ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin KOÇ

SKLERODERMA HASTALARINDA BMPR2 EKSPRESYONUNUN REALTİME PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI VE HASTALARIN KLİNİK SEYRİ İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SKLERODERMA HASTALARINDA BMPR2 EKSPRESYONUNUN REALTİME PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI VE HASTALARIN KLİNİK SEYRİ İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Yasemin KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Bu tez 16/12/2011 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

……..	…….	……... ……...
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ	Prof. Dr. Burhan ARIKAN	Doç.Dr. Fatih MATYAR
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2010YL5

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 Sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SKLERODERMA HASTALARINDA BMPR2 EKSPRESYONUNUN REALTİME PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI VE HASTALARIN KLİNİK SEYRİ İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Yasemin KOÇ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Yıl: 2011, Sayfa: 67
Jüri : Prof.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Prof.Dr. Burhan ARIKAN
: Doç.Dr. Fatih MATYAR

Skleroderma, ilk kez 18. yüzyılda tarif edilmiş, nadir görülen kronik bir bağ dokusu hastalığıdır. BMPR2 (*bone morphogenetic protein receptor type II*) genindeki mutasyonların hastalığın seyrini etkilediği bildirilmektedir.

Bu çalışmada; skleroderma hastalarında, Real Time PCR analizi ile BMPR2 geninin ekspresyon düzeyleri saptanarak hastalığın klinik seyri ile ilişkisi ortaya konmaya çalışılmıştır.

Ç.Ü. Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji kliniğinde skleroderma tanısı almış 20 ve sağlıklı 29 birey bu çalışmaya dahil edilerek kanları alınmıştır. Lökosit hücrelerinden izole edilen m-RNA'ya komplementer c-DNA dönüşümü yapılarak, Real Time PCR ile DNA amplifikasyonu yapılmıştır. BMPR2 genindeki ekpresyon düzeyini saptayabilmek amacıyla referans gen olarak beta actin geni seçilmiştir.

Kontrol grubunda gen ekspresyon düzeyleri ortalaması 0,0023875883 (*yaklaşık %0,2*), hasta grubunda bu değer 0,0007295126 (*yaklaşık %0,07*) şeklinde belirlenmiştir. Hastaların ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre yaklaşık %0,13 düzeyinde azalmıştır. Çalışmaya dahil edilen 20 hastanın 4 tanesinde (%20) PAH (pulmoner arteriyel hipertansiyon) geliştiği saptanmış ve bu hastaların gen ekspresyon düzeyi 0.001 (*yaklaşık %0.1*) bulunmuştur. PAH'lı hastaların gen ekspresyon düzeyi, çalışmada incelenen diğer hastalara oranla yaklaşık %0,03 oranında artmıştır.

Sonuç olarak BMPR2 gen ekspresyon düzeyi skleroderma hastalarında, bireyden bireye değişkenlik göstermiş ama kontrole göre azalmış, PAH'lı hastaların hepsinde, diğer hastalara oranla yüksek bulunmuşltur.

Anahtar Kelimeler: Skleroderma, BMPR2 geni, beta actin geni, PAH

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION OF BMPR2 EXPRESSION WIA REALTIME PCR METHOD IN SCLERODERMA PATIENTS AND ASSOCIATION WITH THE CLINICAL COUISE OF PATIENTS

Yasemin KOÇ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Year: 2011, Pages: 67
Jury : Prof.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Prof.Dr. Burhan ARIKAN
: Assoc.Prof.Dr. Fatih MATYAR

Scleroderma is a rarely seen chronic collagen tissue disease which has been fist described in 18 th century. It is indicated that the mutations in BMPR 2 (*bone morphogenetic protein receptor type II*) gene affected the course of disease.

In this study; the determination of BMPR 2 gene expression levels via Real Time PCR and its association with the clinical course in scleroderma patients were revealed.

20 scleroderma diagnosed and 29 healthy individuals were added to this study and their blood samples were taken at Çukurova University Medicine Faculty, Department of Internal Diseases, Clinic of Rheumatology. Performing the transformation of c-DNA complementer to m-RNA isolated from leucocyte cells, DNA amplification was carried on via Real Time PCR. To determine the expression level in BMPR 2 gene, beta actin gene was selected as the reference gene.

In control group average levels of gene expression were established as 0, 0023875883 *(approximately %0,2),* in patient group that was 0,0007295126 (*approximately %0,07).* Expression level of the patients decreased approximately %0,13 when it was compared with the control group PAH (pulmonary arterial hypertension) improvement was seen in 4 patients (%20) from 20 patients added to this study and the gene expression level of this patients was found to 0,001 *(approximately %0,1).*The gene expression level of patients increased approximately %0.03 in proportion to other patients examined in this study.

Consequently, in scleroderma patients BMPR2 gene expression level showed changes from person to person but decreased by comparison to control, in all the PAH patients that was found high by comparison to other patients.

Key Words: Scleroderma, BMPR2 gene, beta actin gene, PAH

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e, Ç.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Süleyman ÖZBEK'e bu çalışmanın hayata geçirilebilmesi için gerekli koşulları sağlaması ve her türlü desteği için özellikle teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı sayın Akın YİĞİN'e, sevgili Mehmet KURUL'a sevgili Cengiz TAYLANCI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı sevgili Gökhan TÜCCAR'a, sevgili Dilek POLAT'a ve sevgili Deniz TANRISEVER'e teşekkür ederim.

Hayatımın hiçbir anında manevi desteğini esirgemeyen, yaptığım bütün işlerde bana inancını hiçbir zaman kaybetmeyen değerli annem Zümrüt KOÇ'a, babam Şaban KOÇ'a, kardeşlerim Serdar KOÇ ve Serkan KOÇ'a teşekkür ederim.

Tüm çabalarım sırasında sabrını, anlayışını ve ilgilisini esirgemeyen canım eşim Hakan TÜCCAR'a ve eşimin ailesine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ …..……...I
ABSTRACT …..……..II
TEŞEKKÜR ..…….III
İÇİNDEKİLER …….…….IV
ÇİZELGELER DİZİNİ …….……VI
ŞEKİLLER DİZİNİ ...……..VIII
KISALTMALAR.....X
1. GİRİŞ …….……..1
1.1. Skleroderma(Sistemik skleroz).....1
1.1.1. Epidemiyoloji..…….....2
1.1.2. Sklerodermanın Tipleri.....……..…….....2
1.1.2.1. Sistemik Skleroderma…….....2
1.1.2.2. Bölgesel (Lokalize) Skleroderma…….....4
1.1.2.3. Sklerodermanın Diğer Tipleri…….....4
1.1.3. Skleroderma Klinik Bulgular…….....5
1.1.4. Skleroderma Tedavi…….....9
1.2.Genetik Dayanağı.....……..…….……9
1.2.1. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon……..……....9
1.2.1.1. Pulmoner Dolaşım……...…….....9
1.2.1.2. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Tanımı…...….....11
1.2.1.2.(1). Pulmoner Arteriyel Hipert. Genetik Dayanağı….14
1.2.2. Genetik Materyal…….....15
1.2.2.1. DNA Sentezi……...…….....16
1.2.2.2. Gen Ekspresyonu ve Protein Sentezi……..…….....16
1.2.2.3. c-DNA Sentezi…….....19
1.2.2.4. Housekeeping Gen (Referans Gen)……...……..….....20
1.2.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)……...……..…...20
1.2.4. Real-Time PCR……...……...……...23
1.3. Çalışmanın Amacı.....24

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR ……..……..…...25
3. MATERYAL VE METOD ….……...…….....….29
3.1. Materyal …...…….....29
3.2. Metod …….....31
3.2.1. Örnek Toplama…….....31
3.2.2. Kan Örneklerinden Lökositlerin Ayrılması…..….....31
3.2.3. mRNA İzolasyonu…….....32
3.2.4. c-DNA Sentezi…….....….….....34
3.2.5. Real-Time PCR Aşaması…….....36
3.2.5.1. Ekspresyon Çalışması İçin İzlenilen Yöntem…..….....37
3.2.6. Taqman Prob Yöntemi.....40
3.3. Verilerin Analizi…….....41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA …...……...……...……43
4.1. Beta Actin (Housekeeping Gen, Referans Gen) ve BMPR2
Geninin Ekspresyon Bulgularının Değerlendirilmesi.....43
4.1.1. Beta Actin Gen Ekspresyonu Bulguları…….....44
4.1.2. BMPR 2 Gen Ekspresyonu Bulguları…….....46
4.1.3. BMPR 2 Gen Ekspresyon Bulgularının Referans Gen İle
Oranlanması.....47
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ……...…55
6. KAYNAKLAR ……..…59
ÖZGEÇMİŞ ……..……...….67

