

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İDİYOPATİK PULMONER FİBROZİSDE TELOMERAZ İLİŞKİLİ GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan

Halime Yıldırım

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ender M. Çoşkunpınar

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eylül/2019

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda **Halime Yıldırım** tarafından hazırlanan
İdiyopatik Pulmoner Fibrozisde Telomeraz İlişkili Gen Mutasyonlarının Araştırılması
Başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ender M. Çoşkunpınar
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.
İMZA .....

Üye: Prof. Dr. Birsen Pınar Yıldız Silahtaroğlu
Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 3. Klinik
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.
İMZA .....

Üye: Prof. Dr. Ülkan Kılıç
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.
İMZA .....

Üye: Doç. Dr. Sevgi Kalkanlı Taş
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.
İMZA .....

Üye: Prof. Dr. İlhan Onaran
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.
İMZA .....

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 20/09/2019
Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Meltem Vural

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Halime Yıldırım

20.09.2019

ÖZET

Amaç: İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF), akciğerde öksürük, dispne ve fibrotik yara oluşumu ile karakterize olan, İdiyopatik İnterstisyel Pnömoniler'in (İİP) en yaygın tipidir. Klinik seyir yüksek morbidite ve mortalite ile birlikte progresif bir şekilde ilerlemektedir. Tanıdan sonra sağ kalım ortalama 3-5 yıl arasıdır. İPF için tanı ve prognozda kullanılmak üzere şu ana kadar hiçbir biyobelirteç bulunmamaktadır. Bu sebeple İPF'nin erken tanısında ve klinik seyrini belirlemede kullanılabilecek yeni biyobelirteçler keşfedilmelidir. Daha önceki çalışmalar telomer ilişkili genlerin ve telomer kısalmasının bu hastalıkla ilişkisini göstermektedir.
Bu çalışmanın amacı İPF patogenezinde etkili telomer ile ilişkili olabilecek dört genin mutasyonunu ve bu mutasyonların telomer kısalığı ile olası ilişkisini belirleyerek hastalığın patofizyolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlamaktır. Ayrıca bu genlerin İPF ve diğer İAH'ları ile karşılaştırılarak tanı konulmasında kullanılabilecek aday moleküler biyobelirteçler bulunması hedeflenmektedir.

Gereç ve Yöntem: Bu araştırma için 40-85 yaş aralığındaki 34 İPF tanısı almış hasta, 32 İPF dışı İnterstisyel Akciğer Hastalığı'na (İAH) sahip birey ve 31 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edildi ve her katılımcıdan periferik kan örneği alındı. STN1 (suppressor of cdc thirteen 1) (eski adı; OBFC1) gen mutasyonu Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) metoduyla incelenirken TERC (The RNA component of telomerase), TERT (Telomerase reverse transcriptase) ve PARN (poly(A)-specific ribonuclease) gen bölgeleri ise Sanger dizileme ile değerlendirildi. Bunun yanında telomer uzunlukları southern blot tekniği kullanılarak ölçüldü. Çıkan sonuçlar SPSS biyoistatistiksel analiz programının 20.0 versiyonu kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Mutasyon tarama sonuçlarına göre genotipleme analizi bakımından İPF tanılı hastalar, diğer İAH grubu ve sağlıklı bireyler arasında anlamlı fark tespit edilmedi. Ancak TERT ve TERC geni allel dağılımı açısından İPF ve diğer İnterstisyel Akciğer Hastalarında istatistiksel anlamlılık bulundu. İPF ve diğer İAH'lı bireylerin FEV1 ve FVC değerlerinin sağlıklı bireylere göre daha düşük çıktığı görüldü. Telomer uzunluğu ölçümü sonuçlarına göre ise hasta bireylerin telomerlerinin sağlıklılara oranla daha kısa olduğu tespit edildi.

Sonuç: Telomer ilişkili gen mutasyonları ve bunların hastalıkla ilişkisi yönünde literatür bilgileri bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında telomer ilişkili gen mutasyonları ve telomer kısalmasının hastalığın prognozunun kötüye gitmesine sebep olduğu düşünülmektedir. Bizim analiz sonuçlarımıza göre gen mutasyonları açısından allelik olarak anlamlılık tespit edilen genlerin hastalık için risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında, telomer uzunluğu ölçüm sonuçları incelendiğinde literatür ile benzer sonuçlar ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Mutasyon, İdiyopatik Pulmoner Fibrozis, Telomer Kısalması

ABSTRACT

Objective: Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is the most common type of Idiopathic Interstitial Pneumonia (IIP), which is characterized by coughing, dyspnea and fibrotic wound formation in the lung. The clinical course is got worse progressively with high morbidity and mortality. The average survival after diagnosis is 3-5 years. No biomarkers have been available to date for diagnosis and prognosis for IPF. Therefore, new biomarkers that can be used in the early diagnosis of IPF and in determining its clinical course should be discovered. Previous studies have demonstrated the association of telomere-related genes and telomere shortening with this disease.

The aim of this study was to determine the mutation of four genes that may be related to telomere and to determine the possible relationship between these mutations and telomere shortness and to contribute to the pathophysiology of the disease. In addition, it is aimed to find candidate molecular biomarkers which can be used for diagnosis by comparing these genes with IPF and other ILDs.

Material and Methods: For this research, 34 individuals with IPF, 32 individuals with the other Interstitial lung diseases (ILD) and 31 healthy controls in the age of between 40 and 85 were included and peripheral blood samples obtained form all of participants. STN1 (suppressor of cdc thirteen 1) (former name; OBFC1) gene mutation were examined by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method while TERC (The RNA component of telomerase), TERT (Telomerase reversetranscriptase) and PARN (poly (A) - specific ribonuclease) gene regions were evaluated by Sanger sequencing. Moreover, telomere length measurements was performed with southern blot technique. All the results that obtained from this project concluded by using SPSS biostatistical analysis program (ver 20.0).

Results: According to the mutation screening results, no significant difference was found between the patients with IPF, other ILD groups and healthy individuals in terms of genotyping analysis. However, in terms of allele distribution of TERT and TERC genes, statistically significant difference was found in İPF and other Interstitial Lung Patients. FEV1 and FVC values of IPF and other ILD subjects were lower than healthy individuals. Although there was no statistically significant difference between the groups in the telomere length measurement, individuals with short telomeres were detected in IPF and other ILD groups.

Conclusion: There is literature information about telomere related gene mutations and their relationship with disease. In the light of this information, it is thought that telomere related gene mutations and telomere shortening cause the prognosis of the disease to deteriorate. According to the results of our analysis, it is thought that genes that have allelic significance in terms of gene mutations may be risk factors for the disease. In addition, when the telomere length measurement results were examined, similar results were obtained with the literature.

Keywords: Mutation, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Telomere Shortening

TEŞEKKÜR

Maddi ve manevi her türlü desteklerini esirgemeyen değerli Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Ülkan KILIÇ'a

Yüksek lisans dönemim boyunca bilgisi ve desteğini esirgemeyen, bir bilim insanı olarak yeteneklerinden etkilenerek kendisini örnek aldığım, tüm öğrencileri ve meslektaşları tarafından saygı ve sevgiyle anılan rol modelim, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ender M. ÇOŞKUNPINAR'a,

Gönüllülere ait örneklerin ve klinik verilerin toplanmasında ve değerlendirilmesinde katkı sağlayan Yedikule Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3.Klinik Şefi, değerli bilim insanı Prof. Dr. Birsen Pınar YILDIZ SİLAHTAROĞLU'na

Proje için desteklerinden dolayı Bahçelievler Memorial Hastanesi Göğüs hastalıklarından sayın Uzm. Dr. Engin AYNACI ve Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesinden sayın Uzm. Dr. Aysun AYNACI'ya

Tez çalışmam boyunca engin tecrübelerini ve manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ'a

Bilgisine ve karakterine hayran kaldığım Kartal Koşuyolu Eğitim ve Araştırma Hastanesi Operatör Doktoru değerli hocam Prof. Dr. Ali Can HATEMİ'ye

Enerji ve güler yüzleriyle içimizi ısıtan Anatomi Anabilim Dalından değerli hocalarım Doç. Dr. Papatya KELEŞ ve Dr. Öğr. Üy. Ceyda HAYRETDAĞ'a

Yardımlarından dolayı Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kadir TURAN'a

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üy. Betül AKÇEŞME ve Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üy. Faruk Berat AKÇEŞME'ye

Tıbbi Biyoloji Bölümünün gizli kahramanları olan, deneylerimde bana yardımcı olan yüksek lisans ve doktora programında eğitim alan tüm arkadaşlarıma,

Sevgi ve teşekkürlerimi iletiyorum, iyi ki varsınız…

Yüksek Lisans Tez Projemi, yürüdüğüm bu zorlu yolda önümdeki tüm taşları kaldırarak hayallerime giden ilk basamağı aşmamda büyük emeği olan değerli YILDIRIM ailesi fertlerine ithaf ediyorum…

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin "**2018/039"** sayılı projesiyle desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
ÇİZELGE LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. FİBROZİS 3
2.2 İNTERSTİSYEL AKCİĞER HASTALIKLARI 4
2.2.1. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis 7
2.2.1.1. İPF'nin Tarihçesi 7
2.2.1.2. İPF'de Derecelendirme Sistemleri 8
2.2.1.3. İPF Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri 11
2.2.1.4. İPF'nin Tanısı 15
2.2.1.5. İPF Akut Alevlenmesi (AA-İPF) 17
2.2.1.6. İPF ve Ko-Morbiditeler 18
2.2.1.7. İPF'nin Patogenezi 19
2.2.1.8. İPF'de Tedavi Yöntemleri 20
2.2.1.9. İPF ile İlişkili Moleküler Belirteçler 23
2.2.1.10. Telomeropati ve İPF 27
3. GEREÇ VE YÖNTEM 35
3.1. GEREÇ 35
3.1.1. Çalışmaya Katılacak Olan Gönüllülerin Seçimi ve Örneklerinin Elde Edilmesi 35
3.1.2. Proje Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri 36
3.1.3. Proje Kapsamında Kullanılan Kitler 36
3.1.4. Proje Kapsamında Kullanılan Cihazlar 36
3.1.5. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması 37
3.2. YÖNTEM 40
3.2.1. Genomik DNA İzolasyon Kiti ile Kan Örneğinden DNA İzolasyonu 40
3.2.2. Spektrofotometrik Ölçüm 41

3.2.3. Telomer İlişkili Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması 42
3.2.4. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) 43
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi 43
3.2.6. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu ve Sanger Dizileme 44
3.2.6.1. ExoSAP-IT PCR Clean-Up, Affymetrix protokolü (PCR ürünlerinin temizlenmesi) 44
3.2.6.2. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo Fisher Scientific (Sekans reaksiyonunun hazırlanması) 45
3.2.6.3. EDTA/NaOAc/Etanol sekans ürünleri pürifiye edilmesi 45
3.2.6.4. Elüsyon ve Denatürasyon Aşaması 46
3.2.7. TELOTAGGG Telomere Length Assay Kit (Ver 10.0) ile Telomer Uzunluğunun Belirlenmesi 46
3.2.7.1. Genomik DNA'nın Parçalanması 46
3.2.7.2. Southern Blotting 46
3.2.7.3. Hibridizasyon ve Kemülimünesans Deteksiyon 47
3.2.8. İstatistik Analiz 49
4. BULGULAR 51
4.1. HASTALARIN KLİNİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI 51
4.2. MUTASYON TARAMA SONUÇLARI 54
4.2.1. RFLP Metodu ile Mutasyon Tarama Sonuçları 54
4.2.2. Sanger Dizileme ile Mutasyon Tarama Sonuçları 56
4.3. TELOMER UZUNLUĞU ÖLÇÜM SONUÇLARI 61
5. TARTIŞMA 65
6. SONUÇLAR 73
KAYNAKLAR 75
EK 1 85
EK 2 87
EK 3 91
ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ 92

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 2. 1. İdiyopatik İnterstisyel Pnömoni paternleri. 6
Çizelge 2. 2. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis'te skorlama sistemleri. 9
Çizelge 2. 3. GAP Skorlama Sistemi. 10
Çizelge 2. 4. ATS/ERS/JRS ve ALAT'ın İPF Tanısı için Hazırladığı 2011 ve 2018 yılı Rehberlerindeki Önerilerinin Karşılaştırılması. 16
Çizelge 2. 5. İPF hastalarında görülen komorbiditeler ve bunların prevalansı. 19
Çizelge 2. 6. MMP'ler ve Pumoner Fibrozis gelişimine sebep olan mekanizmalar. 24
Çizelge 3. 1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri. 36
Çizelge 3. 2. Kitler ve Reaksiyon Sayıları. 36
Çizelge 3. 3. Kullanılan Cihazlar ve Kullanım Amaçları. 37
Çizelge 3. 4. Telomeraz ilişkili Gen Bölgeleri için PCR komponentleri miktarları. 42
Çizelge 3. 5. Telomer ilişkili genler için tasarlanan primerler ve PCR için bağlanma sıcaklıkları. 42
Çizelge 3. 6. PCR koşulları ve süreleri. 43
Çizelge 3. 7. Restriksiyon enzimleri kesimleri için komponentler ve miktarları. 43
Çizelge 3. 8. Reaksiyon Bileşenleri. 45
Çizelge 4. 1. Gönüllülerin Tanılarına Göre Dağılımı. 51
Çizelge 4. 2. İPF Tanılı Bireylerin GAP Skoru. 51
Çizelge 4. 3. Hasta ve Kontrol Grubunun Cinsiyet Dağılımı. 52
Çizelge 4. 4. Hasta ve Kontrol Grubunda Yaş ve Sigara Kullanım Verileri. 52
Çizelge 4. 5. Solunum ve Fonksiyon Testi Sonuçları. 53
Çizelge 4. 6. Hemogram Testi Sonuçları. 54
Çizelge 4. 7. STN1 Geni Mutasyon Tarama Sonuçları. 55
Çizelge 4. 8. İPF ve Sağlıklı Bireylerin STN1 Geni Genotiplemele Sonuçlarının Crosstabs ile Değerlendirilmesi. 56
Çizelge 4. 9. İPF ve Sağlıklı Bireylerin STN1 Geni Genotiplemele Sonuçlarının Crosstabs ile Değerlendirilmesi. 56
Çizelge 4. 10. TERT Geni Mutasyon Tarama Sonuçları. 57
Çizelge 4. 11. İPF ve Diğer İAH'ların TERT Geni Genotiplemele Sonuçlarının Crosstabs ile Değerlendirilmesi. 58
Çizelge 4. 12. TERC Geni Mutasyon Tarama Sonuçları. 59
Çizelge 4. 13. İPF ve Diğer İAH'larda TERC Geni Genotiplemele Sonuçlarının Crosstabs ile Değerlendirilmesi. 59
Çizelge 4. 14. PARN Geni Mutasyon Tarama Sonuçları. 60
Çizelge 4. 15. Gruplar Arası Telomer Uzunluk Karşılaştırılması. 61
Çizelge 4. 16. Diğer İAH'ya Sahip Bireylerin Telomer Uzunluklarının Sağlıklı Bireylerle Karşılaştırılması. 61
Çizelge 4. 17. İPF ve Sağlıklıların Yaş ile Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması. 62
Çizelge 4. 18. İPF Dışı İnterstisyel ve Sağlıklıların Yaş ile Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması. 62

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2. 1. Fibrojenik Yanıt. 3
Şekil 2. 2. İdiyopatik İnterstisyel Pnömonilerin Uluslarası Multidisipliner Sınıflandırılması... 5
Şekil 2. 3. İPF ile İlişkili Akciğer Lezyonlarını Oluşturabilecek Faktörler. 12
Şekil 2. 4. İPF Tanı Diyagramı. 17
Şekil 2. 5. MUC5B'nin 11. Kromozomdaki lokasyonu. 24
Şekil 2. 6. İPF'de disregüle olan miRNA'lar ve moleküler hedefleri 27
Şekil 2. 7. Telomeropatilerin moleküler biyolojisi. 31
Şekil 2. 8. İPF'de Telomer İlişkili Genler ve Genomda Bulunduğu Bölgeler. 32
Şekil 2. 9. TERT'nin Hücre İçerisindeki Fonksiyonları. 33
Şekil 3. 1. DNA İzolasyonunun şematik görünümü. 41
Şekil 3. 2. Sanger Dizileme Yöntemi İş Akış Şeması. 44
Şekil 3. 3. TeloTAGG Telomere Length Assay kiti ile telomer uzunluğu ölçümü. 49
Şekil 4. 1. STN1 PCR ve RFLP Görüntüsü. 55
Şekil 4. 2. TERT Geni PCR ve Sanger Dizileme Görüntüsü. 57
Şekil 4. 3. TERC Geni PCR ve Sanger Dizlime Görüntüsü. 58
Şekil 4. 4. PARN Geni PCR ve Sanger Dizileme Görüntüsü. 60
Şekil 4. 5. Hasta ve Sağlıklı Bireylerde Telomer Uzunluk Ortalamaları. 61
Şekil 4. 6. Telomer Uzunluklarının Yaşa Göre Dağılımı. 62
Şekil 4. 7. Southern Blot jel ve membran görüntüsü. 63

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
6DYM	6-dk. yürüme mesafesi
AA-İPF	İPF Akut Alevlenmesi
AEH	Alveolar Epiteliyal Hücre
ALAT	The Latin American Thoracic Association
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
ARDS	Akut Respiratuvar distres Sendromu
ATS	American Thoracic Society
BAL	Bronkoalveolar Lavaj
BCO	Buzlu Cam Opasifikasyonu
BLT	Bilateral Akciğer Transplantasyonu
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CF-N	Dolaşımda Bulunan Nükleozom
CPI	Composite Physiologic Index
CRP	Clinic-Radiologic-Physiologic
DDR	DNA Hata Yanıtı
DEFA1	Nötrofil Defensin
DKC1	Dyskerin Pseudouridine Synthase 1
DLCO	Karbonmonksit Difüzyon Ölçümü
DSB	Çift Zincir Kırıkları
ECM	Extracellular Matrix
EBV	Epstein-Barr Virüsü
ER	Endoplazmik Retikulum
ERS	European Respiratory Society
FEV1	1.sn'deki Zorlu Ekspiratuvar Volüm
FGF	Fibroblast Growth Factor
FPF	Familyal Pulmoner Fibrozis
FVC	Zorlu Vital Kapasite
GAP	Gender-Age-Physiology
GÖRH	Gastroözofageal Reflü Hastalığı
HCV	Hepatit C Virüsü

HHV	Human Herpes Virus
İAH	İnterstisyel Akciğer Hastalıkları
İİP	İdiyopatik İnterstisyel Pnömoni
İPF	İdiyopatik Pulmoner Fibrozis
İTS	İnterstisyel Telomer Sekansı
JRS	Japanese Respiratory Society
KL-6	Krebs Von Lungen-6
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
miRNA	Mikro RNA
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MUC5B	MUCin 5B
PAI-1	Plasminogen Activation Inhibitor-1
PARN	Poly(A)-specific Ribonuclease
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PO2	Parsiyel Oksijen Basıncı
PR	Pulmoner Rehabilitasyon
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RTEL1	Regulator of Telomere Elongation Helicase 1
SLT	Tek Akciğer Transplantasyonu
SP	Sürfaktan Protein
SSB	Tek Zincir Kırıkları
STN1	Suppressor of cdc thirteen 1
STS	Telomer Kısalması Sendromu
TBD	Telomer Biyolojisi Hastalıkları
TCAB1	Telomerase Cajal Body Protein 1
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomerase Revers Transcriptase
TGFβ-1	Transforming Growth Factor β-1
TNF-α	Tumour necrosis factor- α
TOLLIP	TOLL-Interacting Protein
TTV	Turque Teno Virüsü
UIP	Usual Interstitial Pneumonia

UPR	Unfolded Protein Response
YÇBT	Yüksek Çözünürlüklü Bilgisayarlı Tomografi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İPF, İdiyopatik interstisyel pnömoni'nin kronik ve progresif şekilde ilerleyen ve en sık görülen tipidir. Mortalitesi ve morbiditesi oldukça yüksektir. Tanı sonrası ortalama sağ kalım ~3-5 yıl olarak bildirilmiştir (1). Genellikle 50 yaş ve üzeri yetişkinleri etkilemektedir ve erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir. Hastalığın Familyal (FPF) ve Sporadik formları bulunmaktadır. Familyal İPF'yi, daha erken yaşta görülmesi dışında, klinik ve histolojik olarak sporadik İPF'den ayırt etmek güçtür (2).

İPF'li akciğerde eş zamanlı epitelyal hücre çoğalması, apoptoz, hücre senesensi ve kısmi epitelyal mezenkimal transisyonu (EMT) ile nitelendirilir (3,4). Ayrıca fibroblastların proliferasyonu ve onların miyofibroblastlara diferansiyasyonu da İPF gelişiminde önemlidir. Bunun yanında bazı İPF'li akciğer dokularında epitelin bazı bölgelerininin hiperplastik proliferasyonu belirlenmiştir. Buna ek olarak miyofibroblastların İPF hastalığına katkısı tam olarak bilinmemektedir (4). Pulmoner parankimada ilerleyici yara oluşumu, dispnea ve hipoksemi ile progresif fonksiyon kaybı ve solunum yetmezliği ve bunun sonucunda ölüme yol açmaktadır. Hastalık tanısı için yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi kullanılmaktadır. Bununla İPF'i diğer İnsterstisyel akciğer hastalıklarından ayırmak istenmektedir (3,4).

Yaygın klinik kullanımda İPF için moleküler biyobelirteç bulunmamaktadır. İPF patogenezinde önerilen aday biyobelirteçler alveolar epiteliyal hücrelerde işlev bozukluğu, immün bozukluklar ve fibrogenez ile ilişkilidir. Bunlar dışında klinik, fizyolojik ve fonksiyonel markırlar da hastalığın şiddetini belirlemede kullanılır. Örneğin klinik markır olarak dispnea değerlendirmesi için nefes darlığı anketi (UCSD-SBQ) veya hastalığın 7işiddetini araştırmada soluksuzluk ölçeği kullanılmaktadır. Fizyolojik markır olarak da FVC (Forced Vital Capacity) ve DLCO (Diffusing Capacity of Lung for Carbon Monoxide) yaygın olarak kullanılır. Altı ay içinde FVC>%10 veya DLCO>%15 değerlerinin mutlak düşüşü ile hastalığın progresyonunun klinik olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. Fonksiyonel markır olarak altı dakika yürüme testi başlangıç ve değişimlerinin ölçülerek İPF hastalarında mortalitenin bağımsız ön gördürücüsü olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (5,6). İPF patogenezinin belirlenmesi çalışmalarında moleküler biyomarkır olan miRNA'ların %80'inin İPF hastalarında down-regüle olduğu tespit edilmiştir (7).

İPF hastalığının familyal ve sporadik formunda birçok genetik varyasyon tanımlanmıştır. Genetik faktör olarak öne çıkan genler SFTPC (Surfactant protein C), SFTPA2 (Surfactant protein A2), TERT, TERC, ABCA3 (ATP binding casette member A3) ve MUC5B (MUCin 5B) genleridir (8). STPC geni, akciğer fonksiyonu ve homeostazı için önemli olan ve yüksek derecede hidrofobik bir protein olan sürfaktan protein C'yi kodlar. Bu gende belirlenen L188Q mutasyonu Endoplazmik Retikulumda (ER) biriken ve ER stresine sebep olan anormal protein birikimiyle sonuçlanmıştır (9). MUC5B'nin rs35705950 polimorfizminin hastalığa yatkınlık ve şiddeti ile ilişkili olduğu ve toplam sağ kalımı azalttığı bildirilmiştir (10). Bu genlerin haricinde çok sayıda gen de hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Familyal fibroziste RTEL1 ve PARN varyasyonları tespit edilmiş ve bu genlerdeki mutasyonları taşıyan bireylerde lökosit telomerlerinde kısalık rapor edilmiştir (11). Diğer bir çalışmada FAM13A geninde rs2609255 varyantının minör G alleli frekansı İPF hastalarında kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş ve majör T alleli daha düşük DLCO seviyesi ile ve bağımsız olarak kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (12). Başka bir polimorfizm çalışmasında AGER geninin rs2070600 varyantının minör allel frekansı İPF'li hastalarda anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir (13). Bu tür genetik yatkınlık, risk ve prognoz belirleme çalışmalarının hastalığın patofizyolojisinin ortaya konmasında önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir.

Telomerler, kromozomların uçlarını koruyan ve insanlarda TTAGGG dizisinden oluşan tekrar bölgeleridir. Normal hücrelerde telomerler her bölünmede bir miktar kısalmaktadır. Bu oluşumun hücre yaşlanmasında etkili mekanizmalardan olduğu bilinmektedir. (14). Bu sebeple telomer ile bağlantısı bulunan mekanizmalarda oluşan mutasyon telomeropati denilen İPF'nin de içinde bulunduğu hastalıklara sebep olabilmektedir (15). İPF üzerinde yapılan araştırmalara bakıldığında telomer ile ilişkili genlerde mutasyon ve bunun sonucunda telomer kısalması tespit edilmiştir. Bu yüzden telomer kısalmasının İPF için sağ kalımda etkili bir prognostik biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür. Daha önce yapılan araştırmalarda telomer ilişkili bazı genlerin İPF hastalığıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bizim de bu çalışmadaki amacımız, TERT, TERC, PARN ve STN1 telomeraz ilişkili gen polimorfizmlerinin belirlenerek ve telomer uzunluklarının ölçülerek Türkiye'de bu faktörlerin İPF hastalığının patofizyolojisinin aydınlatılmasına ve diğer hastalıklardan ayırımının kolaylaştırılmasına katkı sağlanmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. FİBROZİS

Fibrozis, bağ doku komponentlerinin (kollajen, fibronektin gibi Ekstraselüler Matriks (ECM) bileşenleri) doku veya organda birikimiyle karakterize patolojik bir durumdur. Fibrozis kronik doku yaralanması ve kronik inflamasyona yanıt olarak deregüle yara iyileşmesi ile oluşur (16). Bir organda meydana gelen hastalığa bağlı yaralanma, doku fibrozunda meydana gelen kompleks hücresel ve moleküler yanıtları oluşturur. Bu fibrojenik yanıtlar uzun süreli devam ederse parankimal skar oluşumu ve bunun sonucunda da hücrelerde fonksiyon kaybı ve hatta organ yetmezliğine sebep olur (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1. Fibrojenik Yanıt (17).

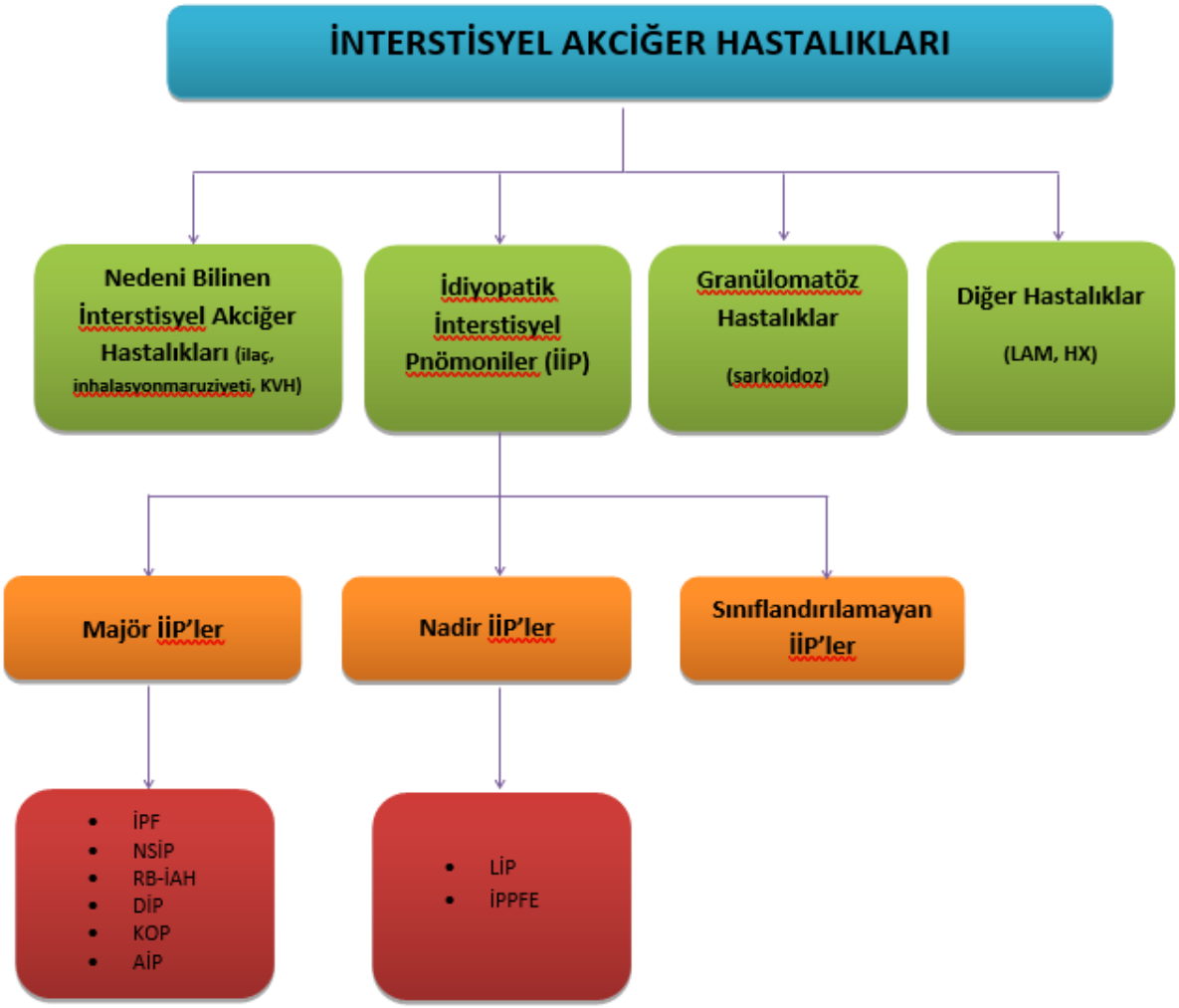
Farklı organ sistemlerinde meydana gelen fibrotik değişimler faklı hücrelerdeki spesifik yolakların görev aldığı, içinde değişik hücre tiplerini barındıran kompleks aktivitelerle ilişkilidir (17). Bu hücre gruplarına makrofajlar (ör; M2 makrofajları) ve T hücreleri (ör; T_H17, T_H1, T_{reg}) gibi inflamatuvar hücreler, miyeloid hücreler, epitelial hücreler, fibrojenik efektör hücreler (fibroblastlar ve miyofibroblastlar; kemik iliğinden elde edilirler, fibrositler; epiteliyal dokudan elde edilirler (epiteliyal-mezenkimal transisyon)), endoteliyal hücreler örnek verilebilir (17,18). ECM, hücre proliferasyonu, sağ kalım ve göç gibi önemli olayların düzenleyicileri olan molekülleri barındırır (19). Yapılan araştırmalar ECM bileşenleri (fibrinojen, laminin), anjiyogenik sitokinler (anjiyonegenin, FGF; Fibroblast Büyüme Faktörü) ve bağışıklıkla ilişkili sitokinlerin (anneksin, DEFA1; Nötrofil Defensin) fibrozisle ilişkisi olduğunu ortaya koymuştur (20).

Fibrozis oluşumunda TGF-β1 (Transforming growth factor-β1), fibrozu oluşturmada öne çıkan faktörlerden biridir. TGF-β1 hücre çoğalması, apoptoz, farklılaşma, otofaji ve immün yanıtın negatif regülasyonu gibi birçok olayda görev alır. Bu molekül kanonikal (smad2/3'ün fosforilasyonu ve aktivasyonunu içerir), AKT ve Rho benzeri GTPaz sinyal yolağı gibi birçok yolakta yer alır (15,21,22,23,24). Bunun yanında Toll ligandları da fibroblastları direkt olarak aktive ederek bunların miyofibroblastlara dönüşümünü sağlayabilir. Bu yüzden TLR (Toll-like receptor) sinyallenmesinin inhibisyonu fibrozis'e neden olan hastalıkların tedavisinde uygulanabilecek bir tedavi yaklaşımı olabilir. TLR ailesinden TLR3 ve TLR9'un aktivasyonun fibrozis dönüşümünü stimüle ettiği düşünülmektedir (16,25,26). TGF-β1 ve TLR'e ek olarak PDGF (Platelet-derived growth factor) ve EGF (Epidermal growth factor) gibi kemokinlerin de fibrozis oluşumu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (27). Bu gibi moleküler markırlar fibroz oluşumu ile ilişkili hastalıkların prognostik ve diyagnostik açıdan değerlendirilmesinde efektiftir.

