

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**BÖBREK NAKLİ HASTALARINDA miRNA
İŞLENMESİNDE GÖREV ALAN KOMPONENTLERİN
EKSPRESYON PROFİLİ**

Esra ÇELEN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

BÖBREK NAKLİ HASTALARINDA miRNA İŞLENMESİNDE GÖREV ALAN KOMPONENTLERİN EKSPRESYON PROFİLİ

Esra ÇELEN

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Şükran Burçak YOLDAŞ ÇELİKTEN**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2014.02.0122.006)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 22/06/2015

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Ş. Burçak YOLDAŞ ÇELİKTEN**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Fahri UÇAR**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Özgül ALPER**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye : **Doç. Dr. Hüseyin KOÇAK**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü yönetim kurulunun/2015 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özgül ALPER

Enstitü Müdürü

ÖZET

Transplantasyon alanında, klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce greftin akıbetini önceden kestirebilmek için biyobelirteç çalışmaları yapılmaktadır. Son yıllarda mikroRNA'lar çok sayıda hastalığın teşhisi ve prognozu için biyobelirteç olmaya aday moleküllerdir. Bu doğrultuda immünsüpresanların miRNA biyogenezinde görevli komponentlerin seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırdık.

Böbrek nakli hastalarında nakil öncesi ve nakilden 3 ay sonrasında periferik kandaki mononükleer hücrelerin lizatlarında Dicer, Drosha, DGCR8, Argonaute2 ve Exportin5 ekspresyon seviyelerini inceledik. Rejeksiyon gerçekleşmeyen hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8 ve Argonaute2 ekspresyon seviyelerinde azalma görülürken Exportin5 ekspresyonunda bir değişime rastlanmadı. Ancak kronik rejeksiyon gelişen olguda Dicer hariç diğer protein ekspresyonlarında değişimler görüldü. Akut rejeksiyon gelişen olguda ise Exportin5 ekspresyonunda artış gözlemlendi. Bu genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri transplantasyon sonrası 3. ayda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ve bu azalma kronik rejeksiyon gelişen olguda daha fazlaydı. Bunlara ek olarak, Everolimus kullanan hastalarda Dicer ekspresyonu değişmezken Argonaute2 ekspresyonunda artış görüldü.

Sonuç olarak çalışmamız immünsüpresif ilaçların miRNA sentezini etkileyebileceğini ve nakledilen organın takibi için potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek nakli, Biyobelirteç, MikroRNA,
MikroRNA biyogenezi, İmmünsüpresan.

ABSTRACT

In transplantation area, biomarker studies are conducted to determine the graft outcome before clinical symptoms. In recent years, miRNAs are considered as biomarkers for diagnosis and prognosis of many diseases. In this respect, we sought to determine the impact of immunosuppressant drugs on the levels of miRNA biogenesis components before and 3 months after transplantation.

We investigated the expression levels of Dicer, Drosha, DGCR8, Argonaute2 and Exportin5 using lysates of peripheral blood mononuclear cells of kidney transplantation patients before and 3 months after transplantation. Expression levels of Dicer, Drosha, DGCR8 and Argonaute2 decreased and that of Exportin5 did not change in patients who did not reject the graft. However, we have seen changes in expressions of above proteins except Dicer in patient who showed chronic rejection and we observed increase in expression of Exportin5 in patient who showed acute rejection. mRNA expression levels of all genes mentioned above showed statistically significant decrease 3 months after transplantation and this decrease was even greater in patient who showed chronic rejection. In addition to these, Dicer expression did not change while Argonaute2 expression increased in patient who received Everolimus.

In conclusion, our study indicates that use of immunosuppressive drugs may have an impact on synthesis of miRNAs and can be used as potential biomarker to follow the nature of transplanted organ.

Key Words: Renal transplantation, Biomarker, MicroRNA,
MicroRNA biogenesis, Immunosuppressant.

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca benimle değerli bilgilerini, fikirlerini ve zamanını cömertçe paylaşan, çalışmam için fırsat yaratan değerli danışmam hocam sayın Doç.Dr. Burçak YOLDAŞ ÇELİKTEN'e,

Tüm maddi ve manevi destekleri için, bitmek bilmeyen sorularımı her zaman sabırla cevaplayan değerli hocam Prof.Dr. Osman Nidai ÖZEŞ'e,

Tezimdeki hasta grubunun oluşturulması için verdiği desteklerinden ötürü sayın Doç.Dr. Hüseyin KOÇAK'a,

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim sayın hocalarım Prof.Dr. Özgül ALPER, Prof.Dr. Ahter DİLŞAD TORAMAN ve Prof.Dr. İbrahim KESER'e,

Çalışmalarında bana yol gösteren sayın hocalarım Prof.Dr. Fahri UÇAR ve Yrd.Doç. Dr. Aslı TOYLU'ya ve değerli abim Dr. Saffet ÖZTÜRK'e,

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan arkadaşlarım Suray PEHLİVANOĞLU, Gökhan GÖRGİŞEN, Fatma Zehra HAPİL, Ufuk MERT, Yusuf OLGAR, Esra TAVŞAN NİZAM, Mustafa Gökhan ERTOSUN, Muslime TANRISEVEN, Elanur YILMAZ, Şule DARBAŞ ve Gökçe ERDOĞAN'a,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Daha küçücükken bir bilim insanı olma heyecanını aklıma düşüren öğretmenim sayın Turgay ASLANER'e,

Çıktığım bu yolda desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bana benden daha çok inanan, ilk öğretmenlerim annem ve babam Gülfidan ve Osman YETİŞGİN'e,

En iyi arkadaşım canım kardeşim Derya YETİŞGİN'e,

Her takıldığımda sabırla tekrar ve daha güçlü olarak ayağa kalkmamı sağlayan, her adımda yanımda yürüyen sevgili eşim Murat Cenk ÇELEN'e,

Benimle her zaman gurur duyan aileme ve tüm dostlarıma, içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1 Böbrek Yetmezliği	3
2.1.1. Akut Böbrek Yetmezliği	3
2.1.2. Kronik Böbrek Yetmezliği	3
2.2. Renal Replasman Tedavileri	4
2.2.1. Hemodiyaliz	5
2.2.2. Periton Diyaliz	5
2.2.3. Böbrek Nakli	7
2.3. Transplantasyon İmmünolojisi	8
2.3.1. Alıcı ve Donörde Doku Uyumu ve Crossmatch (Çapraz Uyum)	9
2.3.2. Alıcı ve Donörde ABO Kan Grubu Uyumu	9
2.3.3. Organ Naklinde Tolerans	10
2.3.4. Organ Rejeksiyonu	10
2.4. Organ Naklinde Kullanılan İmmünsüpresifler	10
2.4.1. Kortikostereoidler	10
2.4.2. Siklosporin A	11
2.4.3. Azatioprin	11
2.4.4. MMF	11
2.4.5. TOR İnhibitörleri	11

2.4.6.	FK-506 (Takrolimus)	12
2.4.7.	Poliklonal İmmünglobulinler	12
2.4.8.	Anti-CD3 Monoklonal Antikorlar	12
2.4.9.	Antiinterlökin-2 Reseptör Antikorları	12
2.5.	Transplantasyon Alanında Biyobelirteçler	12
2.6.	mikroRNA'lar ve mikroRNA Biyogenezi	14
2.7.	Böbrek Naklinde miRNA'lar	15
2.8.	miRNA ve miRNA Biyogenez Komponentlerinin İmmün Sistemle İlişkileri	16
BİREYLER ve YÖNTEMLER		18
3.1.	Böbrek nakli hastalarının seçimi	18
3.2.	Periferik kandan mononükleer hücre (PKMH) izolasyonu	18
3.3.	PKMH'lerden protein eldesi	18
3.4.	Bradford protein miktar tayini	19
3.5.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	19
3.6.	Western Blot yöntemi	20
3.7.	Periferik kandan RNA izolasyonu	21
3.8.	RNA miktar ve kalite tayini	22
3.9.	RT-PCR (Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	22
3.10.	Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	22
3.11.	İstatistiksel Analiz	23
BULGULAR		24
4.1.	Hastalar	24
4.2.	PKMH Lizatlarının Protein Kaliteleri	25
4.3.	Hastalarda Protein Ekspresyon Değişimleri	27
4.4.	İlaç Gruplarına Göre Protein Ekspresyon Değişimleri	33
4.5.	Rejeksiyon Görülen ve Görülmeyen Hastaların Protein Ekspresyon Değişimleri	34

4.6.	RNA Örneklerinin Kalitesi ve Konsantrasyonları	35
4.7.	Real-time RT-PCR Optimizasyonunun Sağlanması	37
4.7.1.	500 ng RNA ile Real-time RT-PCR	37
4.7.2.	200 ng RNA ile Real-time RT-PCR	38
4.8.	Hastalarda Gen Ekspresyon Değişimleri	39
4.9.	İlaç Gruplarına Göre Gen Ekspresyon Değişimleri	43
4.10.	Rejeksiyon Görülen ve Görülmeyen Hastalardaki Gen Ekspresyon Değişimleri	48
TARTIŞMA		46
SONUÇLAR		50
KAYNAKLAR		51
ÖZGEÇMİŞ		54

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ago	: Argonaute
ALG	: Anti lenfosit globülin
APD	: Aletli periton diyalizi
APS	: Amonyum persülfat
ATG	: Anti timosit globülin
BSA	: Bovine serum albumin
cDNA	: Komplementer DNA
CMV	: Sitomegalovirus
CT	: Eşik döngüsü
CYP	: Sitokrom protein
DGCR8	: DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8
dGTP	: Deoksiguanidintrifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECL	: Enhanced kemilüminesan
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FKBP	: FK506 bağlayıcı protein
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GTP	: Guanidintrifosfat
HLA	: İnsan lökosit antijeni
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
ITP	: İmmün trombositopeni
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
MHC	: Majör histokompatibilite kompleksi
miRNA	: mikroRNA
mRNA	: Mesajcı RNA
miRNP	: Mikroribonükleoprotein
NK	: Doğal öldürücü hücre
NTC	: Negatif kontrol

PBS	: Fosfat tuz tamponu
PBS-T	: Fosfat tuz tamponu- Tween-20 solüsyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PKMH	: Periferik kandaki mononükleer hücreler
PVDF	: Polivinilidin florür
RISC	: RNA indükleyici susturucu kompleks
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
RRT	: Renal replasman tedavisi
SAPD	: Sürekli ayaktan periton diyalizi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TRBP	: TAR RNA bağlayıcı protein
UV	: Ultraviyole ışın

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Türkiye’de renal replasman tedavisi gören hastaların milyon nüfus başına insidans ve prevalansındaki seyir	4
2.2. Türkiye’de renal replasman tedavisi uygulanan hasta sayılarının yıllar içinde değişimi	4
2.3. Renal replasman tedavisi gören hastalarda primer etiyolojinin yıllar içindeki değişimi	6
2.4. Yıllara göre yapılan nakil sayıları	7
2.5. Türkiye’de yapılan böbrek nakillerinde kadaverik nakil oranı	7
2.6. 6. Kromozom üzerinde HLA lokusu	8
2.7. miRNA biyogenezi	15
4.1. SDS-PAGE sonrası coomassie blue boyama tamponu ile boyanmış 50 µg lizat örneklerinin bulunduğu jel görüntüleri	27
4.2. Hastalardaki Dicer ekspresyonları	28
4.3. Hastalardaki Drosha ekspresyonları	29
4.4. Hastalardaki DGCR8 ekspresyonları	30
4.5. Hastalardaki Exportin5 ekspresyonları	31
4.6. Hastalardaki Argonaute2 ekspresyonları	32
4.7. Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 protein ekspresyon değişimleri	33
4.8. İmmünsüpresan gruplarına göre protein ekspresyon değişimleri	33
4.9. Rejeksiyon görülen hastaların protein ekspresyon değişimleri	34
4.10. Rejeksiyon görülmeyen hastaların protein ekspresyon değişimleri	35
4.11. 500 ng H16 ve H16-3 RNA örnekleri ile gerçekleştirilen Real-time PCR amplifikasyon eğrileri	38

4.12.	200 ng H16 ve H16-3 RNA örnekleri ile gerçekleştirilen Real-time PCR amplifikasyon eğrileri	39
4.13.	Tüm hastalar için 200 ng RNA örneği ile gerçekleştirilen Real-time PCR sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri	43
4.14.	Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5, Argonaute2 ve β -actin moleküllerinin erime eğrileri	46
4.15.	Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 genlerinin β -actin ile normalize edilmiş ekspresyon düzeyleri	47
4.16.	İmmünsüpresan gruplarına göre gen ekspresyon değişimleri	48
4.17.	Rejeksiyon görülen hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 gen ekspresyonlarındaki değişim oranları	49
4.18.	Rejeksiyon görülen hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 genlerinin β -actin ile normalize edilmiş ekspresyon düzeyleri	49
4.19.	Rejeksiyon görülmeyen hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 genlerinin β -actin ile normalize edilmiş ekspresyon düzeyleri	50

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Hemodiyaliz, periton diyalizi ve transplantasyon hastalarının yaş dağılımı	5
2.2. Hastaların renal replasman tedavisinde geçirdikleri süre	5
3.1. SDS-Poliakrilamid Jel İçerikleri	20
3.2. Real-time PCR koşulları	23
4.1. Hastaların demografik özellikleri	24
4.2. PKMH lizatlarının protein konsantrasyon değerleri ve yüklenecek lizat miktarları	25
4.3. RNA örneklerinin konsantrasyonları, saflık değerleri ve 200 ng için gerekli miktarlar	36
4.4. 500 ng RNA ile RT-PCR optimizasyon protokolü	37
4.5. H16 pre-op ve post-op cDNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri (500 ng RNA)	37
4.6. 200 ng RNA ile RT-PCR optimizasyon protokolü	38
4.7. H16 pre-op ve post-op cDNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri (200 ng RNA)	38
4.8. 500 ng ve 200 ng RNA örnekleri ile gerçekleştirilen Real-time PCR sonucu CT (Threshold Cycle) değerleri	39
4.9. cDNA konsantrasyonları ve saflık değerleri	40
4.10. Rejeksiyon görülen hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 gen ekspresyonlarında görülen azalma katsayıları	44

GİRİŞ

Organ nakli; başta böbrek olmak üzere işlevini yerine getiremeyen pek çok organ için son tedavi seçeneği olarak hastaların hayat kalitesinde olumlu değişiklikler sağlayan önemli bir tedavi yöntemidir. Organ naklinden sonra görülen en önemli sorunlar hayat boyu immünsüpresan kullanımı sonucu enfeksiyon hastalıkları ve tümör oluşumu riskinin artması, akut ve kronik organ rejeksiyonu ve orijinal hastalığın tekrar etmesidir. İmmünsüpresan tedavi seçeneklerinin gelişmesi ve hasta takiplerinin daha düzenli yapılması ile akut rejeksiyon görülme sıklığı azalmıştır. Ancak günümüzde invaziv olmayan biyobelirteçlerin eksikliği erken teşhisi ve optimize edilmiş bir tedavi olanağını zorlaştırmaktadır [1].

Son dönem çalışmalar hastalıkların teşhisi ve takibinde potansiyel bir biyobelirteç olan mikroRNA'lar (miRNA) üzerinde yoğunlaşmıştır. miRNA'lar hücre döngüsü, immün cevap, apoptoz gibi hücresel olaylarda rol oynar. İmmün cevap için gerekli olan inflamasyon, T ve B hücre farklılaşması ve sinyal mekanizmalarını düzenlerler. Dolayısıyla miRNA'lar organ rejeksiyonunda ya da toleransın gelişmesinde etkili olan moleküllerdir [1, 2]. miRNA'lar yüksek oranda korunmuş DNA bölgelerinden kodlanan ve proteine translasyonu gerçekleşmeyen küçük regülatör RNA molekülleridir. Bu moleküller hedefleri olan mRNA'lara bağlanarak translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı sonucu gen ekspresyonunun kontrolünü sağlarlar [3].

miRNA biyogenezi çekirdekte ve sitoplazmada olmak üzere iki basamakta gerçekleşir. Bu basamaklarda özelleşmiş moleküller görev yapmaktadır. Bunlardan en spesifik olanları RNaz III ailesinden olan Drosha enzimi ve kofaktörü Pasha (DGCR8), taşıma reseptörü olan Exportin5, yine RNaz III ailesine ait bir enzim olan Dicer endonükleazı, kararlı zincir seçilimini sağlayan Argonaute proteindir [3].

Organ nakli hastalarında miRNA ekspresyon profillerini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Böbrek nakli hastalarında akut rejeksiyon sonrası miRNA ekspresyon profilleri çıkarılmış ve sağlıklı bireylerin profilleriyle karşılaştırıldığında 20 adet miRNA ekspresyonunda farklılık olduğu gösterilmiştir [4]. Böbrek nakli sonrası allogreftlerden alınan biyopsi örneklerinde ekspresyon seviyeleri değişen miRNA'ların rejeksiyonun tanısı ve önceden tahmini için %90'dan fazla oranda sensitivite ve spesifiklik ile belirleyici moleküller olabilecekleri gösterilmiştir. Bunlardan bazılarının T ve B hücre reseptörleri olan CD3 ve CD20 mRNA düzeyleriyle korelasyon gösterdikleri gözlenmiştir [5]. Periferik kandan elde edilen mononükleer hücrelerdeki miRNA ekspresyon değişimleri incelenerek miR-142-5p yine böbrek nakli hastalarında rejeksiyon olayıyla ilişkilendirilmiş ve biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [6]. miR-155'in allogreftin immünitesini düzenlediği ve baskılanması durumunda rejeksiyonun önlenmesi için potansiyel bir terapötik ajan olduğu öne sürülmüştür [7].

miRNA biyogenezinde görevli proteinlerin ekspresyon profilleri yakın zamanda başta kanser olmak üzere pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Dicer proteinin immün sistemde rol oynadığı gösterilmiştir [8, 9]. Ancak bu komponentlerin organ nakliyle olan ilişkisi henüz gösterilmemiştir. Günümüzde organ nakli sonrasında hastaların klinikleriyle ilişkilendirilebilecek etkin biyobelirteç sayısı sınırlı sayıdadır, dolayısıyla klinik seyrin takibini etkili biçimde sağlayabilecek ve greftin akıbetiyle ilgili bilgi verebilecek biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Bu nedenle çalışmamızda, böbrek nakli yapılan hastaların nakil operasyonu öncesi ve operasyon sonrasında, periferik kan örneklerinde miRNA işlenmesinde görevli komponentlerden Dicer (NM_177438, NP_803187), Drosha (NM_013235, NP_037367), DGCR8 (NM_022720, NP_073557), Exportin5 (NM_020750, NP_065801) ve Argonaute2 (NM_012154, NP_036286)'nin mRNA ve protein ekspresyon düzeylerini araştırarak bu parametrelerin nakil sonrası klinik seyrin takibi ve immünsüpresan etkinliğinde seçiciliği destekleyecek yeni aday moleküler hedefler olabileceğini göstermeyi hedefledik.

GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Yetmezliği

1970 yılından önce son dönem böbrek yetmezliği hastaları için terapötik seçenekler çok sınırlıydı. Çok az sayıda hasta sınırlı sayıda diyaliz merkezlerinden yararlanabiliyordu. Böbrek nakli henüz gelişiminin erken dönemlerindeydi. Transplantasyon immünolojisi ve immünsüpresif tedavi henüz emekleme dönemindeydi. Dolayısıyla kronik böbrek yetmezliği hastalar için bir ölüm fermanıydı. Sonraki yıllarda tedavi seçenekleri büyük bir hızla gelişti.

Günümüzde gelişmiş ülkelerde renal replasman tedavileri –diyaliz ve böbrek nakli- aktif olarak kullanılmaktadır. Ancak gelişmekte olan ülkeler hala bu tedavilere ulaşmak konusunda yeterince ilerlemiş değillerdir. Güney Asya’da son dönem böbrek yetmezliği teşhisi alan hastaların yaklaşık % 90’ı teşhisten sonraki birkaç ay içerisinde kaybedilmektedir. Son dönem böbrek yetmezliğine erişen veya renal replasman tedavisi gereken hastalarda uygun koşullar sağlandığı takdirde hastanın yaşam kalitesini artırmak için en uygun yöntem böbrek naklidir. Canlı donörden ve kadavradan yapılan böbrek nakli oranları gelişmiş ülkeler arasında değişiklik göstermektedir. Ülkeler arasında görülen bu farkların başlıca sebepleri, beyin ölümü konusundaki yasal kısıtlamalar, kültürel farklılıklar ve organ bağışına bakış açılarıdır [10].

Böbrek hastalığı veya böbrek yetmezliği ortaya çıkma zamanlarına göre akut böbrek yetmezliği ve kronik böbrek yetmezliği olmak üzere iki grupta incelenebilir.

2.1.1. Akut Böbrek Yetmezliği

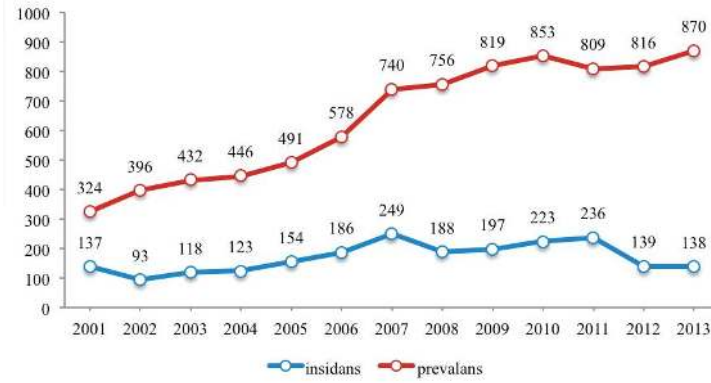
Böbrek fonksiyonunda 7 gün içinde ortaya çıkan kayıptır. Çok sayıda sebepleri olmakla birlikte genellikle dokuda oluşan hasardan kaynaklanmaktadır. Böbrekte gerçekleşen iskemi olayı yani kan akışının azalması, inflamasyon, zararlı maddelere maruziyet veya üriner sistemin tıkanması sonucu idrar akışının engellenmesi başlıca sebepler arasında yer almaktadır. Serum kreatinin oranında minimal düzeyde bir artış gözlenir. Kronik böbrek yetmezliği gelişmesine ve diyaliz gereksinimine sebep olduğu düşünülmektedir [11].

2.1.2. Kronik Böbrek Yetmezliği

Böbrek işlevinin ilerleyerek kaybolması sonucu son dönem böbrek yetmezliği ortaya çıkar. Türk Nefroloji Derneği’nin verilerine göre ülkemizde her 6-7 erişkinden birinde çeşitli evrelerde kronik böbrek yetmezliği (KBY) görülmektedir. ABD’de yaklaşık 20 milyon yetişkin KBY hastası vardır [10]. KBY evresindeki hastalarda eşlik eden kalp-damar hastalıklarına bağlı erken ölüm riski ortaya çıkmaktadır. Bu bireylerin ölüm riski genel toplumdan 10-30 kat daha fazladır. KBY hastalarının yaşamlarını devam ettirebilmeleri için diyalize ihtiyaçları vardır [12].

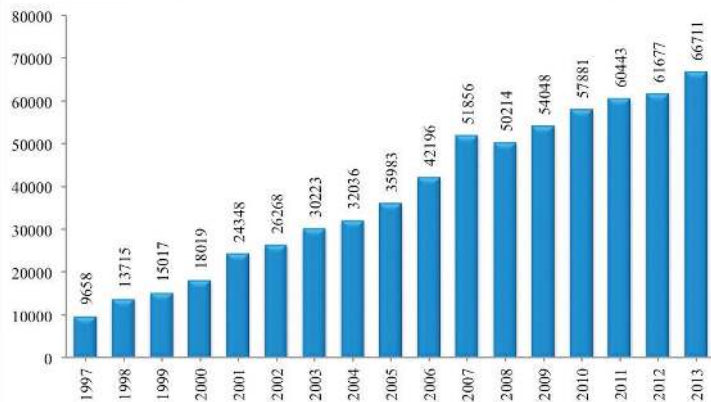
2.2. Renal Replasman Tedavileri

Renal replasman tedavileri (RRT) 1960'lerden beri tüm dünyada artan bir hızla uygulanmaktadır. Yeni boyutlar kazanmakta ve sürekli olarak kalitesinde artış görülmektedir. 2012 yılından itibaren Sağlık Bakanlığı'ndan alınan hasta temelli verilere göre yapılan hesaplamalarda, RRT gören hastaların prevalansı milyon nüfus başına 870, insidansı ise milyon nüfus başına 138 olarak görülmüştür. Şekil 2.1'de RRT tedavisi gören hastalarının prevalans ve insidansının 2001'den bu yana olan değişimi görülmektedir [13].



