi ile ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür. Ancak, gerek kistik fibroziste enflamasyon bölgesinde yapılan araştırmalar [68], gerekse periferik kanda tespit ettiğimiz bulgular nötrofil yaşam döngüsünün farklılaştığı yönündedir.

Sağlıklı ve kistik fibrozis hastalarının nötrofil fonksiyonlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda, kistik fibroziste KFTR fonksiyonundaki bozukluk nedeniyle hava yolu yüzeyinde mukus yapısının değiştiği ve nötrofillerde enzim aktivitesinin ve reaktif oksijen ürün sentezinin

arttığı gözlemlenmiştir. Kistik fibroziste enfeksiyon yokluğunda bile bronkoalveoler lavaj sıvısında IL-8 düzeylerinin arttığı ve bununla ilişkili olarak dokuya göç eden nötrofillerin sağlıklı bireylere göre apoptotik indekslerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu hastaların nötrofillerinde görülen bu değişiklikler oksidatif patlama, fagositik kapasite ve kemotaktik aktivitelerini de etkilemektedir [68]. Elde ettiğimiz veriler sonucunda, $P(+)$ ve $P(-)$ hastalarda nötrofillerde *E. Coli*'ye karşı oluşturulan fagositik aktivite, oksidatif patlama ve kemotaktik indeks değerlerinin sağlıklılara oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. *P. aeruginosa* bakterisine karşı oluşturulan fagositik aktivite değerlendirildiğinde, $P(+)$ olan hastalarda fagositik kapasitenin $P(-)$ ve sağlıklı gruba göre, $P(-)$ grubunda ise sağlıklı çocuklara göre artmış olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız, hastalarda nötrofil fagositoz ve oksidatif patlama kapasitelerinin periferik kanda yüksek saptanmasına rağmen, akciğer bronşlarında kolonize olmuş bakterileri ortadan kaldırmada yetersiz olduğu yönündedir. Nötrofiller tarafından oksidatif patlama ile ortama salınan serbest radikallerin bronşlarda epitel ve yapısal hasarlara sebep olarak nötrofillerin hücre siklusunu etkilediği tahmin edilmektedir [138]. Çalışmamızda özellikle $P(+)$ hastalarda erken/geç apoptozis oranları ve oksidatif patlama indeksinin yüksek olması, serbest oksijen radikallerinin aşırı salgılanmasının nötrofil yaşam döngüsüne etki ettiğini doğrulamakta ve bu durum enfeksiyonun sistemik etkisini göstermektedir.