2.2 İNTERSTİSYEL AKCİĞER HASTALIKLARI

İnterstisyel Akciğer Hastalıkları (İAH) ciddi derecede mortalite ve morbidite barındıran bir akciğer hastalığı grubudur. Bu hastalık grubu Difüze Parenkimal Akciğer Hastalıkları olarak da bilinmektedir. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) bu hastalığın en bilinen ve tehlikeli türüdür (28). İAH'nı kapsayan hastalıklarda pulmoner inflamasyon ve değişken derecelerde fibrozis görülür. İAH'nın değerlendirilmesi klinik değerlendirmeler sonucu ortaya konmaktadır. Yaş, cinsiyet, sigara kullanımı gibi bilgiler de değerlendirme ölçütlerine katkı sağlamaktadır (29). Bu hastalık grubunda klinik, radyolojik ve histopatolojik değerlendirmelerin çok benzer olması sebebiyle gruba dahil olan hastalıkları birbirinden ayırmak oldukça güçtür. Böyle bir sorunun oluşu da biyobelirteçlere gereksinimi beraberinde getirmiştir. İAH'da klinikte kullanılan biyobelirteçler bulunmamakla birlikte bu konudaki çalışmalar hala sürmektedir (30). Bununla birlikte yapılan moleküler araştırmalar bazı moleküllerin bu gruba bağlı hastalıkların tanı ve prognozunda ön gördürücü olduğunu ortaya koymuştur.

İnterstisyel Akciğer Hastalıklarında en öne çıkan hastalık grubu İdiyopatik İntestisyel Pnömoni (İİP)'dir. İPF hastalığını da içine alan bu hastalık grubunun Uluslarası Multisipliner Sınıflandırılması, ATS (American Thoracic Sciety) ve ERS (European Respiratory Society) gibi kuruluşların öncülüğüyle 2002 yılında yapılmasının ardından 2013 yılında revize edilmiştir (Şekil 2.2) (31, 32).



Şekil 2. 2. İdiyopatik İnterstisyel Pnömonilerin Uluslararası Multidisipliner Sınıflandırılması.
KVH: Kollajen Vasküler Hastalığı, İPF: İdiyopatik Pulmoner Fibrozis, NSİP: Non-Spesifik İnterstisyel Pnömoni, RB-İAH: Respiratuvar Bronşiyolit- İnterstisyel Akciğer Hastalığı, DİP: Deskuamatif İnterstisyel Pnömoni, KOP: Kriptojenik Organize Pnömoni, AİP: Akut İnterstisyel Pnömoni, LİP: İdiyopatik Lenfoid İntestisyel Pnömoni, İPPFE: İdiyopatik Plevroparenkimal Fibroelastozis, LAM: Lenfanjiyoleimiyomatozis, HX: Pulmoner Langerhans Hücre Histozis/Histiyositozis X. (31, 32).

İİP ile ilgili olarak kesin epidemiyolojik veriler bulunmamakla birlikte hastalık ileri yaşlarda daha fazla görülmektedir. İPF vakalarının ise bu hastalık grubunun %52,6'sını oluşturduğu bildirilmiştir (33). İİP farklı histolojik ve radyolojik bulguları barındıran 8 hastalığı içerir. Çoğu zaman bu gruptaki hastalıklar arasında ayırım yapmak zordur. Bu sebeple bazı interstisyel pnömonilerin sınıflandırılması yapılamayabilir. İİP tanısı klinik, radyoloji ve patoloji sonuçlarına göre konulmaktadır. İİP'lerin sınıflandırılmasında histolojik özellikler ile birlikte bilgisayarlı görüntüleme (BT) de İİP paternlerinin belirlenmesinde önem arz etmektedir (Çizelge 2.1) (35).

Çizelge 2. 1. İdiyopatik İnterstisyel Pnömoni paternleri.
NSİP: Non-spesifik İnterstisyel Pnömoni, DİP: Deskuamatif İnterstisyel Pnömoni, LİP: İdiyopatik Lenfoid İntestisyel Pnömoni, İPPFE: İdiyopatik Plevroparenkimal Fibroelastozis (34, 35).

MORFOLOJİK PATERN	HİSTOLOJİK KARAKTERİSTİKLER	GÖRÜNTÜLEME ÖZELLİKLERİ	GÖRÜNTÜLEME AYIRICI TANI
UIP	Konumsal ve temporal heterojenite, Yoğunfibroz, fibroblastik odak, bal peteği görünümü	Bazal, periferal predominans, sıklıkla düzensiz, retiküler anormallik, bal peteği görünümü	Kollajen vasküler hastalık, asbest, kronik hipersensitivite pnömonisi
NSİP	Konumsal ve temporal olarak homojen akciğer fibrozu veya inflamasyonu	Bazal predominans, buzlu cam anormalliği, retiküler anormallik	Kollajen vasküler hastalık, kronik hipersensitivite pnömonisi, DIP
RESPİRATUVAR BRONŞİYOLİT	Peribronşiyal makrofaj birikimi, Bronşiyal fibroz; makrofajlar tozlu kahverengi sitoplazmaya sahiptir	Sentrilobüler nodüller, buzlu cam azalması	Hipersensitivite pnömonisi
DİP	Alveolde difüze makrofaj birikimi	Bazal, periferal predominans, buzlu cam atenüasyonu; bazen kistler	Hipersensitivite pnömonisi, NSIP
ORGANİZE PNÖMONİ	Distal hava yollarında intraluminal organize fibrozisin düzensiz dağılımı; akciğer mimarisinin korunması; tekdüze temporal görünüm; hafif interstisyel Kronik inflamasyon	Buzlucam atenüasyonu; konsolidasyon bazal, periferal predominans	Kollajen vasküler hastalık, enfeksiyon, vaskülit (damar iltihabı), sarkoidoz, lenfoma, adenokarsinom
DİFÜZE ALVEOLAR HASAR	Difüze dağılım, tekdüze temporal Görünüm, organize fibroz nedeniyle alveolar septal kalınlaşma, havayolu organizasyonu, hiyalin membranlar	Buzlucam atenüasyonu, konsolidasyon	Akutsolunum sıkıntısı sendromu, enfeksiyon, hidrostatik ödem, kanama
LİP	Alveolar septanındifüze Lenfoplazmasitik infiltrasyonu	Buzlu cam atenüasyonu, kist	DIP, NSIP, hipersensitivite pnömonisi
İPPFE	İntraalveolar fibroz ile birlikte elostatik fibroz	Yoğun subplevral üst-lob konsolidasyonu	Familyal pulmoner fibrozis, kronik hipersensitivitepnömonisi

İİP hakkında yapılan genetik çalışmaların bu hastalıkların anlaşılmasında katkısı olmuştur. Bu gibi çalışmalarla belirlenen mutasyonlar, yatkınlık ve risk alelleri sayesinde familyal ve sporadik İİP'lerin daha iyi tanımlanması mümkün olmuştur. Hastalıkla ilişkilendirilen genetik aberasyonlar, sürfaktan işlemi bozuklukları, ER (Endoplazmik Retikulum) stresi, immün bozukluklar ve telomer uzunluğunun korunması gibi durumların tip II alveolar hücrelerin fonksiyonlarının yerine getirilmesinde önemli bir yere sahip biyolojik süreçlerle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (36). İİP hastalıkları ile ilgili moleküler çalışmalar halen sürmektedir. Bu gibi çalışmaların, klinik olarak birbirine benzer olan hastalıkların

ayırımına veya hastalıkların tanısı ve prognozu hakkında bilinmeyenlerin elde edilmesine ışık tutacağı düşünülmektedir.

2.2.1. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis

İdiyopatik Pulmoner Fibrozis, İdiyopatik İnterstiyel Pnömonilerin en yaygın görünen tipidir. İPF, akciğerde progresif skarlaşma ile karakterize prognozu kötü seyreden bir hastalıktır. Hastalarda artan bir şekilde öksürük ve dispne görülmekle beraber bu durum hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Hastalığın nedeni bilinmemekte ve bu konuda araştırmalar halen sürmektedir. Hastalık, dünyada yaklaşık 3 milyon bireyi etkilemekte ve genellikle bu bireylerin çoğunu erkek bireyler oluşturmaktadır (4, 37). İPF hastalığını ortadan kaldırabilecek kesin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır, bu nedenle kritik durumlarda en etkili yöntem olarak akciğer transplantasyonu yapılmaktadır. İPF'nin familyal ve sporadik formları bulunmaktadır, bunlardan familyal forma sahip hastalarda genellikle çeşitli mutasyonlar görülmektedir.

2.2.1.1. İPF'nin Tarihçesi

Hastalık ilk olarak 1900'lerin başında ölen hastalarda yapılan incelemelerle, akciğerde küçülme, yara oluşumu ve bal peteği görünümü gibi oluşumların tespiti ile fark edildi (38). 1940'lı yılların sonunda ise ilk defa "İPF" terimi ortaya çıktı. Ancak bununla birlikte aynı hastalığı tanımlamada hastalığın belirtilerine vurgu yapan birçok terim de kullanılmıştır. İPF hastalığını detaylı bir şekilde tanımlayan ilk bilim adamları Hamman ve Rich yeni bir histolojik ve patolojik durum olarak hastalığı açıklayarak birçok İPF vakasının tespit edilmesine yardımcı olmuştur (38).

1970'lerde "İdiyopatik Fibrozing Alveolit" kavramı ortaya çıkmış, bu terim aynı zamanda UIP (Usual Interstitial Pneumonia) ile aynı olan histolojik paterni tanımlamak için de kullanılmıştır. 1975 yılında ise Averill Leibow histopatolojik olarak İİP'lerin sınıflandırılmasını ilk yapmıştır. Burada ayrıca "UIP" terimini yaygın bir histolojik patern olarak, genellikle yetişkinlerde görülen ve değişik şekillerde lobülleri etkilediğine de dikkat çektirmiştir. 1990'lı yıllarda İİP'ler daha iyi anlaşılarak İPF hastalığının diğerlerinden ayrımı ve daha iyi anlaşılması konusunda gelişmeler yaşanmıştır (38). Günümüzde ise birçok ülkedeki solunum hastalıklarıyla ilgili kuruluşlar ve hastalık hakkında araştırma yapan bilim insanlarının katkısıyla İPF'nin bilinmeyen yönlerini aydınlatma konusundaki çabalar sürmektedir.

2.2.1.2. İPF'de Derecelendirme Sistemleri

İPF prognozu kötü seyreden ve mortalitesi yüksek olan bir hastalıktır. Bu sebeple hastalığın prognozunun tespiti, klinik olarak uygulanacak tedavi yöntemleri konusunda bilgi sahibi olunmasına katkı sağlamaktadır. Bu sebeple yıllardan beri yapılan araştırmalar sayesinde çeşitli derecelendirme (skorlama) sistemleri oluşturulmuştur ve bu skorlama sistemleri sayesinde mortalite riskinin de değerlendirilebilmesi mümkün olmuştur (Çizelge 2.2). Ancak günümüzde tüm dünyanın kabul ettiği ve validasyonu kesin olarak sağlanmış genel bir İPF derecelendirme sistemi bulunmamaktadır (6).

Hastalar ile ilgili elde edilen klinik, patolojik ve fizyolojik veriler ile oluşturulan skorlama sistemleri ile hastalara uygulanacak tedavi yaklaşımları, ilerleyişi ve sağ kalım hakkında tahmini bilgiler elde edilebilmektedir.

Çizelge 2. 2. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis'te skorlama sistemleri.

SKORLAMA SİSTEMİ	DEĞİŞKENLER	TAHMİNİ DEĞER	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
COMPOSITE PHYSIOLOGICAL INDEX (CPI)	Tah. % DLCO Tah. % FVC Tah. % FEV1 Morfolojik kapsamla korelasyon: CPI= 91.0 -(0.65xDLCO) -(0.53xFVC) + (0.34xFEV1)	Mortalitenin tahmininde özgün fonksiyonel değişkenlerden daha kesindir.	Amfizemin çelişen etkilerinin doğrulanması	Retrospektif veriler; DLCO'da değişken ölçütü; henüz tekrarlanamamıştır
DU BOIS VE ARK. MODELİ	Yaş (0-8 puan) 24-hafta respiratuvar hospitalizasyon öyküsü (0 veya 14 puan) Tah % FVC (0-18 puan) FVC'de 24-hafta değişim (0-21 puan)	1 yılllık mortalite riski Total Skor Örnekleri: • 0–4 puan: <%2 • 22–29 puan: %10–20 • 38–40 puan: %40–50 • >50 puan: >%80	Longitudinal değişkenlerin kolay ve güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi	Kohortlarda sadece temelde hafiften ortaya fizyolojik bozukluklar ile ve şiddetli amfizemin dışlanması ile değerlendirilir
GENDER-AGE-PHYSIOLOGY (GAP) MODELİ	Cinsiyet (0-1) Yaş (0-2) Tah. % FVC (0-2 puan) Tah. % DLCO (0-3 puan)	1, 2, 3. Yıllarda kümülatif mortalite 1-yıllık mortalite riski örnekleri: Stage I (0–3 puan): %6 Stage II (4–5 puan): %16 Stage III (6–8 puan): %39	Eklenti aracı olarak daha kesin risk değerlendirmesi için GAP hesaplayıcı harici olarak valide edildi	Retrospektif veriler; Olası yanlılık yönlendirmesi (akademik merkezler); Riski olduğundan fazla gösterme eğilimi
LONGITUDINAL GAP MODELİ	Cinsiyet (0-1) Yaş (0-4) Tah. % FVC (0-15 puan) FVC'de rölatif 24-hafta değişim (0-12 puan) Tah. % DLCO (0-23 puan) Respiratuvar hospitalizasyon (son 24 hafta) (0 veya 24 puan)	1 ve 2-yıl mortalite riski 1-yıl mortalite riski örnekleri: - 0-1 puan: <%2 - 27-34 puan: %10-20 - 43-45 puan: %40-50 - 55-60 puan: ≥%80	Longitudinal risk değerlendirmesi; prospektif veriler	Eksternal değerlendirme bulunmamaktadır
CT-GAP MODELİ	Cinsiyet Yaş Tah. % FVC Semi-kantitatif BT Fibrozis skoru	1, 2, 3 yıllarda kümülatif mortalite 1-yıllık mortalite riski: Stage I (0–3 puan): %5 Stage II (4–5 puan): %19 Stage III (6–8 puan): %43	Orijinal GAP modeliyle karşılaştırılabilir doğruluk; DLCO ölçülemediği veya bulunmadığı zaman alternatif modeldir; eksternal olarak valide edilmiştir	Retrospektif veriler; BT hastalık derecesinin kantifikasyonunda uzmanlık gerektirir

DLCO: Karbonmonksit Difüzyon Ölçümü; FVC: Zorlu Vital Kapasite; FEV1: 1.Sn'Deki Zorlu Ekspiratuvar VolüM; BT: Bilgisayarlı Tomografi; TAH %: Tahmini %.

Skorlama sistemlerinden biri olan CRP (Clinic-Radiologic-Physiologic) skorlama sistemi klinik olarak hastalığın prognozunun değerlendirilmesinde kantitatif bir yöntem olarak önerilmiştir. Dispne, göğüs radyografisi, spirometre, akciğer kapasitesi, difüzyon kapasitesi, dinlenme durumunda alveolar-arteriyal PO_2 (Oksijenin parsiyel basıncı) ve egzersiz O_2 satürasyonu gibi veriler CRP skorlama sisteminde dikkate alınan ölçütler olarak bilimektedir. Bunların dışında CRP sistemi fibrozis, selülarite, granülasyon/ bağ doku birikimi ve patolojik düzensizlik gibi histopatolojik durumların şiddetiyle ilişkili olduğu da belirtilmiştir (39, 40).

2003 yılında Wells ve ekibinin açıkladığı CPI skorlama sistemi de pulmoner fibrozisin morfolojik boyutunun gösterilmesi açısından önem arz etmektedir. Bu skorlama yönteminde İPF hastalarının klinik verilerini ve BT sonuçlarını kullanarak hastalığın mortalitesinin ölçülmesinde etkili olmuştur. CPI, rutin klinikte uygulanma ve sağ kalımın öngörülmesi bakımından CPR sistemine göre daha avantajlıdır. Ancak CPI sisteminde yaş, sigara kullanımı, desatürasyon varlığı veya 6-dk. Yürüme Mesafesi (6DYM) gibi veriler kullanılmadığı için ve prognostik prediktör olası bakımından yeterli araştırmalar olmaması bu sistemin aleyhine bir durumdur (41, 42).

Bunların dışında 2012 yılında Ley ve arkadaşları tarafından klinik kullanım için öne sürülen GAP (Gender-Age-Physiology) indeks sistemi ortaya çıkmıştır. GAP index online olarak da hastalar için hesaplanması yapılabilen mortalite değerlendirme sistemidir (https://www.acponline.org/journals/annals/extras/gap/). Hastaların solunum fonksiyon testlerine ek olarak cinsiyet, yaş ve fizyolojik verilerine göre oluşturulan puanlandırma sistemine dayalı bir yöntemdir. Puanlama aralıkları hastalığın üç evresini oluşturmaktadır ve bu aşamalara göre 1, 2 ve 3 yıllık sağ kalım yüzdeleri oluşturulmuştur (Çizelge 2.3). Böylece klinik ve fizyolojik değişkenlerle hastalığın mortalitesi tahmin edilebilmektedir (3).

Çizelge 2. 3. GAP Skorlama Sistemi.

	PREDİKTÖR	**PUAN**
G	**Cinsiyet**	
	Kadın	0
	Erkek	1
A	**Yaş**	
	≤60	0
	61–65	1
	>65	2
P	**Fizyoloji**	
	FVC, Tahmini %	
	>75	0
	50–75	1
	<50	2
	DLCO, Tahmini %	
	>55	0
	36–55	1
	≤35	2
	Gerçekleştiremeyen	3
Muhtemel Total Puan		**8**

Evre	**I**	**II**	**III**
Puan	0-3	4-5	6-8
Mortalite			
1-yıl	5.6	16.2	39.2
2-yıl	10.9	29.9	62.1
3-yıl	16.3	42.1	76.8

İPF'nin prognozunun takibi açısından bu gibi skorlama sistemleri ile ilgi çalışmalar hastalığa yaklaşım açısından avantaj sağlamakla beraber hastalık için evrensel olarak kullanılan bir sistem bulunmaması da bu yönde araştırmalara devam edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

2.2.1.3. İPF Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Epidemiyoloji

İPF hastalığı İAH'nın en yaygın tipi olarak bilinmekle beraber görülme sıklığı yılda 5/100 000'den az olarak bilinmektedir. Bu hastalık grubunun yaklaşık %17-37'lik kısmını oluşturmasına karşın hastalığın prevalans ve insidansında birçok çalışmada büyük farklılıklar görülebilmektedir (43). Hastalığın prevalansı kesin olarak bilinmemekle beraber insidansı yılda 1,2/100 000 ile 90,6/100 000 arasında değişmektedir (44). Hastalığın prevalansı ve insidansı değişken olmasının yanında birçok ülkede artış görülmektedir. Örneğin, ABD ve Kanada'da yapılan bir araştırmada elde edilen verilere göre prevalans 2005 yılında 13,4/100 000 iken 2010 yılında 18,2/100 000 şeklinde bulunmuştur. Bunun yanında hastalığın insidansı 2005 yılında 7,9/100 000 iken 2010 yılında ise bu değer 5.8/100 000 olarak tespit edilmiştir (45). Bunlara ek olarak, Musellim ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yayınlanan Türkiye'de yürütülen, 19 şehirden 2245 yeni tanı almış hasta ile yürütülen bir araştırma sonucunda İAH'ların %23,8'i bilinen nedene bağlı İAH, %39,4'ü granülomatöz grup, %4,4'ü ise sınıflandırılamayan grup olarak bulunurken, İPF hastalığı ise %23,7 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 25,8/100.000 olarak bulunan hastalık insidansı erkeklerde 24,7/100 000 kadınlarda 27,0/100 000 şeklinde görülmüştür (46).

Risk Faktörleri

İPF'nin ortaya çıkış sebebi tanımlanamamasına rağmen hastalığın oluşumuna etki ettiği düşünülen birçok faktör çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir. Bu sayede hastalığın oluşum mekanizmaları hakkında daha fazla bilgi elde edilmiştir. Bununla birlikte alveolar epiteliyal hücrelerde (AEH) bazı çevresel faktörlerin etkisiyle akciğer lezyonları oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 2.3). AEH'lerde tekrarlayan yaralanmalar ise apoptoz, nekroz ve senesens oluşumuna sebebiyet vermektedir.



Şekil 2. 3. İPF ile İlişkili Akciğer Lezyonlarını Oluşturabilecek Faktörler (47).

Homeostazın bozulması ve immünolojik mekanizmalardaki problemlerle birlikte dokunun onarılamaması, sorunlu epiteliyal mezenkimal etkileşimlere ve bunun sonucunda da pulmoner fibrozise neden olmaktadır (47).

a) Sigara

Yapılan araştırmalar sigara kullanımının İPF oluşumunda önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Daha önce sigarayı kullanıp bırakmış ve 21-40 pk/yıl sigara kullanmakta olan hastalarda İPF oluşum riski hiç kullanmayanlara göre anlamlı derecede yükselme göstermektedir. Bir araştırmada ise sigara kullanan bir kişinin İPF gelişimi için riskinin %60 artış gösterdiği bulunmuştur (48). Son zamanlarda yürütülen bleomisin ile indüklenmiş fare modeli çalışmasında ise sigara dumanı ekstraktı ile muamele edilen fareler kullanılmış ve sonuç olarak sigaranın akciğer fibroblastları ve plevral mezoteliyal hücrelerde kolajen-1 sentezi ve hücre proliferasyonunun yanı sıra p-Smad2/3 ve p-Akt aktivasyonunu indükleyebileceği öne sürülmüştür. TGF-β-Smad2/3 ve Akt sinyallenmesinin sigara ile bleomisin ile muamele edilmiş farelerin akciğerlerinde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da sigaranın bleomisin modelinde pulmoner fibrozisi TGF-β sinyallenmesi aracılığıyla etkilediğini göstermektedir (49). Bunlar gibi birçok çalışma sigara maruziyetinin İPF de dahil İAH ile ilgili çok önemli bir risk faktörü olduğu ve hastalığın prognozu ile ilişki olabileceği yönünde güçlü bir kanıt taşımaktadır.

b) Yaş

İPF hastalığının insidans ve prevalansı yaş ile artmakla birlikte 45 yaş altı bireylerde nadir olarak görülmektedir. Hastalığın teşhisi ise genelde 60 yaş üzerindeki bireylerde tespit edilmektedir (50). Genomik instabilite, telomer kısalması, epigenetik değişimler, mitokondriyal bozukluklar ve hücre senesensi gibi faktörler yaşlanmanın belirtilerindendir ve İPF oluşumunda etkisi olduğu bilinmektedir. Ancak bu mekanizmalar İPF dışındaki farklı yaşlanmayla ilişkisi olan akciğer türlerinde de mevcuttur. Bu da İPF'nin ortaya çıkmasının genetik yapıdaki alterasyonlar ve epigenetik mekanizmalar sonucu alveolar epiteliyal hücrelerin bütünlüğünün kaybı ile ortaya çıktığını da düşündürmektedir (51). Hücre yaşlanması ile epiteliyal hücreler fazla miktarda büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve MMP'ler salgılarlar ve bu da fibroblastların kalıcı ve anormal aktivasyonuna ve yeniden yapılanmasına sebep olarak hastalığın oluşumuna zemin hazırlamaktadır (52).

c) Cinsiyet

Birçok çalışma İPF'nin tüm dünyada erkek bireylerde kadınlara oranla daha çok görüldüğünü göstermektedir. Ancak bu sonucun biyolojik bir eğilim yüzünden mi yoksa davranışsal ve çevresel faktörlerin etkisiyle mi ortaya çıktığı henüz bilinmemektedir (4). Bununla birlikte yaş ve cinsiyet İPF için oluşturulan skorlama sistemlerinde göz önüne alınan veriler arasındadır.

d) Mesleki ve Çevresel Maruziyet

İPF ile ilgili yürütülen birçok araştırma bazı mesleki ve çevresel maruziyetlerin hastalık ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur. Ahşap işçiliği, marangozluk, kimyasal duman ve tozlar, çiftçilik, hayvan yetiştirme ve pestisitlere maruziyet gibi birtakım faktörler de İPF'nin gelişimine etkisi olduğu belirtilmektedir (53). Başka bir çalışmada yine gösterilmektedir ki metal tozları, duman ve organik tozlar UIP için risk faktörü oluşturmaktadır. Yemler ve hayvan atıkları gibi kaynaklardan oluşan organik toz ve aerosolize partiküllerin tarım çalışanları, veterinerler ve bahçıvanları hastalık oluşumu açısından olumsuz etkilediği bildirilmektedir (54). Asbest, kömür tozu, kaya ve kum, berilyum ve kobalt gibi faktörlerin de İPF de dahil İAH'nın insidansını yükseltmektedir (55). Bunların dışında hava kirliliğinin de İPF hastalığını etkilediği düşünülmektedir (56).

d) Enfeksiyon

Virüs ve bakteriler, epiteliyal hücre hasarı ve apoptoz oluşumu bakımından hastalık gelişimine sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar hastalığın başlangıcı ve gelişiminde virüslerin etkisi olabileceğini hatta akut alevlenmeye bile sebebiyet verebileceğini ortaya koymuştur. Bakterilerle ilgili çalışmaların hastalığın patogenezine katkısı tam olarak açıklanamasa da başka solunum yolu hastalıklarıyla ilgili çalışmalar akciğer mikrobiyatasındaki değişimlerin hastalıkla ilişkili olabileceğini belirtmektedir (57). İPF'nin başlangıcı, patogenezi ve progresyonuna etki edebileceği düşünülen virüsler ele alındığında Hepatit C virüsü (HCV), Turque Teno (Transfussion Transmitted Virus, TTV) virüsü, adenovirüs, Herpes virüsü (Human Herpes Virus, HHV)'nün bazı türleri yapılan çalışmalarda öne çıkmaktadır. HCV'nin bazı akciğer hastalıklarında yaygın olduğu söylenmektedir, fakat İPF ile ilgili yapılan bir çalışmada HCV'nin hastalıkla ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Diğer yandan adenovirüs'ün adenoviral E1A proteiniyle profibrotik TGF-β salınımını ve EMT'yi etkileyerek İPF hastalığının oluşumuna katkı sağladığı ileri sürülmüştür. TTV'nin hastalığın patogenezi ile ilişkisi tam olarak belli olmamasına rağmen yapılan araştırmalar Akut Alevlenme (AA) ile bir bağlantısı olabileceği konusunda bir fikir sağlamaktadır. HHV'nin İPF ile ilişkisi araştırıldığında ise bu gruptan Epstein-Barr Virüsü (EBV), Sitomegalovirüs ve HHV-8'in hastalıkla ilgili olabilecek HHV türleri olabileceği söylenebilir. Yapılan çalışmalar sonucunda EBV geni ve proteinlerinin (anti-EBV IgG gibi) hastaların akciğerlerini enfekte ettiği bulunmuştur (58,59).

e) Genetik Faktörler

Yapılan genetik araştırmalar sonucunda birçok nadir ve yaygın genetik varyantların hastalığın familyal ve sporadik formlarında bulunduğunu ortaya koymakla birlikte birçok genetik faktör FPF ile daha çok ilişkilendirilmektedir. FPF ve sporadik formu klinik ve histolojik değerlendirmelerle birbirinden ayrılamamakla birlikte FPF formu daha erken yaşlarda görülmesininin yanında radyolojik olarak bazı farklılıklar gösterebilmekte ve otozomal kalıtım paterni gösterdiği öne sürülmektedir (9). Alveolar instabilite, hücre senesensi, konak savunması, epiteliyal bütünlük (hücre-hücre adezyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu) ve telomer biyolojisine bağlı mekanizmalarla ilişkili meydana gelen mutasyonların hastalık riski ve fenotipini etkilediği yapılan birçok çalışma sonucu literatürde yerini almıştır (1).

2.2.1.4. İPF'nin Tanısı

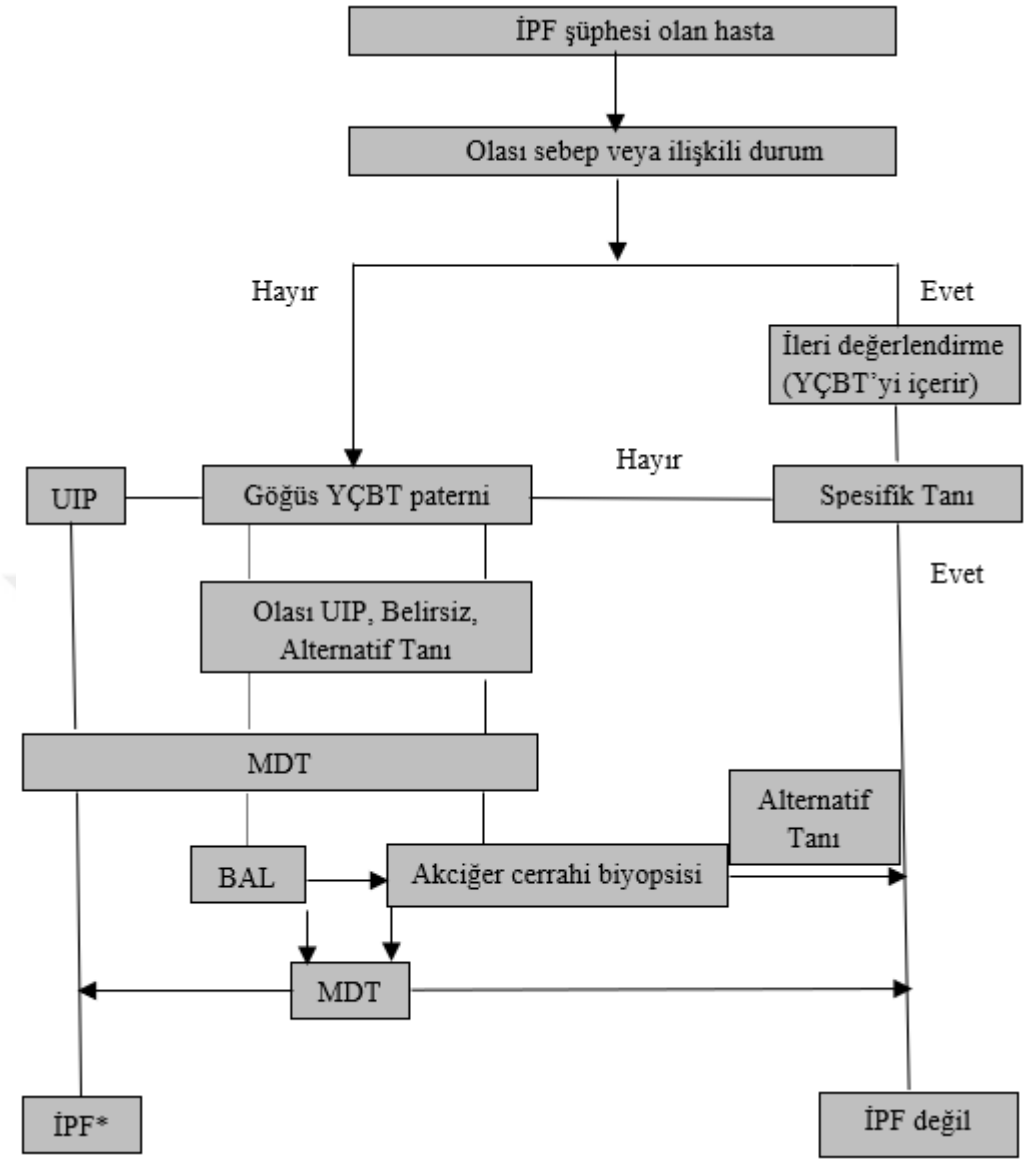
ATS, ERS, JRS (Japanese Respiratory Society) ve ALAT (The Latin American Thoracic Association) topluluklarının İPF'nin tanısı için resmi olarak bir rehber yayınlamasının ardından tüm dünyada ortak olarak kabul görmüş, ardından yine aynı grup tarafından 2011 yılında yayınlanan bu rehber revize edilerek 1 Eylül 2018 tarihinde resmi olarak yayınlanmıştır.

