



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

**DOKTORA
TEZİ**

**BÖBREK NAKLI OLAN HASTALARDA
ORGAN REDDİNDE miRNA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

OKTAY SÖZER

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2018



**BÖBREK NAKLI OLAN HASTALARDA ORGAN REDDİNDE
miRNA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Oktay SÖZER

**DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2018

Oktay SÖZER tarafından hazırlanan “Böbrek nakli olan hastalarda organ reddinde miRNA etkilerinin araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Vedat BULUT

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan : Prof. Dr. Ayşegül Atak YÜCEL

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

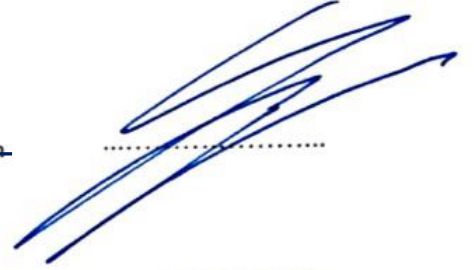
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI

Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

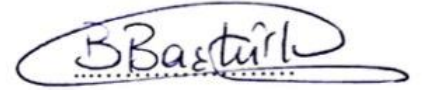
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK

İmmünoloji Anabilim Dalı, Başkent Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Cemalettin AYBAY

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 22 / 06 / 2018

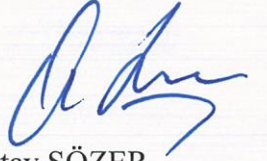
Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Oktay SÖZER

22.06.2018

BÖBREK NAKLI OLAN HASTALARDA ORGAN REDDİNDE miRNA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Oktay SÖZER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2018

ÖZET

Böbrek Transplantasyonu yapılan hastalardaki en büyük engel, nakil sonrası böbrek fonksiyonlarının izlenmesi için spesifik bir biyobelirtecine olmamasıdır. Mevcut altın standart biyopsi örneklerinin histolojik incelenmesidir. Greft fonksiyonunu izlemek için rutin olarak serum kreatinin (Cr), tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR) ve/veya proteinüri gibi ilave belirteçler kullanılır. Ancak, mevcut yöntemler ya etkisiz, hatalı ya da invaziftir ve sonuçların tahmininde kısıtlamalardan etkilenmektedir. Mikro RNA'lar (miRNA) yaklaşık 19-25 nükleotid uzunluğunda kodlanmayan RNA'lardır. miRNA'lar, genleri posttranskripsiyonel seviyede düzenleyerek birçok hücresel işlevde görev yapmalarının yanı sıra DNA ve protein biyosentezi ve aktivitesinde; hücre regülasyonu ve patogeneizde temel bir rol oynarlar. Günümüzde miRNA'lar üzerinde, böbrek naklinde, iskemi-reperfüzyon yaralanmalarında, humoral rejeksiyon ve viral enfeksiyon gibi durumlarda tanısal, prognostik belirteç ve potansiyel terapötik hedef olarak çalışılmaktadır. Gelecekte böbrek allogreft alıcılarının izlenmesinin, biyolojik sıvılardan yapılacak genom çapında miRNA profillemesi ile mümkün olacağı düşünülmektedir. Bu doğrultuda, miRNA çalışmalarının organ naklindeki önemi daha da artmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda bazı miRNA'ların böbrek nakli sonrası oluşan rejeksiyonlarda biyobelirteç olma potansiyeli bulunduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, 100 böbrek nakli yapılmış hastada [%50'si rejeksiyon olan hasta (n=50) ve %50'si rejeksiyonu olmayan hasta (n=50)] böbrek rejeksiyonu ile ilişkili 9 miRNA (hsa-miR-32-5p / hsa-miR-142-5p / hsa-miR-146a-5p / hsa-miR-150-5p / hsa-miR-181a-2-3p / hsa-miR-181b-5p / hsa-miR-192-5p / hsa-miR-210-3p and kontrol miRNA small nucleolar RNA , C/D box61) analiz edilmiştir. Çalışmalar serum örneklerinde belirleme ve kantitasyon için Gerçek Zamanlı PCR metodu kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamızın sonucunda rejeksiyonu olan hasta grubunda mir-142-5p ve miR-192-5p ifadelerinde belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir.

BilimKodu : 1039.2

AnahtarKelimeler : Böbrek nakli, organ reddi, miRNA

Sayfa Adedi : 80

Danışman : Prof. Dr. Vedat BULUT

INVESTIGATION OF miRNA EFFECTS ON ALLOGRAFT SURVIVAL IN PATIENTS WITH KIDNEY TRANSPLANT

(Ph.D. Thesis)

Oktay SÖZER

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2018

ABSTRACT

A major obstacle in the management of kidney transplant recipients is the lack of specific biomarkers for continuous monitoring of graft function post-kidney transplantation (KT). The current gold standard is the histological evaluation of biopsies. Additional markers such as serum creatinine (Cr), estimated glomerular filtration rate (eGFR) and/or proteinuria are routinely used to monitor graft function. Unfortunately, these currently available methods are either ineffective, inaccurate or invasive and suffer from limitations in predicting outcomes. Micro RNAs (miRNA) are non-coding RNAs that are approximately 19 – 25 base long. miRNAs are responsible of DNA and protein biosynthesis and function as well as cell regulation and pathogenesis via posttranscriptional regulations of the genes. miRNAs can be used as a diagnostic, prognostic and therapeutic tool in different medical circumstances such as kidney transplantation, ischemia-reperfusion injuries, humoral rejection and viral infections. In the long view, follow-up of kidney transplantation patients will be possible by genome-wide miRNA profiling from different biological samples. Hereby miRNA studies have a greater importance in organ transplantation. Previous studies have shown that some miRNA's are potential biomarker in kidney rejection of transplantation patients. In this study, we evaluated the kidney rejection related 9 miRNAs (hsa-miR-32-5p / hsa-miR-142-5p / hsa-miR-146a-5p / hsa-miR-150-5p / hsa-miR-181a-2-3p / hsa-miR-181b-5p / hsa-miR-192-5p / hsa-miR-210-3p and control miRNA small nucleolar RNA , C/D box61) in 100 patients [%50 of 100 patients (n=50) had rejection and %50 (n=50) had no rejection] who had kidney transplantation. We performed the assay on serum/ plasma samples with using Real-Time PCR methods for detection and quantification. As a result of our study we observed significant differences in miR142-5p and miR192-5p expressions in the patient groups.

ScienceCode : 1039.2

KeyWords : Renal transplantation, graft rejection, miRNA

Page Number : 80

Advisor : Prof. Dr. Vedat BULUT

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başladığım andan itibaren hem bilimsel hem de kişisel gelişimimde desteklerini hep yanımda hissettiğim, eğitimde bilimsellik kadar iyi insan olmanın da ne kadar değerli olduğunu öğrendiğim danışmanlarım Prof. Dr. Vedat BULUT ve Başkent Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK'e;

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimleri ile katkı sağlayan, tez izleme komitesinde yer alan Prof. Dr. Cemaletin AYBAY başta olmak üzere tüm Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL'e;

Çalışmalarım süresince her konuda desteklerini esirgemeyen Başkent Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı başta olmak üzere Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi yönetimine, Başkent Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Aytül NOYAN, Doç. Dr. Rüya ÖZELSANCAK ve Doç. Dr. Kenan ÇALIŞKAN'a;

Laboratuvar çalışmalarında özveri ile beni destekleyen Bio. Bircan KANTAROĞLU ve Bio. Miray KAVUZLU başta olmak üzere tüm Başkent Üniversitesi Adana Araştırma ve Uygulama Hastanesi İmmunoloji ve Doku Tipleme Laboratuvarı çalışanlarına;

Çalışmalarım sırasında en büyük destekçilerim olan Eşime, aileme ve özellikle de uzun çalışma saatleri nedeniyle çoğu zaman yanında olamadığım çocuklarım Efe ve Berke'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:KA14/329) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Oğullarım'a

Uz.Biyolog.Oktay Sözer

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Böbrek Nakli	7
2.1.1. Böbrek nakli endikasyonları ve kontrendikasyonları.....	7
2.1.2. Böbrek naklinde doku (HLA) uyum.....	8
2.1.3. Böbrek nakli sonrası böbrek fonksiyon bozukluğu.....	11
2.1.4. Böbrek naklinde rejeksiyon.....	12
2.1.5. Böbrek nakli sonrası immünsüpresyon, özellikleri ve etki yerleri.....	13
2.2. MikroRNA (miRNA).....	16
2.2.1. Olgun miRNA'nın oluşumu.....	17
2.2.2. miRNA biyosentezi yolağında görev alan moleküller.....	24
2.2.3. miRNA işlevleri	25
2.2.4. Mitokondrideki miRNA'lar	26
2.2.5. miRNA'lar da kelebek etkisi.....	27

	Sayfa
2.2.6. miRNA'ların kullanım alanları ve hastalıklar ile ilişkileri	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Kitler.....	31
3.1.2. Cihazlar	31
3.2. Çalışma Grubu.....	32
3.2.1. Çalışma etik kurul onayı ve onamlar	32
3.2.2. Çalışma grubunun özellikleri ve verileri.....	32
3.2.3. Hastaların çalışmaya dâhil edilme koşulları	34
3.2.4. Hastaların çalışmadan dışlanma koşulları.....	35
3.2.5. Sağlıklı kontrol grubunun çalışmaya dâhil edilme koşulları.....	35
3.2.6. Hastaların klinik izlemi ve takibi.....	35
3.3. Çalışma Metodu.....	35
3.3.1. Serum örneği toplanması.....	35
3.3.2. Serum örneklerinin saklanmasıve çalışma öncesi hazırlanması	35
3.3.3. Serum örneklerinden miRNA izolasyonu.....	35
3.3.4. miRNA'dan komplementer DNA (cDNA) eldesi	36
3.3.5. Q-PCR (Real Time-PCR, Gerçek zamanlı-PCR).....	37
3.3.6. Veri analizi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ analizi ile kat değişimlerinin hesaplanması).....	37
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53

	Sayfa
KAYNAKLAR	55
EKLER.....	63
EK-1.....	64
EK-2.....	65
EK-3.....	70
EK-4.....	74
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Kronik böbrek hastalığı tanı kriterleri (Aşağıdaki kriterlerden biri varsa KBH tanısı konulmaktadır)	2
Çizelge 1.2. Kronik Böbrek Hastalığı evreleri.....	3
Çizelge 1.3. Kronik böbrek yetersizliğinin klinik bulguları	5
Çizelge 1.4. Kronik böbrek hastalığı etyolojileri	6
Çizelge 2.1. Mitokondride Bulunan miRNA Tipleri	27
Çizelge 2.2. miRNA ve İmmün sistem	29
Çizelge 3.1. Kullanılan kitler	31
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar	32
Çizelge 3.3. Çalışma grubunun dağılım özellikleri	33
Çizelge 3.4. Donör dağılım özellikleri	33
Çizelge 3.5. Donör dağılım özellikleri.....	33
Çizelge 3.6. HLA Uyumu hasta	34
Çizelge 3.7. HLA Uyumu kontrol.....	34
Çizelge 3.8. Rejeksiyon Tipi.....	34
Çizelge 3.9. RT-PCR için bileşenler ve miktarları	37
Çizelge 3.10. qRT-PCR için kullanılan bileşenlerin oranları	37
Çizelge 3.11. qRT-PCR Tepkime Koşulları	38
Çizelge 3.12. MiRNA Listesi (miRNA dizinleri ile birlikte).....	39

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. MHC lokusunun insan MHC (HLA kompleksi) ve fare MHC (H2 kompleksi) bölgelerinin şematik haritası	10
Şekil 2.2. Kurallı yolda üç ana aşama	21
Şekil 2.3. Kurallı ve kuralsız yola arasındaki farklar.....	22
Şekil 2.4. miRNA oluşum yolağı.....	23
Şekil 2.5. miRNA isimlendirilmesi.....	24
Şekil 2.6. miRNA- RISC kompleksi.....	25
Şekil 2.7. Mikro RNA hedef tanıma mekanizması	26
Şekil 4.1. Böbrek nakli olan hastalarda miR32 nin ekspresyon dağılımı	41
Şekil 4.2. Böbrek nakli olan hastalarda miR142-5p nin ekspresyon dağılımı.....	42
Şekil 4.3. Böbrek nakli olan hastalarda miR146a nin ekspresyon dağılımı	43
Şekil 4.4. Böbrek nakli olan hastalarda miR150 nin ekspresyon dağılımı	44
Şekil 4.5. Böbrek nakli olan hastalarda miR181a nin ekspresyon dağılımı	45
Şekil 4.6. Böbrek nakli olan hastalarda miR181b nin ekspresyon dağılımı	46
Şekil 4.7. Böbrek nakli olan hastalarda miR192 nin ekspresyon dağılımı	47
Şekil 4.8. Böbrek nakli olan hastalarda miR210 nin ekspresyon dağılımı	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
----------	-------------

μL	Mikrolitre
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
M	Mol
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng/μl	Nanogram/mikrolitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
rpm	Devir/dakika
sn	Saniye

Kısaltmalar	Açıklamalar
-------------	-------------

ABO	Kan grubu A, B, O
ALG	Anti-lenfosit globulin
ATG	Antitimosit globulin
CD	Cluster of Differentiation
DNA	Deoksiribo nükleik asit
GGF	Gecikmiş greft fonksiyonu
GFH	Glomerüler Filtrasyon Hızı
HLA	Human lökosit antijen
IL	Interleukin
KBH	Kronik Böbrek Hastalığı
MHC	Major histocompatibility complex
Kısaltmalar	Açıklamalar

MMF	Mikofenolat mofetil
MPA	Mikofenolik Asit
miRNA	Mikro RiboNükleik Asit
NKF	National Kidney Foundation
K/DOQ1	National Kidney Foundation
UKAME	Ulusal Koordinasyon Ağı

1. GİRİŞ

Böbrek nakli, böbrek artık işlevlerini yerine getiremediğinde gönüllü vericinin böbreğinin, alıcıya uygun olduğunda, vericiden alınan sağlıklı böbreğin alıcıya cerrahi operasyonla nakil işlemidir. Günümüzde böbrek yetmezliği olan hastaların tedavisinde kullanılan en etkili tedavi şeklidir [1].

Böbrek transplantasyonu 1954 ilk kez yılında yapılmıştır. İlk nakilden başlayarak organ nakilleriyle ilgili çalışmalar hızla artmış ve başarılı bir nakil için immünolojik mekanizmalar ışığında yeni tanı ve tedavi yöntemleri eklenerek günümüz transplantasyon pratiğinin oluşması sağlanmıştır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılı verilerine göre 126.670 organ nakli rapor edilmiş olup, bu nakillerin 84347'si böbrek naklidir. T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2015 yılında 3204, 2016 yılında 3423 ve 2017 yılında 3339 böbrek nakli yapılmıştır. 2015, 2016 ve 2017 yıllarında yapılan bu nakiller sırasıyla 670, 784 ve 693 kadavradan, 2534, 2639 ve 2646'sı canlı donörden yapılmıştır.

Kronik Böbrek Hastalığı

Kronik böbrek hastalığı (KBH) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sık görülen, böbreğin yapısını veya işlevlerini etkileyen ve pek çok hastalığı içeren genel bir terimdir. Bu genel terim renal veya sistemik hastalıklar neticesinde ortaya çıkan, üç ay ve daha uzun süreli böbrek hasarı ya da glomerüler filtrasyon hızının (GFH) 60 ml/dak/1,73 m²'nin altına düşmesi sonucunda böbrek fonksiyonlarının geri dönüşümsüz kaybı olarak tanımlanmıştır (Çizelge.1) [1-2].

Çizelge 1.1. Kronik böbrek hastalığı tanı kriterleri (Aşağıdaki kriterlerden biri varsa KBH tanısı konulmaktadır) [1-2]

KBH tanı kriterleri
1) GFH azalma olsun ya da olmasın, böbrek hasarı bulgularının 3 ay ya da daha uzun süre var olması (yapısal ya da fonksiyonel böbrek bozukluklarının kanıtlarının olması) a) Böbrek biyopsisinde bozukluk olması b) Kan veya idrar tetkiklerinde bozukluk olması c) Görüntüleme yöntemlerinde böbrekte bozukluk olması d) Böbrek nakli 2) Böbrek hasarı olsun ya da olmasın, altta yatan hastalıktan bağımsız olarak GFH'nın üç ay ya da daha uzun süre 60 ml/dk/1,73m²'nin altına inmesi

2002 yılında National Kidney Foundation (NKF) tarafından KBY tanımı ve evrelemesine ilişkin K/DOQ1 (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) kılavuzunda GFH'nın düzeyine göre 5 evrede sınıflandırılmıştır (Çizelge.2) [4].

1- Böbrek fonksiyonlarında azalma: GFH 50-80 ml/dk arasındadır. Klinik belirti görülmez.

2- Hafif derecede böbrek yetmezliği: GFH 90ml/dk'nın altındadır. sekonder hiperparatiroidizm ve hipertansiyon görülür.

3- Orta derecede böbrek yetmezliği: GFH 30-45/60-89 ml/dk arasındadır. Hafif derecede böbrek yetmezliğindeki belirtilere ek olarak anemi görülür.

4- Ciddi böbrek yetmezliği: GFH 15-29 ml/dk arasındadır. Orta derecede böbrek yetmezliğindeki belirtilere ek olarak belirgin iştahsızlık, su ve tuz tutulumu, kusma ve mental işlevlerde azalma eklenir.

5- Son dönem böbrek yetmezliği: GFH 15 ml/dk'nın altındadır. Ciddi böbrek yetmezliğindeki belirtilere ek olarak konvülziyon, pulmoner ödem, dekompanse asidoz, koma, hiperkalemi ve ölüm eşlik edebilir [3].

Çizelge 1.2. Kronik böbrek hastalığı evreleri [4].

Evre	Tanım	GFH (ml/dak./1,73 m ²)
1	Normal veya ↑	GFH ile böbrek hasarı >90
2	Hafif ↓	GFH ile birlikte böbrek hasarı 60-89
3A	Orta derecede ↓	GFH 45-60
3B	Orta derecede ↓	GFH 30-45
4	Ağır derecede ↓	GFH 15-29
5	Son dönem böbrek yetersizliği	<15

Kronik böbrek hastalığı gelişimsel, genetik, immünolojik, metabolik, travmatik veya infeksiyon gibi birçok farklı nedene bağlı olarak gelişmesine rağmen hepsinin sonucunda ortak bir hasar yolağı oluşur ve ortaya çıkan işlev bozukluğu ilerleyici olur ve bu şekilde seyreder. Bir süre sonra da böbrek yetmezliğinin, klinik ve biyokimyasal bulguları hastalarda ortaya çıkar. Mevcut böbrek fonksiyonları ile hastaların yaşamlarını uzun süre devam edebilmesi için primer olayın ilerlemesi durdurulması gerekir

Ancak, birçok hastada hastalığın kritik bir noktaya gelmesiyle nefronların sayısı iyice azalır ve kanda üre, kreatinin, ürik asit gibi toksik maddelerin düzeyi olguların hayatını tehdit edecek miktarda artar. Son dönem olan ve vücut gereksinimlerini böbreklerin hiçbir şekilde karşılayamadığı bu döneme terminal böbrek yetmezliği denir. Terminal dönemde, Kronik hemodiyaliz, peritoneal diyaliz veya böbrek nakli gibi tedavi seçeneklerinden birinin, hastayı hayatta tutmak için uygulanması gerekir. [5].

Kronik Böbrek Hastalığının Önemi

Kronik böbrek hastalığı ve buna bağlı gelişen son dönem böbrek yetmezliği (hastanın kendi böbreğinin artık fonksiyon görmediği renal replasman yöntemlerine ihtiyaç duyduğu dönem) ülkemizde ve dünyada giderek artmaktadır. Türk Nefroloji Derneği'nin 2015 verilerine göre diyaliz tedavisi gören hasta sayısı 80.000-100.000'dir. Kronik böbrek yetmezliği diyabetes mellitus, hipertansiyon, primer glomerülonefrit, renal arter darlığı, malignensi gibi birçok sebepten dolayı gelişebilir. Kan üre azotu ve kreatinin düzeyinin yükselmesi veya kreatinin klirensinin azalması ile böbrek yetmezliği tanısı konulabilmektedir. Bunların dışında çeşitli görüntüleme ve biyopsi teknikleri de tanıya yardımcı olmaktadır [6-7].

Son dönem böbrek yetmezliği ile sonuçlanan, kronik böbrek hastalığı çoğunlukla böbrek fonksiyonlarında bozulmaya yol açar. Son dönem böbrek yetmezliği çok önemli tıbbi, sosyal ve ekonomik sorunlara neden olmaktadır.

1- Ekonomik sorunlar: Hemodiyaliz hastalarının senelik tedavi masrafı ülkemizde ortalama 25.000 ABD dolardır; halen tedavisi devam eden 60.000 diyaliz hastasının olduğu düşünülür ise bu hastalar tedavisi için 1,5 milyar ABD dolar bütçe ayırmak gerekmektedir. Bu bütçe farklı komplikasyonların tedavisini içermez.

2- Sosyal sorunlar: Kronik böbrek hastalarının büyük bir çoğunluğunda diyaliz veya böbrek nakli gerektiren son dönem böbrek yetmezliği gelişir. Bu tedavi seçeneği çok pahalı olup sağlık güvencesi olmayan bir hastanın karşılaması çok zordur. Buna ek olarak, bu hastalarının sürekli olarak bir diyaliz ve sağlık merkezine bağımlı kalmaları, diğer bir hasta grubu olan periton diyalizi hastalarının tıbbi manipülasyon gereksinimleri, sürekli immunosupresif ilaç kullanan transplant hastaları, bu hastaların günlük aile yaşamlarında önemli problemlere yol açar. Maddi zorluklar sosyal problemlerin olmasına sebep olur.

3- Tıbbi sorunlar: Tüm organ ve sistemlerin etkilendiği son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda, tıbbi problemler çok fazladır. Bu hastalarda genel popülasyona göre beklenen yaşam süresi önemli derecede azalır. Diyaliz olgularında yıllık mortalite oranı %10 ile %25 arasında değişir [4,8].

Kronik Böbrek Hastalığı Epidemiyolojisi ve Etyolojisi

Kronik böbrek hastalığı günümüzde görülme sıklığı hızla artmakta olan bir hastalıktır ve bu hastalıktan etkilenmeyen organ veya sistem hemen hemen yoktur (Çizelge.3).

Çizelge 1.3. Kronik böbrek yetmezliğinin klinik bulguları [5]

SİSTEM	BULGU
Sıvı- Elektrolit Bozuklukları	Hipermagnezemi, hipopotasemi, metabolik asidoz, hipervolemi, hipernatremi, hiponatremi, hipokalsemi, hiperpotasemi, hipovolemi, hiperfosfatemi,
Sinir Sistemi	Uyku bozuklukları, Stupor, demans, koma, konuşma bozuklukları, sersemlik, huzursuz bacak (restless leg), irritabilite, ter fonksiyonlarında bozulma, konsantrasyon bozuklukları, yorgunluk, meningism, sendromu, kramp, tik, tremor, myoklonus, ruhsal bozukluklar
Gastrointestinal Sistem	İştahsızlık, pankreatit, hıçkırık, parotit, gastrit, gastrointestinal kanama, intestinal obstrüksiyon, stomatit, bulantı, kusma, kronik hepatit, motilite bozuklukları, özafajit, perforasyon, asit
Hematoloji ve İmmünoloji	Kanama, anemi, mikrositik anemi, eritrosit fragilitesinde artma, lenfopeni, infeksiyonlara yatkınlık, immün hastalıkların yatışması, aşılarmaya cevapta azalma, kanser, tüberkülin testinde bozulma
Kardiyovasküler Sistem	Aritmi, Perikardit, ödem, kapak hastalığı, hipertansiyon, kardiyomyopati, hızlanmış ateroskleroz,
Pulmoner Sistem	Pulmoner ödem, üremik akciğer, plevral sıvı,
Cilt	Nekroz, tırnak atrofisi, kaşıntı, solukluk, hiperpigmentasyon, gecikmiş yara iyileşmesi,
Metabolik-Endokrin Sistem	Hiperprolaktinemi, hiperürisemi, hiperlipidemi, hipogonadizm, hiperparatiroidi, büyüme geriliği, impotans, malnutrisyon, Glukoz intoleransı
Kemik	Artrit, hiperparatiroidi, amiloidoz , D vitamini metabolizması bozuklukları, Üremik kemik hastalığı
Diğer	Miyopati, hipotermi, üremik ağız kokusu, akkiz renal kistik hastalık, kilo kaybı,yumuşak, doku kalsifikasyonu, karpal tunel sendromu,

KBH' nin epidemiyolojisi ile ilgili veriler hastalığın özellikle erken evrelerinin bulgu vermemesi nedeniyle sınırlıdır. KBH birçok nedenle gelişebilir. Bu nedenlerin sıklığı ülkelere göre değişmektedir. ABD'de son dönem böbrek yetmezliğinin %39'unu diyabetes mellitus, %26'sını hipertansiyon ve %11'ini glomerulonefrit oluşturmaktadır. Türkiye'de son dönem böbrek yetmezliği nedenleri ile ilgili en sağlıklı veriler Türk Nefroloji Derneği tarafından elde edilmiştir. 2011 yılı içinde KBH saptanan olguların etiyolojik dağılımı Çizelge 4'de belirtilmektedir. Ülkemizde Türk Nefroloji Derneği tarafından yapılan CREDİT (Türkiye Kronik Böbrek Hastalığı Prevalans Çalışması) çalışma raporuna göre

2011 yılında KBH saptanan olgularda diabetes mellitus, hipertansiyon ve kronik glomerulo nefrit kronik böbrek hastalığına götüren ilk üç neden olarak bulunmuştur [9,11].