IL-1, TNF- α ve IL-8 gibi sitokinlerin varlığında endotelial hücrelerin aktive olduğu ve bunun sonucunda L-selektin ligand ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Endotel hücre yüzeyi üzerinde L-selektin ligand ekspresyonunun artması beraberinde nötrofil yüzeylerinde bulunan CD62L (L-selektin) uyarımını arttırmakta ve bu sayede nötrofiller endotele yapışarak enflamasyon alanına göç etmektedir [46]. Nötrofillerin bronş epitelinde birikmesinde IL-8, TNF- α ve IL-17 gibi sitokinler önemli rol oynamaktadır. Analizlerimiz nötrofil adezyonunda rol oynayan CD62L⁺ ve CD62L⁺CXCR2⁺ yüzey ekspresyon düzeyleri ile birlikte nötrofil kemotaksi indeksinin de kistik fibrozis hastalarında yüksek olduğunu göstermiştir. Elde ettiğimiz veriler kistik fibrozis hastalarında nötrofillerin akciğere kemotaktik kapasiteleri ve endotele adezyonlarının sağlıklılara göre artmış olduğunu ve bu hastaların akciğer bronşlarına nötrofil göçünde CD62L ve CXCR2'nin rol oynayabileceğini göstermektedir. Kemotaktik indeksin nötrofillerde hücre içi TNF- α ⁺ salınımı ve CD62L ekspresyonu ile pozitif korelasyon göstermesi bu verilerimizi desteklemektedir. Özetle bulgularımız kistik fibrozis hasta grubunda nötrofil adezyonu ve kemotaksi değerlerinin yüksek olmasının, hastaların bronşlarında yoğun nötrofil birikimine sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Kistik fibrozis hastalarında yapılan bazı çalışmalarda, akciğer bronş epitel hücrelerinden IL-6, IL-8 ve TNF- α 'nın yüksek düzeylerde salgılandığı gösterilmiştir [139, 140]. Bakteri enfeksiyonu sonucu oluşan yoğun nötrofil göçü beraberinde serbest oksijen radikallerin artmasına neden olmakta ve bu durum aynı zamanda akciğer bronş epitellerinde oksidatif stresi de arttırmaktadır [37-39, 41]. KFTR mutasyonu sonucu NF-kB sinyal yolağı devamlı aktif kaldığından dolayı akciğer bronş epitellerinde yoğun miktarda IL-8, TNF, IL-6 üretimi gerçekleşmekle birlikte IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokin düzeylerinin azaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [13]. Çalışmamızda ise kültür sonrası uyarımsız koşullarda, *P*(+) ve *P*(-) hastalarda hücre içi IL-8 ve TNF- α salınım seviyelerinin hem total hem de aktive fenotipteki CD66b eksprese eden nötrofillerde sağlıklı çocuklara oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *P*(+) hastalarda bakteri ve LPS uyarımı sonrası CD16⁺IL-8⁺ nötrofil oranlarını sağlıklılara göre artmıştır. Yaptığımız analizlerde nötrofillerde IL-8 reseptörü olan CXCR2 ekspresyonlarının hasta gruplarında yüksek olduğunu saptanmıştır. Bakteri ve LPS uyarımı sonrası özellikle CD16⁺CD66b⁺IL-8⁺ ve CD16⁺CD66b⁺TNF- α ⁺ nötrofil yüzdelerinin hastalarda daha da arttığı ancak bu artışın istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmadığı görülmektedir. Bu durumun çalışmamıza dahil ettiğimiz olgu sayısındaki kısıtlılığın neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Uyarımsız, *P. aeruginosa* ve LPS stimülasyonu sonrasında kültür üst sıvılarında, IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 düzeyleri karşılaştırıldığında, *P*(+) ve *P*(-) hasta gruplarında spontan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda da bazı pro-enflamatuvar sitokinlerin enfeksiyona bağlı olmaksızın kistik fibrozisli hastalarda daha yüksek oranda salgılandığı görülmektedir [14-15]. Bunun aksine *P. aeruginosa* uyarımı sonrası IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 düzeylerinin özellikle *P*(+) hastalarda, *P*(-) ve kontrol gruplarına oranla daha düşük olduğu görülmüştür. Bulgularımız *P. aeruginosa* kolonizasyonunun pro-enflamatuvar sitokinler olan IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17 düzeylerini kistik fibrozis hastalarında baskıladığını düşündürmektedir.

Kistik fibrozisli hastalardan alınan bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında antibakteriyal aktivitenin azaldığı gözlemlenmiş ve bu durumun kısmen sıvıdaki yüksek tuz konsantrasyonundan dolayı olduğu düşünülmüştür [134]. Enfeksiyon sırasında kistik fibrozisli hastaların BAL sıvısında bulunan katepsinlerin, insan β -defensinleri (hBD) proteolitik olarak parçalayarak hBD aktivitesini bozduğu ve buna ilaveten, *B. cenocepacia* gibi bazı bakteri lipopolisakkaritlerinin bu bakterileri antimikrobiyal peptidlere dirençli hale getirdiği

bilinmektedir [135, 136]. Bu nedenle kistik fibroziste hBD'lerin üretim ve aktivitelerinde bozukluk meydana gelmekte ve bunun sonucu olarak yıkım hızlanarak antimikrobiyal aktivitede azalma gözlenmektedir. Nötrofillerden salgılanan serin proteazlardan elastaz, doğal antimikrobiyal defansı azaltmakta ve nötrofil elastazların dolaylı yoldan doğal savunma sistemini devre dışı bırakarak *P. aeruginosa* enfeksiyonun şiddetini arttırmaktadır [71]. Yapılan başka bir çalışmada nötrofillerden salgılanan insan nötrofil peptidlerinin (HNP) makrofaj fagositozunu artırıp pro-enflamatuvar sitokin üretimini azalttığı gösterilmiştir [141]. Bu nedenle enfeksiyon sırasında özellikle kistik fibrozis hastalarının antimikrobiyal peptid salınımlarının önemli bir detay olduğu görülmektedir. Çalışmamızda nötrofillerden hücre içi CAP-18 ekspresyonu incelendiğinde, hem tüm nötrofiller hem de CD66b eksprese eden aktive olmuş nötrofillerde *P. aeruginosa* ve LPS uyarımı sonrasında CAP-18 oranı her iki hasta grubunda sağlıklılara göre düşük olduğu tespit edilmiştir. LPS uyarımı sonrasında *P(-)* hastalarda nötrofillerde *E. Coli*'ye karşı oluşan fagositik aktivite ve CAP-18 sekresyonu arasında negatif korelasyon da saptanmıştır. D vitamininin etkisiyle uyarılabilen ve antimikrobiyal bir peptid olan CAP-18 doğal immün sistem hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Kistik fibrozis hasta gruplarımızda vitamin D düzeyleri normal seyretmesine rağmen nötrofillerde CAP-18 sekresyonunda düşüş saptanmış ve bu durumun doğal immün sistemin bir defekti sonucu oluşabileceği düşünülmüştür.