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Pulmoner hipertansiyonun klinik sınıflaması 13
Çizelge 3.1. c-DNA protokolü 36
Çizelge 3.2. Realtime PCR protokolü.....38
Çizelge 4.1. Skleroderma hasta grubu realtime PCR ekspresyon sonuçları 49
Çizelge 4.2. Kontrol grubu realtime pcr ekspresyon sonuçları..... 51**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Skleroderma hastası genel görünüm 1
Şekil 1.2. Skleroderma hastası ellerdeki gergin görünüm 2
Şekil 1.3. Daralan damarlar ve parmaktaki kan akım yavaşması görünüm.....5
Şekil 1.4. Pulmoner arterierler genel görünüm 10
Şekil 1.5. BMPR 2 geni intron- exon bölgeleri.....15
Şekil 1.6. RNA sentezi.....18
Şekil 1.7. Protein sentezi.....19
Şekil.3.1. Çalkalayıcı (shaker) cihazı 29
Şekil 3.2. Vorteks cihazı 30
Şekil 3.3. Eppendorf santrifüj cihazı 30
Şekil 3.4. Lightcycler 480 realtime PCR cihazı 30
Şekil 3.5. Lökosit ayrımı şeması ..... 32**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
Şekil 3.6. mRNA izolasyon şeması ..... 33**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
Şekil 3.7. c-DNA sentez şeması 35
Şekil 3.8. Taqman Prob Metodu.....39
Şekil 3.9. Polimerizasyon 40
Şekil 4.1. Standart eğri grafiği 45
Şekil 4.2. Örneklerin Beta actin geni amplifikasyon eğrileri ve crossing point sonuçlarına göre konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi.....45
Şekil 4.3. Örneklerin BMPR 2 geni amplifikasyon eğrileri ve crossing point sonuçlarına göre konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi.....46
Şekil 4.4. Örneklerin Beta actin geni ve BMPR 2 amplifikasyon eğrileri ve crossing point sonuçlarına göre konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi.....48

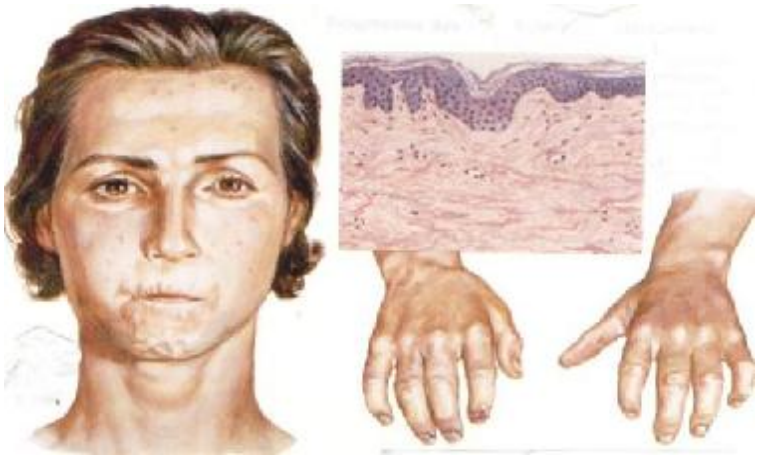
KISALTMALAR

BMPR 2 : Bone morphogenetic protein receptor 2
G6PDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas
DT : Thymidine nükleotidi
SSC : Sistemik Skleroz
TNF : Tümör nekroz faktör
IL : İnterlökin
ANA : Anti-Nüklear Antikorlar
U3 RNP : Anti-fibrillarin
PAH : Pulmoner arteriyel hipertansiyon
ALK-1 : Activin receptor-like kinase 1 gene
HIV : Human immunodeficiency virus
hnRNA : Heterojen nüklear RNA
PCR : Polimerase chain reaction
VEGF : Vasküler endotel büyüme faktörü
PPH : Primer pulmoner hipertansiyon
FPAH : Pulmoner arteryel hipertansiyon
FRET : Fluoresance resonance energy transfer
CP : Crossing point
RF : Reynaud fenomeni

1.GİRİŞ

1.1. Skleroderma (Sistemik Skleroz)

İsmini Yunanca sert anlamına gelen "sklerozis" ve deri anlamına gelen "derma" dan alan Sistemik Skleroz (SSc), kollajen ve diğer bağ dokusu makromoleküllerinin deride ve çeşitli organlarda aşırı birikmesiyle tanımlanan, kaynağı bilinmeyen, kompleks, çok kökenli, otoimmün bir bağ dokusu hastalığıdır (Dulkin, 2001). Skleroderma, ilk kez 18. yüzyılda tarif edilmiş olan, nadir görülen kronik (süreğen) bir bağ dokusu hastalığıdır. Bağ dokusu eklemlerin etrafında, damarlarda, iç organlarda ve ciltte bulunan, destek sağlayan bir dokudur. Bilinen ilk skleroderma hastasına, 1754 yılında Napoli'de Dr. Carlo Curzio tarafından tanı konulmuştur (http://www.romatizmadoktorum.com).



Şekil 1.1. Skleroderma hastası genel görünüm (www.romatizmadoktorum.com).

Hastalığın patogenezi net olarak bilinmemektedir. Ancak, immün aktivasyon ve vaskülopati patogenezde önemli roller almaktadır (Kerieg ve Meurer, 1988; LeRoy ve ark, 1988). Skleroderma hastalarının deri biyopsilerinde T lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar basta olmak üzere inflamatuar hücre infiltrasyonu saptanmıştır (Gu ve ark, 2008). Ek olarak, skleroderma hastalarında tümör nekroz faktör alfa (TNF-α), interlökin (IL)-2, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin

serum düzeylerinin yükseldiği ve deri tutulumunun şiddeti ile korele olduğu gösterilmiştir (Needleman ve ark,1992).

1.1.1. Epidemiyoloji

Hastalık en sık 30-50 yaslarında görülmektedir (Keng ve ark, 2003). Kadın:erkek oranı 8:1'dir (Mayes, 1996). Amerika Birleşik Devletleri'nde erişkin popülasyonda skleroderma insidans ve prevalansı sırasıyla milyonda 19.3 ve 242 olarak bildirilmiştir (Mayes ve ark, 2003). Skleroderma sıklığının en yüksek olduğu bir Amerikan yerli popülasyonu olan kızıl millet (Choctaw)'lerde 469/100.000 olarak rapor edilmiştir (Arnett ve ark, 1996).

1.1.2. Sklerodermanın Tipleri

Sklerodermanın, sistemik ve bölgesel olmak üzere iki ana tipi mevcuttur (Dunkin, 2001; Medsger ve Koopman, 2000).

1.1.2.1. Sistemik Skleroderma

Sistemik skleroderma, hastalarda görünen bulgulara dayanarak CREST sendromu olarak da adlandırılır. CREST sendromu ismini bulguların baş harflerinden almıştır. Bu bulgular aşağıdaki gibidir (Dunkin, 2001).



Şekil 1.2. Skleroderma hastası ellerdeki gergin görünüm; ellerdeki deri gerilerek hareketi kısıtlar (www.drlawrencejaeger.com).

Kalsinoz kutis (Calcinosis): Özellikle parmak uçlarında (nadiren el, yüz ve dirseklerde) olmak üzere bağ dokusunda aşırı kalsiyum birikimi ve plaklaşma olur. Bu plaklar ülsere yol açacak şekilde vücuttan atılabilir (Medsger ve Koopman, 2000).

Reynaud fenomeni (Reynaud's fenomenia): Genel populasyondaki oranı %3-5 gibi yüksek bir frekansa sahiptir (Dunkin, 2001). Sistemik sklerozlu hastaların %75'i ve sınırlı sklerodermalıların neredeyse tamamı Reynaud fenomeni (RF) ile başlar. Parmaklarda, tırnaklarda, kulaklarda ve hatta burundaki küçük kan damarlarında daralma gözlenir (Belch, 1991).

Özofagal fonksiyon bozukluğu (Esophageal dysfunction): Özefagustaki düz kasların normal hareketlerini kaybetmeleri nedeni ile özefagusta yutkunma zorluğu ile tanımlanır (Medsger ve Koopman, 2000).

Sklerodactili (Sclerodactyly): Deri altında aşırı kollajen birikimi nedeniyle parmaklardaki derinin aşırı sıkılaşması ve kalınlaşması, kemiklerin sivrilerek şekillerinin bozulması olarak tanımlanır. Bu durum parmaklarda hareket kaybına neden olur. Deri tüy kaybıyla birlikte koyu ve parlak gözükür (Dunkin, 2001; Medsger ve Koopman, 2000).