Yüksek Çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (YÇBT) İPF'nin tanısının ortaya konmasında önem teşkil etmektedir. UIP, İPF'nin histopatolojik paternidir. UIP'de çoğu zaman Buzlu Cam Opasifikasyonunun (BCO) ve ince retikülasyonunun eş zamanlı varlığı ile görülebilen bal peteği görünümü, traksiyon bronşektazisi ve traksiyon bronşiyolektazisini içeren YÇBT özellikleri görülür. Patolojik değerlendirmeler sonucunda da yer yer BCO ve retikülasyonların varlığı tanı koymada yardımcı olan UIP paternini göstermektedir. Diğer önemli bir husus da "Saf" BCO ve ince bir retiküler paternde BCO'nun arasındaki ayırımı iyi yapmaktır. "Saf" BCO UIP'nin tipik özelliklerinden biri değildir, ancak İPF'li hastalarda varlığı Akut Alevlenme ihtimalini artırabilirken ince bir retiküler paterne yerleştirilmiş BCO fibrozisi göstermekte ve İPF'li hastalarda görülebilmektedir. Traksiyon broşektazisi/ bronşiyolektazisinin olması bu ikisi arasında ayırıma yararı olmaktadır. 2018'de ATS/ERS/JRS ve ALAT'ın yayınladığı rehberde, İPF tanısı için öneriler 2011 ile karşılaştırmalı bir biçimde verilerek hastalığın daha iyi anlaşılmasına katkı sağlanmıştır (çizelge 2.4) (60,61).

Çizelge 2. 4. ATS/ERS/JRS ve ALAT'ın İPF Tanısı için Hazırladığı 2011 ve 2018 yılı Rehberlerindeki Önerilerinin Karşılaştırılması.
BHA; BAL Hücresel Analizi, CAB; Cerrahi Akciğer Biyopsisi, MMP-7; Matriks Metaloproteinaz-7, SPD; Sürfaktan Protein D, TAB; Trasbronşiyal Akciğer Biyopsisi (61).

	2018 Rehberi		**2011 Rehberi: Farklı HRCT paternleri ile hastalar arasında ayırım yapılmamıştır**
	Olası UIP, Belirsiz UIP ve Alternatif Tanı YÇBT paterni	**UIP'nin YÇBT Paterni**	
BAL Hücresel Analizi	BHA uygulanması önerilmektedir (koşullara bağlı)	BHA uygulanması önerilmemektedir (koşullara bağlı)	Hastaların çoğunda İPF'nin diyagnostik değerlendirilmesinde uygulanmamalıdır, ancak hastaların küçük bir kısmında uygulanabilir
Cerrahi Akciğer Biyopsisi	CAB uygulanması önerilmektedir (koşullara bağlı)	CAB uygulanması önerilmemektedir (koşullara bağlı)	UIP ile uyumlu YÇBT paterni olan hastalarda gerekmemektedir
Trasbronşiyal Akciğer Biyopsisi	TABlehinde veya buna karşı görüşte hiçbir öneride bulunulmadı	TAB uygulaması önerilmemektedir (kuvvetli)	Hastaların çoğunda İPF'nin değerlendirilmesinde kullanılmamalıdır, ancak hastaların küçük bir kısmında uygulanabilir.
Akciğer Kriyobiyopsisi	Akciğer kriyobiyopsisi lehinde veya buna karşı görüşte hiçbir öneride bulunulmadı	Akciğer kriyobiyopsisi uygulaması önerilmemektedir (kuvvetli)	Ele alınmadı
İlaç Öyküsü ve Çevresel Maruziyet	Potansiyel İAH'nı dışlamak için hastaların ilaç öyküsünün yanında ev, iş yerleri ve sık ziyaret ettikleri yerlerdeki çevresel maruziyetlerin detaylı bir şekilde ele alınması önerilmektedir (bilinen ifade)		İPF tanısı için İAH'nın diğer bilinen sebepleri (domestik ve mesleki çevresel maruziyetler, bağ doku hastalığı, ilaç toksisitesi gibi) dışlanmalıdır.
Bağ Doku Hastalığını Dışlamak için Serolojik Test	Bu test bağ doku hastalıklarının İAH'nın potansiyel bir sebebi olarak dışlanması bakımından önerilmektedir (bilinen ifade)		İPF tanısı için İAH'nın diğer bilinen sebepleri (domestik ve mesleki çevresel maruziyetler, bağ doku hastalığı, ilaç toksisitesi gibi) dışlanmalıdır.
Multidisipliner Tartışma	Karar alınması için önerilmektedir (koşullara bağlı)		İPF'nin değerlendirilmesinde kullanılmalıdır
Serum Biyobelirteçleri	İPF'nin diğer İAH'dan ayırımını sağlamak için MMP-7, SPD, CCL-18 veya KL-6 serum ölçümü tavsiye edilmemektedir		Ele alınmadı

UIP paterninin YÇBT özelliklerine göre UIP, olası UIP, belirsiz UIP ve alternatif tanı olarak kategorize edilmiştir ve İPF'nin tanı algoritmasında kullanılmaktadır. İPF için oluşturulan algoritma, İPF tanısının konulmasında yardımcı olmaktadır (Şekil 2.4) (60,61).



Şekil 2. 4. İPF Tanı Diyagramı.
MDT; Multi Disipliner Tartışma. *ATS/ALAT/JRS ve ALAT'ın için 2018 yılında yayınladığı tanı rehberinde koşullar açıklanmıştır (61).

2.2.1.5. İPF Akut Alevlenmesi (AA-İPF)

AA-İPF, yeni ve yaygın anormalliklerin belirtileri ile karakterize olan, akut ve klinik olarak anlamlı respiratuvar bozulmaları tanımlamaktadır. AA-İPF'nin klinik, radyolojik ve histopatolojik değerlendirmeleri göz önünde bulundurulduğunda tanı kriterleri 30 günden daha az sürede klinik bozulma, YÇBT'de yeni radyolojik anormalitelerin (bilateral BCO/konsolidasyonu gibi) farkedilmesi ve diğer sebeplerin (enfeksiyon, pulmoner emboli ve kalp yetmezliği gibi) dışlanmasını içeren bulgular kategorizasyon yapılmaksızın AA-İPF olarak adlandırılır. Bunun yanında akut alevlenmelerin, durumu indükleyen bir tetikleyici

bulunup bulunmamasına göre "tetiklenmiş" ve "idiyopatik" olarak alt kategorilere ayrılmaktadır. İPF için kötü prognoza sebep olmakla birlikte sağ kalımı büyük ölçüde etkilemektedir. AA-İPF görülen hastalar ortalama 3-4 ay içinde hayatını kaybedebilmektedirler (62).

AA-İPF, akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) ile bir takım patofizyolojik özellikleri paylaşmaktadır. ARDS, pulmoner vasküler geçirgenliğin ve akciğer ağırlığının artması ve gözenekli akciğer dokusunun kaybına yol açan bir tür akut difüze, inflamatuvar akciğer hasarıdır. AA-İPF'de difüze alveolar hasarın varlığı söz konusu iken ARDS için de aynı şey söylenmektedir, ancak bu özellik biyopsi sonuçlarına göre ARDS bulunan hastaların yaklaşık yarısında bulunmuştur. Bunun gibi ARDS ve AA-İPF'nin birçok benzer ve ortak yönleri bulunması sebebiyle ARDS ile ilgi elde edilen bilgilerin AA-İPF'nin kontrolünde göz önünde bulundurulmalıdır (63).

AA-İPF için risk oluşturabilecek durumlar göz önünde bulundurulduğunda KL-6 konsantrasyonu, sekonder pulmoner hipertansiyon, hava kirliliği maruziyeti (beraberinde oksidatif stres artışı) ve mevsim değişikliği (kış ve son baharda yaygın) potansiyel risk faktörleri olarak değerlendirilebilir (64). AA-İPF için tedavi sınırlıdır. Tedavi önerisi olarak destekleyici bakım ile kortikosteroid tedavisi, geniş spektrumlu antibiyotikler ve bazen de ek olarak immün supresyon yeterli kanıt bulunmamakla birlikte tavsiye edilmektedir. Yeni tedavi yöntemleri olarak da inflamatuvar ve fibrojenik aracılar, otimmünite ve fibroblast proliferasyonu üzerinde durulmaktadır (65).

2.2.1.6. İPF ve Ko-Morbiditeler

İPF ile ilişkili yürütülen çalışmalarda pulmoner ve ekstra-pulmoner olarak nitelendirilen bazı hastalıkların bu hastalıkla beraber diğer hastalıklara göre daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Pulmoner komorbiditeler arasında pulmoner hipertansiyon, amfizem, KOAH (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı) ve akciğer kanseri gibi hastalıklar bulunurken venöz tromboemboli, koroner arter hastalığı, konjestif kalp yetmezliği, uykuda solunum bozukluğu, GÖRH (Gastroözofageal Reflü Hastalığı), anksiyete veya depresyon ise ekstra-pulmoner komomorbiditeler arasında bulunmaktadır. Komorbiditeler İPF'li hastalarda çok görülmekle birlikte prognozu akciğer kanseri ve kardiyak hastalıklar sağ kalımla ilişkilendirilirken GÖRH gibi hastalıkların prognoza etkisi diğerlerine göre daha iyi yönde

olabilmektedir. Bu komorbiditelerin İPF hastalarında prevalansı çalışılan populasyon ve tanı ölçütlerine göre değişken olabilmektedir (çizelge 2.5) (66, 67).

Çizelge 2. 5. İPF hastalarında görülen komorbiditeler ve bunların prevalansı. KOAH; Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (66,67).

KOMORBİDİTE	TÜR	PREVALANS (%)
Obstrüktif uyku apnesi	Non-pulmoner	5,9-91
GÖRH	Non-pulmoner	0-94
Pulmoner Hipertansiyon	Pulmoner	3-86
KOAH	Pulmoner	6-67
Diyabet	Non-pulmoner	10-42
Depresyon-Anksiyete	Non-pulmoner	21-49
Pulmoner Emboli	Pulmoner	3-6
Kongestif Kalp Yetmezliği	Non-pulmoner	4-26
Koroner Arter Hastalığı	Non-pulmoner	3-68
Akciğer Kanseri	Pulmoner	4-23
Venöz Tromboemboli	Non-pulmoner	2-3
Sarkopeni	Non-pulmoner	Tam olarak tanımlanamamış ancak yaygındır

Bu komorbiditelerin bazıları İPF hastalığı ortaya çıkması durumunda ortaya çıkarken bazıları da hastalığın risk faktörlerine bağlı olarak görülebilmektedir. Sebebi ne olursa olsun bu komorbiditeler İPF hastalarında patogenezin yanı sıra bireylerin yaşam kalitesi hakkında da bilgi vermektedir. Bu hastalıkların bazılarının etkisinin İPF hastalarında ne gibi sonuçlara sebep olacağı tam olarak kesin değildir, ancak komorbiditelerin tedavi edilmesi İPF hastalarının yaşam kalitesini artırması bakımından önemlidir. Sonuç olarak İPF hastalarında genel olarak bir veya daha fazla hastalığın eşlik ettiği ve bu hastalıkların da İPF'de prognoz üzerinde farklı etkiler oluşturduğu tespit edilmiştir. İPF'ye eşlik eden bu hastalıkların da yaygın olarak kardiyovasküler, metabolik, gastroenterolojik ve neoplastik türden hastalıklar olduğu görülmüştür (68).

2.2.1.7. İPF'nin Patogenezi

İPF'nin patogenezi kesin olarak bilinmemektedir ancak genetik ve epigenetik çalışmaların hastalığın patogenezine katkı sağladığı söylenmektedir. Hastalığın patogenezi epitelyum ve mezenkim arasında hatalı etkileşim sonucu oluşmaktadır. Başlangıçta epiteliyal hücrelerde yara oluşumu ve bunu da ER ile bağlantılı stres yanıtı ve apoptoz takip etmektedir. Rejeneratif kapasitenin bozulmasıyla epiteliyal onarım zarar görmekte, ardından mezenkimal

hücreler çoğalmakta ve ECM birikimine sebebiyet vermektedir. Farklı orijinden oluşabilen bu hücrelerde epiteliyal-mezenkimal transisyon, dolaşımda olan fibrositler veya inflamatuvar sitokinler gibi faktörlerle hücrelerin aktivasyonu oluşabilmektedir. Tüm bu oluşumlar sonucunda ise fibrotik doku ile akciğer parenkimal dokunun aşamalı olarak değişimiyle sonuçlanmaktadır. Hücresel aktivite proteinlerin gereğinden fazla eksprese olmasına ve ER stresine öncülük ederek homeostazın bozulmasına sebebiyet vermektedir. ER'de yeniden düzen oluşturmada UPR (Unfolded protein response), protein translasyonunu inhibe etmek ve degradasyonları için onları hedeflemek üzere oluşturulan bir mekanizmadır, ancak stresin sürekliliğinde hücreyi apoptoza götürmek üzere tasarlanmıştır. UPR aktivasyonu hücrelerin tam olarak anlaşılmamış çeşitli davranışlar sergilemesine neden olmaktadır. Ayrıca UPR, CCL2 (Chemokine C-C Motif Ligand), CXCL12 (C-X-C Motif Chemokine), PDGF (Platelet-derived growth factor), TGF-β gibi çeşitli profibrotik aracıların üretiminde görevlidir.

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalardaki değişimler de gen ekspresyonunu değiştirerek hastalığın patogenezine katkıda bulunmaktadır. DNA metilasyonlarındaki alterasyonlar sonucu genlerin sitozin rezidülerinde hipo- veya hiper-metilasyon oluşarak hastalık oluşumuna katkı sağlamaktadır. Özellikle sigara kullanımı ve yaşlanmanın da bu mekanizma üzerinde olumsuz etki oluşturduğu düşünülmektedir. Bunlara ek olarak bazı miRNA'ların seviyesinde hasta ve kontrol bireyleri arasında farklılık görülmesi de bunların hastalığa epigenetik olarak etki gösterdiğini söylemektedir (69, 70). Literatürde yerini alan ve halen sürdürülmekte olan birçok çalışma hastalığın patogenezinin aydınlatılmasında katkı sağlamaktadır. Böylece İPF hakkında daha çok bilgi sahibi olunarak bireylere uygulanacak tedavi yöntemlerinin de belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu bağlamda kişiselleştirilmiş tıbbın da ne kadar önemli olduğu üzerinde durulan konulardandır.

2.2.1.8. İPF'de Tedavi Yöntemleri

İPF, prognozu kötü seyreden ve yüksek derecede mortaliteye sahip bir hastalıktır. Hastalığın tamamen ortadan kaldırılmasını sağlayacak etkin bir tedavi yöntemi bulunmasa da bu konu da çalışmalar halen sürmektedir. Hastalığın tedavisi için anti-fibrotik ilaçların kullanılması ile birlikte oksijen terapisi, mekanik ventilasyon, pulmoner rehabilitasyon ve akciğer transplantasyonu gibi tedavi yöntemleri tavsiye edilmektedir. Farmakolojik tedavi olarak kesin kullanılması önerilen bir ilaç bulunmamaktadır, ancak nintedanib ve pirfenidon

dünya çapında kabul gören ve kullanılan antifibrotik ajanlar olarak literatürde yerini almıştır (71).

Oksijen Terapisi

Oksijen terapisi İAH'da nefes darlığını azaltmak ve gaz değiş tokuşunun geliştirilmesi yoluyla fiziksel gücü arttırmak için kullanılan bir yöntemdir. Ancak bu yöntemle interstisyel akciğer hastalığına sahip bireylerde egzersiz kapasitesi artmasına rağmen efor sırasında dispne üzerinde kısa süreli oksijen terapisinin akut etkilerinin uyumlu olmadığı bildirilmiştir. Uzun süreli oksijen tedavisi için ise bazı rehberlerde İPF hastaları için önerilmesine rağmen sağ kalıma veya yaşam kalitesinin artırılmasına bir faydası olduğu belirlenememiştir (72).

Genel Ölçümler

İPF'de diğer tedavilere ek olarak beslenme danışmanlığı, diğer akciğer hastalıkları ve komorbiditelere neden olabilmesi ve hastalığın progresyonunu sağlaması sebebiyle sigarayı bırakma yardımı, influenza ve anti-pnömokok aşısı gibi stratejiler de önerilmektedir (73).

Pulmoner Rehabilitasyon (PR)

PR, kronik solunum hastalığı olan bireylerde egzersiz, eğitim ve davranış değişiminin yanında fiziksel ve fizyolojik durumları iyileştirmeye yönelik uygulamaları içeren ve bununla birlikte kişiye özel tedavilerin de bulunduğu kapsamlı hastanın sağlığını geliştirme çalışmalarından oluşmaktadır. PR, hospitalizasyon, dispne semptomları ve bacak ağrıları gibi sorunların azalmasını sağlarken egzersiz kapasitesi, kas ve eklemlerin kuvveti ve dayanıklılığı, yaşam kalitesi, fonksiyonel kapasite, duygusal işlev ve günlük fiziksel aktivitenin artırılmasına yardımcı olmaktadır. Egzersiz eğitimi PR uygulamalarının en önemlilerindendir (74).

Akciğer transplantasyonu

Mevcut durumda yeni anti-fibrotik tedaviler bulunmasına rağmen sağ kalım konusunda tatmin edici bir başarı elde edilememiştir. Ancak akciğer transplantasyonu sağ kalımı arttırabilmektedir. Hastalığın şiddetine, prognozuna ve trasplantasyonu yapılacak olan hastanın transplantasyon için kümülatif riskleri göz önünde bulundurularak akciğer transplantasyonu için karar verilir. Yakın zamanda İPF'de transplantasyon öncesi değerlendirmelerden biri de kromozomal telomer uzunluğu olmuştur. Yapılan araştırmalarda, hastalarda transplantasyon sonrası mortalitede artış olmamasına rağmen bazı

komplikasyonların oluşumu gözlenmiştir. Günümüzde Tek Akciğer Transplantasyonu (SLT) ve Bilateral Akciğer Transplantasyonu (BLT) olarak kullanılan iki yöntem bulunmaktadır. Geçmiş yıllarda SLT uygulanırken son yirmi yılda BLT'a doğru bir yönelim söz konusudur. Ancak BLT'da daha uzun süreli sağ kalım görülmesine rağmen transplantasyon için bekleme sırasında ölüm riskini düşürmek için SLT daha uygun bir yöntemdir (75).

İlaç Tedavileri

İPF ile ilgili farmakolojik tedaviler devam etmekle birlikte kullanılan ilaçlar hastalığın prognozunun kötüye gitmesini engellemeye çalışmak için uygulanmaktadır. Daha önce prednison, azartiopin ve N-asetil sistein ile yapılan üçlü tedavi yaklaşımının İPF hastalarında yanıtı (PANTHER-İPF) değerlendirilmiştir. Tedavi sonucunda mortalite ve hospitalizasyonun artmasında tedaviye ilişkin beklenmeyen şiddetli olumsuz olaylar görülmesi sebebiyle üçlü ilaç rejiminin İPF hastalarında kullanılmaması önerilmiştir (76).

Şu an tüm Dünya'da kabul gören ve klinik rutinde kullanılan nintedanib ve pirfenidon adında iki ilaç bulunmaktadır. Etki mekanzimaları farklı olmasına rağmen ikisi de İPF hastalarında antifibrotik tedavi yöntemi olarak uygulanmaktadır. Eski adıyla BIB 1120 olarak bilinen Nintedanib, akciğer fibrozu gelişimde rol alan VEGF, FGF ve PDGF reseptörleri gibi birçok tirozin kinazı hedef alan bir intraselüler inhibitördür. Nintedanib için yapılan faz II ve faz III (TOMORROW, INPULSIS-1, INPULSIS-2) etkinlik ve güvenilirlik araştırmalarından elde edilen sonuçlara göre FVC'deki düşüşte azalmanın gözlenmesiyle hastalığın progresyonunda düşüş bulunmuştur. Hastalarda genellikle olumsuz durum olarak diyare gözlenmiştir (77).

Klinik rutinde kullanılan diğer bir ilaç olan pirfenidon (5-metil-1-fenil-2-[1H]-pridon)'un TGF-β ve TNF-α (Tümör Nekrozis Faktör-α) aktivitesini düzenleyerek fibroblast proliferasyonunu, kollajen birikimini ve bir takım hücresel ve histolojik markırları azaltarak etki ettiği düşünülmektedir. Pirfenidon'un klinikte kullanımı ile ilgili etkinlik ve güvenilirlik çalışmalarından (ASCEND, CAPACITY 004, CAPACITY 006) elde edilen sonuçlar neticesinde tahmin FVC yüzdesinde, 6DYM testinde ve progresyonsuz sağ kalımda etkisi görülmüş ve hastalığın progresyonunu anlamlı derecede azalttığı belirtilmiştir. Pirfenidon kullanan hasta grubunda yaygın olarak görülen olumsuz durumların gastrointestinal ve cilt ile ilgili olayların olduğu bildirilmiştir (78.79).

Bu iki ilaç İPF hastalarında progresyonu azaltmaya yönelik mekanizmalarla etki etmesinin yanında; iki ilaç arasında anlamlı bir farmakokinetik ilaç-ilaç etkileşimi olmadığı sonucu ortaya çıkması sebebiyle klinikte birlikte kullanılmamaktadır (80).

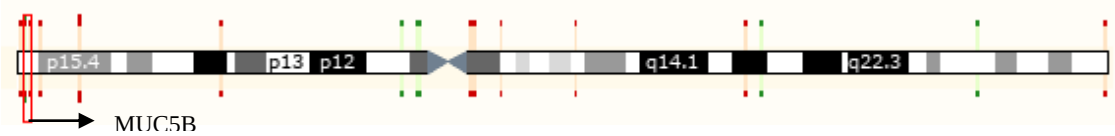
2.2.1.9. İPF ile İlişkili Moleküler Belirteçler

İPF için yürütülen moleküler çalışmalar neticesinde hastalık ile ilişkilendirilebilecek birçok moleküler markır öne sürülmüştür. Ancak bu hastalık için klinik rutinde kullanılan bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Bu sonuçlar da bilim insanlarını bu alanda daha fazla çalışma yapmaya itmiştir. Hastalık için araştırılan biyobelirteçlerin, tanı ve prognozun belirlenmesine yardımcı olmasının yanında hastalığın patogenezinin anlaşılması ve diğer hastalıklardan ayırımının yapılmasını sağlaması amaçlanmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda İPF'nin sprodik ve familyal formu ile ilişkili olan nadir ve yaygın görülen belirteçler ortaya konmuştur. Bunlar alveolar stabilite, konak savunması, hücre-hücre bariyer fonksiyonu ve hücre yaşlanması gibi biyolojik olaylarda görev alan moleküllerdir (1,81).

İPF hastalarının serum seviyeleri ölçüldüğünde KL-6, Sürfaktan protein-A ve -D (SP-A ve SP-D), Matriks Metalloproteinaz-7 (MMP-7), Osteopontin, kemokin ligand-18 (CCL18) gibi epiteliyal veya makrofaj ilişkili proteinlerin seviyelerinin yüksek olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bu gibi potansiyel markırların hastalığın prognozu ve benzer hastalıklardan ayırımı için uygun olabileceği düşünülmektedir (32, 82, 83).

MUCIN 5B (MUC5B)

MUC5B, submukozal bezlerde ve yüzeysel epitelde eksprese olmaktadır MUC5B'yi eksprese eden gen ise 11. Kromozom üzerinde bulunmaktadır (Şekil 2.5) (84). Bu molekülün mukosiliyal atılım için gerekli olduğu ve eksikliğinde hava yolu partiküllerinin birikimi, hava yollarının mukoz tıkanıklığı, enfeksiyon gelişimi riskinde artış ve bozulan makrofaj fagositlerinin inflamasyonu oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. MUC5B promotörü polimorfizminin pulmoner fibrozis gelişimiyle ilişkili olduğu verisi araştırmalar sonucunda ortaya konmuştur. İPF ile ilgili yapılan çalışmalarda rs35705950 promotör varyantının hastalığa yatkınlık, şiddeti ve toplam sağ kalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu SNP İPF'te en çok üzerinde durulan ve birçok popülasyonda incelenen potansiyel moleküler biyobelirteçlerdendir (10, 85).



Şekil 2. 5. MUC5B'nin 11. Kromozomdaki lokasyonu (84).

Sürfaktan Proteinler (SP'ler)

Sürfaktan proteinler tip II alveolar epitelyal hücrelerden salınmaktadır ve lenfatik kanallar yerine kılcal damarlardan direkt olarak kan dolaşımına sızabilmektedir. SP-A ve SP-D hidrofilik glikoproteinler olduğundan dolaşımda görülebilirken SP-B ve SP-C hidrofobiktir ve dolaşımda görülmeleri beklenmemektedir. SP-A ve SP-D pulmoner immün yanıtta önemli rol oynamaktadır ve SP-D'nin pulmoner yüzey geriliminin sürdürülmesinin yanı sıra akciğer parenkimi organizasyonu, stabilitesi ve metabolizmasında görev almaktadır. Bu iki sürfaktan proteinin serum seviyeleri İPF hastalarında anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır ve kötü prognoza sebebiyet verdiği öne sürülmüştür. Bu nedenle İPF'de diyagnostik ve prognostik aday biyobelirteçler arasında çok önemli bir yeri bulunmaktadır (86,87).

Matriks Metaloproteinazlar (MMP'ler)

ECM bileşenlerini degrade eden çinko-bağımlı endopeptidazlar olan MMP'ler, akciğerde inflamasyon aracılarını, latent büyüme faktörleri, antifibrotik büyüme faktörleri, hücre yüzeyini ayıran moleküller ve reseptörleri düzenlemektedir. Çeşitli sınıflara ayrılan MMP'ler pulmoner fibrozis oluşumuna farklı mekanizmalarla etki etmektedirler (Çizelge 2.6).

Çizelge 2. 6. MMP'ler ve Pumoner Fibrozis gelişimine sebep olan mekanizmalar (88, 89).

MMP	Sınıf	Mekanizma
MMP-3, MMP-7	MMP-3: stromelisin/ MMP-7: matrilisin	Epitelyal mezenkimal sinyal transisyonunu arttırma
MM-3, MMP-7 ve MMP-8	MMP-3: stromelisin/ MMP-7: matrilisin/ MMP-8: interstisyel kollajenaz	profibrotik mediatörlerin akciğer seviyelerini veya aktivitesini arttırmak veya antifibrotik mediatörlerin akciğer seviyelerini düşürmek
MMP-3, MMP-9	MMP-3: stromelisin/ MMp-9: jelatinaz	Anormal epitelyal hücre göçünü arttırmak ve diğer aberant onarım uygulamaları
MMP-10, MMP-28	MMP-10: stromelisin/ MMP-28: diğer	Akciğer makrofaj fenotiplerinin M1'den M2 tiplerine geçişine neden olmak
MMP-8	MMP-8: interstisyel kollajenaz	Fibrosit migrasyonunu arttırmak

MMP-7, İPF'de en çok çalışılan MMP'lerdendir ve potansiyel prognostik biyobelirteç olarak akciğer fonksiyonundaki kötüleşmenin tahmini için uygun olabileceği önerilmiştir. MMP-1 ve MMP-7'nin İPF'yi diğer kronik akciğer hastalıklarından ayırımında kullanılabilecek biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca MMP-10'un da hastalığın prognozu ve şiddetini göstermede yararlı olabileceği bildirilmiştir (88, 89, 90).

Büyüme Faktörleri

Pulmoner fibrozis ile ilişkili olan büyüme faktörleri hücre proliferasyonu ve fonksiyonlarını düzenlemede görev almaktadırlar. İPF'li AEH'lerde büyüme faktörlerinin MMP'lerin salınımı ve apoptozu arttırarak proliferasyonun inhibisyonu gibi görevleri bulunmaktadır. TNF-α, PDGF, TGF-β, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ve insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP), Endotelin-1 (ET-1) ve CTGF gibi büyüme faktörlerinin fibrogenezisin başlangıç ve sürdürülmesinde önemli rolü olduğu belirtilmiştir (91). İPF'de önemli rol oynayan TGF-β, İPF'li akciğer dokusunda aşırı anlatımı yapılan ve Epiteliyal Mezenkimal Transisyon yolağında önemli bir büyüme faktörüdür. TGF-β ayrıca SNAI1, SNAI2, ZEB1 ve ZEB2 gibi transkripsiyonel represörlerini de indüklemektedir. İPF epiteliyal hücrelerinde TGF-β sinyal yolağı genlerinin ekspresyonunun yüksek olduğu ve böylece TGF-β sinyallenmesinin anormal aktivasyonuna yol açması hastalıkla bağlantısını açıklamaktadır (92).

Plasminogen Activation Inhibitor-1 (PAI-1)

Serin proteazlar inhibitör gen ailesinden olan PAI-1, uPA (urokinase-type plasminogen activator) ve tPA (tissue type plasminogen activator)'nın inhibitörüdür. PAI-1 ekspresyonu TGF-β, interlökin-1-β, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), insülin, lipopolisakkarit (LPS) ve lipoproteinler gibi faktörler tarafından regüle edilir (93). Yapılan çalışmalarda PAI-1'ın genetik veya farmakolojik faktörlerle hedef alınarak akciğer fibrozunun engellenebileceği düşünülmektedir (94).

TOLL-Interacting Protein (TOLLIP)

TOLLIP, innat immün sistemin düzenlenmesinde görevli bir inhibitör adaptör proteindir. Yapılan çalışmalar neticesinde İPF hastalarında TOLLIP'de bulunan üç SNP'nin (rs5743890, rs5743894 ve rs111521887) İPF hastalığı ile ilişkisi tespit edilmiştir ve bunlardan rs5743890'ın minör allelinin İPF gelişiminden koruduğu ancak var olan İPF hastalarında ise sağ kalımın azalması ile ilgisi olduğu bildirilmiştir (81).

Epigenetik Faktörler

İPF gelişiminde genetik ve epigenetik faktörlerin birlikte hastalığa etki ettiği bilinmektedir. Epigenetik mekanizmaların T_{h1}, T_{h2}, T_{reg} ve T_{h17} gibi hücreler üzerinde etkisi olan transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını ve sitokinlerin gen anlatımını etkilediği bilinmektedir. İşte bu genetik mekanizmaların İPF hastalarında gen anlatımının değiştiği düşünülmektedir.

DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve mikoRNA'lar (miRNA) gibi epigenetik faktörler hastalığın patolojisinin anlaşılmasında önem teşkil etmektedir (95).

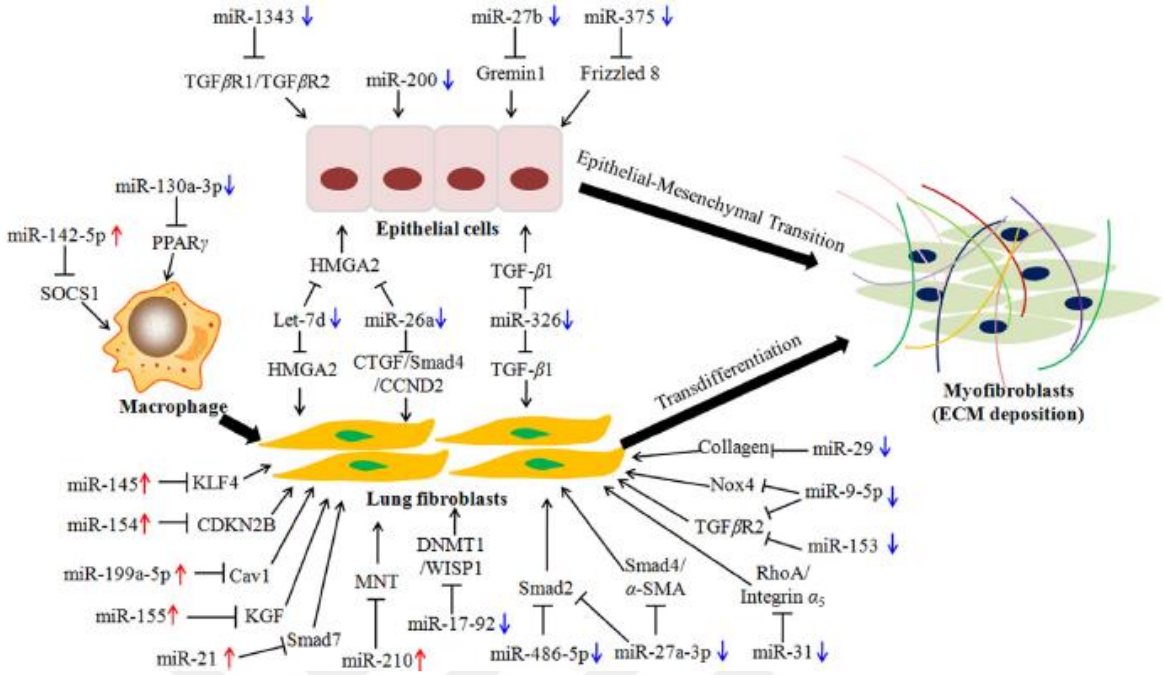
DNA metilasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada, global DNA metilasyonu ve bunula ilişkili olarak DNA metilasyon enzimleri (DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b) incelendiğinde İPF'li ve sağlıklı akciğer dokusu arasında global DNA metilasyonu bulunmamasına rağmen İPF'li dokuda DNMT3a ve DNMT3b ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun gibi DNA metilasyon profilinin anlaşılması ile ilgili çalışmalar hem hastalığın patogenezine katkı sağlamak hem de hastalığın tanısı ve uygulanabilecek tedaviler hakkında yardımcı olmak için yapılmaktadır (96).