Kistik fibrozis *P(-)* ve *P(+)* hasta gruplarında nötrofillerde erken ve geç apoptoz indekslerinin yüksek olması KFTR mutasyonunun nötrofillerin yaşam döngüsünü etkilediğini ve artmış nötrofil fonksiyonlarının da nötrofillerin yaşam süresini kısaltabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte nötrofil yaşam döngüsündeki değişimler *in vitro* şartlarda nötrofillerin fagositoz, oksidatif patlama ve kemotaktik aktivitesini baskılamamaktadır. Ayrıca kistik fibrozisli hasta nötrofillerinde görülen artmış oksidatif patlama indeksi sonucunda ortama fazla miktarda serbest oksijen radikalleri salgılanmakta ve buna paralel şekilde doku hasarı artmaktadır. Bakteri kolonizasyonunun ortadan kaldırılamamasının nötrofillerde fonksiyon yetersizliğinden ziyade mikro çevre şartlarının değişimiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bulgularımızın klinikle ilişkilendirilmesi kistik fibrozisli hastalarımızın çoğunluğunun yaşlarının küçük olması nedeni ile solunum fonksiyon testlerinin yapılamamış olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca ülkemizde kistik fibrozis kliniğini ve immünitesini en çok genetik mutasyonlar etkilediği halde çalışmaya dahil ettiğimiz hastalarımızda genetik mutasyon çeşitliliğinin çok fazla olması alt grup analizleri yapmamızı imkansız hale getirmiştir. *P. aeruginosa* üremesi olmayan hasta grubu seçiminde henüz bakteri üremesi ve kolonizasyonu

bulunmayan hastalar seçildiğinden ve bu grup kistik fibrozis hasta grubunun azınlığını oluşturduğundan hasta sayımız sınırlı kalmıştır.

Kistik fibrozisli hasta alt gruplarında nötrofillerden IL-8 salınımına paralel olarak CD62L ve CXCR2 ekspresyonundaki artış hastalarda nötrofillerin kemotaksisinde bu moleküllerin rol oynayabileceğini göstermektedir. Hasta gruplarında saptanan yüksek IL-1 β , IL-6, IL-17 ve TNF- α plazma düzeylerindeki artış, bu hastalarda enflamatuvar yanıt ile birlikte artmış nötrofil fonksiyonları ve kemotaktik aktiviteleri arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte *P*(+) ve *P*(-) hasta gruplarında bakteri ve LPS uyarımı sonrası nötrofillerden salgılanan düşük hücre içi CAP-18 ekspresyonunun enfeksiyon sırasında nötrofillerde antimikrobiyal peptid salınım defekti oluşabileceğini ve bu durumun doğal ve edinsel immün yanıt arasındaki dengeyi değiştirerek kistik fibrozis patofizyolojisini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Gelecekte akciğer bronşlarından nötrofil izolasyonu yapılarak elde edilecek verilerin periferik kandaki nötrofil bulguları ile karşılaştırılması kistik fibrozis patogenezinde nötrofillerin rollerinin aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Gadsby, D.C., P. Vergani, and L. Csanady, *The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 477-83.
2. Le Drevo, M.A., et al., *Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(10): p. 605-14.
3. Romeo, G., M. Devoto, and L.J. Galletta, *Why is the cystic fibrosis gene so frequent?* Hum Genet, 1989. **84**(1): p. 1-5.
4. Beaudet, A.L., *Carrier screening for cystic fibrosis*. Am J Hum Genet, 1990. **47**(4): p. 603-5.
5. Dong, Q., C.O. Randak, and M.J. Welsh, *A mutation in CFTR modifies the effects of the adenylate kinase inhibitor Ap5A on channel gating*. Biophys J, 2008. **95**(11): p. 5178-85.
6. Leal, T., et al., *Airway ion transport impacts on disease presentation and severity in cystic fibrosis*. Clin Biochem, 2008. **41**(10-11): p. 764-72.
7. Michoud, M.C., et al., *Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance channel in human airway smooth muscle*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(2): p. 217-22.
8. Boucher, R.C., *Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy*. Annu Rev Med, 2007. **58**: p. 157-70.
9. Southern, K.W., *Cystic fibrosis and formes frustes of CFTR-related disease*. Respiration, 2007. **74**(3): p. 241-51.
10. Goss, C.H. and J.L. Burns, *Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis*. Thorax, 2007. **62**(4): p. 360-7.
11. Burgel, P.R. and J.A. Nadel, *Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases*. Eur Respir J, 2008. **32**(4): p. 1068-81.
12. Heijerman, H., *Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review*. J Cyst Fibros, 2005. **4 Suppl 2**: p. 3-5.
13. Machen, T.E., *Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory?* Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(2): p. C218-30.
14. Rao, S. and J. Grigg, *New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis*. Arch Dis Child, 2006. **91**(9): p. 786-8.
15. Chen, J., et al., *Dysfunction of Nrf-2 in CF epithelia leads to excess intracellular H₂O₂ and inflammatory cytokine production*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3367.
16. Dubin, P.J., F. McAllister, and J.K. Kolls, *Is cystic fibrosis a TH17 disease?* Inflamm Res, 2007. **56**(6): p. 221-7.
17. Bayes, H.K., et al., *T helper cell subsets specific for Pseudomonas aeruginosa in healthy individuals and patients with cystic fibrosis*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e90263.
18. Soferman, R., *Immunopathophysiologic mechanisms of cystic fibrosis lung disease*. Isr Med Assoc J, 2006. **8**(1): p. 44-8.
19. Fowleraker, J., *Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis*. Br Med Bull, 2009. **89**: p. 93-110.
20. Silby, M.W., et al., *Pseudomonas genomes: diverse and adaptable*. FEMS Microbiol Rev, 2011. **35**(4): p. 652-80.
21. Rahme, L.G., et al., *Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals*. Science, 1995. **268**(5219): p. 1899-902.