Şekil 2.1. Türkiye'de renal replasman tedavisi gören hastaların milyon nüfus başına insidans ve prevalansındaki seyir [13]

1990 yılında Prof. Dr. Ekrem Erek tarafından temelleri atılan Türk Nefroloji Derneği kayıt sistemi, hemodiyaliz, periton diyalizi ve transplantasyon ile ilgili bilgileri toplamaktadır. 2013 yılında 996 ünitenin 351'i (% 35) verilerini internet yolu ile bildirmiş olup bu verilere göre toplam 66.711 hastaya RRT uygulanmıştır. Genel olarak RRT uygulanan hastaların sayısında yıllar içinde bir artış görülmektedir (Şekil 2.2). RRT uygulanan tüm hastaların % 79'unu oluşturan 52.675 hasta ile en sık uygulanan RRT tipi hemodiyalizdir. Bunu % 14'lük oran ile transplantasyon ve % 7'lik bir oran ile periton diyalizi takip etmektedir.



Şekil 2.2. Türkiye'de renal replasman tedavisi uygulanan hasta sayılarının yıllar içinde değişimi [13]

2.2.1 Hemodiyaliz

Dünya çapında diyaliz hastalarının sayısı 1 milyondan fazladır. Son dönem böbrek yetmezliği hastalarının tedavisinde en çok uygulanan yöntem hemodiyalizdir. Ülkemizde ilk kez 1965 yılında uygulanan hemodiyaliz yaklaşık 350 ulusal merkezde bulunmaktadır [14]. Diyaliz boyunca solüt yarı-geçirgen bir zardan difüzyonla uzaklaştırılır. 2.5 ile 5 saat arasında bir uygulama süresi olmakla beraber haftada yaklaşık 3 kez tekrarlanır [10].

2013 yılında hemodiyalize yeni başlayan hasta sayısı 8757 olup toplam hemodiyaliz hasta sayısı 52.675'tir ve yıllık artış eğilimi devam etmektedir. Türkiye'de hemodiyaliz tedavisi gören tüm hastaların % 56,1'i erkek ve % 43,9'u kadın hastalardır. Hemodiyaliz hastalarının yaş dağılımları Tablo 2.1'de gösterilmiştir. Hastaların %80'den fazlasını orta yaşlı ve yaşlı hasta popülasyonu oluşturmaktadır [13].

Tablo 2.1. Hemodiyaliz, periton diyalizi ve transplantasyon hastalarının yaş dağılımı [13]

Yaş	0-19	20-44	45-64	65-74	75+
Hemodiyaliz (%)	0,9	15,8	42,6	24,3	16,5
Periton Diyalizi (%)	8,0	31,2	43,1	13,5	4,6
Transplantasyon (%)	9,3	51,0	36,6	2,9	0,2

Yeni hemodiyaliz hastalarında başlıca etiyolojik faktör %36'lık bir oran ile diabetes mellitus'tur (Şekil 2.3). Bunu sırasıyla hipertansiyon (% 29), glomerülonefrit (% 6), polikistik böbrek hastalığı (% 3), piyelonefrit (% 2) ve amiloidoz (% 1) takip etmektedir. Tablo 2.2'de hastaların diyaliz süresine göre dağılımları gösterilmiştir. Bu hastaların % 35'i 5 yıldan fazla süredir hemodiyalize girmektedir. Hemodiyaliz hastalarının başlıca ölüm sebepleri kardiyovasküler nedenlerdir (% 53,4) ve 2013 yılında 8260 hemodiyaliz hastası kaybedilmiştir [13].

Tablo 2.2. Hastaların renal replasman tedavisinde geçirdikleri süre [13]

Süre (yıl)	0-5	6-10	11-15	16-20	>20
Hemodiyaliz (%)	66,4	21,8	8,0	2,7	1,1
Periton Diyalizi (%)	70,2	24,2	5,0	0,6	0,0

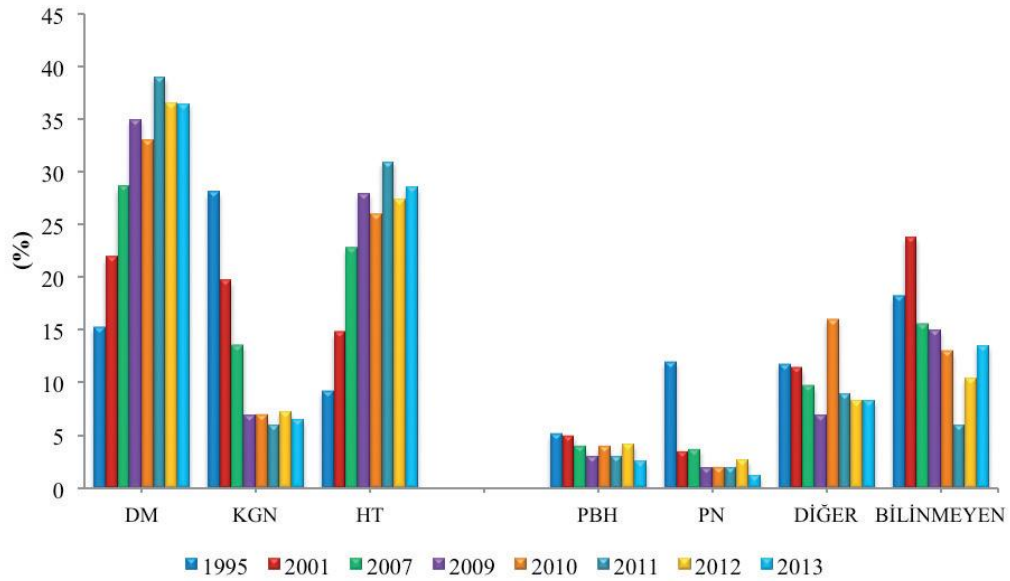
2.2.2. Periton Diyaliz

Periton diyalizi, periton zarının, sıvı ve solüt geçirgenliği özelliği ile endojen bir diyaliz membranı olarak kullanıldığı, hemodiyalize alternatif bir yöntemdir. Hastaya yerleştirilen kateter kullanılarak uygulanmaktadır. Bu yöntemle karın boşluğuna yer çekimi etkisi ile periton diyaliz sıvısı verilir, bir süre karın boşluğunda bekletilir ve uzaklaştırılır. Sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) ve aletli periton diyalizi (APD) olmak üzere iki çeşittir. Periton diyalizinin hemodiyalize göre başlıca

avantajı hastaların ev ortamında diyalizi gerçekleştirebilmeleridir. Bir diğer avantajı da kan veya serum üre, kreatinin, sodyum ve potasyum düzeylerinin görece olarak sabit tutulabilmesidir [10].

ABD’de hastaların % 10’undan daha azı tedavilerine periton diyalizi ile başlamaktadır [10]. Ülkemizde 2013 yılı verilerine göre toplam periton diyalizi hasta sayısı 4537’dir ve son yıllarda periton diyalizi hastalarında bir azalma eğilimi görülmektedir. Periton diyalizine 2013 yılında yeni başlayan hasta sayısı 1150’dir. Periton diyalizi tedavisi uygulanan mevcut tüm hastaların % 51’i erkek ve % 49’u kadın hastalardır. Tablo 2.1’de periton diyalizi hastalarının yaş dağılımları gösterilmektedir. Yeni periton diyalizi hastalarında % 35,4’lük bir oran ile hipertansiyon ilk sırada yer alan etiyolojik faktördür (Şekil 2.3). Bunu sırasıyla diabetes mellitus (% 31), glomerülonefrit (% 10,4), polikistik böbrek hastalığı (% 3,3) ve amiloidoz (% 2,2) takip etmektedir [13].

Hastaların diyaliz süresine göre dağılımları Tablo 2.2’de gösterilmiştir. Bu hastaların % 30’u 5 yıldan fazla süredir periton diyalizi tedavisi almaktadır. Periton diyalizi hastalarının başlıca ölüm sebepleri hemodiyaliz hastalarında olduğu gibi kardiyovasküler nedenlerdir (% 43,2) [13].



Şekil 2.3. Renal replasman tedavisi gören hastalarda primer etiyolojinin yıllar içindeki değişimi [13]

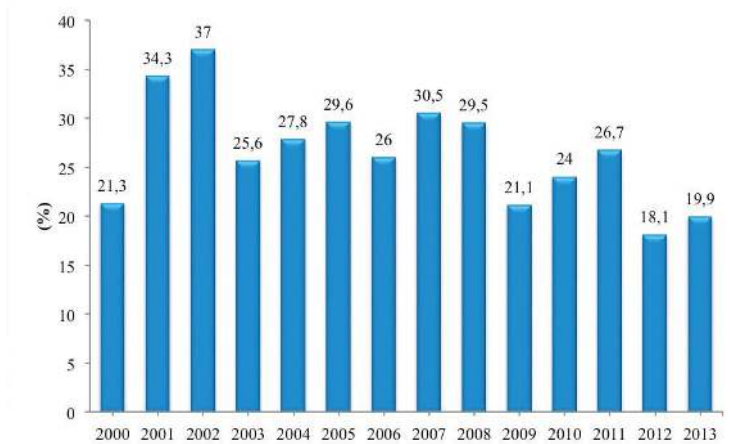
DM: Diabetes mellitus, **KGN:** Kronik glomerülonefrit, **HT:** Hipertansiyon, **PBH:** Polikistik böbrek hastalığı, **PN:** Piyelonefrit.

2.2.3. Böbrek Nakli

Türkiye’de ilk başarılı böbrek nakli 1975 yılında Hacettepe Üniversitesi hastanesinde Dr. Mehmet Haberal ve ekibi tarafından canlı akraba vericiden yapılmıştır [14]. Gerçekleştirilen böbrek nakli sayısı giderek artış göstermektedir (Şekil 2.4). Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2013 yılında 2944 hastaya böbrek nakli gerçekleştirilmiştir. Tablo 2.1’de 2013’te böbrek nakli gerçekleşen hastaların yaş dağılımları incelendiğinde hastaların çoğunun 20-44 yaş aralığında olduğu görülmektedir. Nakillerin yaklaşık % 80’i canlı vericiden yapılmıştır ve kadavra verici oranı ise ne yazık ki yıllar içinde gerilemektedir (Şekil 2.5). Canlı vericilerin büyük çoğunluğunu (% 48,8) alıcıların birinci derece akrabaları oluşturmaktadır. Verici olan eşler ve ikinci derece akrabaların oranları ise hemen hemen aynıdır (% 19 ve % 17,3) [13].



Şekil 2.4. Yıllara göre yapılan nakil sayıları (Türk Nefroloji Derneği, 2013)



Şekil 2.5. Türkiye’de yapılan böbrek nakillerinde kadaverik nakil oranı [13]

Transplantasyon hastalarının % 33'ünde primer etiyoloji bilinmemekle birlikte hipertansiyon (% 18), glomerülonefrit (% 14), piyelonefrit (% 9) ve diabetes mellitus (% 8) başlıca sebeplerdir (Şekil 2.3). Organ nakli öncesinde hastaların % 66'sında hemodiyaliz, % 9,9'unda periton diyalizi uygulanmış olup % 23,6'sı ise preemtif yani diyaliz başlamadan nakil olmuşlardır [13].

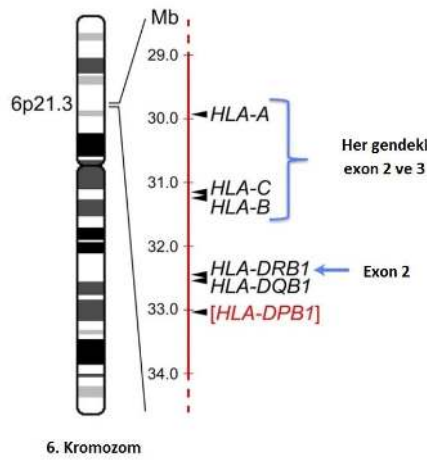
2.3. Transplantasyon İmmünolojisi

Nakil işlemi genetik olarak farklı, aynı türden bireyler arasında yapılıyorsa allojenik greft veya allogreft olarak adlandırılır. Genetik olarak identik bireyler (tek yumurta ikizleri) arasında ise sinjenik, bireyin kendisinden ise otolog ve farklı türler arasında ise zenojenik greft olarak sınıflandırılmıştır [15].

Nakli gerçekleştirilen organa gösterilen immün tepki 3 aşamada incelenebilir;

- 1) Yabancı antijenlerin tanınması
- 2) Antijen-spesifik lenfositlerin aktivasyonu
- 3) Graft rejeksiyonunun etkili fazı [15]

İmmün sistem temel olarak kendinden olan ve olmayan antijenleri tanıma kapasitesine sahiptir. Allogreftte gösterdiği immün tepki ve nakledilen organı reddedebilme gibi güçlü bir kapasiteye sahip olması uzun bir süre şaşırtıcı olmuşsa da bu durum immün sistemin kendinden olmayana verdiği tepki dolayısıyla gerçekleşmektedir. İnbred farelerde yapılan greft kabulü ve rejeksiyonu çalışmaları, rejeksiyonun basit Mendel kalıtım kuralları ile kontrol edildiğini göstermiştir. Bu olaydan sorumlu olan genler 6. kromozomun kısa kolu üzerinde taşınan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) genleridir (Şekil 2.6). Primer immün yanıt oluşturabilen en güçlü antijenler olan MHC hücre yüzey proteinlerini kodlarlar. İnsanlarda tek yumurta ikizleri arasındaki sinjenik greftler kabul edilir çünkü alıcı ve donör aynı MHC moleküllerine sahiptir. Ancak alıcı ve donör arasında MHC antijenlerinde fark olduğu durumda allojenik greft reddedilecektir. 1980'lerin sonunda ve 1990'larda immünsüpresif stratejilerin geliştirilmesi akut rejeksiyonun önemli ölçüde düşürülebildiğini göstermiştir [16].



Şekil 2.6. 6. Kromozom üzerinde HLA lokusu [17]

T hücre antijen reseptörleri öncelikli olarak MHC moleküllerine bağlanmış olan peptidleri tanırlar. Dolayısıyla T hücre aktivasyonu kritik olarak MHC moleküllerine bağlıdır. MHC molekülleri 3 sınıf altında incelenir; Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III. İnsanlarda MHC genleri HLA (human leukocyte antigen) genleri olarak adlandırılır. Sınıf I MHC genleri tüm çekirdekli hücrelerde bulunan HLA-A, HLA-B ve HLA-C; sınıf II MHC genleri antijen sunan hücrelerde (APC- antigen presenting cells); makrofajlar, dendritik hücreler ve B lenfositlerde bulunan HLA-DP, HLA-DQ ve HLA-DR'dir [15].

MHC genlerinin en önemli özelliklerinden bir tanesi polimorfik yapıda bulunmalarıdır. Her MHC lokusundan HLA-A1, HLA-A2 gibi yüzlerce farklı molekül kodlanabilir. Bu şekilde her bireyden farklı moleküllerin ekspresyonu sağlanır. MHC genlerinin bir diğer özelliği de kodominant ekspresyon özelliğidir ki bir MHC genotipinde toplam 12 farklı MHC molekülünün olmasını sağlamaktadır. Bu polimorfik yapı, evrimsel süreçte MHC moleküllerinin geniş bir yelpazede mikrobiyal peptidlere bağlanabilmelerine, bunları T hücrelerine sunmalarına ve başarılı bir şekilde immün tepkinin ortaya çıkmasına olanak sağlamıştır [15].

Antijenlerin küçük peptid parçalarına ayrışması ve bu parçaların MHC moleküllerine bağlanması antijen işlenmesi olarak adlandırılır. Sınıf I MHC molekülleri hücrede sentezlenen endojen peptidlere bağlanırken, sınıf II MHC molekülleri hücreye dışardan alınan proteinlerin parçalanması sonucu ortaya çıkan peptid parçalarına bağlanır. MHC molekülleri ile sunulan peptidler T hücreler üzerindeki T hücre reseptörleri tarafından tanınırlar. Antijen sunan hücrelerden dendritik hücreler, T hücrelerinin uyarılmasında en etkili olan hücrelerdir [18].

2.3.1. Alıcı ve Donörde Doku Uyumu ve Crossmatch (Çapraz Uyum)

MHC moleküllerinde görülen aynı polimorfizm, başarılı bir organ nakli için bir engel teşkil etmektedir. Allograft donör ve alıcı arasındaki MHC uyum oranı organ naklinin başarısı konusunda önemli bir rol oynamaktadır. Organ nakli için en önemli MHC genleri HLA-A, HLA-B ve HLA-DR'dir. Çünkü bu lokuslarda görülen uyumsuzlukların rejeksiyon üzerinde daha büyük etkisi olduğu görülmüştür [15]. HLA-B ve -DR kısa süreli (1yıl), HLA-A uyumu da uzun süreli greft ömrü üzerinde belirleyici durumdadır. Tüm antijenlerin uyumlu olduğu durum (0 HLA mismatch) kısa ve uzun süreli greft ömrünün en uzun olduğu durum olarak kabul edilmektedir [19].

Panel reaktif antikor (PRA) olarak adlandırılan HLA antijenlerine karşı oluşturulan antikorlar, kan transfüzyonları, gebelik, otoimmün hastalıklar ve daha önce rejeksiyona uğramış böbrek grefti sebebiyle görülmektedir. Alıcıda, donörün HLA'sına karşı sensitizasyon artması pozitif crossmatch demektir ve hiperakut rejeksiyonla sonuçlanmaktadır. Sınıf I HLA antikorlar için donörden alınan örneklerden elde edilen T hücrelerinin, Sınıf II HLA antikorları için de B hücrelerinin crossmatch sonuçları önemlidir [19].

2.3.2. Alıcı ve Donörde ABO Kan Grubu Uyumu

Böbrekte Rh antijen ekspresyonu yoktur. Bu sebeple alıcı ve donör arasında Rh uyumu aranmaz. A ve B kan grubu antijenleri ise böbrek vasküler endotelinde bulunmaktadır. ABO uyumu görülmeyen nakillerde A ve B gruplarına karşı geliştirilen antikorların vasküler endotel hücrelere bağlanmasıyla iskemik nekroz ortaya çıkar. Nakil öncesinde çeşitli uygulamalarla başarı elde edildiği gösterilmişse de ABO uyumsuz nakillerde hiperakut rejeksiyon riski fazladır [19].

2.3.3. Organ Naklinde Tolerans

Tolerans, spesifik antijenlere immün tepki gösterilmemesi durumudur. Kendinden olan antijenleri tanıyarak otoimmün hastalıkların önlenmesi sağlanır. Organ naklinde tolerans, grefte yıkıcı bir immün tepki gösterilmemesidir. Organ nakli alıcıları için temel amaç toleransın sağlanması ve hastaların immünsüpresiflerin uzun süreli toksik etkilerinden kurtulmalarıdır.

Toleransın sağlanmadığı durumlarda global bir immünsüpresyon uygulanmalıdır. Bu da alıcıları enfeksiyonlara ve malignansilere açık duruma getirmektedir. Son yıllarda toleransın sağlanması için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Alıcının immün sisteminin baskılanması ve sonrasında alıcı ve donörün kemik iliği nakilleri ile rejeksiyona sebep olmayan kimerik bir immün sistem oluşturulmaktadır. İmmünsüpresiflerin tamamen kesildiği başarılı olgular görülmüştür [15].

2.3.4. Organ Rejeksiyonu

Organ naklinden sonra görülen en önemli sorunlar organ rejeksiyonu yani alıcının nakli gerçekleştirilen organı reddetmesi ve orijinal hastalığın tekrar etmesidir. Ortaya çıktığı zamana göre hiperakut, akut ve kronik rejeksiyon olarak adlandırılır.

Hiperakut rejeksiyon vericinin endotel antijenine karşı önceden var olan antikorlar aracılığı ile başlatılır. Akut rejeksiyon CD4⁺ and CD8⁺ T hücrelerinin alloantijenlere karşı verdiği tepki ile gerçekleşir. T-helper hücreleri inflamasyonun başlamasını tetiklerken sitotoksik T hücreleri greft hücrelerinin parçalanmasını indükler. Kronik rejeksiyon aylar veya yıllar sürebilir. Hücre aracılı veya antikor aracılı olarak ortaya çıkabilir. Kronik rejeksiyonun en belirgin özelliği damar duvarı kalınlaşmasıdır ve zamanla tıkanabilir [20].

2.4. Organ Naklinde Kullanılan İmmünsüpresifler

Organ naklinin kalıcı olabilmesi için immünsüpresif tedaviye ihtiyaç vardır. Akut rejeksiyonun önlenmesi ve greft fonksiyonu kaybının engellenmesi için transplantasyon gerçekleştirilen hastalara immünsüpresif tedavi uygulanmaktadır. İmmünsüpresif rejimi hastaların özelliklerine göre seçilmektedir.

İmmünsüpresif ilaç kullanımından önceki başarısızlıklardan sonra yeni immünsüpresan ilaçlar geliştirilmesiyle birlikte solid organ nakli son 70 yılda en iyi meyvelerini verdiği döneme girmiştir. Bu büyük gelişme, immün sistem fonksiyonlarının altında yatan mekanizmaların çözülmesiyle sağlanmıştır ve daha az toksik immünsüpresanların geliştirilmesine fırsat tanımıştır [21].

2.4.1. Kortikostereoidler

Steroidler immünsüpresyonda ilk kullanılan ilaçlardır ve immünsüpresyonun önemli bir basamağını teşkil ederler. Stereoidler antiinflamatuvar özelliğe sahiptir ve antijen sunumunu inhibe ederler. Glukokortikoidlerin T hücre aktivasyonunu bloke ettikleri, gen ekspresyonunu bloke ettikleri ve kalsineürin bağımlı T hücre aktivasyonunu inhibe ettikleri gösterilmiştir. Ayrıca kortikostereoidlerin IL-2 ve IL-6 kostimülatör aktiviteyi baskıladığı bilinmektedir. Kortikostereoidlerin bilinen yan etkilerinden bazıları Cushingoid yüz görünümü, enfeksiyonlara yatkınlık, büyüme geriliği, osteoporoz, glukoz intoleransı ve hipertansiyondur [22].

2.4.2. Siklosporin A

1980'lerin başında klinik olarak kullanımı başlayan siklosporin fungal orijinli lipofilik siklik bir polipeptittir. Hücre içi immünofilin reseptörü olan siklofiline bağlanmasıyla immünosüpresif etkisi başlar ve oluşan bu kompleksle fonksiyonu IL-2 transkripsiyonunu aktive etmek olan kalsineürine bağlanıp fosfataz aktivitesini inhibe eder. Siklosporin, T hücrelerinin ürettiği IL-3, IL-4, IFN- γ ve TNF- α gibi lenfokin ekspresyonlarını da inhibe etmektedir. 1990'lı yılların sonuna kadar steroidler ve azatioprin ile birlikte kullanılarak immünosüpresyonda altın standart olarak görülmüştü. Siklosporinin başlıca yan etkisi nefrotoksisite olmak üzere hipertansiyon, hepatotoksisite, nörotoksisite, lenfoproliferatif hastalıklar ve hiperürisemi hastalarda görülen diğer komplikasyonlardır. Fazla sayıdaki yan etkilerinin yanı sıra siklosporinin, steroidlerin osteopenik etkilerini önlediği bilinmektedir. Hastalarda mümkün olduğu kadar düşük dozlarda kullanımının devam ettirilmesi önerilmektedir [22, 23].

2.4.3. Azatioprin

6-merkaptopürinin nitroimidazol derivativesidir. Hem DNA hem RNA sentezini inhibe ederek hücre proliferasyonunu engeller. Steroidlerden sonra kullanıma girmiştir ve birlikte kullanımları ile % 65 oranında 1 yıllık greft sağkalımı görülmüştür. Lenfosit proliferasyonunu önlemesi antijen stümülasyonu sonrasında gerçekleştiği için ilaç kullanımına transplantasyon öncesinde başlamanın bir yararı olmadığı düşünülmektedir. İlacın yan etkileri lökopeni, trombositopeni, hepatit, pankreatit, ateş ve seyrek olarak deri döküntüleridir [22, 23].

2.4.4. MMF

Mikofenolat mofetil karaciğerde mikofenolik aside dönüşerek GTP ve dGTP biyosentezinde görevli olan inozin monofosfat dehidrogenaz enzimini inhibe eder. Bu enzim yeni pürin yapımında rol almaktadır. Enzimin inhibe edilmesiyle T ve B lenfositlerin proliferasyonu baskılanır. Mikofenolik asit aynı zamanda monositlerin proliferasyonunu da inhibe eder ve farklılaşmalarını hızlandırır. Monositlerin IL-1 ve IL-6 üretimi azalır. Enzim karaciğerde metabolize edilir ve yarı ömrü yaklaşık 18 saattir. Başlıca yan etkileri iştahsızlık, bulantı, özofajit, diyare, gastrit ve kemik iliği süpresyonudur [22, 23].

2.4.5. TOR İnhibitörleri

Son yıllarda kullanılmaya başlanmış, oldukça etkili bir ilaç olan Sirolimus ve Everolimus bu grupta yer almaktadır. Rapamycin olarak da bilinen Sirolimus 70-kd S6 kinaz aktivasyonu ile protein sentezini önler. CD28/B7 kostimülatör yolla etkilenir ve G0-G1 fazında T hücre aktivasyonu blokajı gerçekleşir. Etkilenen diğer hücreler B hücreleri, endotel hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlardır. İmmünofiline (FKBP-12) bağlanarak IL-2, IL-4, IL-7 ve IL-15'i inhibe ettikleri bilinmektedir. Rapamisin'in yan etkileri trombositopeni, lökopeni, hiperlipidemi ve bazen diyaredir. Everolimus 2010 yılında FDA onayı almış bir Sirolimus varyantıdır. [22].

