

Seramidler ve Hastalıklarla İlişkisi

Ceramides and Their Relation with Diseases

Dilara Bal Topcu **Yesim Öztas** **İncilay Lay**

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Ankara, Türkiye

Başvuru Tarihi: 10 Eylül 2018

Kabul Tarihi: 06 Aralık 2018

ÖZET

Tüm hücrelerde hücre yapısını korumak, enerji üretmek ve sinyal iletimini sağlayabilmek için lipitlere ihtiyaç duyulmaktadır. Lipidomik çalışmalarının artması ile birlikte lipit türleri ve hücre etkileşimleri daha iyi anlaşılır olmuştur. Birçok çalışmada, sfingolipitlerin, hücre canlılığı ve çoğalması, embriyo gelişimi, immünite ve steroidogenezin düzenlenmesi gibi çeşitli hücre fonksiyonları, bazı patolojik süreçlerle, özellikle kronik inflamatuvar hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sfingolipitlerin biyolojik fonksiyonlarını anlamak, bazı hastalıkların gelişim süreçlerinin anlaşılması ve tedavi hedeflerinin belirlenmesi açısından faydalı olabilir. Bununla birlikte sfingolipit metabolitlerinin birbirine dönüşebiliyor olmaları ve aynı zamanda birçok süreçte rol almaları biyolojik mekanizmaların aydınlatılmasını zorlaştırmaktadır.

Anahtar kelimeler: Sfingolipit; seramid; inflamasyon; apoptoz

ABSTRACT

In all cells, lipids are needed to protect cellular structure, generate energy, provide signal transmission. As a result of increased lipidomic studies, lipids species and their cellular interactions have been better understood. In many studies, it has been shown that sphingolipids are associated with various cellular functions, such as cell viability/proliferation, embryo development, regulation of steroidogenesis and immunity, also some pathological processes, especially chronic inflammatory diseases. Understanding biological functions of sphingolipids may helpful in understanding development of diseases and determining treatment targets. However, the fact that sphingolipid metabolites can be transformed into each other and involved in many processes at the same time result with difficulties in understanding these mechanisms.

Key words: Sphingolipid; ceramide; inflammation; apoptosis

Yazışma adresi: Dilara Bal Topcu
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8731-0452>
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
e-posta: drdilarabal@gmail.com

selektif olarak dahil edilip çıkarılabildiği mikrobölgeler gözlenmektedir. Bu özel bölgelere lipit rafları adı verilmektedir. Lipit rafların oluşumunda hidrofobik etkileşimler, Van der Waals ve hidrojen bağlarının rolleri etkindir [4]. Hidrofobik SER molekülleri, hidrofobik etkileşimlerle birbirlerine güçlü bir şekilde bağlanır ve böylece membrandaki diğer lipitlerden kendiliğinden ayrılırlar. SER moleküllerinin bu şekilde kendiliğinden birleşme eğiliminin olması, fizyolojik özellikleri, hidrofobitesi ve membran kalınlığı bakımından membranın diğer bölgelerinden oldukça farklı bir mikroçevre olan 'SER-zengin membran alanlarını' ortaya çıkarır. Bu alanlar lipit raflarının oluşumunda kritik rol oynar [5].

İyonik olmayan deterjanlara dirençli olan lipit rafları, endositoz, ekzositoz gibi membran işlevleri ile hücre içi sinyal iletiminde geçiş istasyonları olarak görev yapmaktadır. Lipit raflarındaki proteinler sıklıkla lipitlerle glikozilfosfatidilinozitol kancaları gibi posttranslasyonel modifikasyonlar gösterirler veya kolesterol ve fosfolipitleri direk bağlayarak kaveolin ve anneksinleri oluştururlar [6]. Ayrıca raflar, sfingomyelin (SM)'i hidroliz ederek SER açığa çıkmasını sağlayan sfingomyelinaz (SMaz)'ların birincil etki yeridir. CD95 ve CD40 gibi moleküllerin raflardaki reseptörleri uyarması sonucunda asidik SMaz (aSMaz) aktive olur, böylece SER açığa çıkar [7-10]. SER'ler reseptör ve hücre içi sinyal moleküllerini yakalar ve kümeler. Zarın biyofiziğini değiştirerek, hücrelerdeki molekülleri yeniden düzenleyebilir, reseptör aracılı olan veya olmayan birçok hücrel aktivasyon süreçlerini kontrol edebilir. Membranda SER üretiminin artması, zarın kimyasal yapısında değişikliklere sebep olur [5].

Sfingolipitler ve Hastalıklar

Sfingolipit metabolizmasının dengede olması fizyolojik süreçlerin devamlılığı için oldukça önemlidir. Sfingolipit metabolizmasındaki bir enziminin yanlış düzenlenmesi, bir veya daha fazla sfingolipit türünün belirli bir organelde birikmesine veya tükenmesine yol açabilir. Hücre içinde sfingolipit birikmesi veya hücre sinyalinin değişmesi durumunda patolojik

durumlar tetiklenebilir. Örneğin, Niemann-Pick hastalığında aSMaz enzimi geninde mutasyon vardır. Enzimin defektif olması sonucunda fagositik hücrelerin lizozomlarında SM birikir. Bu durum beyin, kemik iliği, akciğer, dalak ve karaciğer gibi birden fazla organın yetmezliği ile sonuçlanır [11].

Seramidler ve İnflamasyon

SER, sfingolipit metabolizmasının merkezi olup tüm diğer sfingolipitlerin oluşumu için bir öncüdür. Apoptoz, hücre büyümesi ve farklılaşması, yaşlanma, diyabet, insülin direnci, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar veya ateroskleroz (AS) gibi durumlarda canlı hücrel fonksiyonların düzenlenmesini sağlayan bir sinyal molekülüdür [3].

