

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**KRONİK BÖBREK YETERSİZLİĞİ HASTALARINDA
İDRAR BULUNDURMAYAN MESANE DOKUSUNDA
IL-8, CXCR1 VE CXCR2'NİN GEN İFADELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Kaan GÜNDOĞDU**

**Danışman
Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Eş Danışmanı
Doç. Dr. Pınar ATA**

İstanbul – 2013

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**KRONİK BÖBREK YETERSİZLİĞİ HASTALARINDA
İDRAR BULUNDURMAYAN MESANE DOKUSUNDA
IL-8, CXCR1 VE CXCR2’NİN GEN İFADELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Kaan GÜNDOĞDU**

**Danışman
Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Eş Danışmanı
Doç. Dr. Pınar ATA**

İstanbul – 2013

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2012 – 2013 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve Haydarpaşa Numune Eğitim Araştırma Hastanesi'nin bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın tamamlanması süresince büyük bir gayret ve özveriyle çalışmamı takip eden, gösterdiği sabır ve hoşgörüsü bana destek olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. M. Burcu Irmak Yazıcıoğlu'na ve eş danışmanım Sayın Doç.Dr. Pınar ATA'ya çok teşekkür ederim. Bu çalışmaya hasta bilgi ve örneklerini temin eden Uzm. Dr. Ali Murat Gökçe ve Doç. Dr. İzzet Titiz'e ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan arkadaşım Hilal Fındık ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan dostum Julen Gomez Gutierrez'e teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca bana destek olan ve verdiğim her kararın arkasında durarak beni bu günlere getiren sevgili anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

İstanbul, 2013

Kaan GÜNDOĞDU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
KISALTMALAR	IV
ŞEKİLLER	VII
TABLolar	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Mesanenin Histolojisi.....	1
1.2. Kronik Böbrek Yetmezliği ve Renal Transplantasyon	2
1.3. Kemokinler.....	2
1.3.1. Kemokin Reseptörleri	3
1.3.2. İnterlökin -8.....	5
1.3.3. Kemokin Reseptörleri ve IL-8 Etki Mekanizması	5
1.3.3.1.IL-8'in Biyolojik ve Klinik Özellikleri.....	7
1.3.3.1.a) Anjiogenezdeki Rolü	7
1.3.3.1.b) İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri	7
1.3.3.1.c) Akut Faz Reaksiyonu ve İnflamatuvar Yanıt Üzerindeki Etkileri.....	7
1.3.3.1.d) Allerjik Hastalıklar ve Solunum Sistem Üzerindeki Etkileri.....	8
1.4.Kantitatif Eş Zamalı PZR(Quantitative Gerçek zamanlı PZR, qRT-PZR)	8
1.4.1 Referans Genlerin Kantitatif RT-PZR Çalışmalarındaki Önemi	9
2. AMAÇ	10
3. GEREÇLER	11
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler	11
3.2.Araştırma İçin Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar ve Markaları	11
3.3. RNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar	12
3.4. cDNA Sentezi İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar.....	12
3.5. Polimeriz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar.....	12
3.6. Kantitatif Eş Zamanlı PZR İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar.....	12
3.7. Elektroforez İçin Kullanılan Tampon ve Kimyasallar	12

4. YÖNTEMLER	13
4.1. Doku Eldesi.....	13
4.2. Dokudan RNA İzolasyonu	13
4.3. RNA'nin Spektrofotometrik Analizi.....	14
4.4. RNA Konsantrasyonlarının Ayarlanması	15
4.5. cDNA Sentezi.....	15
4.6. Polimeriz Zincir Reaksiyonu.....	16
4.6.1. Primer Çiftlerinin Tasarlanması	16
4.6.2. Primerlerin Sulandırılması	17
4.6.3. Primer Optimizasyonu	17
4.6.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi	18
4.6.4.1. Agaroz Jel Elektroforez.....	18
4.6.4.1.a)Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	18
4.6.4.1.b)Agaroz Jelin Hazırlanması.....	19
4.6.4.1.c) Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Görüntülenmesi	19
4.6.5 Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR	19
4.7. İstatistiksel Analiz.....	20
5. SONUÇLAR	21
5.1.RNA İzolasyonu Sonuçlar	21
5.2.cDNA Sentez İçin Gerekli RNA Miktarları	22
5.3.qRT- PZR Analiz Sonuçları	24
5.3.1 Amplifikasyon Eğrileri ve Ortalama Cp Değerleri	25
5.3.2. Gen İfade Değişiklik Oranlarının Hesaplanması ve Sonuçları	27
5.3.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	31
6. TARTIŞMA	33
7. KAYNAKLAR	35
8. ÖZGEÇMİŞ	38

KISALTMALAR

Akt	: Protein kinaz B
AMB	: Asimetrik membran birimi
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
Ct	: Eşik Döngü
CXCR1	: Kemokin reseptör 1
CXCR2	: Kemokin reseptör 2
DARC	: Kemokin Duffy Antijen reseptörü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ENA	: Geniş panel
HIV	: İnsan İmmün yetmezlik virusü
IgE	: İmmün Globulin E
IL-8	: İnterlökin-8
IP	: İndüklenebilir Gamma interferon proteini
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
Kd	: Kilodalton
LARC	: Aktivasyon düzenleyici karaciğer kemokini
MCP	: Monosit kemoatraktan protein
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
MIG	: Monokin bağlı interferon gama
MIP	: Makrofaj inflamatuvar proteini
mM	: Mikromolar
mRNA	: Mesajcı RNA
NAP	: Nötrofil alkalen fosfataz
PF	: Trombosit faktör
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RRT	: Renal replasman tedavileri
SDBY	: Son dönem böbrek yetmezliği
SDF	: Stromal hücre üretici faktör
siRNA	: Küçük inhibe edici RNA'lar
Th1	: T lenfosit tip 1
Th2	: T lenfosit tip 2
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
UP	: Üroplakin
USRDS	: Birleşik Devletler Renal Veritabanı Sistemi
µl	: Mikro litre

TABLULAR

Sayfa No.

Tablo 1.1. Kemokin Reseptör-Ligant İlişkisi	4
Tablo 3.1. Laboratuvarında kullanılan cihazlar ve markaları.....	11
Tablo 4.1. cDNA Sentezi İçin Gerekli Bileşen Miktarları	15
Tablo 4.2. RT Karışım Bileşenleri	16
Tablo 4.3. qRT-PZR'da Kullanılan Primerler	17
Tablo 4.4. qRT-PZR'da Kullanılan Primerleri Sulandırmak için Gerekli Hesaplamalar.....	17
Tablo 4.5. PZR protokolü.....	18
Tablo 4.6. PZR Optimizasyonu Termal Döngü Koşulları.....	18
Tablo 4.7. qRT-PZR Reaksiyon Koşulları	19
Tablo 4.8. qRT-PZR termal döngü koşulları.....	20
Tablo 4.9. PZR'da Kullanılan Primerlerin Optimum Bağlanma Sıcaklıkları	20
Tablo 5.1. Nakil Sırasında Alınan Hasta Doku Örneklerine ait RNA İzolasyonu Nanodrop Sonuçları	21
Tablo 5.2. Nakilden Sonra Kontrol Biyopsi Alınan Hasta Doku Örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları.....	22
Tablo 5.3. Kontrol Amaçlı Gelmiş Mesanesinde Sorun Bulunmamış Sağlıklı Birey Doku Örneklerine Ait RNA İzolasyonu Nanodrop Sonuçları	22
Tablo 5.4. 10 ng/µl RNA için Stoktan Alınması Gereken RNA Miktarları(Nakil hastalarında)	23
Tablo 5.5. 10 ng/µl RNA İçin Stoktan Alınması Gereken RNA Miktarları(Kontrol hastalarında)	24
Tablo 5.6. 10 ng/µl RNA İçin Stoktan Alınması Gereken RNA Miktarları(Sağlıklı bireylerde)	24
Tablo 5.7. Kontrol Hastalarının Cp Değerleri	26

Tablo 5.8. Sağlıklı Bireylerin Cp Değerleri	26
Tablo 5.9. Hasta Bireylerin Cp Değerleri.....	27
Tablo 5.10. Nakilden Sonra Kontrol Biyopsi Alınan Hasta Doku Örneklerinin Gen İfade Değişikliği Oranları ve Bu Oranların Log2 Tabanındaki Karşılıkları	28
Tablo 5.11. Nakil Sırasında Alınan Hasta Doku Örneklerinin Gen İfade Değişikliği Oranları ve Bu Oranların Log2 Tabanındaki Karşılıkları	28
Tablo 5.12. Kontrol Amaçlı Gelmiş Mesanesinde Sorun Bulunmamış Sağlıklı Birey Doku Örneklerinin Gen İfade Değişikliği Oranları ve Bu Oranların Log2 Tabanındaki Karşılıkları.....	29
Tablo 5.13. Tanımlayıcı İstatistiksel Analiz Sonuçlarına Göre En Düşük ve En Yüksek Cp Değerleri.....	31
Tablo 5.14. Nakil Öncesi ve Sağlıklı Bireylerde p Değerleri.....	32
Tablo 5.15. Nakil Sonrası ve Sağlıklı Bireylerde p Değerleri.....	32

ŞEKİLLER

	Sayfa No.
Şekil 1.1. Kemokinlerin Biyolojik Rollerini.....	3
Şekil 1.2. Lökositlerin Göçü	7
Şekil 4.1. Dokudan RNA İzolasyonu Basamakları.....	14
Şekil 5.1. IL-8 Amplifikasyon Eğrisi Grafiği	29
Şekil 5.2. CXCR1 Amplifikasyon Eğrisi Grafiği	30
Şekil 5.3. CXCR2 Amplifikasyon Eğrisi Grafiği	30
Şekil 5.4. Beta Aktin Amplifikasyon Eğrisi Grafiği.....	31

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Kaan GÜNDOĞDU
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Doç. Dr. M Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Eylül 2013

ÖZET

KRONİK BÖBREK YETERSİZLİĞİ HASTALARINDA İDRAR BULUNDURMAYAN MESANE DOKUSUNDA IL-8, CXCR1 VE CXCR2'NİN GEN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kemotaktik bir faktör olarak tanımlanan IL-8 in aktive lökositler tarafından salgılandığı, nötrofiller ve T lenfositlerin göçünü sağladığı bilinmektedir. Ayrıca IL-8, anjiogenezi tetikleyerek endotel hücrelerin büyümesini teşvik eder ve devamlılığını sağlar. IL-8 ürotelyum hücrelerinde salgılanmaktadır. IL-8 reseptörleri CXCR1 ve CXCR2 mesane ürotelyum hücrelerinde birlikte eksprese olmaktadır. IL-8' in mesaneden salınımı enfeksiyon sırasında artış göstermektedir. IL-8 idrar yolunu enfeksiyonlardan korur (lökositleri teşvik ederek).