2.4.6. FK-506 (Takrolimus)

Siklosporinin yan etkilerinin görülmesinden sonra ortaya çıkarılmıştır ve ilk defa 1989 yılında kullanıma girmiştir. FK506 bağlayıcı proteine bağlanarak yine bir kalsineürin inhibitörü olan bir kompleks oluşturur. Bu kompleks T hücre reseptör sinyal aktarımını inhibe ederek etki gösterir ve IL-2 üretimi baskılanır. G0 ve G1 fazında etkili olmaktadır. Takrolimus % 25 oranında emilir ve yarı ömrü 8-9 saat kadardır. Karaciğerde CYP450-3A4 enzimi ile metabolize edilir. Takrolimus kullanımında diabetes mellitus görülme riski daha fazladır. Siklosporine kıyasla nörotoksik yan etkileri daha fazladır. Buna bağlı olarak baş ağrısı, konfüzyon, epilepsi, ansefalopati, uyku bozuklukları ve parestezi görülebilir [22, 23].

2.4.7. Poliklonal İmmünglobulinler

İnsan lenfositlerinin at veya tavşanlara enjeksiyonu sonrası anti-human poliklonal antikorlar elde edilmiştir. 1967 yılında Starzl'ın atlardan elde ettiği antikorlar kullanılmıştır. Anti lenfosit globulinlerin (ALG) elde edilmesi için lenfositler, anti timosit globulinlerin (ATG) elde edilmesi için de timositler kültür edilir. Lenfositlerin çoğu B lenfosit olduğu için ALG, ATG'ye kıyasla bir dezavantaja sahiptir. Poliklonal immünoglobulinler kompleman yolu üzerinden toplam lenfosit sayısını düşürerek immünsüpresif etki gösterirler [22].

İlk birkaç doz ATG uygulanmasından sonra ateş ve titreme, deri döküntüleri, hipotansiyon, akut solunum sıkıntısı ve anafilaksi gelişimi başlıca yan etkileridir. Poliklonal antikorlar ile immünitinin ciddi olarak baskılanması sonucu fırsatçı enfeksiyon görülme riski ve lenfoproliferatif hastalıkların gelişme riski artmaktadır [23].

2.4.8. Anti-CD3 Monoklonal Antikorlar

CD3'ün ϵ zincirine karşı oluşturulmuş mürin monoklonal antikorları kullanılmaktadır. Bu antikorlar CD3+ T hücrelerinin temizlenmesini sağlamaktadır. Kullanımda olan tek ilaç OKT3'tür ve ilk kullanımda ilk doz sendromu gerçekleşebilir. Sitokin salınım sendromuna sebep olur ve başta TNF- α aracılığıyla üşüme, titreme, baş ağrısı, bulantı, kusma, hipertansiyon gibi belirtiler ortaya çıkabildiği gibi böbrek fonksiyon bozuklukları da görülebilir. Geç ortaya çıkan yan etkileri ise serum hastalığı, herpes virüs, aseptik menenjit, CMV enfeksiyonu ve non-Hodgkin lenfoma'dır [22].

2.4.9. Antiinterlökin-2 Reseptör Antikorları

Bu ilaç grubu rejeksiyon profilaksisinde kullanılmaktadır. Aktif T hücrelerinin IL-2 reseptörlerini bloklayarak etki gösterirler. Kullanımda olan iki ilaç simulect ve zenapax'tır ve ATG'ye kıyasla yan etkilerinin daha az olduğu görülmüştür. Yarı ömürleri oldukça uzundur ve enfeksiyon ve lenfoproliferatif hastalıklar görülme riskini artırmamışlardır [22].

2.5. Transplantasyon Alanında Biyobelirteçler

Son on yılda transplantasyon alanında özellikle ileri cerrahi teknikler ve daha etkili immünsüpresan tedavileriyle ilgili önemli gelişmeler yaşanmıştır. Ancak ne yazık ki kısa dönem sonuçlar, uzun dönem sağkalım sonuçları hakkında fikir vermemektedir. Bu durum, greftin fonksiyonunu görüntülemek için kullanılabilecek altın bir standardın olmayışından kaynaklanabilir. İmmüntenin baskılanması, immünolojik ve immünolojik olmayan yan etkilerinin yanı sıra, rejeksiyon oranı ve kronik allogreft disfonksiyonu arasındaki hassas dengenin korunması gerektiğinden zorlu bir durum ortaya çıkarmaktadır [3].

Günümüzde akut rejeksiyon, hastalık tekrarı ve ilaç toksisitesi gibi durumların teşhisi için allogreft biyopsisi altın standardı oluşturmaktadır. Örnekleme hatası veya patolog raporları arasındaki farklılıklar sebebiyle allogreft biyopsileri genellikle subjektif veriler sunmaktadır. Ayrıca, iyi tanımlanmış uç noktaların yokluğu, kısa takip süreleri ve yeterince güçlü olmayan çalışmaların, klinik transplantasyon alanında biyobelirteç kullanımında görülen başarı eksikliği ile ilişkili olduğu söylenebilir [3].

Organ nakli gerçekleştirilen hastalarda bireye özgü tedavi uygulayabilmek, moleküler değişikliklerin kliniğe yansımadan ortaya çıkarılması, erken teşhis, tedavi yanıtı ve greftin akıbeti hakkında bilgi sahibi olabilmek için özellikle invaziv olmayan yöntemler kullanılarak biyobelirteç arayışları sürmektedir. Hastalıkların moleküler mekanizmalarının genomik ve proteomik teknolojileri sayesinde açığa çıkarılması sayesinde teşhis ve tedavi amaçlı genomik temelli yeni stratejiler geliştirilmiştir [3].

Son dönemde karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp transplantasyonları için yaygın olarak çalışılan potansiyel biyobelirteçler kemokinler ve sitokinlerdir. Bu moleküller akut rejeksiyon sırasında immün sistemde görevli hücrelerin farklılaşması, hareketleri ve çoğalmalarını sağlar. Serum kreatinin veya proteinüri ve kandaki immünsüpresan düzeylerinin kullanılmasıyla indirekt alloimmün tepki ölçümleri, günümüzde dünya çapında böbrek nakillerinde kullanılan belirteçlerdir. Rejeksiyon riski olan veya nakledilen böbreği kabul etmeye uygun veya immünsüpresan tedavisinin güvenli bir şekilde minimize edilebileceği hastaların belirlenmesi için farklı biyolojik seviyeler gösterebilecek yeni biyobelirteçlere ihtiyaç olduğu aşıkardır [24].

Hayvan deneyleri sonucu elde edilen biyobelirteçlerin insanlarda kullanımının mümkün olmasına karşın, farklı biyolojik mekanizmalara sahip olmaları sebebiyle çok az sayıda biyobelirteç tanımlanmıştır. Farelerde çok düşük miktarlardaki immünsüpresan kullanımı ile bile greftin kalıcı olarak kabul edilmesinin sağlanması nispeten kolaydır [24].

Pek çok çalışmada; organ nakli sonrası greftin kabul edilmesi (tolerans) ya da rejeksiyon gerçekleşmesi durumlarında bazı genlerin ekspresyon seviyelerindeki belirgin değişiklikler periferik kan veya doku örneklerinde gösterilmiştir. Tolerance associated gene-1, mitokondriyel protein T-hücre apoptoz (*TOAG-1*) ve a-1,2-mannosidase genlerinin böbrek ve kalp transplantasyon sıçan modelinde, periferik kanda ve greftte akut ve kronik rejeksiyon öncesinde ve rejeksiyon boyunca regülasyonunun azaltıldığı (down-regüle edildiği); greft kabulünde ise yüksek oranda ekspresyonunun görüldüğü belirtilmiştir [25].

Hayvan modellerinde greft kabulünde Treg'lerin potansiyel biyobelirteç olduğu gösterilmiştir. Kendiliğinden uzun süreli greft kabulü gösteren böbrek nakli yapılmış fare modelinde, greftlerde yüksek oranda FoxP3+ Treg'lere rastlanmıştır [26].

Tolerans veya rejeksiyon için kullanılacak olan biyobelirteçlerin arayışı farklı biyolojik seviyelere odaklanmış durumdadır. Serum, periferik kandaki mononükleer hücreler, idrar ve biyopsi materyalleri farklı teknikler kullanılarak incelenmektedir [24]. İmmün sistemde etkili olan her molekülün transplantasyon ile ilişkisi olması yüksek ihtimal dahilindedir. Bu moleküller hedef ve aday moleküller olabilir. Son yıllarda yoğun olarak çalışılan mikroRNA'lar da bu aday moleküller arasındaki önemli yerini almıştır.

2.6. mikroRNA'lar ve mikroRNA Biyogenezi

Son dönem çalışmalar hastalıkların teşhisi ve takibinde potansiyel bir belirteç olan mikroRNA'lar (miRNA) üzerinde odaklanmıştır.

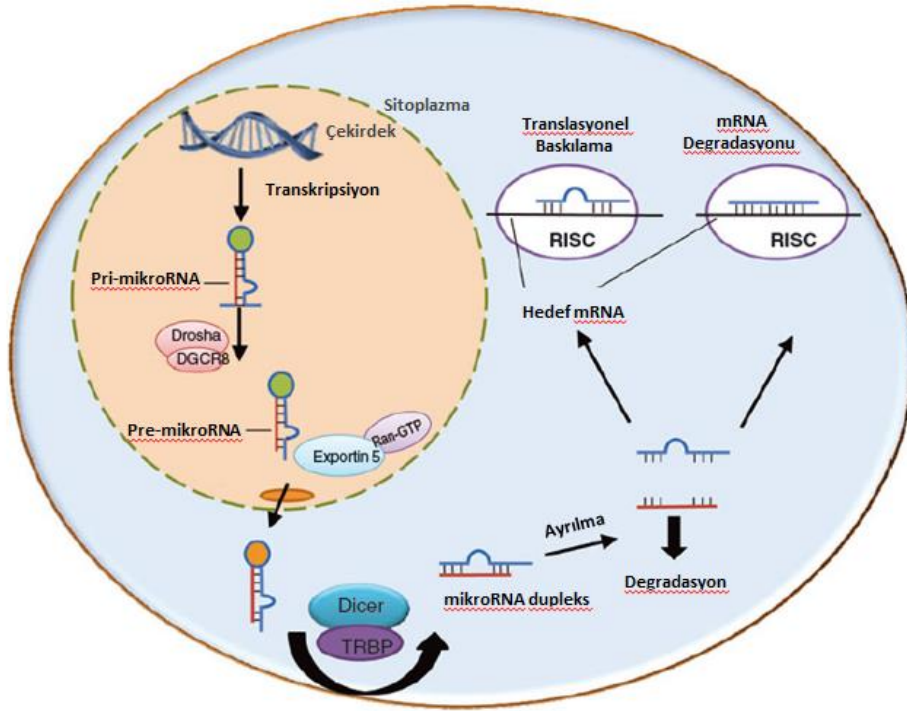
miRNA'lar 1993 yılında nematod *C.elegans*'ta keşfedilmiştir [27, 28]. Temel görevleri post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonlarını düzenlemeleridir. miRNA'lar hücre döngüsü, hücre farklılaşması, immün tepki, apoptoz gibi hücrel olaylarda genlerin ifade edilmesinde rol oynamaktadır. İmmün tepki için gerekli olan inflamasyon, T ve B hücre farklılaşması ve sinyal mekanizmalarını düzenledikleri bilinmektedir. miRNA'lar yüksek oranda korunmuş DNA bölgelerinden kodlanan ve proteine translasyonu gerçekleşmeyen (non-coding) 20-22 nükleotit uzunluğunda küçük regülatör RNA molekülleridir. Bu moleküller hedefleri olan mRNA'lara bağlanarak translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı sonucu gen ekspresyonunun kontrolünü sağlarlar. Böbrek hastalıkları da dahil olmak üzere çok sayıda hastalığın patofizyolojisiyle ilişkili oldukları bulunmuştur [2, 29].

miRNA biyogenezi çekirdekte ve sitoplazmada olmak üzere iki basamakta gerçekleşir (Şekil 2.7). Bu basamaklarda özelleşmiş moleküller görev yapmaktadır. miRNA'ların transkripsiyonları genomik DNA üzerinden, genellikle RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilir. Primer transkript olan 5'cap ve poli A kuyruklarına sahip pri-miRNA, RNaz III ailesinden Drosha enzimi ve kofaktörü Pasha (DGCR8)'dan oluşan mikroprosesör kompleks tarafından kesilerek 60-70 nükleotitlik stem-loop içeren öncü miRNA elde edilir (pre-miRNA). DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) çift iplikli RNA bağlayıcı bir proteindir. Bazı miRNA'ların Drosha-DGCR8 basamağını atlayarak, çok kısa intronlardan splicing ile oluştuğu bilinmektedir. Pre-miRNA çekirdek membranında bulunan

Exportin5 aracılığıyla enerji bağımlı olarak çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Bu aşamada GTP (RanGTP) kullanılmaktadır [3, 29, 30].

Sitoplazmaya geçen pre-miRNA, Dicer-TRBP (transaktivasyon-sorumlu (TAR) RNA bağlayıcı protein) ile katalizlenir ve yine RNaz III ailesinden bir enzim olan Dicer tarafından yaklaşık 22 nükleotitlik bir dupleks oluşturacak şekilde kesilir. Oluşan bu dupleks molekül hem olgun miRNA'yı hem de antisens miRNA'yı içermektedir. Kılavuz miRNA olarak adlandırılan bir zincir RISC (RNA-induced silencing complex)'e yüklenir ve miRISC veya miRNPs (miRibonükleoprotein) olarak adlandırılır. RISC, 5' ucu daha kararlı olan zincir seçimini sağlayan katalitik komponent olan Argonaute (Ago) proteinini de içermektedir. Anti-kılavuz veya antisens miRNA ipliği ise serbest kaldıktan sonra sindirilir. miRNA RISC'i, baz eşleşmesi sayesinde tanıdığı, hedefi olan mRNA'nın 3' UTR bölgesine yönlendirir. miRNA ve mRNA arasındaki bu tanıma olayı miRNA'nın 5' ucundaki 6-8 nükleotitlik seed bölgesi ile kurulan mükemmel eşleşme sayesinde gerçekleşir. miRNA-mRNA etkileşimi sonrasında hedef mRNA'nın protein ekspresyonu translasyonel baskılama, mRNA degradasyonu veya uncapping ve deadenilasyon ile hızlandırılan mRNA decay'i sonucu gerçekleşebilir [3, 29, 30].

miRNA ve mRNA arasında mükemmel veya mükemmele yakın bir dizi komplementasyonu olması durumunda RISC kompleksinde bulunan Ago proteinini hedef mRNA'nın degradasyonunu sağlar. Mükemmel bir eşleşme olmadığı durumlarda ise yine Ago'nun etkisi ile ribozom mRNA'ya bağlanamaz ve hedef molekülün translasyonu baskılanmış olur. miRNA'nın maturasyonu sırasında görev yapan bu moleküller etkin miRNA aktivasyonu için hatasız iş görmek zorundadır [3, 29].



Şekil 2.7. miRNA biyogenezi [3]

2.7. Böbrek Naklinde miRNA'lar

miRNA'ların varlığı kan, serum ve idrar gibi sıvılarda tespit edilmiştir. Dolaşımda bulunan bu miRNA'lar hasta bireylerde ve sağlıklı bireylerde farklılık göstermektedir. Dolaşımdaki miRNA'ların invaziv olmayan yollarla elde edilebilmeleri, hastalıklara özgün olmaları ve incelenmeleri için uygun tekniklerin varlığı, bu moleküllerin transplantasyon alanı için uygun biyobelirteçler olmasını sağlamaktadır. miRNA'lar bu alanda çeşitli uygulamalarda kullanılmak üzere uygun hedef moleküller olarak karşımıza çıkar. Allograft hasarı ve fonksiyon tespiti için mükemmel biyobelirteçler olarak kullanılabilirler. Hücresel ve immünolojik olaylarda rol aldıkları temel görevler sebebiyle miRNA'lar organ rejeksiyonunda ya da toleransın gelişmesinde de etkili olan moleküllerdir [3].

Organ nakli hastalarında miRNA ekspresyon profillerini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Böbrek nakli hastalarında akut rejeksiyon sonrası miRNA ekspresyon profilleri çıkarılmıştır. Sağlıklı bireylerin profilleriyle karşılaştırıldığında 20 adet miRNA ekspresyonunda farklılık olduğunu ve bu moleküllerin akut rejeksiyonun önceden tahmininde veya tedavisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir [4]. Böbrek nakli sonrası allograftlardan alınan biyopsi örneklerinde ekspresyon seviyeleri değişen miRNA'ların rejeksiyonun tanısı ve önceden tahmini için belirleyici moleküller olabilecekleri gösterilmiştir. Bunlardan bazılarının T ve B hücre reseptörleri olan CD3 ve CD20 mRNA düzeyleriyle korelasyon gösterdikleri gözlenmiştir [5]. Periferik kandan elde edilen mononükleer hücrelerdeki miRNA ekspresyon değişimleri incelenerek miR-142-5p yine böbrek nakli hastalarında rejeksiyon olayıyla ilişkilendirilmiş ve biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [6]. miR-155'in allograftın immünitesini düzenlediği ve baskılanması durumunda rejeksiyonun önlenmesi için potansiyel bir terapötik ajan olduğu öne sürülmüştür [7]. Wilflingseder ve diğerleri farklı rejeksiyon türlerinde farklı miRNA profilleri olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla rejeksiyon çeşitlerinin ayırt edilebilmesi için de miRNA'ların potansiyel terapötik moleküller olduğunu öne sürmüşlerdir [31].

2.8. miRNA ve miRNA Biyogenez Komponentlerinin İmmün Sistemle İlişkileri

miRNA'ların immünolojik fonksiyon regülasyonunda ve otoimmünitenin önlenmesinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Yakın bir zamanda miRNA'ların primer immün trombositopenideki (ITP) rollerini göstermek üzere periferik kandaki mononükleer hücrelerdeki miRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve miR-409-3p ekspresyonunun düşük olduğu ve azalmanın miRNA biyogenezinde görevli DGCR8 ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Biyoinformatik incelemelerle şaşırtıcı bir şekilde miR-409-3p'nin hedef molekülünün INF- γ olduğu tespit edilmiştir [32]. 2008 yılında regülatör T hücre aracılı toleransın Dicer tarafından kontrol edilen miRNA yolağına bağlı olduğu, miRNA'ların inflamatuvar şartlarda Treg hücrelerinin fonksiyonelliklerini korudukları [9] ve 2009 yılında invaryant NK (natural killer) T hücrelerinin Dicer olmadan efektör farklılaşmalarını tamamlayamadıkları ve artan hücre ölümüyle beraber homeostazinin bozulduğu gösterilmiştir [8]. 2010 yılında ise CD8+ T hücrelerinin aktivasyon, migrasyon ve

sağkalımlarının Dicer bağımlı olduğu Dicer yoksun hücrelerde ortaya koyulmuştur [33]. Görüldüğü gibi bu moleküller immün sistemin hemen her basamağında rol oynayan ve ekspresyonlarındaki ufak bir değişimle bile immün sisteme dayalı hastalıklarda etkili olan moleküllerdir.

miRNA ve miRNA biyogenez komponentlerinin ekspresyon değişimleri incelenerek özellikle kanserde olmak üzere çok yoğun çalışmalar yapılmıştır. Over kanserinde Dicer ve Drosha'nın mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonlarında azalma görülmüştür. Dicer ve Drosha'daki düşük ekspresyon düzeyleri kanser aşamaları ile ekspresyonlardaki artış ise sağkalım süresinin artışı ile ilişkili bulunmuştur. Bunların yanı sıra Dicer ve Drosha genlerinde yanlış anlamli mutasyonlara rastlanmış ancak bu mutasyonlar ile ekspresyon seviyeleri arasında bir korelasyon bulunamamıştır [34]. Kanser hücrelerinde Exportin5'teki genetik bir bozukluğun, öncü miRNA'ların hücre çekirdeğinde birikmesiyle sonuçlandığı bildirilmiştir. Exportin5'te insersiyon sonucu ortaya çıkan çerçeve kayması mutasyonu, C-terminal bölgenin eksikliğine sebep olmaktadır. Pre-miRNA/Exportin5/RanGTP kompleksinin oluşmasını önleyen bu durum pre-miRNA'ların birikimine sebep olur. Bu hücrelerde normal Exportin5 ekspresyonu sağlandığında ise taşıma işlemi gerçekleşmiş ve tümör süpresör etkisinin olduğu ortaya çıkarılmıştır [35].

miRNA biyogenez komponentlerinin organ nakliyle olan ilişkisi henüz gösterilmemiştir. İmmün sistemdeki etkileri dolayısıyla miRNA'lar ve miRNA biyogenezinde iş gören komponentler transplantasyon alanında biyobelirteç olmaya aday moleküllerdir.

BİREYLER VE YÖNTEMLER

3.1. Böbrek Nakli Hastalarının Seçimi

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli Merkezi'ne böbrek nakli için başvuran, canlı vericiden ilk kez böbrek nakli olan 18-60 yaş arası 16 hasta seçildi. Hastalardan rutin olarak nakil öncesinde ve sonrasında takipleri için kan örnekleri alınmaktadır. Hastaların nakil öncesinde, herhangi bir ilaç uygulanmadan alınan pre-op kanları kontrol grubunu, 3. ay örnekleri de immünsüpresan uygulanan post-op grubunu oluşturdu. Çalışmanın başında 23 hastanın pre-op kontrol kan örnekleri çalışılmış ve lizat kaliteleri iyi olmayan hastaların ve rutin kontrollerine başka merkezlerde devam eden hastaların 3. ay takip kan örnekleri alınmadı.

3.2. Periferik Kandan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu

PKMH izolasyonu için heparinli tüpte alınan kan örnekleri kullanılmıştır. 1X steril PBS (phosphate buffered saline) (mM; 137 NaCl (Merck), 2,7 KCl (Sigma), 10 Na₂HPO₄.2H₂O (Merck), 1,8 KH₂PO₄ (Merck)) ile 1:1 oranında seyreltilen yaklaşık 5 ml kan, 3 ml Biocoll (Biocoll Separating Solution, 1077, Biochrom AG) üzerine cam pastör pipet ile yavaşça bırakıldı. 1600 rpm'de 25°C'de 30 dakika (acceleration/deceleration:3/3) santrifüj edildi. Dansite gradienti oluşturan Biocoll sayesinde kandaki hücreler katmanlar halinde ayrıldılar. Bulutsu kısımda bulunan mononükleer hücreler cam pastör pipetle alındı ve yeni tüpe aktarıldı. Steril 1X PBS ile 10 ml'ye tamamlandı ve alt-üst ederek karıştırıldı. 2000 rpm'de 25°C'de 10 dakika (accel/decel:7/3) santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırılarak pellet 1X PBS ile çözüldü ve 10 ml'ye tamamlanarak tekrar santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırılarak 1X PBS'le yıkama işlemi tekrarlandı. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra PKMH'lerden oluşan pellet elde edildi ve doğrudan protein eldesi için kullanıldı.

3.3. PKMH'lerden Protein Eldesi

200 µl TRX-100 tampon (mM; 50 Hepes, 100 NaF, 150 NaCl, 1 MgCl₂, 1 EGTA, 1 NaOVan, %10 (v/v) gliserol, %1,2 (v/v) Triton X-100, proteaz inhibitörü (Roche) pH:7.0) ile PKMH'lerden oluşan pellet pipetaj yaparak çözüldü, santrifüj tüpüne alındı ve vortexlenerek hücreler iyice parçalandı. Hücrelerin daha iyi parçalanmasını sağlamak için -80°C'de donduruldu ve buz üzerinde çözündürüldü. Hücre membran parçalarını uzaklaştırmak amacıyla lizat 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Hücre içindeki proteinlerin bulunduğu supernatant kısmı yeni bir tüpe alındı ve -80°C'de saklandı.

3.4. Bradford Protein Miktar Tayini

Lizatlar -80°C'den çıkarılarak buz üzerinde yavaş yavaş çözündürüldü. 96-well plate içinde 3 tekrarlı olarak 0, 1, 3, 5, 7, 9 ve 11 µl 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) üzerine 100'er µl 1/5 oranında distile su ile seyreltilmiş Bradford Reagent (Biorad Protein Assay) hava kabarcığı oluşturmada eklendi. Tüm örneklerin 545 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü (Multiskan Spectrum, Thermo). Değerlerin ortalamaları alındıktan sonra BSA'sız kuyunun absorbans değeri diğer değerlerden çıkarıldı ve hesaplanan değerlerle bir kalibrasyon eğrisi elde edildi. 3 tekrarlı olarak 1'er µl PKMH lizatları koyulan kuyulara 100'er µl seyreltilmiş Bradford Reagent eklendi. 545 nm'de okunan değerlerin ortalaması, kalibrasyon eğrisi denklemindeki x yerine yazıldığında bulunan y değerleri protein konsantrasyonlarını vermektedir. Elde edilen lizatlar kullanılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı.