SER'lerin de-novo sentezinde rol alan bazı enzimler proinflamatuvar olarak upregüle olur. SMaz kaynaklı oluşan SER'ler de, proinflamatuvar agonistlerin tetiklediği çok sayıda inflamatuvar süreçte rol alır. Özellikle tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) gibi sitokinler veya interlökin-1 beta (IL-1 β) gibi interlökinler SMaz aktivitesinin güçlü uyarıcılarıdır ve farklı hücre tiplerinde inflamasyonu uyardıkları gösterilmiştir [12].

SER'ler sayısız birçok biyolojik süreçte yer almalarına rağmen, doğrudan hedeflerinden yalnızca birkaçı tarif edilmiştir. Bu örneklerden birisi, SER'in sentezlendikten sonra proinflamatuvar transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa-beta (NF- $\kappa\beta$)'nin ekspresyon ve aktivasyonunu sağlamasıdır. NF- $\kappa\beta$ memelilerde inflamatuvar genler de dahil olmak üzere 150'den fazla genin ekspresyonunu düzenler. Örneğin, IL-1 β , IL-6, IL-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 gibi kemokinler ve siklooksijenaz-2 gibi proinflamatuvar olan prostaglandinlerin sentezini sağlayan enzimlerin ekspresyonunu artırır. Bu sitokin ve interlökinler de aynı zamanda SMaz'ın güçlü aktivatörü olup, farklı hücrelerde inflamasyonu uyarırlar [13]. TNF- α da nötral ve aSMaz'ları aktive eder, ancak sadece aSMaz aktivasyonu NF- $\kappa\beta$ aktivasyonu ile sonuçlanır [14]. Ancak, farklı hücrelerdeki (fibroblast,

endotel ve makrofajlar) SMaz aktivitesi için TNF- α 'nın indüklediği NF- $\kappa\beta$ 'a gerek olmadığı, SER'in kendisinin NF- $\kappa\beta$ gen transkripsiyonu ile inflamatuvar yolları aktive ettiğini gösteren araştırmalar da mevcuttur [15].

Beta Hücre Apoptozu ve Diyabet

SER, tümör hücreleri dahil bir çok hücrede apoptozu tetikler. Sitokinler, büyüme faktörleri, vitamin D, TNF- α , CD95/Fas, kemoterapötik ajanlar, toksinler, radyasyon, UV ışığı veya enfeksiyon gibi herhangi bir stres uyarını varlığında SMaz veya de-novo yolak aracılığı ile SER sentezi meydana gelir. Hüresel SER düzeylerinin artması doğrudan veya dolaylı olarak apoptotik süreçte önemli rol alan MAP kinaz, serin-treonin fosfataz gibi enzimlerle, katepsin D ve ras'ın düzenlenmesinde rol alır [16].

TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ gibi sitokinlerin pankreatik beta hücrelere sitotoksik etkileri olduğu bilinmektedir [17]. Son 20 yıllık verilere göre, bu etkiye apoptozun ekstresek yolak aktivasyonunun sebep olduğu kabul edilmiştir. Ekstresek yolak TNF- α ve Fas ligandı gibi ölüm sinyallerinin hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmasıyla başlar. Bu süreç kaspaz 8 ve kaspaz 3'ün aktivasyonu ile devam eder. Apoptozun ekstresek yolağını aktive eden sitokinlerin ve satüre serbest yağ asitleri (SSA)'nin SER birikimine sebep oldukları ve apoptozda rol aldıkları, ayrıca ekzojen verilen veya endojen üretilen SER'in bu sitokinlerin sitotoksik etkilerini taklit ettiği gösterilmiştir. Apoptozun ekstresek yolağında rol alan kaspaz 8 ve kaspaz 3'den yoksun olan beta hücrelerinin, hem Fas hem de SER'in indüklediği apoptozdan korunduğu gösterilmiştir [18].

SER, beta hücre apoptozunu intrinsek yolak üzerinden de indükler. Mitokondri membranının sitokrom c (sit c)'ye geçirgenliğini artırarak apoptoza neden olur. Bu etkisini, mitokondrideki apoptotik protein olan Bax'ın artışı ve aktivasyonu sağlar. SM'den SER'e dönüşümü sağlayan SMaz enziminin uyarılması, sit c salınımına sebep olan Bax'ın mitokondrideki translokasyon ve aktivasyonunu

arttırır. SER, bir serin-treonin kinaz olan Akt aktivasyonunu interfere ederek, pro-apoptotik bcl-2 proteinlerinin inhibisyonu ile de sit c salınımına sebep olur. Bu süreç protein fosfataz (PP) 1, protein kinaz C zeta (PKC ζ), PP2A ve PP2C de dahil olmak üzere; serin/treonin protein fosfatazları aktifleştirmeleriyle başlar. Serin/treonin protein fosfatazların aktifleşmesi Akt'ın defosforilasyon ve inaktivasyonuna sebep olur. Bu da hücre sağ kalımında kritik rol oynayan fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K)'ı azaltır. Akt inhibisyonunun bir diğer sonucu da glikoz transportunun bozulması ve insülin direncinin gelişmesi olabilir. Çünkü insulinin yarattığı metabolik etkilerinin majör yolağı PI3K/Akt (serin/treonin spesifik protein kinaz) yolağıdır. Glikoz transportu için Akt gereklidir. Buna göre Akt'ın inhibisyonu, insülin direnci ve tip 2 diyabetes mellitus (DM) gelişimine neden olur. Tip 2 DM'lilerin plazma ve mediastinal adipoz yağ dokularında SER düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir [18]. Egzersizle birlikte insülin duyarlılığının artması, SER düzeylerinden özellikle SER 14'ün düştüğünü göstermiştir [19]. Ancak SER ilişkili insülin direncindeki moleküler mekanizmalar net değildir.