Çizelge 1.4. Kronik böbrek hastalığı etyolojileri [9-10]

Hastalık	Türkiye (%)	Avrupa (%)	ABD (%)
Diyabetes Mellitus	22,8	21,2	44,7
Hipertansiyon	18,1	11,8	28
Glomerülonefrit	14,2	13	7,8
Otomozal Dominant Polikistik böbrek Sendromu	4,9	5,7	2
Kronik İnterstisyel Nefritler	4,5	-	-
Ürolojik Hastalıklar (reflü,taş, obstrük. vb.)	6	2,7	-
Renal amilodizos	2,1	-	-
Nedeni Bilinmeyen	22	20,2	4

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Nakli

Son dönem böbrek yetmezliğinde böbrek nakli en etkin tedavi seçeneğidir. Başarılı böbrek nakillerinin morbiditesi düşüktür. Böbrek nakli hastanın hayat kalitesinin artmasını sağlamakta ve günümüzde sayısı giderek artan merkezlerde başarıyla yapılmaktadır. Böbrek nakli canlıdan ve kadavradan olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir. Canlı donörler genellikle akraba kaynaklıdır. Kadavra donörlerde ise alıcı hasta UKAME (T.C. Sağlık Bakanlığı bünyesindeki Ulusal Koordinasyon Ağı) sistemi tarafından verileceği merkez ve bu merkezde kayıtlı hastalar arasından puanlama sistemiyle seçilmektedir [11-12].

2.1.1. Böbrek nakli endikasyonları ve kontrendikasyonları

Başarılı bir böbrek nakli uzun dönem diyaliz tedavisine göre hastaların yaşam süresi ve hayat kalitesinde artışa yol açan, daha etkili (medikal ve ekonomik olarak) bir tedavi yaklaşımıdır. Dolayısıyla böbrek nakli kontrendikasyon oluşturan durumlar dışında ilk tercih edilmesi gereken tedavi seçeneğidir. Böbrek transplantasyonunun mutlak ve göreceli kontra endikasyonları vardır.

Mutlak kontraendikasyonlar arasında;

- Yüksek perioperatif risk
- Ciddi dönüşümsüz böbrek dışı hastalığının olması
- Aktif madde bağımlılığı
- Yakın zamanda veya metastatik malignitesinin olması
- Aktif enfeksiyon (HIV enfeksiyonu dahil)
- Yaşam beklentisinin 2 yıldan az olması
- Tedaviye uyum göstermeme
- ABO uyumsuzluğu
- Yeni geçirilmiş akut miyokard infarktüsü
- Terminal karaciğer hastalığı
- Tedaviye uyumu ve tedavi onayını kabul edemeyen psikiyatrik hastalıklar

- Hali hazırda uyuşturucu kullanıcıları
- Agresif tekrarlayıcı nativ böbrek hastalığı sayılmaktadır
- T hücre lenfosit crossmatch pozitifliği.

Böbrek naklinin göreceli kontraendikasyonları arasında;

- Serebrovasküler hastalık,
- Morbid obezite,
- Kronik aktif hepatit,
- Koroner arter hastalığı,
- Aktif peptik ülser,
- Ağır periferik arter hastalığı,
- Kompliyansın düşük olduğu mental retardasyon durumları,
- Kontrol altına alınamayan diyabet ve hipertansiyon,
- Hastanın yetersiz sosyal desteğe sahip olması,
- Alt üriner sistem hastalığı,
- Ağır amiloidoz ve inatçı üriner enfeksiyonları [13-15].

2.1.2. Böbrek naklinde doku (HLA) uyumu

Böbrek naklinde, nakledilen organın yaşamlılık süresi açısından doku uyumu çok önemlidir [16]. Antijenlerin antijen sunan hücreler aracılığıyla hücrelere sunulması sonucunda, antijenleri tanıyan hücreler immün yanıtları oluşturur. Bu sunum için antijenler özelleşmiş hücresel yapılar aracılığıyla hücrelere sunulur. “Major Doku Uyumluluğu Kompleksi” (Major Histocompatibility Complex= MHC) diye isimlendirilen bu özel hücresel yapı, antijen sunumunda rol alır. MHC molekülleri ilk olarak insanlarda lökositler üzerinde gösterildiğinden HLA (Human Leukocyte Antigen) olarak kliniklerde yaygın kullanılmaktadır [17]. MHC molekülleri protein kaynaklı peptit antijenleri T hücrelerinin tanınması için sunan membran proteinleridir. Kişiler arasında yapılan organ ve/veya doku naklinde organ reddini veya kabulünü belirleyen genetik lokus olarak keşfedilmiştir. MHC lokusları eş-soylu hayvanlar ya da tek yumurta ikizleri arasında (özdeş olan bireyler) yapılan nakillerde doku kabul edilir ve özdeş olmayan bireyler arasında (MHC lokuslarında fark olanlarda) doku reddi daha fazla görülür. HLA uyum oranı organ / doku nakli sonucu ile ilişkilendirilir. Organ / doku naklinde rejeksiyona neden olan, HLA

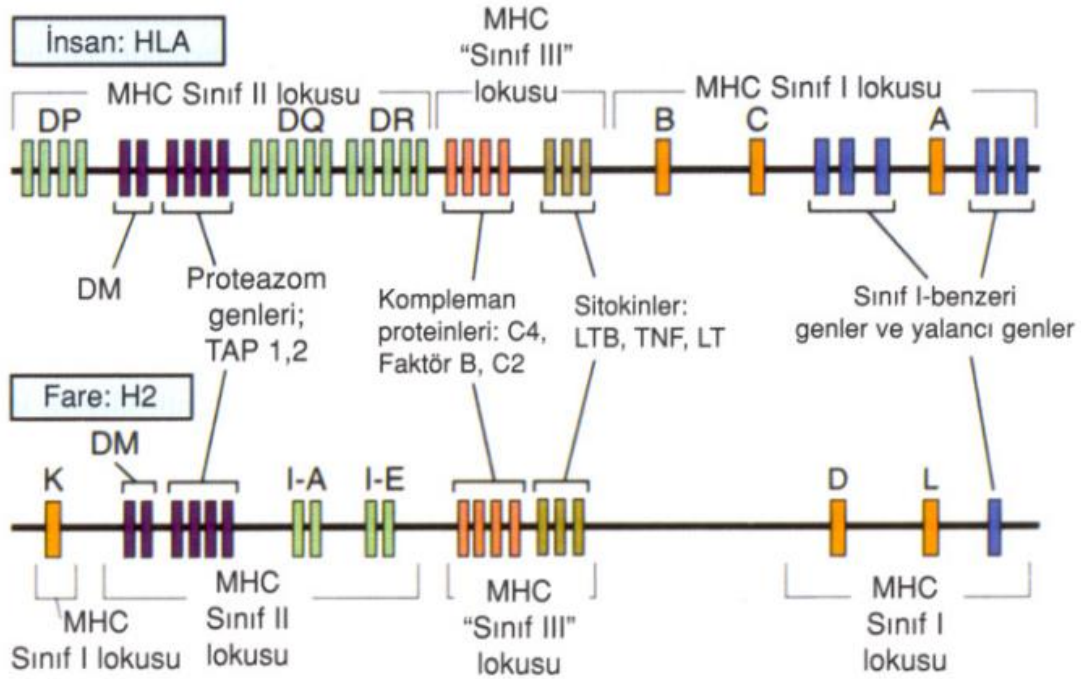
uyumsuzluğudur. Bu uyumsuzluk alıcının T hücrelerinde (yardımcı T CD4+ ve sitotoksik T CD8+) aktivasyona ve T hücrelerinin çoğalmasına neden olur. Bu aktivasyonla birlikte B hücre aktivasyonu ve alloantikör üretimi gerçekleşir. HLA uyumsuzluğunun bir sonucu olarak hümmoral ve hüccresel immün mekanizmalarla organ reddi geçekleşir.

HLA antijenleri fazla oranda polimorfizm gösterir [17-19].

Doku uygunluk antijenlerini içeren HLA sistemi 6. kromozomunda olup, bu kromozomun kısa kolu üzerinde sentromere yakın bölgede yer alır. Baba ve anneden alınan birer haplotipten oluşun HLA sistemi sınıf I ve sınıf II olmak üzere ikiye ayrılır. HLA sınıf I antijenleri HLA-A, HLA-B ve HLA-C' den oluşur ve tüm çekirdekli hücrelerde bulunurken, sınıf II bölgesindeki antijenler ise HLA-DR, HLA-DP ve HLA-DQ antijenlerinden oluşur ve sadece özel hücrelerde (B hüceleri, Makrofajlar, dendritik hücreler) bulunurlar. (Şekil 1). Non-MHC, faktör B, C4 ve C2 kompleman proteinleri, p450 sitokrom 21-hidroksilaz genlerini bulunduran bir diğcr sınıf ise Sınıf III moleküllemi olarak isimlendirilir ve ayrı bir grup içinde değercendirilir. [17-19].

Hücre membranında yerleşik yapılar olan MHC kompleksi çok fazla polimorfik özelliğı olan genler tarafından kodlanır. Bu genlerin kodladığı proteinler değışik hücre membranlarında yer alırlar. Bu proteinlerin (doku uygunluk kopleksi antijenleri) organ / doku naklinde rejeksiyonda önemli belirleyici rolleri bulunmaktadır [19]. MHC moleküllemi özdeş olan bireylerde yapılan nakillerde sorun yaşanmaz iken HLA lokusları farklı olan bireylerde yapılan nakillerde rejeksiyon gelişme riski çok yüksektir. [19]. Hücre yüzeyinde bulunan MHC moleküllemi salgılanmazlar ve işlenmiş peptid antijenleri T lenfositlere sunarlar. T lenfositler sadece MHC ile birleşmiş ve işlenmiş peptid antijenleri tanıyabilirler. MHC molekülünde bulunan işlenmiş peptid antijen ile T lenfosit antijen reseptörü, hem MHC molekülülündeki amino asit yan zinciri hemde MHC ile birleşmiş peptid antijen ile temasa girer. Sonuçta MHC-peptid kompleksini taşıyan taşıyan hücreler, antijeni T hücrelerine sunarlar [17-19]. Aktive olacak T lenfosit belirlenmesinde; antijen kaynağı, peptid kaynağının endojen veya eksojen olması belirleyici faktördür. Bu faktörlere bağılı olarak eksojen kaynaklı protein farklı sentez ve birleştirme süreçleri ile MHC sınıf II moleküllemiyle sunulurken, endojen kaynaklı peptidler MHC Sınıf I moleküllemiyle birleşerek sunulurlar. Sonuç olarak hücre dışı ve hücre içi proteinlerden sentezlenen peptid antijenler birbirinden farklı T lenfositler tarafından tanınırlar [17-19]. T

lenfositler yabancı peptid antijenleri tanıyıp bir immün yanıt oluştururken, kendi öz proteinlerden kaynaklı peptid antijenlere immün yanıt oluşturmazlar. Öz antijenleri tanıyan tüm T lenfositler, gelişim süreçlerinde Timik gelişim safhasında elemine edilirler (negatif seleksiyon). Bunun aksine yabancı peptid antijen-MHC kompleksini tanıyan T lenfositler yaşamlarını sürdürürler. [17-19]. İnsan genlerinin haritasını çıkartmak için aile çalışmalarından yararlanılmıştır. Sadece serolojik testlerle ilk üç gen HLA-A, HLA-B ve HLA-C olarak adlandırılmıştır. Fare H-2K , H-2D ve H-2L lokusları MHC sınıf I olarak isimlendirilir ve insan HLA-A, HLA-B ve HLA-C' lere benzer. Fare I-A, I-E lokusları MHC sınıf II olarak isimlendirilir ve insan HLA- DP, HLA-DQ ve HLA-DR' lere benzer. [17-19].



Şekil 2.1. MHC lokusunun insan MHC (HLA kompleksi denir) ve fare MHC (H2 kompleksi bölgelerinin şematik haritası [22].

Böbrek nakillerinde genellikle HLA-A, HLA-B ve HLA-DR önemli antijenlerdir. Böbrek nakillerinde MHC antijenlerinde tam uyum olduğunda en iyi sonuç alınmaktadır. Alıcı ve donörde HLA-DR, HLA-B ve HLA-A uyumsuzluğu arttıkça rejeksiyon gelişme olasılığı yükselmektedir. Bu faktörlerin dışında minör doku uygunluk antijenleri ve monosit vasküler endotel hücre de rejeksiyonu etkilemektedir. Böbrek naklinin başarısını etkileyen diğer önemli faktörler ise, primer böbrek hastalığı, kan transfüzyonu sayısı, gebelik sayısı

ve daha önceki nakillerdir. [20-21].

2.1.3. Böbrek nakli sonrası böbrek fonksiyon bozukluğu

Böbrek nakli sonrası erken dönemde transplante edilen böbreğin işlevine göre hastalar başlıca 3 grupta incelenebilir.

Yavaşlamış greft fonksiyonu

Böbrek nakli sonrası ilk haftada böbrek fonksiyonlarının yavaş seyretmesi ve hastanın serum kreatinin değerlerinin 3 mg/dl veya üzerinde olmasını tanımlar. Bu hastalarda diyaliz ihtiyacı olmaması tanıda mutlaka olması gereken bir şarttır [14,23].

Gecikmiş greft fonksiyonu (GGF)

Başarılı bir böbreknaklinde, böbrek fonksiyon testlerinin 2-3 günde normalleşmesi beklenir. Testlerin normale dönmemesi veya böbrek nakli sonrası diyaliz ihtiyacının devam etmesi gecikmiş greft fonksiyonu olarak tanımlanır. GGF'nin birçok nedeni vardır. Etyoloji değerlendirmesi yapılırken prerenal (hipotansiyon, hipovolemi vb), postrenal (idrar yolunda obstruksiyona neden olabilecek nedenler) ve renal (akut hümorale/hücresele rejeksiyon, primer hastalığın nüksü, akut tubuler nekroz, kalsinörün toksisitesi, TTP/HUS vb) gibi nedenleri tedavinin yönlendirilmesi bakımından gözden geçirmek faydalı olacaktır. Tüm bu nedenlere ek olarak gecikmiş greft fonksiyonun diğer nedenleri arasında, 24 saatten uzun süren soğuk iskemi süresi, hastanın PRA (panel reaktif antikor) düzeyinin yüksek olması, HLA uyumsuzluğunun fazlalığı, donör böbrek kalitesi, nakilden hemen önce yapılan diyaliz modalitesi sayılmaktadır [14,23].

Optimal böbrek fonksiyonu

Böbrek transplantasyonu sonrası idrar çıkışının normalleşmesi ile birlikte serum kreatinin düzeyinin hızla düştüğü hastaları tanımlamak için kullanılmaktadır [15].

2.1.4. Böbrek naklinde rejeksiyon

Rejeksiyon, böbrek nakli sonrasında erken dönemde greft fonksiyonunda gecikme ve bozulmanın en önemli nedenlerinden biridir. Organ nakillerinde immunolojik mekanizmalar ve değişiklikler, transplantasyonun en önemli sorunu olmaya devam etmektedir [24].

Hiper akut rejeksiyon

Alıcıda böbrek nakli öncesi anti- ABO kan grubu antikorları ile anti sınıf I antikorlarının varlığı hiper akut rejeksiyonun en önemli nedenleridir. Böbrek naklinden hemen sonra kısa sürede (birkaç dakika ile birkaç saat) gelişir. Normal reperfüzyon sonrası gözlenen “pembeleşme” yerine böbrek zayıf ve benekli görünür. Bu antikorlar transplante edilen böbreğin arteriyollerinin endotel yüzeyine yapışır ve komplemanları aktive ederek, nakil edilen organın damarlarının trombozu ve tıkanmasını da içeren şiddetli damar hasarına neden olurlar. Genellikle bu reaksiyon transplante edilen organın kaybı ile sonuçlanır. Crossmatch (çaprazlama) testlerindeki gelişmeler, transplantasyondan önce donöre spesifik antikorları daha iyi saptadığından bu problem büyük oranda aşılmıştır [24-25].

Akut rejeksiyon

Transplantasyondan sonra ilk birkaç hafta veya ay içinde başlayan akut rejeksiyonun, vasküler ve hücrel olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. nakilden sonra ilk 1-2 hafta içinde görülen vasküler tip akut rejeksiyon antikor ve kompleman bağımlı humoral immun yanıttır. Tromboz ve doku nekrozunun daha geç gelişmesi hiper akut rejeksiyondan farklıdır ve ciddi endotelial hasarla seyreder. Daha önce fonksiyona başlamış nakil olan organda hızlı fonksiyon kaybı, oligüri, ödem, hematüri, hipertansiyon, ateş, sodyum ve sıvı retansiyonu, sedimentasyon – CRP – lökosit -, β 2mikroglobulin gibi akut faz reaktanlarında hızlı artış, hızlı toksik madde retansiyonu, greft böbrekte ağırlı büyüme ile ortaya çıkar. Sık karşılaşılan bir rejeksiyon şekli değildir ama büyük bir bölümü (%80) geri dönüşlü değildir. Böbrek naklinden sonra ilk 3-6 ay içerisinde en sık görülen hücrel tip akut rejeksiyon, daha sonraki zamanlarda görülme sıklığı giderek azalmaktadır. T aktivasyonu sonucu gelişen hücrel tip akut rejeksiyonda, böbrekte fonksiyon kaybı ve klinik olarak akut inflamasyon bulguları ile ortaya çıkar. Erken tanı ve tedavi transplante edilen organ kaybını önlemede çok önemlidir. [24-26].

Kronik rejeksiyon

Anti-greft lenfositlerini veya antikorlarını kontrol altında tutmak amacıyla verilen immünsüpressif ilaç tedavisinden kaynaklanan rejeksiyondur. Kronik rejeksiyon, renal fonksiyonda düşüş, T hücrelerinin renal parenkimaya invazyonu ve T hücrelerin ve makrofajların intersitisyuma kalıcı infiltrasyonunu karakterizedir. Ayrıca damarlar da düz kas proliferasyonu ve hiperplazi görülebilir. Neointima oluşur, internal elastik laminanın fokal yıkımı ve son olarak parankimal kayıp izlenir. Kronik antikor aracılı rejeksiyonda, kapiler endotel üzerinde biriken antikorlar etkilidir ve bu antikorlar önceden saptanamayan donöre spesifik antikorlar veya nakil sonrasında oluşan antikorlardır. Sonuçta glomerüler ve peritübüler kapiller endotelyal hasar, hücrel hipertrofi, subendotelyal alanda fibriler materyalin birikmesi, glomeruler bazal membranın genişlemesi ve kalınlaşmasına sebep olur ve bu transplant glomerulopati olarak bilinir [24-25].

2.1.5. Böbrek nakli sonrası immünsüpresyon, özellikleri ve etki yerleri

Böbrek nakli sonrasında en temel mücadele transplante edilen böbreğin reddinin önlenmesidir. Tedavi 3 gruba ayrılır. Bunlardan birincisi böbrek naklinden hemen sonra yoğun olarak başlayan indüksiyon tedavisidir. İkincisi böbrek transplantasyonu sonrası verilen idame tedavisidir. Üçüncü tedavi ise rejeksiyon geliştiğinde rejeksiyonu düzeltme tedavisi olarak uygulanır. Son yıllarda immün rejeksiyon mekanizmaların daha iyi aydınlatılmasıyla daha güvenli modern immün süpressif ilaç tedavileri geliştirilmiştir. Günümüz uygulamalarında hedeflenen sağkalım 10 yıllıdır. Bütün immün baskılayıcı ajanların doza bağlı spesifik yan etkileri vardır. Bu spesifik yan etkilerin dışında immün baskılayıcı ilaçların non spesifik yan etkileri ise, yüksek malignensi riski ve enfeksiyonlardır. Günümüzde immün baskılayıcı ilaç tedavi rejimleri sinerjistik etki oluşturarak dozları düşürmek ve yan etkileri azaltmak üzere tasarlanmıştır [27-30,42].

İmmünosupresif ilaçlar

Günümüzde organ transplantasyonunda kullanılan immün baskılayıcı ilaçlar iki ana başlık altında gruplandırılmaktadır.

İndüksiyon tedavisinde kullanılan immünosupresifler:

- a. *Kortikosteroidler*; metil prednisolone, prednisolone,
- b. *Poliklonal antikorlar*; anti-timosit globulin (ATG), anti-lenfosit globulin (ALG)
- c. *Monoklonal antikorlar*; basiliximab, daclizumab, muromonab (Anti-CD3, OKT-3)

a. *Kortikosteroidler*: İlk olarak 1960'lı yıllarda rejeksiyon tedavisi için kullanılmıştır. Steroidlerin etki mekanizmaları oldukça karmaşıktır ve henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Kortikosteroidlerin immünsüpresif etkileri makrofajlar, T hücre, B hücre ve endotel hücrelerini etkileyerek immünsüpresif ve anti inflamuar etki oluştururlar. Esas olarak nükleer faktör aracılığıyla IL-1,2,3,6 ve interferon alfa (IFN-alfa)'nın transkripsiyonunu inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellerler. Ayrıca makrofajlar ve diğer mononükleer üzerinde de inhibe edici etkileri vardır. Sıklıkla nakil günü veya öncesinde başlanarak birkaç gün yüksek dozda verildikten sonra, doz zaman içinde azaltılarak idame tedavisine devam edilir. Yüksek doz steroidler hala sınırdadır, hafif veya orta derecede hücrel organ reddi tedavisinin temelini oluştururlar [28,30].

b. *Poliklonal antikorlar*: İnsan lenfoid hücrelerinin hayvanlara verilmesi sonucu oluşan antikorların saflaştırılmasıyla elde edilir. Bu antikorlar lenfoid hücre reseptörlerini eksprese eden, kompleman bağımlı lizise sebep olan ve retikulo-endotelyal sisteme lenfosit alımını uyaran hücreleri maskeleyebilir, uzaklaştırabilir veya öldürebilir. Buna örnek olarak tavşan veya attan elde edilen *anti-timosit globulin (ATG)* verilebilir. Bu tedavi primer olarak T hücrelerini hedef alır ve rejeksiyon veya greft versus host hastalığı tedavisi için ve indüksiyon ajanı olarak kullanılabilir [28,30].

c. *Monoklonal antikorlar*: Monoklonal antikorlar, poliklonal antikorlara benzer diğer antikorlardır. Tek bir genetik kaynaktan oluşmalarıyla poliklonal antikorlardan ayrılırlar. En yaygın olarak kullanılanlar, CD25 molekülünü (T hücre yüzeyindeki IL2 reseptörü) hedef alan olan basiliximab. Muromonab-CD3 (OKT3); T lenfositler yüzeyindeki CD3 reseptörünü hedef alır. Son zamanlarda kullanılan ve CD52 reseptörünü (T lenfosit, B lenfosit ve monositlerin membranında bulunur) hedef alan Alemtuzumab. B lenfosit membranındaki CD20 molekülünü hedef alan Rituximab. [31-34].

İdame Tedavisinde Kullanılan İmmünsüpresifler:

- a. *Kortikosteroidler*: metil prednisolone, prednisolone, deflazakort

b. *Kalsinörin İnhibitörleri*; takrolimus ve siklosporin-A,

c. *mTOR inhibitorleri*; sirolimus, everolimus,

d. *Anti-proliferatif ilaçlar*; mikofenolat mofetil/sodyum, azatioprin

a. *Kalsinörin inhibitörleri*: Kalsinörin inhibitörleri solid organ (böbrek, karaciğer, kalp, akciğer) naklinde kullanılan immünsupresif ilaçlardır. Kalsinörin inhibitörleri, böbrek naklinde immünsupresif tedavinin temel taşı oluşturmaktadır. Bunların kullanıma girmesi ile akut hücresel rejeksiyon sıklığında azalma ve greft sağkalımın da iyileşmeler görülmüştür. İmmün yanıtı seçici olarak baskılamaktadır. Hem siklosporin A hem de takrolimus her ikisi de nefrotoksiktir ve kronik allograft disfonksiyonuna neden olabilir. Siklosporin “*Tolypocladium inflatum*” (gams) isimli mantardan elde edilen, 1200 kilodalton (kDa) ağırlığında ve bir tanesi özgün olmayan 11 aminoasitten oluşan lipofilik siklik bir polipeptiddir. Siklosporin A, siklofilin denilen spesifik T hücre yüzey reseptörlerine bağlanır ve hücre içine girerek aktive olur. Hücre içi kalsiyum kullanımını bloke ederek, nükleer faktörlerce interlekin 2 (IL-2) yapım ve sekresyonunu inhibe eder. Böylece diğer T hücrelerinin olgunlaşmasını, aktivasyonunu ve hücre yüzeylerinde IL-2 reseptör ekspresyonunu durdurur. Bu inhibisyon antijene cevap olarak oluşan Ca^{++} kullanımını gerektiren T hücre aktivasyonu ve kaskatın oluşumunu sınırlı bir düzeyde bırakır. Tacrolimus ise Siklosporinden yaklaşık 100 kat daha güçlü bir immünsupresiftir. Molekül, fonksiyon olarak bağlanma halkası ve efektör bölge olarak isimlendirilen iki kısımdan oluşmaktadır. Tac bağlanma domaini aracılığı ile FK 506 bağlanma proteini (FKBP)’ ne bağlanarak bir kompleks yapar. Bu kompleks daha sonra efektör kısım aracılığı ile kalsinörine bağlanır. Böylece IL-2’nin gen transkripsiyonu önlenir [35-37].

b. *mTOR inhibitörleri*: mTOR katabolik ve anabolik metabolizmalar arasında anahtar işlevi olan bir kinazdır. Hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan ve rapamisin tarafından inhibe edilebildiği için ‘mammalian target of rapamycin’ (mTOR) olarak adlandırılan bu hücre içi yolak, esas olarak bir serin/ treonin protein kinazdır (7). mTOR aktivasyonu sonucunda hücre bölünmesine öncülük eden moleküllerin zincirleme aktivasyonu gerçekleşmekte ve böylece mTOR hücre içi ve hücre dışı sinyalleri birleştirerek büyüme, çoğalma ve hücre metabolizmasının düzenlenmesinde ve hayatta kalmanın merkezi fonksiyonlarında görev almaktadır. mTOR inhibitör ilaçlar sirolimus ve everolimus’dur ve bunlar T hücre proliferasyonu için gerekli sitokin sinyallerini, mTOR

yolağındaki kalsiyum bağımlı ve bağımsız yolakları inhibe ederek bloke ederler. Benzer etkileri B hücreler, endotelial hücreler, fibroblastlar ve tümör hücreleri üzerinde de gösterirler [38-40].

c. *Anti-proliferatif ilaçlar*: Standart immünsüpresifler olarak kabul edilen bir diğer grup ilaç anti proliferatifler olup, tamamlayıcı ilaçlar olarak da adlandırılırlar. Bu grupta yer alan Azotiyoprin (İmuran): Purin antimetaboliti olup, 6-merkaptopurinin nitroimidazol türevidir. Güçlü bir mitotik inhibitördür. Bu grubun diğer üyesi Mikofenolat mofetil (MMF)' dir. MMF, birkaç penisilyum türlerinin fermentasyon ürünü olup immünsupresif özellikte mikofenolik asidin (MPA) ön ilacı morfolinoetil esteridir. İlacın molekül ağırlığı 433 kDa'dur. MPA, inozin monofosfat dehidrogenazın (IMPDH) geri dönüşümlü bir inhibitörüdür [41-42].