3.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Cam düzenekler alkolle temizlendikten sonra hazırlandı. Alt jel (resolving) ve üst jel (stacking) Tablo 3.1'de belirtilen şekilde hazırlandı. %10 APS (amonyum persülfat, AppliChem) her elektrofrezden önce taze olarak hazırlandı. TEMED (Tetramethylethylenediamine, Sigma-Aldrich) çeker ocak içinde eklendi. APS ve TEMED eklendikten sonra polimerizasyon başladığı için hızlı bir şekilde hava kabarcığı oluşturmada alt jel döküldü. Üst yüzeyi havayla temasını önlemek ve düz bir yüzey elde etmek için %1 SDS (w/v) (Sigma) ile kaplandı. Alt jel polimerleştikten sonra üst yüzeyde bulunan SDS uzaklaştırıldı. Alt jel üzerine üst jel döküldü ve kuyuları oluşturmak üzere jel içine 15 kuyuluk tarak yerleştirildi. Üst jel polimerleştikten sonra hemen kullanılmayacaksa su ile nemlendirip poşetlenerek +4°C'de bir gün süreyle saklandı.

Lizatlar yükleneceği zaman jel oda sıcaklığına getirildi, tarak çıkarıldı ve tank içine yerleştirildi. Tank yürütme tamponu (mM; 12 Tris-base (Fisher Scientific), 125 glisin (Vivantis), % 0,05 (w/v) SDS) ile dolduruldu. -80°C'den çıkarılıp buzda eritilen lizat örnekleri vortexlenerek karıştırıldı ve kısa bir santrifüjle cidarlarındaki örneklerin dibe inmesi sağlandı. Yeni bir tüp içine istenen miktarda lizat ile aynı hacimde 2X yükleme boyası (Sample Buffer, Laemmli, Sigma) karıştırıldı ve iyice vortexlendi. Kaynayan su içinde 5 dakika inkübe edildi ve buza alındı. Jel içindeki ilk kuyulara 7 µl protein büyüklük belirteci (10-250 kDa, Precision Plus Protein Dual Color Standards, Biorad) yüklenirken diğer kuyulara hazırlanan lizat örnekleri yüklendi. 1 saat 120 voltta, yaklaşık 5 saat 150 voltta örnekler yürütüldü. Elektrofrez sonunda lizat örneklerinin protein kalitesini ve ayrışmalarını gözlemlemek üzere jel boyandı veya Western Blot yöntemi ile işaretlemek üzere kullanıldı.

Boyanacak olan jelin üst kısmı kesilerek uzaklaştırıldıktan sonra coomassie blue boyama tamponu (% 0,1 (w/v) Coomassie Brilliant blue (Merck), % 20 (v/v) metanol (Merck), % 10 glasiyel asetik asit (Merck)) ile gece boyu muamele edildi. Boyama tamponu uzaklaştırıldı ve boya yıkama solüsyonu (% 50 (v/v) metanol, % 10 (v/v) glasiyel asetik asit) ile yaklaşık 3 saat 4-5 kez yıkandıktan sonra büyüklüklerine göre ayrılan proteinler görünür hale geldi.

Tablo 3.1. SDS-Poliakrilamid Jel İçerikleri

Alt (Resolving) Jel	% 10	% 7
Steril ddH ₂ O	11,55 ml	15 ml
Resolving Tamponu	7,5 ml	7,5 ml
Akrilamid/ Bisakrilamid (29:08)	10,5 ml	7,05 ml
% 10 SDS	300 µl	300 µl
APS	300 µl	300 µl
TEMED	30 µl	30 µl
Üst (Stacking) Jel		
Steril ddH ₂ O	3 ml	
Stacking Tamponu	1,25 ml	
Akrilamid/ Bisakrilamid (29:08)	625 µl	
% 10 SDS	50 µl	
APS	50 µl	
TEMED	5 µl	

3.6. Western Blot Yöntemi

Jelin büyüklüğüne uygun olarak PVDF membran (0,45 µm, Immobilon Millipore) kesildi ve 1 dakika metanolle muamele edildi. Süngerler, kağıtlar ve jel taze hazırlanan transfer tamponu (mM; 100 glisin, 120 tris-base, %10 metanol) içinde ısıtıldı. Büyük proteinlerle çalışıldığı için transfer tamponu geleneksel tampon solüsyonlarından farklı olarak hazırlandı. Metanol proteinlerden SDS'i uzaklaştırma özelliğine sahip olduğundan proteinlerin çökelti oluşturmalarını artırabilir. Transfer etkinliğini artırmak amacıyla tampon içindeki metanol yoğunluğu % 10'a düşürüldü.

Transfer cihazının katot ucundan başlayarak sırasıyla sünger, 2 kağıt (Whatman), jel, membran, 2 kağıt ve sünger aralarında hava kabarcığı kalmaması için her seferinde cam silindir çubukla üstünden geçilerek yerleştirildi.

% 7'lik jel çok yumuşak ve hassas olduğu için transfer tamponu ile ısıtılmadan dikkatli bir şekilde doğrudan kağıtların üzerine alındı. Transfer cihazı transfer tamponu ile dolduruldu ve buz içinde 70 voltta yaklaşık 16 saat boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi. Bu sayede gece boyu transferden daha etkin bir transfer sağlandı.

Transfer sonrası transfer işleminin gerçekleştiğini doğrulamak üzere jel coomassie blue solüsyonu ile boyandı. Membran ise Ponceau boyası (Sigma) ile yaklaşık 10 dakika boyunca inkübe edilerek protein bantları görünür hale getirildi. Transferin gerçekleştiği görüldükten sonra membran 1X PBS-T (1X PBS, % 0,1 (v/v) Tween-20 (Merck)) solüsyonu ile yaklaşık 15 dakika yıkanarak Ponceau boyası uzaklaştırıldı. Membran 1 dakika metanolde bekletildi ve % 1 BSA'lı (w/v) (1X PBS-T içinde) bloklama çözeltisi ile oda sıcaklığında 2 saat bloklandı. Bloklama çözeltisi uzaklaştırıldı. % 1 BSA (w/v) çözeltisi içinde 1/1000 oranında hazırlanan primer antikör (rabbit, Cell Signaling) ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Antikör

uzaklaştırıldı ve % 1 PBS-T ile 3 kez 15'er dakika yıkama yapıldı. % 1 BSA çözeltisi içinde 1/2000 oranında hazırlanan sekonder anti-rabbit antikor (KPL) ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Antikor uzaklaştırıldı ve 3 kez 15'er dakika % 1 PBS-T ile yıkama yapıldı. ECL (Clarity Western ECL Substrate, Biorad) solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı. Membran 5 dakika ECL ile muamele edildi ve karanlık odada membran üzerine film (Kodak) yerleştirildi. Kaset içinde yaklaşık yarım saat bekletildikten sonra film banyo cihazında (Konica Minolta) banyo edilerek görüntüleme gerçekleştirildi.

GAPDH işaretlemeleri için 1/10.000 GAPDH primer antikor (mouse, Santa Cruz) ile 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi. 3 kez 15'er dakika yıkama sonrası membran 1/7500 sekonder antikor (anti-mouse, KPL) ile 1 saat inkübe edildi. Aynı sürede yıkama işlemi sonrasında 1 dakika ECL inkübasyonu yapıldı ve görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.

3.7. Periferik Kandan RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, RT-PCR (reverse transkripsiyon-PCR) ve Real-time PCR aşamaları dahil olmak üzere RNA ile yapılan tüm çalışmalarda filtreli ve steril pipet uçları ve her zaman RNaz içermeyen su kullanıldı (RNase-free H₂O).

RNA izolasyonu için K₂ EDTA'lı tüp içindeki kan örneği alındıktan sonra birkaç saat içinde kullanıldı. Kandan RNA izolasyon kiti kullanılarak işlem gerçekleştirildi (QIAamp RNA Blood Mini Kit, Qiagen). 3 ml kan 15 ml'lik bir tüpe alındı ve eritrosit lizis (EL) tampon çözeltisi ile 15 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi ve yaklaşık 5 dakikada bir alt üst ederek karışması sağlandı. 4000 rpm'de 4°C'de 10 dakika (accel/decel:7/3) santrifüj edildi. Supernatant döküldü ve 750 µl EL ile pellet çözülür ve santrifüj tüpüne alındı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve pellet 1ml steril 1X PBS ile çözülür. 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. PBS'le yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı. Tüp ters çevrilerek supernatant döküldü. Tüpün dibinde kalan yaklaşık 50 µl PBS ile lenfositlerin bulunduğu pellet iyice çözülür ve % 1 β-mercaptaethanol (v/v) ilave edilmiş 350 µl RLT tampon çözeltisi ile pipetaj yaparak iyice karıştırıldı. Tüm lizat ilk kolona (QIAshredder) yüklendi. 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon atıldı ve alta geçen filtrat üzerine 400 µl %70 etanol ilave edildi. Pipetaj yaparak karıştırıldı. Karışımın 400 µl'si diğer kolona (QIAamp) yüklendi ve 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Alta geçen kısım uzaklaştırıldıktan sonra kalan karışım da kolona yüklendi ve 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni toplama tüpüne alındı ve kolona 700 µl RW1 (yıkama tamponu) yüklendi. 12.000 rpm'de 1 dakika döndürüldükten sonra kolon tekrar yeni toplama tüpüne alındı. 500 µl RPE (yıkama tamponu) yüklendi ve 12.000 rpm'de 1 dakika döndürüldü. Toplama tüpü yenilendi ve tekrar 500 µl RPE yüklendi. 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra yeni bir tüp içine alınan kolon bir kez de boşken 13.000 rpm'de 2 dakika döndürüldü. Kolon kapaklı toplama tüpüne alındı ve kolon üzerine 50 µl su eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 11.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Kolon atıldı ve tüp içindeki RNA örneği hemen buz üzerine alındı.

3.8. RNA Miktar ve Kalite Tayini

2 µl RNA örneği ile RNA konsantrasyon değerleri ölçüldü (MaestroNano, Maestrogen). 260 ve 280 nm'deki absorbands değerleri ile A260/A280 hesaplandı. Konsantrasyon ölçümleri yapılan RNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı.

3.9. RT-PCR (Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Tüm çalışmalar RNazsız bir ortam sağlanması amacıyla UV ile sterilizasyonu sağlanmış çeker ocakta gerçekleştirildi. Real-time PCR sonuçlarının karşılaştırılabilir olması için tüm RNA örnekleri için başlangıç miktarları eşit olarak ayarlandı.

cDNA sentez kiti (RT² HT First Strand Kit, Qiagen) içerikleri olan GE2 ve BC4 (GE2, genomik DNA eliminasyon tamponu, BC4, Reverse transkriptaz enzim karışımı) -20°C'den çıkarılarak buz üzerinde eritildi. PCR tüpü içinde her bir örnek için 200 ng RNA PCR tüplerinde RNazsız su ile 8 µl'ye tamamlandı. Üzerlerine 6 µl GE2 eklendi ve pipetaj yaparak karıştırıldı. PCR cihazında (Corbett Research) 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Tüpe 6 µl BC4 eklendi ve pipetajla karıştırıldı. Çeperlerde kalan sıvıların inmesi için tüpler yaklaşık 10 saniye santrifüj edildi. PCR cihazında şu program takip edildi:

42°C 15 dakika
95°C 5 dakika
4°C ∞

Cihazdan çıkarılan cDNA örnekleri derhal buza alındı. Kontrol etmek amacıyla 2 µl örnek ile konsantrasyon değerleri ve saflıkları ölçüldü (Tablo 3.4). cDNA örnekleri 90 µl RNazsız su ile seyreltildi ve bir sonraki aşamaya kadar -20°C'de saklandı.

3.10. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real-time PCR kiti (RT² qPCR Primer Assay, Qiagen) içerikleri SYBR Green mastermix ve primerler -20°C'den çıkarılarak buz üzerinde eritildi. -20°C'den çıkarılan cDNA örnekleri buz üzerinde eritildi ve kullanılabildiği kadar buz üzerinde tutuldu. Eriyen örnekler ve kit içerikleri alt-üst ederek karıştırıldı ve kısa bir santrifüjle kenarda kalan örnekler indirildi. SYBR Green mastermix'in içinde çökelti görüldüğü durumlarda 42°C'de 1 dakika inkübe edildi ve çökelti parçalanması sağlandı. 1 örnek için toplam 25 µl'lik reaksiyon PCR tüpleri içinde şu şekilde kuruldu:

12,5 µl SYBR Green mastermix
10,5 µl RNazsız su
1 µl cDNA
1 µl primer

Her primer (Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5, Argonaute2 ve β -actin) için cDNA içermeyen mikserler hazırlandı. Bu mikserler 24'er μ l olarak kuyulara dağıtıldı. Her primer için ikili olarak kontrol kuyusuna 1 μ l pre-op cDNA örneği, örnek kuyusuna 1 μ l post-op cDNA örneği koyuldu. Her primer için hazırlanan NTC (negative template control) kuyularına ise 1'er μ l RNazsız su pipetaj yaparak eklendi. NTC kuyuları, hazırlanan mikserlerde veya çalışılan ortamda DNA kontaminasyonu varlığını kontrol etmek için kullanıldı. Plate üzerine yapışkan folyo (LightCycler 480 Sealing Foil, Roche) yapıştırıldı ve plate Real-time PCR cihazına (LightCycler 480 II, Roche) yerleştirildi. Tablo 3.2'deki program uygulandı. Bu programın hemen arkasından hedef genlerden başka bir bölgede çoğalma olmadığını doğrulamak ve primer dimerlerinin oluşmadığını göstermek için erime eğrisi analizi (melting curve analysis) basamağı eklendi. Erime eğrisi analizinde örnekler 40 °C'den 95 °C'ye, sıcaklık saniyede 0,06 °C artacak şekilde ısıtılırlar. Elde edilen PCR ürününün içeriğine göre tepe noktaları 75-80 °C arasında olacak şekilde erime eğrileri beklenmektedir.

Tablo 3.2. Real-time PCR koşulları

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	95°C	10 dakika
45	95°C	15 saniye
	60°C	1 dakika

RNA ekspresyon düzeylerinin hesaplanması ve istatistiksel analizleri için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılmıştır. PCR veriminin % 100 olduğunu yani her döngüde ürün sayısının 2 katına çıktığını varsayan bir metottur. Hedef gen için elde edilen CT (cycle threshold) değerlerinden referans genin CT değerleri çıkarılarak normalizasyon yapılır (ΔC_t). ΔC_t değeri test edilen durum ve kontrol için ayrı ayrı hesaplanır. Bizim çalışmamızda test edilen durum post-op, kontrol grubu ise pre-op değerleridir. Normalize gen ekspresyonu $2^{-\Delta C_t}$ formülü ile hesaplanır. Post-op ve pre-op grupların normalize gen ekspresyonlarının birbirlerine oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) kat değişimini (fold change) vermektedir.

$$\Delta C_t = C_t (\text{hedef gen}) - C_t (\text{referans gen})$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-\Delta C_t} (\text{post-op}) / 2^{-\Delta C_t} (\text{pre-op})$$

3.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 18.0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizleri yapılacak olan gruplardan normal dağılıma uyan bağımlı gruplar için paired-samples t test ve normal dağılıma uymayan bağımlı gruplar için Wilcoxon signed ranks test uygulanmıştır. p değeri 0,05'ten küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Hastalar

Çalışmaya dahil edilen 16 hastanın pre-op ve post-op 3. ay örnekleri çalışılmıştır. Çalışma grubunda yer alan alıcıların ve bu alıcılara organ nakli yapılan vericilerin doku uyumları ve akrabalık dereceleri, demografik özellikleri ile birlikte alıcının nakil öncesi aldığı tanı ve idame döneminde uygulanan ilaç grubu detayları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların demografik özellikleri

ALICI				DONÖR			Doku Uyum	İmmünsüpresan Grubu
Hasta	Yaş	C	Tanı	Yaş	C	Akrabalık Derecesi		
H2	51	E	T2D, HT	25	K	Kızı	1 A, 1 B, 1 DR	Tac+MFA
H3	35	E	Amiloidozis	34	K	Eşi	1 DR	Tac+MFA
H4	36	E	TIN	55	E	Babası	1 A, 1 B, 1 DR	Tac+MFA
H5	53	E	HT	49	K	Eşi	2 DR	Tac+MFA
H10	30	E	KBY	68	E	Babası	1 A, 1 B, 1 DR	Tac+Eve+MFA
H11	19	E	KBY	64	E	Babası	1 A, 1 B, 1 DR	Tac+Eve+MFA
H12	45	E	IG A GN, KBH	70	K	Annesi	1 A, 1 B, 2 DR	Tac+MFA
H13	42	K	KBY	31	K	Kardeşi	2 A, 2 B, 2 DR	Tac+MFA
H14	30	E	KBY	28	K	Eşi	1 A, 1B, 1 DR	Tac+MFA
H15	58	E	HT	36	E	Oğlu	1 A, 1B, 1 DR	Tac+MFA
H17	28	K	KBH	59	K	Annesi	1 A, 1B, 1 DR	Tac+MFA
H18	32	K	KBH	50	K	Kuzeni	2 B	Tac+MFA
H19	18	K	SLE	44	E	Babası	1 A, 1B, 1 DR	Tac+MFA
H21	20	E	NM, EB	40	K	Annesi	1 A, 1B, 1 DR	Tac+MFA
H22	24	K	KBY	59	K	Annesi	2 A, 2 B, 2 DR	Tac+MFA
H23	32	E	AN	61	K	LURD	0	Tac+MFA

C, cinsiyet; E, erkek; K, kadın; T2D, tip 2 diyabet; HT, hipertansiyon; TIN, tübüler interstisyel nefrit; KBY, kronik böbrek yetmezliği; Ig A GN, Ig A glomerulonefrit; SLE, sistemik lupus eritematozus; NM, nörojenik mesane; EB, ektopik böbrek; AN, analjezik nefropati; LURD (living-unrelated donor), canlı akraba olmayan verici; Tac, tacrolimus; MFA, mikofenolik asit; Eve, Everolimus.

4.2. PKMH Lizatlarının Protein Kaliteleri

Bireyler ve Yöntemler bölümünde detaylı olarak açıklanan Bradford protein miktar tayini yöntemi ile hesaplanan kontrol ve post-op hasta lizatlarının protein konsantrasyon değerleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

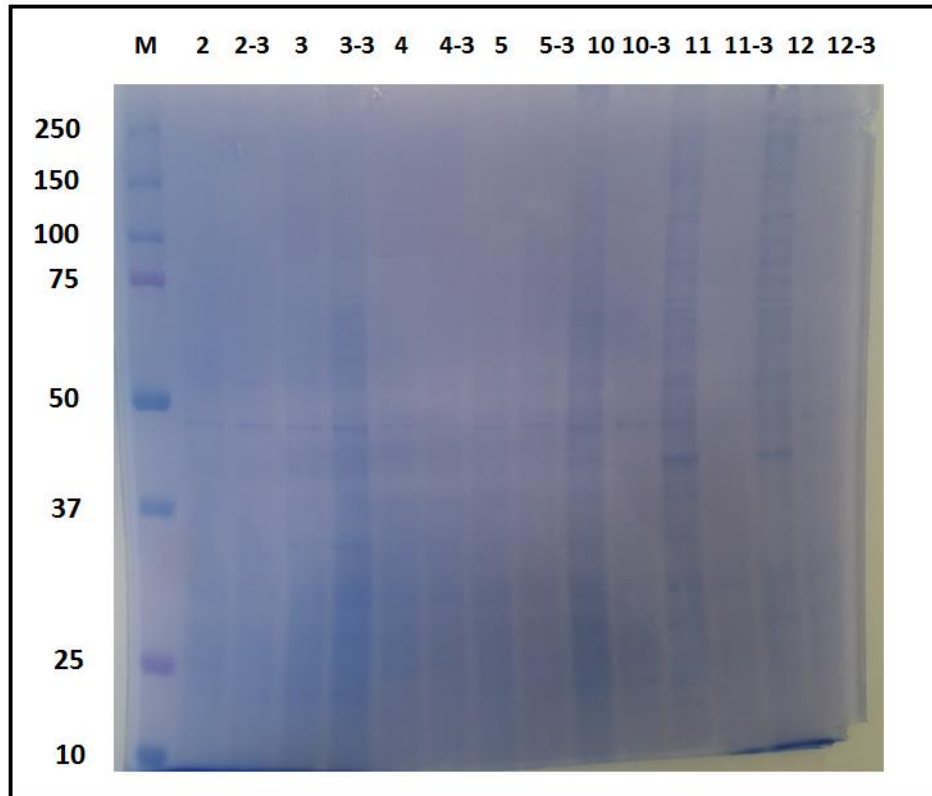
Tablo 4.2. PKMH lizatlarının protein konsantrasyon değerleri ve yüklenecek lizat miktarları

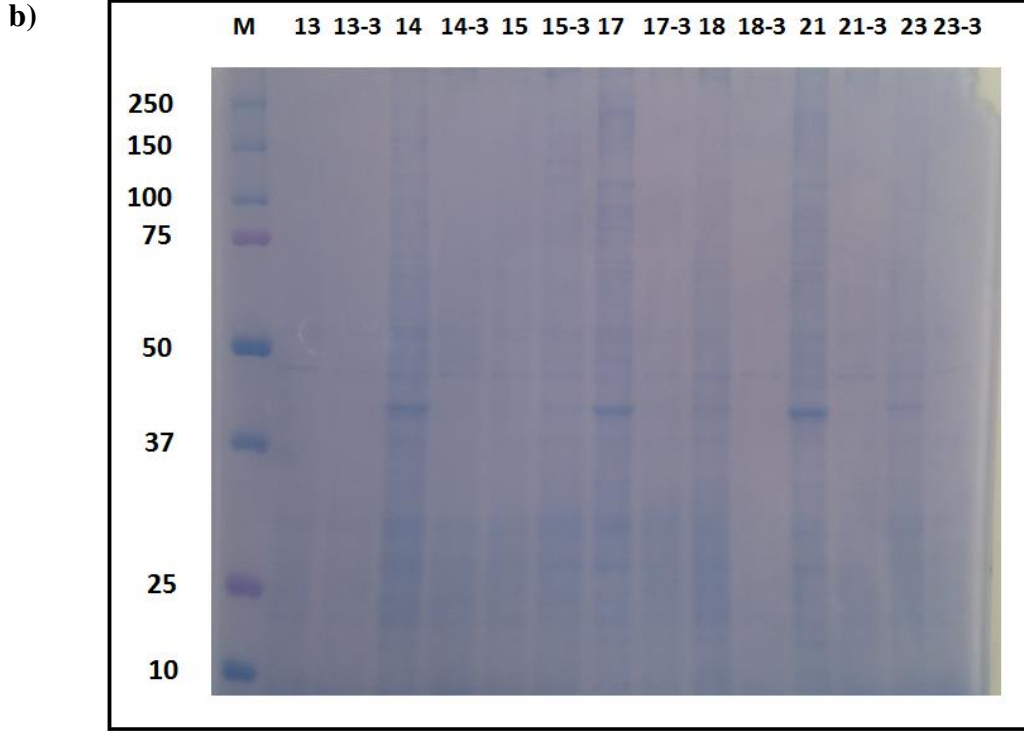
Pre-op	Konsantrasyon (µg/µl)	50 µg (µl)	100 µg (µl)
H2	5,22	9,6	19,2
H3	6,40	7,8	15,6
H4	5,30	9,45	18,9
H5	5,91	8,45	16,9
H10	7,12	7	14,0
H11	6,30	7,95	15,9
H12	5,02	9,95	19,9
H13	6,31	7,9	15,8
H14	6,06	8,25	16,5
H15	4,88	10,25	20,5
H17	6,05	8,25	16,5
H18	6,70	7,45	14,9
H19	4,42	11,3	22,6
H21	6,61	7,55	15,1
H22	4,26	11,75	23,5
H23	6,11	8,2	16,4
Post-op (3.ay)	Konsantrasyon (µg/µl)	50 µg (µl)	100 µg (µl)
H2-3	5,12	9,75	19,5
H3-3	7,66	6,55	13,1
H4-4	5,90	8,45	16,9
H5-5	5,96	8,4	16,8
H10-3	6,08	8,2	16,4
H11-3	4,78	10,45	20,9
H12-3	4,35	11,5	23,0
H13-3	5,21	9,6	19,2
H14-3	7,14	7	14,0
H15-3	7,32	6,85	13,7
H17-3	6,14	8,15	16,3
H18-3	5,97	8,4	16,8
H19-3	3,84	13	26,0
H21-3	6,99	7,15	14,3
H22-3	5,59	8,95	17,9
H23-3	6,94	7,2	14,4

PKMH lizatlarının protein kalitelerini tespit etmek amacıyla lizat örnekleri % 10'luk jel hazırlanarak SDS-PAGE ile görüntüldü. Tablo 4.2'de belirtilen 50 µg örnek için gerekli miktarlar ile aynı hacimde yükleme boyası karıştırıldı ve Yöntemler bölümünde belirtildiği şekilde örnekler yüklemeye hazırlandı. Örnek hazırlama aşamasında, yükleme boyası içinde bulunan β -merkaptaetanol ve örneklerin kaynatılması işlemi sayesinde proteinlerin 3 boyutlu yapılarının bozulması sağlanır. Yükleme boyası içindeki bulunan negatif yüklü bir deterjan olan SDS ise proteinlere bağlanarak negatif yükle yüklenmelerini sağlar. Daha büyük proteinlere daha fazla SDS molekülü bağlanacağından, proteinler birim kütle başına eşit negatif yüke sahip olurlar. Bu işlemler tüm proteinlerin 3 boyutlu yapılarından ve kendi yüklerinden bağımsız olarak eşit koşullarda yalnızca büyüklüklerine göre yürümesini ve ayrılmasını sağlamaktadır.