Çeşitli çalışmalarda, pankreatik beta hücrelerinin, uzun zincirli serbest yağ asitlerine uzun süre maruz kalmasının da zararlı etkiler meydana getirdiği gösterilmiştir. SER'in, beta hücre apoptozunda bahsedilen intrinsek yolak mekanizması ile SSA'ların bu zararlı etkilerine aracılık ettiği düşünülmektedir [20]. SER öncülü palmitatın da diyabetik ve sağlıklı hayvan modelleriyle insan beta hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir [21]. Zucker'in diyabetik fare modellerinde SSA ile indüklenen beta hücre apoptozundan, de-nova yolla üretilen SER'in sorumlu olduğu [21, 22] ve SER'in de-novo sentezinin inhibisyonunun apoptozu anlamlı olarak azalttığı raporlanmıştır [23]. SER sentezi, serin palmitoil transferaz inhibitörü L-sikloserin ve SER sentaz inhibitörü Fumonisin B1 (FB1) ile inhibe edilmiş, hayvan ve insan beta hücrelerindeki SSA'nın indüklediği sitotoksitenin azaldığı gösterilmiştir [24, 25].

Araştırmalar, beta hücre apoptozunda ER stresinin de rol aldığını desteklemektedir [26]. De-novo yoldan sentezlenen SER, ER stresine bağlı beta hücre apoptozu sürecinde yer almaktadır. ER stresinin sorumlusu kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2'nin aktivasyonu, nötral SMaz'ı aktive eder. Böylece sekonder olarak SER birikimine sebep olur. Üretilen SER, beta hücrelerinde apoptozun intrinsek mitokondriyel yolağını aktive eder. Nötral SMaz'ın inhibisyonu ise beta hücrelerini, ER stresinin indüklediği apoptozdan korur [18].

Ateroskleroz

Aterogenez ve bunun sonucunda ortaya çıkan inflamatuvar değişiklikler miyokard infarktüsü, inme ve periferik vasküler hastalıklar ölümün en sık sebeplerindedir. Araştırmalardan elde edilen veriler sfingolipitlerin aterojenik süreçte rol oynadığını göstermektedir [27]. Özellikle SER'lerin, glikosfingolipitlerin ve SER-1-fosfatın aterosklerotik lezyonlarda biriktiği ve aterojenezle ilgili sinyal iletim yollarına katıldıkları gösterilmiştir [28].

Aterosklerotik plak gelişimindeki kritik olay aterojenik lipoproteinlerin agregasyonudur. Lipoproteinlerin birikiminden SM'i hidroliz eden SMaz enziminin aktivitesi sorumlu olabilir. Lipoproteinler tarafından arteriyel duvara transfer edilen SM, arteriyel SMaz tarafından hidroliz edilir. Bu durum, SER içeriğini artırarak lipoprotein agregasyonunu uyarır. Agregate olan düşük dansiteli lipoprotein (LDL) makrofajlardan köpük hücre oluşumunun güçlü bir uyarandır. Aterosklerotik lezyonlarda bulunan LDL partikül içeriğindeki SER miktarının, plazma LDL'sine göre oldukça fazla olduğu bulunmuştur [27].

TNF- α , AS'da rolü olan birçok sitokinden birisidir. TNF- α ve SER arasında direk bir ilişki vardır. TNF- α 'nın vasküler endotel hücrelerinde SER miktarını arttırdığı gösterilmiştir [29]. TNFR1 reseptörü yoluyla fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucunda, araşidonik asit üretimi ile SMaz aktivasyonuna giden yolk aktive olur. Böylece TNF- α hem nötral hem de aSMaz aktivasyonu yoluyla SER üretimini artırabilir [27]. Bazı çalışmalara göre TNF- α

ilişkili SER artışı reaktif oksijen ürünleri (ROS)'nin de sürece katılmasıyla gerçekleşir ve ROS, SER artışını destekler [30]. Ancak, SER'in ROS artışını desteklediğini belirten araştırmalar da mevcuttur [31].

SER'in IL-6'yı ve dolayısıyla C reaktif proteini destekleyerek doğrudan proinflamatuvar etkilere sebep olduğu ve aterosklerotik sürece katkıda bulunduğu gösterilmiştir [32].

Homosistein, AS ve özellikle koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörüdür. Homosisteinin, NADPH oksidaz aracılığı ile süperoksit anyon seviyesini arttırmasının yanı sıra SER düzeylerini arttırdığı da gösterilmiştir [33]. Aynı araştırmacılar, SER'in de-novo sentezini myriosin ile inhibe ettiklerinde homosistein ile indüklenmiş SER üretiminin ve glomerüler hasarın azaldığını tespit etmişlerdir. İlginç olarak SER artışının SMaz'dan bağımsız, direk olarak SER sentez aktivitesi sonucu olduğu bulunmuştur [34, 35]. Ancak SER ve homosistein ilişkisi tam olarak aydınlatılamamıştır.