Bu çalışmada; IL-8'in normal ürotelyum hücrelerinin sağkalımı için gerekli bir büyüme faktörü olduğu gösterilmiştir. IL-8 Akt yolağını aktifleştirerek normal ürotelyum hücrelerinin büyümesinde önemli rol oynar. Ayrıca, çalışmada **siRNA ile IL-8' in susturulmasının** mesane epitelyum **hücre ölümüyle** sonuçlandığı ve **sağkalımın** ağırlıklı olarak **CXCR1** yoluyla olduğu belirlenmiştir. Ancak bu faktörlerle ilgili, böbrek nakli olan hastaların idrarla karşılaşmamış mesane hücreleriyle ilgili herhangi bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada, böbrek nakli hastalarının mesane dokularındaki **IL-8, CXCR1, CXCR2 gen ifadeleri** ile **enfeksiyona yatkınlık** arasında ilişki olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: IL-8,CXCR1,CXCR2, , Ürotelyum

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Kaan GÜNDOĞDU
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Doç. Dr. M Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Degree Awarded and Date : Master of Science – September 2013

ABSTRACT

ANALAYSIS OF IL-8 CXCR1 AND CXCR2 GENE EXSPRESSION LEVELS IN CHRONIC RENAL FAILURE PATIENTS WITH URINE DEPRIVED BLADDER

IL-8, which was known as a chemotactic factor, is secreted by activated leukocytes that promote directional migration of neutrophils and T lymphocytes. In addition, IL-8 maintains and stimulates the growth of endothelial cells by triggering angiogenesis. IL-8 is secreted in cells of the urothelium. IL-8 receptors (CXCR1 and CXCR2) are expressed in the urothelium bladder cells. IL-8 release is increased in the bladder during infection. IL-8 protects from the urinary tract infections (by promoting leukocytes).

IL-8 is a growth and essential survival factor for normal human urothelial cell. IL-8 plays an important role in the growth of normal urothelium cells by activating the Akt pathway. Also silencing of siRNA and IL-8 causes bladder epithelial cell and the survival of epithelial cells depends mainly on CXCR1 expression. However, there is no study on this factor in relation the renal transplant patients urinary bladder cell.

In this context, it was observed that there is a correlation between the bladder tissue samples of renal transplant patients gene expressions IL-8, CXCR1, CXCR2, and susceptibility to infection.

Key Words: IL-8, CXCR1, CXCR2, Urothelium

1. GİRİŞ

1.1. Mesanenin Histolojisi

Mesane, memeli türü için düşük basınçla idrarın depolanması, kontrollü boşaltımı görevini üstlenen üriner sistemin önemli bir organı olup tamamen ürotelyal epitelle (ürotelyum) döşelidir (Tanagho ve diğ., 1971). Normal mesane ve trigonal ürotelyumunun tanımlanması Clayson ve Cooper' a dayanmaktadır (Newman ve Antonakopoulos, 1989).

İdrar yolunun uç yaygısını oluşturan Urotelyum yapı olarak renal pelvis, üreterler, mesane ve prostat salgı kanalları epitellerinden farklı bir yapıdadır. Ürotelyum endodermal orjinli, üç tabakalı transisyonel epitelidir. Taban (bazal) ve ara (intermediate) hücre tabakaları belirgin morfolojik özellik ve bariyer fonksiyonu taşımazlar. Yüzeyde ise birbirine sıkı bağlantılar (tight junction) ile tutunarak geçirgenlik bariyeri oluşturan ve mesanenin gerilme derecesine göre boyutları değişebilen (çap: 50-120um), şemsiye hücre tabakası bulunur. Şemsiye hücrelerinin apikal membranı asimetrik birim membran: ABM özelliği taşıyan: konkav-oyuk şekilli apikal membran plakları ve "hinge" isimli plazma membranı mikropilika bölgelerinden oluşmaktadır. Sitoplazmalarında sitoplazmik veziküller ve ince fibrillerden oluşan hücre iskelet ağı bulunmaktadır (Lewis, 2000).

Alt üniteler, farklılaşmasını tamamlamış yüzey ürotelyumu belirleyicileri olan, üroplakinler (Uroplakin:UP) olarak adlandırılan,dört tip membran içi yerleşimli proteinden oluşmaktadır. Membran asimetrisi alt ünitelerin yoğunluğu ve UP'lerin hücre dışı ünitelerinin büyüklüğü ile sağlanır (Wu ve diğ., 1995).

Ürotelyum idrar volumündeki büyük değişikliklere uyum sağlaması ve idrar ve periferik kan dolaşımı arasında madde değişimlerini sağlaması nedeniyle dinamik olarak değişim halindedir. (Khandelwal ve diğ., 2009) Normal mesane ürotelyumunda proliferatif aktivite düşük seviyededir (Newman ve Antonakopoulos, 1989).

1.2. Kronik Böbrek Yetmezliği ve Renal Transplantasyon

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) böbrek işlevinin ilerleyici şekilde, geriye dönüşü olmaksızın kaybedilmesidir (Andreoli ve ark. 1993). Klinik açıdan KBY, asemptomatik böbrek fonksiyonu azalmasından üremik sendroma kadar uzanan değişen bir spektrum gösterir. Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) tanısı konan hastalarda renal replasman tedavileri (RRT) uygulanmaktadır. Bunlar yaşamı koruyucu tedavilerdir ve uygulanan en yaygın yöntem hemodiyalizdir (Sehgal, 2002).

1.3. Kemokinler

1992 yılında lökosit göçü, enfeksiyon hastalıkları ve enflamasyon, anjiyogenezis, hematopoezis ve organogeneziste rol alan bir grup sitokine kemotaktik sitokinlerden esinlenerek "Kemokin" adı verilmiştir (Lindley ve diğ., 1993).

Kemokinler 8-10 kilodalton (kd) ağırlığında, %20-70 oranında aminoasit dizilimlerinde benzerlik gösteren proteinlerdir. Sistein kalıntılarının pozisyonlarına ve genetik yapılarına göre dört alt gruba ayrılırlar. En az dört kemokin ailesi olmasına rağmen bunlardan iki tanesi çok iyi tanımlanmıştır (Baggiolini ve Loetscher, 2000).

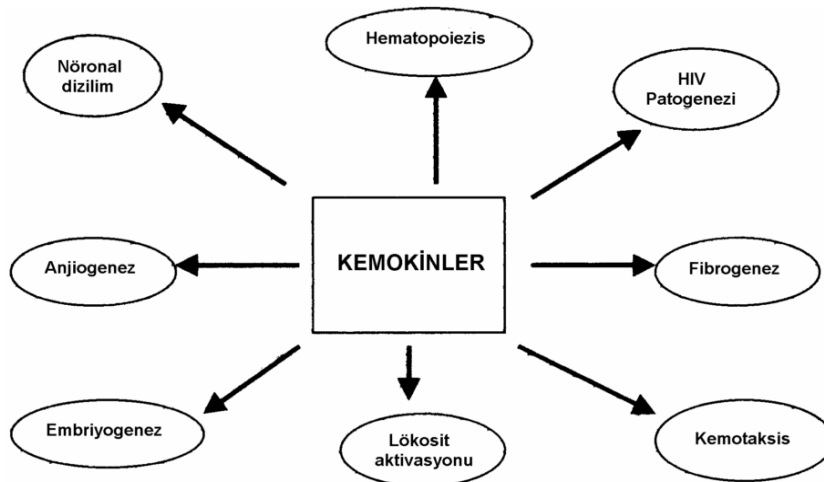
Tüm kemokinler; en azından üç beta (β) tabakası (b1- 3) ve C terminal α heliks yapısı açısından benzerlik gösterirler. CXC kemokin ailesi olarak da bilinen kemokin ailesinde N terminaline yakın iki sistein aminoasidi farklı bir aminoasit tarafından ayrılmıştır. Bu kemokinin kromozomu 14q12-21 üzerindedir. Bu grupta sadece SDF-1 α 10⁵³ kromozomundadır. α kemokinler nötrofillere etki ederken; lenfositlere karşı etki göstermezler. CC kemokinlerde (β kemokin) kemokinlerden farklı olarak N terminaline yakın iki sisteini ayıran aminoasit yoktur. β kemokin geni 17q11.2-12 dedir. Sadece MIP-3p kromozomu 9¹¹⁷, de, MIP-3 α LARC'da kromozom 2^{11/a}dadır. β kemokinler de kendi içinde 5 MCP ve eotaksin içeren MCP-eotaksin ailesi ve diğer β kemokinler olmak üzere iki alt gruba ayrılır. CC kemokinler ise genellikle nötrofillere karşı etki göstermezken, monosit, eozinofil, bazofil ve lenfositlere yüksek derecelerde etki ederler (Luster ve diğ., 1985) (Şekil 1.1).

C kemokin olarak adlandırılan Lenfotaktin tek sistein içerir, kromozomu ise 1q23'dedir. CX3C kemokin, ise Fraktaktin veya Nörotaktin olarak

adlandırılmaktadır ve geni 16. kromozomda bulunmaktadır (Luster, 1998). CXC kemokinler N terminallerinde glutamik asitlözün- arginin (Glu-Leu-Arg) dizilimi gösterenler (ELR kemokinler) ve göstermeyenler (non-ELR kemokinler) olarak iki alt gruba ayrılırlar. Glu-Arg-Leu diziliminin yokluğu nötrofilere karşı olan etkilerinin zayıf olmasına neden olur. Bu grupta PF-4 IP-10 ve MIG bulunur. PF-4'ün N terminali Glu-Leu-Arg olarak değişirse IL-8 reseptörlerine bağlanabilir ve nötrofillere karşı güçlü etki gösterir (Clark-Lewis ve diğ., 1993).

1.3.1. Kemokin Reseptörleri

Kemokinlerin aracılık ettikleri hücre göçü ve aktivasyonu için bu moleküllerin hücre üzerindeki özgül reseptörlerine bağlanmaları gerekir. Bugüne kadar dört tane CXC (CXCR1-CXCR4), sekiz tane CC (CCR1- CCR8) ve bir adet de CX3C (CX3CR) kemokin reseptörü tanımlanmıştır (Tablo 1.1). Bazı reseptörler tek bir hücrede yoğunlaşmışken (CXCR1 sıklıkla nötrofilde); diğer reseptörler farklı hücrelerde görülürler (CCR2 monosit, T lenfosit, NK hücre, dendritik hücre ve bazofilde). CCR1 ve CCR2 özellikle monositlerde bulunurken; sadece IL-2 uyarımından sonra lenfositlerde belirir (Loetscher ve diğ., 1996) (Tablo 1.1) Bazı kemokin reseptörleri çeşitli uyarılarla hücre yüzeyinde artış gösterebilirler. Örneğin CCR2 kemokin reseptörleri lipopolisakaritlerin varlığında azalır ve böylece hücreleri sadece bu reseptörü aktive eden MCP-1'e karşı cevapsız kılar fakat CCR1 ve CCR5'i aktive eden MIP-1a'ya karşı hücrenin halen cevabı vardır (Sica ve diğ., 1997).