Dolaşımda Bulunan Nükleozomlarla (CF-N) yapılan bir epigenetik çalışmada ise CF-N'ler üzerinde dolaşımdaki HMGB1, mH2A1.1, 5mC, H3K9A ve H3K27Ac gibi epitoplar incelendiğinde bu epitopların serum seviyelerinin kotrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca tedavi almamış İPF hastalarında asetillenmiş histon H3 seviyelerinin (H3K9Ac ve H3K27Ac) daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre CF-N'lerin tanı ve tedavi yanıtıyla ilişkili bir biyobeliteç olabileceği öne sürülmüştür (97).

miRNA'lar

miRNA'lar, hedef genlerin 3'UTR bölgelerine bağlanarak RNA degradasyonunu veya tanslasyonun inhibisyonunu sağlayan yaklaşık 18-25 nükleotidden oluşan, küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır. miRNA'lar normal şartlarda gen anlatımını düzenleyerek homeostazı sağlamaktadır, buna karşın bazı miRNA'ların disregülasyonunun İPF ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.6) (7).

İPF ile miRNA'ların bağlantısını araştıran bir çalışmada 47 miRNA'nın serum seviyesinin İPF'de farklı olduğu bulunmuş, bunların 21'i up-regüle iken 26'sının ise down-regüle olduğu bildirilmiştir. Bu miRNA'ların altısının validasyonu yapılmış ve bunun neticesinde miR-21, miR-199a-5p ve miR-200c'nin serum seviyesinde artarken miR-31, let-7a, and let-7d'nin azalmış olduğu tespit edilmiştir (98).



Şekil 2. 6. İPF'de disregüle olan miRNA'lar ve moleküler hedefleri (7).

miR-21'nin TGF-β tarafından indüklendiği ve smad-7'yi baskılayarak TGF-β sinyallenmesinde negatif regülasyon görevi olduğu bilinmekle beraber ADAMTS-1'in down-regülasyonunu sağlayarak ve pulmoner tip-I kollajen ve tip-III kollajeni arttırarak İPF'nin ilerleyişini arttırdığı görülmüştür. Ayrıca miR-18a, miR-19a ve -19b ve miR17-92 kümesi üyelerinin de İPF'li akciğer dokusunda down-regülasyonu bildirilmiştir. miR-155'in susturulması kollajen sentezinin inhibe olması ve Wnt/β-katenin ve Akt sinyal yolaklarıyla sinyallenmenin engellenmesine yol açtığının bildirilmesiyle beraber ve İPF hastalarında serum düzeyinde up-regüle olduğu görülmüştür. miR-486-5p'nin ise İPF'li akciğer fibroblastlarında anlamlı derecede azalma gözlenmiştir. Bunların yanında let-7d-5p'nin hem stabil İPF'de hem de AA-İPF'de ekspresyonunun azaldığı görülürken mİR-25-3p'nin sadece AA-İPF'de artarken stabil İPF'de azaldığı görülmüştür (99). Böylece miRNA ve İPF'deki rolü hakkında yapılan araştırmalar gösteriyor ki miRNA'lar hastalık için potansiyel biyobelirteç niteliği taşıyabilmekte ve hastalığın prognozunun aydınlatılmasına katkı sağlamada yardımcı olabilmektedir.

2.2.1.10. Telomeropati ve İPF

İnsan telomerleri, TTAGGG DNA dizi tekrarlarından ve 150-200 nükleotid uzunluğunda G nükleotidi bakımından zengin tek zincirli bölgeden oluşmaktadır. İn vitro

hücre bölünmesinde telomerlerin her bölünmede yaklaşık olarak 50-100 baz çifti arası kadar kısaldığı belirtilmiştir (14). Telomer tekrar bölgeleri altı proteinin oluşturduğu şelterin kompleksi olarak adlandırılan ve kromozomların uçlarını DNA hasar mekanizmasından korumada görevli T-loop olarak adlandırılan kement benzeri yapıyla bağlantılı bulunmaktadır ve bu T-loop yapısı telomer uçlarını DNA tamir mekanizmalarından saklamaktadır. İnsanlarda bulunan şelterin kompleksi TRF1 (telomere repeat binding factor 1), TRF2, RAP1 (repressor/activator protein 1), TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2), TPP1 (TIN2-interacting protein 1) ve POT1 (protection of telomeres 1) üyelerinin bir araya gelmesiyle kromozom uçlarını DNA hasar yanıtın ortaya çıkmasında, zararlı degradasyonlardan veya genomun stabilizasyonunu bozan rekombinasyon veya füzyon gibi durumlardan korumaktadır. Normal hücrelerde telomerler, telomer sürdürme mekanizmalarının yokluğunda her bölünmeyle beraber aşamalı bir şekilde kısalmaya başlamakta ve kromozom ucu çok kısalmaya başladığında ise uç kısmı çıkarılmış telomer bir DNA hasar sinyali göndererek hücre büyümesini durdurmaktadır. Bu olgu ise hücresel yaşlanma olarak bilinen ve hücrelerin bölünmesinin belirsizliğini tanımlayan Hayflick limitinin ortaya çıkmasını sağlamıştır (14,100).

Telomerlerin replikasyonu tekrar bölgesinden oluştuğu ve G-quardidupleks gibi sekonder yapı oluşturma eğilimde olduğu için zordur ve bu sorun replikasyon çatalının durmasına sebep olabilmektedir. İnsan telomerlerinde bulunan ve CTC1 (conserved telomere protecton component 1), STN1 ve TEN1 (telomeric pathway with STN1) proteinlerinden oluşan CST kompleksi, tek iplikli DNA'ya bağlanmakta ve telomerik DNA replikasyonu sırasında duran replikasyon çatalının tekrar başlamasında görev almaktadır. Ayrıca DNA replikasyonu sırasında telomeraz aktivitesinden sonra telomer C-ipliğinin doldurulmasında da yardımcıdır (15).

Kanser gelişimde genellikle hücreler bir riboprotein kompleksi olan telomerazı (telomer-spesifik reverstranskriptaz) aktive ederek ölümsüz olma yoluna giderler ve bu kompleks tümörlerin yaklaşık %85-90 kadar büyük bir kısmında etkilidir (14). DNA homolog rekombinasyon mekanizması olan ALT (Alternative Lengthening of Telomeres), telomerlerin sürdürülmesi için telomerazdan bağımsız bir yolla tümörlerin yaklaşık %10-15'inden sorumludur. ALT mekanizmasında hücreler non-homolog bir kromozomun telomerine kopyalanan telomerik DNA kalıbını kullanarak işlemekte, ayrıca bu telomer sirküler ya da linear formda ekstra kromozomal telomer DNA içerebilmektedir. Bunlara ek olarak, ALT-

pozitif tümörlerde ATRX (α-thalassemia/mental ratardation sydrome X-linked proteins), DAXX (death domain-associated protein) ve H3.3 histonu genlerini kodlayan somatik mutasyonlar tespit edilmiştir (14,101).

Telomeraz

Telomeraz normal doku yenilenmesi, kök hücre ve kanser hücrelerinin proliferasyonu gibi olaylarda çok önemli bir faktördür. Telomeraz kompleksi katalitik alt ünite komponentleri olan TERT (telomerase reverse transkriptase) ve TERC (telomerase RNA component)'den oluşmaktadır. İnsan telomeraz holoenzimi TERT VE TERC ile bir kompleks oluşturan cajal cismine bağlıdır. Cajal cismi, TERT ve TERC, telomeraz aksesuar proteinleri olarak adlandırılan Diskerin, NOP10, NHP2 ve GAR1 üyelerinin oluşturduğu bir dimer diskerin kompleksi ve TCAB1 (telomerase cajal body protein 1)'den oluşmaktadır. Telomeraz foksiyonu için önemli olan Diskerin, TERC'deki H/ACA kutusu RNA yapısal motifine bağlanırken, TCAB1 ise TERC'ye bağlanarak bu yapıyı düzenlemekle görevlidir. Bunların yanında HSP70, p23 ve HSP90 gibi şaperon proteinleri de TERC'nin H/ACA kutusuna bağlanması ve telomeraz aktivitesinde rol oynamaktadır (15, 100).

Telomeropati

Telomerlerde onkogenik aktivasyon, replikatif stres ve hasar, telomeraz veya şelterin bozukluğu, genotoksik veya oksidatif hasar ve UV ile indüklenme ile meydana gelen bozukluklar telomer bölgesinde fonksiyon bozukluğu veya telomer kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bunun devamında ise apoptoz, hücre döngüsünün durdurulması, senesens, uçtan uca füzyon veya endoreduplikasyon olayları gerçekleşebilmektedir. Oluşan hataların sonucu olarak da hücre ya yaşlanmaya ya da kanserleşme ve metastaza gidebilmektedir (102). Telomerlerin sürdürülmesi ile ilişkili genlerde ortaya çıkan defektler telomeropatiler veya diğer ismiyle Telomer Biyolojisi Hastalıklarına (TBD) sebep olabilmektedirler. TBD, birçok telomeraz sürdürme mekanizmaları ya da DNA Hata Yanıt (DDR) sistemi ile ilgili mutasyonlarla ilişkilidirler. Örneğin, telomerlerde şelterin eksikliğinde, telomerlerin ucu homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uç birleştirme mekanizmalarıyla çift iplikli kırık oluşturabilmektedir.

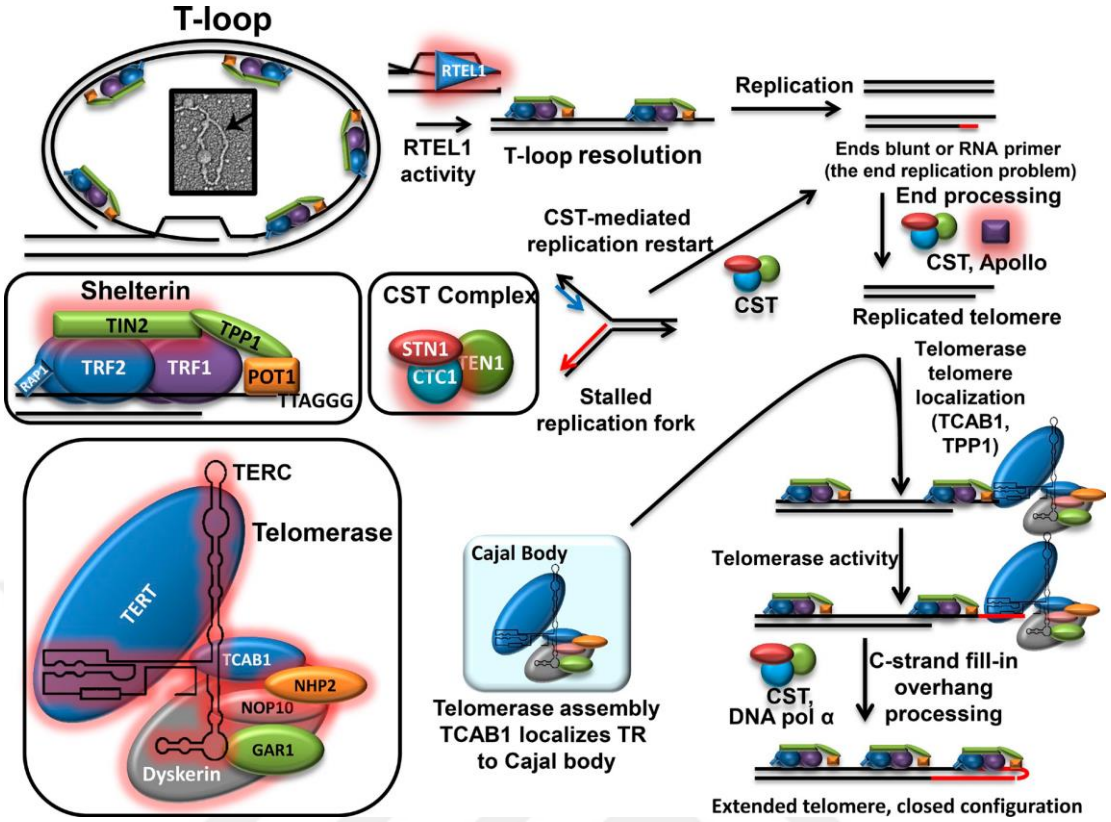
DDR veya telomerlerin korunması ile ilgi olan moleküllerde hasar oluşması durumunda TBD ortaya çıkabilmektedir. DDR sistemi, DNA lezyonlarını arayarak onların onarımını sağlamakla görevlidir. Klasik olarak DNA hasarı iki ana grup altında

incelenmektedir. Bunlardan Çift zincir kırıkları (DSB), iki ana hata onarım mekanizmasıyla düzenlenirken tek zincir kırıkları (SSB) üç ana mekanizma ile düzenlenmektedir:

1. DSB
   a. Holomog Rekombinasyon
   b. Homolog olmayan Uç birleştirme
2. SSB
   a. Yanlış eşleşme onarım (MMR)
   b. Baz eksizyon tamiri (BER)
   c. Nükleotid eksizyon tamiri (NER) (104).

Telomeropatiler, nadir hastalıkların bulunduğu farklı hastalıkları içermektedir, bu hastalıklar primer ve sekonder telomeropati olarak iki ayrı grup altında toplanmaktadır. Diskeratozis konjenita (DKC), Hoyeraal-Hreidarsson sendromu (HHS), Revesz sendromu (RS), İPF, Karaciğer Fibrozu gibi hastalıklar telomer sürdürme mekanizmalarında oluşan defekti içeren primer telomeropati grubu altında toplanırken, bazı semptomları primer telomeropatilerle örtüşen ancak genellikle DDR hataları sonucu oluşan hastalıkların bulunduğu sekonder telomeropati grubunda ise Fankoni Anemisi (FA), Rothmund-Thomson sendromu (RT), İmmün yetersizlik, sentromerik bölge instabilitesi ve yüz anormallikleri sendromu tip I (ICF) bulunmaktadır (15).

TBD oluşumuna sebep olan moleküler biyoloji mekanizmalarına baklıdığında şelterin ve CST kompleksini oluşturan moleküller, telomeraz kompleksi ve cajal cismi, RTEL1 aktivitesi ve apollo gibi molekülerde oluşan bozukluk telomer ile ilişkili hastalıkların oluşumunda öncü mekanizmalardır. Telomerlerin replikasyonu öncesinde T-loop ayrılmalıdır ve bunu RTEL1 gerçekleştirmektedir. RTEL1 yokluğunda ise T-loop SLX4 nükleazı tarafında kesilmekte ve bu da hızlı telomer kaybına sebep olmaktadır. DNA replikasyonundan sonra küt uç ve RNA uçlu telomer sonları telomeraz aktivitesinde önce CST kompleksi ve apollo ile işlenmelidir. Telomeraz kompleksi ve diskerin dimer kompleksi cajal cisminde birleşir ve TCAB1 ile organize edilir. Birleşmeden sonra burada G-çıkıntısına 50-100 baz çift yeni telomer tekrarı ekleyebilen telomeraz replike ve işlenmiş olan telomere TCAB1 ve TPP1 ile lokalize olmaktadır. Telomeraz aktivitesinden sonra CST kompleksi ve DNA polimeraz-α telomeraz aktivitesinin sonlanması ve telomerlerin uzamasını içeren bir doldurma reaksiyonu ve nükleolitik prosesi gerçekleştirmektedir (15) (Şekil 2.7).

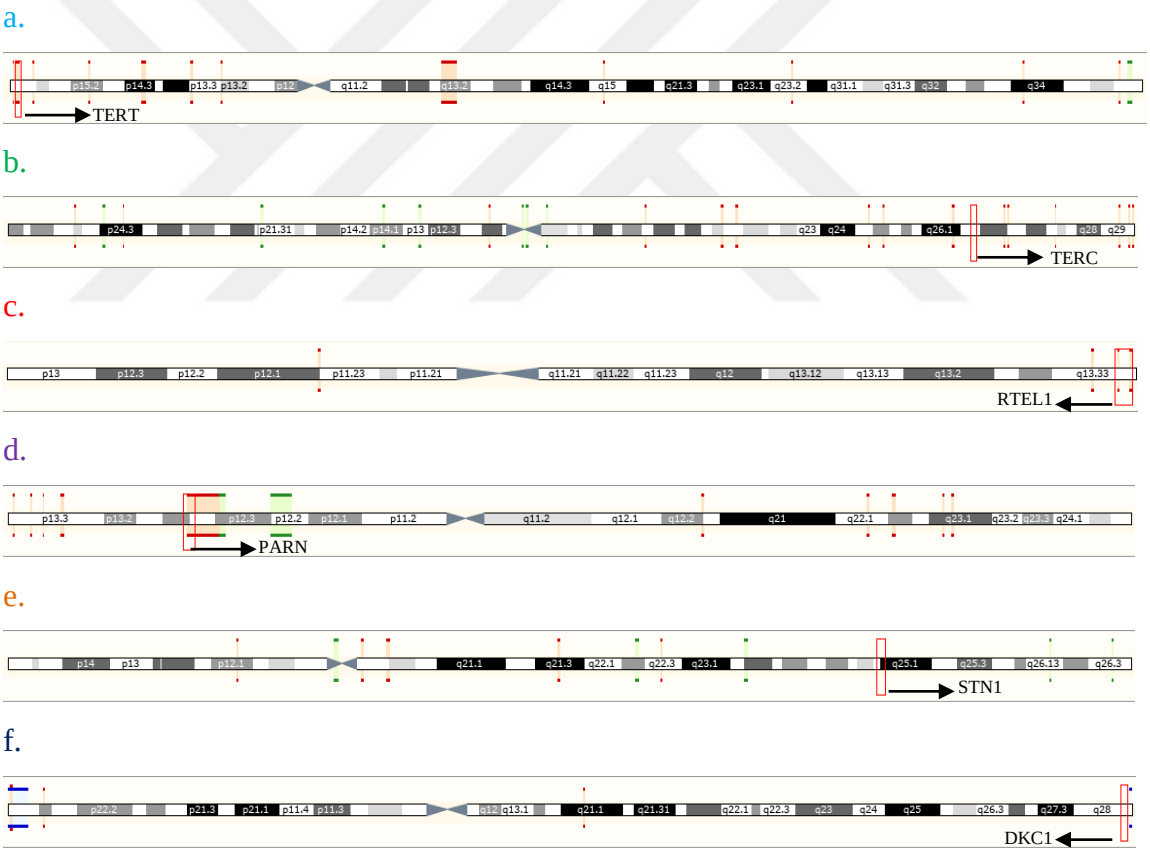


Şekil 2. 7. Telomeropatilerin moleküler biyolojisi (15).

Telomer ilişkili moleküllerde oluşan hatalar telomer kısalmasına yol açmaktadır. Telomer Kısalması Sendromu (STS) olarak adlandırılan ve İPF hastalığını da içine alan bu hastalık grubu telomer kısalması sonucu hücrelerin hızlı yaşlanmasına neden olmaktadır. Kısalan lökosit telomerlerinin İPF ve Kronik Hipersensitivite Pnömonisi hastalarında sağ kalımı kötü yönde etkilediği bildirilmiştir. İPF, STS hastalarında çok görülen pulmoner hastalıktır ve familyal vakalarda yaklaşık %25 oranında görülürken sporadik vakalarda bu oran %1-3'tür. Genç olan İPF hastalarında telomer kısalığının prognozu kötü etkilediği bildirilmiştir. İPF'de genellikle telomer uzunluğunun 10'uncu yüzdenin altına düştüğünde telomer kısalması olarak göz önünde bulundurulmakla birlikte bazı klinik durumların da telomer kısalması için risk oluşturabileceği düşünülmektedir (104,105). Telomer uzunluğu yaş ile ilişkili hastalıklarda potansiyel biyobelirteç olarak bilinmesinin yanında İPF hastalarında transplant sağ kalımında azalmaya yol açtığı bildirilmiştir.

İPF hastalarında telomer ve telomeraz fonksiyonu ile ilgili genler incelendiğinde TERT, TERC, RTEL1, PARN, STN1 (OBFC1) ve DKC1 gibi genlerde bazı mutasyonlar tespit edilmiş ve bunun İPF hastalarında telomer kısalığı ile ilişkisi olduğu öne sürülmüştür (Şekil 2.8) (106).

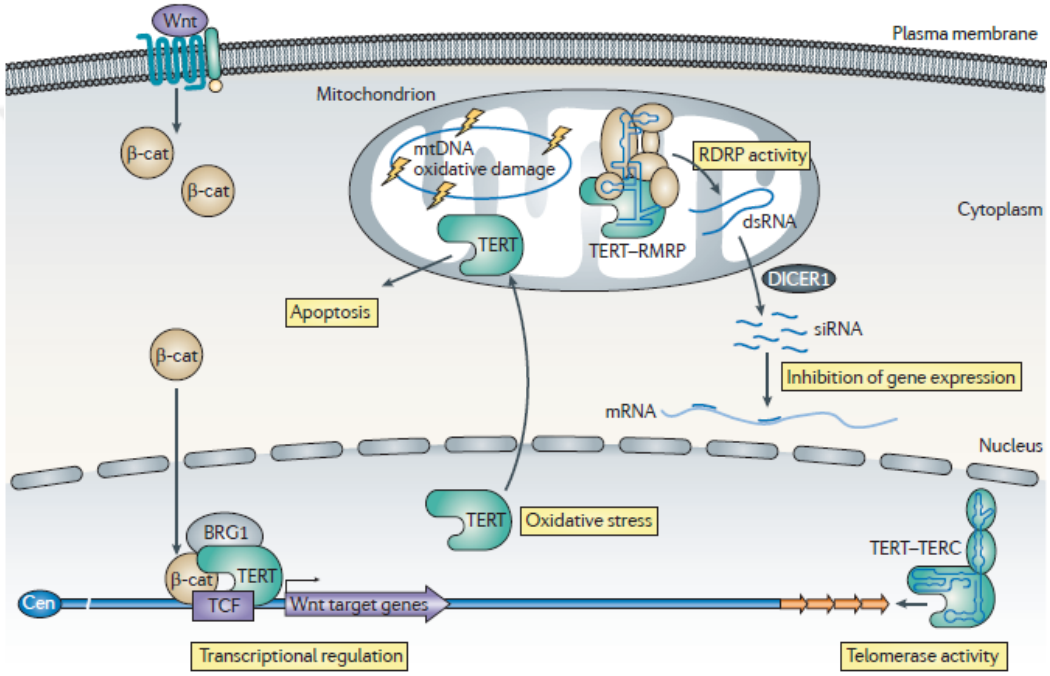
TERT, telomer uzunluğunu sürdürmede telomer uçlarına TTAGGG tekrarları eklemede görevli bir reverstranskriptaz kodlarken, TERC (diğer adıyla hTR) RNA kalıbı kodlamada rol oynayan bir telomeraz kompnentidir. TERT ve TERC mutasyonları FPF vakalarının %8-15'inde görülürken, sporadik Pulmoner Fibrozis hastalarında bu oran %1-3 kadar tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda genel olarak TERT genindeki intron bölgesinde rs2736100 alleli ve TERC geninde ise rs6793295 alleli familyal ve sporadik İPF vakalarında öne çıkan varyantlar olmasının yanında bu genlerdeki birçok mutasyon bu hastalıkla ilişkilendirilmiş ve telomer kısalmasına sebep olduğu bildirilmiştir. Örneğin, TERC promotor bölgesinin CCAAT kutusunda tespit edilen mutasyon'un TBD'ye öncülük ettiği bildirilmiştir (9,107,108). Bunların yanında TERT'nin Wnt-β-katenin sinyal yolağında transkripsiyonel modülatör görevi de bulunmaktadır.



Şekil 2. 8. İPF'de Telomer İlişkili Genler ve Genomda Bulunduğu Bölgeler.
a) TERT; 5p15.33, b) TERC; 3q26.2, c) RTEL1; 20q13.33, d) PARN; 16p13.12, e) STN1 (OBFC1); 10q24.33, f) DKC1; Xq28 (109-114).

TERT'nin TERC ile telomeraz aktivitesinde görev aldığı bilinmekle beraber hücre içerisinde başka fonksiyonları da bulunmaktadır. Plazma membranındaki Wnt reseptörlerinin uyarımında, TERT Wnt trasnkripsiyon faktörü BRG1 ile kompleks oluşturur ve onların

ekpresyonlarını düzenleyen Wnt-hedef genlerinin promotörlerine bağlanır. Mitokondride ise endoribonükleaz RMRP ile birleşerek RNA-bağımlı RNA polimeraz (RDRP) aktivitesi göstermektedir. Bunun sonucunda RMRP-aracılı çift iplikli RNA'lar RMRP'nin endojenöz seviyesinin kontrol edildiği bir Dicer bağımlı yolda siRNA'lara işlenmekte ve bunlar da gen anlatımının inhibisyonunda görev almaktadır. Ayrıca TERT'nin mitokondride oksidatif hasara bağlı apoptozun düzenlenmesinde de rol aldığı düşünülmekte, bunu da oksidatif stresin TERT'nin mitokondriye nükleer eksportunu tetikleyerek yaptığı öne sürülmektedir (Şekil 2.9) (102).



Şekil 2. 9. TERT'nin Hücre İçerisindeki Fonksiyonları.
mtDNA; mitokondriyal DNA, β-cat; β-katenin, TCF; T-cell factor, dsDNA; çift iplikli DNA, Cen; sentromer (102).

RTEL1, telomerlerin sürdürülmesinde görevli demir-sülfür içeren DNA helikazların alt sınıfının bir üyesidir. mRNA stabilitesini sağlayan bir 3'ekzoribonükleaz üreten PARN geni ise TERC, DKC1, RTEL1 ve TERF1 RNA'larının azaltılması ile görevlidir. RTEL1 ve PARN genlerinin de familyal İPF vakalarında (~%7) birçok fonksiyon kaybı mutasyonları tespit edilmiş, ancak PARN eksikliğinin telomer biyolojisindeki yeri bilinmemektedir. Daha önceki çalışmalarda görüldüğü üzere RTEL1 ve PARN geni mutasyonları taşıyan bireylerin lökosit telomerlerinde kısalık tespit edilmiştir. RTEL1 ve PARN geni üzerinde yapılan exom sekanslama çalışmaları sonucu İPF hastalarında birçok yeni mutasyon rapor edilmiştir (11, 115).

Bir telomeraz bileşeni olan diskerin'i kodlayan DKC1 geni mutasyonu ilk olarak otozomal dominant olan Diskeratozis Konjenita (DC) hastalığında tespit edilmiş, etkilenen bireylerin %20'sinde Pulmoner Fibrozis geliştiği bildirilmiştir. Daha önceki çalışmalarda exon 3 bölgesinde c145A.T transversiyon mutasyonu, p.Thr49Ser missens mutasyonu ve c.1213A.G yeni varyantı DC olmayan bazı İPF hastalarında tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise DKC1 geninde Thr405Ala dönüşümüne sebep olan ve TERT destabilizasyonu ile ilişkili olduğu düşünülen zararlı bir mutasyon bildirilmiştir (2,116).

Eski adıyla OBFC1 (oligonucleotide-binding fold containing 1) olarak bilinen STN1, DNA polimeraz-α-primaz aktivitesini stimüle etmekle görevli bir CST kompleksi üyesidir. Bu gen için İPF hastalarındaki varyanlar incelendiğinde bu genin intronik bölgesindeki rs11191865 varyantı yaygın görülen risk varyantı olarak bildirilmiştir (1,117).

Telomer ilişkili genler incelendiğinde bu genlerin İPF'de nadir görülen mutasyonlar olduğu ve bunlardan en çok görülenin ise TERT mutasyonu olduğu ortaya konmuştur. Bu genlerde meydana gelen mutasyonların telomer kısalması ve sağ kalımda kötü prognoz ile bağlantılı olduğu görülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Araştırmanın etik onayı 23.03.2018 tarihinde S.B.Ü İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kulunun "1207" no'lu kararıyla alınmıştır. Bu Proje Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin (BAP) "2018/039" sayılı projesiyle desteklenmiştir. Çalışma EQUATOR (Enhancing the Quality and Transparency of Research)'da yer alan Diagnostic/Prognostic Studies klavuzuna uygun olarak tasarlanmıştır (Genet Med. 2011;13(5):453-456. PMID: 21502867).

3.1.1. Çalışmaya Katılacak Olan Gönüllülerin Seçimi ve Örneklerinin Elde Edilmesi

Çalışmaya Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3. Klinikte tanısı konulan 40-85 yaşları arasında olan ve UIP paterni İPF hastalığı ile uyumlu 34 İdiyopatik Pulmoner Fibrozis olgusu, yapılan tetkikler sonucu herhangi bir akciğer hastalığı saptanmayan 31 sağlıklı kontrol ve klinik incelemeler sonucunda İPF dışında diğer İnterstisyel Akciğer Hastalıklarından birine sahip 32 gönüllü hasta dahil edildi. Çalışmaya girmeyi kabul edenler gönüllü olur formunu doldurup imzaladıktan sonra 2 ml periferik kan örneği DNA izolasyonu için alındı, soğuk zincirle Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na nakledildi. Gönüllülerden alınan kanlardan kit protokolüne göre DNA izolasyonu yapıldı ve DNA'ların spektrofotometre ile konsantrasyon ve saflık ölçümleri yapıldı. Elde edilen DNA'lar bir sonraki yapılacak işlemlere kadar -20^0C'de saklandı.

Araştırmaya dahil olma kriterleri:

- 40-85 yaş arası olmak
- Klinik, radyolojik ve patolojik bulguları İPF ile uyumlu olmak
- Çalışmaya katılmayı kabul ettiğine dair onamı olmak

Araştırmaya dahil olmama kriterleri:

- 40 yaş altı veya 85 yaş üstü olmak
- Hamile olmak
- Çalışmaya katılmayı kabul etmemek

3.1.2. Proje Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

Çizelge 3. 1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri.

	KİMYASAL	KULLANILACAK METOD
1.	Agaroz	Jel Elektroforezi
2.	Etidyum bromür	Jel Elektroforezi
3.	Taq DNA Polimeraz	PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
4.	Mikrosantrifüj Tüpü (1,5 ml/ 0,5 ml/ 0,2 ml)	DNA İzolasyonu, PCR
5.	Etil Alkol (%70) (MERCK)	Genel Kullanım
6.	Erlen Mayer (IsoLab)	Jel Elektroforezi
7.	Naylon Membran	Southern Blot
8.	Hidroklorik Asit /(HCl)	Jel Elektroforezi
9.	PRTEMIX SSC Buffer (20X) (MERCK)	Southern Blot
10.	Tris	Jel Elektroforezi
11.	Borik Asit	Jel Elektroforezi
12.	EDTA	Jel Elektroforezi
13.	DNA Ladder	Jel Elektroforezi
14.	Loading Dye	Jel Elektroforezi
15.	Cam Şişe	Jel Elektroforezi
16.	Rötgen Filmi	Southern Blot
17.	Hibridization Bag (MERCK)	Southern Blot
18.	Membran Filtre (Millipore Millex)	Jel Elektroforezi

3.1.3. Proje Kapsamında Kullanılan Kitler

Çizelge 3. 2. Kitler ve Reaksiyon Sayıları.

KİT	KULLANIM AMACI	REAKSİYON SAYISI
Roche High Pure PCR Template Preparation Kit	Total Kandan DNA İzolasyonu	100
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Total Kandan DNA İzolasyonu	50
TeloTAGGG Telomere Length Assay (ver 10.0)	Telomer Uzunluk Ölçümü	50

3.1.4. Proje Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Projede kullanılan mevcut makine ve teçhizatlar S.B.Ü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından bölüm izni alınarak kullanılmıştır.