Akciğer Hastalıkları

Akciğer vasküler endoteli, akciğerin fizyolojik fonksiyonunu koruyan ve birden fazla homeostatik olayda rol alan kritik yapılardan biridir. Bunlar; damar tonusunun korunması, koagülasyon, inflamasyon, anjiogenez, hücre homeostazı ve akciğer sıvısı dengesinin korunmasıdır. Akciğer endoteli, yeterli gaz transferi ve doku oksijenasyonu için gereklidir [36].

Fetal akciğer gelişimi embriyonik dönemde başlar. Bu süreçte lipitler önemli rol oynar. Sürfaktan, alveol kollapsını önleyen kompleks bir lipoproteindir. Fosfolipitler, proteinler ve kolesterolden oluşur. Fosfolipitler; fosfatidilkolin (lesitin), fosfatidilgliserol, fosfatidiletanolamin, sfingomyelin ve fosfatidilinozitol'dür [37]. Amniyotik sıvıdaki lesitin/sfingomyelin oranı akciğer maturasyonu için geleneksel bir biyobelirteçdir [38]. Akciğerlerin fetal dönemden beri lipitlerle olan ilişkisi sadece maturasyonla sınırlı değildir. Lipidomik çalışmaların ilerlemesiyle, lipitlerin

birçok akciğer hastalığında çeşitli süreçlerde rol aldıkları gösterilmiştir [39].

En sık sigara dumanına maruziyet sonucu meydana gelen amfizemde, insan ve fare akciğerlerinde, endotelial, epitelyal ve alveolar makrofajlarda SER birikimi gözlenmiştir. Bu birikim alveolar, endotelial ve epitelyal hücre ölümüne sebep olur, aynı zamanda amfizemin sebebi olan makrofaj ve matriks proteolizini aktive eder. Farelerde yapılan bir çalışma, intratrakeal olarak sentetik kısa zincirli SER uygulamasının amfizem benzeri defekt ortaya çıkardığını [40], uzun zincirli SER'lerin ise akciğer endotel geçirgenliğini arttırdığını göstermiştir [41]. SER'in moleküler hedefleri arasında, apoptoz haricinde matriks proteolizi (matriks metalloproteinazlar ve katepsin aracılığıyla) da vardır. Akciğer SER düzeyi artışının, alveolar hücre apoptozu, oksidatif stres ve amfizemi arttırdığı ve amfizemde alveolar septaların yok olmasında rol oynadığı gösterilmiştir [40]. Amfizem gelişiminde mutlak SER düzeylerinin yanı sıra, farklı SER türlerinin LC-MS/MS profillerindeki değişikliğinin de önemli olduğu ortaya konmuş ancak, bu fenomen henüz aydınlatılamamıştır [42].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar SER'lerin akciğerlerin bakteriyel patojenlere karşı savunmasının merkezi olduğunu göstermiştir [5].

Spesifik olarak aSMaz/SER sistemi, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ile enfekte olmuş endotel hücrelerinde (pnömoni, yara enfeksiyonu ve sepsis gibi nazokomiyal enfeksiyonlarda) apoptozu indükler. Endotel hücrelerinin *S. aureus* aracılı apoptozu, bir dizi sinyalizasyon sonucu meydana gelir. aSMaz'ın aktivasyonu ile SER artışı ve sonra hücrel kaspazların ve Jun-N-terminal kinazın aktivasyonu ile mitokondriden sitozole sit c geçişi olur. aSMaz'ın genetik eksikliği, *S. aureus* aracılı apoptozu önler [43]. Aynı şekilde *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ile enfeksiyon sonrasında da, aSMaz'ın membran dış bölgesine translokasyonu ve aktivasyonu ile birlikte SER salınımının arttığı gösterilmiştir [44, 45]. Bu hücre

ölümü konakçı hücrenin savunması için gerekli olabilir. Çünkü SER, NADPH-oksidad, CD95 ve KFTR gibi çeşitli moleküllerin membranda kümelenmesini sağlayarak *P. aeruginosa*'nın elimine edilmesine aracılık eder. CD95 eksikliğinde *P. aeruginosa* aracılı epitel ölümünün azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, aSMaz inhibitörleri verilen deney hayvanlarının *P. aeruginosa*'ya daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir [44]. Diğer yandan, membran raftlarının farmakolojik olarak harap edilmesinin apoptoz indüksiyonu ve *P. aeruginosa* enfeksiyonunu azalttığını raporlayan çalışmalar da mevcuttur [46].

Kistik Fibrozis

Kistik fibrozis (KF), kistik fibrozis transmembran regülatör (KFTR) genindeki mutasyonlar sonucu meydana gelen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Bu mutasyonlar şiddetli pulmoner ve gastrointestinal semptomlara neden olur. Pulmoner problemlerden özellikle *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *S. aureus* ve *Haemophilus influenzae*'nin sebep olduğu akut ve kronik enfeksiyonlar klinikteki en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. KF hastalarının %80'den fazlası *P. aeruginosa* ile enfektedir. KF hastalarının pulmoner enfeksiyonlara olan yüksek duyarlılığı ve kronik solunum yolu inflamasyonlarının nedenleri bilinmemektedir [5]. KFTR'nin bir klor kanalı aktivitesi sergilediği bilindiğinden beri, solunum yolu epitel hücrelerinde bulunan mukusun su emiliminin değiştiği, viskozitesinin arttığı, bunun da azalmış mukosilyer klirens nedeniyle olduğu ve böylece *P. aeruginosa* eliminasyon yeteneğinin azaldığı öngörülmüştür. Mukus viskozitesindeki artış, nötrofillerin alana göç etmesini ve solunum yollarındaki patojenleri yok etmesini engelliyor olabilir [47].