Şekil 1.1. Kemokinlerin biyolojik rolleri (Wenzel ve Stahl, 1999)

Tablo 1.1. Kemokin reseptör-ligant ilişkisi (Rollins , 1997)

RESEPTÖR	LIGANT
CXC Reseptör	
CXCR1	IL-8
CXCR2	IL-8, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , NAP-2, ENA-78
CXCR3	IP-10, MIG
CXCR4	SDF-1 α
CC Reseptör	
CCR1	MIP-1 α , RANTES, MCP-3
CCR2	MCP-1, MCP-3, MCP-5
CCR3	Eotaksin, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4 (?)
CCR4	MIP-1 α , RANTES, MCP-1, TARC
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
CCR6	MIP-3 α / LARC
CCR7	MIP-3 β / ELC

Buna karşın diğer kemokin reseptörlerinin ortaya çıkışı farklı hücre tiplerinin ayrılmasından ve aktivasyonundan sorumludur. Örnein; CXCR3 aktive yardımcı T lenfosit tip 1 (Th1) lenfositlerinde görülürken, CCR3, eozinofil, bazofil ve aktive Th2 lenfositlerinde görülür. Kemokin reseptörlerinin lökositlerde artışı hücre aracılı Th1 tip immün cevabı ile ya da allerjik Th2 tip cevabın özgül artışı ile olur (Sallusto ve diğ., 2005).

Bazı kemokin reseptörleri nöronlar, astrositler, epitelial hücrelerde de bulunur. Bu da kemokin sisteminin lökosit göçü dışında diğer sistemlerde de birtakım fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir (Baggiolini ve Loetscher. 2000).

Birçok kemokin reseptörü birden fazla kemokinle bağlanmakta ise de; CC reseptörleri sadece CC kemokinleri, CXC reseptörleri de CXC kemokinlerini başlamakta. Bu reseptör-ligand sınırlılığı muhtemelen primer, sekonder ve tersiyer yapıları benzer ancak kuaterner yapıları birbirinden farklı olan CC ve CXC kemokinlerin yapısal farklılığından kaynaklanmaktadır (Lodi ve diğ., 1994).

Reseptör uyarımı; inozitoltrifosfat oluşumu, hücre içi kalsiyum artışı ve protein kinaz C aktivasyonuna yol açarak hücrenin aktivasyonunu sağlar (Laudanna ve diğ., 1996). Kemokinreseptör sinyali ayrıca Ras ve Rho ailelerinin küçük guanozintrifosfat bağlayan proteinlerini de aktive eder (Lodi ve diğ., 1994). Rho

proteinler; hücre membranında katlanma, yalancı ayak oluşumu ve fokal adezyon komplekslerinin toplanması gibi aktin bağımlı olayların düzenlenmesiyle hücre motilitesini sağlarlar (Luster. 1998).

Kemokinler ayrıca iki tane sinyal üretmeyen moleküle de bağlanırlar. Bunlardan bir tanesi; eritrosit kemokin reseptörü olarak da adlandırılan DARC'dir (Horuk ve diğ., 1993). Bu reseptör, eritrosit ve endotelial hücrelerde bulunmaktadır ve 1950'lerden bu yana Duffy kan grubunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (Horuk ve diğ., 1993). Bu reseptörün görevinin CC ve CXC kemokinleri bağlayıp, dolaşımdan uzaklaştırmak olduğu düşünülmektedir (Luster. 1998). Diğeri ise heparan sülfat proteoglikan grubudur (Luster ve diğ., 1995). Heparan sülfat proteoglikanlar ekstrasellüler matrikste ve endotelial hücre yüzeyinde kemokinleri tutar ve bölgesel bir yoğunluk farkı oluşturarak kemokin salımına yol açar (Tanaka ve diğ., 1993).

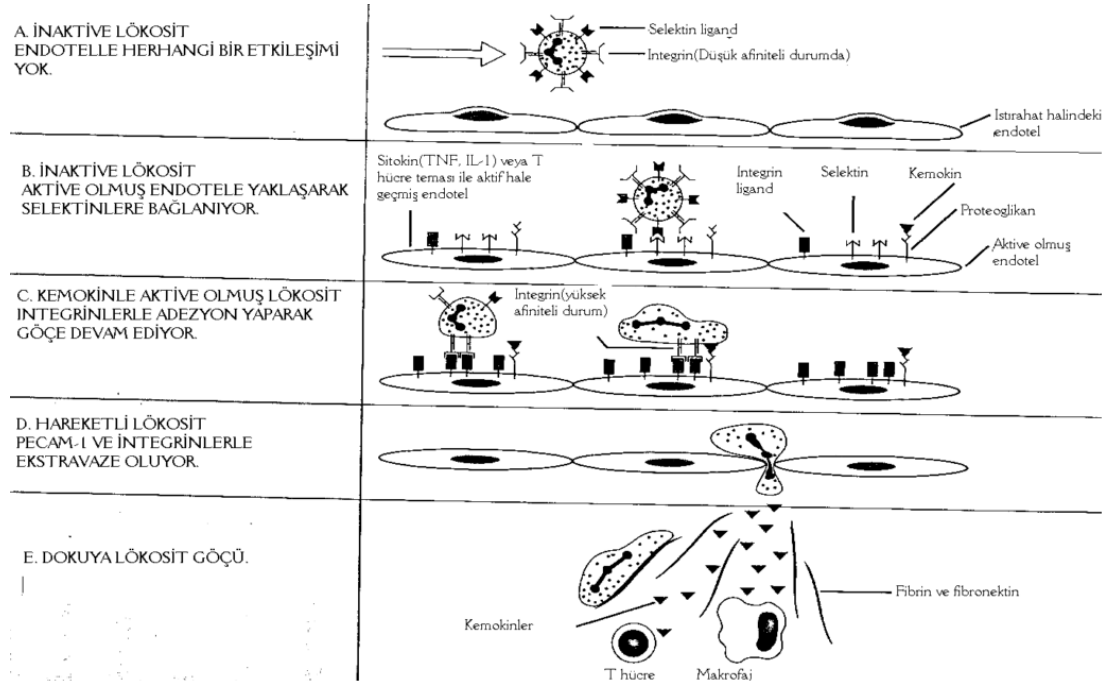
1.3.2. Interlökin-8

Son yıllarda lökositler ve fibroblastlar için kemotaktik aktivitesi olan yeni bir sitokin ailesi tanımlanmıştır. Bu kemotaktik sitokinler kemokinler olarak adlandırılmış olup moleküler ağırlıkları 8000 ile 16000 dalton arasında değişir. % 20-50 aminoasit dizisi ile birbirlerine benzerler. 7-transmembran reseptörlerine bağlanarak, $10^{-8}/10^{-11}$ M konsantrasyonda aktive olurlar. IL-8'de bu kemokin ailesinin bir üyesidir (Oppenheim ve diğ., 1997) .

1.3.3. Kemokin reseptörleri ve IL-8 etki mekanizması:

Tüm kemokinler iki çift sistein rezidüsünden oluşan, iki intramoleküler disülfid bağı taşırlar ve amino terminaline en yakın sistein çiftinin dizilişine göre iki alt gruba ayrılırlar.

C-X-C (veya alfa) kemokinlerde bu sisteinler bir aminoasit tarafından ayrılmıştır. C-C (veya beta) kemokinlerin genleri ise 17.kromozomda kodlanan iki sistein birleşiktir. Çoğu alfa kemokinler nötrofilleri çekerken, tüm beta kemokinler monosit ve T lenfositleri çekerler, aynı zamanda bazıları eozinofiller, bazofiller ve doğal katil hücreler için de kemotaktiktirler (Oppenheim ve diğ., 1997). IL-8 C-X-C kemokin ailesinin bir üyesi olup 7-transmembran helikal G protein-çifti reseptörü olan CXCR1 ve CXCR2 ye bağlanarak etkisini gösterir (David ve diğ., 2003). Dokuz kemokin reseptörü şu ana kadar tanımlanmıştır. Tümü rodopsine benzer reseptör



Şekil 1.2. Lökositlerin göçü

1.3.3.1. IL-8'in Biyolojik ve Klinik Özellikleri

a) Anjiogenezdeki rolü:

IL-8 kobayda korneal neovaskülarizasyon modelinde endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ederek yeni kan damarları oluşumunu uyarmaktadır. Bu da organogenez yara iyileşmesi, tümör büyümesi, metastazlarda etkilerinin olabileceği yönünde fikirler oluşturmaktadır (Alam, 2003).

b) İmmun sistem üzerindeki etkileri:

Primer olarak mononükleer fagositlerden, endotelial ve epitelyal hücrelerden kaynaklanan IL-8, aynı zamanda T hücreleri, eozinofiller, nötrofiller, fibroblastlar, keratinositler, hepatositler ve kondrositlerden de salgılanabilir. IL-8 sentezi lipopolisakkaritler, IL-1, TNF ve virüsler tarafından da aktiflenebilir. IL-8 nötrofiller için en potent kemotaktiklerden biridir.

Aynı zamanda polimorfonükleer nötrofillerin degranulasyonunu (özellikle solunum yollarında) ve CD11b/CD18 ile endotel hücrelerine adezyonunu sağlar.

c) Akut faz reaksiyonu ve inflamatuvar yanıt üzerindeki etkileri:

İnflamatuvar yanıtta diğer kemotaktiklerle karşılaştırıldığında IL-8 daha geç ortaya çıkar. Örneğin LTB4 hücre aktivasyonunda dakikalar içinde ortaya çıkıp, 3

saatte pik yaparken konsantrasyonu azalmaya başladığında IL-8 yeni sentezlenerek sekrete edilir ve salgılanması 24 saat sürer(Alam, 2003)

IL-8 ve diğer alfa kemokinler inflamatuvar reaksiyonu ve ağır travması olan hastaların kanında bulunmuş ve inflamasyon bölgesinde; romatoid artritte sinovyal sıvıda, psöriatik deride ve septik şoklu hastaların dolaşımında tesbit edilmiştir. Bu yüzden alfa kemokinler akut inflamatuvar reaksiyonlarda major rol oynayıcı olarak pyojenik olmamaları ve akut faz reaktanlarını indüklememelerine rağmen görülmektedirler. Farelerde IL-8 reseptör homoloğu genler taşıyanların bakteriyal enfeksiyonlara karşı daha duyarlı oldukları gösterilmiştir(Oppenheim ve diğ., 1997).

d) Allerjik Hastalıklar ve Solunum Sistemi Üzerindeki Etkileri:

IL-8'in mRNA'sı aynı zamanda tipl1 insan mast hücreleri aktive olduğunda üretilmeye başlar. İmmunelektron mikroskobu ile IgE ile uyarılmış deri mast hücrelerinin sitoplazmik membranlarında ve intraselüler granüllerinde IL-8 bulunduğu gösterilmiştir. IL-8'in artmış epitelyal üretimi akut ve rölatif olarak değişik etkenlere maruziyete karşı nonselektif yanıt olarak ta ortaya çıkabilir. Bu etkenler içinde respiratuvar virüsler, bakteriler, ev tozu akarları proteolitik allerjenleri, toksik maddeler (ozon, nitrojen dioksit, asbest), proinflamatuvar sitokinler ve mekanik etkenler yer alır. İn vivo olarak allerjik rinit ve astımda da epitelyal IL-8 ifadesi artmıştır. İntraselüler IL-8'in atopik dermatitli ve astımlı hastalarda arttığı gösterilmiştir.

1.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (Quantitative Gerçek zamanlı PZR, qRT-PZR)

Gerçek zamanlı PZR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir PZR teknolojisidir. DNA sarmalına bağlanarak floresan ışığa yapan özel boyalarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob diziler aracılığı ile 10 amplifikasyon miktarının tespit edilmesini sağlamaktadır. Her PZR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarının ölçülebilmesini ve kantitatif analizlerin yapılmasını sağlar (Bustin ve diğ., 2005; Nolan ve diğ., 2006).

Eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) Gerçek zamanlı PZR uygulamalarında önemli bir parametredir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile ürünün ilk anlamlı

artışın olduğu noktayı belirtir. Farklı PZR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir (Womg ve Medrano,2005).

Florimetrik PZR yöntemi ile yapılan kantitasyon çalışmalarında, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak kantitasyon yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PZR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Standart örnek olarak içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen örneklerle yapılan çalışmalara mutlak kantitasyon adı verilir. Bir örneğin içinde yer alan kalıp miktarının diğer bir örnekle karşılaştırıldığı durumlarda mutlak kantitasyona gerek yoktur. Bu durumda, standart örneğin içinde bulunan kalıp DNA miktarının bilinmesi önemli değildir. İyi ifade sağlayan bir örneğin seri dilasyonları standart olarak kullanılabilir. Bu çalışmalarda önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara göreceli kantitasyon (relative quantitation) adı verilir (Pfaffl, 2001).

1.4.1. Referans Genlerin Kantitatif RT-PZR Çalışmalarındaki Önemi

Kantitatif RT-PZR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ifadesi değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır. Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ifade düzeyinin incelenmesi için dokularda ifadesi değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. İlgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan referans genin ifade düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir. Bu nedenle farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ifade düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak referans genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak referans genin ifade düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ifade düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır (Bustin ve diğ., 2005).

2. AMAÇ

Son dönem kronik böbrek yetmezliği (SDKBY), ülkemizde ve dünyada insidansı her geçen yıl artmakta olan mortalitesi yüksek bir sağlık sorunudur. Günümüzde, SDKBY gelişmiş olan hastalara 2 tedavi modeli uygulanmaktadır: Bu tedavi modelleri, sırasıyla, diyaliz tedavisi ve renal transplantasyondur.

Türkiye’de 2008 yılı itibariyle, SDBY tanısı alan hasta sayısı 40 bini aşmıştır. Bu hastalardan büyük çoğunluğu diyaliz tedavisi görmekteyken, ülke genelinde yalnızca 1300 civarında hastaya renal transplantasyon yapılmaktadır (Türk Nefroloji Derneği Raporu, 2007).

Birleşik Devletler Renal Veritabanı Sistemi (USRDS) verilerine göre, renal transplantasyon yapılan SDBY hastalarıyla, ulusal bekleme listesinde yer alıp diyaliz tedavisi görmekte olan hastalar karşılaştırıldığında, 3 ila 4 yıllık takip sonunda, renal transplantasyon yapılan hastaların % 68 daha düşük ölüm riski olduğu gösterilmiştir (ABD Renal Veri Sistemi, 2005).

Yapılan analizlerde, renal transplantasyonun, diyaliz tedavisi ile karşılaştırıldığında, yüksek yaşam kalitesi, SDBY hastalarında başlıca ve en önemli tedavi şekli olduğu gösterilmiştir (Rigatto, 2003). Buna karşın, ülkemizde renal transplantasyon yapmakta olan merkezlerin ve yetişmiş elemanların görece az olması, ulusal bekleme listesinin düzenli bir şekilde yeni oluşturulmakta olması ve en önemlisi böbrek bağışi konusunda yaşanan türlü zorluklar nedeniyle, bu en önemli tedavi şekli düşük sayılarda kalmaktadır.

Böbreğin ilk bozulan fonksiyonlarından birisi idrarı konsantre etme yeteneğinin azalmasıdır. Kronik Böbrek hastalığında hastaların birçoğu hemodiyalize girdiğinden idrar çıkışı olmamaktadır.

Bu tez çalışmasında; İdrarla karşılaşmamış mesane hücrelerindeki değişimin böbrek hastalarında enfeksiyona yatkınlık geliştirmesi ve bu kapsamda, böbrek nakli hastalarının mesane dokularındaki IL-8, CXCR1, CXCR2 gen ifadelerine ve bunların enfeksiyona yatkınlığına bakılması hedeflendi.

Bu konu hakkında nakil sonrası hastaların mesane dokusunda gen ifadesi düzeyinde yapılmış çok fazla çalışma mevcut değildir.

3. GEREÇLER

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışmada kullanılan 46 adet hastanın doku örnekleri 2009-2012 yılları arasında Haydarpaşa Numune Eğitim Araştırma Hastanesi'nden temin edilmiştir. 25 nakil öncesi hasta dokusu, 12 nakil sonrası hasta dokusu, 9 sağlıklı birey hasta dokusu olup -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Araştırma İçin Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Tablo 3.1. Laboratuvarında kullanılan cihazlar ve markaları

CİHAZLAR	MARKA
Görüntüleme Sistemleri	: Vilber Lourmant ETX-26.MX
Isıtıcı	: Labart, SH-5 Heating Stirrer
Manyetik Karıştırıcılar	: MR3001
Spektrofotometreler	: Nanodrop ND-1000
Thermo Cycler	: Techne TC-512
Santrifüjler	: Centrolit II-BL Centrifuge
Tartı	: Hassas Terazı, XB220 A (Presica)
Vorteks	: Heidolph REAX
Derin Dondurucular	: -80°C , Thermo Fisher Scientific
Mikropipet Seti	: 0,2-2, 1-10, 2-20,10-100, 20-200, 200-1000 μl 'lik Finnpipette (ThermoScientific, FİNLANDİYA)
Doku parçalama cihazı	: MagNA Lyser Parçalama Cihazı MagNA Lyser Green Beads tüpü, Katalog No: 03 358 941 001
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı	: LightCycler® 2.0 Instrument LightCycler® 2.0 Sample Carousel (20 μl) 2 LightCycler® Capping Tools

3.3. RNA izolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

Örneklerden kit kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Roche High Pure RNA Tissue Kit (50) (Katalog No: 12 033 674 001) kullanılmıştır.

3.4. cDNA Sentezi İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar

Örneklerden kit kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Roche, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Katalog No: 04 379 012 001) kullanılmıştır.

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar

10X MgCl₂'süz Tampon	: 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 750 mM Tris-HCl (pH 8,8), % 0,1 Tween 20 (Fermentas, LİTVANYA)
MgCl₂	: dH ₂ O'da 25 mM (Fermentas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotitler (dNTP)	: 10 mM (Fermentas, LİTVANYA)
Taq DNA Polimeraz	: 5u/µl (Fermentas, LİTVANYA)

3.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (Quantitative Gerçek zamanlı PZR, qRT-PZR) İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar

Solis BioDyne - 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPZR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Katalog No: 08-24-00001) kullanılarak ifade seviyeleri tespit edilmiştir.

3.7. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

Agaroz (Bio Basic Inc., Agarose A)

EtBr (Scharlau ET0109),

Trisma Base (Amresco, 0826),

Borik asit (Amresco, 0588)

EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (Sigma E5134) 1000 ml'ye

6X DNA yükleme boyası (Fermentas, LİTVANYA)

4. YÖNTEMLER

4.1. Doku Eldesi

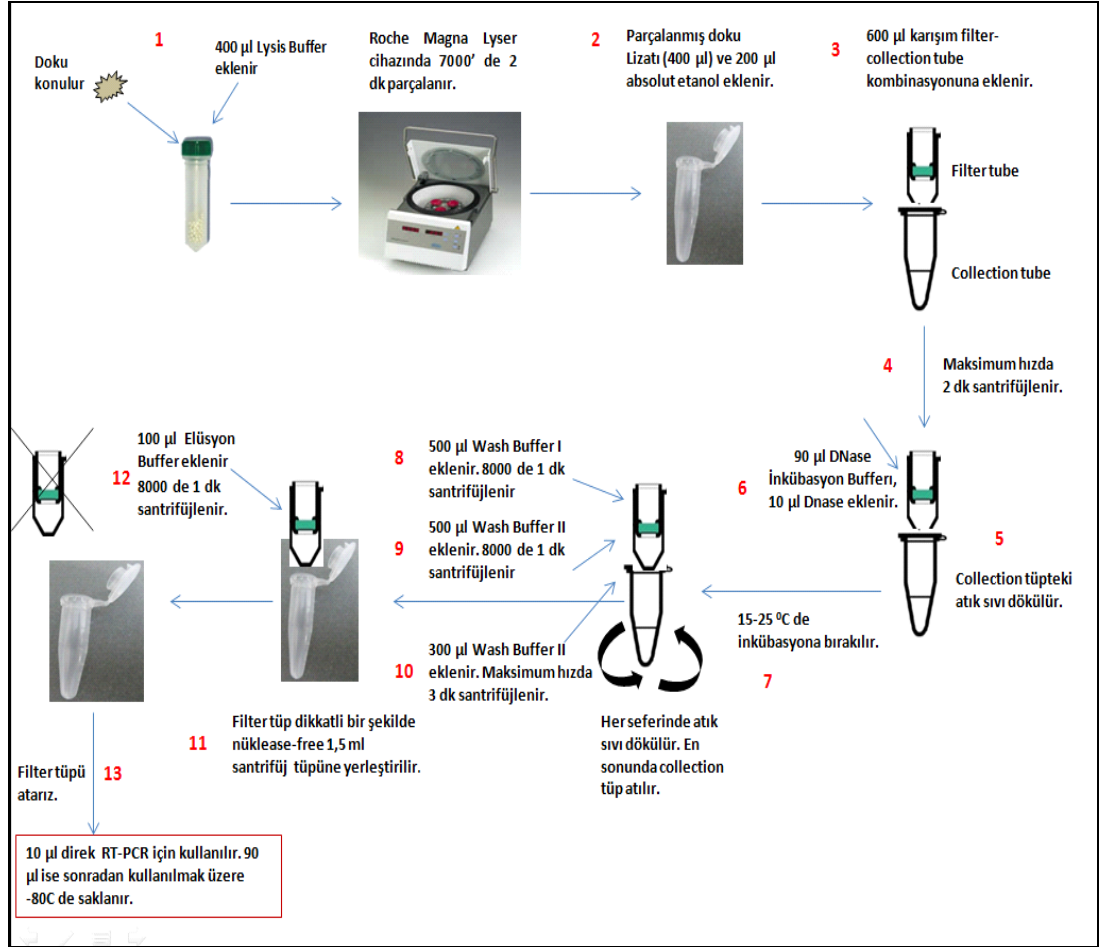
Nakil sırasındaki hastaların mesanelerinden doku alımı gerçekleştirilmiştir. Nakil sonrası kontrol amaçlı gelen hastaların mesanelerinden doku alımı gerçekleştirilmiştir. Ürolojik muayene için gelen ancak sonucu temiz olan hastaların mesanelerinden doku alımı gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri eppendorf tüpleri içinde, sıvı azota alınarak donduruldu. Tüm örnekler RNA izolasyonu aşamasına kadar -80°C ' de saklandı.