Telanjiektazi (Telangiectasias): Kılcal kan damarlarındaki şişme nedeni ile elde yüzde küçük kırmızı noktalar oluşması ile tanımlanır (Medsger ve Koopman, 2000).

Sistemik Skleroderma deri, kan damarları veya iç organlar gibi vücudun herhangi bir bölümünde oluşabilir. 3 alt tipi vardır; yaygın (diffuse), sınırlı (limited) ve çakısan (overlap) (Richart ve ark, 1991).

Yaygın Sistemik Skleroderma: Hastalarının yaklaşık %95'inde genellikle eller, kollar ve yüz olmak üzere ciltte sıkılaşma, kalınlaşma görülür. Sistemik Sklerozun bu tipinde deri tutulumuna ek olarak; akciğerler, kalp, böbrekler ve tüm sindirim sistemi gibi birçok doku ve sistemide etkilenebilir (Richart ve ark, 1991).

Sınırlı Skleroderma: Sınırlı skleroderma genellikle ellerin tutulumu ile tanımlanır. Raynaud's fenomeni ve özofagus problemleri hastalığa eşlik eder. İç organ tutulumu çok nadirdir ve sklerodermanın hafif formu olarak kabul edilir (Richart ve ark, 1991).

Çakışan (Overlab) Skleroderma: Sistemik Skleroderma (Sınırlı ya da Yaygın) bir başka bağ dokusu hastalığının (örn: Sistemik Lupus Eritematozis, Polymyozit, Dermatomyozit) bir veya birkaç belirtisiyle birlikte görülürse 'Çakışan Skleroderma' adını alır (Richart ve ark, 1991).

1.1.2.2. Bölgesel (Lokalize) Skleroderma

Bölgesel formları Morphea ve Çizgisel olarak ikiye ayrılır. Bu formlar genelde deriyi, çok nadir olarak deri altı dokularını tutarlar fakat iç organları tutmadığı gibi hastanın ömrünü kısaltmadıkları belirtilmektedir (Richart ve ark, 1991).

Morphea Skleroderma: Morphea Yunanca biçim veya yapı demektir. Morphea Skleroderma genellikle sarı veya fildişi rengi, katı, kuru deri yamaları şeklinde başlar. Bunlar sonradan sertleşir, hafifçe çukurlaşır, oval şekilli plaklar oluşturur. Bu plakların etrafında da pembe bir halka oluşur.

Çizgisel Skleroderma: Çizgisel Skleroderma altındaki kas ve kemikleri de etkileyebilen çizgi şeklinde derinin kalınlaşmasıdır. Böylelikle etkilenen eklemlerin ve kasların hareketlerini kısıtlar. En çok kollar, bacaklar ve alın tutulur. Aynı anda birden fazla bölgeyi tutabilir (Richart ve ark, 1991).

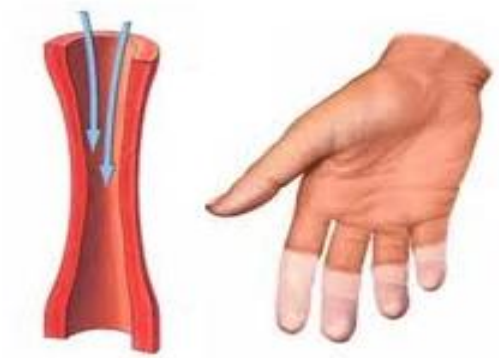
1.1.2.3. Sklerodermanın Diğer Tipleri

Juvenil Skleroderma: Sklerodermanın herhangi bir tipi (bölgesel veya sistemik) çocuklarda görülebilir, bu durumda çocukluk çağı skleroderması veya "Juvenile" skleroderma olarak adlandırılır (Dunkin, 2001).

Sine Skleroderma: Akciğer, böbrek ve kan damarlarındaki değişim ile sınırlı ve yaygın skleroderma ile benzerlik göstermesine rağmen diğer formlardan ayırmanın tek yolu sine sklerodermanın deride etkili olmamasıdır (Richard ve ark, 1991).

Fasiyal Skleroderma: Ağız açılmasında kısıtlanma, burnun gagalaşması, dudak çerçevelerinde ışınsal çekilmeler ile ilerler. Reynaud fenomeni (RF)

hastalarda parmak uçlarında veya kalsinozis bölgesinde ağrılı ülserler, sekonder infeksiyon ve gangren oluşabilir (Tuffanelli, 1989).



Şekil 1.3. Daralan damarlar ve parmaktaki kan akım yavaşlaması görünüm; Soluk almak için damarlar daralır ve parmaklara kan akımı azalır (aurorahealtcare.org).

1.1.3. Skleroderma Klinik Bulgular

Skleroderma hastaları üzerinde yapılan araştırmada laboratuvar bulguları 1960'ların başından beri bilinen nukleus proteinlerine karşı oluşturulan antikorların "Anti-Nüklear Antikorlar" (ANA) birçok römatolojik hastalıkta olduğu gibi sklerodermayla da ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Anti-sentromer ve antitopoizomeraz I (anti-Scl 70) SSc'li hastalarda saptanan iki temel serum antikorudur. Sklerodermalı hastaların serumları diğer ANA'ları da içermektedir. Bu antikorların çoğu immünofloresan tekniğiyle boyanma gösterirler. Bunlar, anti-Th , anti-fibrillarin (U3 RNP) ve PM-Scl'dir. Anti RNP genellikle sınırlı sklerodermaya özgündür. Antifibrillarin antikorları, Afrika-Amerika kökenli hastalarda yüksek sıklıktadır ve kas iskelet sistemi bulguları ve akciğerlerdeki hipertansiyon ile ilişkilidir. PM-Scl iskelet kası tutulumu olan hasta gruplarına özgüdür (Okano, 1996).

RNA polimeraz kompleks enzimlerine (RNA-p I, II, III) karşı olan antikorlar da skleroderma için özgün otoantikorlardandır. Anti-Scl 70 ile karşılaştırıldığında anti-RNA polimeraz antikorları yaygın cilt tutulumu, daha yoğun cilt kalınlaşması ve renal tutulumla ilişkilidir (Steen ve ark, 1988).

Skleroderma karakteristik cilt tutulumuna eşlik eden çesitli derecelerde ic organ tutulumlarının olduğu, bircok farklı klinik tablonun olustuğu sistemik bir hastalıktır. Halsizlik, cabuk yorulma ve kilo kaybı gibi sistemik semptomlar hastalığa eşlik edebilir. Ates sık rastlanan bir yakınma değildir ve bu durumda hasta enfeksiyonlar açısından araştırılmalıdır. Hastalık alevlenme ve remisyonlarla seyretmektedir (Jimenez ve Derk, 2004).

Bu laboratuvar bulguları klinik olarak hastalar üzerinde şu etkileri gösterir:

Deri Değişimleri: Sklerodermanın başlangıç semptomları deride meydana gelmektedir. Elin üstünde oyuklu yaralar oluşur. Vücudun diğer bölgelerindeki deride sertleşmiş ve kalınlaşmış yama şeklinde alanlar gelişebilir (Medsger ve Koopman, 2000). Deri kalınlığının Sınırlı SSc'de azalmasına ya da uzun süre minimalde kalmasına rağmen, Yaygın SSc'de hızlı bir artısla 1-2 yıl içinde maksimuma ulaşır, dermis belirgin sekilde kalınlaşmasına rağmen, epidermis incelir (Clements ve ark, 1995). Deride kırışıklık meydana gelir, tüy-saç, ter bezi ve yağ kaybı olur. Yüzdeki tutulum mimik kaybına neden olur. Ağız açıklığı azalır, dudaklar incelir ve dudak çevresindeki deri kırışır (Dunkin, 2001).

Eklem, tendon ve kemik Semptomları: Derideki fibroz olusumunu periferal eklemlerde geçici, düzensiz şişme ve eklem sıvısı içerigindeki mononüklear lokositler birikimi izler (Brandt ve Krey, 1977).

Sindirim Sistemi semptomları: Özofagal fonksiyon bozukluğu hastaların neredeyse %80'inde gelişir ve en yaygın iç organ tutulumudur. Hastalarda yutkunma zorluğu gözlenir. Eger tutulum sfinkterlerde ise gastroözofagal reflü oluşumuna neden olur ki bu durum oldukça yaygındır (Martin ve ark, 2001).

Hastaların %80'inde mide fonksiyon bozukluğu bildirilmistir. Birçok hastada mide sindirimi normalden uzun sürmektedir. Midenin tutulumu mide kanser riskini önemli ölçüde arttırmaktadır. Sindirim sisteminin aşağı kısımlarında da nadir olarak tutulum gerçekleşebilir. Bu tutulum genellikle kabızlığa neden olur (Singh, 2001).