Sfingolipit metabolizma bozukluğu, KF'deki kronik akciğer enfeksiyonu patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. aSMaz eksik ve aSMaz inhibitörleri verilmiş farelerde IL-8 salınımının arttığı, *P. aeruginosa* ile enfekte hücrelere apoptoz yanıtının azaldığı ve böylece *P. aeruginosa*'ya daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir [44]. Bu defektif aSMaz yanıtı,

P. aeruginosa'nın öldürülmeden kaçmasına ve sonuç olarak KF'de sonlanmayan bir inflamatuvar yanıtı sebep oluyor olabilir [48]. Ancak Ziobro ve ark. bu hipotezin tam aksine, KF'de biriken SER'in epitel hücre apoptozunu arttırarak bronşilerde DNA birikimini tetiklediğini, böylece asemptomatik inflamasyonla beraber *P. aeruginosa* infeksiyonuna yatkınlığı arttırdığını belirtmişlerdir [49].

Birçok araştırma sonucunda elde edilen veriler, KF'de veziküler pH düzenlenmesinde defekt olduğunu düşündürmektedir. KFTR'nin trans-golgi veziküllerinin pH kontrolüne katıldığı bilinmektedir [50]. Ayrıca KFTR, makrofajlardaki fagolizozomların asidifikasyonunu sağlamaktadır [51]. KF'deki disfonksiyonel immün yanıtın temeli tam olarak anlaşılammış olsa da, KFTR'deki defekt fagositik veziküllerin asidifikasyonunun bozulması ile sonuçlanmaktadır. Bu da alveolar makrofajların lizozomal enzimlerinin bakterisidal özelliklerini kaybetmesine sebep olur [51]. Yu ve ark.nın yaptığı çalışmada, fare bronş epitelinde KFTR'deki defektin lizozomal pH'yı bozduğu, bu nedenle lizozomal enzim olan aSMaz'ın aktivitesinin azaldığı (defektif aktivite artışı) dolayısıyla SER miktarının azaldığı gösterilmiş, sonuç olarak KF'li farelerin aSMaz/SER yolağının bozulmuş olabileceğini belirtilmiştir [48]. Bu bağlamda, apikal lipit raflarda lokalize olan doğal tip KFTR'nin, doğal ve edinsel immün yanıtın kontrolünde de kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir [52].

KF'de sfingolipit metabolizmasının bozulduğu açıktır, ancak bu konuda yapılan çalışmaların birbiriyle çelişen yönleri vardır. KF'li insan ve hayvan solunum yolları epitel hücreleri, hücre hatları ve akciğer dokularında SER düzeyleri çoğu çalışmada yüksek bulunmuş olsa da [49, 53-56], aksine normale göre düşük bulan çalışmalar [48, 57-61] da mevcuttur.

Brodie ve ark. çeşitli SER türlerinin akciğerde birikimi ile ilgili detaylı kütle spektrometresi verileri sağlamış ve KF'li hastaların akciğerlerinde SER 16, 18 ve 20'nin önemli

birikimlerini göstermiştir [55]. Araştırmacılar, hücre içi veziküllerin alkalizasyonunun aSMaz ve seramidaz aktivitesini azalttığını ancak, seramidaz aktivitesinin, aSMaz'dan daha fazla azalması sonucu SER biriktiğini belirtmişlerdir [49]. SER, SM ve kolesterol içeren lipit raflarının yapısını değiştirir ve membran platformunu oluşturur. KFTR yokluğundaki SER birikiminin, SM ve kolesterolden zengin lipit raflarının kompozisyonunu değiştirerek, membrandaki proteinlerin fonksiyonlarını değiştirdiği tahmin edilmektedir.

KF modellerinde SER düzeylerini düşük bulan araştırmacılar ise, KFTR mutasyonuna bağlı oluşan hücre içi vezikül alkalizasyonunun, aSMaz aktivitesini seramidaza göre daha fazla azaldığını ve bu nedenle SER düzeylerinin düştüğünü savunmuşlardır [48].

SER'in fonksiyonları, dokularda birikimi, plazmada düşüşü gibi bulguların mekanizması tam aydınlatılmamış ve hangi SER türünün, hangi patofizyolojik süreçte ve nasıl rol aldığı henüz bilinmemektedir. Bu nedenle biz de Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) hastanesine başvuran KF tanılı hastaların SM ve SER düzeylerinin, hastalığın alevlenme, taburculuk ve kontrol dönemlerinde nasıl olacağı, hastalık seyri boyunca ne yönde değişeceği ve sağlıklı kontrollerle aralarında farklılık olup olmayacağını merak ettik. Bu bağlamda, araştırmamızda, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı iş birliği ve HÜTF, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin desteğiyle, KF hastalarının pulmoner alevlenme, taburculuk ve taburcu olduktan sonraki kontrol dönemlerini kapsayan 3 farklı klinik döneminin plazma SER ve SM düzeyleri değerlendirildi. Çalışma grubuna erişkin hastaların yanı sıra, çocuk KF hastaları da dahil edildi. Sonuçlar benzer yaş aralığındaki sağlıklı bireylerle kıyaslandı. Ayrıca çocuk KF hasta grubunun verileri, sağlıklı kontrol grubu haricinde, primer silyer diskinezi (PSD) tanılı çocuk hastalardan oluşan ikinci kontrol grubuyla da kıyaslandı.

PSD'de de KF'de olduğu gibi mukosilyer klirens bozulmuştur. Patofizyolojileri farklı

olan bu iki hastalığın kliniği oldukça benzer olup, PSD'nin prognozu KF'e göre daha iyidir [62]. Literatürde PSD hastalarında SER veya SM metabolizması bizden önce hiç araştırılmamış ancak, silya fonksiyonu için SER'lerin gerekli olduğu gösterilmiştir [63].