4.2. Dokudan RNA İzolasyonu

Çalışma boyunca tüm RNA izolasyonları aşağıdaki Roche High Pure RNA Tissue Kit protokolü esas alınarak gerçekleştirilmiştir:

- ✓ Parçalama tüpü içine dokunun tamamı konulur. Üzerine 400 μl Lysis Buffer eklenir. Parçalama cihazına yerleştirilir ve 7000 rpm'de 2 dakika doku parçalanır.
- ✓ Nükleazdan arınmış 1,5 ml santrifüj tüpünün içine parçalanmış doku lizatı eklenir (400 μl). Lizatın üstüne 200 μl absolüt etanol eklenir ve iyice karıştırılır.
- ✓ Filtre tüp ve toplama tüp birleştirilir. 600 μl karışım bu tüp kombinasyonuna eklenir.
- ✓ Maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilir.
- ✓ *Eğer ıslaklık varsa, tekrar santrifüjlenir.*
- ✓ Santrifüjden sonra toplama tüpündeki atık sıvı dökülür.
- ✓ 90 μl DNase İnkübasyon Bufferı, 10 μl DNase I çalışma solüsyonu eklenir.
- ✓ 15 - 25°C de inkübasyona bırakılır.
- ✓ 500 μl Wash Buffer I eklenir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Toplama tüpündeki atık sıvı dökülür.
- ✓ 500 μl Wash Buffer II eklenir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Toplama tüpündeki atık sıvı dökülür.
- ✓ 300 μl Wash Buffer II eklenir. Maksimum hızda 3 dakika santrifüjlenir. Toplama tüpündeki atık sıvı dökülür.

- ✓ Dikkatli bir şekilde kolon çıkarılır. Filtre tüp, santrifüj tüpünün içine konulur.
- ✓ Üzerine 100 µl Elüsyon Buffer eklenir. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir.
- ✓ Mikrosantrifüj tüpü şimdi izole edilmiş RNA içermektedir. 10 µl direk RT-PZR için kullanılır. 90 µl ise sonradan kullanılmak üzere -80⁰C de saklanır.(Sekil 4.1)



Şekil 4.1. : Dokudan RNA İzolasyonu Basamakları

4.3. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi

Elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için spektrofotometre kullanılarak ölçüm yapılmıştır. RNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranları esas alınmaktadır. 260 nm DNA'nın, 280 nm proteinin, 230 nm de fenolün maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyunu ifade etmektedir. A260/A280 oranınının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir. Fenol, protein veya benzeri diğer safsızlıkların olması durumunda bu oranlar belirtilen aralığın dışında çıkmaktadır.

4.4. RNA Konsantrasyonlarının Ayarlanması

RNA konsantrasyonları Nanodrop aracılığıyla belirlenmiştir. Bunun için 1.5 µl RNA alınarak cihazın üzerine damlatılıp, miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Geriye kalan RNA lar cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.

4.5. cDNA Sentezi

Komplementer DNA (cDNA), mRNA'dan sentezlenen DNA kopyasıdır. Bu reaksiyonda Reverse transkriptaz enzimi kullanılır. Reverse Transkriptaz RNA bağımlı bir DNA polimerazdır. Yani diziyi bir RNA kalıbı olmadan sentezlemeye başlayamaz. Kalıp RNA tek strand mRNA dizisine bağlanarak, polimeraz enziminin sentezlemeye başlaması için gerekli olan çift strand diziyi oluşturur. Çalışma buz üzerinde yapılmıştır. cDNA sentezinde Roche, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Katalog No: 04 379 012 001) protokolü kullanılmıştır:

- ✓ Tüm donmuş bileşenler çözündürülür. Kullanmadan önce kısa bir santrifüjleme yapılır. Tüm bileşenler çalışma boyunca buz üzerinde muhafaza edilir.
- ✓ Steril, PZR tüpü buz üzerine konular, Tablo 4.1. de belirtilen miktarlarda primer karışımı hazırlanır.

Tablo 4.1. cDNA sentezi için gerekli bileşen miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
Poly(A) ⁺ mRNA	<i>*10 ng Poly(A)⁺ mRNA olacak şekilde ayarlanır.</i>
Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer, 50pmol/µl	1µl
Su	<i>*Son hacmi 13' e tamamlamak üzere değişik miktarlarda su eklenir.</i>
Toplam	13 µl

- ✓ Primer karışımı 10 dakika, 65⁰C de denatüre edilir. Denatürasyon bitince hızlı bir şekilde buz üzerine alınır.

- ✓ Tüpe Tablo 4.2. de belirtilen RT karışım bileşenleri eklenir.

Tablo 4.2. RT karışım bileşenleri

BİLEŞEN	MİKTAR (µl)
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, <i>5×conc.</i>	4
Protector RNase Inhibitor, <i>40 U/ µl</i>	0.5
Deoxynucleotide Mix, <i>10mM</i>	2
Transcriptor Reverse Transcriptase, <i>20 U/ µl</i>	0.5
Total	7
Final Miktar	20

- ✓ Karışımları ekledikten sonra elimizle hafifçe sallayarak birbirlerine karışması sağlanır.
- ✓ Karıştırdıktan sonra tüpler hemen PZR cihazı içine konulur (Buharı minimize etmek için).
- ✓ 10 dakika 25⁰C de, 30 dakika 55⁰C inkübasyona bırakılır.
- ✓ 85⁰C de 5 dakika ısıtılır. Reaksiyon bitince tüpler hemen buz üzerine alınır.
- ✓ cDNA lar -20⁰C de saklanır.

4.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Canlılarda bulunan özgün genetik parçacıkların (DNA veya RNA) enzimatik olarak çoğaltılmasıdır. Kullanılan enzim “polimeraz” enzimidir. Aslında PZR işlemi (DNA polimerizasyonu-DNA’nın kopyalanarak çoğaltılması) canlı hücrelerde devamlı olmaktadır. PZR DNA polimerizasyon işleminin belli özel amaçlar için minik deney tüplerinde (PZR tüpleri) veya cam borucuklarda yapılan bir kopyasıdır. Canlı hücreler içindeki polimerizasyon işlemi, PZR tüpleri içinde, gerekli tüm kimyasal maddeler konularak ve sıcaklık parametreleri uygulanarak taklit edilmektedir.

4.6.1. Primer Çiftlerinin Tasarlanması

İfade profiline bakılacak dört gene (IL-8, CXCR1, CXCR2, Beta Actin) özgün primerler tasarlanmıştır. Bu primerler esas olarak qRT-PZR işlemlerinde kullanılacağı için primer tasarımında dikkat edilen en önemli husus ileri ve ters

primerlerinin genin farklı ekzonlarında olacak biçimde tasarlanmış olmasıdır. Bu sayede, mRNA senteziyle intronlarından arınmış olan genin amplifikasyonu sırasında ortamda DNA kontaminasyonunun olup olmadığı kontrol edilebilmektedir. Tablo 4.3.'de qRT-PZR'da kullanılan primerlere ait diziler mevcuttur:

Tablo 4.3. qRT-PZR'da kullanılan primerler

Gen	Primer Dizisi	Tm
IL8	F:ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC R:AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC	112
CXCR1	F:CTGGTGATGCTGGTCATCTTAT R:CAAGGTCAGGGCAAAGAGTAG	62
CXCR2	F:CTCTCTAAGACCTCCTGCCTAA R:TGACACTGAGACCAAGAAGAAC	62
Beta Aktin	F:AATGCTTCTAGGCGGACT R:ACTCCCAGGGAGACCAA	54

4.6.2. Primerlerin Sulandırılması

Primerler 1 μ l' de 100 pmol olacak şekilde sulandırılmıştır. Önce nmol değeri pmole dönüştürülmüştür. Sonra 1 μ l' de 100 pmol olacak şekilde su eklenilmiştir.

Tablo 4.4. qRT-PZR'da kullanılan primerleri sulandırmak için gerekli hesaplamalar

Primer	nmol Ana Stok	pmol	dH ₂ O μ l (1 μ l/100pmol)
IL-8 F	31,6	31600	316
IL-8 R	35,9	35900	359
Beta Actin F	27,1	27100	271
Beta Actin R	21,9	21900	219
CXCR1 F	13,2	13200	132
CXCR1 R	15,1	15100	151
CXCR2 F	13,4	13400	134
CXCR2 R	11,5	11500	115

4.6.3. Primer Optimizasyonu

Primer çiftlerinin en etkin çalıştıkları bağlanma sıcaklıklarını bulmak için primerler belli sıcaklık aralığında denenmiştir. Bu reaksiyonlarda hasta örneklerine ait cDNA'lar kullanılmıştır. Tablo 4.8.'de miktarları belirtilen reaktifler ve Tablo 4.5.'deki termal döngü koşulları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.5. PZR protokolü

Reaktif	Miktar (μ l)
10X Taq tamponu (Fermentas)	2,5
MgCl ₂ (Fermentas, 25 mM)	2
dNTP (Fermentas, 10 mM)	0,5
F Primer (10 pmol/ μ l)	1,25
R Primer (10 pmol/ μ l)	1,25
Taq DNA polimeraz (5U/ μ l)	0,2
dH ₂ O	15,3
cDNA	2
Toplam Hacim	25

Tablo 4.6. PZR optimizasyonu termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95	5 dakika	1
95	10 saniye	30
Değişken*	15 saniye	
72	20 saniye	
72	10 dakika	1
10	15 dakika	

(* 46°C - 61°C arasındaki sıcaklık değerleri kullanılmıştır.)

4.6.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

4. 6.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi

a. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

5x TBE (Tris-HCl, Borik asit, EDTA)

54 gr Trisma Base, 27,5 gr Borik asit ve 20 ml 0,5 M EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) 1000 ml'ye dH₂O ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Ethidium Bromide, EtBr (10 mg/ml)

EtBr, son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde sulandırılarak hazırlanmıştır.

b. Agaroz Jelin Hazırlanması

Jel hazırlığı için öncelikle 2 gr/100 ml olacak şekilde hassas terazide agaroz tartılır. Ana stokta 5X olarak hazırlanmış, dH₂O ilavesiyle 1X olacak biçimde seyreltilmiş olan TBE, 2 gr agarozla son hacim 100 ml olacak biçimde ilave edilir. Hazırlanan bu karışımın ısıtıcıda çözünmesi sağlanır. Çözelti hazırlandıktan sonra bir süre soğuması beklenir, ardından içine 5 µl EtBr eklenir. İyice karıştırılmasının ardından çözelti, donması için jel tablasına dökülerek 25-30 dakika bekletilir.

c. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Görüntülenmesi

Kullanıma hazır hale gelmiş olan %2'lik jel, içinde 1x TBE bulunan agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilir. PZR ürünleri, 5 µl PZR ürünü, 5 µl yükleme boyası ile karıştırılarak mikropipet yardımıyla jele yüklenir ve jel 120 voltta ~30 dakika yürütülür. Ardından jel görüntüleme sisteminde görüntülenir.

4.6.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR)

Hasta örnekleri cDNA'ları ile aşağıdaki protokole uygun olarak yapılmıştır:

- Tüm donmuş reaktanları çözündürülür. Kullanmadan önce kısa bir santrifüjleme yapılır. Tüm reaktanlar çalışma boyunca buz üzerinde muhafaza edilir.
- Tablo 4.7. doğrultusunda reaksiyon karışımı hazırlanır.