Çizelge 3. 3. Kullanılan Cihazlar ve Kullanım Amaçları.

	Kullanılacak Mevcut/Ekipman türü, Modeli (Araç, Makine-Teçhizat vb.)	**Projede Kullanım Amacı**
1.	PCR Cihazı (Thermal Cycler) (Blue- Ray/ tcst-9620)	PCR İşlemi
2.	Derin Dondurucu (-80^{0}C) (DAIHAN/Duo Freez U500)	Örneklerin Muhafazası
3.	Derin Dondurucu (-20^{0}C) (BOSCH/GSN36AI31)	Örneklerin muhafazası
4.	Mikrodalga fırın (BEKO/MD2610)	Elektroforez İşlemi
5.	Hassas Terazi, 0.1 mg hassasiyeti (SHIMADZU/ATX224, SEG)	Solüsyon hazırlanması
6.	Otomatik pipet seti (Eppendorf)	Moleküler çalışmalarda, tüm deneylerde
7.	Isıtıcı Blok Stuart (SBH130D)	Moleküler çalışmalarda
8.	Elektroforez (Hoefer)	Gen ekspresyon çalışmasında
9.	Jel Görüntüleme Sistemi (CCD kameralı) (Syngene/G: BoxF3)	Moleküler genetik çalışmalarında, agaroz jel sonrası sonuçların incelenmesi ve kayıt altına alınması amacıyla kullanılacaktır.
10.	UV Transluminatör (Yatay) (DAIHAN-Wisd/WUV-L20)	Moleküler genetik çalışmalarında
11.	Spektrofotometre ve Florometre (DENOVIX/DS-11FX)	DNA/RNA/miRNA/protein miktar tayini
12.	Masaüstü soğutmalı ultrasantrifüj	Genel kullanım
13.	Horizontal Elektroforezler (Hoefer)	Agaroz jel yürütme
14.	Güç Kaynağı (Hoefer/PS300B)	Elektroforez işleminde
15.	İnkübator (DAIHAN/ IG-50)	İmmünhistokimyasal ve inkübasyon gerektiren tüm çalışmalarda
16.	Vorteks 4S (DAIHAN- Wisd/ VM-10)	Genel kullanım
17.	Distile su cihazı	Genel kullanım
18.	Kar buz makinesi	Genel kullanım
19.	+4 buzdolabı (Arçelik)	Genel kullanım

3.1.5. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

a)TBE Çözeltisi (TRİS-BORİK ASİT-EDTA)

5X çözelti için;

- 60,57 gr Tris Baz
- 30,90 gr Borik Asit (H_3BO3)

- 40 ml EDTA (0,5 M)

Tris, Borik Asit ve EDTA ölçülerek 1 litrelik cam şişeye alındı, üzerine distile sueklenerek toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

b)TAE Çözeltisi (TRİS-ASETİK ASİT-EDTA)

50X çözelti:

- 242 g Tris baz
- 57,1 g Glasiyal asetik asit
- 100 ml EDTA (0,5 M, pH: 8,0) ya da 37,2 g $Na_2EDTA•(2H_2O)$ eklendi (900 ml çözüldü).
- 1000 ml'ye dH_2O ile tamamlanır.
- 4°C / Oda sıcaklığında saklandı.

NOT: Otoklavlanarak steril edildi.

c) 100 mL %10 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

- 10 mL hidrojen peroksit mezür ile ölçüldü.
- dH_2O ile 100 mL'ye tamamlandı (90 mL dH2O eklenir).

d) 100 mL %70'lik Etil Alkol

- 70 mL etil alkol mezür ile ölçüldü.
- dH_2O ile 100 mL'ye tamamlandı (30 mL dH2O eklenir).

e) Etidyum Bromür, 10 mg/Ml

100 ml çözelti:

- 1 gr Etidyum Bromür tartıldı ve 100 ml dH_2O eklendi.
- Manyetik karıştırıcıda birkaç saat karıştırıldı.
- Koyu renkli tüp içine alınan sıvı, alüminyum folyo ile sarıldı ve 4°C'de saklandı.

NOT: Etidyum bromür mutajen ve toksiktir. Bu sebeple maske kullanıldı ve eldivenler hazırlık bittikten sonra değiştirildi.

f) HCI Çözeltisi:

250 ml çözelti:

- 2, 278 gr (0,25 M) HCI tartıldı

- dH_20 ile 250 ml'ye tamamlandı.

g) % SDS Çözeltisi:

1000 ml %10'luk SDS için;

100 gr SDS 900 ml distile su ile çözdürüldü. Çözünmeye yardımcı olması için karışım alt üst edilerek 68^0C'de çözdürüldü. pH HCl ile 7,2'ye ayarlandı ve toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

NOT: SDS toksik olduğundan karışım filtreden geçirilerek steril edildi.

h) Denatürasyon Çözeltisi:

500 ml çözelti:

- 9,99 gr NaOH (0,5 M)
- 43,875 gr NaCI (1,5 M)
- dH2O ile 500 ml'ye tamamlandı.

NOT: 200 cm^2'lik bir blotlama için 500 ml gerekmektedir.

ı) Nötralizasyon Çözeltisi:

250 ml çözelti:

- 15,125 gr Tris
- 29 gr NaCI
- dH_2O ile 250 ml'ye tamamlandı
- pH 7,4'e ayarlandı.

NOT: 200 cm^2'lik bir blotlama için 500 ml gerekmektedir.

i) Stringent Wash Buffer I

1000 ml çözelti:

- 2X SSC
- %0,1 SDS

500 ml distile suya 100 ml 20X SSC stok solüsyonundan eklendi. Üzerine 10 ml %10'luk SDS solüsyonundan eklendi ve toplam hacim 1000 ml olana kadar distile su karışıma ilave edildi.

j) Stringent Wash Buffer II

1000 ml için:

- 2X SSC
- %0,1 SDS

500 ml distile suya 10 ml 20X SSC stok solüsyonundan eklendi. Üzerine 10 ml %10'luk SDS solüsyonundan eklendi ve toplam hacim 1000 ml olana kadar distile su karışıma ilave edildi.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Genomik DNA İzolasyon Kiti ile Kan Örneğinden DNA İzolasyonu

• Hibridizasyon fırını +70°C'ye ayarlandı.

• Elution buffer hibridizasyon fırınının içine kondu.

• 1,5 ml'lik ependorf içine

- 200 µl Kan
- 200 µl Buffer
- 40 µl Proteinaz K

eklenerek karısım hazırlandı.

• Karısım vortekslendikten sonra, 10 dk +70°C'de bekletildi.

• Karışımın üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve iyice alt üst edildi.

• Karısım altında toplama tüpü bulunan filtreli spin kolona aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

• Alt ksımıdaki toplama tüpü atıldı ve filtreli spin kolon yeni toplama tüpü kondu.

• Üzerine 500 µl "Removel Buffer" eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

• Alt kısımdaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü kondu.

• Üzerine 500 µl "Washing Buffer" eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

• Alt kısımdaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü kondu.

• Üzerine 500 µl "Washing Buffer" eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

• Alt kısımdaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü kondu.

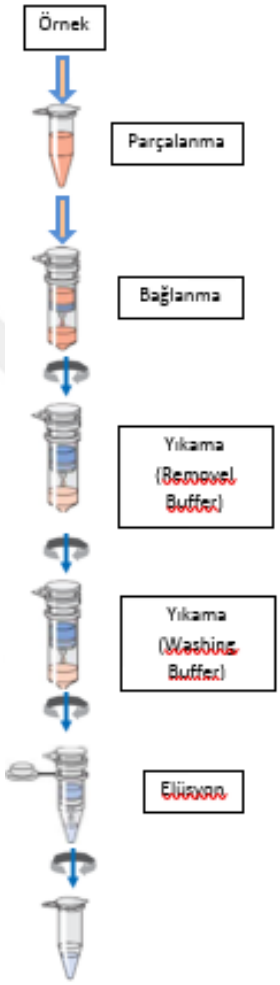
• Kalan buffer'ın uzaklştırılması için 14000 rpm'de 15 sn spin edildi.

• Alt kısımdaki toplama tüpleri atıldı ve filtreli kolonların altlarına 1,5 ml'lik ependorf kondu.

• Filtreli spin kolonlara 100 µl Elution buffer eklendi ve 1 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

• Filtreye takılı DNA Elution buffer ile ependorf içine aktarılmış oldu.

• Elde edilen DNA'lar +4ºC'de saklandı (Şekil 3.1). (ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit /Product No: 11796828001).



Şekil 3. 1. DNA İzolasyonunun şematik görünümü (QIAamp DNA Blood Mini Kit Cat No./ID: 51104).

3.2.2. Spektrofotometrik Ölçüm

DNA izolasyonu ile izole edilen DNA'lar DENOVIX DS-11 FX spektrofotometrik ölçüm cihazıyla ölçüldü. OD260 / OD280 değerine göre 1,7-1,8 arası değerler saf olarak kabul edildiğinden, bu değer dikkate alınarak DNA'lar değerlendirildi.

3.2.3. Telomer İlişkili Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

TERT, TERC, PARN ve STN1 gen bölgeleri için hazırlanan PCR'da, her gen için 1µl DNA kullanılarak toplam hacim 50 µl olacak şekilde PCR karışımı 0,2 ml'lik PCR tüplerine hazırlandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3. 4. Telomeraz ilişkili Gen Bölgeleri için PCR komponentleri miktarları.

PCR Komponenti	**Miktar**
dH2O	15,85
Tampon	2,5 µl
MgCl	1,5 µl
dNTP (10mm)	2 µl
Forward Primer 10pmol	0,5 µl
Reverse Primer 10pmol	0,5 µl
Taq polimeraz	0,15 µl
Genomik DNA	1 µl
Toplam:	**24 µl**

Telomer ilişkili genler için tasarlanan primerler için uygun bağlanma sıcaklıkları belirlendi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3. 5. Telomer ilişkili genler için tasarlanan primerler ve PCR için bağlanma sıcaklıkları.
F; forward, R; reverse, bç; baz çifti.

GEN	**Forward**	**Reverse**	**Sıcaklık**	**bç**
TERT	TTGACACCCCCACAAGCTAA	GTGAGTCTCCACATCTTCATCTG	$62,5^0$C	**F:** 20 **R:** 23
TERC (LRRC34)	AGAAAAGATGACATGTTTGCTGCT	AGAAACTCCCCATGCCATGT	64^0C	**F:** 24 **R:** 20
PARN	TGATGAAAAACGTTCACAGG	GCCATTCACAACATCACACC	64^0C	**F:** 20 **R:** 20
STN1 (OBFC1)	CTCTGCTGGTGATGTCTGAA	GATGAAAATTCACAGGGCTC	$62,9^0$C	**F:** 20 **R:** 20

Hazırlanan 0,2 ml'lik PCR tüpleri Thermal Cycler (Blue- Ray/ tcst-9620) cihazına yerleştirildi. Uygun sıcaklık değerleri ve süreleri ayarlanarak istenilen bölgelerin çoğaltılması sağlandı (Çizelge 3.6). Ardından STN1 gen bölgesine RFLP metodu uygulanırken TERT, TERC (LRCC34) ve PARN gen bölgeleri sanger yöntemiyle incelendi.

Çizelge 3. 6. PCR koşulları ve süreleri.

AŞAMA	SICAKLIK	SÜRE	
Ön Denatürasyon	94^0C	1 dk.	
Denatürasyon	94^0C	30 sn.	**35 DÖNGÜ**
Annealing (Primerlerin Bağlanması)	62,5-64^0C	45 sn.	
Elongasyon (Zincirin Uzaması)	72^0C	30 sn.	
Son Elongasyon	72^0C	5 dk.	
Cooling	4^0C	-	

3.2.4. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

PCR yöntemi ile çoğaltılan DNA bölgelerinden STN1 genine ait bölge spesifik olarak mutasyonların saptanması için bölgeye özgü restriksiyon enzimiyle kesime uğratıldı (Çizelge 3.7, Çizelge 3.8). Restriksiyon kesimi için Fastdigest TaaI enzimi (HpyCH4III) ile 15 dk. kesim yapıldı. Ardından mutasyon olup olmadığını belirlemek için agaroz jelde yürütüldü. Kullanılan restriksiyon enzimi iki bölgeden kesim yaptığından iki bölgeden birden kesim yaptığında 234, 68 ve 47 bantları görüldü. 68. Bazdan kesim yapmadığında ise 302 ve 47 bantları görüldü.

Çizelge 3. 7. Restriksiyon enzimleri kesimleri için komponentler ve miktarları.

KOMPONENT	MİKTAR	
dH_2O	7,5 µl	
10X Buffer	2 µl	37°C'de 4 saat
Restriksiyon enzimi	0,5 µl	
PCR ürünü	10 µl	
Toplam:	**20 µl**	

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

- Yürütülecek DNA'nın uzunluğuna göre uygun miktarda toz agaroz tartılarak erlen mayer'e aktarıldı ve üzerine 1XTBE tamponu eklendi.
- Hazırlanan çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak tamamen homojen bir çözelti elde edildi.

- Çözeltiye 2 µl kadar etidyum bromür çeker ocak altında eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan jel çözeltisi horizontal elektroforez matriksine aktarıldı ve hava kabarcıklarının oluşması engellendi. Taraklar jele dikkatli bir şekilde yerleştirildi ve donması için bir süre çeker ocak içinde bekletildi.
- Jel donduktan sonra taraklar çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi ve tarakla oluşturulan kuyucukların üzerini geçecek kadar 1XTBE tamponundan eklendi.
- En baştaki kuyucuğa DNA Ladder markırı eklendi. Sonraki kuyucuklara yüklenecek örnekler, Loading Dye yükleme boyası ile karıştırılarak yükleme yapıldı.
- Yükleme tamamlandıktan sonra jel 110 volt elektrik akımında 500 mA'de 1 saat yürütüldü.
- Yürütme sonunda elde edilen jel görüntüsü CCD kameralı Jel Görüntüleme Sistemi (Syngene/G: BoxF3) ile görüntülendi.

3.2.6. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu ve Sanger Dizileme

TERT, TERC (LRCC34) ve PARN gen bölgeleri için sanger dizileme yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. Sanger Dizileme Yöntemi İş Akış Şeması.

3.2.6.1. ExoSAP-IT PCR Clean-Up, Affymetrix protokolü (PCR ürünlerinin temizlenmesi)

1. 0,2'lik PCR tüplerine 5 µl PCR ürünleri pipetlendi.

2. PCR reaksiyondan kalan artıkların temizlenmesi için üzerlerine 2 µl ExoSAP-IT enzimi eklendi. Toplam hacim 7 µL'dir.

3. 37^0C'de 15 dk. inkübe edilerek, PCR'dan kalan fazla primerler ve nükleotidler degrade edildi.

4. ExoSAP-IT inaktivasyonu için 80^0C'de 15 dk. inkübe edildi.

5. Pürifiye olmuş ürünler analiz edilene kadar -20^0C'de saklandı.

3.2.6.2. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo Fisher Scientific (Sekans reaksiyonunun hazırlanması)

Çizelge 3. 8. Reaksiyon Bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	**Final Konsantrasyon**	**1X**
BigDye Terminator	2X	2µl
BigDye Dizileme Tamponu	5X	2 µl
Primer (Forward ya da Reverse)	2 pmol	2µl
Steril H2O	toplam hacim10 µL olacak şekilde ayarlandı	
Kalıp DNA	3-10 ng	1-4 µl
Toplam:	10 µl	10 µl

3.2.6.3. EDTA/NaOAc/Etanol sekans ürünleri pürifiye edilmesi

1. 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine 1 µl 125 mM EDTA (pH: 8.0), 1 µl 3M NaOAc (pH 4.8), 1 µl glikojen eklenerek karışım hazırlandı.

2. 0,2'lik PCR tüplerindeki sekans örneklerinin üzerine karışımdan 3'er µl eklendi, toplam 13 µl'lik karışım pipetleme yapılarak 96'lık plate'e (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode) aktarıldı.

3. Üzerine 25 µl soğuk %100 alkol eklendi, plate seal'ı ile üzeri kapatıldı. Birkaç saniye hafifçe vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 15 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Plate santrifüjü ile 1850 g'de 45 dk. çevrildi.

5. Plate seal'ı çıkarılıp, plate üzeri, kâğıt peçete ile kapatılarak, plate ters çevrildi ve 165 g'de 1 dk. çevrildi.

6. Plate kuyularına 35 µl %70 etanol pipetlendi. Plate üzeri seal ile kapatılarak, 1650 g'de 15 dk. santrifüj edildi.

7. Plate seal'ı çıkarılıp, plate üzerine kağıt peçete örtülüp, plate ters çevrildi ve 185 g'de 2 dk. çevrildi.

3.2.6.4. Elüsyon ve Denatürasyon Aşaması

Plate, PCR cihazında 56 °C'de 3 dk. kapak açık tutularak, ethanol kurutma işlemi ardından, plate kuyularına 10'ar µl formamid eklenerek üzeri septa ile kapatıldı ve PCR cihazında 95˚C'de 3 dk. denatüre edildi. Ardından plate kırık buz içerine alınıp renatüre edildi. Örnekler ışıktan korunarak, ABI 3500 genetik analiz cihazında dizileme işlemi gerçekleştirildi.

3.2.7. TELOTAGGG Telomere Length Assay Kit (Ver 10.0) ile Telomer Uzunluğunun Belirlenmesi

3.2.7.1. Genomik DNA'nın Parçalanması

Not: Solüsyonların kullanımı ve pipetleme buz üzerinde yapıldı.

- Eşit miktarlarda HinfI ve RsaI'i karıştırarak bir HifI/RsaI enzim karışımı hazırlandı. Bu, her enzim için 20 U/µl enzim konsantrasyonunu sağladı.
- Test edilen her enzim ve kontrol DNA'sı için1 µl enzim karışımı gereklidir.
- Reaksiyon şişesinde, 17 µl'lik final volümü elde etmek için 15 µl (=1.5 µg) kontrol DNA'sı 2 µl nuclease-free water ile çözdürüldü.
- Her bir örnek için, 1-2 µg pürifiye edilmiş genomik DNA, nuclease-free water (4. Şişe) ile reaksiyon şişesindeki final volüm 17 µl olacak şekilde çözdürüldü.
- Her genomik DNA örneğine, 2 µl digestion buffer (10X) ve 1 µl HinfI/RsaI enzim karışımını eklendi ve karışıtıldı.
- Reaksiyon karışımı +37^{0}C'de 2 saat inkübe edildi.
- Reaksiyonu durdurmak için jel yükleme tamponundan (5X) 5 µl eklendi ve hızlı bir şekilde reaksiyon şişeleri çevirildi.

3.2.7.2. Southern Blotting

Not: Parçalanan DNA'nın ayrılması standart protokolleri takiben agaroz jel elektroforeziyle yapıldı.

- Agaroz MP gibi yüksek derece saf nükleik asit grade agaroz kullanarak 1XTAE tampon içerisinde %0,8'lik bir agaroz jel (yaklaşık 15 cm uzunluğunda) hazırlandı.
- Bir reaksiyon şişesi içerisinde, 4 µl DIG molecular weight marker, 12 µl nuclease-freewater ve 4 µl 5X loading buffer karıştırıldı ve şişe hızlı bir şekilde çevirildi.

- Her parçalanmış DNA örneğinden 1-2 µg jelin bir kuyucuğuna yüklendi.
- Doğru uzunluk ölçümünden emin olmak için dilüe edilmiş DIG molecular weight markerının bir alikod (10 µl) jelin her köşesine (örnek şeritlerini çevreleyen) yüklendi.
- Jel 5V/cm'de 1XTAE buffer'ında bormofenol tracking dye başlama kuyucuğundan yaklaşık 10 cm kadar ayrılana kadar (total çalışma 2-4 saat) yürütüldü.

Not: parçalanan DNA'nın southern transferi 20xSSC transfer buffer veya alkalin transfer buffer kullanarak ya kapiler transfer ya da vakum transfer ile yapılabilir.

Bununla beraber kapiler transfer ve 20XSSC buffer kullanarak pozitif olarak şarj edilmiş naylon membran ile maksimum transfer etkinliği ve hassaslığı sağlanır.

Aşağıdaki tüm inkübasyon basamakları nazikçe alt üst etme ile uygulandı.

- Jel HCl solüsyonuna batırıldı ve +15 ila +25 ^{0}C'de 5-10 dakika bromofenol mavisinin rengi sarıya dönene kadar çalkalandı.
- Jel iki defa H_2O ile durulandı.
- Jel denatürasyon solüsyonuna +15 ila +25 ^{0}C'de 2X15 dakika daldırıldı.
- Jel iki defa H_2O ile durulandı.
- Jel nötrolizasyon solüsyonuna +15 ila +25 ^{0}C'de 2X15 dakika daldırıldı.

Not: Pudrasız eldiven kullanıldı ve membranın pens ile sadece kenarlarından tutuldu.

- Southern blotting yapmak için gerekli tüm ekipmanlar hazırlandı.
- Trasfer tamponu olarak 20XSSC kullanılarak +15 ila +25 ^{0}C'de kapiler transfer ile parçalanmış DNA jelden naylon membrana blotlandı.

Not: 6 saat süreyle transfer, çoğu uygulamada yeterli hassasiyet sağlar. Bununla birlikte, sonuçların maksimum hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği için, gece boyunca blotlama yapıldı.

- Southern trasferinden sonra UV-crosslinking (120 mj) veya membran +120 ^{0}C'de 20 dakika ısıtılarak transfer edilen DNA wet blotting mabranına fikse edildi.
- Blotlama yapılan membran 2XSSC ile 2 defa yıkandı.
- Hibridizasyon ve kemülimünesans saptama adımları hemen yapılmadığı zamanlarda blotlama yapılan membran hava ile kurutuldu ve +2 ila +8 ^{0}C'de muhafaza edildi.

3.2.7.3. Hibridizasyon ve Kemülimünesans Deteksiyon

Not: Aşağıda tavsiye edilen volümler 200 cm^2 membran boyutuna dayanmaktadır. Volümler eğer başka boyutta membranlar kullanılacaksa ona göre ayarlanmalıdır.

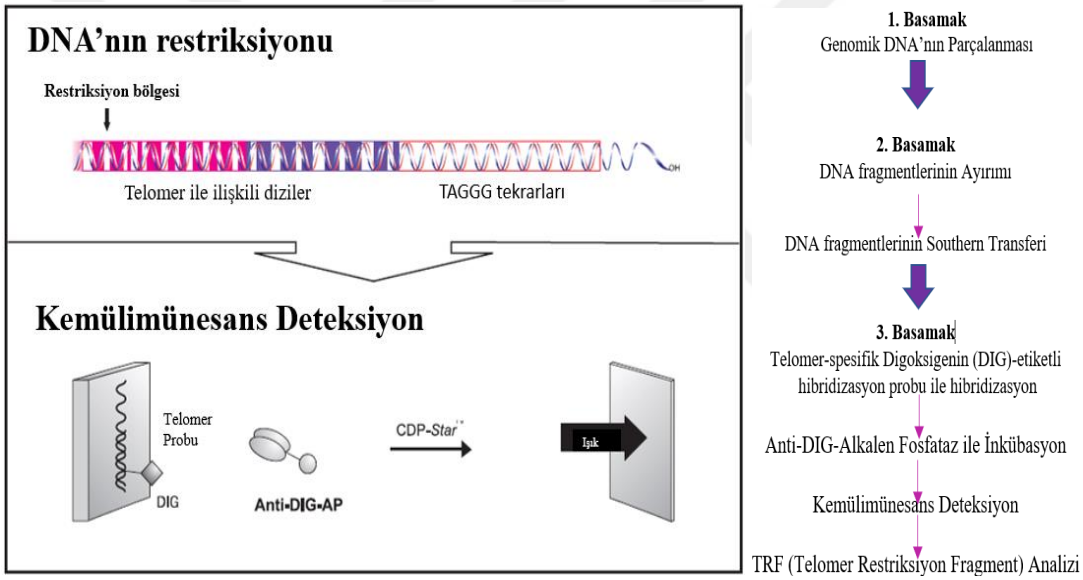
Hibridizasyon ve zorlu yıkama sıcaklıklarının titizlikle sürdürülmesi şiddetle tavsiye edilmektedir.

- Yaklaşık 25 ml DIG Easy Hyb Granules +42 ^{0}C'ye kadar ön ısıtma yapıldı.
- Prehibridizasyon için blot, 18 ml önceden ısıtılmış DIG Easy Hyb Granules'ün içine daldırıldı ve +42 ^{0}C'de 30-60 dakika nazikçe çalkalandı.
- Hibridizasyon solüsyonu, önceden ısıtılmış 5 ml taze DIG Easy Hyb Granules başına 1µl Telomer probu eklenerek hazırlandı ve karıştırıldı. Her 200 cm^2 blotting membranı için en az 6,5 ml hibridizasyon solüsyonu gerekti.
- Prehibridizasyon solüsyonu tamamen uzaklaştırıldı ve hemen membrana hibridizasyon solüsyonu eklendi.
- Nazikçe karıştırma ile 3 saat +42 ^{0}C'de inkübasyona bırakıldı.
- Hibridizasyon solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Membran iki defa stringent wash buffer I ile yıkandı (Her yıkama +15 ila +25 ^{0}C arasında 5 dakika nazikçe çalkalanarak yapıldı).
- Membran iki defa önceden ısıtılmış stringent wash buffer II ile bir sıcak su banyosunda yıkandı (Her yıkama 15-20 dakika +50 ^{0}C'de nazikçe karıştırma ile yapıldı).

Not: Deteksiyon uygulamasında temiz laboratuvar malzemeleri kullanıldı.

- Membran en az 100 ml 1XWashing buffer'da +15 ila +25 ^{0}C'de nazikçe karıştırma ile 1-5 dakika durulandı.
- Membran 100 ml taze hazırlanmış 1XBlocking solüsyonunda +15 ila 25 ^{0}C'de nazikçe karıştırmayla 30 dakika inkübe edildi.
- Anti-DIG-AP Working solüsyonu hazırlandı.
- Membran 50-100 ml Anti-DIG-AP Working solüsyonunda +15 ila 25 ^{0}C'de nazikçe karıştırılarak 30 dakika inkübe edildi.
- Membran iki defa 1XWashing buffer (her seferinde 100 ml) ile yıkandı (+15 ila 25 ^{0}C'de nazikçe karıştırma ile 2X15 dakika).
- Membran 100 ml 1XDetection buffer'da +15 ila 25 ^{0}C'de nazikçe karıştırılarak 2-5 dakikalığına inkübe edildi.
- Detection buffer atıldı ve DNA tarafı yukarı gelecek biçimde membran emici birkağıdınüzerine yerleştirilerek fazla sıvı membrandan alındı. Membranın kurumasına izin verilmedi.

- Islak membran hemen DNA tarafı yukarı bakacak biçimde açık bir hibridizasyon torbasına yerleştirildi ve yaklaşık 40 damla substrat solüsyonu (yaklaşık 3ml) çok hızlı bir şekilde uygulandı.
- Membran hemen hibridizasyon torbasının ikinci tabakasıyla kaplandı, substrat solüsyonu homojen bir biçimde hava kabarcıklarını hapsetmeden dikkatlice dağıtıldı.
- Membran +15 ila 25 ^{0}C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Fazla substrat solüsyonunusıkıldı ve hibridizasyon torbasının kenarları kapatıldı.
- Membran, görüntüleme cihazına veya X-ray filmine +15 ila +25 ^{0}C'de 20 dakikalığına maruz bırakıldı (TeloTAGGG Telomere Length Assay Version 10/ Cat. No: 12 209 136 001).



Şekil 3. 3. TeloTAGG Telomere Length Assay kiti ile telomer uzunluğu ölçümü.
(TeloTAGGG Telomere Length Assay Version 10/ Cat. No: 12 209 136 001)

3.2.8. İstatistik Analiz

Yapılan ölçümler ile elde edilen sonuçlar Sağlık Bilimleri Üniversitesi'nin sağladığı SPSS (V.20.0) biyoistatistik programı ile değerlendirildi. İPF hastalarının sonuçları, diğer İAH'ya sahip bireylerin ve sağlıklı kontrol grubunun sonuçları ile karşılaştırıldı. Telomer uzunlukları kit protokolündeki formül dikkate alınarak hesaplandı. İstatistiksel anlamlılığı test etmek için Chi-square, Student t, ANOVA ve non-parametrik Mann Whitney U testleri kullanıldı. Sanger dizileme sonuçları Finch TV V.1.4.0 ve Snapgene Viewer 4.3.11 programları ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. HASTALARIN KLİNİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

Çalışmaya Yedikule Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3. Klinikte tanı konulan 34 İPF, 31 sağlıklı ve 32 diğer İAH'ya sahip 40-85 yaş arası gönüllülerin seçildiği toplam 97 gönüllü dahil edildi. Gönüllülerin tanılarına göre dağılımları Çizelge 4.1'deki gibi bulundu. Klinik, patolojik ve radyolojik incelemeler sonucunda altı HP hastası bireyde NSİP paterni tespit edildi.

Çizelge 4. 1. Gönüllülerin Tanılarına Göre Dağılımı.
KEP; Kronik Eozinofilik Pnömoni

TANI	**n**	**%**
İPF	34	35,05
Sarkoidoz	12	12,37
HP	7	8,24
Sjögren Sendromu	2	2,06
RA-İAH	2	2,06
NSİP	2	2,06
KEP	1	1,03
Tanısı Konamayan İAH	6	6,18
Sağlıklı	31	31,95
TOPLAM:	**97**	

İPF hastalarının GAP skorlaması yapıldı. Evre I'de olan 14, evre II'de olan 17 ve evre III'te olan 1 İPF tanılı hasta çalışmaya dahil edildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 2. İPF Tanılı Bireylerin GAP Skoru.

GAP SKORU						
	0-3		**4-5**		**6-8**	
	EVRE I		**EVRE II**		**EVRE III**	
VERİ	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
ERKEK	10	40	14	56	1	4
KADIN	4	57,14	3	42,86	-	-

Çizelge 4. 3. Hasta ve Kontrol Grubunun Cinsiyet Dağılımı.

	İPF		**DİĞER İAH**		**KONTROL**		
CİNSİYET	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**P değeri**
Erkek	26	76,47	12	37,50	18	58,06	**0,006**
Kadın	8	23,53	20	62,50	13	41,93	

İPF hastalarının cinsiyet dağılımı incelendiğinde bireylerin büyük bir kısmını erkek bireyler oluşturmaktaydı. Bu veriler literatürde açıklandığı gibi hastalığın 50 yaş ve üzeri ve çoğunlukla erkek bireylerde görüldüğünü destekler nitelikte bulundu. Sigara kullanımı açısından İPF hastası bireylerde halen sigara içmekte olan ve önceden sigara kullanıp bırakan bireylerin diğer İAH'ya sahip ve sağlıklı bireylere oranla daha çok görüldüğü tespit edildi (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. Hasta ve Kontrol Grubunda Yaş ve Sigara Kullanım Verileri.

	İPF		DİĞER İAH		KONTROL		
VERİ	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**P değeri**
Yaş	34		32		31		**0,001**
50 >	26	76,47	18	56,25	17	54,84	
50 ≤	8	23,53	14	43,75	14	45,16	
ORTALAMA	63,81		54,9		52,32		
STANDART SAPMA	±8,17		±16,4		±8,43		
Sigara Kullanımı	33		21		31		**0,006**
İçiyor	6	18,18	1	4,76	11	35,48	
İçmiş Bırakmış	20	60,60	7	33,33	4	12,90	
Hiç İçmemiş	7	21,21	13	61,90	16	51,61	

Hastaların klinik değerlendirmesi için rutinde kullanılan solunum fonksiyon testi değerleri kullanıldı. FEV1 ve FVC değerleri hasta ve kontrol grubunda ölçüldü. İPF ve diğer İAH grubunun FEV1 ve FVC değerleri sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında iki grubun değerlerinin de sağlıklı bireylere göre daha düşük çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.5).

Çizelge 4. 5. Solunum ve Fonksiyon Testi Sonuçları.

	İPF		**KONTROL**		
Veri	**ORT**	**SS.**	**ORT**	**SS.**	**P değeri**
FEV1%	73,94	±19,42	89,00	±12,30	**0,015**
FVC%	70,47	±18,59	86,96	±12,16	**0,01**

	DİĞER İAH		**KONTROL**		
Veri	**ORT**	**SS.**	**ORT**	**SS.**	**P değeri**
FEV1%	70,73	±19,12	89,00	±12,30	**0,007**
FVC%	68,70	±20,03	86,96	±12,16	**0,02**

Hasta ve kontrol grubu bireylerin hemogram sonuçları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Çizelge 4.6).