22. Mulcahy, L.R., V.M. Isabella, and K. Lewis, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol*, 2014. **68**(1): p. 1-12.
23. Rybtke, M., et al., *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. *J Mol Biol*, 2015. **427**(23): p. 3628-45.
24. Rasamiravaka, T., et al., *The formation of biofilms by Pseudomonas aeruginosa: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 759348.
25. Tolker-Nielsen, T., *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS Suppl*, 2014(138): p. 1-51.
26. Doring, G., N. Hoiby, and G. Consensus Study, *Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus*. *J Cyst Fibros*, 2004. **3**(2): p. 67-91.
27. Alhede, M., et al., *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv Appl Microbiol*, 2014. **86**: p. 1-40.
28. Jensen, P.O., et al., *The immune system vs. Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010. **59**(3): p. 292-305.
29. Wagner, V.E. and B.H. Iglewski, *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2008. **35**(3): p. 124-34.
30. Sousa, A.M. and M.O. Pereira, *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs-A Review. *Pathogens*, 2014. **3**(3): p. 680-703.
31. Govan, J.R., A.R. Brown, and A.M. Jones, *Evolving epidemiology of Pseudomonas aeruginosa and the Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis lung infection*. *Future Microbiol*, 2007. **2**(2): p. 153-64.
32. Akdis, M., et al., *Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases*. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. **138**(4): p. 984-1010.
33. Holmes, W.E., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor*. *Science*, 1991. **253**(5025): p. 1278-80.
34. Schmidt-Weber, C.B., M. Akdis, and C.A. Akdis, *TH17 cells in the big picture of immunology*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(2): p. 247-54.
35. Hwang, S.Y. and H.Y. Kim, *Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients*. *Mol Cells*, 2005. **19**(2): p. 180-4.
36. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
37. Cantin, A.M., et al., *Oxidant stress suppresses CFTR expression*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(1): p. C262-70.
38. Bartling, T.R. and M.L. Drumm, *Oxidative stress causes IL8 promoter hyperacetylation in cystic fibrosis airway cell models*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. **40**(1): p. 58-65.
39. 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.
40. Luciani, A., et al., *Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition*. *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(9): p. 863-75.
41. Blackwell, T.S., et al., *In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation*. *J Immunol*, 1996. **157**(4): p. 1630-7.