Akciğer semptomları: Akciğer problemleri Sistemik Sklerodermanın meydana getirdigi en önemli semptomdur ve hastalarının ölümüne yol açan en büyük etkendir. Akciğerlerde SSc'nin yol açtığı pulmonar fibroz ve pulmonar

hipertansiyon, birlikte veya bağımsız sekilde meydana gelebilir. Akciğerle ilgili fibrozun en önemli güçlüğü akciğer fonksiyonunu düşüren ve nefes almayı zorlaştıran intestisiyal akciğer rahatsızlığıdır. Bu durum hastalardaki akciğer kanseri riskini de önemli ölçüde arttırır (Oor, 2003).

Pulmoner hipertansiyon ise %50 civarında bir sıklıkta meydana gelir. Bu durumda akciğerlerdeki kan basıncı tehlikeli seviyelere erişebilir. Bazı durumlarda pulmonar hipertansiyon "ko pulmoner" olarak bilinen bir duruma yol açabilir. Bu olay hipertansiyon sonucu akciğerler büyür ve kalbe baskı yaparak kalp yetmezliğine neden olur (Gunduz ve ark, 2001).

Böbrek semptomları: SSc'deki böbrek tutulumunun ilk belirtisi normal tansiyonda idrardaki protein seviyeleridir. En güçlü böbrek komplikasyonu böbrek krizidir (Renal Crisis). Genellikle hastalığın erken safhalarında başlayan yaygın SSc'li hastaların az bir kısmında görülen nadir bir olaydır ve kan basıncındaki ani bir artışla hızlı ilerleyen böbrek yetmezliğine neden olur (Steen ve ark, 1990).

Kalp semptomları: Sklerodermanın kalpteki en doğrudan etkisi sklerozdur. En sık gözlenen bulgu kan basıncı düşüklüğü ve bu düşüşün getirdiği temel rahatsızlıklardır. Sklerodermanın neden olduğu kalp kası tutulumu, sklerodermanın yol açtığı kalpteki ritm bozukluğunun temel nedenidir. Bu tutulum elektriksel iletide problemler ve kalp yetmezliği yaratabilir. Ayrıca kalp zarının etkilenmesi iltihaba neden olabilir (Deswal and Follansbe, 1996).

İlk defa 1926 yılında Heine tarafından sklerodermalı hastalarda kalp tutulumu olduğu belirtilmiştir, sonrasında Weiss ve arkadasları (1999), konjestif kalp yetmezliği olan 9 vaka sunmuştur. Kardiyak tutulumu olan sklerodermalı hastalar değişik semptomlarla gelebilir. Sol kalp yetmezliği bulguları olan hastaların en sık sikayetleri efor dispnesi, paroksismal nokturnal dispne veya ortopne olurken, pulmoner hipertansiyon ve neticesinde sağ kalp yetmezliği gelişen hastalarda ilerleyici nefes alma zorluğu, pretibial ödem, asit ve konjestif hepatomegali görülebilmektedir (Champion, 2008).

Sklerodermalı hastalarda kalp tutulumu olması 5 yılda %70 mortalite ile ilişkili bulunmuştur. Genellikle kalp yetmezliği, kötü sağ ventrikül fonksiyonu, pulmoner hipertansiyon, düşük kardiyak indeks, yüksek sağ atriyal basınç veya

dökümante ventriküler aritmi olması daha yüksek risk oluşturmaktadır (Champion, 2008).

Steen ve arkadaşlarının (1988), 48 hasta ile yapmış olduğu bir çalışmada hem sınırlı, hem de diffuz sklerodermada talyum perfuzyon defekt skorunun mortilitenin en güçlü belirteci olduğu bildirilmiştir. Sklerodermada kardiyak fibrozis yama tarzında olma eğilimindedir ve her iki ventrikül miyokardı içine yayılmıştır. Koroner arter hastalığına bağlı gelişen fibrozisten farklıdır. Sklerodermadaki fibrozis subendokardiyal tabakayı içerir ve hemosiderin depositleri bulunmaz. Genellikle fibrozis kardiyak hipertrofi ile birliktedir ve yükselmiş pulmoner veya sistemik basıncın indirekt göstergesi olabilir. Kreatinin kinaz yüksekliği olan sklerodermalı hastalarda kalp yetmezliği ve kardiyak kokenli ölüm sıklığı, kreatin kinaz yüksekliği olmayan hastalara göre daha fazla bulunmuştur. Ancak kreatin kinaz yüksekliğinin olmaması kardiyak inflamasyonu ekarte ettirmemiştir. Düşük derecede inflamasyon bulguları sıklıkla sklerodermalı hastalardan yapılan sağ ventrikül biyopsilerinde görülmektedir. Kardiyak inflamasyonun tahmin edilenden daha sık olduğu ve fibrotik sürecin kalbin kronik inflamasyonuna sekonder olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun radyonüklid ventrikülografi (Radyonüklid Ventrikülografi: Sol ventrikül duvar hareketleri ve sistolik fonksiyonları ile ilgili bilgiler vermektedir) ile hesaplandığı çalışmalarda, hastaların %11'inde istirahat ejeksiyon fraksiyonu bozuk bulunmuş, egzersiz ile semptomlar ortaya çıkıp hemodinamik değişiklikler izlenmiştir (Deswal and Follansbe, 1996).

Bir başka çalışmada istirahat ejeksiyon fraksiyonu hastaların sadece %15'inde düşük 22 iken bu oran, efor ile %46'ya çıkmıştır. Sklerodermalı hastalarda hastalığın süresi ile ilişkili olarak diyastolik disfonksiyonun ortaya çıktığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Diyastolik disfonksiyona eşlik eden durumlar, sistemik hipertansiyon, renal hastalık, sol ventrikul hipertrofisi veya miyokardiyal fibrozis olabilmektedir.

Pulmoner hipertansiyon sklerodermalı hastalarda sıklıkla görülür ve kötü prognoz göstergesidir. Sağ kalp yetmezliği sıklıkla pulmoner hipertansiyona sekonder olarak ortaya çıkmaktadır (Denton and Black, 2004).

Dolaşım sistemi farklılaşmaları: Damarla ilgili anormallikler SSc patogenezinde en yaygın ilk belirtilerdendir. Bazı hipotezler SSc'de endotelyumun temel hedef doku olduğunu ileri sürmektedir. Değişimler sadece deride değil iç organlarda da meydana gelir (Deswal ve Follansbee, 1996).

1.1.4. Skleroderma Tedavisi

Etkili ve kesin bir tedavisi yoktur, ancak destek tedavi ile prognoz iyileştirilmeye çalışılır. Sklerodermada tedavinin temel amacı, katılaşmış, sertleşmiş, bağ dokusunu ve deriyi yumuşatmak, gevşetmektir. Bu amaçla; ilaç tedavisi (Kortikosteroidler, D-Penicillamin-Kolşisin) egzersiz programları uygulanır. Hemşire; bakımını üstlendiği sklerodermalı hastada; düzenli ve sürekli egsersiz programları ile eklem, kas ve deride kalıcı kontraktürlerin oluşmasını önlemeye, en az günde iki kez (sabah ve öğleden sonra) planlanan dinlenme periyodları ile istirahatin sağlanmasına, Reyno Fenomeni ve özellikle periferik ekstremite yaralanmalarını önlemek için hastanın iyi giyinmesine, soğuk ve travmalara maruz kalmamasına, yutma güçlüğü nedeni ile rahat beslenemeyen hastanın uygun, yeterli-dengeli ve rahat beslenmesine, barsak ve böbrek tutulumunu dikkate alarak boşaltım sisteminin ve giren-çıkan sıvı miktarının izlenmesine, ilaçların (Aspirin-Prednison) ciddi yan etkilerinden hastanın korunmasına dikkat etmelidir. (http://zehirlenme.blogspot.com/2008/11).