2.2. MikroRNA

MikroRNA'lar (miRNA), fonksiyon olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli bir RNA molekül çeşididirler. MikroRNA'lar kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olur. miRNA'lar ile ilgili yapılan son çalışmalar kanser gelişiminde anahtar rol oynadıklarını ortaya çıkarmıştır [43]. MiRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliğine göre onkogenik veya tümörsüpresör özellik kazanabilmektedir.

MikroRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, RNA molekülleridir. Olgun mikroRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. MikroRNA'lar kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. miRNA, baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır, sonrasında protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olur [44].

miRNA'lar gelişme, farklılaşma, sağkalım, apoptozis, senesens ve metabolizma gibi çeşitli biyolojik olayların kontrolünde de görev alır. MikroRNA'ların keşfinden sonra, fonksiyon-

ları hakkında yapılan birçok çalışma, miRNA'ların kanser gelişiminde anahtar rol oynadıklarını ortaya çıkarmıştır [43].

miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliğine göre onkogenik veya tümörsüpresör özellik kazanabilir. Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'lar "tümör süpresör miRNA'lar olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun tersi olarak, "onko-mir" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'lar bir tümör süpresörün baskılanmasını sağlarlar. MikroRNA'lar, onkogen ve tümör süpresör mRNA'ların her ikisini de potansiyel hedef olarak görebilir. Bu yüzden, belirli bir miRNA'nın gerçek fonksiyonu ya tümör süpresörün veya onko-mir'in hücresel içeriğine bağlıdır [44].

miRNA moleküllerin çeşitli tümörlerde aşırı eksprese oldukları ya da ekspresyonlarının azaldığı saptanmıştır [45]. Örneğin kromozom 13q31'de bulunan mir-17-92 gen grubu ekspresyonunun akciğer kanseri ve çeşitli tipte lenfomalarda arttığı saptanmıştır. Bu moleküllerin hedefleri arasında PTEN ve RB2 tümör süpresör genlerinin bulunduğu tahmin edilmektedir [46]. Farklı kanser türlerinin kendilerine özgü miRNA ekspresyon profilleri olduğu görülmektedir. Genel olarak tümör dokusunda miRNA ekspresyonunun azaldığı ve ekspresyon profilinin tümörün tipini ve farklılaşmasını ile ilişki gösterdiği bulunmuştur [47].

miRNA'lar, mRNA'larının 3'UTR ya da 5'UTR bölgesine bağlanarak mRNA'ların ekspresyonlarını etkilerler [48-50]. Bu miRNA- mRNA eşleşmesi mRNA'nın yıkımı için bir uyarıcıdır [49-50]. miRNA'lar hücrelerin farklılaşma, gelişme, proliferasyon, hücre göçü biyolojik ve bazı patolojik süreçlerde önemli düzenleyicilerdir [49-50]. Son çalışmalar, tümör ve normal hücre arasındaki miRNA ifade seviyelerinin profillerinin farklılıklarının tüm kanser tiplerinin patogenezinde yer aldığını göstermektedir [49-50].

2.2.1. Olgun miRNA'nın oluşumu

miRNA ların olgunlaşması bir çok adımdan geçtikten sonra gerçekleşmektedir [50]. miRNA'lar genlerinin intronik ya da genler arası bölgelerinden kodlanırken, bazı pri-miRNA'lar protein kodlamayan uzun mRNA'ların ekzonlarından ya da protein

kodlamayan ve kodlayan genlerin intronik bölgelerinde kodlanabilmektedir [51]. Bu süreçte çeşitli enzimler ve çekirdek, sitoplazma olmak üzere farklı hücre bölümleri kullanılır [50]. miRNA'ların birçoğunun sentezinde RNA polimeraz II rol alır ve mRNA'ların karakteristik 3'ucundaki poliA kuyruğu ile 5'ucundaki 7-metil-guanilat şapkasını taşır [52].

miRNA ilk olarak olarak DNA dan kodlanır bu süreç çekirdekte başlar [50]. ve miRNAların olgunlaşma süreci sitoplazmada sonlanır [53]. miRNA ların oluşum sürecinde iki temel farklı yolak bulunmaktadır: Bunlar kurallı ve kuralsız olarak tanımlanır [54]. miRNA'ların çoğu kurallı yolak üzerinden sentezlendiği bilinmektedir [54]. Kurallı yolak; üç ana basamaktan oluşmaktadır bu aşamalar; kırılma, ihraç, kesim aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 2) [53]. miRNA'lar çekirdekte öncelikle transkripte olduktan sonra, ilk olarak RNA Pol II tarafından pri-miRNA olarak isimlendirilen ve uzunluğu yaklaşık olarak 1kb-3kb olan RNA'lar sentezlenir (Şekil 4) [55]. Pri-miRNA'lar, RNase III Drosha ve çift zincirli RNA ya bağlanan [51] ve RNase III Drosha'nın katalitik bölgesinin 10 baz çiftlik yerini tanıyan protein DGCR8 ile kırılır (Şekil 4) [53]. miRNA nın olgunlaşma sürecinde rol alan bu protein kompleksi 'microprocessor' olarak da isimlendirilmektedir [51,55]. pri-miRNA'nın kırılma sonucunda pre-miRNA olarak bilinen ve yaklaşık olarak 60-100 nükleotit uzunluğunda saç tokası yapısında miRNA' lar oluşturulur [53]. Pre-miRNA zincirinin 3' ve 5' uçlarındaki fosfatın ve 2 nükleotitin oluşturduğu çıkıntı [51], exportin5 ve Ran-GTP denilen proteinler tarafından tanınır [53]. Exportin5- Ran-GTP bir protein kompleksidir , exportin5 ise bir mekik proteindir{[55]. miRNA'lar GDP nin GTP ye dönüşümü süreci sayesinde ve çekirdek zarından Exportin5 aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır (Şekil 4) [55]. Pre-miRNA'lar çekirdekten sitoplazmaya gönderildiğinde, RNaseIII Dicer aracılığıyla kırılır (Şekil 4) [53]. Pre-miRNAlar Dicer-RNaseII ile kırıldıktan sonra yaklaşık 21-23 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA/miRNA yapısını oluşturur [55]. Dicer enzimi, birbiriyle ilişkili iki protein TRBP (transactivation Response RNA-Binding Protein) ve PACT/PRKRA (Protein ACTivator of the interferon-induced protein kinase) ile bir kompleks oluşturur [53]. TRBP/ PACT/PRKRA protein kompleksi Dicer-RNaseII kompleksinin etkinliği için önemsiz olmasına rağmen miRNA etkinliğine ikincil bir katkı sağladığı düşünülmektedir [53]. Biyokimyasal sürecin nasıl işlediğine dair mekanizmalar halen bilinmemektedir [53]. Dicer-RNaseII çift zincirli miRNA/miRNA yapısını oluşturduktan miRNA/miRNA kompleksi Ago (Argonaute) proteinine gönderir [51]. Çift zincirli olan miRNA/miRNA

yapısı Ago ile etkileşime girer ve RISC (RNA-Induced Silencing Complex) kompleks yapısını oluşturur (Şekil 6) [53]. O anda oluşan bu yapı pre-RISC (ön-RISC) olarak adlandırılır [51]. Bu yapıda Ago proteininin bağlandığı zincir ‘kılavuz zincir’ (guide strand/miRNA) olarak; diğer zincir ise ‘geçici zincir’ (passenger strand/miRNA) olarak ifade edilir [53]. Çift zincirli miRNA/miRNA yapısından tek zincir uzaklaştırılır ve RISC kompleksi oluşturulmuş olur, geçici zincir diye adlandırılan RNA zinciri parçalanır ve bu sürece ‘zincir seçimi’ denilmektedir [51]. Termodinamik kanununa göre en uygun miRNA zinciri seçilir [51] ancak genel itibariyle uygun miRNA’nın seçiminde çift zincirin ilk 4 nükleotidi tarafından belirlenir [51]. Olgun RISC yapısı, sitoplazmada RISC ile yüklenmiş miRNA’nın eşleşebileceği mRNA için inceleme yapar [51].

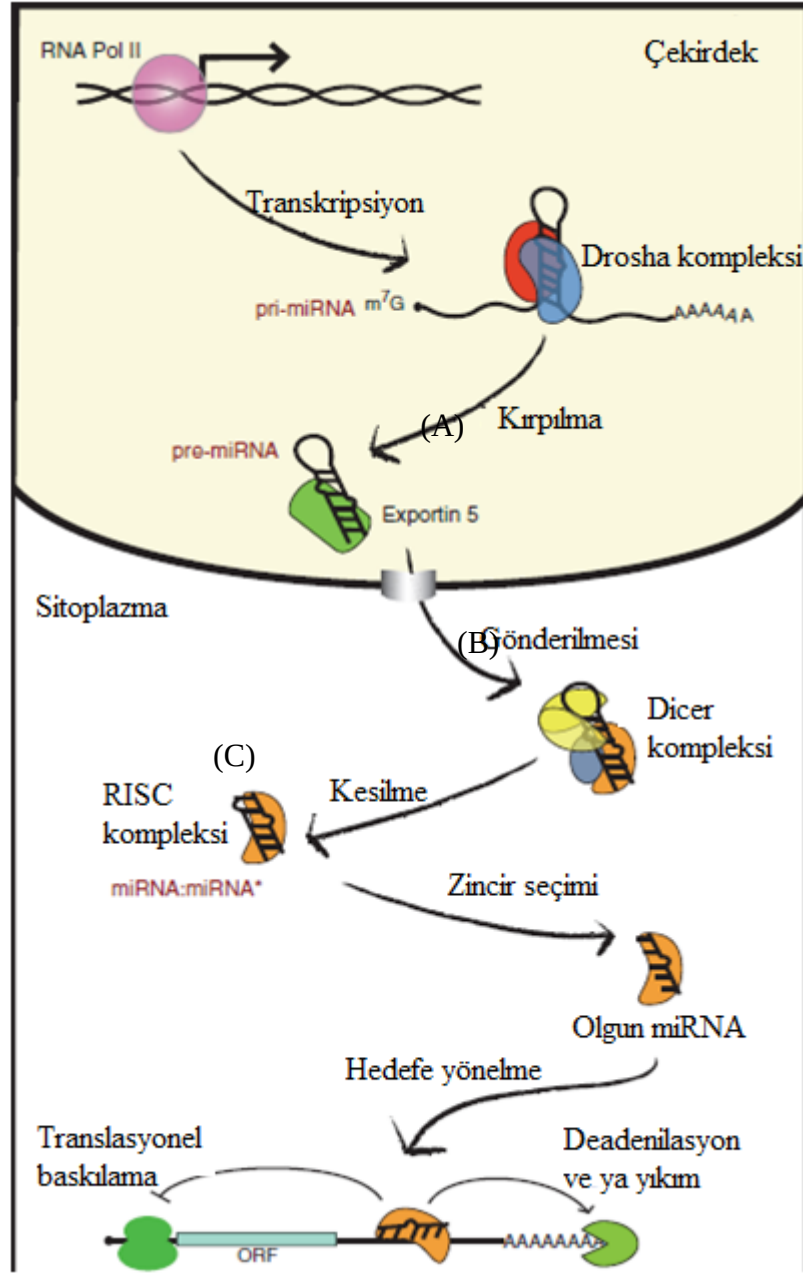
miRNA- RISC kompleksi, miRNA’ların fonksiyonlarında ve miRNA’nın hedeflediği mRNA’la bağlanıp mRNA’nın proteine dönüşmesini yani protein translasyonunu inhibe etmektedir [55]. Ayrıca bu RISC ile yüklenme miRNA’yı sitoplazmada nükleaz aktivitesinden koruyarak kararlılığını sağlar [56].

Ago proteini miRNA’nın mRNA’ya bağlamasında önemli bir rol oynamaktadır [53]. miRNA:mRNA eşleşmesi mRNA’nın 3’UTR’si ile miRNA’nın ‘eşleşme dizisi’ (seed sequence) olarak bilinen bölgesi arasında Watson-Crick etkileşimi ile sağlanır [51]. miRNA’ların mRNA ya bağlanmasında 6-8 nükleotidlik küçük parçası önemlidir [57]. miRNA ile mRNA ya bağlanmasında etkin rol alan korunmuş olan nükleotid dizileri hedef mRNA arasındaki eşleşme derecesi, gen ifadesi düzenlenme mekanizmasını büyük oranda belirler [57]. miRNA: mRNA’nın tam bir eşleşmesi mRNA’nın parçalanmasına ve yıkımına yol açarken; eksik eşleşme mRNA’nın translasyonunu başlama ya da uzama aşamasında inhibe eder [57].

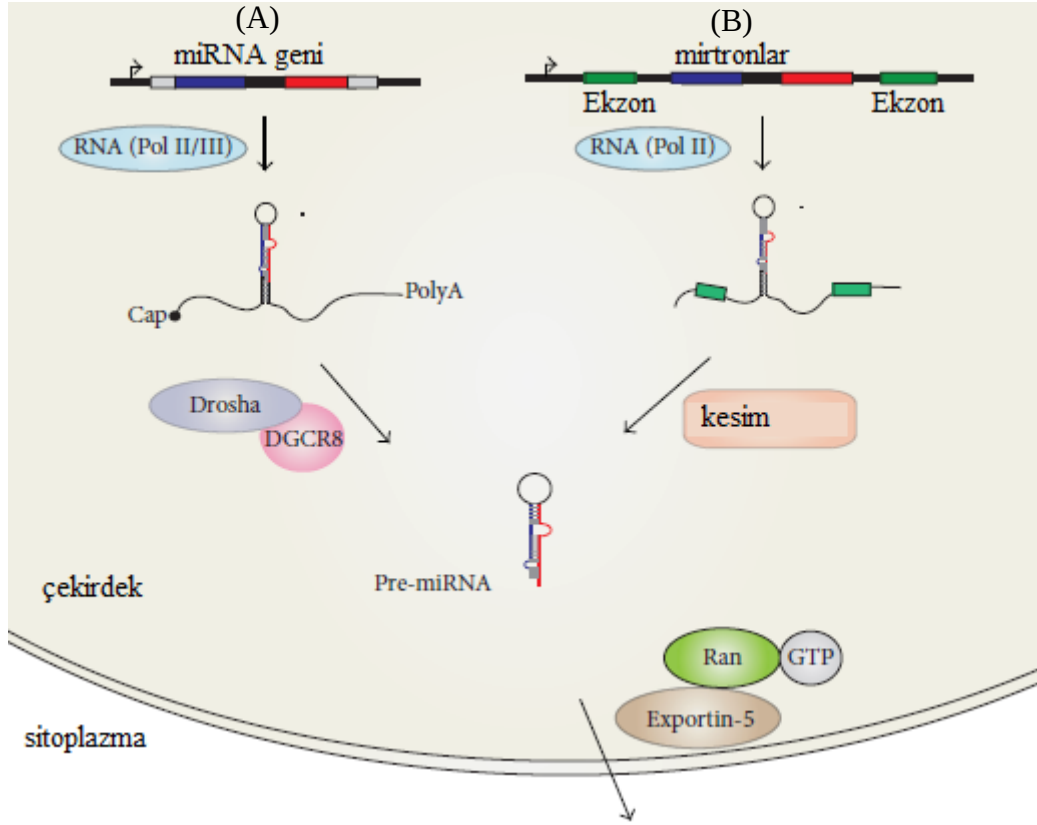
miRNA’nın oluşum süreçlerinden bir diğerinde ise kurallı yoldan farklı olarak, mirtron yolağı da denilen kuralsız yoldan; pre-miRNA’nın çekirdekte oluşması için Drosha/Dgcr8 kompleksi kullanılmamaktadır [54]. Oluşan miRNA ise kısa intron boyutlu pre-miRNA olarak adlandırılır [54]. Çekirdekte, bu intronlardan uç birleştirme (spliceosome) ve gruplaşmayı bozucu (debranching) enzimler ile saç tokası şeklindeki miRNA oluşturulur (Şekil 3) [54]. Kurallı yoldan oluşan Mirtron saç tokası, kurallı yoldaki pri-miRNA’dan yaklaşık 10 baz çifti kısadır [58]. İntronların enzimi tarafından uçları birleştirilince kementi çözmek için gruplaşmayı bozucu (debranching/Ldbr) enzime ihtiyaç duyar [58]. Bu enzim sayesinde ikincil saç tokası yapısına dönüşür [58]. Exportin5 ile çekirdekten

gönderilir hale gelen olgunlaşmamış olan miRNA çekirdekten gönderilir ve kurallı yolla aynı şekilde işlem görür [58].

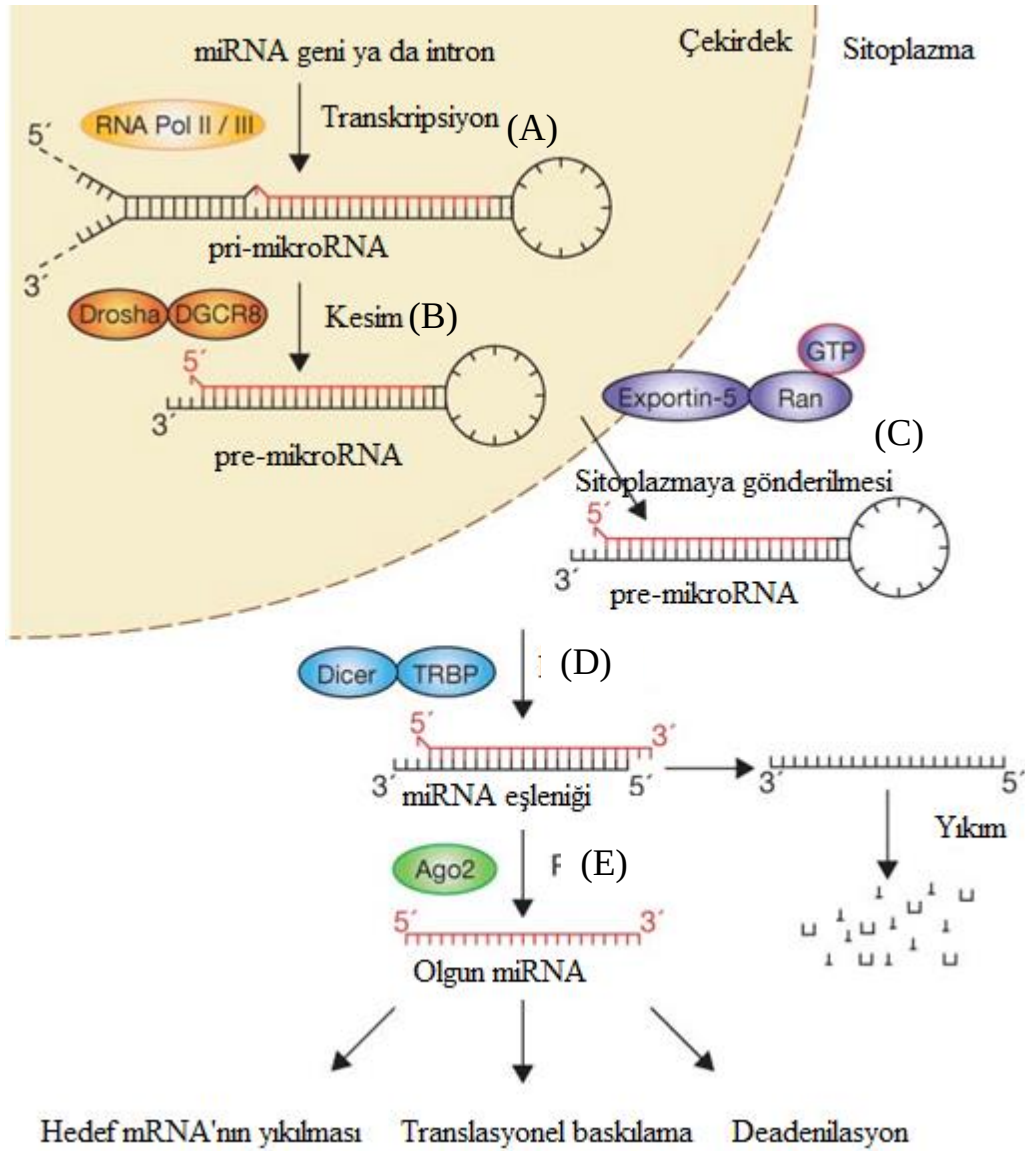
miRNA'lar oluşturuldukları (köken aldıkları) uca göre isimlendirilir [59]. Örneğin miRNA 5'ucundan oluşturulmuş ise miR-XXX-5p olarak veya 3'ucundan oluşturulmuş ise ise miR-XXX-3p olarak adlandırılır (Şekil 5) [59].



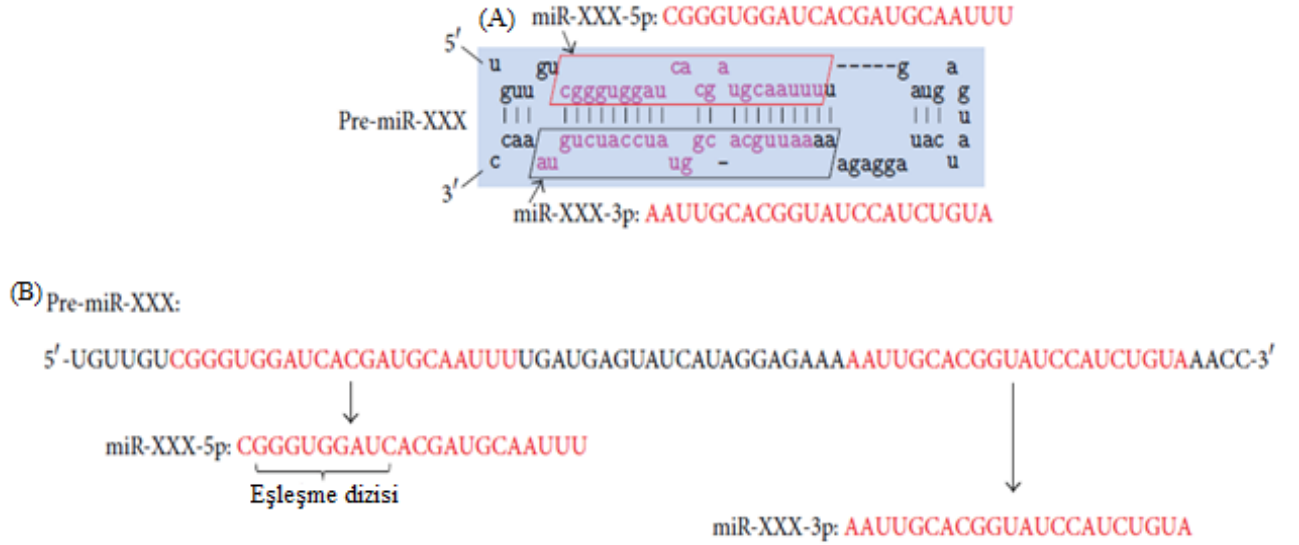
Şekil 2.2. Kurallı yolda üç ana aşama bulunur. Pri-miRNA yapısının kesilerek pre-miRNA saç tokası yapısının oluşması(A). Pre-miRNA yapısının sitoplazmaya gönderilmesi(B). Saç tokası yapısının kesilmesi ve miRNA:miRNA eşlenik yapısının oluşması(C) [52].



Şekil 2.3. Kurallı ve kuralsız yolak arasındaki fark nelerdir. Kurallı yolakta pri-miRNA'nın oluşması için Drosha-Dgcr8 kompleksi gereklidir bu kompleksle kesilip pre-miRNA oluşurken(A); Kuralsız yolakta ise intronlardan kesim/uç birleştirme (spliceosome) ile saç tokası şeklindeki pre-miRNA oluşturulur(B) [60].