Tablo 4.7. qRT-PZR reaksiyon koşulları

Bileşen	Miktar (µl)
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPZR Mix Plus (ROX)	3
Primer F (10 pmol/µl)	0.35
Primer R (10 pmol/µl)	0.35
cDNA	0,5
dH ₂ O	10,8
Total	15

- ✓ Hazırlanan reaksiyon karışım her bir tüpte 15 µl olacak biçimde dağıtılır. Tüplerin ağzı kapatılır.
- ✓ Santrifüj içine tüpler konular ve çok kısa santrifüjlenir.
- ✓ Santrifüjden sonra cihaza tüpler yerleştirilir.
- ✓ Cihaz Tablo 4.8.'de belirtilen termal döngü koşullarına uygun biçimde ayarlanmıştır:

Tablo 4.8. qRT-PZR termal döngü koşulları

Program	Döngü	Analiz Modu	Sıcaklık (°C)	Süre
Program 1	1	Denetürasyon	95	15 dakika
Program 2	45	Amplifikasyon	95	10 saniye
			*Değişken	15 saniye
			72	15 saniye

(* Amplifikasyon basamağındaki değişken sıcaklık her primer çiftine göre farklılık göstermektedir.)

- ✓ Deney protokolünün sonlanması ardından sonuçlar cihazın yazılımında bulunan programlar doğrultusunda analiz edilir.

Tablo 4.3.'da dizi bilgileri verilmiş olan bu primerlerin, yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum bağlanma sıcaklıkları Tablo 4.9.'de mevcuttur:

Tablo 4.9. qRT-PZR'da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları

Gen	Optimum Sıcaklık (°C)
IL8	58
CXCR1	59
CXCR2	59
Beta Actin	58 ve 59

4.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirmesi yapılırken *SPSS 16.0* programı kullanılmıştır. Veriler *Mann-Whitney U* kullanılarak analiz edilmiştir. Nakil öncesi ve nakil sonrası hasta grubu karşılaştırılmıştır. Ayrıca hiç hastalığı olmayan sağlıklı bireylerle hastalıklı bireyler de karşılaştırılmıştır. Yaşa ve cinsiyete göre de ifade düzeylerine bakılmıştır.

5. SONUÇLAR

5.1. RNA İzolasyonu Sonuçları

Tüm örneklerden Roche firmasının RNA izolasyonu protokolü kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir. Bu RNA'ların A260/A280 değerlerine sonraki aşamalarda yapılacak nicel ölçümler sebebiyle özellikle dikkat edilmiş, izole edilen RNA örneklerinde herhangi bir safsızlığın olmamasına özen gösterilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için yapılmış olan Nan drop ölçümleri Tablo 5.1-2-3.'de mevcuttur:

Tablo 5.1. Nakil Sırasında Alınan Hasta Doku Örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

Nakil Hastası	Konsantrasyon (ng/µl)	Faktör	A260/280
1	3,1	40	2,05
2	2	40	1,82
3	3,1	40	2,05
4	2,8	40	1,93
5	2,9	40	1,96
6	4,6	40	2,01
7	2,5	40	1,91
8	8,9	40	2,19
9	8,4	40	2,16
10	2,6	40	1,82
11	5,2	40	1,98
12	2,9	40	1,96
13	2,3	40	1,87
14	3,1	40	2,05
15	2,6	40	1,82
16	3	40	2,01
17	2,4	40	1,86
18	3,4	40	1,97
19	3,5	40	1,92
20	2,1	40	1,81
21	3,1	40	2,06
22	3,4	40	2,13
23	23,9	40	2,06
24	10,2	40	2,13
25	4,2	40	1,85

Tablo 5.2. Nakilden Sonra Kontrol Biyopsi Alınan Hasta Doku Örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

Nakil Hastası	Konsantrasyon (ng/µl)	Faktör	A260/280
1	2,5	40	1,92
2	2	40	1,87
3	1,8	40	1,98
4	1,7	40	1,95
5	1,6	40	1,82
6	1,3	40	1,84
7	6,3	40	2,16
8	2,6	40	1,93
9	3	40	1,89
10	37,4	40	2,14
11	3,7	40	1,97
12	5,2	40	1,81

Tablo 5.3. Kontrol Amaçlı Gelmiş Mesanesinde Sorun Bulunmamış Sağlıklı Birey Doku Örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

Nakil Hastası	Konsantrasyon (ng/µl)	Faktör	A260/280
1	2,1	40	2,03
2	1,1	40	2,19
3	5,6	40	2,07
4	3,4	40	1,89
5	4,8	40	1,92
6	5,2	40	2,02
7	6,7	40	2,08
8	3,5	40	1,94
9	3,2	40	1,97

5.2. cDNA Sentezi İçin Gerekli RNA Miktarları

Çalışmanın nihai hedefi örneklerdeki hedef gen ifade değişikliklerinin tespiti olduğu için, başlangıçtaki transkript sayısının eşit olması büyük önem arz etmektedir. Bu sebeple birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerin her biri, başlangıç RNA miktarı 10 ng/µl olacak biçimde ayarlanmıştır ve sonrasında cDNA

sentezi gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten izolasyon sonucu elde edilen RNA ana stoğundan cDNA sentezi için ne kadar alınması gerektiği *Tablo 5.4 – 5.5 – 5.6.*'da mevcuttur.

Tablo 5.4. 10 ng/ μ l RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

Nakil Hastası	Poly(A) ⁺ mRNA [μ l]	Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer [μ l]	dH ₂ O [μ l]
1.	3,2	1	8,8
2.	5	1	7
3.	3,2	1	8,8
4.	3,5	1	8,5
5.	3,4	1	8,6
6.	2,1	1	9,9
7.	4	1	8
8.	1,1	1	10,9
9.	1,1	1	10,9
10.	3,8	1	8,2
11.	1,9	1	10,1
12.	3,4	1	8,6
13.	4,3	1	7,7
14.	3,2	1	8,8
15.	3,8	1	8,2
16.	3,3	1	8,7
17.	4,1	1	7,9
18.	2,9	1	9,1
19.	2,8	1	9,2
20.	4,7	1	7,3
21.	3,2	1	8,8
22.	2,9	1	9,1
23.	0,41	1	11,59
24.	0,9	1	11,1
25.	2,3	1	9,7

Tablo 5.5. 10 ng/ μ l RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

Kontrol Biyopsi	Poly(A) ⁺ mRNA [μ l]	Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer [μ l]	dH ₂ O [μ l]
1.	4	1	8
2.	5	1	7
3.	5,5	1	6,5
4.	5,8	1	6,2
5.	6,25	1	5,75
6.	7,6	1	4,4
7.	1,5	1	10,5
8.	3,8	1	8,2
9.	3,3	1	8,7
10.	0,2	1	11,8
11.	2,7	1	9,3
12.	1,9	1	10,1

Tablo 5.6. 10 ng/ μ l RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

Sağlıklı Birey	Poly(A) ⁺ mRNA [μ l]	Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer [μ l]	dH ₂ O [μ l]
1.	2,1	1	9,9
2.	1,1	1	10,9
3.	5,6	1	6,4
4.	3,4	1	8,6
5.	4,8	1	7,2
6.	5,2	1	6,8
7.	6,7	1	5,3
8.	3,5	1	8,5
9.	3,2	1	8,8

5.3. qRT-PZR Analiz Sonuçları

Her bir hedef gen için (IL-8, CXCR1, CXCR2, Beta Actin) tasarlanmış primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarının saptanması amacıyla yapılan

optimizasyon PZR'larının ardından elde edilen örnek cDNA'ları ile qRT-PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ifade düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ifadesi değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. İlgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan genin ifade düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir. Bu nedenle farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ifade düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak housekeeping genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak referans genin ifade düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ifade düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır (Bustin ve diğ., 2005).

Çalışmamızda normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ifadesi değişmediği bilinen bir referans gen olarak *beta actin* kullanılmıştır.

5.3.1. Amplifikasyon Eğrileri ve Ortalama Cp Değerleri

Gerçekleştirilmiş olan her qRT-PZR deneyinin sonunda, hedef gene özgü primerlerin örnek cDNA'sı üzerinde uygun bölgelere bağlanması ve bu transkriptin logaritmik olarak artışını gösteren amplifikasyon eğrisi grafikleri oluşmaktadır. Oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber ROX daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışımaya artmaktadır. Bu floresan ışımaların eşik değerini geçtiği döngü sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir. Hastalara ait Cp değerleri 5.7 - 5.8 - 5.9 Tablolarında belirtildiği gibidir:

Tablo 5.7. : Kontrol Hastalarının Cp Değerleri

Hasta No	IL8	Beta	CXCR1	CXCR2	Beta
1.	32,62	26,62	39,96	35,96	26,9
2.	36,97	26,41	37,88	34,88	26,44
3.	31,16	26,28	34,12	33,06	26,6
4.	30,1	26,52	38,86	32,74	26,86
5.	39,39	26,87	33,18	30,77	26,76
6.	30,76	26,57	34,74	31,03	26,51
7.	39,86	26,17	36,71	32,62	26,67
8.	36,82	26,96	34,3	31,69	26,24
9.	34,82	26,12	39,69	34,69	26,31
10.	39,37	26,24	36,67	33,24	26,45
11.	33,34	26,6	37,24	33,64	26,84
12.	38,37	26,96	35,27	31,04	26,41

Tablo 5.8. : Sağlıklı Bireylerin Cp Değerleri

Hasta No	IL8	Beta	CXCR1	CXCR2	Beta
1.	32,12	26,51	27,94	27,6	26,44
2.	35,01	26,38	29,55	26,88	26,76
3.	30,12	26,85	28,61	27,03	26,84
4.	32,06	26,74	28,52	27,35	26,88
5.	34,17	26,71	29,67	28,63	26,08
6.	33,53	26,31	27,15	26,84	26,85
7.	32,47	26,06	29,49	28,26	26,12
8.	31,25	26,15	27,15	26,96	26,38
9.	30,94	26,84	28,26	27,85	26,92

Tablo 5.9. : Hasta Bireylerin Cp Değerleri

Hasta No	IL8	Beta	CXCR1	CXCR2	Beta
1.	12,84	26,61	19,13	19,41	26,04
2.	11,76	26,36	18,66	18,94	26,37
3.	15,21	26,82	18,06	18,98	26,88
4.	11,61	26,3	18,13	18,57	26,08
5.	15,24	26,15	20,2	20,33	26,92
6.	15,53	26,96	19,6	20,66	26,49
7.	16,56	26,54	20,94	21,96	26,38
8.	12,41	26,83	20,13	20,41	26,92
9.	11,95	26,57	18,28	18,88	26,73
10.	13,46	26,92	20,51	20,96	26,9
11.	17,34	26,82	19,22	19,95	26,38
12.	18,9	26	20,04	20,63	26,92
13.	10,24	26,21	20,45	20,59	26,32
14.	10,42	26,76	19,48	19,73	26,69
15.	11,8	26,51	20,97	21,75	26,59
16.	11,43	26,67	23,9	21,14	26,14
17.	12,9	26,53	22,37	23,08	25,97
18.	15,76	26,62	19,04	21,23	26,08
19.	11,36	26,26	21,47	22,65	26,22
20.	18,71	26,38	23,13	24,05	26,12
21.	15,64	26,31	20,08	22,58	26,85
22.	13,57	26,45	21,52	23,94	26,12
23.	11,12	26,84	19,27	20,62	26,52
24.	10,31	26,41	19,26	19,93	26,74
25.	14,62	26,39	19,65	20,94	26,86

5.3.2. Gen İfade Değişikliği Oranlarının Hesaplanması ve Sonuçları

Gen ifade değişikliği oranlarının hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır. Bu formül amplifikasyon etkinliği değeri olan E değerini 2 olarak reaksiyon etkinliğinin %100 olduğunu kabul eder. Formülün açık hali aşağıdaki gibidir:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{Hedef Gen} - \Delta Ct_{Referans Gen})}$$

Bu formül doğrultusunda hesaplanan gen ifadesi değişim oranları, daha sonra log2 tabanına çevrilmiştir. Bunun yapılmasının sebebi, bu değişimlerinin ifade ediliş biçimlerini kolaylaştırmaktır. Her bir hedef gen için örneklere ait gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanındaki karşılıkları Tablo 5.10-11-12’de mevcuttur.