Örnekler jelin sonuna kadar yürütüldü ve jel coomassie blue boyama tamponu ile gece boyu inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile yıkanan jelde bandlar görünür hale geldi. Şekil 4.1'de hasta lizatlarında bulunan proteinler büyüklüklerine göre ayrılmış halde görülmektedir. Bandların yoğunluklarının az olması sebebiyle Western blot yöntemi ile görüntülemek için 100 µg lizat örneği ile devam edildi.

a)





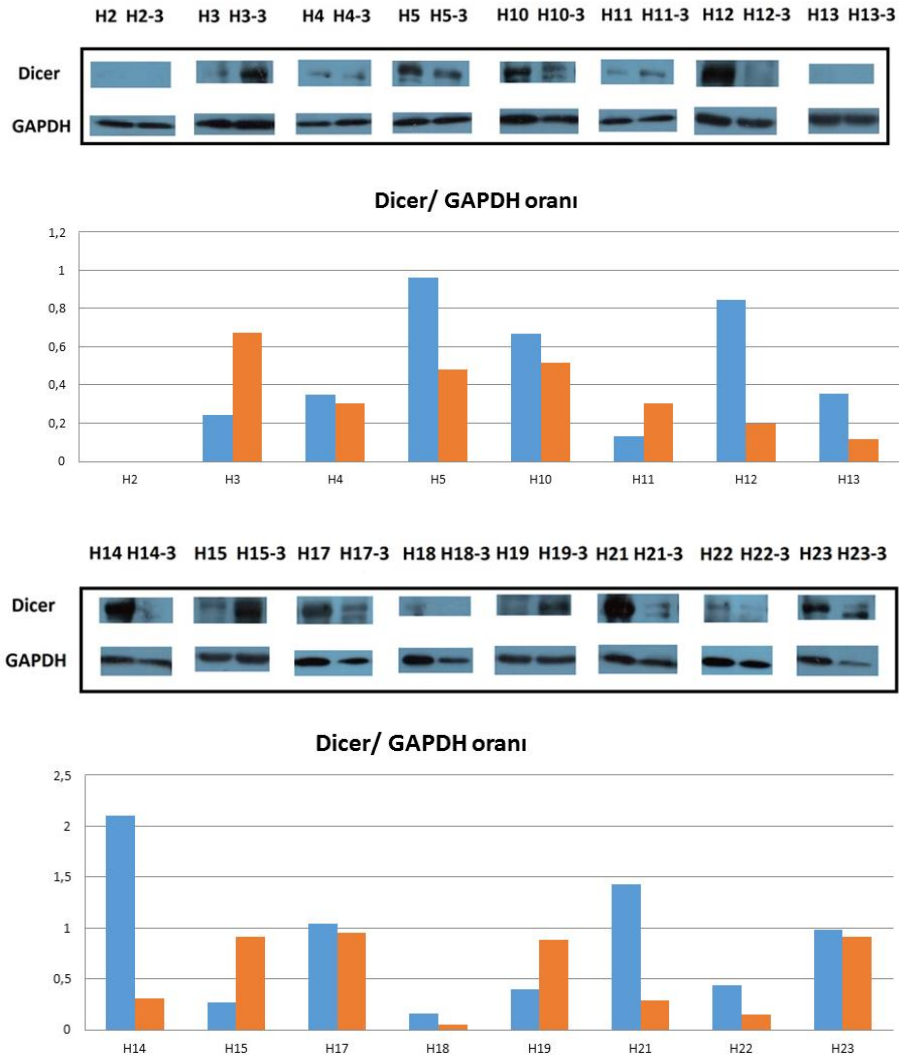
Şekil 4.1. SDS-PAGE sonrası coomassie blue boyama tamponu ile boyanmış 50 µg lizat örneklerinin bulunduğu jel görüntüleri (M, marker- protein büyüklük belirteci)

4.3. Hastalarda Protein Ekspresyon Değişimleri

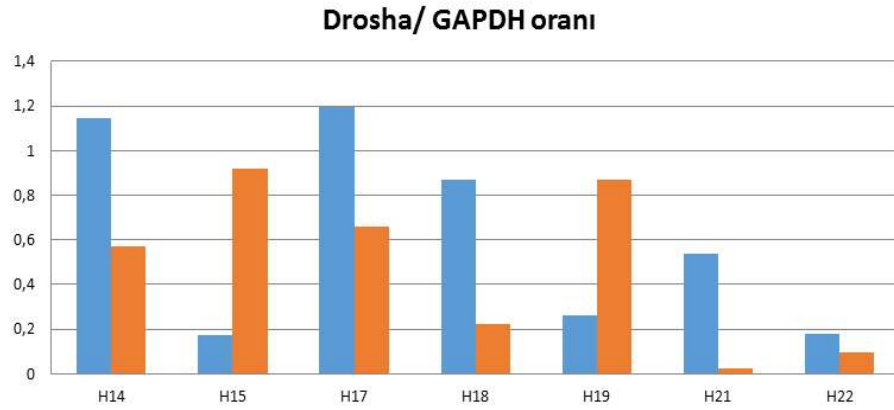
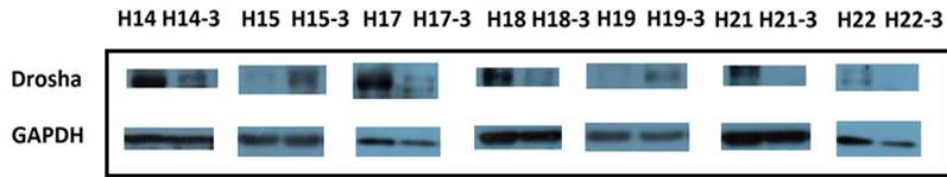
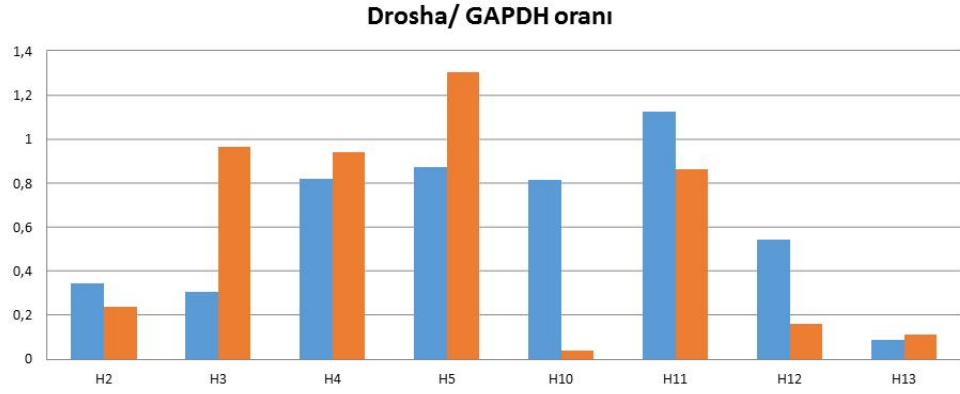
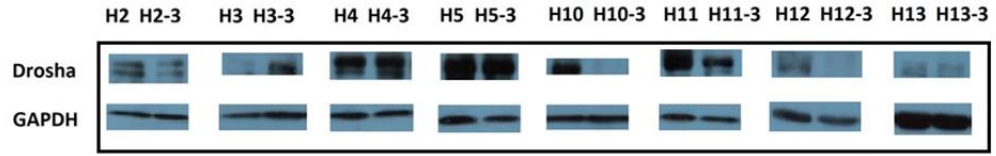
Western Blot ile işaretlenecek olan proteinlerin yaklaşık büyüklükleri şöyledir; Dicer 220 kDa, Drosha 160 kDa, Exportin5 136 kDa, DGCR8 120 kDa, Argonaute2 97 kDa ve GAPDH 37 kDa. Yaklaşık 120 kDa'dan büyük proteinler için daha büyük porlara sahip olan düşük yoğunlukta jeller kullanılmaktadır. Bu jeller hem proteinlerin daha iyi ayrılmasını sağlar hem de proteinlerin jelden daha kolay çıkmalarını sağlayarak transfer etkinliğini artırır. % 10 ve % 7'lik alt jeller hazırlanarak uygun koşullar denenmiştir. Büyük proteinlerin daha düşük yoğunlukta olan daha büyük porlara sahip % 7'lik jelden membrana geçişlerinin daha etkin gerçekleştiği gözlenmiştir.

Büyük proteinlerin transferlerinin geleneksel transfer işleminden farklı yapılması gerekmektedir. Büyük proteinler transfer esnasında jelde çöktirler oluşturma eğilimindedirler ve porlardan membrana geçmeleri görel olarak daha zordur. Yarı kuru (semi-dry) transfer sistemi jelde aşırı ısınma ve yanmaya sebep olacağından büyük proteinler için uygun değildir. Bu nedenle transfer işlemi ıslak transfer sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemler bölümünde bahsedildiği gibi transfer tamponu içindeki metanol konsantrasyonu proteinlerin membrana geçişini kolaylaştırmak için azaltılmıştır.

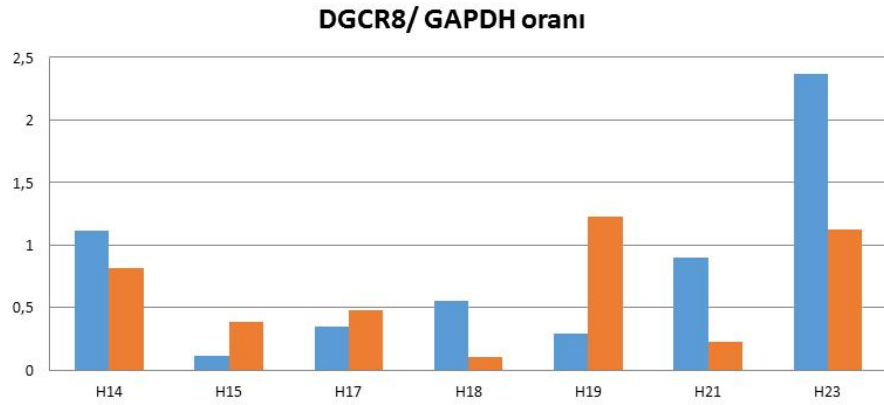
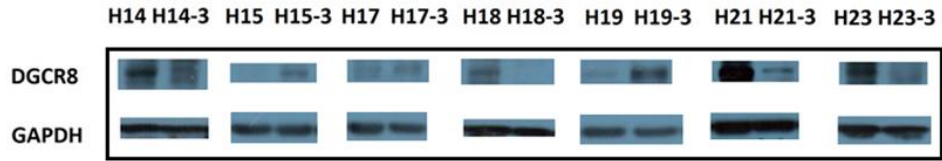
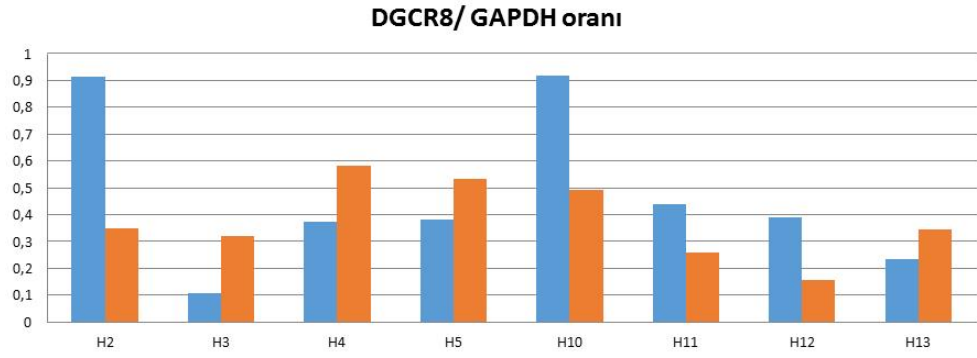
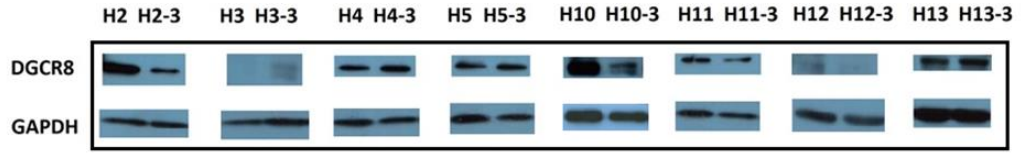
Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6'da Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 proteinlerinin hastalardaki ekspresyon miktarlarının GAPDH ekspresyonuna oranları verilmiştir. Grafiklerde pre-op ve post-op sırasıyla görülen değerler, hastaların 3. aylarında bu proteinlerin ekspresyonlarındaki artış veya azalmaları göstermektedir. H2 hastasında pre-op ve post-op dönemde Dicer ekspresyonu görülmezken H3, H11, H15 ve H19 olgularında 3. ayda ekspresyon seviyesinde artış, diğer hastalarda ise azalmaya rastlanmıştır (Şekil 4.2). Şekil 4.3'te hastalardaki Drosha protein ekspresyon değişimleri görülmektedir. Yine hastaların çoğunda ekspresyonda azalma göze çarpmaktadır. Artış görülen hastalar H3, H4, H5, H15 ve H19'dur. H13'te ise neredeyse hiç ekspresyon değişimi gözlenmemiştir. Şekil 4.4 ve 4.5'te DGCR8 ve Exportin5 protein ekspresyonlarının hasta popülasyonunun hemen hemen yarısında arttığı ve diğer yarısında ise azaldığı görülmektedir. Argonaute2 protein ekspresyon değişimleri incelendiğinde H3, H13 ve H15 hastaları dışında belirgin bir azalma olduğu göze çarpmaktadır. H3 ve H15'te artış gözlenirken H13 hastasında hemen hemen hiç değişim olmamıştır (Şekil 4.6).



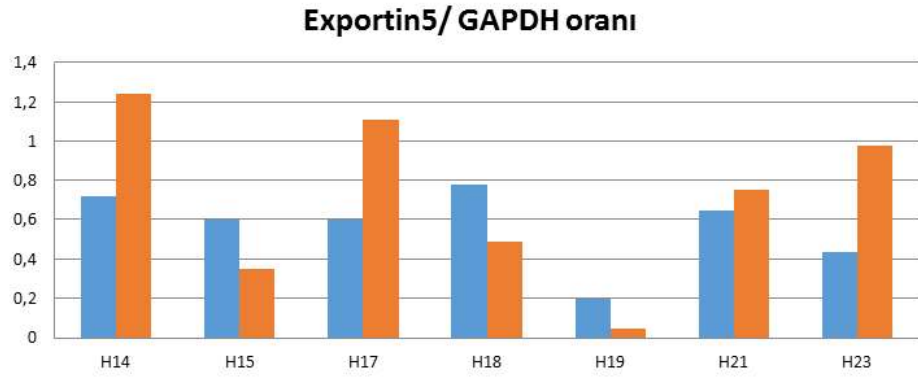
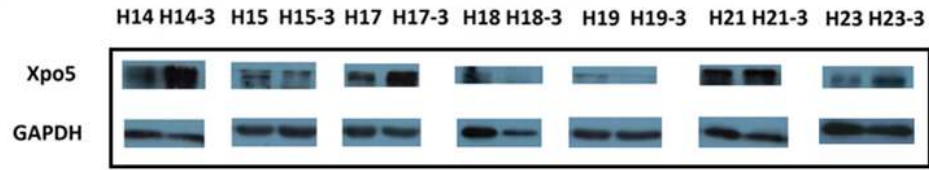
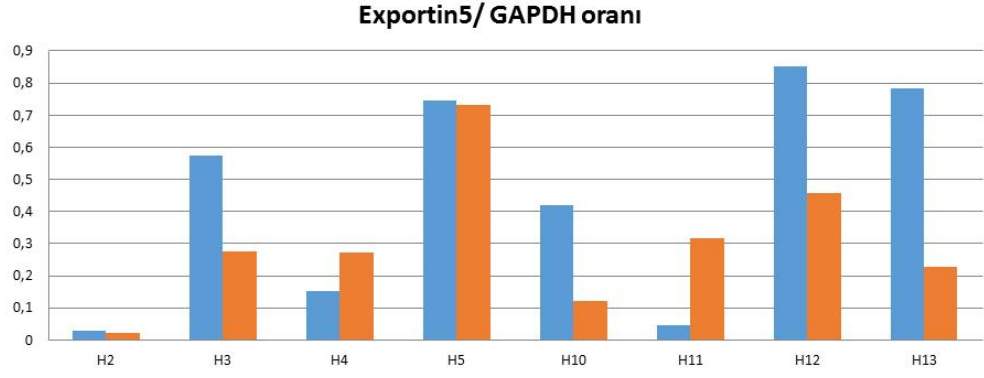
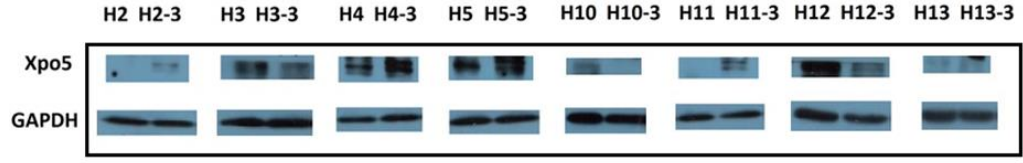
Şekil 4.2. Hastalardaki Dicer ekspresyonları. Sırasıyla hastaların pre-op ve post-op 3. ay ekspresyonları görülmektedir. Grafikte Dicer ekspresyonlarının house-keeping gen olan GAPDH ekspresyonuna oranları verilmiştir.



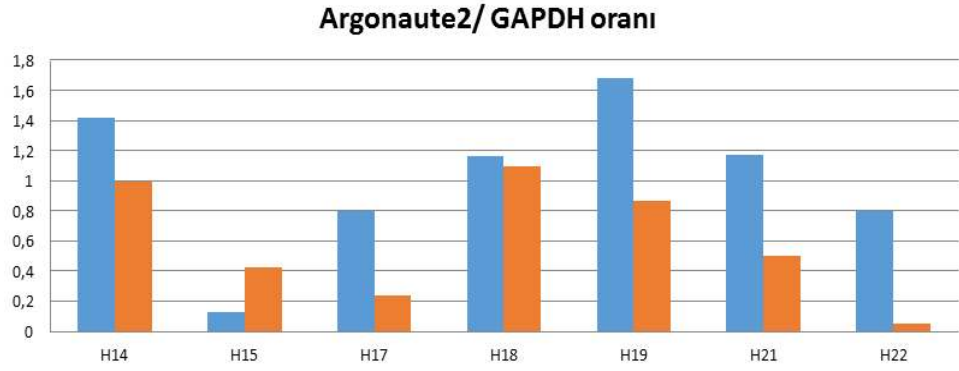
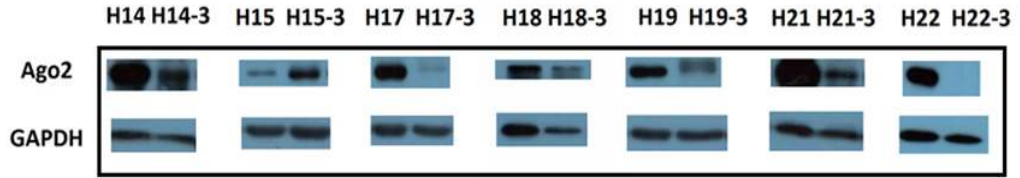
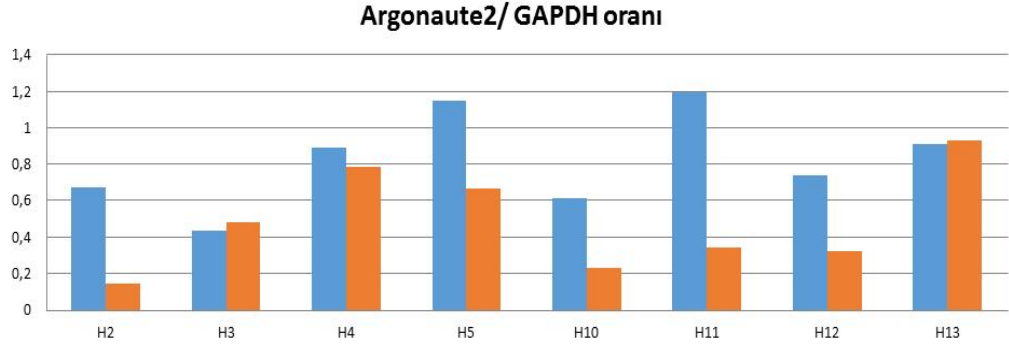
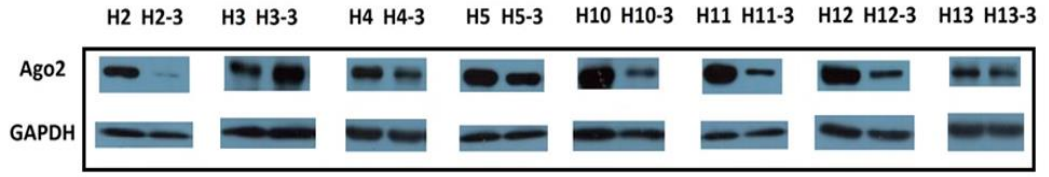
Şekil 4.3. Hastalardaki Drosha ekspresyonları. Sırasıyla hastaların pre-op ve post-op 3. ay ekspresyonları görülmektedir. Grafikte Drosha ekspresyonlarının house-keeping gen olan GAPDH ekspresyonuna oranları verilmiştir.



Şekil 4.4. Hastalardaki DGCR8 ekspresyonları. Sırasıyla hastaların pre-op ve post-op 3. ay ekspresyonları görülmektedir. Grafikte DGCR8 ekspresyonlarının house-keeping gen olan GAPDH ekspresyonuna oranları verilmiştir.

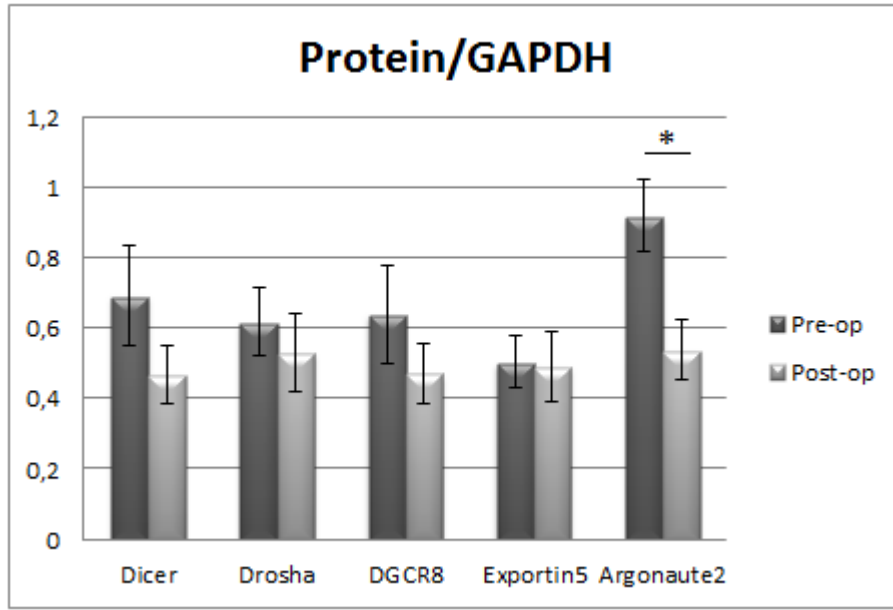


Şekil 4.5. Hastalardaki Exportin5 ekspresyonları. Sırasıyla hastaların pre-op ve post-op 3. ay ekspresyonları görülmektedir. Grafikte Exportin5 ekspresyonlarının house-keeping gen olan GAPDH ekspresyonuna oranları verilmiştir. (Xpo5-Exportin5)



Şekil 4.6. Hastalardaki Argonaute2 ekspresyonları. Sırasıyla hastaların pre-op ve post-op 3. ay ekspresyonları görülmektedir. Grafikte Argonaute2 ekspresyonlarının house-keeping gen olan GAPDH ekspresyonuna oranları verilmiştir. (Ago2-Argonaute2)

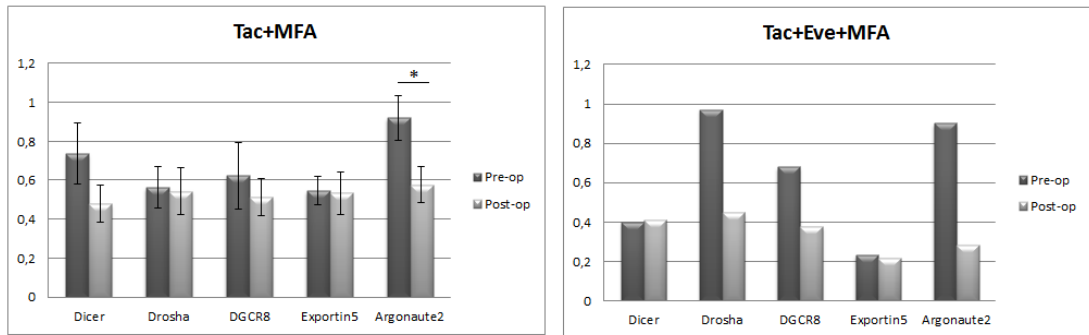
Şekil 4.7.'de tüm hastaların protein ekspresyon ortalamaları verilmiştir. Dicer, Drosha ve DGCR8 için azalma görülürken ($n=15$, $p>0,05$) Exportin5 için değişme görülmemiştir ($p>0,05$). İmmünsüpresan kullanan hastaların post-op 3. aylarında Argonaute2 protein ekspresyonunda anlamlı bir azalma ortaya çıkmıştır ($p<0,001$).