Çizelge 4. 6. Hemogram Testi Sonuçları.

	İPF		DİĞER İAH		KONTROL		
	ORT.	**SS.**	**ORT.**	**SS.**	**ORT.**	**SS.**	**P değeri**
WBC	9.38	±4.59	8.39	±2.40	8.23	±2.48	0,135
RBC	4.80	±0.90	4.61	±0.65	5.08	±0.53	0,519
HGB	13.84	±2.02	12.47	±1.68	14.06	±1.48	0,55
HCT	41.39	±5.82	38.11	±4.67	42.33	±3.90	0,27
MCV	86.19	±7.12	83.34	±7.64	83.57	±5.84	0,80
MCH	28.78	±2.74	27.23	±3.10	27.81	±2.58	0,32
MCHC	33.32	±0.95	32.41	±1.40	33.24	±1.43	0,55
PLT	260.73	±82.33	294.85	±134.16	261.33	±75.99	0,19
MPV	10.33	±1.14	9.78	±0.96	10.47	±0.91	0,36
PCT	0.27	±0.07	0.31	±0.19	0.27	±0.08	0,34
PDW	12.07	±2.65	12.04	±2.30	13.45	±1.70	0,21

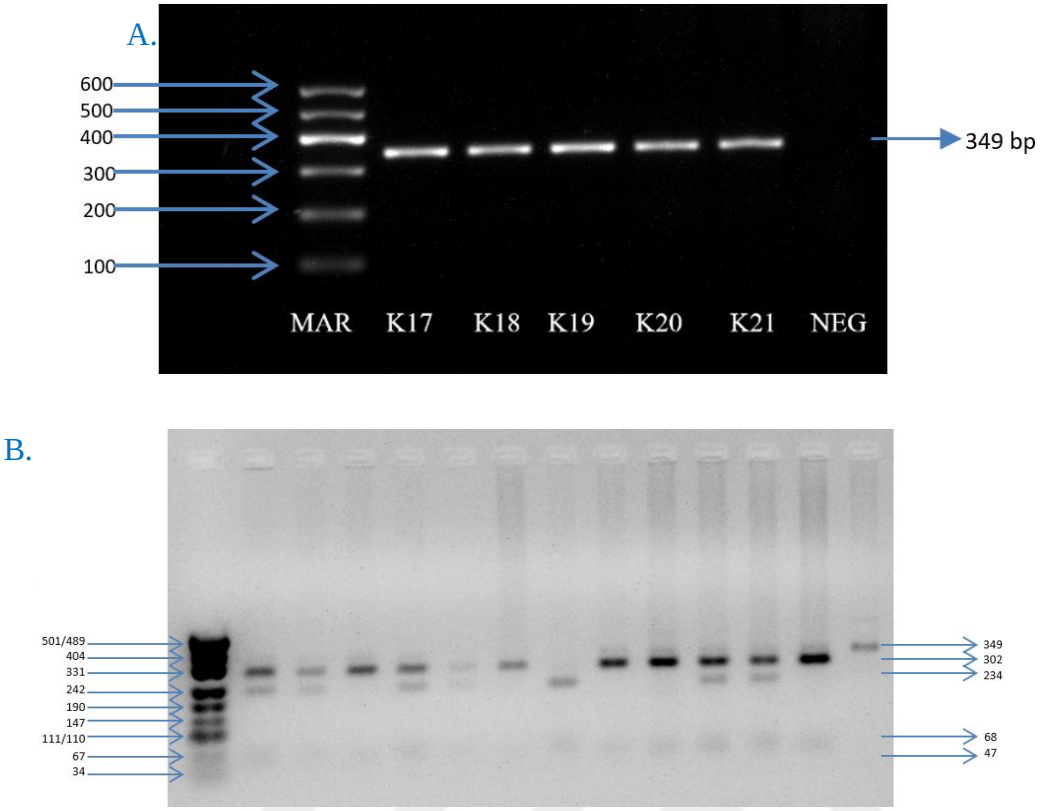
4.2. MUTASYON TARAMA SONUÇLARI

Projede İPF hastalarında dört genin tek gen mutasyonu incelendi ve çıkan sonuçlar neticesinde bu genler arasında bir pleiotropi olduğu ile ilgili bir sonuç oluşmadı.

4.2.1. RFLP Metodu ile Mutasyon Tarama Sonuçları

STN1 geni primer bölgesi içerisinde kalan hedef bölgenin restriksiyon kesimi için enzimler Snapgene viewer software 3.2.1 programı ile tespit edildi.

STN1 bölgesi için mutasyon tarama sonuçlarına göre İPF hastalarında en az görülen genotip GG olarak belirlenirken GA genotipinin bireylerde daha fazla olduğu tespit edildi. İPF dışı İAH'da ise GG ve AA genotipi birbirine yakın sayıda iken GA genotipi bireylerde daha fazla görüldü. Sağlıklı bireylerde mutasyon tarama sonuçlarına göre ise en az GG genotipi ve en çok GA genotipi RFLP sonuçlarına göre tespit edildi (Şekil 4.1, Çizelge 4.7).



Şekil 4. 1. STN1 PCR ve RFLP Görüntüsü.
A. PCR görüntüsü; %2'lik agaroz jelde 60 dk. yürütüldü, B. RLFP görüntüsü; %2'lik agaroz jelde 60 dk. yürütüldü.

STN1 geninin istatistiksel sonucuna göre gruplar arasında mutasyon bakımından anlamlılık tespit edilmedi (p=0,88) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4. 7. STN1 Geni Mutasyon Tarama Sonuçları.
G; wild type allel, A; mutant allel

	İPF		**DİĞER İAH**		**KONTROL**		
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**P değeri**
GENOTİP	**34**		**32**		**31**		
G/G	9	26,47	8	25,0	6	19,35	0,88
G/A	14	41,18	15	46,87	15	48,39	
A/A	11	32,35	9	28,12	10	32,26	
ALLEL	**68**		**64**		**62**		
G	32	47,05	31		27		0,89
A	36	52,94	33		35		

STN1 gen bölgesinde incenen mutasyon taraması sonucu bulunan genotip dağılımı crosstabs ile değerlendirilerek İPF tanı bireylerin ve diğer İAH'ların sağlıklı bireyler ile karşılaştırması yapıldı (Çizelge 4.8, Çizelge 4.9).

Çizelge 4. 8. İPF ve Sağlıklı Bireylerin STN1 Geni Genotiplemele Sonuçlarının Crosstabs ile Değerlendirilmesi.

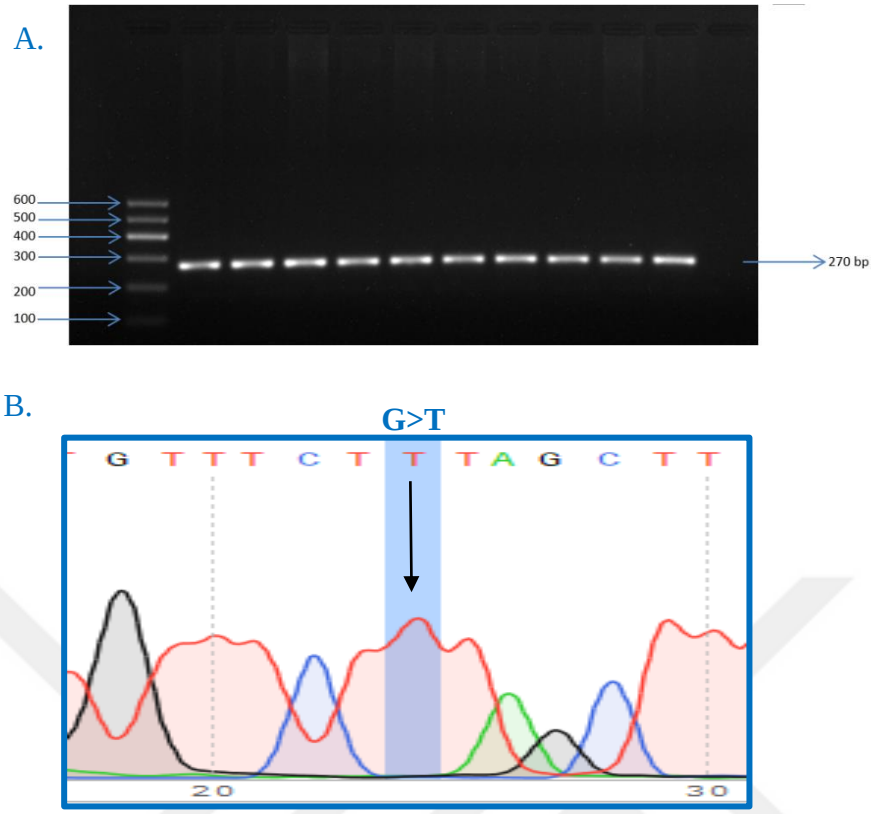
Crosstabs					
Grup		**GG**	**AA**	**GA**	**TOTAL**
İPF	n	9	11	14	34
	Grup İçi %	%26,5	%32,4	%41,2	%100.0
	GG, AA, GA içi %	%64,3	%50,0	%48,3	%52,3
Sağlıklı	n	5	11	15	31
	Grup İçi %	%16,1	%35,5	%48,4	%100
	GG, AA, GA içi %	%35,7	%50,0	%51,7	%41,7
Toplam	n	14	22	29	65
	Grup İçi %	%21,5	%33,8	%44,6	%100.0
	GG, AA, GA içi %	%100.0	%100.0	%100.0	%100.0
Odds Ratio	0,68				

Çizelge 4. 9. İPF ve Sağlıklı Bireylerin STN1 Geni Genotiplemele Sonuçlarının Crosstabs ile Değerlendirilmesi.

Crosstabs					
Grup		**GG**	**AA**	**GA**	**TOTAL**
Diğer İAH	n	8	9	15	32
	Grup İçi %	%25.0	%28.1	%46.9	%100.0
	GG, AA, GA içi %	%61.5	%45.0	%50.0	%50.8
Sağlıklı	n	5	11	15	31
	Grup İçi %	%16.1	%35.5	%48.4	%100.0
	GG, AA, GA içi %	%38.5	%55.0	%50.0	%49.2
Toplam	n	13	20	30	63
	Grup İçi %	%20.6	%31.7	%47.6	%100.0
	% within GG:0, AA:1, GA:2	%100.0	%100.0	%100.0	%100.0
Odds Ratio	1,39				

4.2.2. Sanger Dizileme ile Mutasyon Tarama Sonuçları

TERT geninde 34 İPF ve 15 diğer İAH mutasyon tarama sonuçlarına göre iki grup verilerine göre en düşük TT genotipi görülürken en yüksek GT genotipi görülmüştür (Şekil 4.2, Çizelge 4.10).



Şekil 4. 2. TERT Geni PCR ve Sanger Dizileme Görüntüsü.
A. PCR görüntüsü; %2'lik agaroz jelde 60 dk. yürütüldü, B. Sanger dizileme görüntüsü; Homozigot mutant allel.

TERT geni bakımından mutasyon tarama sonucunda genotipte istatistiksel anlamlılık bulunmazken (p=0,84) allel dağılımı incelendiğinde İPF ve diğer İAH'lar arasında anlamlı sonuç elde edilmemiştir. Ancak allel frekansı incelendiğinde P değeri 0,002 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10).

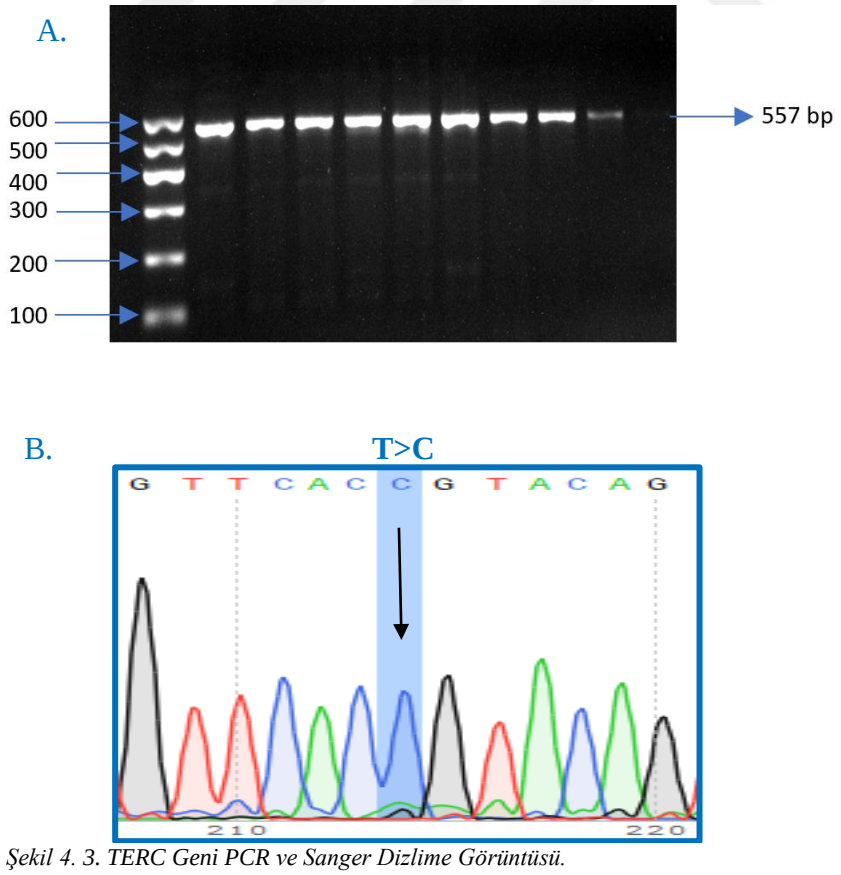
Çizelge 4. 10. TERT Geni Mutasyon Tarama Sonuçları.
G; wild type allel, T; mutant allel

	İPF		**DİĞER İAH**		
	n	**%**	**n**	**%**	**P değeri**
GENOTİP	**34**		**15**		
G/G	8	23,53	4	26,67	0,84
G/T	20	58,82	8	53,33	
T/T	6	17,65	3	20,00	
ALLEL	**68**		**30**		
G	36	52,94	16	53,33	**0,002**
T	32	47,06	14	46,67	

TERT gen bölgesinde incenen mutasyon taraması sonucu genotip dağılımı crosstabs ile değerlendirilerek İPF tanı bireylerin diğer İAH'lar ile karşılaştırması yapıldı (Çizelge 4.11).

Çizelge 4. 11. İPF ve Diğer İAH'ların TERT Geni Genotiplemele Sonuçlarının Crosstabs ile Değerlendirilmesi.

Crosstabs					
Grup		**TT**	**GG**	**GT**	**Total**
Interstisyel	n	3	4	8	15
	Grup İçi %	%20.0	%26.7	%53.3	%100.0
	GG, AA, GA içi %	%33.3	%33.3	%28.6	%30.6
İPF	n	6	8	20	34
	Grup İçi %	%17.6	%23.5	%58.8	%100.0
	GG, AA, GA içi %	%66.7	%66.7	%71.4	%69.4
Total	n	9	12	28	49
	Grup İçi %	%18.4	%24.5	%57.1	%100.0
	GG, AA, GA içi %	%100.0	%100.0	%100.0	%100.0



Şekil 4. 3. TERC Geni PCR ve Sanger Dizlime Görüntüsü.
A. PCR görüntüsü; %2'lik agaroz jelde 60 dk. yürütüldü, B. Sanger dizileme görüntüsü; Homozigot mutant allel.

34 İPF ve 15 diğer İAH grubu bireyin TERC geni mutasyon tarama sonuçları analiz edildiğinde gruplar arasında genotip bakımından anlamlı sonuç bulunamadı (p=0,79), fakat gruplar arası allellerin durumu incelendiğinde istatistiksel anlamlılık görüldü (p=0,001) (Şekil 4.3, Çizelge 4.12).

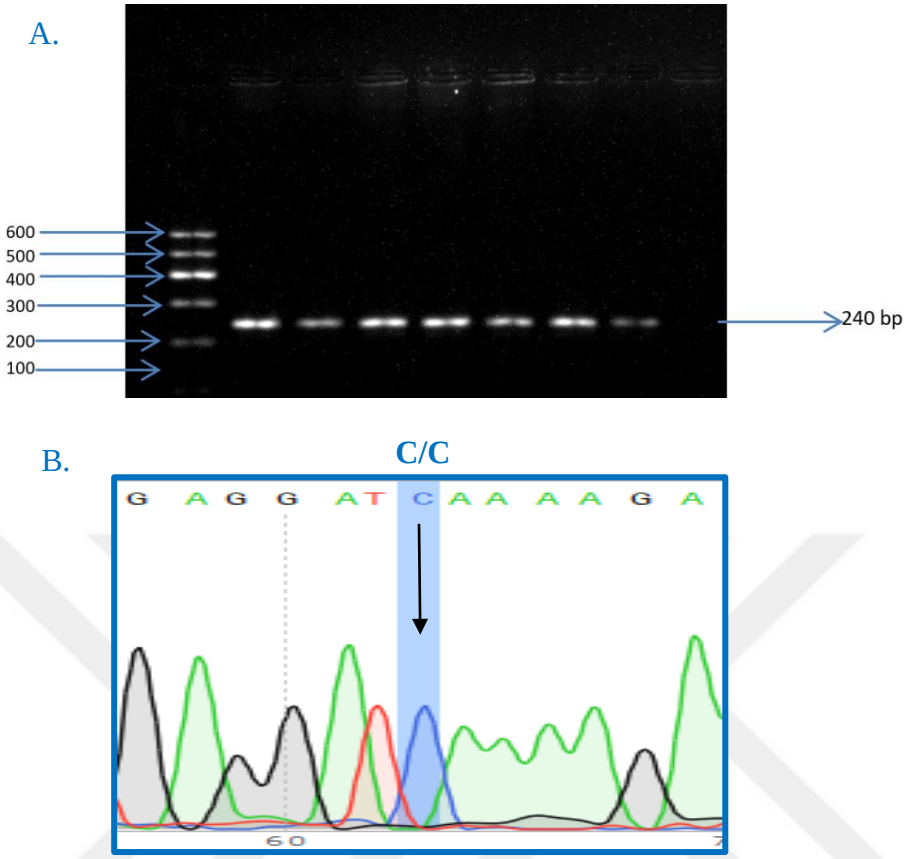
Çizelge 4. 12. TERC Geni Mutasyon Tarama Sonuçları.
T; wild type allel, C; mutant allel.

	İPF		**DİĞER İAH**		
	n	**%**	**n**	**%**	**P değeri**
GENOTİP	**34**		**15**		
T/T	12	35,29	6	40,00	0,79
T/C	19	55,88	6	40,00	
C/C	3	8,82	3	20,00	
ALLEL	**68**		**30**		
T	43	63,23	18	60,00	**0,001**
C	25	36,77	12	40,00	

TERC gen bölgesinde incenen mutasyon taraması sonucu bulunan genotip dağılımı crosstabs ile değerlendirilerek İPF tanı bireylerin diğer İAH'lar ile karşılaştırması yapıldı (Çizelge 4.13).

Çizelge 4. 13. İPF ve Diğer İAH'larda TERC Geni Genotiplemele Sonuçlarının Crosstabs ile Değerlendirilmesi.

Crosstabs					
Grup		**TT**	**CC**	**TC**	**Total**
Interstisyel	n	5	3	7	15
	Grup İçi %	%33,3	%20,0	%46,7	%100,0
	GG, AA, GA içi %	%33,3	%50,0	%20,0	%30,6
İPF	n	10	3	21	34
	Grup İçi %	%29.4	%8.8	%61.8	%100.0
	GG, AA, GA içi %	%66.7	%50.0	%75.0	%69.4
Total	n	15	6	28	49
	Grup İçi %	%30.6	%12.2	%57.1	%100.0
	GG, AA, GA içi %	%100.0	%100.0	%100.0	%100.0



Şekil 4. 4. PARN Geni PCR ve Sanger Dizileme Görüntüsü.
A. PCR görüntüsü; %2'lik agaroz jelde 60 dk. yürütüldü, B. Sanger dizileme görüntüsü; Homozigot wild-type allel.

İncelenen 34 İPF ve diğer İAH'ların PARN bölgesi genotipleme sonucunda genotiplerin tamamı homozigot wild type bulundu. Bu sebeple gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmadı (Çizelge 4.14).

Çizelge 4. 14. PARN Geni Mutasyon Tarama Sonuçları.
C; Wild type, T; mutant allel.

	İPF		**DİĞER İAH**		
	n	**%**	**n**	**%**	**P değeri**
GENOTİP	**34**		**15**		
CC	34	100	15	100	0,000
CT	0	0	0	0	
TT	0	0	0	0	
ALLEL	**34**		**15**		
C	34	0	15	0	0,93
T	0	0	0	0	

4.3. TELOMER UZUNLUĞU ÖLÇÜM SONUÇLARI

Telomer uzunluğu bakımından İPF tanılı hastalar, diğer İAH'ya sahip bireyler ve sağlıklı gönüllülerin TRF analizi sonucunda İPF ve diğer İAH'larının telomer uzunluklarının sağlıklı bireylere oranla daha kısa bulunduğu tespit edildi. Bu bireylerden 2 İPF, 1 sarkoidoz ve 1 KEP tanılı bireyin telomerleri 5,1 kb'nin altında çıkarak bu bireylerin telomerlerinin diğer gönüllülerin telomerlerinden daha kısa olduğu görüldü (Çizelge 4.15, Çizelge 4.16).

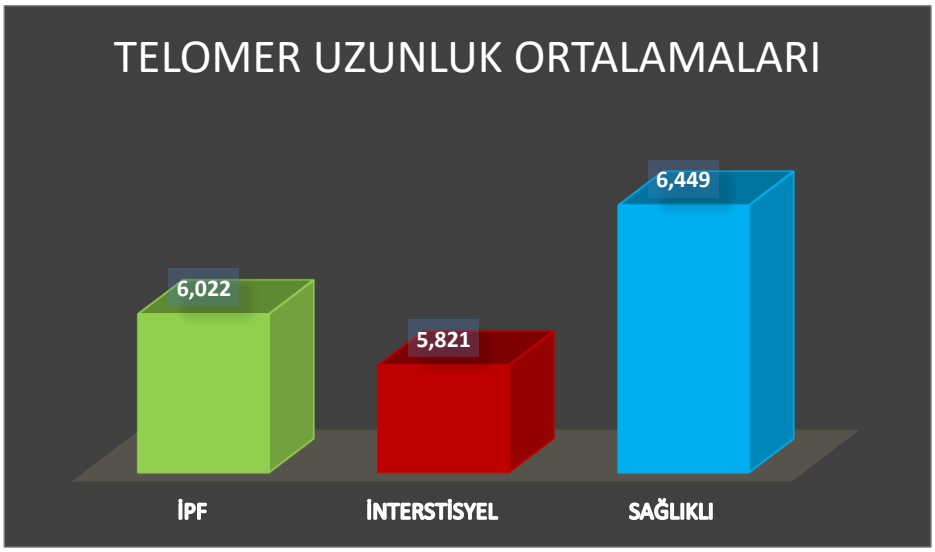
Çizelge 4. 15. Gruplar Arası Telomer Uzunluk Karşılaştırılması.

Test Statistics		
	Grup	TRF ANALİZİ
Chi-Square	.144[a]	112.600[b]
df	2	23
p	0,930	**0,0001**

Çizelge 4. 16. Diğer İAH'ya Sahip Bireylerin Telomer Uzunluklarının Sağlıklı Bireylerle Karşılaştırılması.

Grup	n	ORT.	SS.	P değeri
Sağlıklı	14	6,53	±1,18	
İPF Dışı İnterstisyel	32	5,94	±0,76	**0,049**
Toplam:	46			

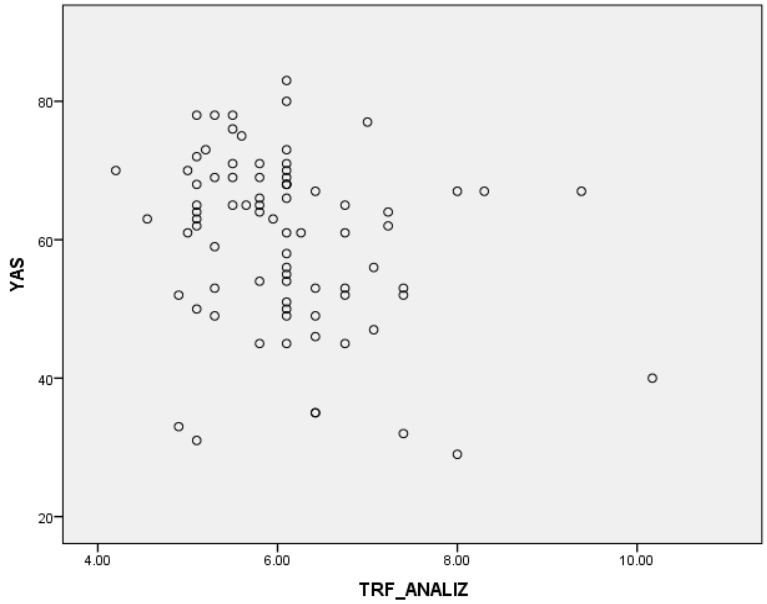
İPF, diğer İAH grubu ve sağlıklı bireylerin telomer uzunluk ortalamalarına bakıldığında en kısa telomerlere sahip bireylerin diğer İAH gurubunda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. Hasta ve Sağlıklı Bireylerde Telomer Uzunluk Ortalamaları.

İPF tanılı bireyler ve diğer İAH'lı bireylerin telomer uzunluklarının yaş ile karşılaştırılması sağlıklı bireyler ile yapıldı. Bunun sonucunda iki hasta grubunda da sağlıklı bireylere oranla anlamlılık tespit edildi (Çizelge 4.17, Çizelge 4.18).

Telomer uzunluğunun yaşa göre dağılımı sonucu yaşı ileri olan bireylerin telomerlerinin daha kısa olduğu görülmektedir (Şekil 4.6).



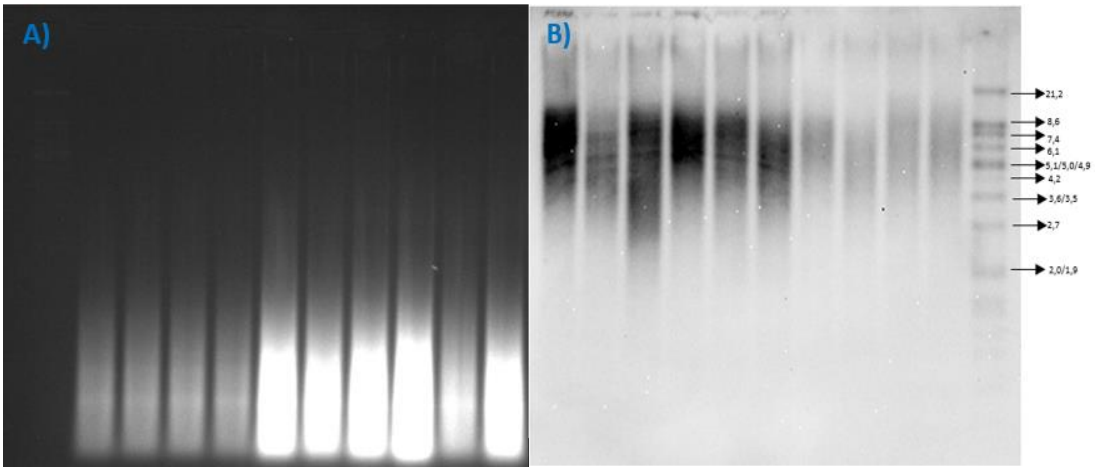
Şekil 4. 6. Telomer Uzunluklarının Yaşa Göre Dağılımı.

Çizelge 4. 17. İPF ve Sağlıklıların Yaş ile Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması.

	n	ORT.	SS.	P değeri
YAŞ	65	3,78	±1,59	0,000
TRF ANALİZİ	48	6,19	±1,13	**0,007**

Çizelge 4. 18. İPF Dışı İnterstisyel ve Sağlıklıların Yaş ile Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması.

	n	ORT.	SS.	P değeri
YAŞ	63	2,40	±1,45	0,089
TRF ANALİZİ	46	6,12	±0,94	**0,0001**



Şekil 4. 7. Southern Blot jel ve membran görüntüsü.
A) %0,8'lik agaroz ve TAE tamponu ile hazırlanan jel ile 3 saat yürütme 10 hasta örneği için hazırlandı. En başta bulunan 1kb'lik MBA Fermentas markır en solda silik görünen DIG molecular weigth markıra alternatif olarak eklendi. B) membrana substrat tamponu eklenip 5 dk. beklettikten sonra iBright imaging cihazı ile kemülimünesans görüntüleme sonucu

5. TARTIŞMA

İPF hastalığı, mortalitesi yüksek olması ve şu ana kadar bilinen etkili ve kesin bir tedavi yönteminin bulunmaması sebebiyle bilimsel alanda ilgi gören ve üzerinde halen birçok çalışma yürütülen bir hastalık türüdür. Nintedanib ve pirfenidon gibi ilaçların klinikte hastalar için kullanılmasına rağmen hastalığı ortadan kaldırma konusunda yardımı olamamaktadır. Bu sebeple hastalar için en uygun seçenek akciğer transplantasyonudur (4, 37, 77, 79, 80).

Hastalık, genellikle 50 yaş üstü ve çoğunlukla erkek bireylerde görülmektedir (50,52). Araştırmamız neticesinde de hasta grubumuzu 50 yaş üstü ve çoğunluğu erkek bireyler oluşturmuştur.

İPF ile ilgili yapılan moleküler birçok çalışma olmasına ve rutinde KL-6, MMP-7 gibi gibi moleküllerin bazı ülkelerde kullanılmasına rağmen klinik uygulamada tüm Dünya'nın kabul gördüğü bir biyobelirteç henüz bulunmamaktadır. Bu sebeple hastalığın tanısı, prognozu ve sağ kalımına yönelik araştırmalar halen sürmektedir. Hastalığın daha iyi anlaşılması için yürütülen çalışmalar neticesinde genetik ve çevresel faktörlerin İPF oluşumunda risk oluşturduğu bildirilmiştir (1, 47). Araştırmalar sonucunda familyal ve sporadik vakalarda birçok hastalıkla ilişkisi olduğu düşünülen varyantlar keşfedilmiştir (9). Hastalığa özgü biyobelirteçler bulma yolunda yürütülen araştırmalarda alveolar epiteliyal hücrelerde yara oluşumu, fibroblastların çoğalması, immün regülasyon ve ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesi gibi işlevlerde bağlantısı bulunan çok sayıda molekül keşfedilmiştir (81,83).

Yaşlanma, birçok organda ilerleyen bir şekilde bozulma ve bunun sonucunda ise dokuda işlevsel bozukluklara yol açan aşamalı fonksiyonel azalma ile karakterize bir durumdur. Telomer aşınımı, DNA hasarı, mitokondriyal bozukluklar, kök hücrelerin tükenmesi ve epigenetik faktörler yaşlanmaya sebep olan önde gelen etmenler içinde yer almaktadırlar. Hücresel yaşlanma İPF'yi de içine alan birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bu olay üzerinde telomer kısalmasının etkisi olduğu ve sağ kalım yönünde kötü prognoza sebep olduğu önceki araştırmalarda ortaya konmuştur (104, 105, 118).

Telomerler, kromozomların uçlarını füzyon veya degradasyondan koruyan tekrarlı bölgelerdir. Telomerlerin uzamasını sağlayan mekanizmaların bulunmaması durumunda telomer uçları kısalmaya başlar ve bunun sonucunda hücre aşamalı bir şekilde yaşlanmaya gider. Telomerle ilişkili mekanizmalarda oluşan beklenmedik durumlar telomerlerin normal

olmayan bir biçimde kısalmasına ve bunun sonucunda ise telomerle ilişkili patolojik durumlara yol açabilmektedir (119). Bunun yanında omurgalılarda TTAGGG tekrar bölgeleri kromozomların terminal bölgeleri dışında da bulunabilirler ve bu tekrar bölgeleri ise interstisyel telomerik sekanslar (İTS'ler) (veya intestisyel telomerik tekrarlar) olarak adlandırılmaktadır. Bu diziler telomer ve sentromer arasındaki konumlarına göre perisentrik veya sentromerik İTS'ler gibi isimler almaktadır. Omurgalılarda kısa, subtelomerik ve füzyon İTS'leri bulunurken heterokromatik İTS insanlarda bulunmamaktadır. İTS'ler fonksiyonel telomerler gibi görev almamasına rağmen genom instabilitesi ve kromozomal değişimlerde önemli rolü olduğu bilinmektedir (120).