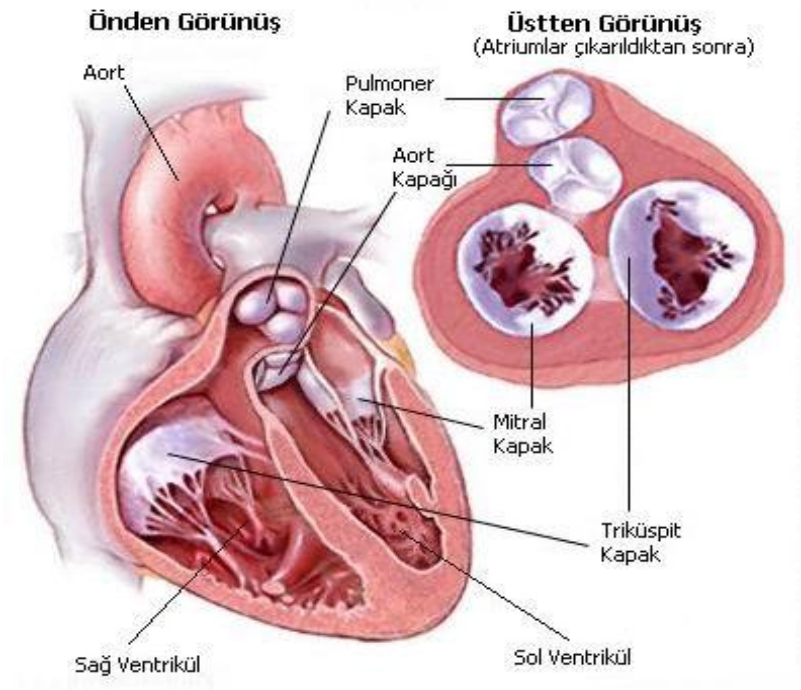
1.2. Genetik Dayanağı

1.2.1. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon

1.2.1.1. Pulmoner Dolaşım

Akciğerler iki ayrı dolaşım sistemine sahiptir. Bunlardan biri pulmoner dolaşım, diğeri ise bronşial dolaşımdır. Bronşial dolaşıma arteriyel yolla, pulmoner dolaşıma ise sistemik venoz yolla kan gelir. Pulmoner dolaşım, esas işlevi gaz

alışverişi olan, geniş hacim ve kapasiteye, düşük basınç ve rezistansa, yüksek akım ve kompliansa sahip bir sistemdir. Bu sistemin pompasını sağ ventrikül oluşturur.



Şekil 1.4. Pulmoner arterieller genel görünüm (http://onlinehastane.net).

Pulmoner arter ve arterioller karışık venöz kanı pulmoner kapillerlere taşır. Burada değişen kan, pulmoner ven ve venüllerle sol atriuma taşınır. Pulmoner dolaşımda pulmoner arterden kapillerlere giden ve buradan pulmoner venlere dönen bir tüpler dizini mevcuttur. Pulmoner arterlerin duvarı, sistemik arterlere göre daha incedir ve duvarların içine uzanım bronşlar gösteren az sayıda düz kas içermektedir. Bu yapı özelliğinden dolayı, aktif olarak kasılmazlar ancak genişleme yeteneğine sahiptirler. Başlangıçta arterler, venler ve birbirine yakın olarak beraber giderler, fakat venler akciğerin periferine doğru, lobüllerin arasından geçmek üzere diğerlerinden uzaklaşırlar; oysa arterler ve bronşlar lobüllerin merkezlerinde yan yana bulunurlar. Kapillerler, alveollerin duvarında yoğun bir ağ oluştururlar. Ağ oluşturan kapillerler birbirlerine o kadar yakındırlar ki, alveol duvarında neredeyse kesintisiz bir kan tabakası oluşur. Bu durum da akciğerin esas görevi olan gaz alışverişi icin oldukça etkin bir düzen sağlar. Kapillerdeki kan ile alveol boşluğu arasında çok ince bir membrandan başka bir engel yoktur.

Akciğerlerdeki diğer kan dolaşımı olan ve kardiyak output'un %1'ini oluşturan bronşial dolaşımın görevi, havayollarının terminal bronşiollerine kadar kısmının beslenmesini sağlamaktır. Burada bronşial arterler, bronşial venlerce drene edilen kapiller ağlara dağılırlar. Bunların çoğu sistemik venoz yatağa boşalırken, bazıları pulmoner venlere açılırlar ve böylece bronşial dolaşım fizyolojik bir soldan sağa şant içerir. Şantla sol atriuma gelen desature kanın miktarı önemsizdir. Bronşial sistemde akım, akciğer dolaşımının çok küçük bir bölümünü oluşturur ve akciğer transplantasyonun da olduğu gibi bu dolaşım olmaksızın da akciğerler oldukça iyi görev yapabilir (Grossman ve Braunwald, 1992).

1.2.1.2. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Tanımı

Akciğerlere giden damardaki (pulmoner arter) basıncın artmasına ise pulmoner hipertansiyon denir. "Pulmoner dolaşım" akciğere aittir, "hipertansiyon" ise yüksek kan basıncı demektir. Normalde hipertansiyon denince aort ve dallarındaki basıncın artması anlaşılır ve aslında bunun tam adı "sistemik hipertansiyon"dur. Günlük konuşmalarda, tansiyon veya hipertansiyon denince kastedilen aslında kol atardamarlarındaki (dolayısı ile aorttaki-yani büyük dolaşım'daki) basıncın artmasıdır yani sistemik hipertansiyondur. Pulmoner hipertansiyona yol açan birçok neden vardır. Örnek olarak, akciğerin kan damarları (pulmoner arteriyeller) daralmış olabilir. Ayrıca bu durum, kanın akciğerlerde göllenmesine neden olan kalbin sol tarafına ait bir hastalık nedeniyle de ortaya çıkabilir. Pulmoner hipertansiyon pulmoner arterlerdeki kan basıncını ölçerek teşhis edilir. Normal koşullar altında, istirahat halinde pulmoner arter sistolik (büyük) basıncı yaklaşık 14 mmHg (milimetre civa) civarındadır. Pulmoner hipertansiyon, sistolik (büyük) kan basıncının istirahatte 25 mm Hg, veya egzersiz sırasında 30 mmHg'dan büyük pulmoner arter basıncı olarak tanımlanır (Gibbs ve Higenbottam, 2001).

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), küçük pulmoner arterlerin vasküler proliferasyonu ve yeniden şekillenmesi ile karakterize bir hastalığıdır. PAH tanısını koymak kadar tedavisi de zordur. Tedavi edilmediğinde sağ ventrikül

yetmezliği ve ölüme götüren, pulmoner vasküler dirençte progresif bir artışla karakterizedir. Pulmoner vaskuler yatağın rezistansı ve basıncı düşük, genişleyebilme kapasitesi ise fazladır. Normal şartlarda istirahat halinde pulmoner arter basıncı 18–25 mmHg arasında değişir. PAH hemodinamik açıdan, ortalama pulmoner arter basıncının istirahatte 25 mmHg, egzersizle 30 mmHg'nın üzerine çıkması olarak tanımlanır (Gibbs ve Higenbottam, 2001).

Pulmoner arteriyel hipertansiyon, pulmoner arter basıncının şiddetine göre 3 bölüme ayrılır:

Hafif PAH: 25–45 mmHg

Orta PAH: 46–65 mmHg

Ağır PAH: >66 mmHg

Tedavi edilmediği takdirde ciddi PAH' lı hastaların prognozu çok kötüdür. İdiopatik PAH'da rapor edilen yaşam süresinin medyanı, tanı konulmasından itibaren 2-8 yıldır. Özellikle ileri evredeki PAH'ın tedavi edilmemesi progresif sağ ventrikül hipertrofisine, sağ ventrikül dilatasyonuna ve sağ ventrikül disfonksiyonuna yol açar. Uygun tedavi verilmezse sağ ventrikül yetersizliği sürer ve ölüme sebebiyet verir (D'Alonzo ve ark, 1991).

Çizelge 1. Pulmoner hipertansiyonun klinik sınıflaması (Dana Point, 2008).

PULMONER ARTERİEL HİPERTANSİYON KLİNİK SINIFLANDIRILMASI	
1. PULMONER ARTERİYAL HİPERTANSİYON	A. İdiyopatik B. Kalıtımsal * BMPR2 mutasyonu * ALK 1, endoglin mutasyonu * Bilinmeyen C. İlaç ve toksinlere bağlı D. İlişkili hastalıklar * Bağ dokusu hastalıkları * HIV infeksiyonu * Portal hipertansiyon * Konjenital kalp hastalığı * Şistozomiazis * Kronik hematolojik anemi E. Yeni doğanın persistan pulmoner hipertansiyonu
2. SOL KALP HASTALIĞINA BAĞLI PULMONER HİPERTANSİYON	A. Sistolik disfonksiyon B. Diyastolik disfonksiyon C. Kapak hastalıkları
3. AKCİĞER HASTALIKLARINA ve/veya HİPOTOKSİYE BAĞLI PULMONER HİPERTANSİYON	A. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı B. İnterstisyel akciğer hastalıkları C. Karışık obstrüktif ve restriktif paterne sahip diğer akciğerhastalıkları D. Uykuda solunum bozukluğu E. Alveolar hipoventilasyon bozuklukları F. Uzun süre yüksek rakıma maruziyet G. Gelişme bozuklukları
4. KRONİK TROMBOEMBOLİK PULMONER HİPERTANSİYON	
5. SEBEBİ BİLİNMEYEN/ MULTİFAKTÖRİYEL PULM. HİPERTANSİYON	A. Hematolojik bozukluklar: miyeloproliferatif hastalıklar, splenektomi B. Sistemik hastalıklar: sarkoidoz, pulmoner Langerhans hücreli histiyositoz, nörofibromatozis, vaskülit. C. Metabolik bozukluklar: glikojen depo hastalıkları, Gucher hastalığı, tiroid hastalıkları D. Diğer: Tümoral obstrüksiyon, fibröz mediastinit, diyaliz alan kronik böbrek yetersizliği