Şekil 4.7. Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 protein ekspresyon değişimleri. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. (Dicer, Drosha, DGCR8 ve Exportin5, n=15; Argonaute2, n=16, *p<0,001)

4.4. İlaç Gruplarına Göre Protein Ekspresyon Değişimleri

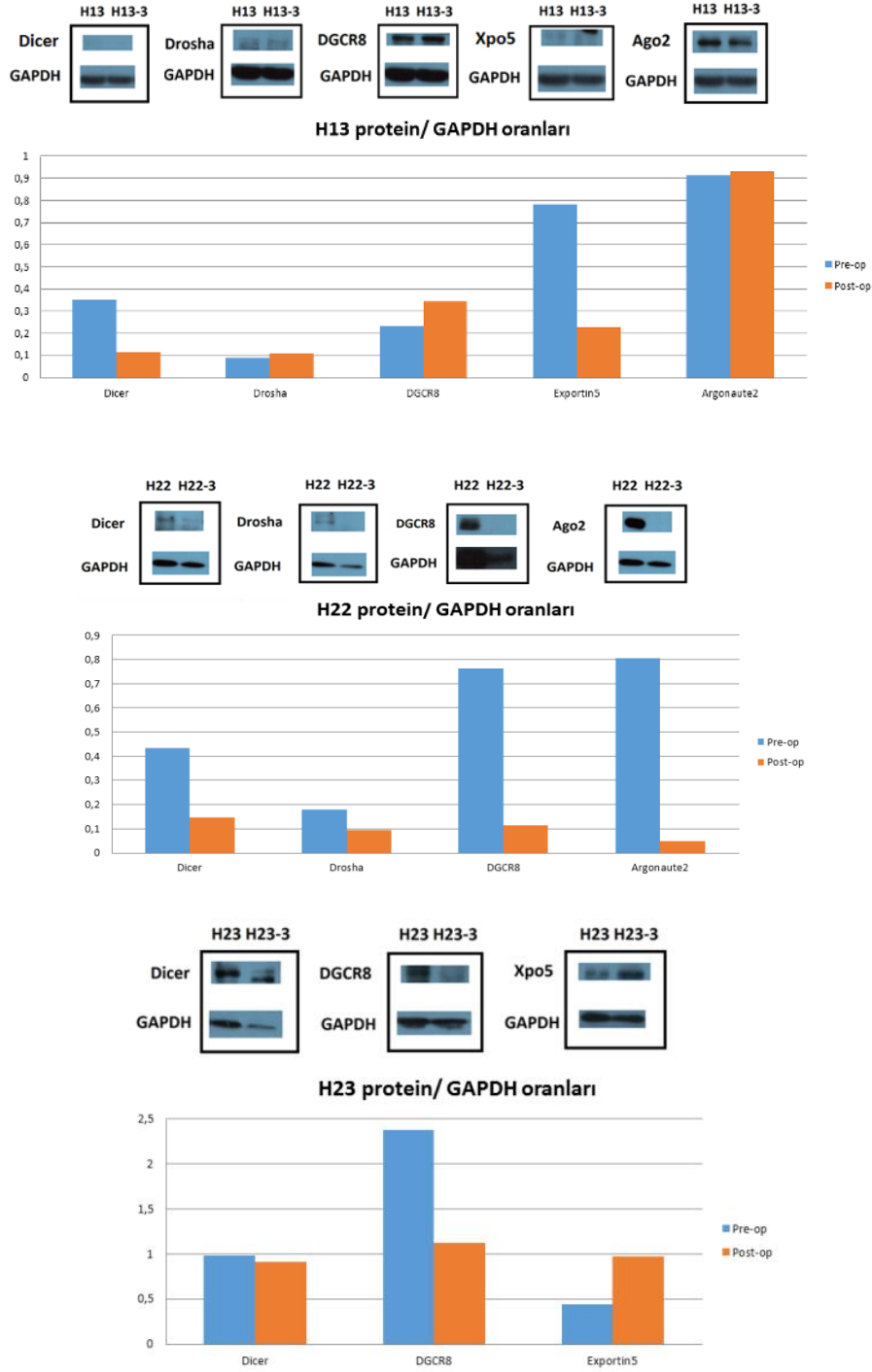
Çalışmamızdaki hastaların idame döneminde kullandığı immünsüpresan grupları Tac+MFA ve Tac+Eve+MFA'dır (Tablo 4.1). Hastaların protein ekspresyon değişimleri ilaç gruplarına göre incelendiğinde Şekil 4.8'deki sonuçlar elde edilmiştir. Tac+MFA grubu ilaç kullanan hastalarda Argonaute2'de görülen protein ekspresyon azalmaları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$, n=13). Tac+Eve+MFA kullanan hastalarda ise Dicer ve Exportin5 ekspresyonlarında değişme görülmemiştir. Bu protein ekspresyonları incelendiğinde H10 olgusunda azalma, H11 olgusunda ise artma olduğu görülmüş, dolayısıyla protein ekspresyon değişimi ile Everolimus kullanımı arasında bir ilişki tespit edilememiştir.



Şekil 4.8. İmmünsüpresan gruplarına göre protein ekspresyon değişimleri. * $p<0,01$ (Tac+MFA, n=13, Tac+Eve+MFA, n=2, Tac-Tacrolimus; MFA- mikofenolik asit; Eve-Everolimus)

4.5. Rejeksiyon Görülen ve Görülmeyen Hastaların Protein Ekspresyon Değişimleri

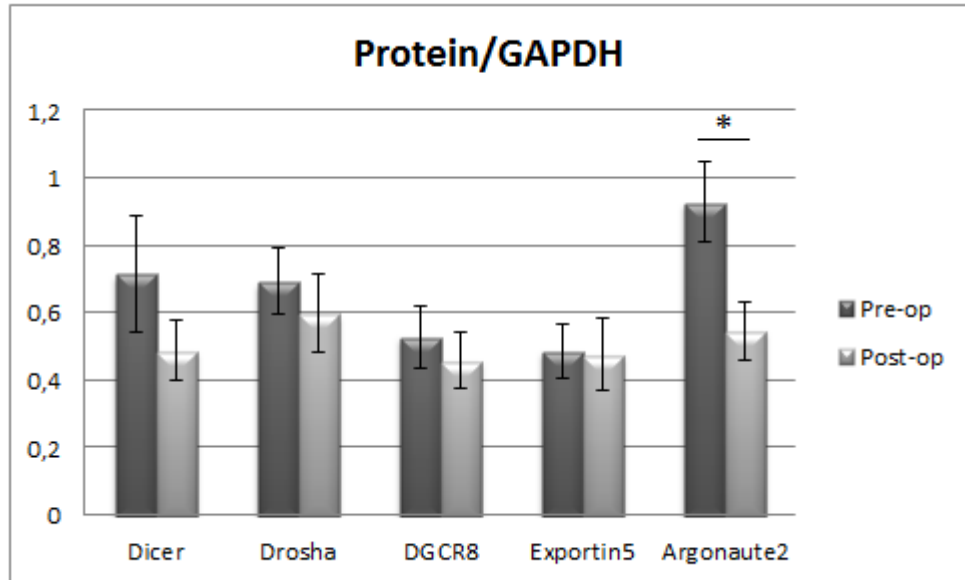
Hastaların nakil sonrası klinik seyirleri incelendiğinde H13 hastasında kronik rejeksiyon ve greft kaybı gerçekleştiği öğrenilmiştir. H22’de post-op 2. ayda ve H23 olgusunda ise yaklaşık 5 gün içinde akut rejeksiyon görülmüştür. Şekil 4.9’da rejeksiyon gerçekleşen 3 hastanın protein ekspresyon değişimleri görülmektedir.



Şekil 4.9. Rejeksiyon görülen hastaların protein ekspresyon değişimleri. (H13-kronik rejeksiyon, H22 ve H23-akut rejeksiyon)

Rejeksiyon gerçekleşmiş 3 olguda görülen ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). H13 hastasının Dicer dışındaki proteinlerinin ekspresyon değişimlerinin, rejeksiyon görülmeyen hastalarda görülen profilden farklı olduğu dikkat çekmektedir. H22’de Xpo5 ekspresyonu elde edilememiş, ancak diğer protein ekspresyonlarında genel profile benzer olarak azalma görülmektedir. H23’te ise Dicer’da değişim görülmezken, Xpo5’te artış görülmüştür.

Rejeksiyon görülmeyen hastalardaki protein ekspresyon değişimleri incelendiğinde Exportin5’te belirgin bir değişme yokken, diğer protein ekspresyonlarında azalma olmuş ve Argonaute2’nin protein ekspresyonunda görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Rejeksiyon görülmeyen hastaların protein ekspresyon değişimleri (Dicer, n=12; Drosha, DGCR8, Exportin5, Argonaute2, n=13; * $p<0,05$)

4.6. RNA Örneklerinin Kalitesi ve Konsantrasyonları

RNA izolasyon kiti ile elde edilmiş RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık ölçüm değerleri Tablo 4.3’te görülmektedir. A260/A280 değerinin yaklaşık 2 olması RNA örneğinin saflığını göstermektedir.

Tablo 4.3. RNA örneklerinin konsantrasyonları, saflık değerleri ve 200 ng için gerekli miktarlar

Pre-op	Konsantrasyon (ng/μl)	A260/A280	200 ng
H2	117,22	1,97	1,7
H3	147,64	1,96	1,4
H4	160,82	2,11	1,2
H5	27,67	2,04	7,2
H10	105,90	2,20	1,9
H11	47,28	2,20	4,2
H12	58,83	2,60	3,4
H13	111,63	2,40	1,8
H14	51,30	2,05	3,9
H15	80,84	2,33	2,5
H17	26,97	2,15	7,4
H18	100,74	2,13	2,0
H19	40,34	2,28	5,0
H21	42,92	2,43	4,7
H22	42,36	2,12	4,7
H23	35,61	2,18	5,6
Post-op (3. ay)	Konsantrasyon (ng/μl)	A260/A280	200 ng
H2-3	110,23	2,08	1,8
H3-3	266,61	2,08	0,8
H4-3	92,88	2,16	2,2
H5-3	62,46	2,10	3,2
H10-3	134,91	2,17	1,5
H11-3	39,23	2,17	5,1
H12-3	71,29	2,15	2,8
H13-3	97,91	2,11	2,0
H14-3	60,51	2,13	3,3
H15-3	87,04	2,03	2,3
H17-3	40,50	2,34	4,9
H18-3	139,94	2,18	1,4
H19-3	55,88	2,07	3,6
H21-3	180,49	2,16	1,1
H22-3	34,29	2,09	5,8
H23-3	52,77	2,22	3,8

4.7. Real-time RT-PCR Optimizasyonunun Sağlanması

4.7.1. 500 ng RNA ile Real-time RT-PCR

Kullanılan kitin tavsiye ettiği miktar olan 500 ng RNA kullanılarak bir hastanın pre-op ve post-op örnekleri ile primerlerin aktiviteleri denendi. Tablo 4.4'te RNA örneklerinden cDNA sentezi için kullanılan kimyasalların miktarları verilmiştir.

Tablo 4.4. 500 ng RNA ile RT-PCR optimizasyon protokolü

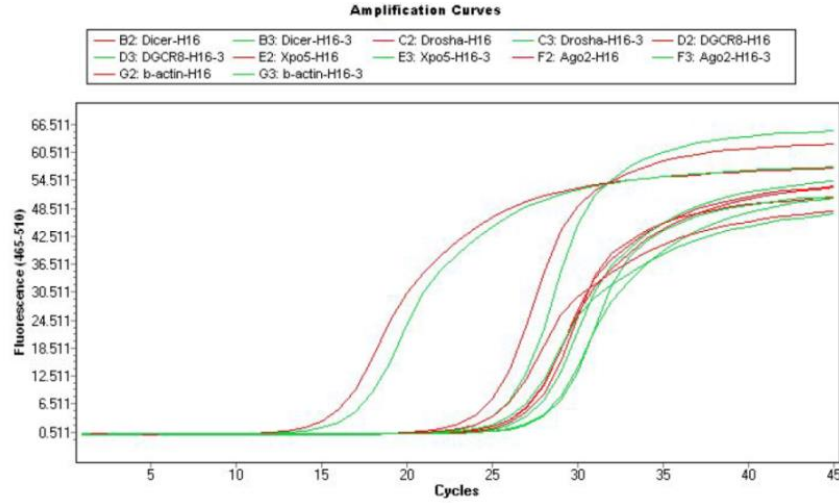
	H16	H16-3
Konsantrasyon (ng/μl)	176,86	151,13
500 ng RNA (μl)	3	3,5
RNAzsız su (μl)	5	4,5
GE2 (μl)	6	6
BC4 (μl)	6	6

Yöntemler bölümünde belirtildiği gibi RT-PCR gerçekleştirilmiş ve cDNA 90 μl RNazsız su ile dilüe edilmiştir. H16 ve H16-3'ün konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4.5'te görülmektedir. cDNA saflığı için A260/A280 değerinin 1,8, A260/A230 değerinin ise 2 civarında olması beklenmektedir.

Tablo 4.5. H16 pre-op ve post-op cDNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri (500 ng RNA)

	Konsantrasyon (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Dilüe 500 ng H16 cDNA	13,28	1,74	2,20
Dilüe 500 ng H16-3 cDNA	9,83	1,74	2,22

H16 ve H16-3 cDNA örnekleri için Real-time PCR reaksiyonu Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde her gen için gerçekleştirilmiştir. Örneklerin her gen için amplifikasyon eğrileri Şekil 4.11'de görülmektedir.



Şekil 4.11. 500 ng H16 ve H16-3 RNA örnekleri ile gerçekleştirilen Real-time PCR amplifikasyon eğrileri

4.7.2. 200 ng RNA ile Real-time RT-PCR

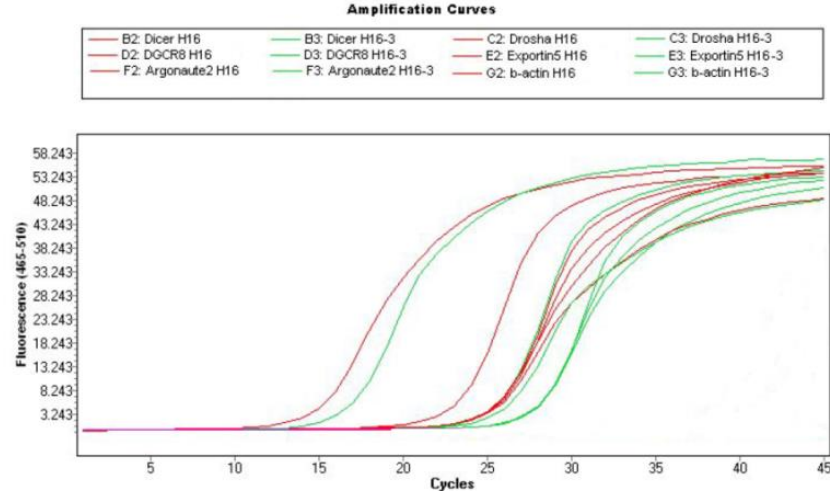
Primer aktivitelerinden emin olduktan sonra örnekler arasında düşük konsantrasyona sahip örnekler olması sebebiyle bir hesaplama ile kullanılabilecek maksimum RNA miktarı bulundu. Kullandığımız cDNA sentez kitinin 1 reaksiyon için vermiş olduğu maksimum RNA hacmi 8 μ l'dir. En düşük konsantrasyona sahip örnekten (H17=26,97 μ g/ml) 8 μ l aldığımız durumda 215,76 ng RNA elde edilmektedir. Bu durumda 500 ng RNA ile denemesi gerçekleştirilen hastanın pre-op ve post-op örneklerinde 200 ng RNA ile deneme yapıldı. Tablo 4.6 ve Tablo 4.7'de RT-PCR protokolü ve cDNA ölçüm sonuçları görülmektedir. cDNA dilüsyonları 90 μ l RNAzsız su ile yapılmış ve Real-time PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.12).

Tablo 4.6. 200 ng RNA ile RT-PCR optimizasyon protokolü

	H16	H16-3
Konsantrasyon (ng/ μ l)	176,86	151,13
200 ng RNA (μ l)	1,2	1,4
RNAzsız su (μ l)	6,8	6,4
GE2 (μ l)	6	6
BC4 (μ l)	6	6

Tablo 4.7. H16 pre-op ve post-op cDNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri (200 ng RNA)

	Konsantrasyon(ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
200 ng H16 cDNA	57,69	1,695444	2,14293
200 ng H16-3 cDNA	52,29	1,67207	2,12888



Şekil 4.12. 200 ng H16 ve H16-3 RNA örnekleri ile gerçekleştirilen Real-time PCR amplifikasyon eğrileri

500 ng ve 200 ng RNA kullanılarak Real-time RT-PCR ile elde edilen CT değerleri Tablo 4.8’de verilmiştir. Her iki durum için de yakın CT değerleri elde edildiği görülmüştür. Primerlerin 200 ng RNA kullanılarak da etkin bir şekilde çalıştığı gösterildikten sonra tüm hastalar için 200 ng RNA ile çalışmaya devam edilmiştir.

Tablo 4.8. 500 ng ve 200 ng RNA örnekleri ile gerçekleştirilen Real-time PCR sonucu CT (Threshold Cycle) değerleri

	CT			CT	
500 ng	H16	H16-3	200 ng	H16	H16-3
Dicer	24,26	25,49	Dicer	22,82	25,20
Drosha	26,28	26,90	Drosha	25,22	27,48
DGCR8	26,14	27,59	DGCR8	24,94	27,33
Exportin5	26,65	27,93	Exportin5	25,23	27,66
Argonaute2	24,75	25,76	Argonaute2	24,97	25,51
β -actin	15,45	16,59	β -actin	14,75	16,43

4.8. Hastalarda Gen Ekspresyon Değişimleri

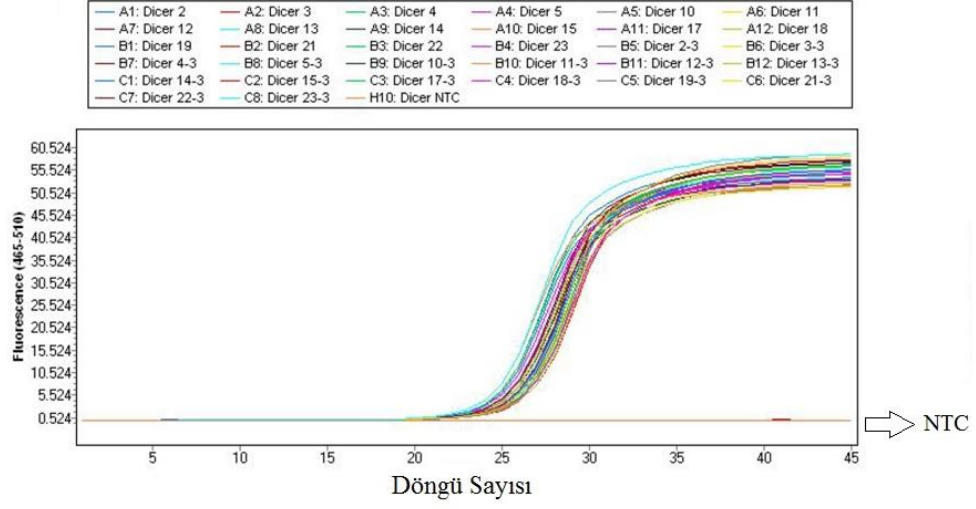
Tablo 4.3’te verilen 200 ng için gerekli RNA miktarları su ile 8 μ l’ye tamamlanmış ve Yöntemler bölümünde belirtilen şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Hastaların cDNA konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4.9’da görülmektedir. Tüm örneklerin değerlerinin birbirine yakın olduğu görüldükten sonra 2 tekrarlı olacak şekilde 5 gen (Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5, Argonaute2) ve 1 house-keeping gen (β -actin) için Real-time PCR reaksiyonları kurulmuştur (Şekil 4.13). Negatif kontrol olarak hazırlanmış olan NTC kuyularında amplifikasyon görülmemiştir. Her reaksiyon sonunda elde edilen erime eğrileri primerlerin hedef gene spesifik olarak çalıştığını göstermiştir (Şekil 4.14).

Tablo 4.9. cDNA konsantrasyonları ve saflık değerleri

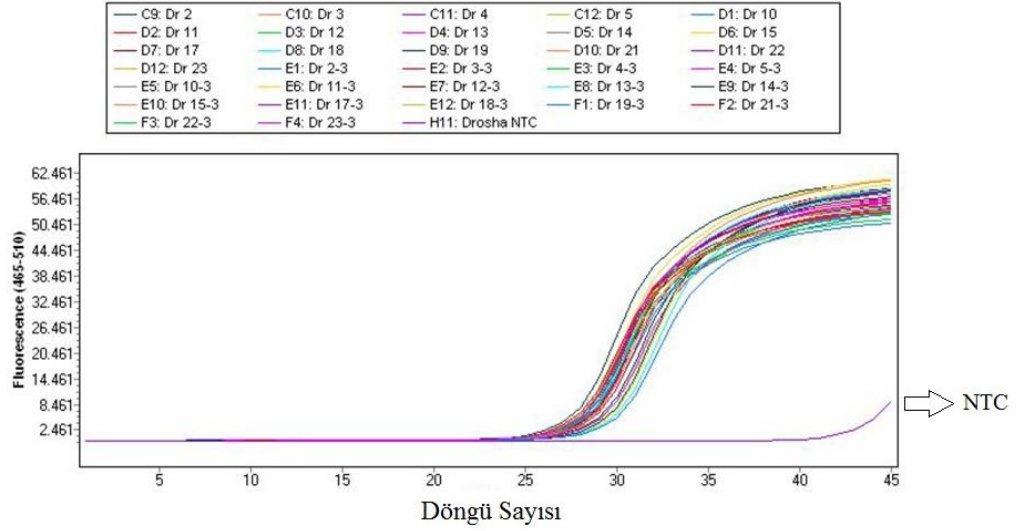
Pre-op	Konsantrasyon (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
H2	60,67	1,68	2,15
H3	56,00	1,68	2,16
H4	59,19	1,68	2,15
H5	55,33	1,68	1,99
H10	54,72	1,69	2,14
H11	60,87	1,68	2,12
H12	50,94	1,70	2,13
H13	53,86	1,63	2,14
H14	53,03	1,69	2,13
H15	55,71	1,68	2,15
H17	66,00	1,67	2,13
H18	51,23	1,68	2,13
H19	65,35	1,67	2,15
H21	51,34	1,67	2,11
H22	62,01	1,67	2,16
H23	54,34	1,68	2,15
Post-op (3.ay)	Konsantrasyon (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
H2-3	54,48	1,67	2,13
H3-3	53,09	1,68	2,15
H4-4	50,55	1,68	2,13
H5-5	56,80	1,69	2,13
H10-3	62,44	1,68	2,12
H11-3	58,96	1,62	2,10
H12-3	63,04	1,68	2,15
H13-3	58,20	1,64	2,08
H14-3	50,84	1,68	2,10
H15-3	54,62	1,68	2,13
H17-3	65,40	1,67	1,98
H18-3	66,12	1,68	2,15
H19-3	56,67	1,68	1,98
H21-3	52,53	1,68	2,15
H22-3	53,26	1,68	2,15
H23-3	76,26	1,66	2,15

a)