Şekil 2.4. miRNA oluşum yolağı. Öncelikli olarak RNA polimeraz II/III yardımıyla pri-miRNA sentezlenir(A). Ardından, Drosha-DGCR8 kompleksi aracılığıyla kesilerek pre-miRNA saç tokası yapısı oluşur(B). Exportin-5-Ran-GTP ile pre-miRNA sitoplazmaya gönderilir(C). Sitoplazmada Dicer-TRBP kompleksiyle kesilir ve çift zincirli miRNA eşleniği oluşur(D). Çift zincirli yapının olgun miRNA'yı oluşturacak zincir, RISC yapısı içinde Ago2 ile yüklenip olgun miRNA'yı oluştururken diğer zincir yıkıma uğrar(E) [61].



Şekil 2.5. miRNA isimlendirilmesi. Saç tokası yapısında bir pre-miRNA örneği(A). miRNA'lar 5' ve 3' ucun hangisinden köken alırsa o uca göre isimlendirilir(B) [59].

2.2.2. miRNA biyosentezi yolağında görev alan moleküller

Argonaute protein ailesi: C-terminallerinde ise PIWI domaini ve N- terminallerinde PAZ domaini bulunmaktadır. Argonaute proteini (Şekil 2) mRNA kesimi için temel katalitik bölge olup bu proteinin N-terminal ucundaki PAZ domaini rehber zincirin 3' ucuna bağlanmasını sağlarken, yapısal olarak RNAaz H'nin aktif bölgesine benzeyen C-terminal uçtaki PIWI domaini hedef mRNA'nın kesiminde görev almaktadır. Argonaute proteinler Arabidopsis'in argonaute1 mutantının adını almıştır.

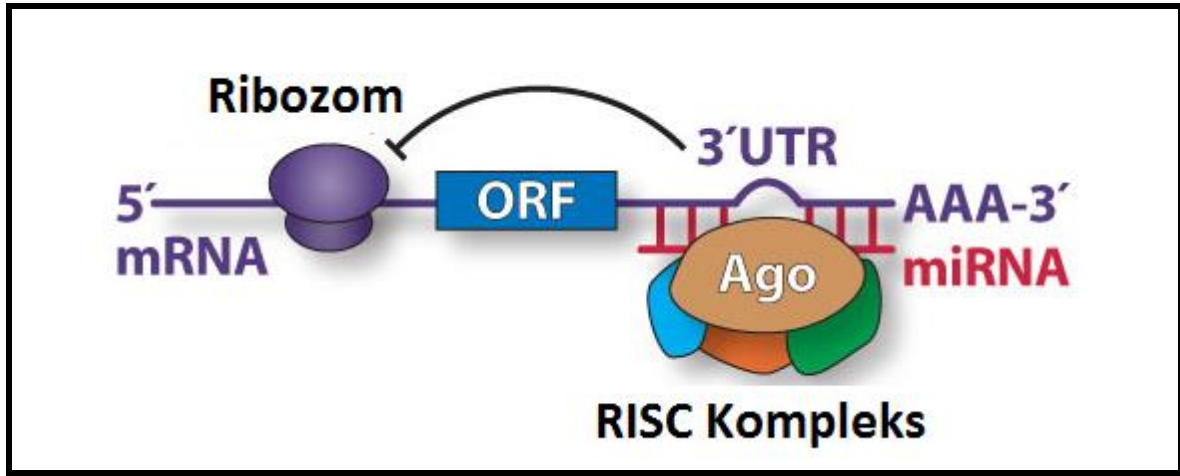
Drosha protein kompleksi: Nükleusta bulunan RNAz III tipi enzimdir. Kofaktör olarak Pasha ya da insandaki Pasha proteinin homloğu olan DGCR8 proteinine ihtiyaç duymaktadır. Drosha homologları, tüm metazoalarda tek kopya halinde bulunurken, artropodlarda iki tanedir.

Dicer protein kompleksi: N-terminal ucunda DExD/H-box helikaz ve bir de PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) bölgesine sahip bir diğer RNAz III tipi enzimdir. Uzun olan dsRNA'yı kesime uğratarak 3' ucunda 2 nükleotidlik kuyruğu buluna yaklaşık 17-24 nükleotid uzunluğunda dsRNA (çift zincirli) zincirini oluşturur.

Polimerazlar: miRNA'lar da proteinler gibi transkribe edilirler. miRNA'lar (intronlarda bulunan) RNA polimeraz II tarafından genellikle transkribe edilirler. Bunun dışında genomda tekrar dizilerinin içinde bulunan miRNA'lar ise RNA polimeraz III tarafından pri-miRNA'ya transkribe edilirler [57, 62].

2.2.3. miRNA işlevleri

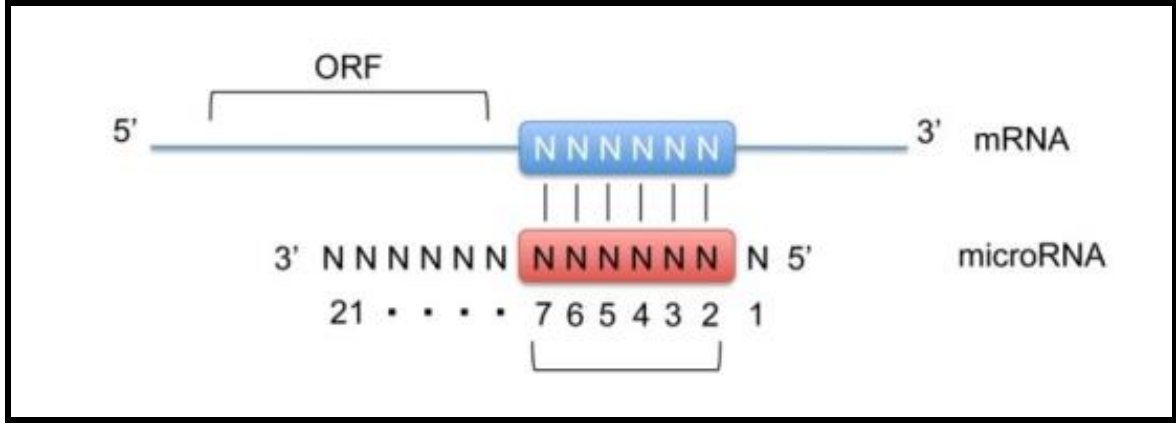
Bu güne kadar miRNA'ların sadece küçük bir kısmının biyolojik işlevleri aydınlatılmış olup, genel olarak miRNA'nın görevinin gen düzenlemesi olduğu anlaşılmaktadır. Bu amaçla bir miRNA bir veya daha çok mRNA'yı tamamlayıcıdır ve olgun mikroRNA'lar hedef genlerin ifadesini azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katkı sağlarlar. MikroRNA'lar kendi nükleotid dizilerine tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. miRNA, RISC ile kompleks oluşturur, baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır, sonrasında protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olur [62-63].



Şekil 2.6. miRNA- RISC kompleksi [66].

MikroRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye hedef mRNA'nın ORF (open reading frame-açık okuma çerçevesi) bölgesine veya hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanır ve bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir (Şekil 7). 3'UTR bölgesine tam olarak bağlanmayan, kusurlu, eksik komplementerlik gösterir ve translasyonun baskılanması ile sona ererken ORF bölgesi içine bağlanması kusursuz olan tam komplementerliği gösterir ve mRNA'nın Argonaute tarafından yıkımı ile sonuçlanır ve RISC mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına

neden olur. Ayrıca, her bir miRNA'nın birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve her bir mRNA'nın da birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir [63-65].



Şekil 2.7. Mikro RNA hedef tanıma mekanizması [67].

2.2.4. Mitokondrideki miRNA'lar

Ana işlevi hücrelerin fizyolojik ihtiyaçları için gerekli enerjiyi oksidatif fosforilasyonla gerçekleştirmek olan mitokondri kendi genomuna sahiptir. Mitokondrial genom sadece 13 protein kodlamasına rağmen, mitokondride 2000'den fazla protein bulunur. Mitokondrial proteinlerin büyük çoğunluğu nükleer genler tarafından kodlanır ve sitozolde sentezlenir, daha sonra mitokondriye geçerler. Son zamanlarda birçok patofizyolojik durumlarda kısa kodlanmayan RNA'larla mitokondrilerin gittikçe artan işlevlerinin ortaya çıkışı ve mitokondiler ile kısa kodlanmayan RNA'lar arasında olası bir ilişkinin varlığı bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Farklı hücre hatlarından kaynaklı piRNA, snRNA, snoRNA, srpRNA ve miRNA gibi mitokondriyal transkriptomda kodlanmayan RNA'ların varlığı gösterilmiştir. Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda mitokondri kaynaklı miRNA'ların (mitomiRs) bazı tipleri fare, rat, ve insanların farklı hücre hatlarından izole edilmiştir [68].

Çizelge 2.1. Mitokondride Bulunan miRNA Tipleri [68].

Mitokondri Kaynağı	miRNA Tipi
Fare Karaciğeri	mmu-miR-202-5p, mmu-miR-122, mmu-miR-223, mmu-miR-134,
Rat Karaciğeri	rno-miR-130a, rno-miR-130b, rno-miR-140, rno-miR-320, rno-miR-494, rno-miR-671
İnsan miyotübülü	hsa-miR-720, hsa-miR-133b, hsa-miR-1974, hsa-miR-24, hsa-miR-133a, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-1979, hsa-miR-103, hsa-miR-125b, hsa-miR-103, hsa-miR-221, hsa-miR-23a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-106a, hsa-miR-23b, hsa-miR-92a, hsa-miR-193b, hsa-miR-365, hsa-miR-93, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-20a, hsa-miR-149, hsa-miR-181a, hsa-miR-503, hsa-miR-210, hsa-miR-107, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-34a, hsa-miR-7g, hsa-miR-Plus-D1033, hsa-miR-19b, hsa-miR-197, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-675, hsa-miR-134, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-598
İnsan HeLa	hsa-miR-1973, hsa-miR-1275, hsa-miR-494let-7b, let7g, hsa-miR-107, hsa-miR-181a, hsa-miR-221, hsa-miR-320a
İnsan 143-B	hsa-miR-146a, hsa-miR-103, hsa-miR-16
İnsan HEK293	let-7b, let7g, hsa-miR-107, hsa-miR-181a, hsa-miR-221, hsa-miR-320a

2.2.5. miRNA'lar da kelebek etkisi

Kelebek etkisi, bir sistemin başlangıç verilerindeki küçük değişikliklerin büyük ve öngörülemez sonuçlar doğurabilmesine verilen addır. Edward Lorenz 1979 yılında bir toplantıda “Brezilya’da kanat çırpın bir kelebek Teksas’ta fırtınaya sebep olur mu?” sorusuyla ünlü kaos teorisini öne sürmüştür. Bu teoriye göre küçük bir olayın büyük sonuçlara neden olabileceği ileri sürülmüştür. Aynı soru miRNA’lar için de kurgulanabilir. Acaba miRNA’lardaki en ufak değişiklik tüm gen ekspresyonunu etkiler mi? miRNA dizilerinde meydana gelen değişimler ve tek nokta mutasyonu, organizmanın gen ekspresyonunun değişiminde önemli değişikliklere sebep olur ve bu olay ‘kelebek etkisi’ne sebep olabilmektedir. miRNA dizisinin promotor bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonları downstream gen ekspresyonlarına sebep olabilir. Bir gen üzerinde meydana gelen anlamlı veya anlamsız mutasyonlar proteinin fonksiyonel değişikliklerine neden

olabilirler. Bu mutasyonlar evrim sürecinde önemli rol oynarlar. Ancak, bir pre-miRNA dizisi üzerinde meydana gelen mutasyon miRNA biyogenezinde bir değişikliğe yol açabilir ve miRNA'nın mRNA hedefi veya zincir seçimi değişikliği gerçekleşebilir. Bu olayların sonucu olarak genlerin geniş spektrumu için ince ayarlı bir baskılama veya değişiklik meydana getirebilir.

Sonuç olarak miRNA'ların etkilerine bakıldığında 1000'den fazla molekülün birincil, ikincil ve üçüncül yapılarıyla etkileşime girerek birçok biyokimyasal yolların düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir [68].

2.2.6. miRNA'ların kullanım alanları ve hastalıklar ile ilişkileri

Memelilerin transkriptinin %60'ından fazlası miRNA'ların kontrolü altındadır. Canlıların farklı hücre tiplerinde farklı miRNA tipleri eksprese olmaktadır. miRNA'lar gen ekspresyonunun regülasyonu fonksiyonlarının yanı sıra birçok hücresel yolda da görev almaktadırlar. Bu görevlerinden biri de bağışıklık sisteminin bir parçası olarak patojen ve viral enfeksiyonların kontrolünü sağlamaktır. Viral enfeksiyona karşı immün yanıt oluşturmak amacıyla konakçı tarafından kodlanan spesifik miRNA profilleri oluşturulabilmektedir. Böylelikle kodlanan miRNA'lar viral transkriptlerde hedef bölgeler ile etkileşime girerek viral replikasyonu değiştirebilmektedirler. Canlılarda miRNA'lar farklı dokuların fonksiyonlarını düzenleme görevlerine sahiptirler. Enfeksiyon sonucu oluşan hastalıklar, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek hastalıkları ve kanser çeşitleri gibi farklı hastalıklarda miRNA'nın hücre ve doku homeostazisinin ayarlanması arasında çeşitli ilişkiler bulunmaktadır. Kısacası; günümüzde birçok hastalığın tanısında, prognozunda ve tedavisinde miRNA'ların kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır. miRNA'larla hastalıkların tanısı için; serum, beyin-omurilik sıvısı, göz sıvısı, süt, safra, karın zarı sıvısı, folikül sıvısı, idrar, tam kan, nazal sekresyon, tükürük, plevral efüzyon ve feçes gibi biyolojik sıvı ve dokular kullanılmaktadır. Biyobelirteç olarak kullanılması planlanan miRNA'ların ilk kez serumdaki varlığı Lawrie ve arkadaşları tarafından 2008 yılında gösterilmiştir. Dolaşımdaki miRNA'lar lipid veya lipoprotein kompleksini içeren mikrovezikül (1µm ve üstü) veya ekzosom (10-100nm) adı verilen endositik kaynaklı küçük membran küçük veziküllerin içinde yer aldığından çok kararlı olup kimyasal modifikasyonlardan ve RNAaz aktivitesinden etkilenmediği bildirilmiştir. Günümüzde çeşitli hastalık tiplerinde ve aşamalarında hastalıklı dokularla sağlıklı dokular arasında

miRNA'ların ekspresyonlarının farklı olduğu belirlenmiştir. Bu da hastalıkların tanısında ve prognozunda miRNA'ların kullanılabileceğini göstermektedir [68-72].

miRNA'ların immün sistem hücrelerinin gelişiminde, farklılaşmasında, aktivasyonunda , immün yanıtlarda ve immün yanıtların regülasyonu gibi bir çok farklı süreçte rol oynadığı düşünülmektedir. [75] miRNA'lar bir çok immün sistem hücrelerinin farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve işlevini etkileyerek inflamasyonda önemli rol oynamaktadır [75]. miRNA ve immün sistemdeki görevleri Çizelge 2.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. miRNA ve İmmün sistem [73-83]

miRNA'lar	Rol Aldığı İmmün Sistem Hücreleri
miR-32	T ve B hücreleri
miR-142	T ve B hücreleri
miR-146a	Dendritic Hücreler, T Hücreleri
miR-150	Dendritic Hücreler, T ve B hücreleri, Monositler, NK Hücreleri
miR-181a	NK Hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri
miR-181b	NK Hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri
miR-192	T ve B hücreleri
miR-210	Th17, Germinal Merkez B Hücreleri

mir-146a-5p: mir-146a-5p immün sistemde T hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir. CD4⁺ T hücre aktivasyonunda negatif, Treg hücreleri için ise pozitif düzenleyici olarak görev yaptığı düşünülmektedir [84]. Ayrıca TLR aracılı sinyal yollarında rol oynadığı bildirilmiş (negatif regülasyon) ve doğal immün yanıtların düzenlenmesinde de etkin olabileceği bildirilmiştir. TLR/IL-1 yoloğında anahtar rolü olan 2 önemli molekül (TRAF6 ve IRAK1) mir-146'nın direk hedefleri olarak tanımlanmıştır [80].

mir-150-5p: immün hücrelerin farklılaşmasında, CD4⁺ , CD8⁺ T hücre ve B hücre aktivasyonunda negatif düzenleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca mir-150,

pro-fibrotik moleküllerin üretimini arttırarak renal fibrozis ile ilişkili extraselüler matriks birikiminde rol aldığı düşünülmektedir [85].

mir-181a-3p: T ve B hücre gelişiminde ve CD4 pozitif aktive T hücrelerinde negatif regülasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle akut rejeksiyonda T ve B hücrelerinin migrasyonunda önemli rol oynadıkları düşünülmektedir [80].

mir-181b-5p: T ve B hücre gelişiminde düzenleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir. importin- $\alpha 3$ hedefliyerek NF- κB aracılı vasküler inflamasyonu inhibe etmektedir. [86].

mir-210-5p: Yardımcı T Hücre 17 (Th17) farklılaşmasında düzenleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle Th17 hücrelerinin farklılaşmasında negatif düzenleyiciler oldukları, hipoksik koşullar altında mir-210'un susturulmasının Th17 farklılaşmasını arttırdığı düşünülmektedir. mir-210, Th17 farklılaşmasında anahtar rol alan transkripsiyonel regülatör HIF-1alfa'yı negatif olarak regüle eder. [87].

mir-142-5p: immün sistemde CD8+ Sitotoksik T Lenfosit aktivasyonunda negatif regülasyonda rol oynadığı düşünülmektedir [73-83]

mir-192-5p: Böbrekte diğer organlardan daha fazla ifade edilir. Hücre fenotipine bağlı olarak pro ve anti fibrotik özellikler gösterebildiği düşünülmektedir. Renal fibroziste en önemli mekanizmalardan biri Tübüler Epitelyal Mezenkimal dönüşümdür. TGF-beta sinyalleme, mezenkimal transkripsiyon faktörlerinin (ZEB1/2) aktivasyonu ile güçlü bir EMT indükleyicisidir. Özellikle mir-192 renal tübüler hücrelerde EMT'nin indüksiyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir [94].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmamızda böbrek nakli olan hastalarda miRNA etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Örnekler Başkent Üniversitesi Adana Turgut Noyan Eğitim Araştırma Merkezinde 2000-2016 yılları arasında böbrek nakli olmuş çocuk ve erişkin hastalardan seçilmiştir. Hastaların rutin testler için alınan kan örneklerinden ayrılan ve kullanılmayan serum örnekleri kullanılmıştır. Bu serum örneklerinde miRNA etkilerinin araştırılması amacıyla gerekli tüm kit ve sarflar QIAGEN firmasından temin edilmiştir.

3.1.1. Kitler

Kullanılan kitlerin, kullanım amacı, markaları ve üretim yerleri çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kitler

Kitin adı	Kullanım amacı	Markası ve üretim yeri
miRNeasy Serum/Plasma Kit	miRNA izolasyonu	Qiagen, Hilden, Almanya
miscript II RT Kit	cDNA sentezi	Qiagen, Hilden, Almanya
miScript Primer Assay	miRNA Real-Time çalışması	Qiagen, Hilden, Almanya
miScript SYBR Green PCR Kit	miRNA Real-Time çalışması	Qiagen, Hilden, Almanya

3.1.2. Cihazlar

Tüm çalışmalar Başkent Üniversitesi Adana Turgut Noyan Eğitim Araştırma Merkezi HLA/İmmünoloji laboratuvarında yapılmıştır. Çalışma sırasında kullanılan cihazlar çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Kullanım Amacı	Cihazın markası, modeli	SERİ NO
(-80) derin dondurucu - 1	Örneklerin saklanması	Wisecryo / WUF400	4089260995001.
(-20) derin dondurucu 2	Kitlerin saklanması	Beko / D7215SMF	09-103434-11
Mini Santrifüj/ Vorteks-1	Örnek hazırlanması	Biosan / FVL2400N	010202-1203-0155
VORTEX-3	Örnek hazırlanması	Biosan / V1	580705114
Spektrofotometre	RNA/cDNA konsantrasyon ölçümü	Maestrogen Nano / MN-913	436020166118
PCR Kabin	Örnek çalışılması	Scanlaf / Titan	1090188
PCR Cihazı	cDNA sentezi	Sensquest / Labcycler	1123280171
Real-Time PCR Cihazı	miRNA ekspresyon çalışması	RGQ 5Plex HRM	R012567
Otomatik Pipet Seti	Örnek hazırlanması	HTL	340562884

3.2. Çalışma Grubu

3.2.1 Çalışma etik kurul onayı ve onamlar

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:KA16/199) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.Etik kurul onayı Ek-1’ de sunulmuştur

Çalışma grubuna alınan hasta ve gönüllülere gerekli bilgiler verilerek onamları alınmış ve örneği Ek-2 ve Ek-3’de sunulmuştur.

3.2.2. Çalışma grubunun özellikleri ve verileri

Çalışmaya dâhil edilen denek sayısı, cinsiyet dağılımı, prognoz, nakil için donör değişkenler ve rejeksiyon tipleri çizelge 8, 9,10,11,12 ve 13’de verilmiştir.

Çalışma 50 rejeksiyon (hasta grubu) ve 50 rejeksiyonu olmayan (kontrol grubu) olmak üzere böbrek nakli yapılan toplam 100 hasta [27 kadın (%27,0), 73 Erkek (%73,0)] ile yapılmıştır (Çizelge 8). Hasta grubu Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi AD’de 2010-2016 yılları arasında böbrek nakli olmuş olgulardan seçilmiştir. Çalışmaya dahil edilen böbrek nakli yapılan 50 rejeksiyon hastasının 43 tanesi (%86) erişkin, 7 tanesi (%14) pediatrik olgulardan oluşmaktadır. Çalışmaya dahil edilen böbrek nakli yapılmış kontrol grubunun 34 tanesi (%68) erişkin, 16 tanesi (%32) pediatrik olgulardan oluşmaktadır.

Çizelge 3.3. Çalışma grubunun dağılım özellikleri

	Erkek	Kadın	Erişkin	Çocuk
Hasta	42	8	43	7
Kontrol	31	19	34	16

Çalışmaya dahil edilen böbrek nakli yapılan 50 rejeksiyon hastasına 16 kadavra (%32), 34 canlı (%68) donörden nakil yapılmıştır (Çizelge 9). Canlı donörlerden yapılan nakillerin 15’i anneden (%44), 13’ü babadan (%38) ve 6’sı kardeşten (%18) yapılmıştır (Çizelge 10). Böbrek nakli yapılan 50 kontrol grubuna 17 kadavra (%34), 33 canlı donörden (%66) nakil yapılmıştır (Çizelge 9). Canlı donörlerden yapılan nakillerin 10’u anneden (%30,3) , 9’u babadan (%27,2) ve 14’ü kardeşten (%42,4) yapılmıştır (Çizelge 10).

Çizelge 3.4. Donör dağılım özellikleri

Hasta (Donör)		Kontrol (Donör)	
Kadavra	Canlı	Kadavra	Canlı
16	34	17	33

Çizelge 3.5. Donör dağılım özellikleri

Hasta (Donör Canlı)			Kontrol (Donör Canlı)		
Anne	Baba	Kardeş	Anne	Baba	Kardeş
15	13	6	10	9	14

Çalışmaya dahil edilen böbrek nakli yapılan 50 rejeksiyon hastasında HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP uyumu sırasıyla 6 HLA uyumu (0), 5 HLA uyumu (7), 4 HLA uyumu (1), 3 HLA uyumu (23), 2 HLA uyumu (8) ve 1 HLA uyumu (11) olarak sonuçlanmıştır (Çizelge 11). Çalışmaya dahil edilen böbrek nakli yapılan 50 kontrol grubunda HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP uyumu sırasıyla 6 HLA uyumu (0), 5 HLA uyumu (10), 4 HLA uyumu (1), 3 HLA uyumu (22), 2 HLA uyumu (12) ve 1 HLA uyumu (5) olarak sonuçlanmıştır (çizelge12).

Çizelge 3.6. HLA uyumu

Hasta (Donör HLA Uyumu olan A/B/C/DR/DQ/DP)					
6 UYUM	5 UYUM	4 UYUM	3 UYUM	2 UYUM	1 UYUM
0	7	1	23	8	11

Çizelge 3.7. HLA uyumu

Kontrol (Donör HLA Uyumu olan A/B/C/DR/DQ/DP)					
6 UYUM	5 UYUM	4 UYUM	3 UYUM	2 UYUM	1 UYUM
0	10	1	22	12	5

Böbrek nakli yapılan 50 rejeksiyon hastasında rejeksiyon tipleri 32 hümmoral ve hüccresel rejeksiyon (%64) , 10 yalnız hümmoral rejeksiyon (%20) ve 8 (%16) yalnız hüccresel rejeksiyon olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.8. Rejeksiyon tipi

Hasta Rejeksiyon Tipi (Akut + Kronik)		
Hümmoral	Hüccresel	Hümmoral + Hüccresel
10	8	32

3.2.3. Hastaların çalışmaya dâhil edilme koşulları

Nakil sonrası takiplerinin merkezimizde yapılması, nakil sonrası herhangi bir malignite saptanmamış olması ve zihinsel ve kognitif bozukluk olmaması olarak belirlenmiştir.