Snetselaar ve arkadaşlarının telomer kısalmasının İPF hastalığı üzerindeki etkisi üzerine yürüttüğü bir çalışmada akciğerdeki fibrotik ve non-fibrotik bölgelerdeki telomerlerin uzunluğu ölçülmüş ve bunun sonucunda da Tip II alveolar epiteliyal hücrelerinde telomer kısalması tespit edilmiş, ayrıca telomer kısalmasının fibrotik oluşuma sebep olabileceği ve sağ kalımı olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (121).

Telomer uzunluğunun İAH'da daha hızlı akciğer fonksiyonunda düşüşe yol açtığı ve prognozun kötüye gitmesine sebep olduğu Newton ve arkadaşlarının MUC5B ve telomer kısalmasının prognozu ve sağ kalımı ile ilişkisinin bulunduğu çalışmasında ortaya konmuştur. Çalışmada otoimmün özellikli interstisyel pnömoni (IPAF), bağ doku hastalığı-İAH ve İPF hastalarını telomer uzunluğu ve MUC5B (rs35705950) ve TOLLIP (rs5743890) mutasyonları karşılaştırılmış. Buna göre IPAF hastalarında telomer kısalmasının İPF'ye oranla daha yüksek bulunduğu ve ayrıca İPF'de prognozu iyi seyreden MUC5B mutasyonunun IPAF hastalarında tam tersi bir tablo oluşturduğu görülmüştür (122). Bizim de bu çalışmamızda amacımız kandaki lökositlerin telomer uzunluklarını ölçerek telomer kısalmasının hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğunu göstermek ve İPF'de öne çıkan genlerdeki mutasyonları Türk popülasyonunda incelemek olmuştur. Çalışmamız neticesinde sağlıklı bireylerin telomerlerinin İPF ve diğer İAH'larına oranla daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Bu da daha önce yapılan telomer uzunluğu ölçümü ile ilgili çalışmaları destekler niteliktedir.

Dressen ve arkadaşlarının MUC5B ve telomeraz genlerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada ise İPF hastalarında prognozun yavaş ilerlediği ve sağ kalımın daha yüksek görüldüğü MUC5B-TOLLIP arasındaki intron bölgesinde bulunan rs35705950 varyantı ve telomer kısalmasına yol açmakla beraber prognozu ve sağ kalımı olumsuz yönde etkileyen, ayrıca telomer kısalmasına sebep olan TERT, TERC, PARN ve RTEL1 geninin protein

değiştiren varyantlarını içeren telomeraz ilişkili genler üzerinde durulmuştur. Analiz sonuçlarına göre pirfenidonun öncü denemelerinde bir yıllık FVC'deki düşüş ölçümü ile MUC5B risk allelinin daha yavaş ve telomer kısalmasının daha hızlı hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu çalışmada söz edilmiştir. Bunun yanında, TERT, TERC, PARN ve RTEL1 geni nadir varyantı taşıyan İPF'li bireylerin telomer uzunluklarının ortalama 348 bç (standart sapma; 122) olarak bulunduğu ve bu varyantları taşımayan bireylerin telomerlerinden daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Ancak rs35705950 varyantı ile sınıflandırılan bireylerde telomer uzunluğu üzerinde nadir varyantların hiçbir etkisi bulunmamıştır (p=0,94). Çalışmanın neticesinde, İPF hastalarının tüm genom dizileme sonuçları ile yaygın rs35705950 SNP varyantı, TERT geni nadir varyantları ve telomeraz kompleksi bileşenlerini kodlayan diğer genler, telomer uzunluğu, hastalığın görülme yaşı ve prognozu arasında kompleks bir genetik ilişki var olduğu bulunmuştur (123).

Telomer uzunluğunun İPF hastalarında sağ kalımın etkisinin araştırıldığı Stuart ve arkadaşlarının çalışmasına göre kısa telomerlerin sağ kalım üzerinde kötü prognoza sebep olduğu sonuç olarak öne sürülmüştür. Araştırmada, uzunluğu kan lökositlerinden qPCR metoduyla ölçülmüştür. Ayrıca İPF grubundan TERT mutasyonu taşıyan vakaların hepsinin telomerlerinin kısa olarak bulunduğu beyan edilmiştir. Sonuç olarak telomer kısalmasının hastalığın patogenezi, progresyonu ve azalan sağ kalım ile ilişkisi olduğu ortaya ortaya konmuştur (124). Bu çalışmada ise biz de İPF tanılı hastaları İAH ve sağlıklı bireylerle telomer uzunluğu bakımından karşılaştırdık. Bu üç grubun telomer uzunluğu bakımından anlamlı bir farklılık görülmemesine rağmen 2 İPF, 1 sarkoidoz ve 1 KEP tanılı bireyin telomerlerinin diğer bireylere göre daha kısa olduğu tespit edildi.

Cerezales ve arkadaşlarının telomer kısalması ile ilgili bir çalışmasında ise kandan telomer uzunluğu ölçülmüş ve bunun sonucunda telomer uzunluğundaki azalmanın üç yıllık sağ kalımı kötü yönde etkilediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, telomer kısalmasının 60 yaşın altındaki bireylerde en kötü prognozu gösterdiği görülmüş ve bu hastaların bazı immünolojik ve hematolojik anormallikler taşıyan bireylerinde telomer kısalığı riskinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca klinik fenotipe göre telomer kısalığının farklılık gösterdiğinden de bu çalışmada bahsedilmiştir (105). Liu ve arkadaşlarının lipopolisakkarit veya bleomisin ile indüklenmiş fare modeli çalışmasında da TERC geni susturulan kısa telomerli ve mutant fareler normal grup ile karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada ise telomer kısalmasının fosforile smad3 ve TGF-β1 seviyesini arttırarak TGF-β/smad sinyal yolağını aktive ettiği bildirilmiştir.

Sonuç olarak da çevresel etkenlere bağlı akciğer hasarıyla birlikte oluşan telomer kısalmasının pulmoner fibrozis gelişimini hızlandırdığı ve TGF-β/smad sinyal yolağıyla birlikte İPF oluşumunda etkili olduğu çalışmada ortaya konulmuştur. Bu da telomer kısalmasının diğer faktörlerle birlikte hastalık oluşumuna sebep olduğunu göstermektedir (125).

İPF'de telomeropati ile bağlantısı bulunan genler familyal vakalarda otozomal resesif kalıtım paterni göstermekle beraber sporadik vakalarda ise nadir olarak görülmektedir. Literatürde ortaya konulan verilere göre özellikle telomeraz ilişkili genlerin telomer kısalmasında etkisinin büyüklüğü, ayrıca hastalığın patogenezi ve sağ kalım ile bir bağlantısı olduğu bildirilmiştir (14, 105, 106, 107). Telomerlerin korunması ve telomeraz aktivasyonunda görev alan birçok gen bulunmasının yanında İPF hastalığında etkisi olduğu (yaklaşık %10 sporadik İPF ve %25 familyal İPF) düşünülen ve hastalarda nadir mutasyonlar olarak görülmüş olan bazı genler tespit edilmiştir. Bu genlerin ise hastalığın seyrini kötü yönde etkilediği düşünülmektedir (103,106). TERT, RTEL1, PARN, TERC, DKC1, TINF2, STN1 ve NAF1 gibi telomer ilişkili genlerde oluşan mutasyonların İPF'nin de içinde bulunduğu pulmoner hastalıklarla bağlantılı olabileceği yapılan genetik araştırmalar sonucu bildirilmiştir (106, 126, 127).

Telomeraz ilişkili gen mutasyonları İPF hastalığında nadir mutasyonlardan sıkça sözü edilen mutasyon türleridir. Özellikle TERT geninin intron bölgesindeki rs2736100 numarasına ait varyantı, TERC geninin yanındaki bir bölgede bulunan LRRC34 bölgesindeki rs6793295 varyantı ve STN1 geninin intron bölgesinde bulunan rs11191865 varyantı bu genler için öne çıkan mutasyon türlerindendir. Biz de bu çalışmamızda bu varyantlara ait tek nükleotid değişimlerini hastalarımızda inceleyerek hastalığa etkisini görmeyi amaçladık. Araştırmamız sonucunda İPF tanılı hastalar, İAH ve sağlıklı bireyler arasında bu genlerde genotipleme sonuçları bakımından anlamlılık tespit edilmedi. Ancak TERT ve TERC geni allelik dağılımı sonuçlarında istatistik anlamlılık belirlendi. RTEL1 ve PARN genleri ile ilgili olarak ise fonksiyon kaybı mutasyonları bu hastalıkta görülen mutasyon türlerindedir. DKC1 geni mutasyonları ise diskeratozis konjenita hastalığında görülmekle birlikte İPF hastalığında da bu gende görülen mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu genler ile ilişkili mutasyonların en önemli ortak özelliği ise telomer uzunluğu ile bağlantılı olmaları ve bu genlerde görülen mutasyonların telomer kısalmasına sebep olabilmeleridir (1, 2, 11, 117).

Varshney ve arkadaşlarının 2014 yılında HeLa hücrelerinde telomer ilişkili genlerin global ekspresyon profilini inceledikleri çalışmada TERT ve TERC genlerinin kanser

hücrelerinde yüksek derecede ifade edildiği bilgisinden yola çıkarak TERT geninin oto regülatör etkisi olabileceği bildirilmiştir. Çalışmada TERT geni siRNA (short interfering RNA) ve shRNA (short hairpin RNA) kullanılarak susturulmuş ve bu girişim neticesinde 388 genin farklı ekprese olduğu (p=0,05, fold change>2), bunlardan 80 genin ekspresyonunun up-regüle olduğu (konkordans derecesi %21) görülürken 73 genin down-regüle olduğu (konkordans derecesi %19) görülmüştür. Bununla birlikte telomeraz aktivitesi ölçümü için kullanılan bir yöntem olan TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) ile TERT geni shRNA aracılığıyla susturulan HeLa hücre hattında telomeraz aktivitesi ölçülmüş ve telomeraz aktivitesinde azalma gözlenmiştir (128). Telomerazın terapötik etkisinin gösterilmek istendiği bir çalışmada ise bleomisin ile muamele edilmiş fareler kullanılarak AAV9 vektörleri kullanılarak TERT temelli gen terapisi uygulanmıştır. Bunun sonucunda telomeraz aktivitesi artmış , telomer elongasyonu ve Tip2 AEH'lerin proliferasyonunun yanında DNA hasarı, apoptoz ve senesenste azalma görülmüştür. Ayrıca tip 2 AEH'lerde telomeraz tedavisinin daha düşük kollajen birikimine, daha az inflamasyona ve azalan fibroblastik odaklara öncülük ettiği bulgularla ortaya konulmuştur ($p=0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$). Ayrıca AAV9-TERT muamelesiyle αSMA-pozitif miyofibroblastlarında azalmanın yanında bazı sitokin türlerinde de tedavi sonrası düşüş gözlemlenmiştir (129). Buna göre telomer ilişkili genlerin İPF oluşumunda direkt etken olmamakla birlikte pleiotropik olarak hastalık oluşumuna yol açan yolaklarda yer alan diğer genler üzerindeki regülatör etkisi hastalığın tetiklenmesi ve prognozu açısından büyük öneme sahiptir.

Newton ve arkadaşlarının yayınladığı bir başka çalışmada, %46'sını İPF hastalarının oluşturduğu 115 İAH'lı familiyal vakada TERT (n=75), TERC (n=7), RTEL1 (n=14) ve PARN (n=19) mutasyonu taşıyan bireylerde aynı klinik fenotipi veya klinik seyrin progresyonu incelemek amacıyla İPF ve non-İPF grup incelenmiştir. Çalışmaya göre TERC mutasyonu taşıyan bireylerde (51±11 yaş) PARN mutasyonu taşıyanlara göre (64±8 yaş, p=0,03) ortalama tanı yaşının daha genç yaşlarda konulduğu gösterilmiştir. PARN mutasyonu taşıyan bireylerin yaşa bağlı telomer uzunlukları TERT mutasyonu taşıyanlara göre daha uzun bulunmuştur (-0,36±0,14 ve -0,58±0,27; p=0,013). Ayrıca TERC mutasyonu taşıyan bireylerde hetolojik komorbiditelerin daha çok görüldüğü de belirtilmiştir ($p<0,05$). Bu kohortta dokuz ailede genetik yatkınlık incelendiğinde TERT ve RTEL1 mutasyonları açısından anlamlı sonuçlar elde edilirken (p=0,003 ve p=0,018) PARN mutasyonu için istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiştir (p=0,55). Bunun yanında İPF ve İPF dışı İAH grup

ortalama sağ kalım açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülememiştir (2,75 ve 3,11 yıl). Bu veriler ışığında telomer ilişkili mutasyonların İAH'da tanı ve prognoz açısından etkili olduğu rapor edilmiştir (130).

Telomeraz ilişkili gen mutasyonlarından TERT ve TERC geni ile ilgili 100 sporadik İPF hastasının bulunduğu bir çalışmada 6 yeni heterozigot mutasyon tespit edilmiş, bunlardan dördü TERT geni mutasyonu (V777L, F1032I, T644M ve R622H), geri kalan ikisi TERC mutasyonu (108 C>T, 141 C>T) olarak tespit edilmiştir. Bu hastaların telomer uzunlukları ölçüldüğünde TERT veya TERC mutasyonu taşıyan İPF hastalarının (0.656±0.125) telomerlerinin mutasyon taşımayanlara göre (1.080±0.6819, p=0.0184) daha kısa olduğu görülürken, mutasyon taşımayan hastaların telomerlerinin ise kontrol grubu (1.244±0.5890, p=0.0355) ile karşılaştırıldığında daha kısa olduğu açıklanmıştır. Ayrıca mutasyon taşıyan bireylerde ($160.167\pm28.089\times10^9$) trombositopeni görülme oranının mutasyon taşımayanlara göre ($191.018\pm71.187\times10^9$, p=0.047) daha fazla olduğu bulunmuştur (131). TERT geni promotör bölgesi mutasyonlarının (TERTp) incelendiği bir başka çalışmada -124 ve -146 varyantları İPF vakalarında tanımlanmış ve aplastik anemi vakaları ile karşılaştırıldığında patojenik TERTp varyantlarının frekansının İPF hastalarında daha yüksek olduğu çalışmada ortaya konmuştur (p=0,007) (132).

Salgado ve arkadaşlarının telomeropati ve genetik analizine yönelik çalışmasında Diskeratozis Konjenita (n=4), aplastik anemi (n=22) ve pulmoner fibrozis (n=21) hastalığı taşıyan 47 vaka incelenmiş ve telomer ilişkili TERT, TERC, RTEL1, CTC1 ve ACD genlerinde bazı varyantlar tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda TERT geninde, p.R447C (rs1304418053) ve p.R742H missens varyantı, p.S602L (rs759017540) aminoasit varyantı, p.R671W (rs1060503011) patojenik varyant görülürken bir hastada da aminoasit 671_672'de çerçeve kayması delesyonu tespit edilmiştir. TERC geninde ise r.269G>A ve r.23G>C varyantları tespit edilirken CTC1 geninde ise p.P722S varyantı görülmüştür. RTEL1 geni varyasyonlarından ise p.R988* (rs398123017) patojenik varyant, p.F988L (rs1470145133) ve p.R574C (rs369419645) varyantları bildirilmiştir. Çalışmada telomer ilişkili varyantları taşıyan bazı vakalarda ayrıca DNA tamiri ile ilişkili nadir varyantlar da bulunduğu sonuçlarda belirtilmiştir (133). Başka bir çalışmada ise 44 yaşındaki familyal bir vakada TERT geninde (c.2701C>T) Arg901Trp heterozigot mutasyonundan bahsedilirken bu vakada trombositopeni (90x109/sL) ve telomer kısalığı da (<1. yüzde) görüldüğü bildirilmiştir (134). Diğer bir çalışmada ise Zheng ve arkadaşları 3 İPF hastası ve bunların etkilenmemiş 5

aile bireyinde tüm genom dizileme yapılmış ve TERT geninde c.2146G>A (p.Ala716Thr) heterozigot nadir missens varyantı sadece hastalıktan etkilenmiş bireylerde görülmüş, ayrıca bu varyantı taşıyan bireylerde akut alevlenme ile kötü prognoza sahip oldukları bildirilmiştir. Hastaların tanı konulduktan sonra ortalama sağ kalım süresi 2,8 yıl olarak bu çalışmada tespit edilmiştir (135).

Konak savunması ve senesens ile ilişkili genlerde bulunan lokusların İPF hastalığı için risk oluşturabileceği literatürde çokça geçmektedir. Bu olguyu destekler nitelikte olan bir GWAS (Genome-Wide Associaton Study; European Ancestry) çalışmasında 478 familyal, 3146 sporadik vaka ve 4442 kontrol grubu varyantları incelenmiştir. Çalışmada sequence kernel association test kullanılarak tek yaygın varyantlar ve nadir varyantlar grubu incelenmiştir. Analiz sonuçları neticesinde MUC5B yaygın promotör varyantının (rs35705950) en güçlü risk varyantı olduğu belirtilirken ($p=9,60x10^{-29}$), TERT ve RTEL1 bölgelerindeki nadir varyantların rolünün İPF riski üzerinde etkisi doğulanmış ve FAM13A ile TERT bölgelerinin bağımsız yaygın ve nadir varyant sinyalleri olduğu görülmüştür. Çalışmada telomer ilişkili genlerden baş yaygın varyantlar incelendiğinde TERC geni rs2293607 ($9,11x10^{-13}$) downstream varyantı, TERT geni rs4449583 ($2,67x10^{-25}$) intronik varyantı ve OBFC1/STN1 rs2488000 ($7,13x10^{-9}$) intronik varyantının başlıca yaygın varyant ilişkisi incelenerek İPF hastalığı riski açısından rolü doğrulanmıştır (136).

Kropski ve arkadaşlarının familyal interstisyel pnömoni vakaları ile yaptıkları bir çalışmada, 69 yaşında TERT ve TERC mutasyonu taşımayan ve kısa telomere (kan lökositleri ve AEH'lerde ölçülmüş) sahip olan bir proband NOP10, TINF2, NHP2 ve DKC1 genleri seanslanarak incelendiğinde DKC1 geninde (hTR bağlanma bölgesinin yanında) Thr405Ala (G1213 transisyonu) mutasyonu tespit edilmiş, ardından sanger dizileme ile doğrulaması yapılmış ve bu yeni diskerin missens mutasyonunun bu hastanın İPF hastası olan kardeşinde de görüldüğü açıklanmıştır (116).

Stuart ve arkadaşlarının familyal pulmoner fibrozis vakaları ile yürüttükleri bir çalışmada, TERT, TERC, SFTPC ve SFTPA nadir varyantlarını içermeyen 185 akraba seçilmiş, bunların RTEL1 ve PARN geni varyantları incelenmiş ve mutasyon oranları sırasıyla en az %4 ve %3 olarak tespit edilmiştir. PARN geni için probantlarda 6 hasar varyantı bulunurken kontrol grubunda tespit edilmemiştir ($3,8x10^{-10}$). Bir probandda is yeni missens varyantı bulunmuştur (Lys421Arg). RTEL1 geninde ise 2 hasar veren ve 3 missens varyant olmak üzere 5 yeni heterozigot varyant belirlenmiştir. RTEL1 ve PARN geni

mutasyonu taşıyan bireylerin telomer uzunlukları ölçüldüğünde telomerleri anlamlı derecede kısa olduğu gösterilmiştir (11). Biz de bu çalışmada PARN genine ait c.529 C>T (Gln177*) mutasyonunu hastalarımızda inceledik. Seçtiğimiz varyant Newton ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da telomer kısalığı bulunan bir hastada tespit edilmiştir (130). Bizim çalışmamızda ise hiçbir hastada bu mutasyonu homozigot veya heterozigot olarak taşıyan birey görülmemiştir.

TERT, TERC, PARN ve STN1 genotiplemelerinin, İPF tanılı hastaların diğer İAH ve sağlıklı bireylerle karşılaştırılması ile elde etmiş olduğumuz sonuçlar literatürde yer alan bazı genotipleme çalışmalarıyla örtüşmemektedir. Ancak, allelik incelemede TERT (P=0,002) ve TERC geni için (P=0,001) istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Bu allelik varyasyonların hastalığın oluşumunda, prognozun ve sağ kalım sürelerinin kısalmasında etkili olabileceği ve farklı genlerle etkileşim içinde olması bakımından önemli olduğu kanaatindeyiz.

6. SONUÇLAR

İPF hastalığının birçok gen ile ilişkisi olduğu daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. Hücre yaşlanmasında rolü olan telomer kısalmasının bu hastalıkta prognozu kötü etkilediği bilindiğinden biz de çalışmamızda telomer kısalması ve buna sebep olabilecek genleri ele alarak telomer ilişkili dört gendeki tek nükleotid mutasyonlarını Türk popülasyonunda inceledik. Pleiotropik olarak da çok sayıda farklı genin ortak etki gösterip göstermeyeceği noktasından yola çıkılarak telomer uzunluğuna bağlı prognoz gelişimi, hasta ve kontrol gruplarımız arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. Hasta ve kontrol gruplarının telomer uzunlukları karşılaştırıldığında ise İPF ve diğer İAH grubundaki bireylerin telomerlerinin sağlıklı bireylerinkinden daha kısa olduğu görülmüştür. İncelenen gen bölgelerindeki mutasyonların telomer kısalığı ile ilişkisi tespit edilmemiştir. Buna karşı telomeraz ilişkili iki gende tespit edilen allelik farklılığın hastalığın patofizyolojisiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar telomer kısalmasının prognozu kötü yönde etkilediği şeklindedir. Biz de çalışmamızın ikinci sonlanım noktası olarak, incelediğimiz hastaları, prognoz ve sağ kalım açısından izleyerek, telomer kısalığı olan bireylerin izlem sonuçlarının hastalık ile ilişkisini göstermeyi ve bu konuda tedavi protokollerinde kullanılabilecek biyobelirteçler tespit etmeyi hedeflemekteyiz.

Çalışmamızın zayıf yönü, hastalık tanısının çok zor konması, yeterli hasta sayısı elde edilememesi ve telomer ilişkili diğer tüm genlerin incelenememesidir. Bundan sonraki süreçte bu zayıflıkların giderilmesi ile yapılacak olan çalışmaların gerek tanı gerek prognoz açısından çok daha aydınlatıcı olacağı düşüncesindeyiz.

Bu proje İPF hastalığı hakkında Türkiye'de yapılan ilk moleküler çalışma olması sebebiyle önem arz etmektedir. Bunun yanında araştırmanın hastalığın patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması açısından literatüre katkı sağlamasını beklemekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Kaur A, Mathai SK, Schwartz DA. Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis, Prognosis, and Treatment. Front Med (Lausanne). 2017 Sep 25;4:154. doi: 10.3389/fmed.2017.00154. eCollection 2017. Review.
2. Zhou W, Wang Y. Candidate genes of idiopathic pulmonary fibrosis: currentevidence and research. Appl Clin Genet. 2016 Feb 2;9:5-13. doi: 10.2147/TACG.S61999. eCollection 2016. Review.
3. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ryu JH, Tomassetti S, Lee JS, et al. A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. Ann Intern Med. 2012 May 15;156(10):684-91.
4. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Nat Rev Dis Primers. 2017 Oct 20;3:17074. doi: 10.1038/nrdp.2017.74. Review.
5. Sharif R. Overview of idiopathic pulmonary fibrosis (İPF) and evidence-based guidelines. Am J Manag Care. 2017 Jul;23(11 Suppl):S176-S182.
6. Robbie H, Daccord C, Chua F, Devaraj A. Evaluating disease severity inidiopathic pulmonary fibrosis. Eur Respir Rev. 2017 Sep 6;26(145).
7. Li H, Zhao X, Shan H, Liang H. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis: involvement in pathogenesis and potential use in diagnosis and therapeutics. Acta Pharm Sin B. 2016 Nov;6(6):531-539. Epub 2016 Jul 27. Review.
8. Coghlan MA, Shifren A, Huang HJ, Russell TD, Mitra RD, et al. Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. BMJ Open Respir Res. 2014 Dec 10;1(1):e000057. doi: 10.1136/bmjresp-2014-000057.
9. Spagnolo P, Cottin V. Genetics of idiopathic pulmonary fibrosis: from mechanistic pathways to personalised medicine. J Med Genet. 2017 Feb;54(2):93-99. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103973.
10. Jiang H, Hu Y, Shang L, Li Y, Yang L, Chen Y. Association between MUC5B polymorphism and susceptibility and severity of idiopathic pulmonary fibrosis. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Nov 1;8(11):14953-8.
11. Stuart BD, Choi J, Zaidi S, Xing C, Holohan B, Chen R, et al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. Nat Genet. 2015 May;47(5):512-7. doi: 10.1038/ng.3278.
12. Hirano C, Ohshimo S, Horimasu Y, Iwamoto H, Fujitaka K, Hamada H, et al. FAM13A polymorphism as a prognostic factor in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Med. 2017 Feb;123:105-109. doi: 10.1016/j.rmed.2016.12.007.
13. Yamaguchi K, Iwamoto H, Horimasu Y, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, et al. AGER gene polymorphisms and soluble receptor for advanced glycation end product in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respirology. 2017 Jul;22(5):965-971. doi: 10.1111/resp.12995.
14. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: three decades of progress. NatRev Genet. 2019 Feb 13. doi: 10.1038/s41576-019-0099-1.
15. Holohan B, Wright WE, Shay JW. Cell biology of disease: Telomeropathies: anemerging spectrum disorder. J Cell Biol. 2014 May 12;205(3):289-99. doi: 10.1083/jcb.201401012. Review.

16. Ho YY, Lagares D, Tager AM, Kapoor M. Fibrosis--a lethal component of systemicsclerosis. Nat Rev Rheumatol. 2014 Jul;10(7):390-402.

17. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. N Engl J Med. 2015 Jul 2;373(1):96.

18. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. Nat Med. 2012 Jul 6;18(7):1028-40. doi: 10.1038/nm.2807. Review.

19. Naba A, Clauser KR, Hynes RO. Enrichment of Extracellular Matrix Proteins from Tissues and Digestion into Peptides for Mass Spectrometry Analysis. J Vis Exp. 2015 Jul 23;(101):e53057.

20. Moore MC, Pandolfi V, McFetridge PS. Novel human-derived extracellular matrix induces in vitro and in vivo vascularization and inhibits fibrosis. Biomaterials. 2015 May;49:37-46.

21. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-β: the master regulator of fibrosis. Nat Rev Nephrol. 2016 Jun;12(6):325-38.

22. Böttinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. J Am Soc Nephrol. 2002 Oct;13(10):2600-10. Review.

23. Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF-β/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. Clin Sci (Lond). 2013 Feb;124(4):243-54. doi: 10.1042/CS20120252. Review.

24. Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-β Family. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017 Feb 1;9(2). pii: a022129. doi: 10.1101/cshperspect.a022129.

25. Sugiura H, Ichikawa T, Koarai A, Yanagisawa S, Minakata Y, Matsunaga K, et al. Activation of Toll-like receptor 3 augments myofibroblast differentiation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009 Jun;40(6):654-62. doi: 10.1165/rcmb.2008-0371OC.

26. Meneghin A, Choi ES, Evanoff HL, Kunkel SL, Martinez FJ, Flaherty KR, Toews GB, Hogaboam CM. TLR9 is expressed in idiopathic interstitial pneumonia and its activation promotes in vitro myofibroblast differentiation. Histochem Cell Biol. 2008 Nov;130(5):979-92. doi: 10.1007/s00418-008-0466-z.

27. Sahin H, Wasmuth HE. Chemokines in tissue fibrosis. Biochim Biophys Acta. 2013 Jul;1832(7):1041-8.

28. Antoniou KM, Margaritopoulos GA, Tomassetti S, Bonella F, Costabel U, Poletti V. Interstitial lung disease. Eur Respir Rev. 2014 Mar 1;23(131):40-54.

29. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis andtreatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). Am J Respir Crit Care Med. 2000 Feb;161(2 Pt 1):646-64.

30. De Lauretis A, Renzoni EA. Molecular biomarkers in interstitial lung diseases. Mol Diagn Ther. 2014 Oct;18(5):505-22. doi: 10.1007/s40291-014-0109-0

31. American Thoracic Society; European Respiratory Society. American ThoracicSociety/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the

ERS Executive Committee, June 2001. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Jan 15;165(2):277-304. Review. Erratum in: Am J Respir Crit Care Med 2002 Aug 1;166(3):426.

32. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, et al. ATS/ERS Committee on Idiopathic Interstitial Pneumonias. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. Am J Respir Crit Care Med. 2013 Sep 15;188(6):733-48.

33. Zheng P, Liu X, Huang H, Guo Z, Wu G, Hu H, et al. Diagnostic value of KL-6 in idiopathic interstitial pneumonia. J Thorac Dis. 2018 Aug;10(8):4724-4732. doi: 10.21037/jtd.2018.07.54.

34. Müller NL, Coiby TV. Idiopathic interstitial pneumonias: high-resolution CT and histologic findings. Radiographics. 1997 Jul-Aug;17(4):1016-22.

35. Hobbs S, Lynch D. The idiopathic interstitial pneumonias: an update and review. Radiol Clin North Am. 2014 Jan;52(1):105-20. doi: 10.1016/j.rcl.2013.08.001. Review.

36. van Moorsel CH, Hoffman TW, van Batenburg AA, Klay D, van der Vis JJ, GruttersJC. Understanding Idiopathic Interstitial Pneumonia: A Gene-Based Review of Stressed Lungs. Biomed Res Int. 2015;2015:304186. doi: 10.1155/2015/304186.

37. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet. 2017 May 13;389(10082):1941-1952. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30866-8.

38. Meyer KC, Nathan SD eds. Idiopathic pulmonary fibrosis: a comprehensive clinical guide. Springer, 2018.

39. Watters LC, King TE, Schwarz MI, Waldron JA, Stanford RE, Cherniack RM. A clinical, radiographic, and physiologic scoring system for the longitudinal assessment of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis. 1986 Jan;133(1):97-103.

40. King TE Jr, Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Oct 1;164(7):1171-81.

41. Wells AU, Desai SR, Rubens MB, Goh NS, Cramer D, Nicholson AG, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: a composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Apr 1;167(7):962-9.

42. Lee SH, Park JS, Kim SY, Kim DS, Kim YW, Chung MP, et al. Comparison of CPI and GAP models in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a nationwide cohort study. Sci Rep. 2018 Mar 19;8(1):4784.

43. Sauleda J, Núñez B, Sala E, Soriano JB. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Natural History, Phenotypes. Med Sci (Basel). 2018 Nov 29;6(4). pii: E110. doi: 10.3390/medsci6040110. Review.

44. Navaratnam, V, Forrester, DL, Hubbard, RB. Incidence and prevalence of İPF. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: ERS Monograph. 2016; 71, 1.

45. Raghu G, Chen SY, Hou Q, Yeh WS, Collard HR. Incidence and prevalence ofidiopathic pulmonary fibrosis in US adults 18-64 years old. Eur Respir J. 2016 Jul;48(1):179-86.

46. Musellim B, Okumus G, Uzaslan E, Akgün M, Cetinkaya E, Turan O, et al. Turkish Interstitial Lung Diseases Group. Epidemiology and distribution of interstitial lung diseases in Turkey. Clin Respir J. 2014 Jan;8(1):55-62. doi: 10.1111/crj.12035.

47. Kuwano K, Araya J, Hara H. Epidemiology and Risk Factors of İPF. In: Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Springer, Tokyo, 2016. p. 11-25.

48. Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA. Cigarette smoking:a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Jan;155(1):242-8.

49. Zhou LL, Wang M, Liu F, Lu YZ, Song LJ, Xiong L, et al. Cigarette smoking aggravates bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis.Toxicol Lett. 2018 Dec 17;303:1-8. doi:10.1016/j.toxlet.2018.12.008.

50. López-Ramírez C, Suarez Valdivia L, Rodríguez Portal JA. Causes of Pulmonary Fibrosis in the Elderly. Med Sci (Basel). 2018 Jul 24;6(3). pii: E58. doi: 10.3390/medsci6030058. Review.

51. Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms ofthe enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model. Am J Respir Crit Care Med. 2014 May 15;189(10):1161-72.