Dicer Amplifikasyon Eğrileri

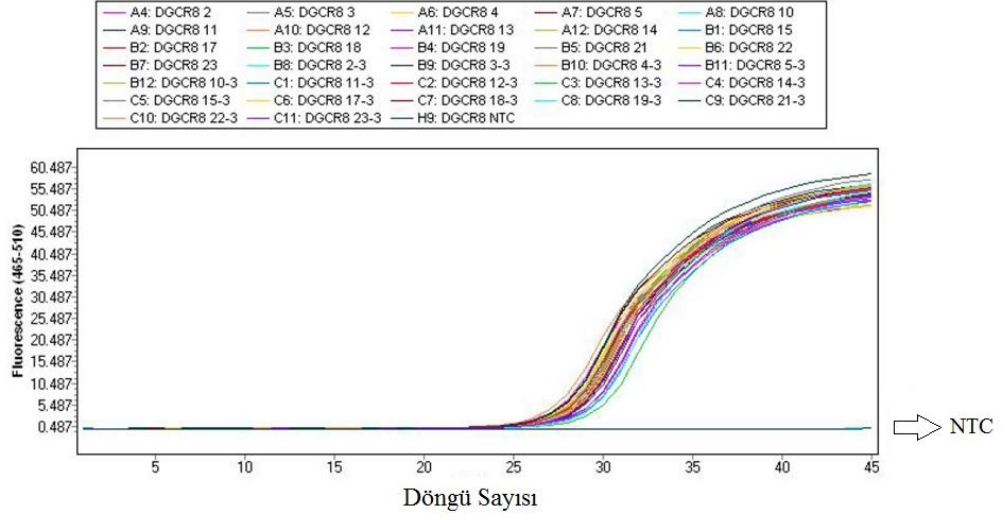


Drosha Amplifikasyon Eğrileri

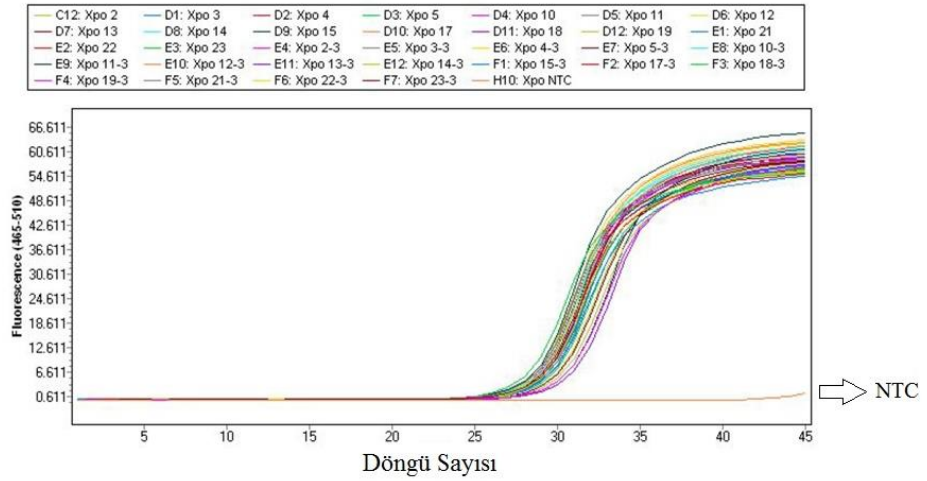


b)

DGCR8 Amplifikasyon Eğrileri

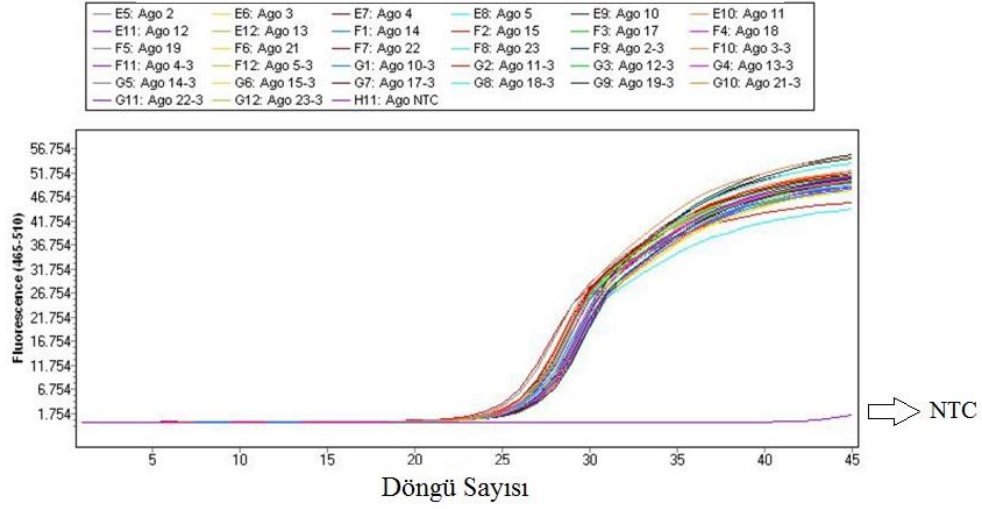


Exportin5 Amplifikasyon Eğrileri

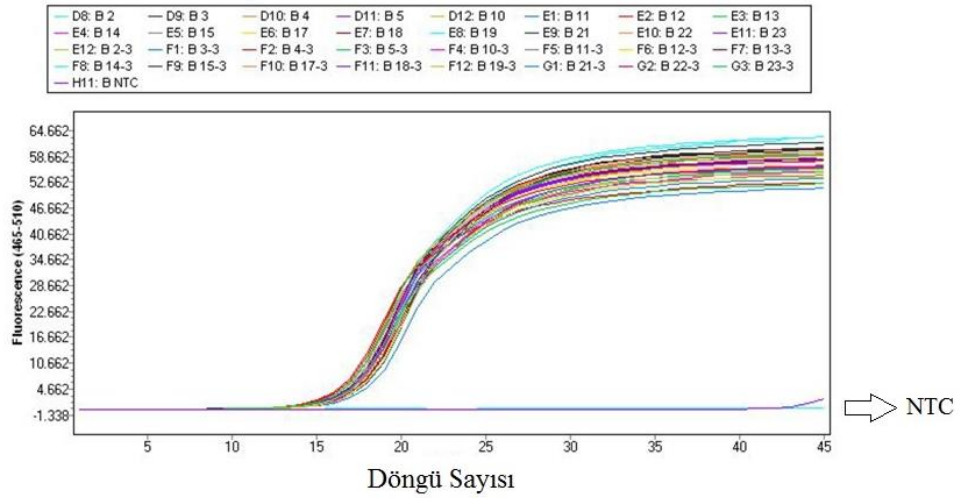


c)

Argonaute2 Amplifikasyon Eğrileri



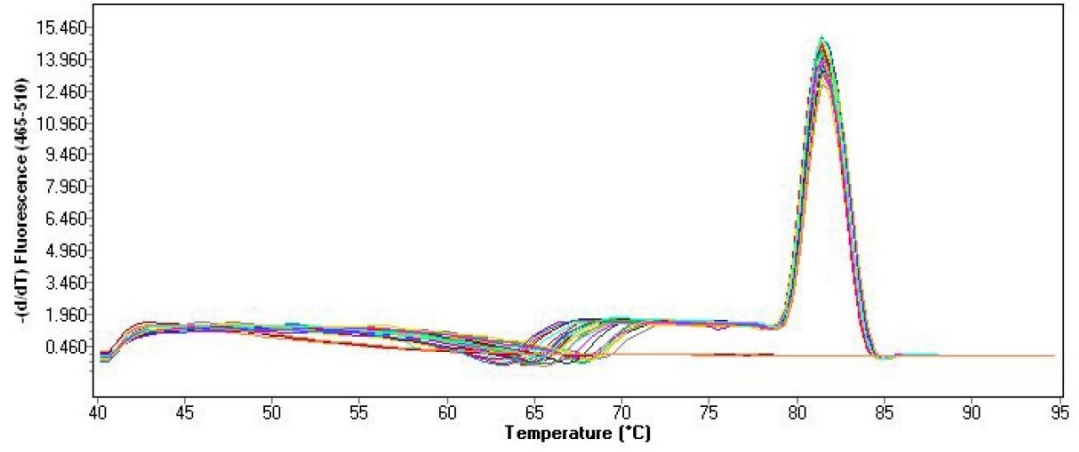
β -actin Amplifikasyon Eğrileri



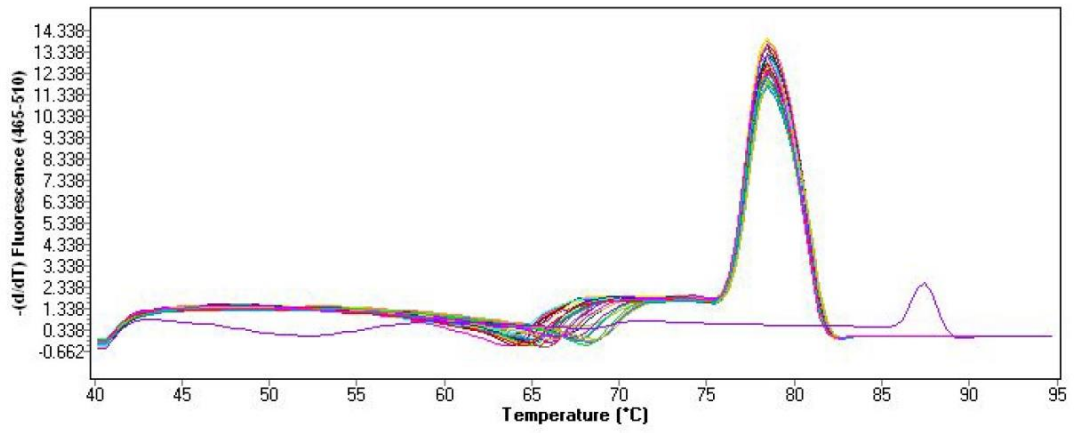
Şekil 4.13. Tüm hastalar için 200 ng RNA örneği ile gerçekleştirilen Real-time PCR sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri. Sırasıyla Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5, Argonaute2 ve β -actin genleri.

a)

Dicer Erime Eğrileri

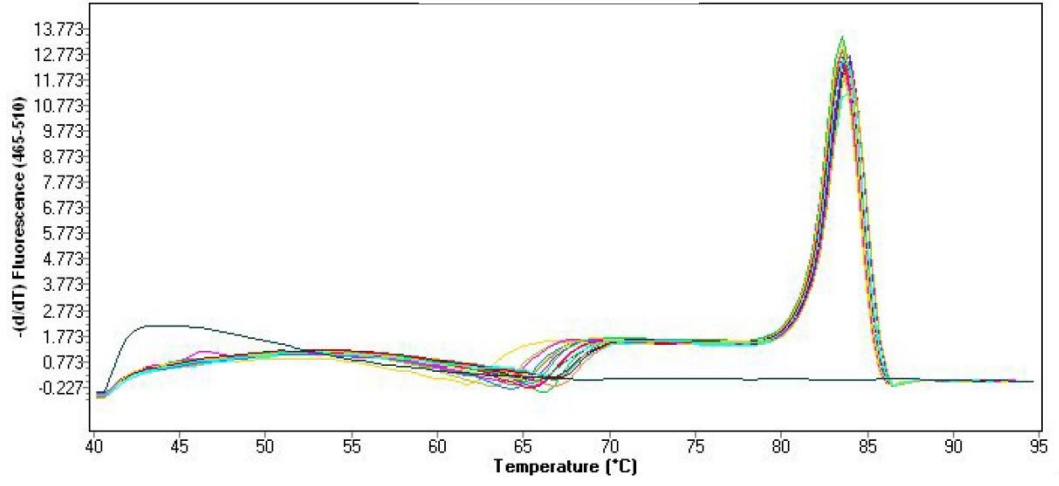


Drosha Erime Eğrileri

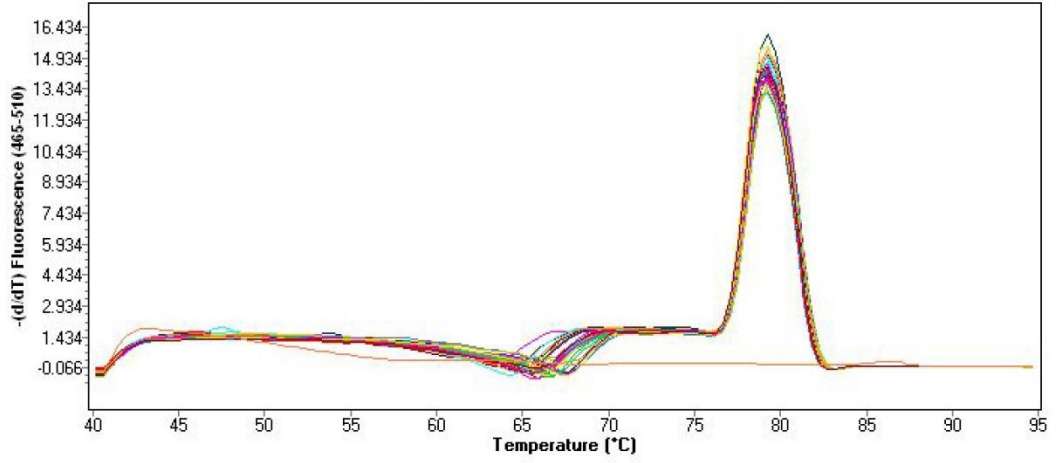


b)

DGCR8 Erime Eğrileri

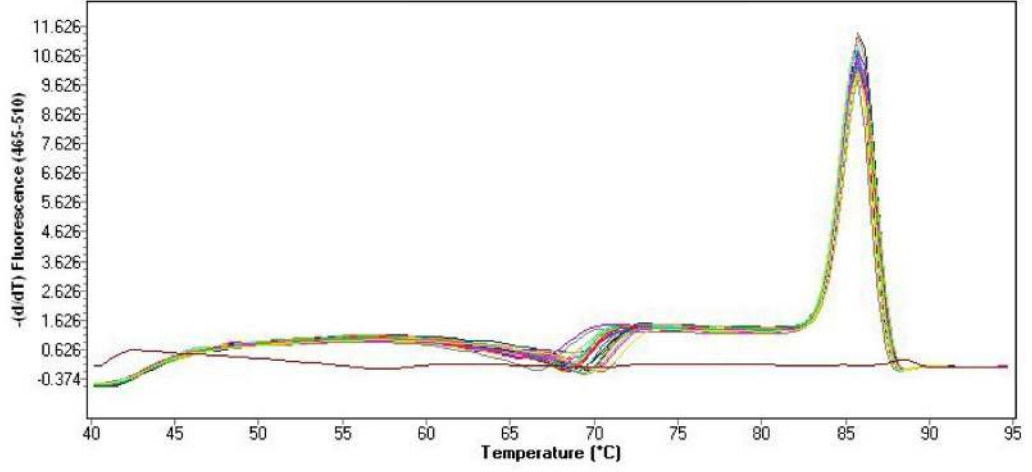


Exportin5 Erime Eğrileri

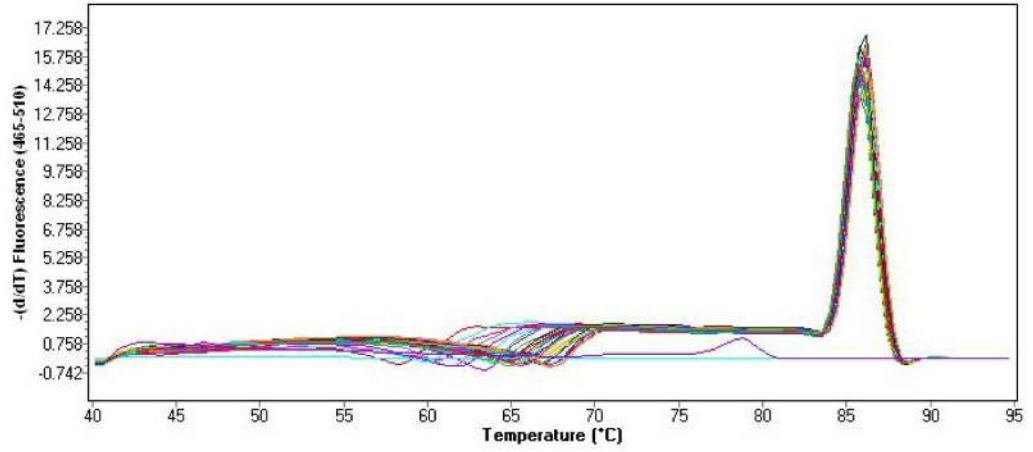


c)

Argonaute2 Erime Eğrileri

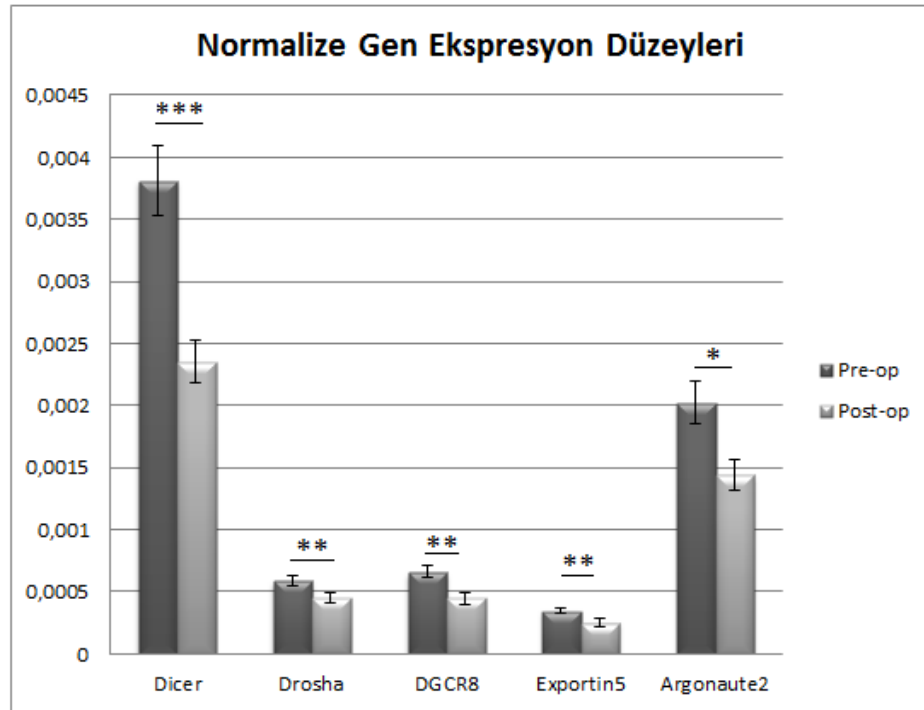


β -actin Erime Eğrileri



Şekil 4.14. Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5, Argonaute2 ve β -actin moleküllerinin erime eğrileri

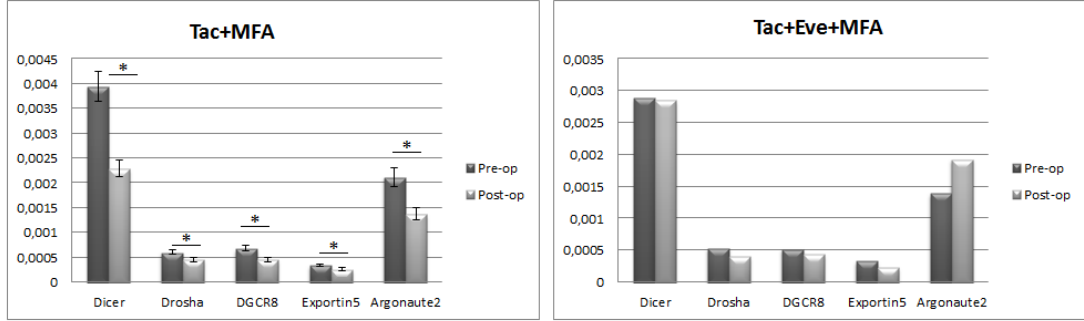
Tüm örnekler için iki kez gerçekleştirilen Real-time PCR sonuçları olan CT değerlerinin ortalaması alındı. Bu değerler referans gen olarak kullanılan β -actin ile normalize edildi. Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak normalize gen ekspresyonları ve ekspresyon değişimleri hesaplandı. İstatistiksel analizlerde normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri kullanıldı. Tüm hastaların post-op 3. ay dönemde, incelenen 5 genin de ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 4.15.). Nakil sonrası 3. ayda Dicer gen ekspresyonu 1,5 kat ($p<0,001$), DGCR8 gen ekspresyonu 1,4 kat ($p<0,01$), Drosha ve Exportin5 gen ekspresyonları 1,3 kat ($p<0,01$), Argonaute2 gen ekspresyonu 1,3 kat ($p<0,05$) azalmıştır.



Şekil 4.15. Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 genlerinin β -actin ile normalize edilmiş ekspresyon düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, $n=16$)

4.9. İlaç Gruplarına Göre Gen Ekspresyon Değişimleri

Kullanılan ilaç gruplarına göre gen ekspresyon değişimleri Şekil 4.16'da görülmektedir. Tac+MFA kullanan hasta grubunda incelenen tüm gen ekspresyonlarında anlamlı azalma görülmüştür. Diğer ilaç grubunda ise Dicer ekspresyonunda değişme olmazken Argonaute2 ekspresyonunda ise ilginç bir şekilde artış gözlenmiştir.



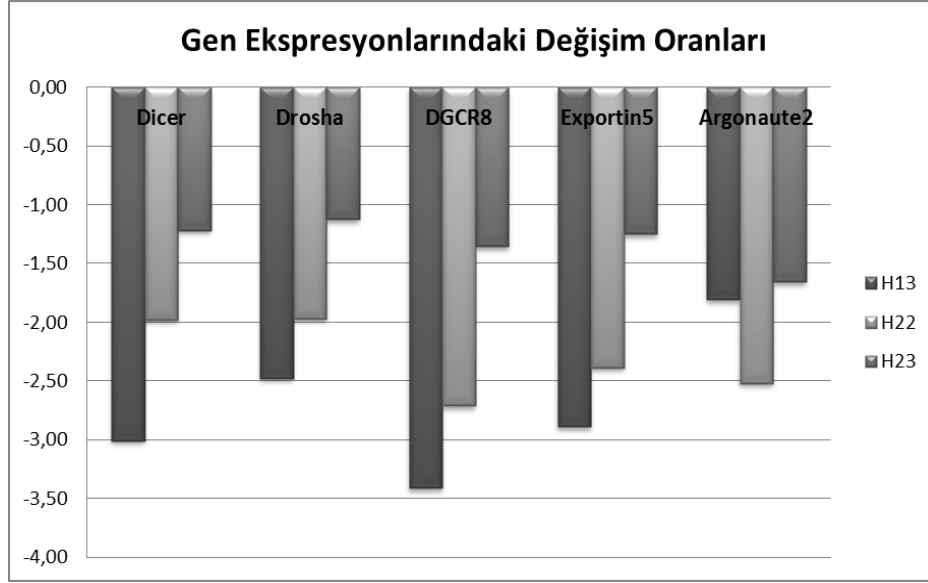
Şekil 4.16. İmmünsüpresan gruplarına göre gen ekspresyon değişimleri. * p<0,001 (Tac+MFA, n=14, Tac+Eve+MFA, n=2)

4.10. Rejeksiyon Görülen ve Görülmeyen Hastalardaki Gen Ekspresyon Değişimleri

Rejeksiyon gerçekleşmiş hastaların gen ekspresyonlarında görülen değişim oranları grafik olarak Şekil 4.17'de verilmiştir. Grafikte gösterilen azalmaların sayısal verilerinin gösterildiği Tablo 4.10'a göre kronik rejeksiyon gerçekleşmiş olan H13'te görülen azalma katsayılarının diğer hastalardan fazla olduğu dikkat çekmektedir.

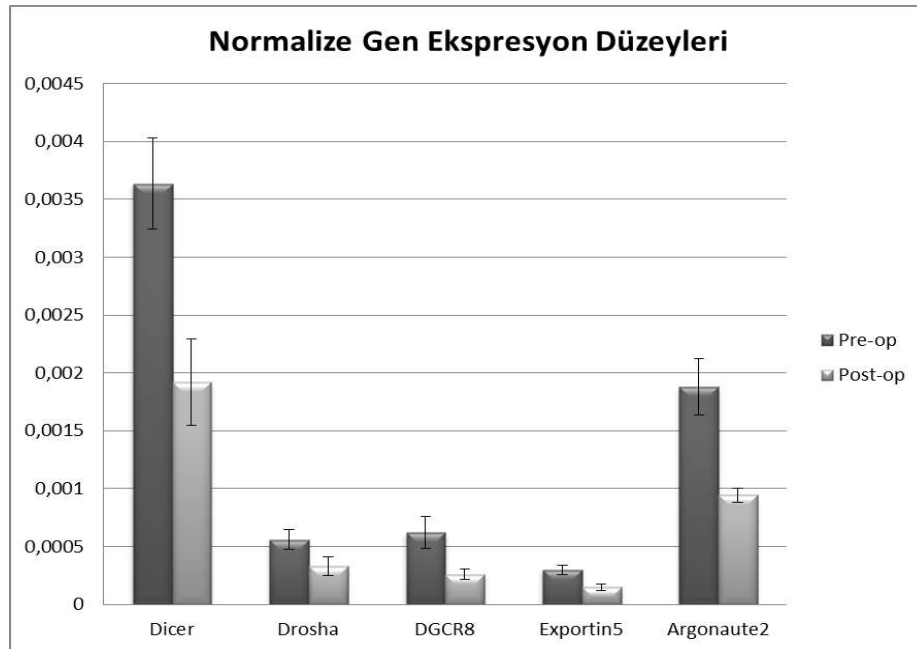
Tablo 4.10. Rejeksiyon görülen hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 gen ekspresyonlarında görülen azalma katsayıları (H13-kronik rejeksiyon, H22, H23-akut rejeksiyon)

	Dicer	Drosha	DGCR8	Exportin5	Argonaute2
H13	3,01	2,48	3,41	2,89	1,81
H22	1,98	1,97	2,71	2,39	2,52
H23	1,22	1,13	1,36	1,25	1,66



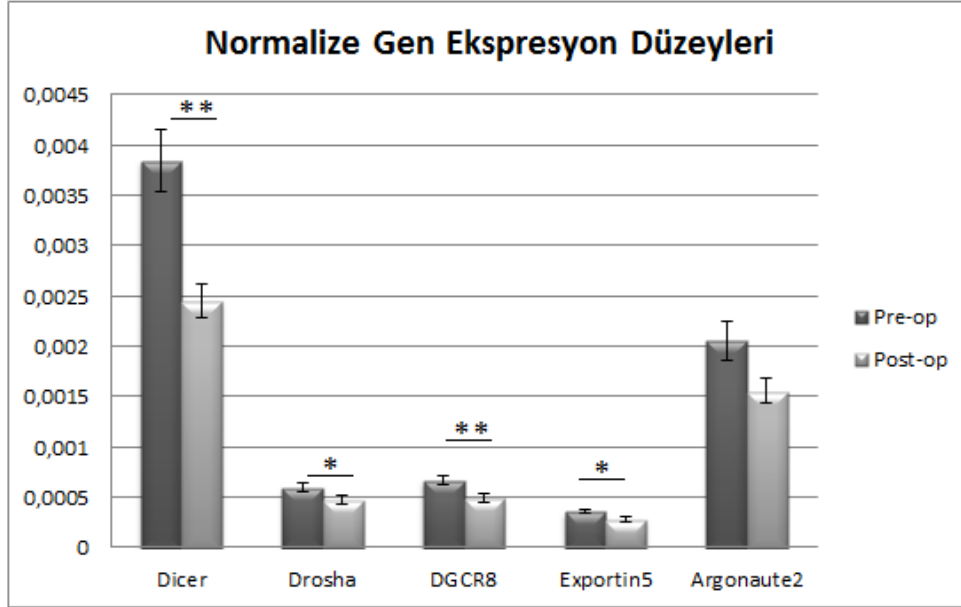
Şekil 4.17. Rejeksiyon görülen hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 gen ekspresyonlarındaki değişim oranları (fold regulation) (H13-kronik rejeksiyon, H22, H23-akut rejeksiyon)

Rejeksiyon görülen hastalardaki gen ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.18) ($p=0,11$). Bu hastalarda nakil sonrası 3. ayda Dicer gen ekspresyonu 1,8 kat, Drosha gen ekspresyonu 1,7 kat, DGCR8 gen ekspresyonu 2,1 kat, Exportin5 ve Argonaute2 gen ekspresyonları 1,9 kat azalmıştır.