KF ve PSD hastalarının alevlenme, taburculuk ve kontrol dönemleri plazmaları ile sağlıklı kontrollerin plazma örneklerinde SM 16, SM 18, SM 24, SER 16, SER 18, SER 20, SER 22 ve SER 24 düzeyleri, çoklu reaksiyon izleme metodu kullanılarak ultra-hızlı likid kromatografi-tandem kütle spektrometresi ile ölçüldü.

Erişkin KF hastalarının alevlenme ve taburculuk dönemi tüm SM ve SER düzeyleri ile kontrol dönemi 16 SM hariç tüm SM ve SER düzeyleri sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulundu. Çocuk KF hastalarının ise alevlenme dönemi; 16 SM, 18 SM, 24 SM, SER 22 ve SER 24, taburculuk dönemi 18 SM, 24 SM, SER 18, SER 20, SER 22 ve SER 24 ile kontrol dönemi 18 SM, 24 SM ve 24 SER düzeyleri sağlıklı kontrole göre anlamlı düşük bulundu. Ancak hastalığın klinik dönemleri arasında anlamlı farklılık yoktu.

Erişkin grubun SM ve SER türleri sağlıklı kontrolle kıyaslandığında ortaya çıkan anlamlı farklılıkların, erişkin hastalarda, çocuk hastalara göre daha fazla ve daha belirgin olması dikkat çekici idi. Bu durum; erişkin hastaların yüksek yaş dolayısıyla kronik hastalık yükünü daha fazla taşımaları ve bu nedenle sfingolipit metabolizmalarının daha fazla etkilenmiş olabileceği ile açıklanabilir.

PSD hastalarının sonuçları da oldukça dikkat çekici idi. PSD alevlenme dönemi ölçülen tüm SER ve SM düzeyleri, KF hastalarının alevlenme dönemine göre anlamlı yüksek bulundu. Sağlıklı kontrolle kıyaslandığında ise alevlenme döneminde 24 SM, SER 24, taburculuk dönemi 24 SM, kontrol dönemi ise SER 18 ve SER 22 hariç tüm SM ve SER düzeyleri anlamlı yüksek bulundu. PSD'de de hastalık dönemleri arasında anlamlı farklılık yoktu.

Kronik inflamasyondan muzdarip PSD ve KF hastalarının alevlenme dönemi beyaz küre ve

C-reaktif protein düzeyleri anlamlı farklı değildi. Yani, her iki hastalıkta da inflamasyon mevcutken, tespit ettiğimiz sfingolipit farklılığının inflamasyondan bağımsız olarak, KF'de KFTR mutasyonunun ve PSD'de ise silya patolojisinin bir sonucu olduğunu söyleyebiliriz [64].

Seramidlerin Tedavideki Rolü

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

Becker ve arkadaşları, KFTR geni eksik farelerde, SER düzeylerini normalize etmek amacıyla aSMaz inhibitörleri ilaç panelini (amitriptilin, trimipramin, desipramin, amlodipin, sertralin, fluoksetin) inhaler olarak uygulamış, sonuç olarak klasik trisiklik antidepressanlar ve diğer yapısal özellikteki antidepressanların (fluoksetin, amlodipin, sertralin) farelerin akciğer dokularındaki SER düzeylerini düşürdüğünü ve bu durumun fareleri *P.aeruginosa* infeksiyonundan koruduğunu, akciğerlerindeki inflamasyonun derecesini azalttığını göstermişlerdir [53]. *P. aeruginosa*-lipopolisakkarit ile indüklenmiş akciğer hasarı sonrası de-novo SER sentezinin FB1 ile inhibisyonunun da, inflamatuvar sitokinlerden, IL-6 ve IL-1β'yı anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiş ancak, FB1'in KFTR geni intakt olan farelerde bu kadar etkili olmadığı görülmüştür [52]. Bu bulguların yanı sıra KF hastalarında amitriptilin kullanımına yönelik yapılan faz II çalışmasına katılan bir KF hastasına, 21 ay boyunca oral amitriptilin tedavisi uygulanmış ve hastanın son 21 aydaki akciğer fonksiyon testlerinde (FEV1, FVC) %10'dan fazla düzelme olduğu, beden kitle indeksinin de pozitif yönde anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir [53].

SER'lerin akciğer fibrozisindeki rolünü araştırmak amacıyla yapılan başka bir çalışmada,

KF'li farelere uygulanan aSMaz inhibitörleri ile SER düzeyleri normalize edilmiş ve aSMaz tedavisinin denekleri akciğer fibrozisinden koruduğu gösterilmiştir [65].

Retinoidler, hücresel büyüme, farklılaşma ve hücre ölümünü düzenleyen vitamin A analoglarıdır. Fenretinid (N-4-hidroksifenil-retinamid), peroksizom proliferatör-aktive reseptör agonisti olarak işlev gören yarı sentetik bir retinoiddir. Fenretinid tedavisi, ROS ve reaktif azot türlerinin oluşumuna neden olur. Retinoid reseptörleri ve reseptör aracılı olmayan SER indüksiyonu da dahil olmak üzere farklı yolların aktivasyonunda rol alır. ROS'un indüksiyonu, antiinflamatuvar homeostatik yolları tetikleyerek malign hücreleri ve bakteri infeksiyonunu ortadan kaldırmaya yardımcı olan önemli bir koruyucu, konak savunma mekanizması olarak düşünülür [57]. Fenretinid, kanser tedavisi ve profilaksisinde yaygın olarak kullanılır ancak,

KF hava yolu epitelindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir. SER düzeylerini SMaz yolak aracılığı ile değil, de-novo yolla arttırdığı düşünülmektedir. Bu nedenle hem de-novo yolak üzerinden etki ettiği için SMaz aktivitesini azaltması, hem de SER miktarını artırması proinflamatuvar etkileri azaltabilir [58].