42. Boncoeur, E., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator controls lung proteasomal degradation and nuclear factor-kappaB activity in conditions of oxidative stress*. Am J Pathol, 2008. **172**(5): p. 1184-94.
43. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
44. Theilgaard-Monch, K., B.T. Porse, and N. Borregaard, *Systems biology of neutrophil differentiation and immune response*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 54-60.
45. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *Granulopoiesis and granules of human neutrophils*. Immunol Rev, 2016. **273**(1): p. 11-28.
46. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
47. Brown, G.E., et al., *Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27059-68.
48. El-Benna, J., et al., *Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation*. Immunol Rev, 2016. **273**(1): p. 180-93.
49. Nguyen, G.T., E.R. Green, and J. Meccas, *Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 373.
50. Gorlach, A., et al., *Calcium and ROS: A mutual interplay*. Redox Biol, 2015. **6**: p. 260-71.
51. Rada, B. and T.L. Leto, *Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases*. Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 164-87.
52. Rada, B., et al., *Role of Nox2 in elimination of microorganisms*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(3): p. 237-53.
53. Schultz, H. and J.P. Weiss, *The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease*. Clin Chim Acta, 2007. **384**(1-2): p. 12-23.
54. Wittmann, I., et al., *Murine bactericidal/permeability-increasing protein inhibits the endotoxic activity of lipopolysaccharide and gram-negative bacteria*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7546-52.
55. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 541-50.
56. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 459-89.
57. Lowe, D.M., et al., *Neutrophils in tuberculosis: friend or foe?* Trends Immunol, 2012. **33**(1): p. 14-25.
58. Bloes, D.A., D. Kretschmer, and A. Peschel, *Enemy attraction: bacterial agonists for leukocyte chemotaxis receptors*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(2): p. 95-104.
59. Conese, M., et al., *Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease*. J Cyst Fibros, 2003. **2**(3): p. 129-35.
60. Downey, D.G., S.C. Bell, and J.S. Elborn, *Neutrophils in cystic fibrosis*. Thorax, 2009. **64**(1): p. 81-8.
61. Hayes, E., et al., *The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011. **59**(2): p. 97-112.
62. Griese, M., et al., *Inhibition of airway proteases in cystic fibrosis lung disease*. Eur Respir J, 2008. **32**(3): p. 783-95.
63. Laval, J., A. Ralhan, and D. Hartl, *Neutrophils in cystic fibrosis*. Biol Chem, 2016. **397**(6): p. 485-96.
64. Lawrence, R.H. and T.C. Sorrelli, *Decreased polymorphonuclear leucocyte chemotactic response to leukotriene B₄ in cystic fibrosis*. Clin Exp Immunol, 1992. **89**(2): p. 321-4.

65. Petit-Bertron, A.F., et al., *Circulating and airway neutrophils in cystic fibrosis display different TLR expression and responsiveness to interleukin-10*. Cytokine, 2008. **41**(1): p. 54-60.
66. Moriceau, S., G. Lenoir, and V. Witko-Sarsat, *In cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes, neutrophil apoptosis is delayed and modulated by diamide or roscovitine: evidence for an innate neutrophil disturbance*. J Innate Immun, 2010. **2**(3): p. 260-6.
67. Cowburn, A.S., et al., *Advances in neutrophil biology: clinical implications*. Chest, 2008. **134**(3): p. 606-12.
68. Zhou, Y., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator recruitment to phagosomes in neutrophils*. J Innate Immun, 2013. **5**(3): p. 219-30.
69. 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.
70. Sagel, S.D., et al., *Induced sputum inflammatory measures correlate with lung function in children with cystic fibrosis*. J Pediatr, 2002. **141**(6): p. 811-7.
71. Nordin, S.L., et al., *High expression of midkine in the airways of patients with cystic fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **49**(6): p. 935-42.
72. Jacquot, J., O. Tabary, and A. Clement, *Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new?* Expert Rev Mol Diagn, 2008. **8**(4): p. 359-63.
73. Yoshimura, K., et al., *Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5417-23.
74. Bonfield, T.L., et al., *Absence of the cystic fibrosis transmembrane regulator (Cftr) from myeloid-derived cells slows resolution of inflammation and infection*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(5): p. 1111-22.
75. Ng, H.P., et al., *Neutrophil-mediated phagocytic host defense defect in myeloid Cftr-inactivated mice*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106813.
76. Pohl, K., et al., *A neutrophil intrinsic impairment affecting Rab27a and degranulation in cystic fibrosis is corrected by CFTR potentiator therapy*. Blood, 2014. **124**(7): p. 999-1009.
77. Lemire, J.M., A. Ince, and M. Takashima, *1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice*. Autoimmunity, 1992. **12**(2): p. 143-8.
78. Linker-Israeli, M., et al., *Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC*. Clin Immunol, 2001. **99**(1): p. 82-93.
79. Ginde, A.A., J.M. Mansbach, and C.A. Camargo, Jr., *Vitamin D, respiratory infections, and asthma*. Curr Allergy Asthma Rep, 2009. **9**(1): p. 81-7.
80. Walker, V.P. and R.L. Modlin, *The vitamin D connection to pediatric infections and immune function*. Pediatr Res, 2009. **65**(5 Pt 2): p. 106R-113R.
81. Holick, M.F., *Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6 Suppl): p. 1678S-88S.
82. DeLuca, H.F., *Overview of general physiologic features and functions of vitamin D*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6 Suppl): p. 1689S-96S.
83. Holick, M.F., *Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application*. Ann Epidemiol, 2009. **19**(2): p. 73-8.
84. Wang, Z. and G. Wang, *APD: the Antimicrobial Peptide Database*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D590-2.