52. Mora AL, Rojas M, Pardo A, Selman M. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. Nat Rev Drug Discov. 2017 Nov;16(11):755-772. doi: 10.1038/nrd.2017.170.

53. Awadalla NJ, Hegazy A, Elmetwally RA, Wahby I. Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis in Egypt: a multicenter case-control study. Int J Occup Environ Med. 2012 Jul;3(3):107-16.

54. Paolocci G, Folletti I, Torén K, Ekström M, Dell'Omo M, Muzi G, Murgia N. Occupational risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis in Southern Europe: a case-control study. BMC Pulm Med. 2018 May 21;18(1):75. doi: 10.1186/s12890-018-0644-2.

55. Steven ND, Brown AW, King CS. Overview of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Guide to Clinical Management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Adis, Cham, 2016. 1-13.

56. Sesé L, Nunes H, Cottin V, Sanyal S, Didier M, Carton Z, et al. Role of atmospheric pollution on the natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. Thorax. 2018 Feb;73(2):145-150. doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-209967.

57. Molyneaux PL, Maher TM. The role of infection in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. Eur Respir Rev. 2013 Sep 1;22(129):376-81. doi: 10.1183/09059180.00000713. Review.

58. Moore BB, Moore TA. Viruses in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Etiology and Exacerbation. Ann Am Thorac Soc. 2015 Nov;12 Suppl 2:S186-92. doi: 10.1513/AnnalsATS.201502-088AW. Review.

59. Tang YW, Johnson JE, Browning PJ, Cruz-Gervis RA, Davis A, Graham BS, et al. Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. J Clin Microbiol. 2003 Jun;41(6):2633-40.

60. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic

pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. Am J Respir Crit Care Med. 2011 Mar 15;183(6):788-824. doi: 10.1164/rccm.2009-040GL.

61. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, and Latin American Thoracic Society. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Crit Care Med. 2018 Sep 1;198(5):e44-e68. doi: 10.1164/rccm.201807-1255ST.

62. Collard HR, Ryerson CJ, Corte TJ, Jenkins G, Kondoh Y, Lederer DJ, et al. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report. Am J Respir Crit Care Med. 2016 Aug 1;194(3):265-75. doi: 10.1164/rccm.201604-0801CI. Review.

63. Marchioni A, Tonelli R, Ball L, Fantini R, Castaniere I, Cerri S, Luppi F, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: lessons learned from acute respiratory distress syndrome? Crit Care. 2018 Mar 23;22(1):80. doi: 10.1186/s13054-018-2002-4. Review.

64. Qiu M, Chen Y, Ye Q. Risk factors for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. Clin Respir J. 2018 Mar;12(3):1084-1092. doi: 10.1111/crj.12631.

65. Juarez MM, Chan AL, Norris AG, Morrissey BM, Albertson TE. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis-a review of current and novel pharmacotherapies. J Thorac Dis. 2015 Mar;7(3):499-519. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.01.17. Review.

66. King CS, Nathan SD. Idiopathic pulmonary fibrosis: effects and optimal management of comorbidities. Lancet Respir Med. 2017 Jan;5(1):72-84. doi: 10.1016/S2213-2600(16)30222-3.

67. Torrisi SE, Vancheri A, Pavone M, Sambataro G, Palmucci S, Vancheri C. Comorbidities of İPF: How do they impact on prognosis. Pulm Pharmacol Ther. 2018 Dec;53:6-11. doi: 10.1016/j.pupt.2018.09.003.

68. Kreuter M, Ehlers-Tenenbaum S, Palmowski K, Bruhwyler J, Oltmanns U, Muley T, et al. Impact of Comorbidities on Mortality in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. PLoS One. 2016 Mar 29;11(3):e0151425. doi: 10.1371/journal.pone.0151425.

69. Loeh B, Korfei M, Mahavaladi P, von der Beck D, Ghünter A. The epithelium appears to be the initial site of injury. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: ERS Monograph, 2016, 71: 35.

70. Sgalla G, Iovene B, Calvello M, Ori M, Varone F, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. Respir Res. 2018 Feb 22;19(1):32. doi: 10.1186/s12931-018-0730-2. Review.

71. Raghu G, Rochwerg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, et al.; American Thoracic Society; European Respiratory society; Japanese Respiratory Society; Latin American Thoracic Association. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. Am J Respir Crit Care Med. 2015 Jul 15;192(2):e3-19. doi: 10.1164/rccm.201506-1063ST. Erratum in: Am J Respir Crit Care Med. 2015 Sep 1;192(5):644.

72. Bell EC, Cox NS, Goh N, Glaspole I, Westall GP, Watson A, Holland AE. Oxygen therapy for interstitial lung disease: a systematic review. Eur Respir Rev. 2017 Feb 21;26(143). pii: 160080. doi: 10.1183/16000617.0080-2016. Print 2017 Jan. Review.

73. Millan-Billi P, Serra C, Alonso Leon A, Castillo D. Comorbidities, Complications and Non-Pharmacologic Treatment in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Med Sci (Basel). 2018 Jul 24;6(3). pii: E59. doi: 10.3390/medsci6030059. Review.

74. Rochester CL, Vogiatzis I, Holland AE, Lareau SC, Marciniuk DD, Puhan MA, et al.; ATS/ERS Task Force on Policy in Pulmonary Rehabilitation. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Policy Statement: Enhancing Implementation, Use, and Delivery of Pulmonary Rehabilitation. Am J Respir Crit Care Med. 2015 Dec 1;192(11):1373-86. doi: 10.1164/rccm.201510-1966ST.

75. Kumar A, Kapnadak SG, Girgis RE, Raghu G. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis. Expert Rev Respir Med. 2018 May;12(5):375-385. doi: 10.1080/17476348.2018.1462704.

76. Izumi S, Iikura M, Hirano S. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 2012 Aug 30;367(9):870; author reply 870-1. doi: 10.1056/NEJMc1207471.

77. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al.; INPULSIS Trial Investigators. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 2014 May 29;370(22):2071-82. doi: 10.1056/NEJMoa1402584.

78. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, et al.; CAPACITY Study Group. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. Lancet. 2011 May 21;377(9779):1760-9. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60405-4.

79. King TE Jr, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al.; ASCEND Study Group. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 2014 May 29;370(22):2083-92. doi: 10.1056/NEJMoa1402582.

80. Richeldi L, Fletcher S, Adamali H, Chaudhuri N, Wiebe S, Wind S, et al. No relevant pharmacokinetic drug-drug interaction between nintedanib and pirfenidone. Eur Respir J. 2019 Jan 10;53(1). pii: 1801060. doi: 10.1183/13993003.01060-2018.

81. Drakopanagiotakis F, Wujak L, Wygrecka M, Markart P. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. Matrix Biol. 2018 Aug;68-69:404-421. doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.023.

82. White ES, Xia M, Murray S, Dyal R, Flaherty CM, Flaherty KR, et al. Plasma Surfactant Protein-D, Matrix Metalloproteinase-7, and Osteopontin Index Distinguishes Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Other Idiopathic Interstitial Pneumonias. Am J Respir Crit Care Med. 2016 Nov 15;194(10):1242-1251.

83. Sokai A, Tanizawa K, Handa T, Kanatani K, Kubo T, Ikezoe K, et al. Importance of serial changes in biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. ERJ Open Res. 2017 Aug 30;3(3).

84. Ensembl Genome Browser 97. 2019. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000117983;r=11:1223066-1262172

85. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. MUCins, MUCus, and Goblet Cells. Chest. 2018 Jul;154(1):169-176.

86. Greene KE, King TE Jr, Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, NewmanLS, et al. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. Eur Respir J. 2002 Mar;19(3):439-46.

87. Wang K, Ju Q, Cao J, Tang W, Zhang J. Impact of serum SP-A and SP-D levels on comparison and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2017 Jun;96(23):e7083.

88. Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, Owen CA. Matrix metalloproteinases astherapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2015 Nov;53(5):585-600.

89. Sokai A, Handa T, Tanizawa K, Oga T, Uno K, Tsuruyama T, et al. Matrix metalloproteinase-10: a novel biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res. 2015 Sep 29;16:120.

90. Bauer Y, White ES, de Bernard S, Cornelisse P, Leconte I, Morganti A, et al. MMP-7 is a predictive biomarker of disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. ERJ Open Res. 2017 Mar 22;3(1).

91. Allen JT, Spiteri MA. Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis:relative roles. Respir Res. 2002;3:13.

92. Saito A, Horie M, Micke P, Nagase T. The Role of TGF-β Signaling in Lung Cancer Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Int J Mol Sci. 2018 Nov 15;19(11).

93. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. J Cell Physiol. 2012Feb;227(2):493-507. doi: 10.1002/jcp.22783. Review.

94. Schuliga M, Grainge C, Westall G, Knight D. The fibrogenic actions of thecoagulant and plasminogen activation systems in pulmonary fibrosis. Int J Biochem Cell Biol. 2018 Apr;97:108-117. doi: 10.1016/j.biocel.2018.02.016.

95. Yang IV. Epigenomics of idiopathic pulmonary fibrosis. Epigenomics. 2012 Apr;4(2):195-203. doi: 10.2217/epi.12.10. Review.

96. Sanders YY, Ambalavanan N, Halloran B, Zhang X, Liu H, Crossman DK, et al. Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Sep 15;186(6):525-35. doi: 10.1164/rccm.201201-0077OC.

97. Guiot J, Struman I, Chavez V, Henket M, Herzog M, Scoubeau K, et al. Altered epigenetic features in circulating nucleosomes in idiopathic pulmonary fibrosis. Clin Epigenetics. 2017 Aug 15;9:84. doi: 10.1186/s13148-017-0383-x.

98. Yang G, Yang L, Wang W, Wang J, Wang J, Xu Z. Discovery and validation ofextracellular/circulating microRNAs during idiopathic pulmonary fibrosis disease progression. Gene. 2015 May 10;562(1):138-44. doi: 10.1016/j.gene.2015.02.065.

99. Miao C, Xiong Y, Zhang G, Chang J. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis,new research progress and their pathophysiological implication. Exp Lung Res. 2018 Apr;44(3):178-190. doi: 10.1080/01902148.2018.1455927.

100. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. Nat Rev Genet. 2012Oct;13(10):693-704. doi: 10.1038/nrg3246. Epub 2012 Sep 11. Review. Erratum in: Nat Rev Genet. 2013 Mar;14(3):235.

101. Minasi S, Baldi C, Pietsch T, Donofrio V, Pollo B, Antonelli M, et al. Telomere elongation via alternative lengthening of telomeres (ALT) and telomerase activation in primary metastatic medulloblastoma of childhood. J Neurooncol. 2019 Mar 4. doi: 10.1007/s11060-019-03127-w.

102. Martínez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. Nat Rev Cancer. 2011 Mar;11(3):161-76. doi: 10.1038/nrc3025. Review.

103. Armando RG, Mengual Gomez DL, Maggio J, Sanmartin MC, Gomez DE. Telomeropathies: Aetiology, diagnosis, treatment and follow-up. Ethical and legal considerations. Clin Genet. 2019 Feb 28. doi: 10.1111/cge.13526.

104. Mangaonkar AA, Patnaik MM. Short Telomere Syndromes in Clinical Practice:Bridging Bench and Bedside. Mayo Clin Proc. 2018 Jul;93(7):904-916. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.03.020. Epub 2018 May 24. Review.

105. Planas-Cerezales L, Arias-Salgado EG, Buendia-Roldán I, Montes-Worboys A,López CE, Vicens-Zygmunt V, et al. Predictive factors and prognostic effect of telomere shortening in pulmonary fibrosis. Respirology. 2019 Feb;24(2):146-153. doi: 10.1111/resp.13423.

106. Hoffman TW, van Moorsel CHM, Borie R, Crestani B. Pulmonary phenotypes associated with genetic variation in telomere-related genes. Curr Opin Pulm Med. 2018 May;24(3):269-280. doi: 10.1097/MCP.0000000000000475.

107. Borie R, Tabèze L, Thabut G, Nunes H, Cottin V, Marchand-Adam S, et al. Prevalence and characteristics of TERT and TERC mutations in suspected genetic pulmonary fibrosis. Eur Respir J. 2016 Dec;48(6):1721-1731. doi: 10.1183/13993003.02115-2015.

108. Aalbers AM, Kajigaya S, van den Heuvel-Eibrink MM, van der Velden VH, CaladoRT, Young NS. Human telomere disease due to disruption of the CCAAT box of the TERC promoter. Blood. 2012 Mar 29;119(13):3060-3. doi: 10.1182/blood-2011-10-383182.

109. Ensembl Genome Browser 97. 2019. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000164362;r=5:1253147-1295069

110. Ensembl Genome Browser 97. 2019. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000270141;r=3:169764520-169765060;t=ENST00000602385

111. Ensembl Genome Browser 97. 2019. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000258366;r=20:63657810-63696253

112. Ensembl Genome Browser 97. 2019. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000140694;r=16:14435701-14632728

113. Ensembl Genome Browser 97. 2019. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000107960;r=10:103882542-103918205

114. Ensembl Genome Browser 97. 2019. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000130826;r=X:154762742-154777689

115. Kropski JA, Loyd JE. Telomeres revisited: RTEL1 variants in pulmonaryfibrosis. Eur Respir J. 2015 Aug;46(2):312-4. doi: 10.1183/13993003.00710-2015.

116. Kropski JA, Mitchell DB, Markin C, Polosukhin VV, Choi L, Johnson JE, et al. A novel dyskerin (DKC1) mutation is associated with familial interstitial pneumonia. Chest. 2014 Jul;146(1):e1-e7. doi: 10.1378/chest.13-2224.

117. Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, Peljto AL, Brown KK, Steele MP, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. Nat Genet. 2013 Jun;45(6):613-20. doi: 10.1038/ng.2609. Epub 2013 Apr 14. Erratum in: Nat Genet. 2013 Nov;45(11):1409.

118. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. J Cell Biol. 2018 Jan 2;217(1):65-77. doi: 10.1083/jcb.201708092.

119. Shay JW. Telomeres and aging. Curr Opin Cell Biol. 2018 Jun;52:1-7. doi: 10.1016/j.ceb.2017.12.001.

120. Bolzán AD. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. Mutat Res. 2017 Jul;773:51-65. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.04.002.

121. Snetselaar R, van Batenburg AA, van Oosterhout MFM, Kazemier KM, Roothaan SM, Peeters T, et al. Short telomere length in İPF lung associates with fibrotic lesions and predicts survival. PLoS One. 2017 Dec 27;12(12):e0189467. doi: 10.1371/journal.pone.0189467.

122. Newton CA, Oldham JM, Ley B, Anand V, Adegunsoye A, Liu G, et al. Telomere length and genetic variant associations with interstitial lung disease progression and survival. Eur Respir J. 2019 Apr 11;53(4). pii: 1801641. doi: 10.1183/13993003.01641-2018.

123. Dressen A, Abbas AR, Cabanski C, Reeder J, Ramalingam TR, Neighbors M, et al. Analysis of protein-altering variants in telomerase genes and their association with MUC5B common variant status in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a candidate gene sequencing study. Lancet Respir Med. 2018 Aug;6(8):603-614. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30135-8.

124. Stuart BD, Lee JS, Kozlitina J, Noth I, Devine MS, Glazer CS, et al. Effect of telomere length on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an observational cohort study with independent validation. Lancet Respir Med. 2014 Jul;2(7):557-65. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70124-9.

125. Liu YY, Shi Y, Liu Y, Pan XH, Zhang KX. Telomere shortening activates TGF-β/Smads signaling in lungs and enhances both lipopolysaccharide and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Acta Pharmacol Sin. 2018 Nov;39(11):1735-1745. doi: 10.1038/s41401-018-0007-9.

126. Bertuch AA. The molecular genetics of the telomere biology disorders. RNA Biol. 2016 Aug 2;13(8):696-706. doi: 10.1080/15476286.2015.1094596.

127. Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. Nat Genet. 2013 Apr;45(4):422-7, 427e1-2. doi: 10.1038/ng.2528.

128. Varshney A, Ramakrishnan SK, Sharma A, Santosh B, Bala J, Yadava PK, Jaiswal RK. Global expression profile of telomerase-associated genes in HeLa cells. Gene. 2014 Sep 1;547(2):211-7. doi: 10.1016/j.gene.2014.06.018.

129. Povedano JM, Martinez P, Serrano R, Tejera Á, Gómez-López G, Bobadilla M, et al. Therapeutic effects of telomerase in mice with pulmonary fibrosis induced by damage to the lungs and short telomeres. Elife. 2018 Jan 30;7. pii: e31299. doi: 10.7554/eLife.31299.

130. Newton CA, Batra K, Torrealba J, Kozlitina J, Glazer CS, Aravena C, et al. Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. Eur Respir J. 2016 Dec;48(6):1710-1720. doi: 10.1183/13993003.00308-2016.

131. Dai J, Cai H, Zhuang Y, Wu Y, Min H, Li J, Shi Y, Gao Q, Yi L. Telomerase gene mutations and telomere length shortening in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in a Chinese population. Respirology. 2015 Jan;20(1):122-8. doi: 10.1111/resp.12422.

132. Gutierrez-Rodrigues F, Donaires FS, Pinto A, Vicente A, Dillon LW, Clé DV, et al. Pathogenic TERT promoter variants in telomere diseases. Genet Med. 2019 Jul;21(7):1594-1602. doi: 10.1038/s41436-018-0385-x.

133. Arias-Salgado EG, Galvez E, Planas-Cerezales L, Pintado-Berninches L, Vallespin E, Martinez P, et al. Genetic analyses of aplastic anemia and idiopathic pulmonary fibrosis patients with short telomeres, possible implication of DNA-repair genes. Orphanet J Rare Dis. 2019 Apr 17;14(1):82. doi: 10.1186/s13023-019-1046-0.

134. Sousa SR, Caetano Mota P, Melo N, Bastos HN, Padrão E, Pereira JM, et al. Heterozygous TERT gene mutation associated with familial idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Med Case Rep. 2018 Dec 8;26:118-122. doi: 10.1016/j.rmcr.2018.12.005.

135. Zheng CM, Zhan X, Yang YH, Jiang T, Ye Q, Lu Y. A Rare Missense Variant in Telomerase Reverse Transcriptase is Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in a Chinese Han Family. Chin Med J (Engl). 2018 Sep 20;131(18):2205-2209. doi: 10.4103/0366-6999.240802.

136. Moore C, Blumhagen RZ, Yang IV, Walts A, Powers J, Walker T, et al. Resequencing Study Confirms That Host Defense and Cell Senescence Gene Variants Contribute to the Risk of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2019 Jul 15;200(2):199-208. doi: 10.1164/rccm.201810-1891OC.

EK 1

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU
(2011-KAEK-50)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"İdiyopatikPulmonerFibrozis'deTelomeraz İlişkili Gen Mutasyonlarının Araştırılması"**
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURULLARI BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	S.B.Ü.İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Abdurrahman Nafiz Gürman Cad. Kocamustafapaşa - Fatih 34098 İST.
	TELEFON	0 (212) 459 60 00 Dahili;(6225)-(6841)-(6220)
	FAKS	0 (212) 459 62 30
	E-POSTA	ieahetikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Ender Mehmet COŞKUNPINAR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİVEYA PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐			
		FAZ 2 ☐			
		FAZ 3 ☐			
		FAZ 4 ☐			
		Gözlemsel ilaç çalışması ☐			
		İlaç dışı klinik araştırma ☐			
		Diğer ise belirtiniz:Prospektif çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe☒İngilizce☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-	Türkçe☐İngilizce☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİY. MAT.TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI İstanbul İl Sağlık Müdürlüğü S.B.Ü İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mehmet [illegible] ÇELEBİ Müdür Yardımcısı

ASLINDAKİ GİBİDİR

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Uzman Dr.Mehmet Emin PİŞKİNPAŞA
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU
(2011-KAEK-50)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"İdiyopatikPulmonerFibrozis'deTelomeraz İlişkili Gen Mutasyonlarının Araştırılması"**
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	DİĞER:	☐	
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 1207**	**Tarih:23/03/2018**	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALARETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Uzman Dr.Mehmet Emin PİŞKİNPAŞA**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Uz.Dr.Mehmet Emin PİŞKİNPAŞA	İç Hastalıkları	İstanbul EAH	E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☐	
Doç.Dr.Ufuk EMRE	Nöroloji	İstanbul EAH	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☐	
Doç.Dr.Hale ARAL	Tıbbi Biyokimya	İstanbul EAH	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☐	
Doç.Dr.Feyzullah ERSÖZ	Genel Cerrahi	İstanbul EAH	E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☐	
Yard.Doç.Dr.Nihan ÇARÇAK YILMAZ	Farmakoloji	İst.Üniversitesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☐	GÖZENLİ
Uz.Dr.Özgü KESMEZACAR	Halk Sağlığı	İl Sağlık Müd.	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☐	
Müh.MerveCOŞKUN	Biyomedikal	İstanbul İli Fatih Bölgesi Genel Sekr.	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☐	RAPORLU
Av.Derya ÖZYURT	Avukat	İstanbul Barosu	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☐	
Şinasi TAKAK	Sağlık Mensubu Olmayan Kişi	Serbest	E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☐	

*:Toplantıda Bulunma

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İstanbul İli Sağlık Müdürlüğü
S.B.Ü İstanbul Dr. Lütfi Kırdar Eğitim Araştırma Hastanesi
Mehmet Mustafa ÇELEBİ
Müdür Yardımcısı
ASLI İDARECE GÖRÜLMÜŞTÜR

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Uzman Dr.Mehmet Emin PİŞKİNPAŞA
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

EK 2

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

I-Araştırmayla İlgili Bilgi Verilmesi:

Proje Adı: "*İdiyopatik Pulmoner Fibrozis'de telomeraz ilişkili gen mutasyonlarının araştırılması*"

Yapılacak işlemin tanımı: Bu çalışmada, İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) hastalarında genetik değişiklikler ve hastalık oluşumuna yol açabileceği düşünülen parametreleri incelemeyi amaçlamaktayız. Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir.

Araştırmanın Amacı: Bu çalışmada, genetik değişikliklerinİPF hastalarında hastalığın erken tanısı ve hastalığa yatkınlığın belirlemesi için moleküler araştırma yürütülmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada Kullanılacak Yöntemler:

Yedikule Göğüs hastalıkları ve Göğüs cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3**.** Klinikte tanı konulan 50 İPF'li hasta, 30 sağlıklı kontrol ve 30 interstisyel dışı gönüllü hasta grubu çalışma hakkında bilgilendirilecek. Çalışmaya girmeyi kabul edenler gönüllü olur formunu doldurup imzaladıktan sonra 1 adet EDTA'lı tüpe 10cc kanları alınacak ve soğuk zincirle S.B.Ü Tıbbi Biyoloji AD'na nakledilecek ve DNA'ları izole edilecektir. PCR İşleminden sonra veri analizleri ve istatistikler yapılarak proje sonlandırılacaktır.

II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Verilmesi

- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırıcı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllü arzusu üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilir.
- Bu işlemler için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
- Bu çalışma için gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
- Çalışmaya katılmak zorunluluğunuz bulunmamaktadır, gönüllü istediği takdirde çalışmadan ayrılabilir.
- Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkide bulunmayacaktır.

- Çalışma kabul kriterlerine ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırıcının isteği ile çıkarılabilirsiniz.
- Araştırma sırasında elde edilen test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
- Araştırmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkmanız ya da çıkarılmanız halinde hastalığınızın tedavisi ile ilgili hiçbir aksama olmayacaktır.
- Kimlik bilgileriniz gizli tutulacak ve sizden alınacak kandan elde edilecek tüm materyaller özel bir kodlama ile kodlanacak ve bu bilgiler üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
- Çalışma sonunda elde edilecek verilerle uluslararası çapta yayınlanabilecek, hastalığınıza açıklık getirecek bilgiler elde edilebilmesi mümkündür. Klinik, patolojik ve radyolojik bulgular ve alınan materyaller bundan sonraki bilimsel amaçlı çalışmalarda da kullanılabilecektir. Bu şekilde çalışma sonucunda ulaşılan önemli bir bilgi varsa tarafınıza bildirilecektir.

Olası riskler ve faydalar:

Yapılacak araştırmanın getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır.

Olası yararlar: Bu incelemelerin esas amacı hastalığınızın erken dönemde hızlı bir şekilde tanısının konulup yine erken dönemde etkin bir şekilde tedavi edilmesiyle birlikte uzun dönemde gelişebilecek sorunların başvuru anında öngörülmesidir.

Katılımcının/Hastanın Beyanı:

Sayın Prof. Dr. B. Pınar Yıldız Salahtaroğlu tarafından Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki

bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

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

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

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

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

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte,

Prof. Dr. B. Pınar Yıldız Silahtaroğlu'nu 0533 358 5708 no'lu telefondan**,** arayabileceğimi biliyorum.

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

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih:

Gönüllünün Adı-soyadı : **İmzası**

Gönüllünün Telefonu :

Adresi :

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no. faks no,)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı: Prof. Dr. B. Pınar Yıldız Silahtaroğlu **İmzası**

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı: **İmzası**

EK 3

OLGU RAPOR FORMU (ORF)

HASTA ADI VE SOYADI:TC.KİMLİK NO:

YAŞ:DR.ADI SOYADI:

CİNSİYET: E☐ K☐ **ÇALIŞTIĞI KURUM:**

BOY VE KİLO: ……cm, ……kg **ÖRNEK ALINMA TARİHİ:**

MESLEĞİ:HASTA TELEFON NO:

DOĞUM YERİ:

MEZUN OLUNAN OKUL: İlkokul ☐ Orta☐ Lise ☐ Yüksekokul-Üniversite☐ Hiçbiri ☐

ŞİKAYETİ:Öksürük ☐algam ☐emoptizi N☐es darlığı Gö☐s ağrısı İşta☐zlık ☐

Kilo kaybı: ☐…….kg Ses kısıklığı ☐ Diğer:

TANI TARİHİ /
SİGARA KULLANIMI: Halen Kullanmakta / ……...paket/yıl
İçmiş ve bırakmış / ……paket/yıl……..yıl önce bırakmış
Hiç kullanmamış ☐
ALKOL KULLANIMI:
İLAÇ KULLANIMI:
EŞLİK EDEN HASTALIKLAR:

HASTALIK	VAR	YOK	HASTALIK	VAR	YOK
KORONER ARTER HASTALIĞI	☐	☐	KONJESTİF KALP YETMEZLİĞİ	☐	☐
PEPTİK ÜLSER	☐	☐	PERİFERİK VASKÜLER HASTALIK	☐	☐
HAFİF KARACİĞER HAST.	☐	☐	SEREBROVASKÜLER HASTALIK	☐	☐
KONNEKTİF DOKU HASTALIĞI	☐	☐	DİABETES MELLİTUS	☐	☐
DEMANS	☐	☐	HEMİPLEJİ	☐	☐
ORTA-CİDDİ BÖBREK YETMEZLİĞİ	☐	☐	ORGAN YETMEEZLİĞİ YAPAN DM	☐	☐
DAHA ÖNCE HERHANGİ BİR TÜMÖR	☐	☐	LÖSEMİ	☐	☐
LENFOMA	☐	☐	ORTA-CİDDİ KARACİĞER HASTALIĞI	☐	☐
METASTATİK SOLİD TM.	☐	☐	AIDS	☐	☐
AİLEDE KANSER ÖYKÜSÜ	☐	☐	RADYASYONA MARUZİYET	☐	☐

ÖZGEÇMİŞİNDE AKCİĞER İLE İLGİLİ HASTALIK: KOAH: VAR ☐ YOK ☐
TBC: VAR ☐ YOK ☐
ASTIM: VAR ☐ YOK ☐

BİYOKİMYASAL TETKİKLER:

						HEMOGRAM	
GLUKOZ		LDH		ALP			
ÜRE		KREATİNİN		CEA		RBC	
T.PROTEİN:		ALBUMİN		Na		WBC	
K		Ca		Cl		HGB	
AST		ALT		GGT		HCT	
SEDİM.		DİĞER				PLT	

MEDİASTİNOSKOPİ YAPILDI İSE SONUCU (pozitif LAP lokalizasyonları ile birlikte):
6 Dakika Yürüme Testi Sonucu:

SON DURUM (İZLEM 1):…….tarih……yaşıyor……..ex…….(ex tarihi):

Gönüllülerin 24 saat ulaşabilecekleri araştırıcı**:**
Prof.Dr. Pınar Yıldız (Tel: 0533 358 57 08)
(**Not:** Toraks BTraporu, histopatoloji raporu, ameliyat raporu, sistem tarama raporları eklenecek.)

ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ

Ad-Soyad:	Halime Yıldırım
Doğum Yeri ve Tarih:	Batman/ 13.07.1993
Uyruk:	T.C.
Medeni Durum:	Bekar
İletişim Adresi	Mareşal çakmak mah. /taşçılar sok.- Güngören / İSTANBUL
Telefon ve e-mail:	0541 673 3063 / hlmyildirim93@gmail.com
Sürücü Ehliyeti:	B

Eğitim Bilgileri		
Yüksek Lisans	Sağlık Bilimleri Üniversitesi SBE, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2019
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016
Lise	Eyüp Anadolu İmam Hatip Lisesi	2010

Staj Bilgileri		
Tıbbi Biyokimya Lab.	Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2014
Sinirbilim AD	İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü	2015
Tıbbi Mikrobiyoloji Lab.	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi	2015

Yabancı Dil	
İngilizce	Advance
Arapça	Orta

ALES Puanı	76,99 (Sayısal)
Yökdil Puanı	70

Bilişim Becerileri
Microsoft Office, SPSS, MATLAB

Katıldığı Etkinlikler ve Kurslar		
Türk Toraks Derneği	İnterstisyel Akciğer Hastalıkları Kursu	18.05.2019
Abcam IHC Training	Online Kurs	Kasım 2018
İstanbul Üniversitesi	3. Kök Hücre ve Uygulamaları Sempozyumu	28.04.2018-29.04.2018
Sağlık Bilimleri Üniversitesi	MR Görüntülerinde Beyin Parselasyonları Yaparak Hacim Hesaplama ve DT Görüntülerde Traktgrafi Kursu	28.02.2018
MedSanTek Laboratuval Malzemeleri Şirketi	Western Blot ve Hücre Analizi Kursu	12.02.2018-13.02.2018
Medipol University	Deney Hayvanları Kursu	29.01.2018-07.02.2018
ELİPS Sağlık Ürünleri Şirketi	LightCycler 480 Cihazı Eğitimi	16.01.2018
MedicRes-Good Medical Researcher Online Program	Good Medical Researcher Online Eğitimi	09.01.2018
JustEnglish English Course (Private)	Upper İntermediate-AdvanceİngilizceKursu	04.01.2017-10.06.2017 19.02.2017-22.06.2017
İstanbul Üniversitesi	Uygulamalı Girişimcilik Eğitimi	2016

İSMEK	Arapça Kursu	08.03.2009-31.05.2009
İstanbul University	6. Ulusal Fizik Çalıştayı	18.02.2016-19.02.2016
İstanbul Teknik Üniversitesi	Molecular Biology and Genetics Student Congress'15 (İnternational)	02.10.2015-4.10.2015
Üsküdar Üniversitesi	1. Ulusal BİTEK Bilimsel Konferansı	09.05.2015

Projeler		
Proje No: 2018/039	İdiyopatik Pulmoner Fibrozis'de Telomeraz Iliskili Gen Mutasyonlarının Arastırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel arastırma projesi, Yürütücü: Çoskunpınar Ender Mehmet, Arastırmacı: Yıldırım Halıme, Arastırmacı: Yıldız Sılahtaroglu Pınar	30.05.2018
Proje No: 2017/027	Lokal ileri Meme Kanserlerinde Kemoterapötik Etki Mekanizmaları ile Iliskili Genlerin Metilasyon Seviyelerinin Neoadjuvan Tedaviye Yanıta Etkisi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel arastırma projesi, Arastırmacı: Cabıoglu Neslıhan, Arastırmacı: Yıldırım Halıme, Yürütücü: Çoskunpınar Ender Mehmet, Arastırmacı: Müslümanoglu Mahmut Ebudeccane, Arastırmacı: Tükenmez Mustafa	23.05.2017

Üyelikler	
Türk Kızılayı (Ulusal)	2019
European Respiratory Society (Uluslararası)	2018
Türk Toraks Derneği (Ulusal)	2018
Tıbbi Genetik Derneği (Ulusal)	2018

Bilimsel İlgi Alanları
- Nadir hastalıklar - Solunum hastalıkları - Nörogenetik - Kanser - Kök hücre - Moleküler genetik araştırmalar - Epigenetik araştırmalar