Şekil 4.18. Rejeksiyon görülen hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 genlerinin β -actin ile normalize edilmiş ekspresyon düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. ($p=0,11$, $n=3$)

Rejeksiyon görülmeyen hastalar için yapılan istatistiksel analizler sonucu Dicer, Drosha, DGCR8 ve Exportin5 için anlamlı bir azalma görülmüş ancak Argonaute2 gen ekspresyonunda görülen azalma anlamlı bulunamamıştır (p=0,10) (n=13) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Rejeksiyon görülmeyen hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 genlerinin β -actin ile normalize edilmiş ekspresyon düzeyleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (* p<0,05, ** p<0,01, Argonaute2 p=0,10, n=13)

TARTIŞMA

Günümüzde tespit edilmiş yaklaşık 1200 adet miRNA'nın, primer miRNA'dan olgun miRNA'ya gidiş sürecinde görev alan proteinlerden herhangi birindeki eksiklik veya farklılık, gen ekspresyon düzeyinde anlamlı etkiler göstererek miRNA'lardan bir ya da birkaçının ve hatta bazı durumlarda tüm miRNA profilinin sentezine etki etmektedir. Bu komponentlerdeki ekspresyon artışı veya azalışı hem tek başlarına hem de miRNA biyogenezini etkilemeleri sebebiyle önem taşımaktadır. Organ nakli yapılacak hasta seçimi, immünsüpresan seçimi, nakil sonrası greftin sağkalım sürecinin takibi için miRNA biyogenez komponentlerinin önemli yeri olabilir. Bu özellikleriyle miRNA'lar ve olgun miRNA oluşumunda görevli moleküller, organ nakli için biyobelirteç olabilmeleri yanı sıra önemli farmakolojik hedefler olarak da karşımıza çıkmaktadır.

Böbrek naklinde klinik özelliklerin ve biyopsi sonuçlarının ortaya koyduğu fenotiplerin yani greftin akıbetinin biyobelirteçler aracılığıyla önceden tahmini ve doğru bir şekilde sınıflandırmasının sağlanması transplantasyon alanındaki hedeflerin başında gelmektedir. Biyobelirteçler sayesinde hastanın durumunun belirlenmesi, uzun dönem immünsüpresif tedavinin önlenmesi veya kişiselleştirilmiş immünsüpresif tedavi uygulanması sağlanabilir. Bu da hastaların immünsüpresiflerin toksik etkilerine uzun dönem maruz kalmalarını engelleyebilecektir.

miRNA'lar immün sistem, homeostazi, immün hastalıklar, fizyolojik olayların düzenlenmesi gibi pek çok önemli role sahip küçük RNA molekülleridir. Otoimmün hastalıklar ve kanser gibi immün sistemle ilişkili hastalıklarda, miRNA ekspresyonlarında görülen değişimin etkisi olduğu ancak mekanizmasının henüz çözülemediği bilinmektedir. Yapılan sınırlı sayıdaki miRNA ekspresyon profillemesi çalışmaları, miRNA'ların organ nakli hastalarının klinik evrelendirilmesi ve greft akıbetinin öngörülmesi amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

Böbrek nakli hastalarında yapılan bir gen ekspresyon çalışmasında PKMH'lerde ekspresyon değişikliği görülen genlerin çoğunlukla immün sistemde görevli genler olduğu, biyopsilerde ve PKMH'lerdeki ekspresyon değişimlerinin örtüşmediği rapor edilmiştir. PKMH'lerdeki gen ekspresyon profillerinin normal böbrekte ve fonksiyonu normal seyreden böbrek greftlerinde farklı olmasının transplantasyonu, immüniteyi ve immünsüpresanların etki mekanizmalarını tanımlamaya yardımcı olabileceği belirtilmiştir [36].

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda organ nakli hastalarında miRNA biyogenezinde görevli komponentlerin ekspresyon profilleri ilk kez gösterilmiştir. 18-60 yaş arası 16 böbrek nakli alıcısının nakil öncesi hiçbir immünsüpresan tedavi almadan ve nakil sonrası 3. ay dönemlerindeki, miRNA biyogenez komponentlerinin ekspresyon değişimlerinin mRNA ve protein düzeyinde gösterilmesi hedeflenmiştir. Literatür çalışmaları PKMH'lerdeki ekspresyon değişimlerinin invaziv bir girişime

gerek kalmadan böbrek fonksiyonu, immünsüpresanların etkisi, greftin akıbeti ile ilgili fikir verebileceğini göstermektedir. Biz de çalışmamızda, seçilen komponentlerin ekspresyonlarını PKMH'lerde inceledik.

Pri-miRNA'nın kesilerek pre-miRNA'ya dönüşümünü sağlayan RNaz III ailesinden bir enzim olan Drosha ve kofaktörü DGCR8, pre-miRNA'nın çekirdek dışına çıkmasını sağlayan Exportin5, pre-miRNA'nın sitoplazmada kesilerek dupeks yapı oluşturmalarını sağlayan, yine RNaz III ailesinden bir enzim olan Dicer ve kararlı miRNA zincir seçilimini sağlayan Argonaute2 komponentlerinin ekspresyon düzeylerinin değişimleri araştırılmıştır.

Ekspresyon düzeylerini mRNA düzeyinde göstermek için real-time (gerçek zamanlı) RT-PCR ve protein düzeyinde göstermek için de Western Blot teknikleri kullanılmıştır. Bu teknikler halen ekspresyon çalışmalarındaki altın standart yöntemler olarak kabul görmektedir. Real-time RT-PCR, uygun primer kullanımı ile çok spesifik sonuçlar vermektedir. Son yıllarda tüm ekspresyon profilini göstermek için kullanılan mikrodizin (microarray) sonuçlarının validasyonu için de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemler sayesinde seçilen komponentlerin hem mRNA hem de protein ekspresyon seviyeleri gösterilmiş ve birbirleriyle kıyaslama fırsatı yakalanmıştır.

Böbrek nakli alıcılarında immünsüpresanların etkisiyle görülen değişimin gösterilmesi hedeflenmiş ancak 3 hastada rejeksiyon görülmesiyle, rejeksiyon durumundaki ekspresyon değişimlerinin gözlenmesi de mümkün olmuştur. İki olguda akut rejeksiyon, bir olguda ise kronik rejeksiyon seyretmiş ve greft kaybıyla sonuçlanmıştır.

Tez çalışmamızda yer alan tüm hastaların PKMH'lerindeki protein ekspresyon düzeyleri gösterilmiş ve Exportin5 için değişim görülmemiş, diğer komponentler için azalma gerçekleşmiştir. Exportin5 protein ekspresyonunun değişmemesi, hastaların bir kısmında azalma görülürken bir kısmında artış görülmesine bağlı olabilir. Argonaute2'de seyreden azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Argonaute proteinin miRNA biyogenezindeki önemli rolleri göz önüne alındığında bu proteinin azalmasının, miRNA'ların hedefleri olan mRNA moleküllerinin post-transkripsiyonel regülasyonlarını gerçekleştirmede aksaklığa sebep olacağını tahmin etmek zor değildir.

Western blot sonuçları her hasta için tek tek incelendiğinde protein ekspresyonlarındaki değişimin tüm hastalarda aynı seyretmediği görülmüştür. Genel ekspresyon profilinde azalma görülmesine rağmen belirgin ekspresyon artışı gözlenen olgular olmuştur. Bunlar Dicer için H3, H11, H15, H19; Drosha için H3, H4, H5, H15, H19; DGCR8 için H3, H4, H5, H13, H15, H17, H19; Exportin5 için H4, H11, H14, H17, H21, H23 ve Argonaute2 için H3, H13, H15'tir. Görüldüğü gibi Dicer, Drosha, DGCR8 ve Argonaute2 protein ekspresyon artışları için ortak olgular bulunmaktadır. H3, H13, H15 ve H19 olgularında rastladığımız ekspresyon artışları, bu hastaların diğer hastalardan farklı özellikleri olduğunu düşündürmektedir. Hastaların elimizde olan bilgileri karşılaştırılmış ancak bir benzerlik görülemedi. Bu durum hastaların demografik farklılıklarından, HLA uyumlarından, donörlerin

akrabalık derecesinden, tanı farklarından kaynaklanıyor olabilir. Bu olguların daha uzun zaman dilimi içinde takip edilmesi, daha iyi bir sonuç elde edilmesini sağlayabilir.

Böbrek nakli hastalarındaki gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde tüm hastalarda her gende istatistiksel olarak anlamlı azalmaya rastlanmıştır. Bu sonuç immünsüpresanların miRNA biyogenezindeki global etkisini göstermesi açısından büyük önem taşımaktadır. Greftin akıbetiyle ilişkili olarak değişen miRNA ekspresyon profilleri göz önüne alındığında bu durum beklenen bir sonuçtur [4, 5, 31, 37].

Çalışmamızdaki hastalara uygulanan immünsüpresan grupları rejeksiyon gerçekleşen hastalar da dahil olmak üzere 14 hastada Tac+MFA ve iki hastada Tac+Eve+MFA'dır. İlk basamak olarak ilaç gruplarının protein ekspresyon değişimleri ile ilişkisi olup olmadığı incelenmiştir. Tac+MFA grubu ilaç kullanan hastalarda Drosha ve Exportin5'te değişim görülmemiş, diğer komponentlerin ekspresyonlarında ise azalma görülmüştür. Argonaute2'nin protein düzeyindeki ekspresyonunda karşımıza çıkan azalma anlamlı bulunmuştur. Tac+Eve+MFA kullanan hastalarda ise Dicer ve Exportin5 ekspresyonlarında değişim görülmemiş diğer protein ekspresyonları ise azalmıştır. Bu ilaç grubunu kullanan iki olgunun Dicer ve Exportin5 ekspresyonları incelendiğinde bir olguda artış, diğerinde ise azalma görülmüştür. Dolayısıyla bu farklılıklar ile Everolimus kullanımı arasında bir ilişki kurulamamıştır. Bu değişikliğin hastaların demografik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu iki gruptaki gen ekspresyon değişimleri incelendiğinde, Tac+MFA grubu ilaç kullanımının tüm gen ekspresyonlarında anlamlı azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Bu immünsüpresanların miRNA biyogenezi üzerindeki global etkisini göstermektedir. Tac+Eve+MFA grubunda ilgi çekici sonuçlar elde edilmiştir. Dicer ekspresyonu değişmemiş, Argonaute2 ekspresyonunda ise artış görülmüştür. Bu durum Everolimus'un bu genlerin ekspresyonu üzerinde diğer ilaçlardan farklı bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Yine de bu kadar az sayıda hasta için ilacın bu komponentler üzerindeki etkisi ile ilgili bir çıkarım yapmak şu aşamada mümkün değildir.

İkinci basamak olarak rejeksiyon görülmeyen hastaların ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. Tüm hastalar için bulunan tablo ile karşılaşıldı. Exportin5'in protein ekspresyonunda değişim görülmezken, diğer komponentlerin ekspresyonlarında azalma, Argonaute2 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. Gen ekspresyon düzeyleri de her gen için azalma gösterdi.

Rejeksiyon görülen hastaların ekspresyon değişimlerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum hem akut ve kronik rejeksiyon görülen hastaların bir arada incelenmesinden hem de sayının çok küçük olmasından kaynaklanıyor olabilir. Protein ekspresyon değişimlerini rejeksiyon görülen hastalarda tek tek incelemek daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Kronik rejeksiyon gerçekleşmiş olan H13'te Drosha, DGCR8 ve Argonaute2 protein ekspresyonlarındaki değişim hem normal seyreden hastalardan hem de akut rejeksiyon görülen hastalardan farklıdır. DGCR8

protein ekspresyonunda diğer hastalarda karşılaştığımız azalma yerine bir artış söz konusudur. Drosha ve Argonaute2 ekspresyonunda ise yine bir azalma beklenirken değişim olmadığı görülmüştür. Bu durumda nakil sonrası immünsüpresanların etkisiyle miRNA biyogenezinde olması gereken regülasyonun, kronik rejeksiyon gelişen olguda gerçekleşemediği yorumu yapılabilir. Exportin5 protein ekspresyonu artan ve azalan hastalar bulunduğundan, rejeksiyon görülen hastalarda bu protein için yorum yapılamamaktadır.

Protein ekspresyonunda azalma beklenen Argonaute2'nin kronik rejeksiyon gerçekleşmiş olan H13'te değişim göstermemesi ve DGCR8'in artış göstermesi, Argonaute2'nin ve DGCR8'in kronik rejeksiyon için biyobelirteç olarak kullanılabileceğini, kronik rejeksiyon gerçekleşmiş hasta sayısının artması ile anlamlı bir sonuç bulunabileceğini düşündürmektedir.

Akut rejeksiyon görülen hastalarda rejeksiyon görülmeyen profile benzer bir tablo ortaya çıkmasının yanında akut rejeksiyon gelişen olgu H23'te Exportin5'te görülen artış, Exportin5'in akut rejeksiyon için hedef bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Rejeksiyon gerçekleşmiş hastaların gen ekspresyonları post-op 3. ayda yaklaşık 2 kat azalma göstermiştir. Kronik rejeksiyon gerçekleşmiş olan H13'te görülen azalma katsayılarının diğer hastalarda görülenlerden daha fazla olduğu göze çarpmıştır. miRNA biyogenez komponentlerinde mRNA düzeyinde gerçekleşmiş olan daha büyük orandaki bu azalma kronik rejeksiyon gelişmesiyle ilişkili olabilir.

miRNA biyogenez komponentlerindeki ekspresyon değişimlerinin kanserin seyri ile ilişkilendirilebileceğini gösteren çalışmalarda hasta sayılarının 100'den fazla olduğu görülmüştür [34, 38]. Biz de daha geniş kapsamlı bir çalışma ile ekspresyon değişimlerini etkileyen faktörleri tanımlama şansına erişebiliriz.

Böbrek nakli hastalarının miRNA profilini gösteren çalışmalar, spesifik miRNA'ların ekspresyon değişimlerinin akut rejeksiyonun önceden tahmininde veya tedavisinde kullanılabileceğini, farklı rejeksiyon türlerinde farklı miRNA profilleri olduğunu göstermiştir [4, 5, 31]. 2012 yılında yapılan bir çalışmada tolerans sağlanmış hastalarda PKMH'lerde immünsüpresan kullanan hastalara kıyasla miR-142-3p'nin ekspresyonunda artış bildirilmiştir [37]. Dolayısıyla greftin akıbetini belirleyebilmek ve rejeksiyon çeşitlerinin ayırt edilebilmesi için miRNA'ların potensiyel terapötik moleküller olduğu öne sürülmektedirler. Ancak bazı çalışmaların sonuçlarının örtüşmemesi henüz bu moleküllerin rutinde kullanılamayacağını ve daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Organ nakli hastalarında miRNA biyogenezinde görevli komponentlerin ekspresyon profili çalışmaları yapılmamıştır. Ancak bu komponentlerdeki mutasyonları veya ekspresyon farklılıklarını başta kanser olmak üzere belirli patolojik durumlarla ilişkilendirilen yayınlar karşımıza çıkmaktadır. Kanser hücrelerinde Exportin5'teki genetik bir bozukluğun, öncü miRNA'ların hücre çekirdeğinde biriktiğini ve normal Exportin5'in ise tümör süpresör etkisinin olduğu gösterilmiştir [35]. Over kanserinde Dicer ve Drosha'nın mRNA ve protein

düzeyinde ekspresyonlarında azalma kanser aşamaları ile, ekspresyonlardaki artış ise sağkalım süresinin artışı ile ilişkili bulunmuştur. Bunların yanı sıra Dicer ve Drosha genlerinde yanlış anlamlı mutasyonlar olduğu gösterilmiştir [34]. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde yine Dicer ve Drosha'nın ekspresyon değişimlerinin histolojik derecelendirme ve sağkalımla ilişkili olabileceği belirtilmiştir [38].

SONUÇLAR

Yukarıdaki bilgiler ışığında greftin seyri ile ilişkilendirilecek miRNA ekspresyon çalışmalarının literatürde anlamlı bir yere sahip olduğu görülmüş ancak organ nakli alanında miRNA biyogenez komponentlerinin ekspresyon profilleri çalışmalarının eksikliği farkedilmiştir. miRNA biyogenez komponentleri olgun miRNA oluşmasını sağladıkları için greftin akıbetini göstermek açısından anlamlı olabilir. Bu yüzden olgu sayısı açısından tek başına yeterli olmamakla beraber, çalışmamız böbrek nakli hastalarında miRNA biyogenez komponentlerinin ekspresyon profillerinin ve bu ekspresyonların kullanılan immünsüpresan ilaçlarla etkileşiminin gösterildiği ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır.

Çalışmamıza dahil edilen böbrek nakli olgularında greft fonksiyonları normal seyreden hastalarda, miRNA biyogenezinde görevli başlıca komponentlerden olan Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 ekspresyonlarında görülen azalmalar, rejeksiyonun gerçekleşmeyeceğinin veya belki de toleransın sağlanacağını göstergesi olarak klinikte kullanılabilir. Rejeksiyon gelişmiş olgularda, greft fonksiyonları normal seyreden olgulardan farklı olduğu gözlenen DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 molekülleri, rejeksiyon gelişimini öngören potansiyel biyobelirteçler olabilir.

Sonuç olarak, literatürden elde edilen bilgiler doğrultusunda çalışmamızda hedef olarak belirlediğimiz ve istatistiksel olarak anlamlı bulgular ile tartıştığımız miRNA biyogenez komponentleri olan Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 moleküllerinin böbrek nakli vakalarında ekspresyon değişimlerini etkileyen faktörleri tanımlamak, bu değişiklikleri greftin akıbeti ile ilişkilendirebilmek ve bu moleküllerin immünsüpresan seçiminde yardımını anlamlı olarak gösterebilmek için vaka sayısı açısından daha geniş kapsamlı ve vakaların daha uzun süre takip edildiği çalışmalara gerek olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Roedder, S., et al., *Biomarkers in solid organ transplantation: establishing personalized transplantation medicine*. Genome Med, 2011. **3**(6): p. 37.
2. Sarma, N.J., et al., *Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA*. Exp Mol Pathol, 2012. **93**(3): p. 378-85.
3. Mas, V.R., et al., *MicroRNAs as biomarkers in solid organ transplantation*. Am J Transplant, 2013. **13**(1): p. 11-9.
4. Sui, W., et al., *Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation*. Transpl Immunol, 2008. **19**(1): p. 81-5.
5. Anglicheau, D., et al., *MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5330-5.
6. Danger, R., et al., *Expression of miR-142-5p in peripheral blood mononuclear cells from renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60702.
7. Zhang, M., et al., *MicroRNA-155 may affect allograft survival by regulating the expression of suppressor of cytokine signaling 1*. Med Hypotheses, 2011. **77**(4): p. 682-4.
8. Fedeli, M., et al., *Dicer-dependent microRNA pathway controls invariant NKT cell development*. J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2506-12.
9. Liston, A., et al., *Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 1993-2004.
10. Danovitch, G.M., *Handbook of Kidney Transplantation*. 2010.
11. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. Crit Care, 2007. **11**(2): p. R31.
12. www.thsk.saglik.gov.tr
13. Seyahi, N., et al., *Türkiye’de Renal Replasman Tedavilerinin Güncel Durumu: Türk Nefroloji Derneği Kayıt Sistemi 2014 Yılı Özet Raporu*. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 2015. **24**(1): p. 10-16.
14. Erek, E., G. Suleymanlar, and K. Serdengeçti, *Nephrology, dialysis and transplantation in Turkey*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(12): p. 2087-93.

15. A., M.D. and M.H. Sayegh, *Transplantation Immunology*, in *Handbook of Kidney Transplantation*, G.M. Danovitch, Editor. 2010.
16. Morath, C., et al., *Clinical relevance of HLA antibody monitoring after kidney transplantation*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 845040.
17. Warren, E.H., et al., *Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT*. Blood, 2012. **120**(14): p. 2796-806.
18. Male, D., et al., *İmmünoloji*. 2008: Elsevier Limited.
19. Duranay, M., et al., *Renal Transplantasyon Oncesi Alici Adayinin Degerlendirilmesi*, in *Bobrek Transplantasyonu El Kitabı*, S. Sert, Editor. 2001, Bilimsel Tip Yayınevi: Ankara.
20. Khan, F.H., *The Elements of Immunology*. 2009: Pearson.
21. Ravindra, K.V., et al., *Composite tissue transplantation: a rapidly advancing field*. Transplant Proc, 2008. **40**(5): p. 1237-48.
22. Duranay, M., et al., *Renal Transplantasyonda Immunsupresif İlaclar*, in *Bobrek Transplantasyonu El Kitabı*, S. Sert, Editor. 2001.
23. Yenicesu, M., *Bobrek Transplantasyonu*, in *Nefroloji*, N. Arik, Editor. 2001.
24. Bestard, O., et al., *Biomarkers in renal transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(4): p. 467-73.
25. Sawitzki, B., et al., *Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance*. American Journal of Transplantation, 2007. **7**(5): p. 1091-1102.
26. Brown, K., et al., *Ultra-localization of Foxp3(+) T cells within renal Allografts shows infiltration of tubules mimicking rejection*. American Journal of Pathology, 2007. **171**(6): p. 1915-1922.
27. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
28. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
29. Zhu, S., W. Pan, and Y. Qian, *MicroRNA in immunity and autoimmunity*. J Mol Med (Berl), 2013. **91**(9): p. 1039-50.

30. *Kanserin Erken Tanisinda Moleküler Altyapi Laboratuvarinin Olusturulmasi Projesi*. 2012, Mersin.
31. Wilflingseder, J., et al., *miRNA profiling discriminates types of rejection and injury in human renal allografts*. Transplantation, 2013. **95**(6): p. 835-41.
32. Li, H., et al., *Reduced expression of MIR409-3p in primary immune thrombocytopenia*. Br J Haematol, 2013. **161**(1): p. 128-35.
33. Zhang, N. and M.J. Bevan, *Dicer controls CD8(+) T-cell activation, migration, and survival*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(50): p. 21629-21634.
34. Merritt, W.M., et al., *Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(25): p. 2641-50.
35. Melo, S.A., et al., *A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells*. Cancer Cell, 2010. **18**(4): p. 303-15.
36. Flechner, S.M., et al., *Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes*. Am J Transplant, 2004. **4**(9): p. 1475-89.
37. Danger, R., et al., *Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(4): p. 597-606.
38. Diaz-Garcia, C.V., et al., *DICER1, DROSHA and miRNAs in patients with non-small cell lung cancer: implications for outcomes and histologic classification*. Carcinogenesis, 2013. **34**(5): p. 1031-8.

ÖZGEÇMİŞ

Esra ÇELEN 1988 yılında Ankara’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Alanya’da tamamladı. 2006 yılında Alanya Ayşe Melahat Erkin Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü 2011 yılında tamamladı. Budapeşte Semmelweis Üniversitesi Tıp Okulu’nda Biyokimya bölümünde stajını gerçekleştirdi. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce’dir.