3.2.4. Hastaların çalışmadan dışlanma koşulları

Hastaların tedaviyi hekimin bilgisi olmadan kesmesi, aksatması veya değiştirmesi, malignite saptanması hastaların çalışmadan dışlanma koşulları olarak kabul edilmiştir.

3.2.5. Sağlıklı kontrol grubunun çalışmaya dâhil edilme koşulları

Herhangi bir tedavi gerektiren hastalığının olmaması ve zihinsel ve kognitif bozukluğun olmaması kontrol grubu seçiminde çalışmaya dâhil edilme koşulları olarak belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilmiş olan koşullara göre çalışmaya dâhil edilen kişilerde yeni bir dışlama koşulu ortaya çıktığı zaman çalışmadan çıkarılmıştır.

3.2.6. Hastaların klinik izlemi ve takibi

Hastalar Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi ABD’de böbrek nakli yapılarak, Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Pediatrik Nefroloji ve/veya Erişkin Nefroloji BD’ de takip edilmiştir.

3.3. Çalışma Metodu

3.3.1 Serum örneği toplanması

Böbrek nakli yapılmış olgulardan rutin tetkikleri için alınmış olan kan örneğinden ayrılan 1 ml serum örneği kullanıldı.

3.3.2. Serum örneklerinin saklanması ve çalışma öncesi hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen tüm olgulardan rutin testler için alınmış kan örneklerinden elde edilen 1ml serum örnekleri Başkent Üniversitesi Turgut Noyan Eğitim Araştırma Merkezi HLA/immünoloji Laboratuvarında -80°C de saklanmıştır.

3.3.3. Serum örneklerinden miRNA izolasyonu

-80°C de saklanan serum örnekleri +4 °C de çözüldükten sonra oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Serum örneklerinden miRNA izolasyonu için miRNeasy Serum/Plazma izolasyon kiti (QIAGEN,Hilden) kullanıldı. 200 µl serum örneği alınarak 2 ml tüpe konuldu ve üzerine 5 volüm (1000 µl) Qiazol lysis reagent eklenerek vortekslendi

(karıştırıldı). Örnekler 5 dk oda sıcaklığında (15-25°C) bekletildi. Süre sonunda başlangıç materyali kadar (200 µl) kloroform eklendi. 15 saniye boyunca iyice vortekslendi (Çalkalama işleminin iyi yapılmış olması faz ayırmasına avantaj sağlar). 2-3 dakika oda sıcaklığında hafif alt-üst edilerek beklenir. Sonrasında +4 °C'de 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Oluşan üç fazdan üstte olanından 600 µl alınarak yeni bir toplama tüpüne transfer edilir. Ara fazdan alınmaması gerekir. 900 µl %100 lük saf etanol eklenir. Alt üst edilerek iyice karışması sağlanır. Bu karışımdan 700 µl örnek alınarak RNaz Mini kolonun içine konuldu. Kapağı kapatıldı ve 15 sn oda sıcaklığında 10000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı. Örnekten geriye kalan kısım tekrar RNaz Mini kolonun içine konup 15 sn oda sıcaklığında 10000 rpm'de santrifüj edildi. 700 µl RWT tamponundan RNaz mini kolona eklendi ve 15 sn oda sıcaklığında 8000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı. 500 µl RPE tamponundan RNaz Mini kolonun üstüne eklendi ve 15 sn oda sıcaklığında 8000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı. 500 µl RPE tamponundan RNaz Mini kolona eklendi ve 2 dk 8000 rpm'de santrifüj edildi. Yeni bir 2 ml koleksiyon tüpüne RNaz Mini kolon yerleştirildi. Membran kuruyana kadar 1 dk en yüksek hızda santrifüj edildi. RNaz Mini kolon, yeni bir 1,5 ml toplama tüpe transfer edildi. Kolon 1,5 ml lik yeni toplama tüpüne yerleştirildi. 14 µl RNase içermeyen su spin kolonunun merkezine direkt olarak eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında beklenir. Maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen RNA'lar -80 °C'de saklamak üzere kaldırıldı.

3.3.4. miRNA'dan komplementar DNA (cDNA) eldesi

cDNA (*kalıp, complementary DNA*)'lar, Qiagen miScript Reverse Transcription (RT) Kit II (Hilden, Almanya) kullanılarak sentezlenmiştir. Tablo 14'e göre RT toplam karışımı buz üzerinde hazırlandı. RNA miktarı 12 µl kullanıldı. RNA, RT karışımı içeren her bir tüpe eklendi. Kısa bir santrifüj edildi ve buz üzerine tekrar konuldu.

Çizelge 3.9. RT-PCR için bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Tepkime Hacmi
5x miScriptHiSpec tamponu	4 µl
10x miScript Nükleik asit karışımı	2 µl
miScriptReverseTranscriptaseMix	2 µl
Kalıp RNA	12 µl
Toplam Hacim	20 µl

37°C’de 60 dk, 95°C’de 5 dk olan tepkime koşullarına göre RT-PCR yapıldı. Sonrasında cDNA miktarları 20 µl’de 50 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. qRT-PCR (*gerçek zamanlı-Real Time PCR*) tepkimesi için 10 ng/µl cDNA kullanıldı.

3.3.5. Q-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı-PCR)

qRT-PCR için tepkime bileşenleri Qiagen miScript SYBR Green PCR kiti kullanılarak hazırlandı. Çizelge 15’de bileşenlerin tepkime hacimleri verilmiştir.

Çizelge 3.10. qRT-PCR için kullanılan bileşenlerin oranları

Bileşenler	Hacim
2x QuantiTect SYBR Green PCR Toplam Karışım	10 µl
10x miScript Universal Primer	2 µl
10x miScriptPrimerAssay (Related miRNA primer)	2 µl
RNaz içermeyen su	1 µl
Kalıp cDNA (50ng/ul’dan alındı)	5 µl
Toplam hacim	20 µl

Buz üzerinde tepkime bileşenleri hazırlanıp mir-32-1, mir-142-5p, mir-146a-1, mir 150-1, mir-181a-2, mir-181b-1, mir-192-1, mir-210-1 mikro RNA primerleriyle beraber referans olarak SNORD61 ifade seviyelerine tespit etmek için qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) kullanılmıştır. Çizelge 16’da Q-PCR tepkime koşulları verilmiştir.

Çizelge 3.11. qRT-PCR Tepkime Koşulları

Sıcaklık (oC)	Zaman(dk)	
95	15	
94	15	} 40 döngü
55	30	
70	30	

3.3.6. Veri analizi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ Analizi ile kat değişimlerinin hesaplanması)

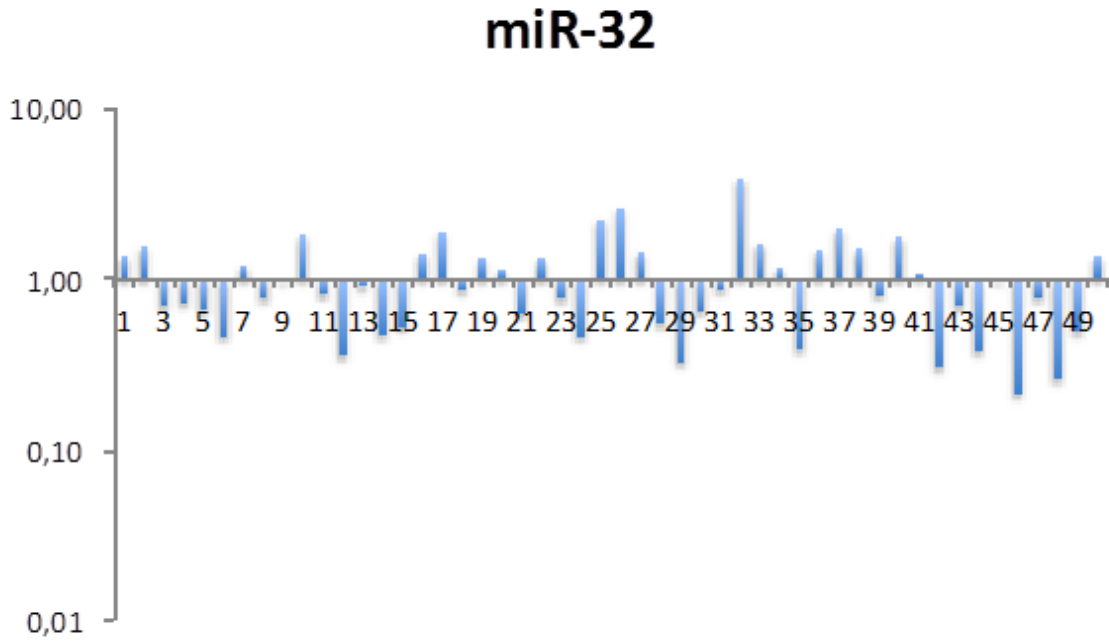
Böbrek nakli yapılan 100 olguda, rejeksiyon gelişen (50 olgu) grup ile rejeksiyon gelişmeyen (50 olgu) gruptaki miRNA gen ekspresyonlarında meydana gelecek değişiklikler hesaplandı. Real Time analizinde verilen Ct değerleri formüle edilerek Excel programı yardımıyla tüm miRNA'ların $2^{-\Delta\Delta C_t}$ analizleri yapıldı. SNORD referans miRNA kabul edilerek öncelikle delta Ct değerleri hesaplandı. Sonrasında normal olgulara göre normalizasyonu yapılarak kat değişimleri hesaplandı. Bu hesaplamalar için kat değişim eşik oranı 2 olarak kabul edildi. Analizlerin sonrasında miRNA'ların R programı kullanılarak Heatmap grafikleri çizilmiştir. Analizler sonucu anlamlı değişiklik gösteren miRNA'lardan hsa-miR-142 ifadesinin arttığı, hsa-miR-192'nin ise azaldığı gözlemlenmiştir. Tüm analizler "QIAGEN GeneGlobe Data Analysis Center" web sitesi üzerinden yapılmıştır.

Çizelge 3.12. miRNA Listesi (miRNA dizinleri ile birlikte)

miRNA	Sekans Dizisi	Primer Sekans Dizisi
hsa-miR-32-5p	GGAGAUAAUUGCACAUUACUAAGUUGCAUGUUGU CACGGCCUCAAUGCAAUUUAGUGUGUGUGAUAAU UUUC	UAUUGCAC AUUACUAA GUUGCA
hsa-miR-142-5p	GACAGUGCAGUCACCCAUAAGUAGAAAGCACUA CUAACAGCACUGGAGGGUGUAGUGUUUCCUACU UUAUGGAUGAGUGUACUGUG	CAUAAAGU AGAAAGCA CUACU
hsa-miR-146a-5p	CCGAUGUGUAUCCUCAGCUUUGAGAACUGAAUUC CAUGGGUUGUGUCAGUGUCAGACCUCUGAAAUU CAGUUCUUCAGCUGGGGAUAUCUCUGUCAUCGU	UGAGAACU GAAUUCCA UGGGUU
hsa-miR-150-5p	CUCCCCAUGGCCCUGUCUCCCAACCCUUGUACCA GUGCUGGGCUCAGACCCUGGUACAGGCCUGGGGG ACAGGGACCUGGGGAC	UCUCCCAA CCCUUGUA CCAGUG
hsa-miR-181a-2-3p	AGAAGGGCUAUCAGGCCAGCCUUCAGAGGACUCC AAGGAACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUUGGA UUUGAAAAAACCACUGACCGUUGACUGUACCUUG GGGUCCUUA	ACCACUGA CCGUUGAC UGUACC
hsa-miR-181b-5p	CCUGUGCAGAGAUUAUUUUUAAAAGGUCACAA UCAACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGUUGAACUGU GUGGACAAGCUCACUGAACAAUGAAUGCAACUG UGGCCCCGCUU	AACAUUCA UUGCUGUC GGUGGGU
hsa-miR-192-5p	GCCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAUGA AUUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCUGGCU GCCAAUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUCGCCUCA AUGCCAGC	CUGACCUA UGAAUUGA CAGCC
hsa-miR-210-3p	ACCCGGCAGUGCCUCCAGGCGCAGGGCAGCCCCU GCCACCGCACACUGCGCUGCCCCAGACCCACUG UGCGUGUGACAGCGGCUGAUCUGUGCCUGGGCAG CGCGACCC	CUGUGCGU GUGACAGC GGCUGA

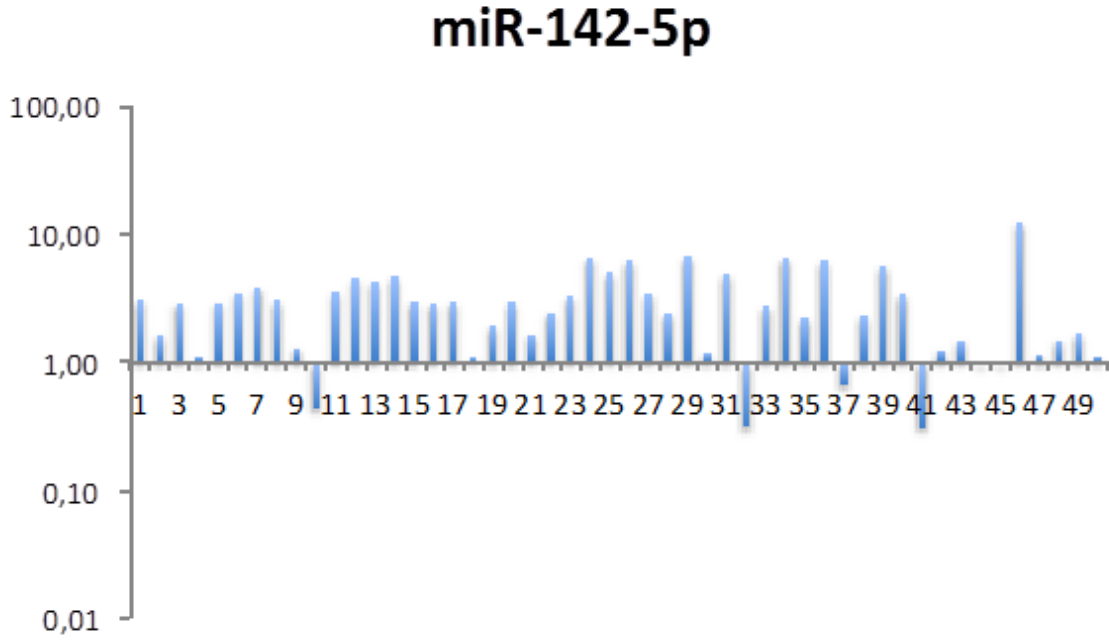
4. BULGULAR

Böbrek nakli yapılan ve böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların (n=50) mir-32 miRNA'sı böbrek rejeksiyonu olamayan hastalarla (n=50) karşılaştırıldığında , böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların 14'ünde (%28) anlamlı kat değişimi saptanırken 36 hastada (%72) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 14 olgudan 11'inde (%78) artış, 3 olguda (%22) azalış analiz edilmiştir (Şekil 8).



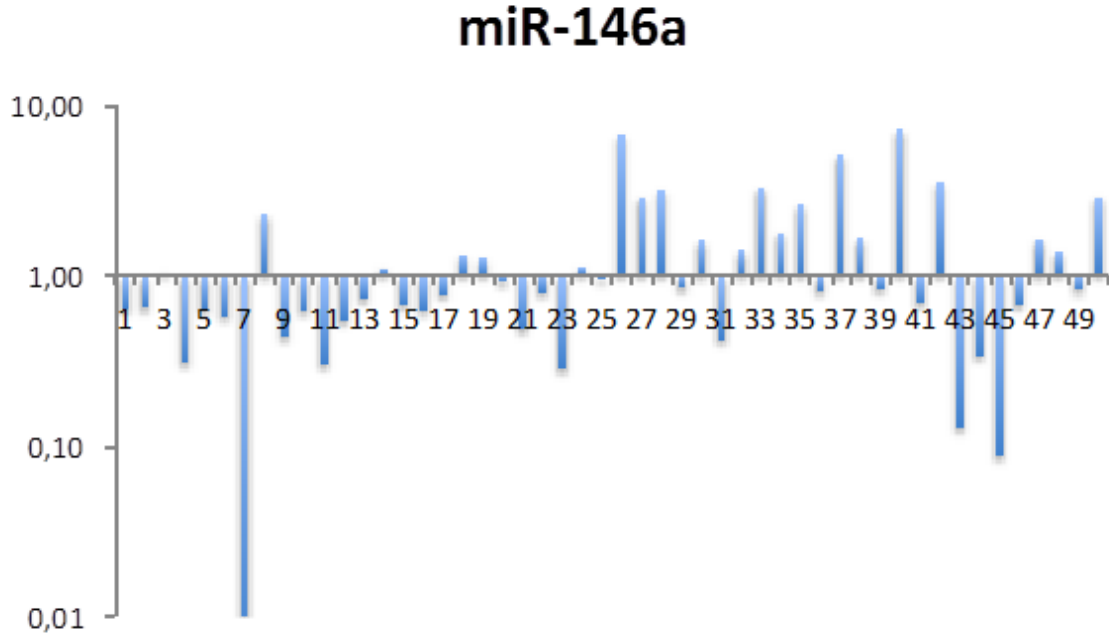
Şekil 4.1. Böbrek nakli olan hastalarda miR32 nın ekspresyon dağılımı

Böbrek nakli yapılan ve böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların (n=50) mir-142 miRNA'sı böbrek rejeksiyonu olmayan hastalarla (n=50) karşılaştırıldığında , böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların 33'ünde (%66) anlamlı kat değişimi saptanırken 17 hastada (%34) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 33 olgudan 30'unda (%91) ciddi artış, 3 olguda (%9) azalış analiz edilmiştir (Şekil 9).



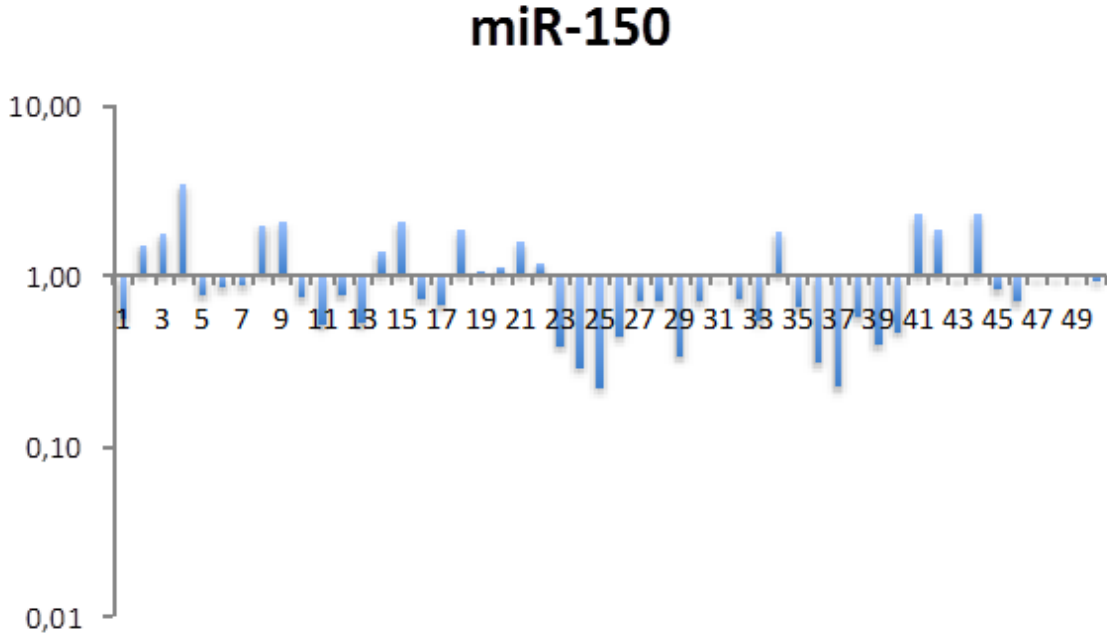
Şekil 4.2. Böbrek nakli olan hastalarda miR142-5p nin ekspresyon dağılımı

Böbrek nakli yapılan ve böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların (n=50) mir-146 miRNA'sı böbrek rejeksiyonu olmayan hastalarla (n=50) karşılaştırıldığında , böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların 19'unda (%38) anlamlı kat değişimi saptanırken 31 hastada (%62) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 19 olgudan 9'unda (%47) artış, 10 olguda (%53) azalış analiz edilmiştir (Şekil 10).



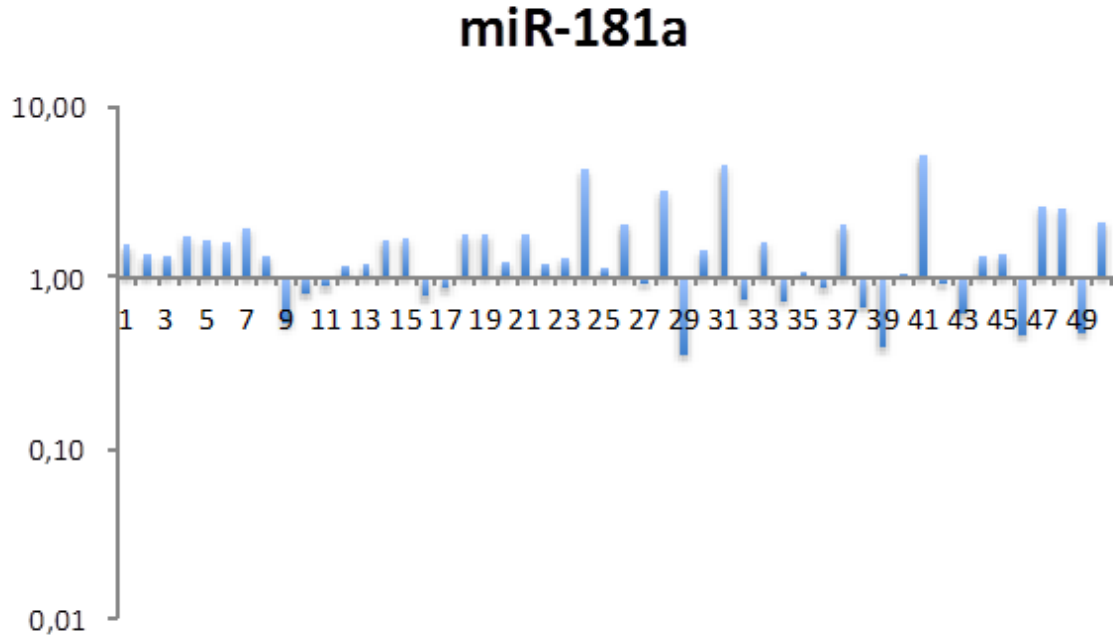
Şekil 4.3. Böbrek nakli olan hastalarda miR146a nın ekspresyon dağılımı

Böbrek nakli yapılan ve böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların (n=50) mir-150 miRNA'sı böbrek rejeksiyonu olamayan hastalarla (n=50) karşılaştırıldığında , böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların 14'ünde (%28) anlamlı kat değişimi saptanırken 36 hastada (%72) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 14 olgudan 9'unda (%64) artış, 5 olguda (%36) azalış analiz edilmiştir (Şekil 11).



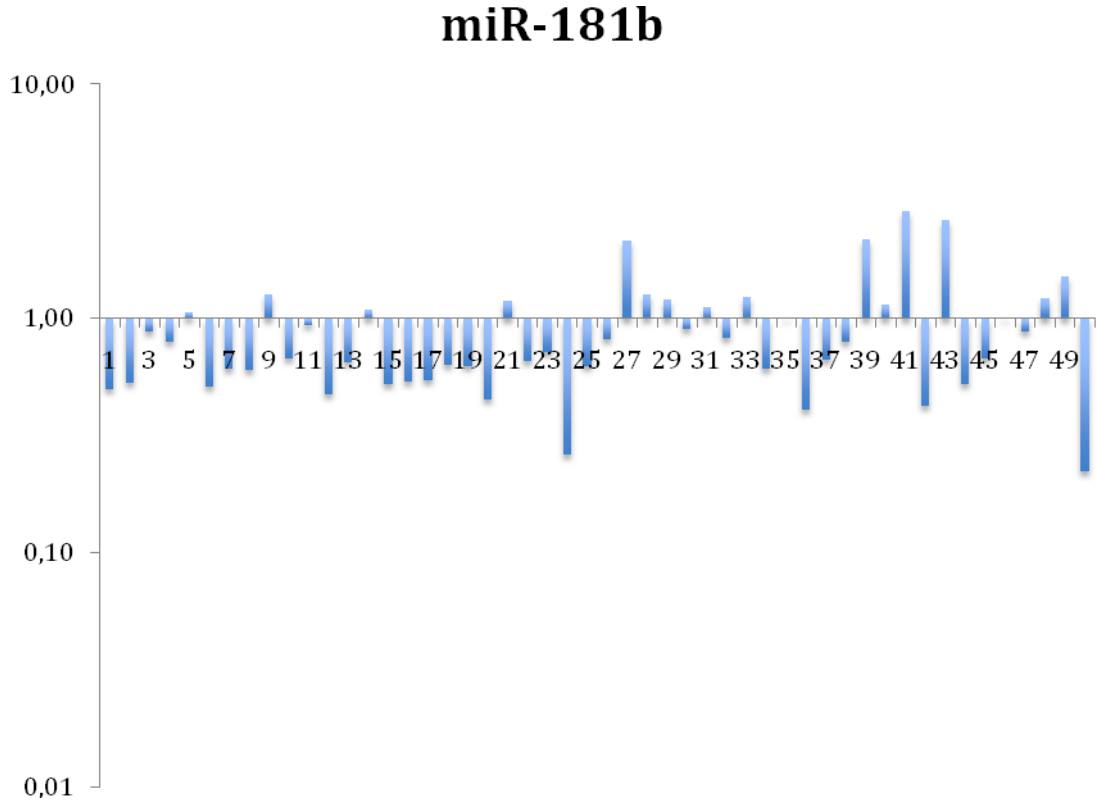
Şekil 4.4. Böbrek nakli olan hastalarda miR150 nin ekspresyon dağılımı

Böbrek nakli yapılan ve böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların (n=50) mir-181a miRNA'sı böbrek rejeksiyonu olmayan hastalarla (n=50) karşılaştırıldığında , böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların 13'ünde (%26) anlamlı kat değişimi saptanırken 37 hastada (%74) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 13 olgudan 9'unda (%69) artış, 4 olguda (%31) azalış analiz edilmiştir (Şekil 12).