85. Sorensen, O.E., et al., *Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3951-9.
86. Yamasaki, K., et al., *Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin*. FASEB J, 2006. **20**(12): p. 2068-80.
87. Bucki, R., et al., *Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010. **58**(1): p. 15-25.
88. Nijnik, A. and R.E. Hancock, *The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications*. Curr Opin Hematol, 2009. **16**(1): p. 41-7.
89. Kai-Larsen, Y. and B. Agerberth, *The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 3760-7.
90. Schaubert, J., et al., *Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli*. Immunology, 2006. **118**(4): p. 509-19.
91. Nell, M.J., et al., *Bacterial products increase expression of the human cathelicidin hCAP-18/LL-37 in cultured human sinus epithelial cells*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004. **42**(2): p. 225-31.
92. Wang, T.T., et al., *Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 2909-12.
93. Schaubert, J., et al., *Histone-deacetylase inhibitors induce the cathelicidin LL-37 in gastrointestinal cells*. Mol Immunol, 2004. **41**(9): p. 847-54.
94. Termen, S., et al., *PU.1 and bacterial metabolites regulate the human gene CAMP encoding antimicrobial peptide LL-37 in colon epithelial cells*. Mol Immunol, 2008. **45**(15): p. 3947-55.
95. Mendez-Samperio, P., E. Miranda, and A. Trejo, *Expression and secretion of cathelicidin LL-37 in human epithelial cells after infection by Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(9): p. 1450-5.
96. Park, K., et al., *Regulation of cathelicidin antimicrobial peptide expression by an endoplasmic reticulum (ER) stress signaling, vitamin D receptor-independent pathway*. J Biol Chem, 2011. **286**(39): p. 34121-30.
97. Islam, D., et al., *Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 180-5.
98. Bergman, P., et al., *Neisseria gonorrhoeae downregulates expression of the human antimicrobial peptide LL-37*. Cell Microbiol, 2005. **7**(7): p. 1009-17.
99. Chakraborty, K., et al., *Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells*. Cell Microbiol, 2008. **10**(12): p. 2520-37.
100. Lee, Y.H., et al., *Associations between TLR polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis*. Clin Exp Rheumatol, 2012. **30**(2): p. 262-5.
101. Hu, Z., et al., *Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85765.
102. Larrick, J.W., et al., *Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein*. Infect Immun, 1995. **63**(4): p. 1291-7.
103. Rosenfeld, Y., N. Papo, and Y. Shai, *Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1636-43.

104. Pinheiro da Silva, F., R.L. Gallo, and V. Nizet, *Differing effects of exogenous or endogenous cathelicidin on macrophage toll-like receptor signaling*. Immunol Cell Biol, 2009. **87**(6): p. 496-500.
105. Shornick, L.P., et al., *Airway epithelial versus immune cell Stat1 function for innate defense against respiratory viral infection*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3319-28.
106. Hansdottir, S., et al., *Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7090-9.
107. De, Y., et al., *LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1069-74.
108. Mookherjee, N., et al., *Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2455-64.
109. Mookherjee, N., et al., *Intracellular receptor for human host defense peptide LL-37 in monocytes*. J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2688-96.
110. Tan, B.H., et al., *Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1864-71.
111. Hazrati, E., et al., *Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8658-66.
112. Yu, J., et al., *Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7684-91.
113. Otte, J.M., et al., *Human beta defensin 2 promotes intestinal wound healing in vitro*. J Cell Biochem, 2008. **104**(6): p. 2286-97.
114. Lopez-Garcia, B., et al., *Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in Candida albicans skin infection*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(1): p. 108-15.
115. Shaykhiev, R., et al., *Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(5): p. L842-8.
116. Byfield, F.J., et al., *Cathelicidin LL-37 increases lung epithelial cell stiffness, decreases transepithelial permeability, and prevents epithelial invasion by Pseudomonas aeruginosa*. J Immunol, 2011. **187**(12): p. 6402-9.
117. Barlow, P.G., et al., *The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **43**(6): p. 692-702.
118. Grassme, H., et al., *CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to Pseudomonas aeruginosa*. Science, 2000. **290**(5491): p. 527-30.
119. Tjabringa, G.S., et al., *The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6690-6.
120. Scott, M.G., et al., *The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3883-91.
121. Adams, J.S. and M.A. Gacad, *Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis*. J Exp Med, 1985. **161**(4): p. 755-65.
122. Gyetko, M.R., et al., *Monocyte 1 alpha-hydroxylase regulation: induction by inflammatory cytokines and suppression by dexamethasone and uremia toxin*. J Leukoc Biol, 1993. **54**(1): p. 17-22.
123. Liu, P.T., et al., *Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response*. Science, 2006. **311**(5768): p. 1770-3.