Tablo 5.10. Nakilden sonra kontrol biyopsi alınan hasta doku örneklerinin gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log2 tabanındaki karşılıkları

Hasta No	IL8	CXCR1	CXCR2
1	6	4	9,06
2	10,6	3	8,44
3	4,88	1,06	6,46
4	3,58	6,12	5,88
5	12,5	2,41	4,01
6	4,19	3,71	4,52
7	13,7	4,09	5,95
8	9,86	2,61	5,45
9	8,7	5	8,38
10	13,1	3,43	6,79
11	6,74	3,6	6,8
12	11,4	4,23	4,63

Tablo 5.11. Nakil sırasında alınan hasta doku örneklerinin gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log2 tabanındaki karşılıkları

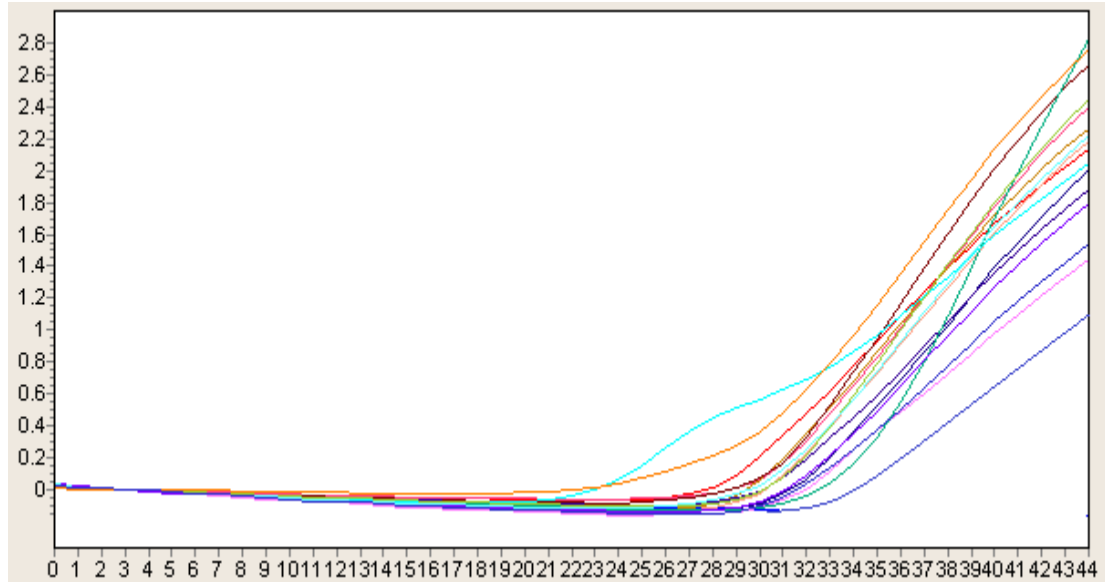
Hasta No	IL8	CXCR1	CXCR2
1	-13,8	-6,91	-6,63
2	-14,6	-7,71	-7,43
3	-11,6	-8,82	-7,9
4	-14,7	-7,95	-7,51
5	-10,9	-6,72	-6,59
6	-11,4	-6,89	-5,83
7	-9,98	-5,44	-4,42
8	-14,4	-6,79	-6,51
9	-14,6	-8,45	-7,85
10	-13,5	-6,39	-5,94
11	-9,48	-7,16	-6,43
12	-7,1	-6,88	-6,29
13	-16	-5,87	-5,73
14	-16,3	-7,21	-6,96
15	-14,7	-5,62	-4,84
16	-15,2	-2,24	-5
17	-13,6	-3,6	-2,89
18	-10,9	-7,04	-4,85
19	-14,9	-4,75	-3,57
20	-7,67	-2,99	-2,07
21	-10,7	-6,77	-4,27
22	-12,9	-4,6	-2,18
23	-15,7	-7,25	-5,9
24	-16,1	-7,48	-6,81
25	-11,8	-7,21	-5,92

Tablo 5.12. Kontrol amaçlı gelmiş mesanesinde sorun bulunmamış sağlıklı birey doku örneklerinin gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log2 tabanındaki karşılıkları

Hasta No	IL8	CXCR1	CXCR2
1	5,6	0,34	1,16
2	8,6	2,67	0,12
3	3,3	1,58	0,19
4	5,3	1,17	0,47
5	7,5	1,04	2,55
6	7,2	0,31	-0,01
7	6,4	1,23	2,14
8	5,1	0,19	0,58
9	4,1	0,41	0,93

Gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanına göre karşılığı olan değerlerin negatif olması, ilgili örnekte hedef gen ifadesinin azaldığını; değerlerin pozitif olması ise, hedef gen ifadesinin artmış olduğunu göstermektedir.

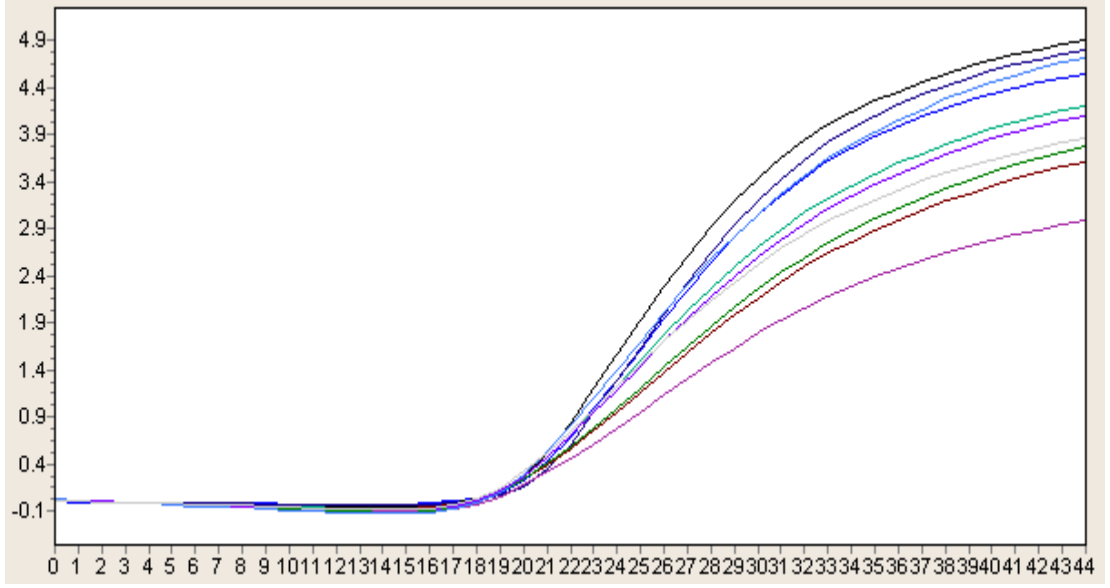
Cp Değeri



Şekil 5.1. IL-8 amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 58°C)

Döngü sayısı

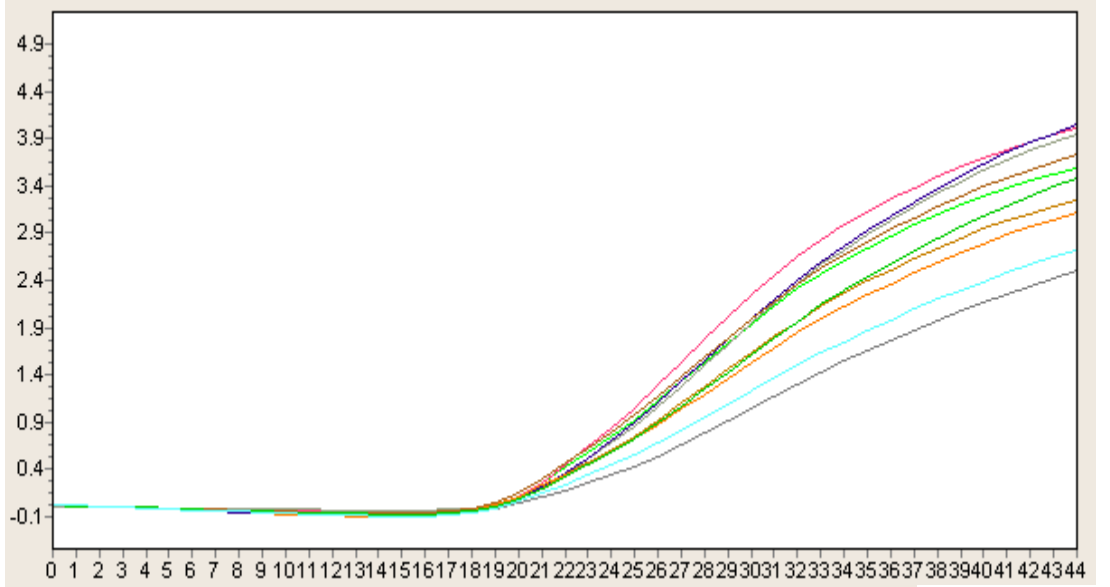
Cp Değeri



Şekil 5.2. CXCR1 amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 59°C)

Döngü sayısı

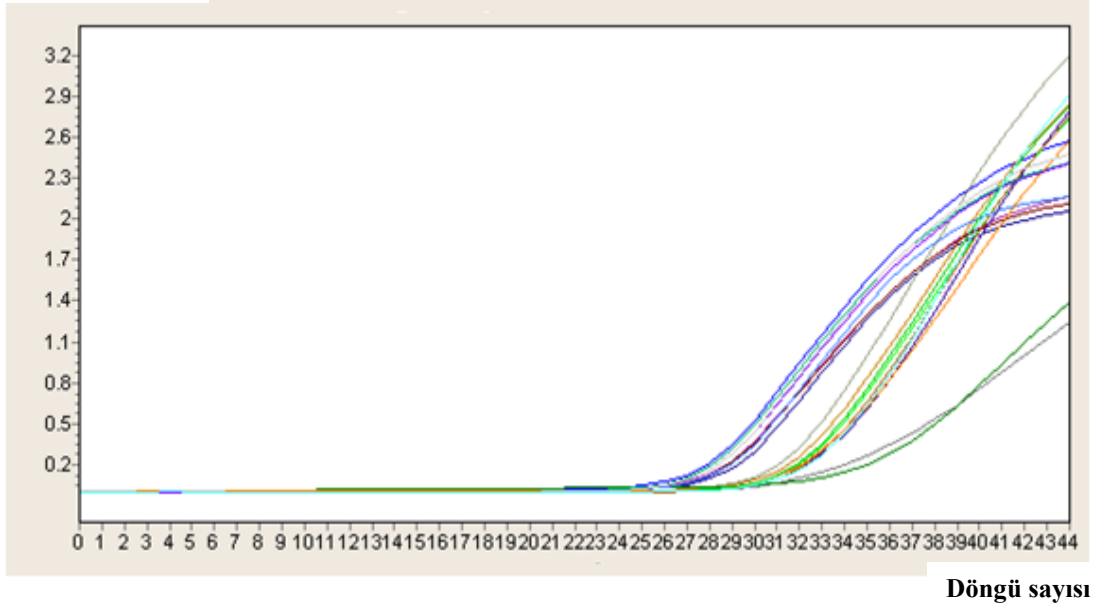
Cp Değeri



Şekil 5.3. CXCR2 amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 59°C)

Döngü sayısı

Cp Değeri



Şekil 5.4. Beta Aktin amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 58-59°C)

5.3.3. İstatistiksel Analiz sonuçları

Nakil öncesi ve sonrası bireyler karşılaştırıldığında;

Yapılan ki-kare analizinde IL-8($p \leq 0,05$), CXCR1($p \leq 0,05$), ve CXCR2($p \leq 0,05$), İfadeleri anlamlı olarak farklı bulunmuştur. İnternal kontrol geni Beta aktin ifadesinin farklılık göstermediği saptandı. Cinsiyete göre(Kadın Erkek); IL-8, CXCR1 ve CXCR2 İfadelerinde anlamlı değişiklik saptanmadı. Ancak Yaşı 40 tan büyük ve küçük olanlarda sadece CXCR1($p \leq 0,05$), ifade düzeyinin anlamlı olduğu saptandı.