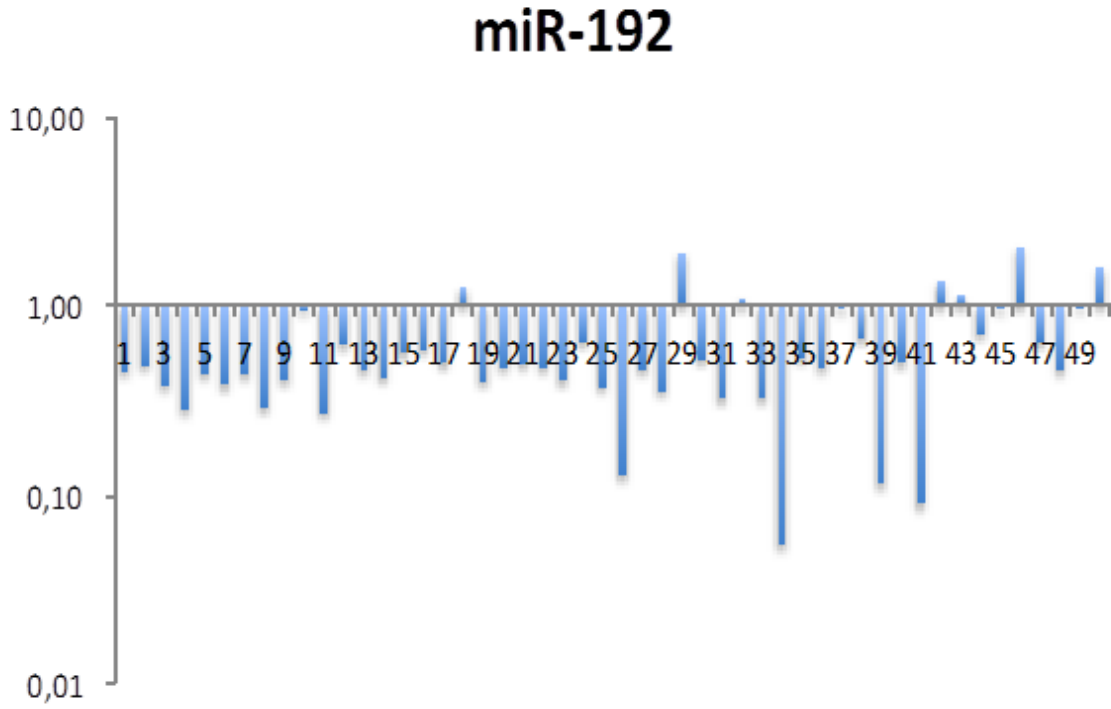
Şekil 4.5. Böbrek nakli olan hastalarda miR181a'nın ekspresyon dağılımı

Böbrek nakli yapılan ve böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların (n=50) mir-181b miRNA'sı böbrek rejeksiyonu olmayan hastalarla (n=50) karşılaştırıldığında , böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların 11'inde (%22) anlamlı kat değişimi saptanırken 39 hastada (%78) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 11 olgudan 4'ünde (%36) artış, 7 olguda (%64) azalış analiz edilmiştir (Şekil 13).



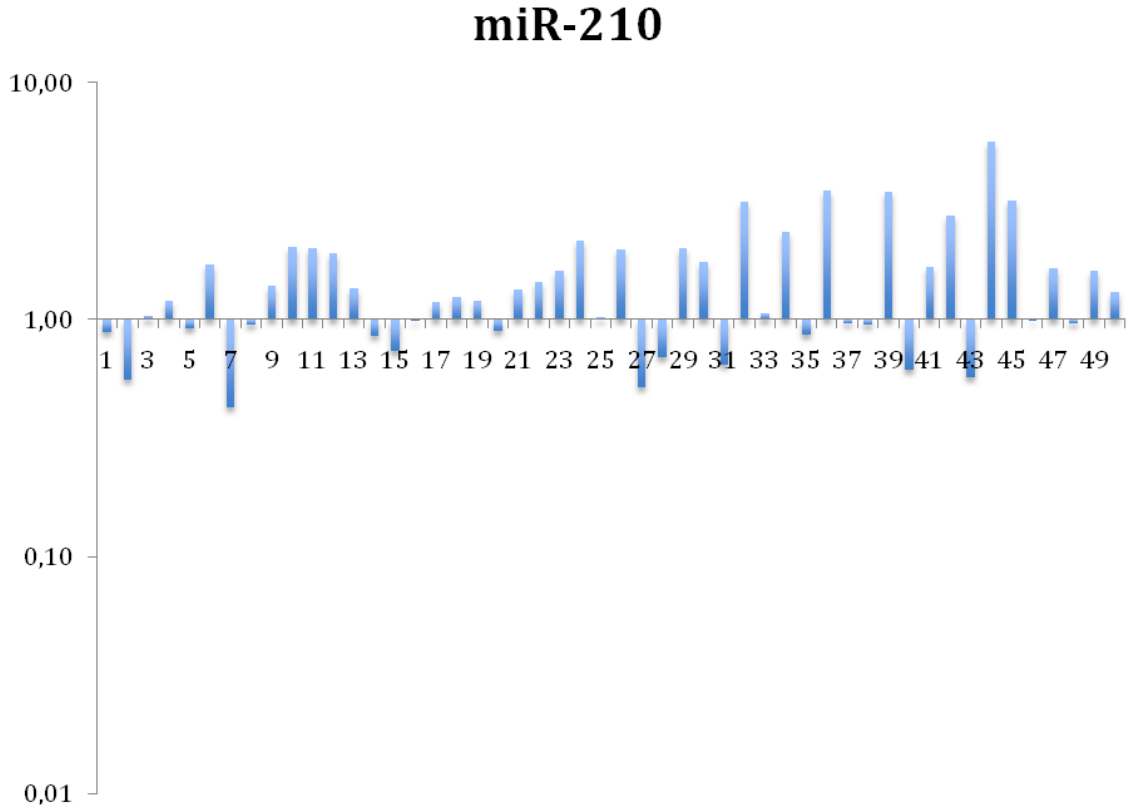
Şekil 4.6. Böbrek nakli olan hastalarda miR181b'nin ekspresyon dağılımı

Böbrek nakli yapılan ve böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların (n=50) mir-192 miRNA'sı böbrek rejeksiyonu olmayan hastalarla (n=50) karşılaştırıldığında , böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların 31'inde (%62) anlamlı kat değişimi saptanırken 19 hastada (%38) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 31 olgudan 1'inde (%3) artış, 30 olguda (%97) azalış analiz edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 4.7. Böbrek nakli olan hastalarda miR192'nin ekspresyon dağılımı

Böbrek nakli yapılan ve böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların (n=50) mir-210 miRNA'sı böbrek rejeksiyonu olamayan hastalarla (n=50) karşılaştırıldığında , böbrek rejeksiyonu gelişen hastaların 11'inde (%22) anlamlı kat değişimi saptanırken 39 hastada (%78) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 11 olgudan 4'ünde (%36) artış, 7 olguda (%64) azalış analiz edilmiştir (Şekil 15).



Şekil 4.8. Böbrek nakli olan hastalarda miR210 nın ekspresyon dağılımı

5. TARTIŞMA

Böbrek nakli, son dönem böbrek yetersizliği hastalarının hem yaşam süresini uzatan hem de yaşam kalitesini artıran en seçkin tedavi yöntemidir. Başarılı ile sonuçlanan ilk böbrek nakli, 1954 yılında Amerika Birleşik Devletlerinin Boston şehrinde Peter Bent Brigham Hastanesi'nde Dr. Joseph Murray ve ekibi tarafından HLA'ları (Human leucocyte antigens- insan lökosit antijen) aynı olan tek yumurta ikizleri arasında gerçekleştirilmiştir. İmmüsupresif ilaçların keşfiyle HLA'ları uyumlu olmayan bireyler arasında da başarılı nakiller yapılmaya başlanmıştır. Güçlü bağışıklık sistemi baskılayıcıların kullanıma girmesiyle akut rejeksiyon oranları giderek azalmış ve günümüzde çoğu merkezde 1 yıllık graft sağkalım oranı %90'ı geçmiştir. Ancak bağışıklık sistemi baskılayıcıların kullanımına bağlı olarak infeksiyonlarda ve malignite sıklığında artış, ilaçların kardiyovasküler risk artışına yol açan yan etkileri ortaya çıkmıştır. Bağışık sistemini baskılayıcı ilaçlar kısa dönem graft sağkalım oranlarındaki başarının uzun döneme yansımaları önlemektedir.

Yeni ilaçlar geliştirmenin yanında uzun dönem graft sağkalımını artırmak için başvuru yollarından biri de, grafta karşı immünolojik tolerans gelişimini sağlamaktır.

Ülkemizde böbrek yetersizliği gelişen hasta sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu hastaların donör bulmakta sıkıntıların yaşandığından dolayı, uygun organ bulmak veya organ bağışının teşviki önemli bir ihtiyaçtır. Bunu sağlamanın yollarından biri, grafta karşı immünolojik tolerans gelişiminin sağlanarak idame immüsupresif tedavinin azaltılması veya kesilmesinin sağlanması ve böylece ilaç yan etkilerine bağlı problemlerin de azaltılmasıdır. Regulator T hücrelerinin ve miRNA'ların keşfi ve hem öz antijenlere hem alloantijenlere tolerans gelişiminde önemli rol oynadıklarının gösterilmesiyle, transplantasyon toleransı oluşturmak için regulator T hücrelerini artırmanın yolları aranmaktadır.

Mikro RNA'lar (miRNA) immün regülasyonda rol alan, küçük, kodlama yapmayan RNA molekülleridir. Esas olarak protein kodlayan mRNA'ların 3' bölgelerine bağlanarak protein translasyonunun inhibisyonu takibinde mRNA'nın degradasyonuna neden olurlar ve stresle indüklenen ligandları hedef alırlar. miRNA'ların immün sistem hücrelerinin gelişiminde, farklılaşmasında, aktivasyonunda, immün yanıtlarda ve immün yanıtların regülasyonu gibi bir çok farklı süreçte rol oynadığı düşünülmektedir. [75] miRNA'lar bir

çok immün sistem hücrelerinin farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve işlevini etkileyerek inflamasyonda önemli rol oynamaktadır [75]. miRNA ve immün sistemdeki görevleri Çizelge 18 de gösterilmiştir. miRNA'ların immün sistemdeki kritik rolleri baz alınarak böbrek nakli yapılan olgularda serumdaki miRNA'ların ekspresyonu analiz edilmiştir.

Bu çalışmada böbrek nakli olan hastalar rejeksiyon gelişenler ve rejeksiyon gelişmemiş olanlar olarak gruplandırılıp kendi arasında değerlendirilmiştir. Rejeksiyon gelişmeyen hasta gurubu kontrol olarak kabul edilmiş ve rejeksiyonu gelişmiş olan hasta gurubunda miRNA ların ekspresyon değerlerine bakılmıştır.

mir-32 immün sistemde T hücre farklılaşmasında ve B hücre regülasyonunda görevli olduğunu gösteren çalışmalar vardır [73,77,79]. Hem immün sistem ve yanıtlarında görevli genleri hem de transplant rejeksiyonunda görevli bazı genleri hedeflemesi açısından miR-32 çalışmamıza dahil edilmiş olup, rejeksiyonu olan ve olmayan toplam 100 olgunun serum örneklerinde miR-32 ekspresyonuna bakılmıştır. Anglicheau ve arkadaşlarının böbrek nakli yapılan olgularda miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında, olgulardan alınan biyopsi örneklerinde miR-32 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir [88]. Scian ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada 27 olguya ait biyopsi örneklerinde miR-32 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [89]. Çalışmamızda böbrek nakli yapılan hastalarda (n=100), rejeksiyon gelişen ve gelişmeyen hastalar miR-32 miRNA ekspresyonu açısından analiz edilmiştir. Rejeksiyon gelişen hastalar (n=50) rejeksiyon gelişmeyen hastalara göre değerlendirildiğinde, rejeksiyon gelişenlerin 14'ünde (%28) anlamlı kat değişimi saptanırken 36 hastada (%72) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 14 olgudan 11'inde (%78) artış, 3 olguda (%22) azalış analiz edilmiştir.

mir-142-5p immün sistemde T hücre aktivasyonunda ve CD8 Sitotoksik T Lenfosit fonksiyonlarında anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. İmmün sistemde CD8+ Sitotoksik T Lenfosit aktivasyonunda negatif regülasyonda rol oynadığı düşünülmektedir [73-83]. Hem immün sistem ve yanıtlarında görevli genleri hemde transplant rejeksiyonunda görevli bazı genleri hedeflemesi açısından miR-142-5p çalışmamıza dahil edilmiş olup, rejeksiyonu olan ve olmayan toplam 100 olgunun serum örneklerinde miR-142-5p ekspresyonuna bakılmıştır. Ben-Dov ve arkadaşlarının 18 olguya ait biyopsi örneklerinden yaptıkları derin sekanlama sonuçlarında miR-142-5p ekspresyonunu anlamlı düzeyde

arttığını tespit etmişlerdir [90]. Anglicheau ve arkadaşlarının böbrek nakli yapılan olgularda miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında, olgulardan alınan biyopsi örneklerinde miR-142-5p ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [92]. Soltaninejad ve arkadaşlarının intersitiyal fibrozis ve tübüler atrofi ile karakterize kronik allograft disfonksiyonu olan 16 olgunun biyopsi örneklerinden yapmış oldukları miRNA ekspresyon çalışmasında miR-142-5p ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [91]. Çalışmamızda böbrek nakli yapılan hastalarda (n=100), rejeksiyon gelişen ve gelişmeyen hastalar miR-142-5p ekspresyonu açısından analiz edilmiştir. Rejeksiyon gelişen hastalar (n=50) rejeksiyon gelişmeyen hastalara (n=50) göre değerlendirildiğinde, rejeksiyon gelişenlerin 33'ünde (%66) anlamlı kat değişimi saptanırken 17 hastada (%34) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 33 olgudan 30'unda (%91) ciddi artış, 3 olguda (%9) azalış analiz edilmiştir. miR-142-5p bulgularımız daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olup, diğer çalışmalardan en önemli farkı serumda ilk olarak gösterilmiş olmasıdır.

mir-146a-5p immün sistemde T hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir. CD4⁺ T hücre aktivasyonunda negatif, Treg hücreleri için ise pozitif düzenleyici olarak görev yaptığı düşünülmektedir [84]. Ayrıca TLR aracılı sinyal yollarında rol oynadığı bildirilmiş (negatif regülasyon) ve doğal immün yanıtların düzenlenmesinde de etkin olabileceği bildirilmiştir. TLR/IL-1 yoloğında anahtar rolü olan 2 önemli molekül (TRAF6 ve IRAK1) mir-146'nın direk hedefleri olarak tanımlanmıştır [80]. Hem immün sistem ve yanıtlarında görevli genleri hemde transplant rejeksiyonunda görevli bazı genleri hedeflemesi açısından miR-146a-5p çalışmamıza dahil edilmiş olup, rejeksiyonu olan ve olmayan toplam 100 olgunun serum örneklerinde miR-146-5p ekspresyonuna bakılmıştır. Anglicheau ve arkadaşlarının böbrek nakli yapılan olgularda miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında, olgulardan alınan biyopsi örneklerinde miR-146a-5p ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [88]. Çalışmamızda böbrek nakli yapılan hastalarda (n=100), rejeksiyon gelişen ve gelişmeyen hastalar miR-146a ekspresyonu açısından analiz edilmiştir. Rejeksiyon gelişen hastalar (n=50) rejeksiyon gelişmeyen hastalara (n=50) göre değerlendirildiğinde, rejeksiyon gelişenlerin 19'unda (%38) anlamlı kat değişimi saptanırken 31 hastada (%62) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 19 olgudan 9'unda (%47) artış, 10 olguda (%53) azalış analiz edilmiştir.

mir-150-5p immün hücrelerin farklılaşmasında ve aktivasyonunda (NK hücre gelişimi ve olgunlaşmasında, olgun T ve B hücre gelişiminde) negatif düzenleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca mir-150, pro-fibrotik moleküllerin üretimini arttırarak renal fibrozis ile ilişkili extraselüler matriks birikiminde rol aldığı düşünülmektedir [85, 92-93]. Çalışmamızda rejeksiyonu olan ve olmayan toplam 100 olgunun serum örneklerinde miR-150-5p ekspresyonuna bakılmıştır. Vahed ve arkadaşlarının böbrek nakli yapılan olguların (27 normal böbrek fonksiyonu olan olgu, 26 intersitial fibrozis ve tübüler atrofisi olan olgu) serum örneklerinden miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında miR-150-5p ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [92-93]. Çalışmamızda böbrek nakli yapılan hastalarda (n=100), rejeksiyon gelişen ve gelişmeyen hastalar miR-150 ekspresyonu açısından analiz edilmiştir. Rejeksiyon gelişen hastalar (n=50) rejeksiyon gelişmeyen hastalara (n=50) göre değerlendirildiğinde, rejeksiyon gelişenlerin 14'ünde (%28) anlamlı kat değişimi saptanırken 36 hastada (%72) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 14 olgudan 9'unda (%64) artış, 5 olguda (%36) azalış analiz edilmiştir.

mir-181a-3p immün sistem hücrelerinin gelişiminde ve immün sistem yanıtlarında (T ve B hücre gelişiminde) düzenleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle akut rejeksiyonda T ve B hücrelerinin migrasyonunda önemli rol oynadıkları düşünülmektedir [80, 94]. Vitalone ve arkadaşlarının böbrek nakli yapılan olgularda miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında, olgulardan alınan biyopsi örneklerinde miR-181a ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir [94]. Ayrıca Wilflingseder arkadaşlarının böbrek nakli yapılan olgularda miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında, olgulardan alınan biyopsi örneklerinde miR-181a ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir [95]. Çalışmamızda böbrek nakli yapılan hastalarda (n=100), rejeksiyon gelişen ve gelişmeyen hastalar miR-181-a ekspresyonu açısından analiz edilmiştir. Rejeksiyon gelişen hastalar (n=50) rejeksiyon gelişmeyen hastalara (n=50) göre değerlendirildiğinde, rejeksiyon gelişenlerin 13'ünde (%26) anlamlı kat değişimi saptanırken 37 hastada (%74) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 13 olgudan 9'unda (%69) artış, 4 olguda (%31) azalış analiz edilmiştir.

mir-181b-5p T ve B hücre gelişiminde düzenleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir. importin- 3 hedefliyerek NF- B aracılı vasküler inflamasyonu inhibe etmektedir. [86].

Wilflingseder arkadaşlarının böbrek nakli yapılan olgularda miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında, olgulardan alınan biyopsi örneklerinde miR-181b ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir [95]. Çalışmamızda böbrek nakli yapılan hastalarda (n=100), rejeksiyon gelişen ve gelişmeyen hastalar miR-181-b ekspresyonu açısından analiz edilmiştir. Rejeksiyon gelişen hastalar (n=50) rejeksiyon gelişmeyen hastalara (n=50) göre değerlendirildiğinde, rejeksiyon gelişenlerin 11'inde (%22) anlamlı kat değişimi saptanırken 39 hastada (%78) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 11 olgudan 4'ünde (%36) artış, 7 olguda (%64) azalış analiz edilmiştir.

mir-192 diğer organlarla karşılaştırıldığında böbrekte daha yüksek düzeyde eksprese olduğu bildirilmiştir. Böbrek fibrozisinde farklı ekspresyon düzeyleri rapor edilmiştir. Hücre fenotipine bağlı olarak pro ve anti fibrotik özellikler gösterebildiği düşünülmektedir. Renal fibroziste en önemli mekanizmalardan biri Tübüler Epitelyal Mezenkimal dönüşümdür. TGF-beta sinyalleme, mezenkimal transkripsiyon faktörlerinin (ZEB1/2) aktivasyonu ile güçlü bir EMT indükleyicisidir. Özellikle mir-192 renal tübüler hücrelerde EMT'nin indüksiyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir [94]. Glowacki arkadaşlarının böbrek fibrozisi olan hayvan modellerinde yapmış oldukları miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında alınan biyopsi örneklerinde miR-192 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir [96]. Bir başka çalışmada Vahed ve arkadaşlarının böbrek nakli yapılan olguların (27 normal böbrek fonksiyonu olan olgu, 26 intersitial fibrozis ve tübüler atrofi olan olgu) serum örneklerinden miRNA ekspresyon profillemesi çalışmasında miR-192'nin özellikle evre 4 intersitial fibrozis ve tübüler atrofi olan olgularda ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir [92-98]. Çalışmamızda böbrek nakli yapılan hastalarda (n=100), rejeksiyon gelişen ve gelişmeyen hastalar miR-192 ekspresyonu açısından analiz edilmiştir. Rejeksiyon gelişen hastalar (n=50) rejeksiyon gelişmeyen hastalara (n=50) göre değerlendirildiğinde, rejeksiyon gelişenlerin 31'inde (%62) anlamlı kat değişimi saptanırken 19 hastada (%38) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 31 olgudan 1'inde (%3) artış, 30 olguda (%97) azalış analiz edilmiştir.

mir-210-5p immün sistem hücrelerinin farklılaşmasında ve immün sistem yanıtlarında (Th17 hücre farklılaşmasında) düzenleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir. özellikle Th17 hücrelerinin farklılaşmasında negatif düzenleyiciler oldukları, hipoksik koşullar

altında mir-210'un susturulmasının Th17 farklılaşmasını arttırdığı düşünülmektedir [87]. Lorenzen ve arkadaşlarının akut böbrek hasarı olan 77 olgunun serum örneklerinden yapmış olduğu miRNA ekspresyon çalışmasında miR-210 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [97-99]. Çalışmamızda böbrek nakli yapılan hastalarda (n=100), rejeksiyon gelişen ve gelişmeyen hastalar miR-210 ekspresyonu açısından analiz edilmiştir. Rejeksiyon gelişen hastalar (n=50) rejeksiyon gelişmeyen hastalara (n=50) göre değerlendirildiğinde, rejeksiyon gelişenlerin 11'inde (%22) anlamlı kat değişimi saptanırken 39 hastada (%78) anlamlı kat değişimi tespit edilmemiştir. Anlamlı kat değişimi tespit edilen 11 olgudan 4'ünde (%36) artış, 7 olguda (%64) azalış analiz edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Böbrek nakli, böbrek yetersizliği olan hastalar için en önemli tedavi seçeneğidir. Böbrek nakli olan hastalarda graft kaybını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Böbrek nakli olan hastalarda graft kaybının önlenmesinin en önemli yolu grafta karşı immünolojik toleransın gelişmesidir. miRNA'lar küçük, kodlama yapmayan RNA molekülleri olup protein kodlayan mRNA'ların 3' bölgelerine bağlanarak protein translasyonunun inhibisyonu takibinde mRNA'nın degradasyonuna neden olan küçük RNA molekülleridir. miRNA'ların immün sistem hücrelerinin gelişiminde, farklılaşmasında, aktivasyonunda , immün yanıtlarda ve immün yanıtların regülasyonu gibi bir çok farklı süreçte rol oynadığı düşünülmektedir. miRNA'lar bir çok immün sistem hücrelerinin farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve işlevini etkileyerek inflamasyonda önemli rol oynamaktadır. İmmün sistemde bu önemli rolleri nedeni ile son yıllarda böbrek nakli yapılan hastalarda önemli araştırma konularından biri olmuştur. Çalışmamızda miRNA'ların immün sistemdeki önemli etkileri baz alınarak böbrek nakli yapılmış 100 hasta serumunda miRNA ekspresyonuna gerçek zamanlı PCR ile bakılmıştır. miRNA'lardan hsa-miR-142-5p ve has-miR-192-5p'nin rejeksiyon gelişen grupta gelişmeyen gruba göre anlamlı düzeyde ekspresyonunun değiştiği tespit edilmiştir. Literatürde böbrek nakli yapılmış ve rejeksiyon gelişen olguların biyopsi örneklerinde çalışmamızı destekleyen benzer bulgular bulunmaktadır. Böbrek nakli yapılmış ve rejeksiyon gelişmiş olgularda daha önce hsa-miR-142-5p ve has-miR-192-5p'nin anlamlı düzeyde ekspresyonunun değiştiği gösterilmiş olsa da bu çalışmalar çoğunlukla hayvan modellerinde veya rejeksiyon gelişen hastaların biyopsi örneklerinde yapılan çalışmalardır. Tez çalışmamızın literature en önemli katkısının girişimsel olamayan ve çok kolay örnek teminine olanak sağlayan hastaların serum örneklerinden yapılmış olmasıdır.