124. Krutzik, S.R., et al., *IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7115-20.
125. Provvedini, D.M., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes*. Science, 1983. **221**(4616): p. 1181-3.
126. Carlberg, C., *Current understanding of the function of the nuclear vitamin D receptor in response to its natural and synthetic ligands*. Recent Results Cancer Res, 2003. **164**: p. 29-42.
127. Gombart, A.F., et al., *Regulation of the CAMP gene by 1,25(OH)2D3 in various tissues*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **103**(3-5): p. 552-7.
128. Gombart, A.F., N. Borregaard, and H.P. Koeffler, *Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. FASEB J, 2005. **19**(9): p. 1067-77.
129. Liu, P.T., et al., *Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5810.
130. Yim, S., et al., *Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3)*. J Cyst Fibros, 2007. **6**(6): p. 403-10.
131. White, J.H., *Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **121**(1-2): p. 234-8.
132. Di Nardo, A., et al., *Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1829-34.
133. Brown, K.L., et al., *Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses*. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5497-505.
134. 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.
135. Taggart, C.C., et al., *Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 931-7.
136. Loutet, S.A., et al., *A complete lipopolysaccharide inner core oligosaccharide is required for resistance of Burkholderia cenocepacia to antimicrobial peptides and bacterial survival in vivo*. J Bacteriol, 2006. **188**(6): p. 2073-80.
137. Caulfield, A.J. and W.W. Lathem, *Disruption of fas-fas ligand signaling, apoptosis, and innate immunity by bacterial pathogens*. PLoS Pathog, 2014. **10**(8): p. e1004252.
138. Cohen, T.S. and A. Prince, *Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome*. Nat Med, 2012. **18**(4): p. 509-19.
139. 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.
140. Rosenfeld, M., et al., *Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 2001. **32**(5): p. 356-66.
141. Doss, M., et al., *Human defensins and LL-37 in mucosal immunity*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(1): p. 79-92.

HAM VERİLER



FORMLAR

HASTALARA YÖNELİK BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bilimsel araştırma amaçlı klinik bir çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini tam olarak anlamanız ve kararınızı, araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra özgürce vermeniz gerekmektedir. Bu bilgilendirme formu söz konusu araştırmayı ayrıntılı olarak tanıtmak amacıyla size özel olarak hazırlanmıştır. Lütfen bu formu dikkatlice okuyunuz. Araştırma ile ilgili olarak bu formda belirtildiği halde anlayamadığınız ya da belirtilemediğini fark ettiğiniz noktalar olursa hekiminize sorunuz ve sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım **gönüllülük** esasına dayalıdır. Araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra, kararınızı özgürce verebilmeniz ve düşünmeniz için formu imzalamadan önce hekiminiz size zaman tanıyacaktır. Kararınız ne olursa olsun, hekimleriniz sizin tam sağlık halinizin sağlanmasına ve korunmasına yönelik görevlerini bundan sonra da eksiksiz yapacaklardır. Araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde formu imzalayınız.

Proje Başlığı:

Kistik Fibrozis hastalarında nötrofil fonksiyonları ve sitokin düzeylerinin araştırılması

Açıklama:

Kistik fibrozis hastalarında, hastalığın enflamasyonun da etkili olan nötrofil fonksiyonları ve sitokin seviyelerinin, normal çocuklarla kıyaslanmasının amaçlandığı çalışmamızın ileriki çalışmalara kaynak oluşturacağı ve tedavide yeni pencereler açacağını öngörmekteyiz.

Bu araştırmada yer alması öngörülen toplam katılımcı sayısı 30'dur.

Rutin kan alma işlemi sırasında (hemogram ölçümü biyokimya tahlilleri vs.) bir kere olmak üzere 10 ml kan alınacaktır. Araştırmaya katılım daimi değildir.

Bu araştırmanın amacı; Kistik Fibrozis hastalarında nötrofil fonksiyonları ve sitokin düzeylerinin araştırılması ve kontrol grubu ile karşılaştırılmasıdır.

Gönüllüye mevcut tedavisi dışında araştırma amacıyla ilaç verilmeyecektir. Rutin kan alma işlemi sırasında damardan yaklaşık 10ml kadar kan alınacaktır. Bu alınan kanda nötrofil adezyon molekülleri, nötrofil fonksiyonları ve sitokin düzeyleri çalışılacaktır.