KF'de düşük SER düzeyleri raporlayan araştırmacılar, normal lipit düzeyleri olan KF hastalarının daha hafif bir KF formu gösterebileceğini öngörmüşlerdir [59]. Bu nedenle KF hayvan modellerine uygulanan fenretinid tedavisi, yağ asidi dengesizliğini düzelterek, SER üretimini artırarak normalize etmiştir. Ayrıca KF ilişkili osteoporozdaki iyileştirici etkileri gösterilmiştir. Fenretinid tedavisiyle plazma SER düzeyinin artması, araşidonik asit düzeyinin azalması trabeküler kemik yoğunluğunun artmasıyla ilişkili bulunmuştur [60]. Hastalık şiddetini azaltma açısından fenretinid yeni bir tedavi ajanı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Fahy, E., et al., *Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids*. Journal of Lipid Research, 2009. 50(Suppl): p. S9-S14.
2. Coant, N., et al., *Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease*. Advances in Biological Regulation, 2017. 63: p. 122-131.
3. Arana, L., et al., *Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease*. Lipids Health Dis, 2010. 9: p. 15.
4. Nicolson, G.L., *Cell Membrane Fluid-Mosaic Structure and Cancer Metastasis*. Cancer Research, 2015. 75(7): p. 1169-1176.
5. Seitz, A.P., et al., *Ceramide and sphingosine in pulmonary infections*. Biol Chem, 2015. 396(6-7): p. 611-20.
6. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. 387(6633): p. 569-572.
7. Grassme, H., et al., *CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts*. J Biol Chem, 2001. 276(23): p. 20589-96.
8. Cremesti, A., et al., *Ceramide enables fas to cap and kill*. J Biol Chem, 2001. 276(26): p. 23954-61.
9. Liu, P. and R.G. Anderson, *Compartmentalized production of ceramide at the cell surface*. J Biol Chem, 1995. 270(45): p. 27179-85.
10. Bock, J. and E. Gulbins, *The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts*. FEBS Lett, 2003. 534(1-3): p. 169-74.
11. Lopez, A.M., et al., *Systemic administration of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin to symptomatic Npc1-deficient mice slows cholesterol sequestration in the major organs and improves liver function*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2014. 41(10): p. 780-7.
12. Jenkins, R.W., et al., *Regulated secretion of acid sphingomyelinase: implications for selectivity of ceramide formation*. J Biol Chem, 2010. 285(46): p. 35706-18.
13. Gomez-Muñoz, A., et al., *Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate*. Progress in Lipid Research, 2016. 61: p. 51-62.
14. Wiegmann, K., et al., *Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling*. Cell, 78(6): p. 1005-1015.
15. Manthey, C.L. and E.H. Schuchman, *Acid sphingomyelinase-derived ceramide is not required for inflammatory cytokine signalling in murine macrophages*. Cytokine, 1998. 10(9): p. 654-61.
16. Mullen, T.D. and L.M. Obeid, *Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death*. Anticancer Agents Med Chem, 2012. 12(4): p. 340-63.
17. Kim, K.A. and M.S. Lee, *Recent progress in research on beta-cell apoptosis by cytokines*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. 14: p. 657-64.
18. Galadari, S., et al., *Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms*. Lipids Health Dis, 2013. 12: p. 98.