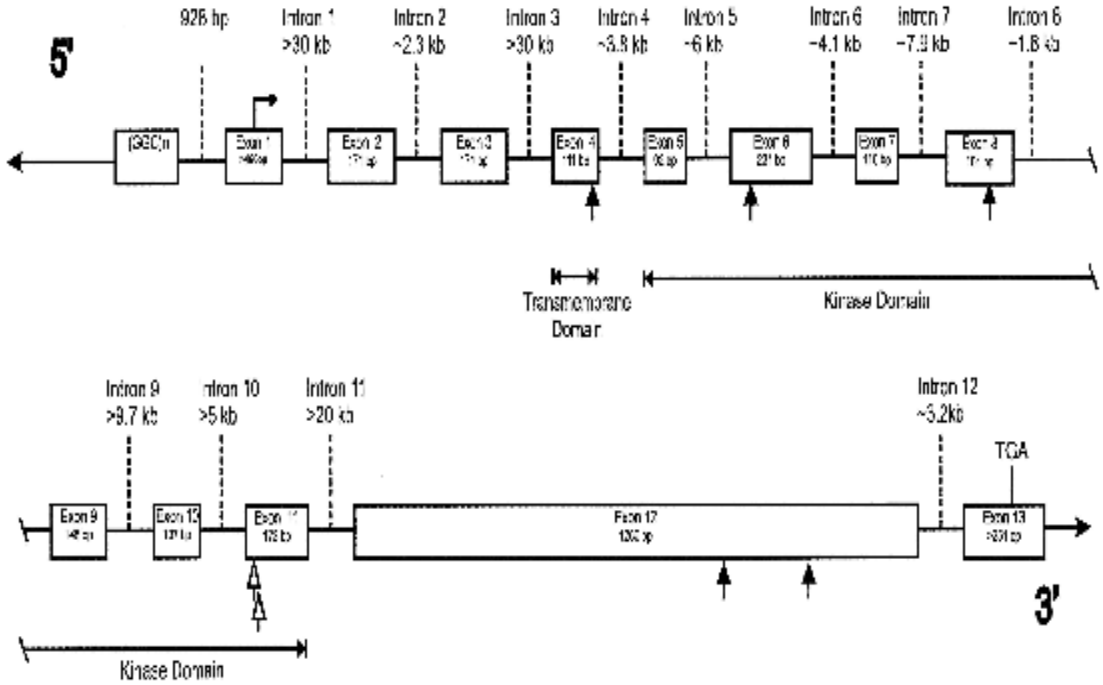
(BMPR2: Bone Morphogenetic Protein Receptor 2, ALK-1: Activin receptor-like kinase 1 gene, HIV: human immunodeficiency virus).

1.2.1.2.(1). Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonun Genetik Dayanağı

Ailevi PAH'dan sorumlu genetik defektler, kemik morfogenetik protein reseptöründeki (BMPR2) mutasyonla ilişkilidir. Reseptor TGF-β'nın bir parçasıdır. 40'dan fazla BMPR2 gen mutasyonu tespit edilmiş olup, hepsi de hücre proliferasyonu inhibisyonunun ortadan kalkmasına neden olmaktadır. BMPR2 anormalliklerinin yanı sıra farklı genlerdeki mutasyonların da pulmoner hipertansiyon gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Yine bir TGF-β üyesi olan ALK–1 (aktivin benzeri kinaz) reseptöründeki mutasyonlarında herediter hemorajik telenjiektazideki PAH gelişimiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Du ve ark, 2003).

STGF-β ailesi hücre proliferasyonu, migrasyonu, farklılaşması, apoptoz, ekstrasellüler matriks sekresyonu ve depozisyondan sorumludur. Pulmoner düz kas ve endotel hücreleri gibi değişik hücrelerden salgılanır. TGF-β ailesine ait olan, moleküller alt sınıflara ayrılırlar. Ligandlar, reseptörler, aktivinler, kemik morfogenetik protein (bone morphogenetic protein) bu alt grupları oluşturur. BMP en büyük gruptur. BMPR2 normal akciğerlerin arter düz kas hücrelerinde hücre çoğalmasını baskılar, apoptozisi stimule eder. BMPR2 geni kromozom 2q31-31 bölgesinde yer almakta olup, 13 eksona sahiptir. Fonksiyon gören dört bölümü vardır: N-terminal ligand bağlayıcı bölüm, transmembran bölüm, sern/treonin kinaz ve sitoplazmik bölüm. Ekson 1-3 ekstrasellüler bölgeyi kodlar. Ekson 4 transmembran bölgeyi ve 5-11 eksonlar serin/treonin kinaz bölgesini ve ekson 12 büyük ekstrasellüler C-terminal bölgeyi kodlar. Protein başlangıç kodonu ekson1, bitiş kodonu ise ekson 13'tur. Ekson 5, 10 ve 13 dışındaki tüm eksonlarda mutasyon bildirilmiştir. Ekson 6,8 ve 12'de polimorfizm saptanmıştır. Her mutasyon bir aileye özeldir. Farklı ailelerde aynı nukleotid değişikliği görülebilse de mikrosatellit belirteçler tarafından yapılan haplotipler her aile için özeldir. Nokta mutasyonları sonucu gelişen aminoasit yer değiştirmeleri reseptor fonksiyonunu bozar. Ortaya çıkan hasar mutasyonunun ekstrasellüler, transmembran, serin/treonin kinaz veya sitoplazmik kuyruk bölgelerinden hangisini etkilediğine bağlıdır. Mutasyonlar kinaz aktivitesini bozarak, ligandın bağlanmasını engelleyerek ve heterodimerik dimer oluşumuna etki ederek BNP sinyal yolunda kesintiye neden olurlar. BMP yolu hücre

yüzeyinde başlayıp nukleusa kadar uzanan fosforilazyonunu içerir. Tip I ve tip II olmak üzere iki reseptörü olan BMP'nin tip II reseptörü tip I reseptörlerini fosforlar, tip I reseptorleri de fosforilasyon ile aktive olan Smad ailesini (Smad1/5 ve ya 8) fosforlar. Bu aktive olmuş moleküller hücre nükleusunda hedef genleri etkiler. Bu olaylar sonucunda endotel proliferasyonu inhibe olur, hücre siklusunun kontrolünde ve anjiyogenezde rol oynayan proteinler düzenlenir (Alan ve Nalbantgil, 2010).



Şekil 1.5. BMPR2 geni intron- exon bölgeleri;
İnsan BMPR2 geni intron ve exon yapısındadır. İntron ve exon boyutları gösterildiği gibidir. Protein başlangıç ve bitiş kodonları sırasıyla yatay ok ve 'TGA' da gösterildiği gibidir. BMPR2 nin zamansız sonlanmasına sebep olan mutasyonlar, karalanan oklar ile gösterilir, karalanmamış oklar ise Arg491 mutasyonunu gösterir. Transmembrane ve kinaz alanları, gösterilen eksonlar tarafından kodlanır.

1.2.2. Genetik Materyal

DNA, ebeveynlerden çocuğa fiziksel özellikleri taşıyan genetik materyaldir. RNA ise, DNA'dan bilgiyi alıp protein sentezinde kullanılmasını sağlar. DNA çift, RNA tek sarmallıdır.

DNA ve RNA'nın, fosfat grupları, nitrojenli bazlar ve monosakkaritler içeren temel yapı taşlarına nükleotit adı verilir. Nükleik asitler azot içeren bir baz, bir pentoz ve fosforik asit kapsayan temel yapı üniteleridir. DNA, dört organik bazdan, 1 fosfat grubundan ve 1 şeker grubundan oluşur. DNA çift zincirden oluşmuştur. Yapısındaki dört organik bazın (adenin, timin, guanin, sitozin) diziliş şekilleri ve sayıları ile genetik bilgiler belirlenir. RNA, dört organik bazdan oluşmuştur. Fakat bu materyal tek zincirden oluşmuştur. Yapısında bir baza sadece bir fosfat-şeker grubu denk gelmektedir. DNA'da ise bazlar çift halinde bulunur ve bir çift baza bir fosfat-şeker grubu denk gelmektedir. Ebeveynlerden çocuğa aktarılacak genetik bilgiyi taşır. RNA'nın görevinin yarısını oluşturur: RNA protein sentezi için bilgiye ihtiyaç duyar. Eğer bu bilgi yoksa RNA sentez yapamaz. O yüzden DNA, RNA açısından çok önemli bir materyaldir. DNA'dan bilgiyi alır. Bunu işleyerek protein sentezi işleminde kullanır. Çekirdekten bilgiyi alıp, sitoplazmaya taşır. DNA, hücrede bulunan serbest bazlardan alır ve kendini kopyalar.