Araştırmamız yalnızca bilimsel araştırma olup gönüllünün doğrudan yarar görmesi ya da tedavi seyrinin değişmesi beklenmemektedir. Ancak, bu araştırmadan elde edilen sonuçlar sizin gibi tanı almış diğer hastaların tedavisinin planlanmasında katkı sağlayacaktır.

Kan alma işlemi ile sırasında acı-ağrı duyma, nadiren bayılma, morarma, nadiren iğnenin giriş yerinde enfeksiyon, pıhtılaşma veya kanamanın uzaması olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

Kan işlemi sonrasında istenmeyen durumlarda Uzm. Dr. Ahmet Hakan Gedik'e veya Doç Dr. Erkan Çakır'a ulaşabilirsiniz.

Telefon Numarası: 05323634577 Mail Adresi: erkancakir1@yahoo.com
 Telefon Numarası: 05056151824 Mail Adresi: ahakangedik@hotmail.com
 Adresi: Bezmialem Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları BD.
 Telefon Numarası: 05355231127 Mail Adresi: umitaslanhan@gmail.com
 Telefon Numarası: 05447212134 Mail Adresi: esinaktas@yahoo.com
 Adresi: İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji AD.

Bu araştırmaya katılmanız için veya araştırmadan kaynaklanabilecek giderler için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Hastalığınızın gerektirdiği tetkiklere ilave olarak yapılacak her türlü tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma giderleri size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kuruma ödetilmeyecektir. Bu araştırmaya katılmanızla, araştırma ile ilgili çıkabilecek zorunlu masraflar tarafımızdan karşılanacaktır. Bunun dışında size veya yasal temsilcilerinize herhangi bir maddi katkı sağlanmayacaktır.

Araştırma süresince elde edilen sizinle ilgili tıbbi bilgiler size özel bir kod numarası ile kaydedilecektir. Size ait her türlü tıbbi bilgi gizli tutulacaktır. Araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçla kullanılacaktır. Araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir. Ancak, gerektiğinde araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar tıbbi bilgilerinize ulaşabilecektir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabileceksiniz.

Bu araştırma insanlar üzerinde yapılacak olan bir ilaç araştırması değildir. Araştırmaya yönelik herhangi bir ilaç gönüllülere verilmeyecektir.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz.

Araştırmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda da, sizle ilgili tıbbi veriler bilimsel amaçla kullanılabilir.

(Katılımcının/Hastanın/Anne-Baba/Yasal Temsilcinin Beyanı)

Sayın Dr. tarafından Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Bilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili

yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

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

Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim). Ayrıca, tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim anlatıldı.

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

Gönüllü İsim Soyisim
..... İmza.....

Vasi İsim Soyisim
..... İmza.....

Araştırmacı İsim Soyisim
..... İmza.....

Tarih:...../...../20.... Saat:.....

ETİK KURUL KARARI

BEZMEİLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU						
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Kistik Fibrozis Hastalarında Nütrofil Fonksiyonları ve Stokin Düzeylerinin Araştırılması				
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU						
BEZMEİLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Reha ERKOÇ				
Unvanı/Adı/Soyadı	Ünvanlık Atamı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili	Konum *	İmza
Prof. Dr. Reha ERKOÇ	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Orhan ÖZTÜRKAN	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Faruk OKTEM	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Özcan KARAMAN	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Adem KIRIŞ	Radyoloji	Mehmet Akif Ersoy G.K.D.C Eğitim Araştırma Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Ahmet MIHMANLI	Ağız-Diş ve Çene Cerrahisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Hayrullah KÖSE	Biyofizik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Ertuğrul KAYA	Tıbbi Farmakoloji	Düzce Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL	Biostatistik ve Tıp Bilişimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Mahmut GÜRGAN	Deontoloji ve Tıp Tarihi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Mehmet AKHOROZ	Emekli	Kurum Dışı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Avukat Şevkiye KARAHAN	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
* / Toplamda Bulunma		Karar: ☒ Onaylandı ☐ Reddedildi				
Etik Kurulu Başkanı: Prof. Dr. Reha ERKOÇ		Sayfa 3 / 3				

PATENT HAKKI İZNİ

TELİF HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KİSTİK FİBROZİS HASTALARINDA NÖTROFİL FONKSİYONLARI VE SİTOKİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 11	% 3	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	toraks.dergisi.org İnternet Kaynağı	% 6
2	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	acrabstracts.org İnternet Kaynağı	% 1
4	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1