Tamamlayıcı İstatistiksel analiz sonuçlarına göre en düşük ve en yüksek ifade seviyeleri;

Tablo 5.13. Tanımlayıcı istatistiksel analiz sonuçlarına göre en düşük ve en yüksek Cp değerleri

Gen	Cp Değeri
IL 8	10,24+/- 39,86
CXCR1	18,06 +/- 39,96
CXCR2	18,57+/- 35,96
Beta Actin	25,97+/-26,92

Nakil öncesi ve sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında;

IL-8, CXCR1 ve CXCR2 ifadelerinde anlamlı olarak farklılık bulunmuştur. Internal kontrol geni Beta aktin ekspresyonunun farklılık göstermediği saptandı.

Tablo 5.14. Nakil öncesi ve sağlıklı bireylerde p değerleri

Nakil öncesi	Sağlıklı Bireyler
IL 8	0.017*
CXCR1	0.025*
CXCR2	0.029*
Beta Actin	0.25

(*p<0.05 ise anlamlı)

Nakil Sonrası ve sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında;

CXCR1 ve CXCR2 ifadelerinde anlamlı olarak farklılık bulunmuştur. Ancak IL-8 ve internal kontrol geni Beta aktin ifadesinin farklılık göstermediği saptandı.

Tablo 5.15. Nakil sonrası ve sağlıklı bireylerde p değerleri

Nakil Sonrası	Sağlıklı Bireyler
IL 8	0.19
CXCR1	0.034*
CXCR2	0.018*
Beta Actin	0.26

(*p<0.05 ise anlamlı)

6. TARTIŞMA

Renal transplantasyon, günümüzde son dönem böbrek yetmezliği hastalarının tedavisinde, yalnızca yaşam süresini uzatmasıyla değil, aynı zamanda yaşam kalitesini artırması, diyaliz tedavileriyle ilişkili morbiditenin ortadan kalkması ve uzun vadede daha düşük maliyetiyle de başlıca tedavi seçeneğidir (Wolfe ve diğ, 1999). Nakil öncesi ve sonrası gen düzeyinde yapılan araştırmalar enfeksiyon riskini azaltma yönünde olumlu gelişme olduğu sayılabilir.

Renal transplantasyon, diğer tedavi modelleriyle kıyaslandığında üstün olsa da, kendine has sorunlar taşıdığı, kullanılan immünsupresif tedavilerin yan etkilerinin olduğu gerçekleri göz ardı edilmemelidir. Böbrek nakli yaygınlaştıkça, nakil sonrası yaşanan sorunların da artması, yeni arayışlara yol açmıştır. Bu arayış ve araştırmalar transplantasyon sonrası problemleri asgariye indirmek, transplantasyon tedavisinin başlıca hedeflerinden olmalıdır ki, bunu sağlamanın başlıca yollarından birisi de gen düzeyinde araştırmalar yapmak sayılabilir.

Nakil sırasında alınan idrarla yüzleşmemiş mesane dokusunda ifade düzeylerine bakıldığında IL-8 CXCR1 ve CXCR2 ifadelerinde kontrole göre belirgin bir azalma olduğu saptanmıştır(Tablo 5.11) Ancak nakilden 1 ay sonra kontrol amaçlı gelen hastaların idrarla karşılaşmamış mesane dokularındaki ifade düzeylerine bakıldığında IL-8, CXCR1 ve CXCR2 ifade düzeylerinde kontrole göre belirgin bir artış saptanmıştır(Tablo 5.10).

Ürolojik rahatsızlık nedeniyle gelen ancak herhangi bir hastalığı bulunmayan sağlıklı bireylerin mesane dokularındaki ifade düzeyleri araştırıldığında kontrole göre artış gözlemlenmiştir(Tablo 5.12)

Bulgularımız gösteriyor ki IL-8, CXCR1 ve CXCR2 nin hücre sağkalımıyla ilişkilidir. Çünkü idrarla yüzleşmemiş mesane dokularında hücre ölümü gerçekleşmiş dolayısıyla gen ifadelerinde azalma saptanmıştır. Stephanie ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2009) hücre sağkalımının ağırlıklı olarak IL-8 ve CXCR1 ile ilişkili olduğu, CXCR2 ile ilişkili olmadığı saptanmıştır. Ancak bizim çalışmamız CXCR2'nin de hücre sağkalımıyla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Mesanenin nakil sonrası idrarla yüzleşmesi sonucu, idrarda bulunan büyüme faktörleri ve diğer faktörler üreteriyumun eski aktivitesine dönmesini sağlamış ve

hücre sağkalımı artarak kemokin faktörlerinde artış olduğu saptanmıştır. Buradan anlaşılıyor ki idrar mesane için çok önemli yaşam faktörüdür.

7. KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Effectör mechanisms of T cell mediated immun reactions*. In Cellular and molecular Immunology. 3rd ed. USA: WB Saunders Company 1997;13:286.

Alam R. *Chemokines in cell movement and infammation*. Middleton's Allergy. 6th ed. USA: Mosby 2003; 164-165, 138-139, 205,

Andreoli TE Evanoff GV, Ketel BL, Shah SV, Walker PD. *Kronik Böbrek Yetersizliği*. (Çeviri: Ülkü U.) Cecil Essentials of Medicine. Türkçesi.Tuzcu M (ed).Yüce Yayınları, İstanbul, 1995: s 244-254.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol 15: 675–705, 1997.

Baggiolini M, Loetscher P. *Chemokines in inflammation and immunity*. Immunol Today 2000;21:418-20.

Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, Moser B, Baggiolini M. *Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 3574-7.

David R, achova Z, Beck-Sickinger AG. *Semisynthesis and application of carboxyfluorocin-labelled biologically active human interleukin-8*. Biol Chem. 2003;384:1619-30.

G. Godaly, G. Bergsten, L. Hang, H. Fischer, B. Frende' us, A.-C. Lundstedt, M. Samuelsson, P. Samuelsson, and Catharina Svanborg, *Neutrophil recruitment, chemokine receptors, and resistance to mucosal infectio*. Journal of Leukocyte Biology Volume 69, June 2001.

Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ et al. *A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor*. Science 1993;261:1182-4.

IJD, Westwick J, Kunkel SL. *Nomenclature announcement- the chemokines*. Immunol Today 1993; 14:24.

Khandelwal P, Abraham SN, and Apodaca G, *Cell biology and physiology of the uroepithelium*. Am J Physiol Renal Physiol 297: F1477–F1501, 2009.

Ko YC, Mukaida N, Ishiyama S. *Elevated, interleukin-8 levels in the urine of patients with urinary infections*. Infect Immun 61: 1304–1314, 1993.

Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. *Role of Rho in chemoattractant-activated leucocyte adhesion through integrins*. Science 1996;271:981-3.

Lewis SA. *Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask*. Am J Physiol Renal Physiol 2000;278: F867-F874

Lodi PJ, Garrett DS, Kuszewski J, Tsang ML, Weatherbee JA, Leonard WJ et al. *High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 by multidimensional NMR*. Science 1994;263:17627.

Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser M. *Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes.* J Exp Med 1996;184:569-77.

Luster AD, Greenberg SM, Leder P. *The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor-4 and inhibits endothelial cell proliferation.* J Exp Med 1995;182:219-31.

Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. *Gamma interferon transcriptionally regulates an early response gene containing homology to platelet proteins.* Nature 1985;315:672-6.

Luster AD. *Chemokines-chemotactic cytokines that mediated inflammation.* N Engl J Med 1998; 338: 436-45.

Newman J, Antonakopoulos GN. *The fine structure of the human fetal urinary bladder development and maturations light, transmission and scanning electron microscopic study.* J Anat 1989; 166: 135-150

Oppenheim JJ, Ruscetti FW. *Cytokines.* In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Medical Immunology. 9th ed. USA: Appleton & Lange 1997;10:162-164.

Parham P. *The Immune System.* Londra 2000 :Garland Publishing 2000; 216.

Rigatto C: *Clinical epidemiology of cardiac disease in renal transplant recipients.* Semin Dial 16:106-110, 2003.

Rollins BJ. *Chemokines.* Blood 1997;90:909-928

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. *Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells.* Science 1997;277:2005-7.

Sehgal AR. *What is the best treatment for endstage renal disease?* Am J Med 2002; 112:735- 736

Sica A, Saccani A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W et al. *Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes.* J Exp Med 1997;185:969-74.

Stephanie Tseng-Rogenski and Monica Liebert. *Interleukin-8 is essential for normal urothelial cell survival.* Am J Physiol Renal Physiol 297: F816–F821, 2009.

Tanagho EA, Miller ER, Lyon RP, Fisher R. *Spastic striated external sphincter and urinary tract infection in girls.* Br J Urol 1971; 43(1): 69-82.

Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. *T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1.* Nature 1993;361:79-82

Türk Nefroloji Derneği Registry Raporu, 2007.

US Renal Data System: USRDS 2005 Annual Data Report. *The National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2005.*

Wenzel UO, Stahl RAK. *Chemokines, Renal Disease, and HIV Infection Nephron*. 1999;81:5-16.

Wenzel UO, Stahl RAK. *Chemokines, renal disease, and HIV infection*. *Nephron* 1999;81:5-16

Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL. *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant*. *N Engl J Med* 341: 1725, 1999.

Wu X-R, Medina J.T, and Sun T-T. *Selective interactions of UPla and UPlb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane domain protein in differentiated urothelial cells*. *J Biol Chem* 1995: 270; 29752-29759

8- ÖZGEÇMİŞ

Kaan GÜNDOĞDU, 12.02.1984 tarihinde Bulanık' ta doğdu. 2003 yılında İstanbul Kocatepe Mimar Kemal YDL Lisesi' nden mezun olduktan sonra 2004 yılında Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü' nde başladığı yüksek öğrenimini 2010 yılında tamamladı.

Yüksek lisans eğitimine 2011 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne girerek devam etti.