Böbrek nakli yapılan olgularda graft fonksiyonlarının takibi için girişimsel olmayan, uygulama kolaylığı olan yöntem ve/veya bir belirteç bulmak en önemli hedeflerden biridir. Bu konuda serum miRNA ekspresyon düzeyleri önemli adaylardan biri olarak bilim insanlarının en önemli araştırma konularından biri haline gelmiştir. Tez çalışmamızın bu anlamda literature önemli bir bilimsel veri olarak katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Serum miRNA'ların böbrek nakli yapılan olgularda graft fonksiyonlarına olan etkilerinin daha geniş miRNA içeriği ile araştırılması ve bunların diğer parametrelerle (miRNA'ların hedef genleri) birlikte graft fonksiyonu üzerine olan etkilerinin araştırılması, böbrek nakli

olan olgularda graft fonksiyonu takibi açısından çok önemli bilimsel verilerin elde edilmesine olanak sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Serum miRNA'ların hedeflediği genlerle birlikte araştırılması ve bu verilerin graft fonksiyonlarını etkileyen diğer immünolojik mekanizmalarla birlikte değerlendirilmesinin, sadece graft fonksiyonlarının takibine önemli katkı yapmasının dışında, aynı zamanda yeni tedavi hedeflerinin araştırmalarına önemli katkı yapacağı düşüncesindeyiz. Özellikle hedefe yönelik tedavilerin, gen ve miRNA tedavilerinin gelişmekte olduğu günümüzde, graft sağkalımına pozitif katkı yapan ve immünolojik toleransı hedefleyen immün terapiler açısından çok önemli olduğu düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- 1- National Kidney Foundation (2002). K/DOQI Clinical Practice guidelines for Chronic Kidney Disease: evaluation, classification, and stratification. *American Journal of Kidney Diseases*, 39(2):1-266.
- 2- Hogg, R.J., Furth, S., Lemley, K., Portman, R., Schwatz, G., Coresh, J. (2003). National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics*, 111: 1416-1421.
- 3- Feehally, J., Floege, J., Tonelli, M., Johnson, R.J. (2014). *Comprehensive Clinical Nephrology*, 5th Edition.
- 4- Ç, Erol. ve Süleymanlar, G. (2011). *İç Hastalıkları Nefroloji*. Birinci Baskı.
- 5- İnternet: İstanbul Üniversitesi Tıp fakültesi, URL: <http://www.webcitation.org/6zvGCPR3t> Son Erişim Tarihi: 10.09.2017
- 6- İnternet: Türk Nefroloji Derneği, URL: <http://www.webcitation.org/6zv2UUYFF> Son Erişim Tarihi: 10.09.2017
- 7- İnternet: Türk nefroloji Derneği, URL: <http://www.webcitation.org/6zv2aIHBv> Son Erişim Tarihi: 10.09.2017
- 8- Tanrıverdi, M.H., Karadağ, A., Hatipoğlu, E. (2010) Kronik böbrek yetersizliği. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2(2):27-32
- 9- Süleymanlar, G. Kronik Böbrek Hastalığı ve Yetmezliği: Tanımı, Evreleri ve Epidemiyolojisi. (2007). *Türkiye Klinikleri Journal Internal Medical Sciences*. 3(38): 1-7.
- 10- İnternet: U.S. Renal Data System. URL: <http://www.webcitation.org/6zvGQ3Qgs> Son Erişim Tarihi: 10.09.2017
- 11- Kocak, T., Nane, I., Ander, H., Ziyilan, O., Oktar, T., Özsoy, C. (2004). Urological and surgical complications in 362 consecutive living related donor kidney transplantations. *Urologia Internationalis*, 72: 252-6.
- 12- Altınanahtar, A. (2016). Dünya’da ve Türkiye’de Organ Tedariki ve Nakli: İktisadi Perspektifler, Sorunlar ve Çözüm Önerileri. *Sosyoekonomi*, 24(28), 11-30.
- 13- Sinangil, A., Ecder, T. (2016). Böbrek Transplantasyonu Endikasyonları. *Türkiye Klinikleri Journal Radioogyl Special Topics*, 9(3):83-6.
- 14- Danovitch, G.M. (2010). *Handbook of Kidney Transplantation*, 5th Edition.
- 15- <http://european-renal-best>
- 16- Opelz, G., Wujciak, T., Dohler, B. (1999). Is HLA matching worth the effort? Collaborative Transplant Study. *Transplant Proceedings*, 31:717-720.

- 17- Mosaad, Y.M. (2015). Clinical Role of Human Leukocyte in Health and Diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*, Oct;82(4):283-306. 614-25.
- 18- DeWolf, S., Sykes, M. (2107) Alloimmune T Cells in Transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, 127 (7):2473-2481.
- 19- Alegre, M.L., Lakkis, F.G., Morelli, A.E. (2016). Antigen Presentation in Transplantation. *Trends in Immunology*, 37(12): 831-843.
- 20- Pratschke, J., Dragun, D., Hauser, I., Horn, S., Mueller, T., Schemmer, P., Thaiss, F. (2016). Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. *Transplantation Reviews*, 30 77–84.
- 21- Valenzuela, N.M., Reed, E.F. (2017). Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies: a novel cell-based immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*, 127(7):2492-2504.
- 22- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology*, 8th Edition.
- 23- Goldberg, R.J., Weng F.L., Kandula, P. (2016). Acute and Chronic Allograft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients. *Medical clinics of North America*, 100(3):487-503.
- 24- Nankivell, B.J., Alexander, S.I. (2010). Rejection of the Kidney Allograft. *The New England Journal of Medicine*, 363:1451-62.
- 25- Cozzi, E., Colpo, A., De Silvestro, G. (2017). The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. *Transfusion and Apheresis Science*, 56(4):498-505.
- 26- Garg, N., Samaniego, M.D., Clark, D., Djamali, A. (2017). Defining the phenotype of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: Advances in diagnosis of antibody injury. *Transplant Reviews*, 31(4):257-267.
- 27- Vilkes, D.S., Burlingham, W.J. (204). *Immunobiology of OrganTransplantation*, 1th Edition
- 28- Dantal, J., Soulillou, J.P. (2005) Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 352(13): 1371-1373.
- 29- Langer, R.M., Jaray, J., Toth, A., Hidvegi, M., Vegsö, G., Perner, F. (2003). De novo tumors after kidney transplantation: the Budapest experience. *Transplant Proceedings*, 35: 1396-1398.
- 30- Hardinger, K.L., Brennan, D.C. (2013). Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. *World Journal of Transplantation*, 3(4): 68-77.
- 31- Land, W., Vincenti, F. (2005) Toxicity-sparing protocols using mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Transplantation*, 15;80(2):221-34.

- 32- Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K., Baldwin, A.S. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, 13;270(5234):283-6.
- 33- Augustine, J.J., Hricik, D.E. (2007). Minimization of immunosuppression in kidney transplantation. *Current Opinion in Nephrology Hypertension*, 16(6): 535-41.
- 34- Gaston, R.S. (2006). Current and evolving immunosuppressive regimens in kidney transplantation. *American Journal of Kidney Diseases*, 47(4): 3-21.
- 35- Zhao, Y., Song, M., Guan, D., Bi, S., Meng, J., Li, Q., Wang, W. (2005) Genetic Polymorphisms of CYP3A5 Genes and Concentration of the Cyclosporine and Tacrolimus. *Transplantation Proceedings*, 37:178-181.
- 36- Webster, A.C., Woodroffe, R.C., Taylor, R.S., Chapman, J.R., Craig, C.J. (2005). Tacrolimus versus cyclosporine as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: metaanalysis and meta-regression of randomised trial data. *British Medical Journal*, 331(7520):810-12
- 37- Giessing, M., Fuller, T.F., Tuellmann, M., Slowinski, T., Budde, K., Liefeldt, L. (2007). Steroid- and calcineurin inhibitor free immunosuppression in kidney transplantation: state of the art and future developments. *World Journal of Urology*, 25(3): 325-32.
- 38- Laplante, M., Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122: 3589-92.
- 39- Augustine, J.J., Bodziak, K.A., Hricik, D.E. (2007). Use of sirolimus in solid organ transplantation. *Drugs*, 67(3): 369-91.
- 40- Heisel, O., Heisel, R., Balshaw, R., Keown, P. (2004). New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Transplantation*, 4:583-95.
- 41- Taylor, A.L., Watson, C.J.E., Bradley, J.A. (2005). Immunosuppressive Agents in Solid Organ Transplantation: Mechanisms of Action and Therapeutic Efficacy. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 56: 23–46
- 42- Ellion, G.B., Callahan, S., Bieber, S., Hitchings, G.H., Rundles, RW. (1961). A summary of investigations with 6-(1-methy-4-nitro-r-imidazo-lyl) thio purine (BW 57-322) *Cancer Chemotherapy Reports*, 14:93.
- 43- Gebeshuber, C.A., Zatloukal, K., Martinez, J. (2009). miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *European Molecular Biology Organization Report*, 10(4):400-5.
- 44- Shenouda, S.K., Alahari, S.K. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(3-4):369-78.
- 45- Blenkiron, C., Miska, E.A. (2007). miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Human Molecular Genetics*, Spec No 1:R106-13. Review.

- 46- Zhang, W., Dahlberg, J.E., Tam, W. (2007). MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *American Journal of Pathology*, 171(3):728-38. Review.
- 47- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., Golub, T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 435(7043):834-8.
- 48- Bhaskaran, M., Mohan, M. (2014). MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary Pathology*, 51(4):759-74.
- 49- Shah, N.R., Chen, H. (2014). MicroRNAs in pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis and treatment. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(2):48-60
- 50- Gulyaeva, L.F., Kushlinskiy, N.E. (2016). Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of Translational Medicine*, 14(1):143.
- 51- Mari-Alexandre, J., Sánchez-Izquierdo, D., Gilabert-Estellés, J., Barceló-Molina, M., Braza-Boils, A., Sandoval, J. (2016). miRNAs Regulation and Its Role as Biomarkers in Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1).
- 52- Davis-Dusenbery, B.N., Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *The Journal of Biochemistry*, 148(4):381-92.
- 53- Acunzo M, Croce CM. (2015) MicroRNA in Cancer and Cachexia--A Mini-Review. *The Journal of Infectious Diseases*. 15;212
- 54- Abdelfattah, A.M., Park, C., Choi, M.Y. (2014). Update on non-canonical microRNAs. *Biomolecular Concepts*, 5(4):275-87.
- 55- Bonfrate, L., Altomare, D.F., Di Lena, M., Travaglio, E., Rotelli, M.T., De Luca, A., Portincasa, P. (2013). MicroRNA in colorectal cancer: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 22(3):311-20.
- 56- Mullany, L.E., Herrick, J.S., Wolff, R.K., Slattery, M.L. (2016). MicroRNA Seed Region Length Impact on Target Messenger RNA Expression and Survival in Colorectal Cancer. *Public Library of Science*, 28;11(4)
- 57- Baulina, N.M., Kulakova, O.G., Favorova, O.O. (2016). MicroRNAs: The Role in Autoimmune Inflammation. *Acta Naturae*, 8(1):21-33.
- 58- Xie, M., Steitz, J.A. (2014). Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses. *RNA Biology*, 11(6):673-81.
- 59- Khuu, C., Nirvani, M., Utheim, T.P., Sehic, A. (2016). MicroRNAs: Modulators of Tooth Development. *Microna*, 5(2):132-139.
- 60- Gao, Z., Dou, Y., Chen, Y., Zheng, Y. (2014). MicroRNA roles in the NF- kappaB signaling pathway during viral infections. *Biomedical Research International*, 436097.

- 61- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3): p. 228-34
- 62- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): p. 281-297.
- 63- Pillai, R.S. (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*, 11(12): p. 1753-1761.
- 64- Sun, W., Julie Li, Y.S., Huang, H.D., Shyy, J.Y., Chien, S. (2010) microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12:1-27.
- 65- Sun, B.K., Tsao, H. (2008). Small RNAs in development and disease. *Journal of The American Academy of Dermatology*, 59(5): p. 725-737.
- 66- https://www.activemotif.com/images/products/ago_mirna_risc_binding_2.jpg
- 67- Hou, J., Zhao, D. (2013). MicroRNA regulation in renal pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7):13078-92.
- 68- Güzelgül, F., Aksoy, K. (2015). Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. *Archives Medical Review Journal*, 24(4):472-493.
- 69- Lee, H.C., Yang, C.W., Chen, C.Y., Au, L.C. (2011). Single point mutation of microRNA may cause butterfly effect on alteration of global gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404, 1065-9.
- 70- Fiorucci, G., Chiantore, M.V., Mangino, G., Percario, Z.Aç, Affabris, E., Romeo, G. (2012). Cancer regulator microRNA: potential relevance in diagnosis, prognosis and treatment of cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 19:461-74
- 71- Lässer, C., O'Neil, S.E., Ekerljung, L., Ekström, K., Sjöstrand, M., Lötvall, J. (2011). RNA-containing exosomes in human nasal secretions. *American Journal of Rhinology & Allergy*, 25(2): p. 89-93.
- 72- Umbach, J.L., Cullen, B.R. (2009). The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes & Development*, 23(10): p. 1151-1164.
- 73- Pauley, K.M., Chan, E.K. (2008). MicroRNAs and Their Emerging Roles in Immunology. *Annals of the New York Academy Sciences*. 1143:226-39.
- 74- De Candia, P., De Rosa, V., Casiraghi, M., Matarese, G. (2016). Extracellular RNAs: A Secret Arm of Immune System Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14):7221-8.
- 75- Xu, X.M., Zhang, H.J. (2016). miRNAs as new molecular insights into inflammatory bowel disease: Crucial regulators in autoimmunity and inflammation. *World Journal of Gastroenterology*, 22(7):2206-18.

- 76- Bi, Y., Liu, G., Yang, R. (2009). MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *Journal of Cellular Physiology*, 218(3):467-72.
- 77- Lindsay, M.A. (2008). microRNAs and the immune response. *Trends in Immunology*, J29(7):343-51.
- 78- Davidson-Moncada, J., Papavasiliou, F.N., Tam, W. (2010). MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Annals of the New York Academy Sciences*, 1183:183-94.
- 79- Pedersen, I., David, M. (2008). MicroRNAs in the immune response. *Cytokine*. 43(3):391-4.
- 80- Sonkoly, E., Pivarcsi, A. (2009). microRNAs in inflammation. *International Reviews of Immunology*, 28(6):535-61.
- 81- Neilson, J.R., Zheng, G.X., Burge, C.B., Sharp, P.A. (2007). Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes and Development*, 21(5):578-89.
- 82- Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D.P, Lodish, H.F. (2007). miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17):7080-5.
- 83- Bezman, N.A., Chakraborty, T., Bender, T., Lanier, L.L. (2011). miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *Journal of Experimental Medicine*, 208(13):2717-31.
- 84- XU, XM., Zhang, HJ. (2016). miRNAs as new molecular insights into inflammatory bowel disease: Crucial regulators in autoimmunity and inflammation. *World Journal of Gastroenterology*, 22(7):2206.
- 85- Zununi, S., Ardalan, M. (2013). MicroRNA and Renal Allograft Monitoring. *Nephro-Urology Monthly*, 5(3):783-6.
- 86- Sun, X., He, S., Wara, AKM., Icli, B., Shvartz, E., Tesmenitsky, Y., Belkin, N., Li, D., Blackwell, TS., Sukhova, GK., Croce, K., Feinberg, MW. (2104). Systemic delivery of microRNA-**181b** inhibits nuclear factor- κ B activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation Research*, 114(1):32-40.
- 87- Wang, H., Flach, H., Onizawa, M., Wei, L., McManus, MT., Weiss, A. (2014). Negative regulation of Hif1a expression and TH17 differentiation by the hypoxia-regulated microRNA miR-210. *Nature Immunology*, 15(4):393-401.
- 88- Anglicheau, D., Sharma, V.K., Ding, R., Hummel, A., Snopkowski, C., Dadhania, D., Seshan, S.V., Suthanthiran, M. (2009). MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13):5330-5.

- 89- Scian, M.J., Maluf, D.G., David, K.G., Archer, K.J., Suh, J.L., Wolen, A.R., Mba, M.U., Massey, H.D., King, A.L., Gehr, T., Cotterell, A., Posner, M., Mas, V. (2011). MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA. *American Journal of Transplantation*, 11(10):2110-22.
- 90- Ben-Dov, I.Z., Muthukumar, T., Morozov, P., Mueller, F.B., Tuschl, T., Suthanthiran, M. (2012). MicroRNA sequence profiles of human kidney allografts with or without tubulointerstitial fibrosis. *Transplantation*, 94(11):1086-94.
- 91- Soltaninejad, E., Nicknam, M.H., Nafar, M., Sharbafi, M.H., Keshavarz Shahbaz, S., Barabadi, M., Yekaninejad, M.S., Bahrani, T., Ahmad, P., Amirzargar, A. (2015). Altered Expression of MicroRNAs Following Chronic Allograft Dysfunction with Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy. *Iranian Journal of Allergy Asthma and Immunology*, 14(6):615-23.
- 92- Zununi, V.S., Poursadegh Zonouzi, A., Mahmoodpoor, F., Samadi, N., Ardalan, M., Omid, Y. (2017). Circulating miR-150, miR-192, miR-200b, and miR-423-3p as Non-invasive Biomarkers of Chronic Allograft Dysfunction. *Archives of Medical Research*, 48(1):96-104.
- 93- Zununi, V.S., Samadi, N., Ardalan, M. (2014). Diagnosis of interstitial fibrosis and tubular atrophy in kidney allograft: implementation of microRNAs. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 8(1):4-12.
- 94- Vitalone, M.J., Sigdel, T.K., Salomonis, N., Sarwal, R.D., Hsieh, S.C., Sarwal, M.M. (2015). Transcriptional Perturbations in Graft Rejection. *Transplantation*, 99(9):1882-93.
- 95- Wilflingseder, J., Regele, H., Perco, P., Kainz, A., Soleiman, A., Mühlbacher, F., Mayer, B., Oberbauer, R. (2013). miRNA profiling discriminates types of rejection and injury in human renal allografts. *Transplantation*. 95(6):835-41.
- 96- Glowacki, F., Savary, G., Gnemmi, V., Buob, D., Van der Hauwaert, C., Lo-Guidice, J.M., Bouyé, S., Hazzan, M., Pottier, N., Perrais, M., Aubert, S., Cauffiez, C. (2013). Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *Public Library of Sciences*, 8(2):e58014.
- 97- Lorenzen, J.M., Kielstein, J.T., Hafer, C., Gupta, S.K., Kümpers, P., Faulhaber-Walter, R., Haller, H., Fliser, D., Thum, T. (2011) Circulating miR-210 predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(7):1540-6.

EKLER

Ek-1. Etik kurul onay formu



Sayı : 94603339-604.01.02/ 40988
Konu : Proje Onayı

03/12/2016

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALINA

Anabilim Dalımızda görev yapmakta olan Prof. Dr. Bilkay Baştürk tarafından yürütülecek olan KA16/199 nolu "Böbrek nakli yapılan olgularda allograft reddinde miRNA etkilerinin araştırılması" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 30/11/2016 tarih ve 16/101 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Kurul Başkanı

Not: Çalışma bildirisi ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Institutional Review Board and Ethics Committee (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır

Taşkent Caddesi (Eski 1. Caddesi) 77. Sokak (Eski 16. Sokak) No:11 06490 Bahçelievler / Ankara
Birim Telefon No: 0 312 212 90 65 Faks No: 0 312 246 66 05
E-Posta: rektorlik@baskent.edu.tr İnternet Adresi: www.baskent.edu.tr

Bilgi İçin: Liliifer TAŞBİLEK
Unvan: Sekreter
Telefon No: 2129065-2228



Ek-2. Çocuk gönüllü onam formu

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**ÇOCUKLARDA YAPILACAK BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR İÇİN
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU****SEVGİLİ KARDEŞİM**

*Yapmayı planladığımız bilimsel bir araştırmaya katılman konusunda izin almak için sizi buraya davet ettik. Bu konuda bir karar vermeden önce, yapılacak araştırmayı ayrıntılı olarak tanıtan bu belge sizin için hazırlanmıştır. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Araştırmaya katılım **gönüllülük** esasına dayalıdır. Bu belgeyi okuyup anlamanızda bir sorun ile karşılaşsanız, gerekli gördüğünüz her zaman bizden, anne-babanızdan veya yasal bir temsilcinizden yardım alabilirsiniz. Karar aşamasına gelmeden önce bu konu ile ilgili her türlü yardım ve süreyi bizden isteyebilirsiniz.*

1. ARAŞTIRMANIN ADI

Böbrek Nakli Yapılan Olgularda Allograft Reddinde miRNA Etkilerinin Araştırılması

2. KATILIMCI SAYISI

Bu araştırmada yer alması öngörülen toplam böbrek nakli olmuş gönüllü sayısı 100 kişidir.

3. ARAŞTIRMAYA KATILIM SÜRESİ

Bu araştırmaya hastanın katılım süresi; nakil yapıldıktan sonra 7. günde, nakil sonrası 1. ay kontrolünde ve eğer hekiminiz gerek görürse nakil sonrası vücudun böbreği kabul etmediği düşünülen durumda toplam 3 kez olacak şekilde çocuğunuzdan tetkikleri için zaten alınacak kan örneğinden ayrılan 1 ml serum/plazma örneği ile tamamlanacaktır

BU ARAŞTIRMAYI NEDEN ÇOCUKLAR ÜSTÜNDE YAPIYORUZ?

Bu araştırma konusu, yetişkin kişiler üzerinde yapılmış araştırmalar sonucu elde edilmiş verilerin çocuklarda da geçerliliğinin kanıtlanmasını gerektirmektedir

Bu araştırma gönüllü çocuk sağlığı açısından öngörülebilir ciddi bir risk taşımamaktadır ve çocuklara doğrudan bir fayda sağlayacağı umulmaktadır

4. ARAŞTIRMANIN AMACI

Bu çalışmanın amacı, doğal ve edinsel immune sistemde etkileri olan miRNA'ların organ reddine etkisinin araştırılmasıdır.

5. ARAŞTIRMAYA KATILMA KOŞULLARI

Bu araştırmaya dahil edilebilmek için çocuğunuzun sahip olması gereken koşullar şu şekildedir;

1. Nakil sonrası takiplerinin merkezimizde yapılması
2. Nakil sonrası herhangi bir kanser hastalığının belirlenmemiş olması,

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

1

Ek-2. (devam) Çocuk gönüllü onam formu

3. Zihinsel bozukluğunun olmaması.

6. ARAŞTIRMANIN YÖNTEMİ

Bu araştırmada çocuğunuzdan rutin testleri için alınacak olan kan örneğinden alınan 1 ml serum/plazma örneği ile belirlenen miRNA parametreleri çalışılacaktır.

7. ARAŞTIRMA SÜRECİNDE UYAMAM GEREKEN ŞARTLAR, ARAŞTIRMA DIŞINDA BIRAKILACAĞI DURUMLAR

1. Kan alma sırasında hastada herhangi bir şekilde rahatsızlık hissetmeniz durumunda ilgili doktora danışmalısınız,
2. Kan alındıktan sonra uyulması gereken bir program bulunmamaktadır.
3. Nakil sırasında ve sonrasında doktorunuzun uygulamakta olduğu tedaviyi doktorunuzun haberi olmadan bırakmamanız, değiştirmemeniz ve aksatmamanız çalışmanın doğru sonuç vermesi açısından önemlidir.

8. ARAŞTIRMADAN BEKLENEN OLASI YARARLAR

Bu araştırma, neden bazı nakillerde organ reddi olurken bazılarında olmadığı konusuna ışık tutacaktır. Araştırmamız yalnızca bilimsel amaçlı olup sizin doğrudan yarar görmeyiz ya da tedavinizin seyrini değiştirmesi beklenmemektedir. Ancak, bu araştırmadan elde edilen sonuçlar sizin gibi tanı almış diğer hastaların tedavisinin ileriye yönelik planlanmasına katkı sağlayacaktır.

9. ARAŞTIRMADAN KAYNAKLANABİLECEK OLASI RİSKLER

Araştırma amacıyla ayrıca kan alınmayacağı için, olası riskler, rutin kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bulunan; acı- ağrı duyma, nadiren bayılma, morarma, nadiren iğnenin giriş yerinde enfeksiyon, pıhtılaşma veya kanamanın uzaması gibi çok nadiren de olsa görülebilen risklerden oluşmaktadır Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler ilgili birim tarafından alınacaktır

10. ARAŞTIRMADAN KAYNAKLANABİLECEK HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK / SORUMLULUK DURUMU

Başkent Üniversitesine aittir.

11. ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLARDA ARANACAK KİŞİ

Uygulama süresince, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da araştırma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki veya diğer rahatsızlıklarınız için herhangi bir saatte adresi ve telefonu aşağıda belirtilen ilgili hekime ulaşabilirsiniz.

İstediginizde Günü 24 Saati Ulaşılabilecek Hekimin Adres ve Telefonları:

Prof.Dr. Aytül Noyan

Adres: Başkent Hastanesi Çocuk Nefroloji BD Seyhan Adana

İş: 0 322 3272727 (2025) Cep: (0542 3273998)

12. GİDERLERİN KARŞILANMASI VE ÖDEMELER

Bu araştırmaya çocuğunuzun/ vasisi olduğunuz çocuğun katılması için veya araştırmadan kaynaklanabilecek giderler için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Hastalığınızın gerektirdiği tetkiklere ilave olarak yapılacak her türlü tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

2

Ek-2. (devam) Çocuk gönüllü onam formu

giderleri size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kuruma ödetilmeyecektir.