1.2.2.1. DNA Sentezi

DNA'nın sentezi sırasında nükleotitler pentoz şekerinin 3'-OH grubuna bağlandığından, polinükleotidin uzaması bu uçtan başlayarak 5'-3' yönüne doğru devam eder. Buna göre iplikçiklerden birinin yönü 5'-3' ise diğerinin yönü bunun tersine 3'-5' olmaktadır ve iplikçikler birbirlerine anti-paralel bir durum gösterirler. Bir saniyede, bir hücrede, bir milyon reaksiyon oluşmaktadır. Bir DNA'nın şeklinin belirlenmesi için kendini on defa üst üste tekrarlaması gerekir.

1.2.2.2. Gen Ekspresyonu ve Protein Sentezi

DNA'da saklanan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA, tRNA, rRNA) sentezi suretiyle kopyalanması veya bilginin RNA'ya aktarılmasına transkripsiyon adı verilir.

Transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan, bir protein molekülüne ait genetik bilgilerin okunması veya bir protein molekülü haline çevrilmesine translasyon adı verilir.

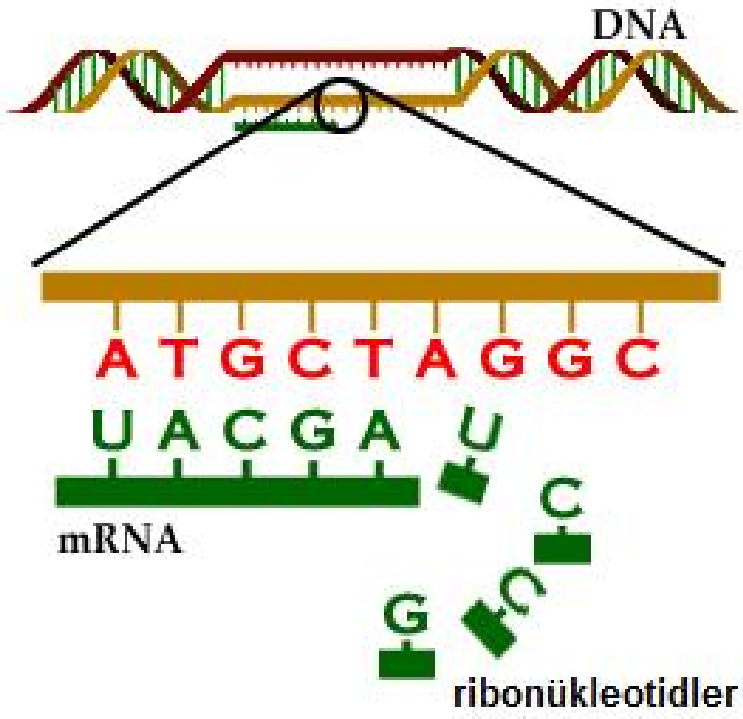
Transkripsiyon ve translasyon olaylarının toplamı, gen ifadesi (gen ekspresyonu) olarak tanımlanır.

Transkripsiyon; DNA'da saklanan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA, tRNA, rRNA) şeklinde kopyalanması veya yazılması olayıdır.

Bir RNA molekülü, DNA'nın kalıp kolunun dizilişini bütünleyici ribonükleotidlerin ATP, GTP, CTP ve UTP'tan pirofosfatlar ayrılması suretiyle polimerizasyonu sonucunda, 5′ → 3′ yönünde sentezler. RNA sentezi için RNA polimeraza, başlama ve sonlanma sinyallerine gereksinim vardır. RNA sentezi (transkripsiyon) başlayacağı zaman, kopyalanacak kalıp DNA kolunun 3′ tarafına, RNA polimeraz bağlanır ve promoter bölgeye doğru göç eder. Start yerinden itibaren RNA polimeraz kalıp kol tarafından yönetilen ve baz eşleşmesi kuralları tarafından yorumlanan spesifik bir diziliş içinde ribonükleotidleri polimerize ederken pirofosfatlar serbest bırakılır.

Ökaryotlarda hücre çekirdeğinde bulunan RNA'lar heterojen nüklear RNA (hnRNA) olarak adlandırılırlar ki bunların sadece az bir kısmı sonradan sitozolde mRNA olarak görülürler mRNA oluşumu için hnRNA'nın geçirdiği RNA processing üç işlemi kapsar:

1) 3′ ucuna poliadenilat (poliA) kuyruğu takılması.
2) 5′ ucunun cap strüktür denen yapı ile kapatılması.
3) Primer RNA molekülü içinden bazı bölgelerin çıkarılması (Splicing)



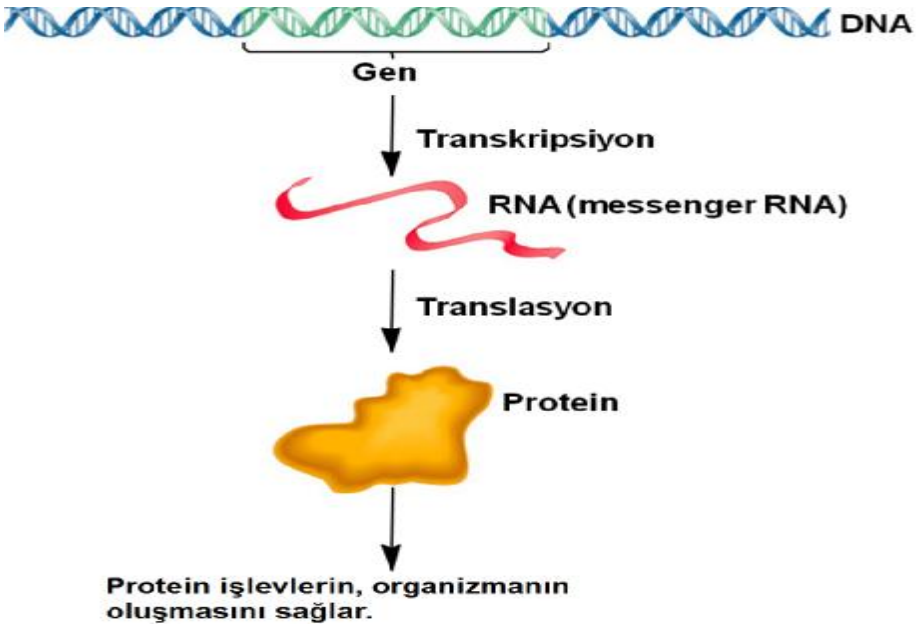
Şekil 1.6. RNA sentezi

Translasyon, transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan genetik bilginin bir protein veya polipeptit zinciri haline dönüştürülmesidir. mRNA'yı oluşturan nükleotid dizisinde her üç bazlık dizi kodon olarak adlandırılır ki her kodon ya protein sentezine katılacak bir amino asidi veya protein sentezinin sonlanacağını ifade eder. Her amino asit için en az bir tane kodon vardır. tRNA, her amino asit için en az bir tane olmak üzere bulunur. Protein sentezi sırasında 3′ ucuna bir aminoaçil kalıntısı bağlar ve mRNA ile etkileşen bir adaptör olarak işlev görür. tRNA üzerinde antikodon denilen ve mRNA'daki kodonları tamamlayıcı üçer bazlık nükleotid dizileri vardır. Bir tRNA, aynı amino aside ait üç değişik kodonu tanıyabilir. Örneğin tRNA daki (5′)ICG antikodonu, mRNA'da, arjinine ait (5′)CGA, (5′)CGU, (5′)CGC kodonlarını tanıyabilir. Ribozomlar, ökaryotik hücrelerde 40S ve 60S'lik sedimantasyon katsayılarına sahip iki alt ünitesi olan toplam 80S'lik sedimantasyon katsayılı, prokaryotik hücrelerde ise 30S ve 50S'lik sedimantasyon katsayılarına sahip iki alt ünitesi olan toplam 70S'lik sedimantasyon katsayılı sitozolik taneciklerdir. Sitoplazmada serbest veya endoplazmik retikulumun sitozolik yüzüne tutunmuş olarak bulunurlar.