19. Kasumov, T., et al., *Improved insulin sensitivity after exercise training is linked to reduced plasma C14:0 ceramide in obesity and type 2 diabetes*. Obesity (Silver Spring), 2015. 23(7): p. 1414-21.
20. Maestre, I., et al., *Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1*. Endocrinology, 2003. 144(1): p. 335-45.
21. Shimabukuro, M., et al., *Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(5): p. 2498-502.
22. Shimabukuro, M., et al., *Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression*. J Biol Chem, 1998. 273(49): p. 32487-90.
23. Boslem, E., P.J. Meikle, and T.J. Biden, *Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic beta-cell function and dysfunction*. Islets, 2012. 4(3): p. 177-87.
24. Maedler, K., et al., *Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function*. Diabetes, 2003. 52(3): p. 726-33.
25. Lupi, R., et al., *Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin*. Diabetes, 2002. 51 Suppl 1: p. S134-7.
26. Eizirik, D.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. Endocr Rev, 2008. 29(1): p. 42-61.
27. Bismuth, J., et al., *Ceramide: a common pathway for atherosclerosis?* Atherosclerosis, 2008. 196(2): p. 497-504.
28. Kockx, M.M., et al., *Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal*. Circ Res, 1998. 83(4): p. 378-87.
29. Xu, J., et al., *Involvement of de novo ceramide biosynthesis in tumor necrosis factor- α /cycloheximide-induced cerebral endothelial cell death*. J Biol Chem, 1998. 273(26): p. 16521-6.
30. Singh, I., et al., *Cytokine-mediated Induction of Ceramide Production Is Redox-sensitive IMPLICATIONS TO PROINFLAMMATORY CYTOKINE-MEDIATED APOPTOSIS IN DEMYELINATING DISEASES*. Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(32): p. 20354-20362.
31. Garcia-Ruiz, C., et al., *Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione*. J Biol Chem, 1997. 272(17): p. 11369-77.
32. Blake, G.J. and P.M. Ridker, *Novel clinical markers of vascular wall inflammation*. Circ Res, 2001. 89(9): p. 763-71.
33. Yang, Z.Z. and A.P. Zou, *Homocysteine enhances TIMP-1 expression and cell proliferation associated with NADH oxidase in rat mesangial cells*. Kidney Int, 2003. 63(3): p. 1012-20.
34. Yi, F., et al., *Homocysteine activates NADH/NADPH oxidase through ceramide-stimulated Rac GTPase activity in rat mesangial cells*. Kidney Int, 2004. 66(5): p. 1977-87.
35. Yi, F., et al., *Inhibition of ceramide-redox signaling pathway blocks glomerular injury in hyperhomocysteinemic rats*. Kidney Int, 2006. 70(1): p. 88-96.
36. Grassmé, H., J. Riethmüller, and E. Gulbins, *Sphingolipids in Inflammation, Infection and Lung Diseases*, in *Sphingolipids in Disease*, E. Gulbins and I. Petrache, Editors. 2013, Springer Vienna: Vienna. p. 199-403.
37. KİMYA, Y. and C. CENGİZ, *Diabetes Mellitus ve Fetal Akciğer Matürasyonu*. Perinatoloji Dergisi, 1993. 1: p. 101-104.
38. Tibboel, J., et al., *Sphingolipids in lung growth and repair*. Chest, 2014. 145(1): p. 120-8.
39. Uhlig, S. and E. Gulbins, *Sphingolipids in the lungs*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. 178(11): p. 1100-14.
40. Petrache, I., et al., *Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice*. Nat Med, 2005. 11(5): p. 491-8.
41. Schweitzer, K.S., et al., *Mechanisms of lung endothelial barrier disruption induced by cigarette smoke: role of oxidative stress and ceramides*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. 301(6): p. L836-46.
42. Kroesen, B.J., et al., *BcR-induced apoptosis involves differential regulation of C16 and C24-ceramide formation and sphingolipid-dependent activation of the proteasome*. J Biol Chem, 2003. 278(17): p. 14723-31.
43. Esen, M., et al., *Mechanisms of Staphylococcus aureus induced apoptosis of human endothelial cells*. Apoptosis, 2001. 6(6): p. 431-439.
44. Grassme, H., et al., *Host defense against Pseudomonas aeruginosa requires ceramide-rich membrane rafts*. Nat Med, 2003. 9(3): p. 322-30.
45. Zhang, Y., et al., *Acid sphingomyelinase amplifies redox signaling in Pseudomonas aeruginosa-induced macrophage apoptosis*. J Immunol, 2008. 181(6): p. 4247-54.
46. Kowalski, M.P. and G.B. Pier, *Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for Pseudomonas aeruginosa-induced cellular activation*. J Immunol, 2004. 172(1): p. 418-25.
47. Matsui, H., et al., *Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces*. J Immunol, 2005. 175(2): p. 1090-9.
48. Yu, H., et al., *Defective acid sphingomyelinase pathway with Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. 41(3): p. 367-75.
49. Teichgraber, V., et al., *Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis*. Nat Med, 2008. 14(4): p. 382-91.

50. Goldman, M.J., et al., *Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis*. Cell, 1997. 88(4): p. 553-60.
51. Barasch, J., et al., *Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis*. Nature, 1991. 352(6330): p. 70-3.
52. Bodas, M., et al., *Critical modifier role of membrane-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent ceramide signaling in lung injury and emphysema*. J Immunol, 2011. 186(1): p. 602-13.
53. Becker, K.A., et al., *Acid sphingomyelinase inhibitors normalize pulmonary ceramide and inflammation in cystic fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. 42(6): p. 716-24.
54. Ulrich, M., et al., *Alveolar inflammation in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2010. 9(3): p. 217-27.
55. Brodli, M., et al., *Ceramide is increased in the lower airway epithelium of people with advanced cystic fibrosis lung disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. 182(3): p. 369-75.
56. Zhang, Y., et al., *Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cfr-deficient macrophages on infection*. J Immunol, 2010. 184(9): p. 5104-11.
57. Guilbault, C., et al., *Fenretinide corrects newly found ceramide deficiency in cystic fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. 38(1): p. 47-56.
58. Vilela, R.M., et al., *Inhibition of IL-8 release from CFTR-deficient lung epithelial cells following pre-treatment with fenretinide*. Int Immunopharmacol, 2006. 6(11): p. 1651-64.
59. Guilbault, C., et al., *Cystic fibrosis fatty acid imbalance is linked to ceramide deficiency and corrected by fenretinide*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. 41(1): p. 100-6.
60. Saeed, Z., et al., *Fenretinide prevents the development of osteoporosis in Cfr-KO mice*. J Cyst Fibros, 2008. 7(3): p. 222-30.
61. Noe, J., et al., *CFTR regulation of intracellular pH and ceramides is required for lung endothelial cell apoptosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. 41(3): p. 314-23.
62. Ratjen, F., et al., *Changes in airway inflammation during pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia*. European Respiratory Journal, 2015: p. ERJ-01390-2015.
63. Wang, G., K. Krishnamurthy, and E. Bieberich, *Regulation of primary cilia formation by ceramide*. J Lipid Res, 2009. 50(10): p. 2103-10.
64. Bal Topcu, D., et al., *Plasma ceramides and sphingomyelins increase in primary ciliary dyskinesia but decrease in cystic fibrosis*. European Respiratory Journal 2018. 52(62).
65. Ziobro, R., et al., *Ceramide mediates lung fibrosis in cystic fibrosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 434(4): p. 705-9.