13. ARAŞTIRMAYI DESTEKLEYEN KURUM

Araştırmayı destekleyen kurum Başkent Üniversitesi'dir

14. KATILIMCIYA HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILIP YAPILMAYACAĞI

Bu araştırmaya katılmanızla, araştırma ile ilgili çıkabilecek zorunlu masraflar tarafımızdan karşılanacaktır. Bunun dışında size veya yasal temsilcilerinize herhangi bir maddi katkı sağlanmayacaktır.

15. BİLGİLERİN GİZLİLİĞİ

Araştırma süresince elde edilen çocuğunuz/ vasisi olduğunuz çocuk ilgili tıbbi bilgiler özel bir kod numarası ile kaydedilecektir. Çocuğunuz/ vasisi olduğunuz çocuğa ait her türlü tıbbi bilgi gizli tutulacaktır. Araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçla kullanılacaktır. Araştırma yayınlanırsa bile kimlik bilgileri verilmeyecektir. Ancak, gerektiğinde araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar tıbbi bilgilere ulaşabilecektir. Siz de istediğinizde çocuğunuz/ vasisi olduğunuz çocuğa ait tıbbi bilgilere ulaşabileceksiniz

16. ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILMA KOŞULLARI

Uygulanan tedavinin hekimin bilgisi olmadan kesilmesi, aksatılması veya değiştirilmesi, yeni ve uzun süreli tedavi gerektiren bir hastalığın tespit edilmesi durumunda hekiminiz sizin izniniz olmadan çocuğunuzun araştırmadan çıkarabilir. Bu durum çocuğunuz/ vasisi olduğunuz çocuğa uygulanan tedavide herhangi bir değişikliğe neden olmayacaktır.

Ancak araştırma dışı bırakılmanız durumunda da, çocuğunuz/ vasisi olduğunuz çocuk ilgili tıbbi veriler bilimsel amaçla kullanılabilir.

17. ARAŞTIRMADA UYGULANACAK TEDAVİ DIŞINDAKİ DİĞER TEDAVİLER

Yoktur.

18. ARAŞTIRMAYA KATILMAYI REDDETME VEYA AYRILMA DURUMU

Bu araştırma için karar vermeden önce anne ve babanızla konuşup onlara danışabilirsiniz. Karar vermek için kısıtlı bir süre yok, karar vermek için bir düşünme sürecine ihtiyaç duyduğunda, bu süreyi bekleyebiliriz. Biz, anne baban veya yasal temsilcine bu araştırmayı açıklayacağız ve onların izinlerini isteyeceğiz. Anne, baban veya yasal temsilcin bu araştırmaya katılmanızı kabul etseler bile, son kararı sen vereceksin. Bu araştırmaya katılmak konusu bütünüyle senin isteğinize bağlıdır.

Araştırma sürerken de araştırmadan istediğiniz zaman ayrılabilirsiniz. Bu konuda herhangi bir neden göstermeniz gerekmez.

Araştırmaya katılmayı istememeniz ve araştırmadan ayrılmanız durumunda hastalığınız ile ilgili her türlü tedavi ve girişim eksiksiz yapılmaya devam edecek, size yaklaşımımızda hiçbir değişiklik olmayacaktır.

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

3

Ek-2. (devam) Çocuk gönüllü onam formu

Ancak araştırmadan ayrılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler bilimsel amaçla kullanılabilir.

19. YENİ BİLGİLERİN PAYLAŞILMASI VE ARAŞTIRMANIN DURDURULMASI

Araştırma sürerken, araştırmayla ilgili olumlu veya olumsuz yeni tıbbi bilgi ve sonuçlar en kısa sürede size veya yasal temsilcinize iletilecektir. Bu sonuçlar sizin araştırmaya devam etme isteğinizi etkileyebilir. Bu durumda karar verene kadar araştırmanın durdurulmasını isteyebilirsiniz.

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

Sayın Dr. tarafından Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Adana Uygulama Araştırma Merkezi İmmünoloji-Doku Tipleme Laboratuvarında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

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

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

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

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

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

ARAŞTIRMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıda belirtilen araştırmaya başlanmadan önce; bana, anne-babama veya yasal temsilcime verilmesi gereken bilgileri içeren 7 sayfalık yazılı belgeyi okudum. Konu ile ilgili açıklamaları dinledim. Aklıma gelen her tür soruyu sordum ve yanıtlarını aldım. Yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları anladım. Bu süreçten anne-babam veya yasal temsilcimin bilgisi vardır ve en az birisi bana eşlik etmiştir. Karar vermem için bana yeterli zaman tanınmıştır.

Belirtilen araştırmaya katılma kararımı hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın verdim. Bu araştırmaya katılmayı gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu belgenin imzalanması ile mevcut yasaların bana sağladığı hakların saklı kalacağını biliyorum. Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

4

Ek-2. (devam) Çocuk gönüllü onam formu

ADRES		
TELEFON		
TARİH		

ANNE BABA VEYA VASİ (Varsa)		İMZASI
İSİM SOYİSİM		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

ARAŞTIRMACI		İMZASI
İSİM SOYİSİM ve GÖREVİ		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

ÇOCUK İLE BİRLİKTE ONAM ALMA İŞİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİ		İMZASI
İSİM SOYİSİM ve GÖREVİ		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

İMZALAR: Gönüllü**(varsa) Vasi****Araştırmacı****Tanık****5**

Ek-3. Hasta gönüllü onam formu

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK
KURULU
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ
GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

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

1. ARAŞTIRMANIN ADI

Böbrek Nakli Yapılan Olgularda Allograft Reddinde miRNA Etkilerinin Araştırılması

2. GÖNÜLLÜ SAYISI

Bu araştırmada yer alması öngörülen toplam böbrek nakli olmuş gönüllü sayısı 100 kişidir.

3. ARAŞTIRMAYA KATILIM SÜRESİ

Bu araştırmaya hastanın katılım süresi; nakil yapıldıktan sonra 7. günde, nakil sonrası 1. ay kontrolünde ve eğer hekiminiz gerek görürse nakil sonrası vücudun böbreği kabul etmediği düşünülen durumda toplam 3 kez olacak şekilde çocuğunuzdan tetkikleri için zaten alınacak kan örneğinden ayrılan 1 ml serum/plazma örneği ile tamamlanacaktır

4. ARAŞTIRMANIN AMACI

Bu çalışmanın amacı, doğal ve edinsel immune sistemde etkileri olan miRNA'ların organ reddine etkisinin araştırılmasıdır.

5. ARAŞTIRMAYA KATILMA KOŞULLARI

Bu araştırmaya dâhil edilebilmeniz için gereken koşullar şunlardır:

1. Nakil sonrası takiplerinizin merkezimizde yapılması
2. Nakil sonrası herhangi bir kanser hastalığınızın belirlenmemiş olması,

İMZALAR: Gönüllü**(varsa) Vasi****Araştırmacı****Tanık****1**

Ek-3. (devam) Hasta gönüllü onam formu

3. Zihinsel bozukluğunuzun olmaması.

6. ARAŞTIRMANIN YÖNTEMİ

Bu araştırmada çocuğunuzdan rutin testleri için alınacak olan kan örneğinden alınan 1 ml serum/plazma örneği ile belirlenen miRNA parametreleri çalışılacaktır.

7. GÖNÜLLÜNÜN SORUMLULUKLARI

1. Kan alma sırasında herhangi bir şekilde fenalık hissedilmesi durumunda ilgili doktora danışmalısınız,
2. Kan alındıktan sonra uyulması gereken bir program bulunmamaktadır.
3. Nakil sırasında ve sonrasında doktorunuzun uygulamakta olduğu tedaviyi doktorunuzun haberi olmadan bırakmamanız, değiştirmemeniz ve aksatmamanız çalışmanın doğru sonuç vermesi açısından önemlidir.

8. ARAŞTIRMADAN BEKLENEN OLASI YARARLAR

Bu araştırma, neden bazı nakillerde organ reddi olurken bazılarında olmadığı konusuna ışık tutacaktır. Araştırmamız yalnızca bilimsel amaçlı olup sizin doğrudan yarar görmeniz ya da tedavinizin seyrini değiştirmesi beklenmemektedir. Ancak, bu araştırmadan elde edilen sonuçlar sizin gibi tanı almış diğer hastaların tedavisinin ileriye yönelik planlanmasına katkı sağlayacaktır.

9. ARAŞTIRMADAN KAYNAKLANABİLECEK OLASI RİSKLER

Araştırma amacıyla ayrıca kan alınmayacağı için, olası riskler, rutin kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bulunan; acı-ağrı duyma, nadiren bayılma, morarma, nadiren iğnenin giriş yerinde enfeksiyon, pıhtılaşma veya kanamanın uzaması gibi çok nadiren de olsa görülebilen risklerden oluşmaktadır. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler ilgili birim tarafından alınacaktır.

10. ARAŞTIRMADAN KAYNAKLANABİLECEK HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK / SORUMLULUK DURUMU

Başkent Üniversitesi

11. ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLARDA ARANACAK KİŞİ

Uygulama süresince, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da araştırma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki veya diğer rahatsızlıklarınız için herhangi bir saatte adresi ve telefonu aşağıda belirtilen ilgili hekime ulaşabilirsiniz.

İstediginizde Günü 24 Saati Ulaşılabilecek Hekimin Adres ve Telefonları:

Doç.Dr. Dilek Torun

Adres: Başkent Hastanesi Erişin Nefroloji BD Kışla Yerleşkesi Adana

İs: 0 322 3272727 (2025)

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

2

Ek-3. (devam) Hasta gönüllü onam formu

Araştırma sürerken, araştırmayla ilgili olumlu veya olumsuz yeni tıbbi bilgi ve sonuçlar en kısa sürede size veya yasal temsilcinize iletilecektir. Bu sonuçlar sizin araştırmaya devam etme isteğinizi etkileyebilir. Bu durumda karar verene kadar araştırmanın durdurulmasını isteyebilirsiniz.

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

Sayın Dr _____ tarafından Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Adana Uygulama Araştırma Merkezi İmmünoloji-Doku Tipleme Laboratuvarında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

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

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

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

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

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

ARAŞTIRMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 6 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Araştırmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜ		İMZASI
<i>İSİM SOYİSİM</i>		
<i>ADRES</i>		
<i>TELEFON</i>		

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

4

Ek-3. (devam) Hasta gönüllü onam formu

TARİH		
--------------	--	--

VASİ (Varsa)		İMZASI
İSİM SOYİSİM		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

ARAŞTIRMACI		İMZASI
İSİM SOYİSİM ve GÖREVİ		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

ONAM ALMA İŞİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİ		İMZASI
İSİM SOYİSİM ve GÖREVİ		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

İMZALAR: Gönüllü

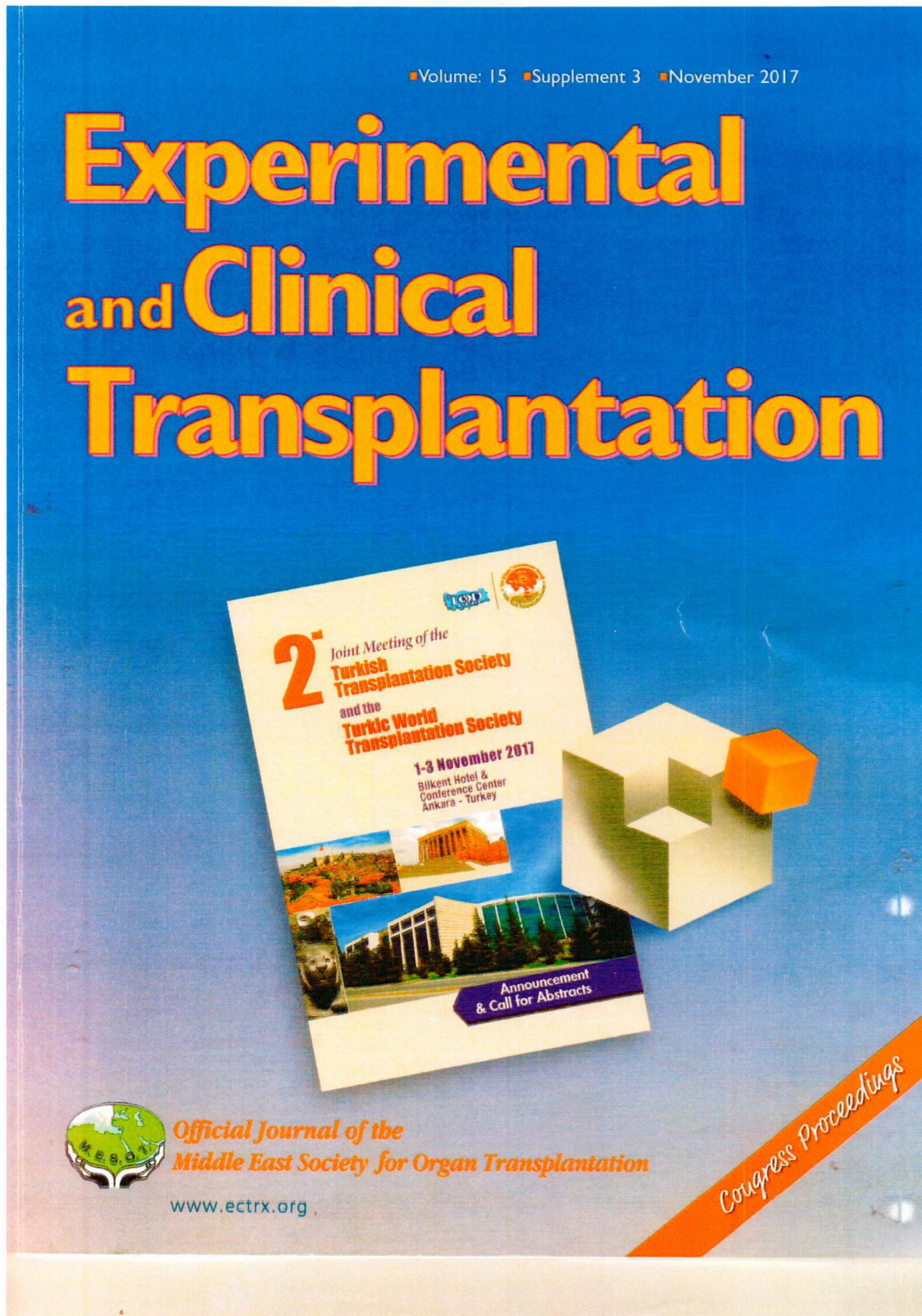
(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

5

Ek-4. Uluslararası Kongrede Tez Sözel Sunumu



Ek-4. (devam) Uluslararası Kongrede Tez Sözel Sunumu

01

KAPOSI SARCOMA IN THE ERA OF RAPAMYCIN: STILL CAN BE A THERAPEUTIC CHALLENGE IN ORGAN TRANSPLANT RECIPIENTS**Ayşe Tunçer Vural, Arzu Karataş Toğral, A. Tülin Güleç***Department of Dermatology and Venereology, Başkent University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey*

Introduction: Kaposi sarcoma (KS) is a multicentric neoplasm of lymphatic endothelium-derived cells infected with human herpes virus 8. Transplant recipients are at higher risk for KS, which affects 0.2-11% of them. Reduction of immunosuppressive drugs and a switch from calcineurin inhibitors to mTOR inhibitor rapamycin suggest an effective first-line treatment modality in most of the cases.

Case Report: A 64-year-old female patient was referred to our clinic for the presence of two painless lesions on her arm and foot that had been present for a month. She had undergone renal transplantation 3 months ago (April 2013), and was on maintenance immunosuppression with prednisolone (20 mg/day), tacrolimus (2 mg/day), and mycophenolate mofetil (720 mg/day). Dermatological examination disclosed violaceous indurated plaques of 2 cm in diameter located on the left forearm and left ankle, while her physical examination was unremarkable. The diagnosis of KS was based on histologic examination and HHV-8 immunohistochemistry. Endoscopic examination of the gastrointestinal system revealed involvement of sigmoid colon and gastric mucosa, while lymph node ultrasonography, chest X-ray, chest and abdomen computed tomography showed no abnormal findings. The disease extent corresponded to stage 3. Although reduction of immunosuppressive drugs and switch from tacrolimus to rapamycin were performed immediately, new cutaneous lesions arised in clusters on lower legs accompanied by edema within the following 4 months. Therefore, propranolol (1 mg/day) was added to her treatment. Yet, lesion counts increased, satellite like papules and exophytic nodules arose and enlarged within time causing difficulty in walking. However, since asymptomatic lesions of gastrointestinal tract were found to be stable on endoscopy at 9-month follow-up, systemic chemotherapy was not planned. Finally, regression of the lesions has been started after the 11th month, and now at 4-year follow-up 90% of the cutaneous lesions got cleared leaving postinflammatory hyperpigmentation.

Conclusions: Post-transplant KS can still be a therapeutic challenge in some of the patients, as tapering down

immunosuppressive drugs to the lowest possible level in conjunction with a switch to rapamycin does not always lead to stable asymptomatic disease or it can take a long time. Cryotherapy, laser, surgery, intralesional chemotherapy, and imiquimod are not good options when the lesions are numerous and widespread as in our patient. Furthermore, radiotherapy is not recommended in this patient population as it increases the risk of cutaneous neoplasms.

02

INVESTIGATION OF MIRNA EFFECTS ON ALLOGRAFT SURVIVAL IN PATIENTS WITH KIDNEY TRANSPLANT**Oktay Sözer¹, Bircan Kantaroğlu², Bilkay Baştürk², Vedat Bulut¹, Cemalettin Aybay¹**

¹Department of Immunology, Gazi University, Ankara; and
²Transplantation and Tissue Typing Laboratory, Başkent University Faculty of Medicine, Dr. Turgut Noyan Teaching and Medical Research Center, Adana, Turkey

Introduction: A major obstacle in the management of kidney transplant recipients is the lack of specific biomarkers for continuous monitoring of graft function post-kidney transplantation (KT). The current gold standard is the histological evaluation of biopsies. Additional markers such as serum creatinine (Cr), estimated glomerular filtration rate (eGFR) and/or proteinuria are routinely used to monitor graft function. Unfortunately, these currently available methods are either ineffective, inaccurate, or invasive and suffer from limitations in predicting outcomes. Micro RNAs (miRNA) are non-coding RNAs that are approximately 19 - 25 base long. miRNAs are responsible for DNA and protein biosynthesis and function as well as cell regulation and pathogenesis via posttranscriptional regulations of the genes. miRNAs can be used as a diagnostic, prognostic and therapeutic tool in different medical circumstances such as kidney transplantation, ischemia-reperfusion injuries, humoral rejection and viral infections. In the long view, follow-up of kidney transplantation patients will be possible by genome-wide miRNA profiling from different biological samples. Hereby miRNA studies have a greater importance in organ transplantation. Previous studies have shown that miR142 is a potential biomarker in kidney rejection of transplantation patients.

Materials and Methods: In this study, we evaluated the kidney rejection related 9 miRNAs (hsa-miR-16-3p / hsa-

Ek-4. (devam) Uluslararası Kongrede Tez Sözel Sunumu

miR-32-5p / hsa-miR-142-5p / hsa-miR-146a-5p / hsa-miR-150-5p / hsa-miR-181a-2-3p / hsa-miR-181b-5p / hsa-miR-192-5p / hsa-miR-210-3p and control miRNA small nucleolar RNA , CD box61) in 100 patients[%50 of 100 patients (n=50) had rejection and %50 (n=50) had no rejection] who had kidney transplantation. We performed the assay on serum/plasma samples with using Real-Time PCR methods for detection and quantification. This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project no: KA16/199) and supported by Baskent University Research Fund.

Results: We observed significant differences in miR142-5p and miR192-5p (in rejection group) expressions in the patient groups.

Conclusions: Anglicheau et al. determined the over-expressions of three miRNAs (miR-142-5p, -155 and -223) in the cases with T-cell acute rejection. Ben-Dov IZ, et al. detected the upregulation of four miRNAs (miR-21, miR-142-5p, miR-142-3p and miR-506) and the downregulation of two miRNAs (miR-30 b and miR-30c) in the assay performed from allograft biopsies and urine samples. It has shown that specific genes have roles in kidney rejections. It is hypothetically thought that RUNX3 gene is targeted by miR145-5p. Increasing the miR145-5p expression has a possible effect on RUNX3 regulation. Therefore it is considered that miR145-5p expression serves a function in kidney rejection. Furthermore, miR192 targeting CD44, PRKCB1, PSMB9 and SERPING1 genes are also under consideration. Thus, the decreasing of miR192-5p gene expression is related to kidney rejection via affecting the associated genes and pathways.

03

PSYCHOSOCIAL EXPERIENCES OF KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS BEFORE AND AFTER TRANSPLANTATION

Emine Selda Gündüz

Vocational School of Health Services, Akdeniz University, Antalya, Turkey

Introduction: Physical, emotional and economic aspects of transplantation are an important life experience for the patient and family. Good organizational success in transplantation, surgery preparation and post-operative care is extremely important as well as biopsychosocial care and rehabilitation. Care interventions should be based on the individuality of the patient and should be undertaken in line with requirements.

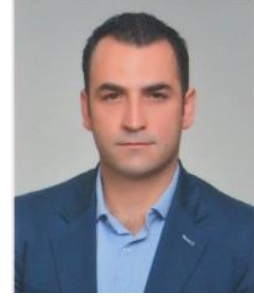
Materials and Methods: In this research, in order to identify the psychosocial problems of the patients and to collect comprehensive information on their experiences in the transport process, phenomenological type of design among qualitative research types was used. The research population was consisted of 15 patients from the province of Antalya, Akdeniz University Hospital, Organ Transplant Center which were planned to have organ transplantation. The Sample was determined with the techniques like "purposive sampling" and "quota sampling", which were used in the qualitative research. Data were collected by semi-structured form, in -depth individual interview. A week in the hospital before and after surgery, including two interviews were done after 6 months. Content analysis data were analyzed with SPSS17 and N- Vivo7 program.

Results: The average age of participants was 38, 53.3 % were male, 33.3 % were primary school graduates, 13.3 % were unable to work, 73.3 % were married, renal failure period of the patients was 7.3 years, 60% were hemodialysis patients, average transplant waiting period was 4.5 years, 66.7% of them had a live donor transplants, the donor of 20% were their mothers and the donor of 20.0% were their wives or husbands. Pre-transplant themes; Experiences and Perceptions of Coping (illness perception, anxiety, interpersonal relationships, individual coping), the Emotions Regarding to transplantation (the meaning of organ transplantation for individuals), Posttransplant themes; Early Experiences (being happy or living strain); Long-Term Experience (mood changes, changes in self-perception, the meaning of organ transplantation for the individual, interpersonal relationships, productivity, individual coping studies, perception of the body, feelings towards organ donor) as thus categorized reached a large number of sub-themes.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Sözer Oktay
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 27.01.1977 / Hatay
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (530) 952 54 55
 e-mail : oktay_sozer@yahoo.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / İmmünoloji AD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Çukurova Üniversitesi / Biyokimya AD	2004
Lisans	Çukurova Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012 – Devam ediyor	ATQ Biyoteknoloji	Market Geliştirme Müdürü
2003 – 2012	Başkent Üni. Adana Hematoloji lab	Sorumlu Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Arapça

Yayınlar

1. Baştürk B, Karakayali F, Emiroğlu R, **Sözer O**, Haberal A, Bal D, Haberal M..Human leukocyte antigen-G (HLA-G) a new parameter in the follow-up of liver transplantation. Transplant Proc. 2006 Mar;38(2):571-4.
2. Ozdogu H, Boga C, **Sozer O**, Sezgin N, Kizilkilic E, Maytalman E, Yalcintas D. The apoptosis of blood polymorphonuclear leukocytes in sickle cell disease. Cytometry B Clin Cytom. 2007 Jul;72(4):276-280.

3. Ozdogu H, **Sozer O**, Boga C, Kozanoglu I, Maytalman E, Guzey M. Flow Cytometric Evaluation of Circulating Endothelial Cells: A New Protocol for Identifying Endothelial Cells at Several Stages of Differentiation. Am J Hematol. 2007 Aug;82(8):706-11
4. Boga C, Ozdogu H, Kozanoglu I, **Sozer O**, Sezgin N, Kizilkilic E, Bakar C. Platelet P-selectin Expression in Patients with Sickle Cell Disease who Undergo Apheresis. Ther Apher Dial. 2007 Aug;11(4):255-61.
5. Kozanoglu I, Boga C, Ozdogu H, Maytalman E, Ovali E, **Sozer O**. A detachment technique based on the thermophysiologic responses of cultured mesenchymal cells exposed to cold. Cytotherapy. 2008;10(7):686-9.
6. Kozanoglu I, Boga C, Ozdogu H, **Sozer O**, Maytalman E, Yazıcı AC, Sahin FI. HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL CELLS EXPRESS NG2: may increase in discriminative ability of flow cytometry during MSC identification. Cytotherapy 2009;11(5):527-533
7. Boga C, Kozanoglu I, Ozdogu H, **Sozer O**, Sezgin N. Alterations of circulating endothelial cells after apheresis in patients with sickle cell disease: a potential clue for restoration of patho physiology. Transfusion and Apheresis 2010 Dec;43(3):273-9.
8. Güven A, Ecevit A, **Sozer O**, Tarcan A, Tarcan A, Ozbek N. Correlation between the cord vitamin D levels and regulatory T cells in newborn infants. Eur J Pediatr. 2012 Mar 1

Kitap Yazarlığı

Klinik ve Pratikte Akım Sitometri / Kitap yazarı

Hobiler

Basketbol oynamak, seyahat etmek, film izlemek.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