Protein sentezi başlayacağı zaman, sitoplazmada bulunan amino asitler, kendilerine özgü ve Mg^{2+} gerektiren aminoaçil-tRNA sentetaz enzimleri yardımıyla kendilerine özgü tRNA'lara bağlanarak aminoaçil-tRNA şeklinde aktiflenirler .polipeptit zinciri amino-terminal uçtan karboksil-terminal uca doğru uzar.

Polipeptit zincirinin uzaması sonlandırılacağı zaman A yerine UAG, UAA, UGA sonlandırma kodonlarından biri gelir. Buraya terminasyon faktörü bağlanır ve önce polipeptidil-tRNA bağı hidroliz olur daha sonra diğer komponentler dissosiye olurlar.

DNA'nın üç bazlık bir dizisi bir amino asidin inkorporasyonunu yönetir; bu şekilde genetik kod bir triplet koddur. Gen gerçek transkripsiyonun hem başlama hem de sonlanma noktalarını ve proteine dönüşümün en iyi şekilde başlaması ve sonlandırılmasını betimler. Bunun yanında ne zaman, nerede ve nasıl mRNA yapılmalıdır gibi gen ekspresyonunun doğasını düzenleyen ek DNA dizileridirler (Cantor ve Smith, 1999).



Şekil 1.7. Protein sentezi

Relatif gen ekspresyonu karşılaştırma çalışmalarında en iyi sonuç; endojen/internal kontrolün örnek içerisinde fazla ve sabit oranda (total RNA'ya göre) bulunmasıyla elde edilir. Her bir reaksiyondaki farklı hedef mRNA'ların kuantifikasyonu için değişmeyen bir endojen kontrol kullanılabilir. Bu amaç için genellikle 18S RNA, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas) ve β-actin seçilir. Çünkü 18S mRNA'da poli-A kuyruğu bulunmaz. Bu durumda c-DNA sentezi için oligo-dT kullanmaya gerek olmaz (Suzuki ve ark, 2000).

1.2.2.3. c-DNA Sentezi

c-DNA anlamındaki complementer DNA veya c-DNA tek veya çift iplikli olabilir. c-DNA, mRNA şablonundan reverse transkriptaz kullanılarak invitro olarak sentezlenir.

1.2.2.4. Housekeeping Gene (Referans gen)

Araştırmacılara göre GAPDH ekspresyonu bölünmekte olan hücrelerde artmış olduğundan, referans olarak kullanılması sakıncalıdır. Beta actin'in aktif referans olarak kullanılmasını tavsiye etmektedirler. GAPDH kullanımı diğer bazı araştırmacılar tarafından da ciddi olarak eleştirilmektedir (Deheda ve ark, 2004).

1.2.3. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

PCR, izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa zincirli oligonükleotit primerler yardımıyla enzimatik olarak sayısal çoğaltılması (amplifikasyon) olarak tanımlanabilir. Termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimeraz ve değişimleri (modifikasyonlar) neredeyse tüm DNA çoğalmasında (amplifikasyon) kullanılır. Taq DNA polimeraz enzimi en iyi 70^{o}C'de aktivite gösterir ve PCR'da ayrılma (denatürasyon) için gerekli olan ısılara dayanıklıdır (90-95^{o}C). Mg^{++} iyon konsantrasyonunun primer bağlanması, kalıp DNA ve PCR

ürünlerindeki çift iplikli yapının ayrılma ısısı, primer-dimer yapısı ve enzim aktivitesi üzerine etkisi bulunmaktadır. Gereğinden fazla miktarda Mg^{++} un ortamda bulunması anlamsız ürünlerin oluşumuna yol açarken; gerektiğinden az miktarlar ise istenen ürünün yeterince sentezlenmemesine neden olur.

PCR'ın prensibi tekrarlanan üç basamağa dayanır.

1. Denatürasyon (ayrılma)
2. Hibridizasyon (pirimerlerin yerleşmesi)
3. Polimerizasyon (sentez)

PCR için saf DNA kullanmaya gerekmemektedir. Kaba hücre özütü, total DNA preparatı, bir damla kan ya da sperm başarılı bir PCR için başlangıç materyali olabilir.

Denatürasyon: PCR işleminin ilk aşamasında çoğaltılacak DNA başlangıçta 95-100^{o}C'ye kadar ısıtılır. İlk DNA'nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi tek döngü olarak 15 dakikaya kadar uygulanır.

Hibridizasyon: Yüksek ısının kullanılması yanlış nükleotitlerin primerlerin 3' ucuna bağlanmasını önler. Bağlanma ısısının düşük tutulduğu durumlarda özgün (spesifik) olmayan küçük DNA fragmentlerinin oluşması söz konusu olur. Bu olay çoğunlukla 47-60°C arasında 30-60 sn'de gerçekleşir (G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısısı 68°C'ye kadar arttırılabilir).

Polimerizasyon: Taq DNA polimeraz enzimi, 5'-3' yönünden olmak üzere, ortamdaki nükleotitleri kullanırlar, primerlerin 3' ucuna nükleotitleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Isı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. DNA'nın uzunluğuna göre 30sn ile 3 dakika arasında değişir.

Klasik PCR normalde sayısal (kantitatif) bir değerlendirme ölçüsü değildir fakat kantitatif dönüştürülür. Jel elektroforez de ürünler karşılaştırılarak veya en muhtemel sayı (most probable number: MPN) yardımıyla sonuca ulaşılır. MNP yönteminde ard arda seyreltmeler ve MNP hesaplayıcısı kullanılır. Tercih edilmeyen bir yöntemdir. Bir diğer yöntem karşılaştırmalı PCR'dir. Karşılaştırmada delesyon veya insersiyon taşıyan örneklerle (farklı uzunlukta bant oluştururlar) elde edilen ürün jel elektroforezde karşılaştırılır.

Multiplex PCR: Klasik veya Real-Time PCR'ın modifikasyonuyla iki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayanır. Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşir fakat her bir reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılır. Multiplex PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemidir. Fakat önemli derecede optimizasyon gerektirir. Değişik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi, bağlanma ısılarının birbirine uygun olması, birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri gibi bazı önemli şartları gerçekleştirilmesi gereklidir. Farklı primer çiftlerinin en iyi konsantrasyonlarının seçimi ve spesifik olmayan amplifikasyonların önlenmesi birçok deneme gerektirir.

Revers transkripsiyon (RT)-PCR: mRNA ve viral RNA gibi RNA hedef dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır. Bu PCR çeşitinde bir revers transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. DNA primeri genellikle dT oligonükleotidi içerir (sadece hexamer yapıda thymidine nükleotidi) veya bir spesifik primerdir. dT mesajcı RNA'nın poli A kuyruğuna bağlanır (5' ucunda). dT hexameri tüm RNA çeşitlerinde bulunmakla birlikte dezavantajı 25°C de hibridize olması ve ortamda RNaz inhibitörü bulunmaz ise çabuk bozunmasıdır.

Revers transkripsiyon ve PCR amplifikasyonu bir veya iki aşamada uygulanabilir. Ayrı ayrı iki aşama halinde uygulanan RT-PCR daha hassas; tek aşamalı ise daha az kontaminasyon riski taşır (çünkü tüp transkripsiyondan sonra açılmamaktadır). Hangi yöntemin kullanılacağının belirlenmesi bizim, hassasiyetmi yoksa kontaminasyondan kaçınmakmı istediğimize bağlıdır. RT-PCR için birkaç çeşit revers transkriptaz enzimi vardır. Bir veya iki aşamalı reaksiyon seçimi ve daha sonraki uygulamalara göre enzim karekteristiği seçilir. Bu seçimde RNase aktivitesinin olup olmaması, iyon gerekliliği, dUTP ekleyebilme yeteneği ve optimum çalışma ısısı gibi etmenlerde önemlidir (http://biyoinformatik.wordpress.com/2007).

1.2.4. Real-time PCR

Gerçek zamanlı kantitatif PCR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metoddur. Bu teknoloji "kinetic PCR" ve "homogenous PCR" isimleriyle de tarif edilmektedir. "Real-time PCR"da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısında da gereklidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan "SYBR-Green I" floresan boya en basit metoddur. "SYBR-Green I" boya ile belirleme çok iyi işleyen bir metoddur fakat reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ışıma yapabilir. Bu primer-dimer oluşumu da olabilir. Bunda başka güvenilir bir şekilde kullanılan üç adet floresan ışıma yapabilen işaretli prob vardır. Bunlar "TaqMan ® probe" veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problarını içeren problardır. "Real-time PCR"ın kullanımında birçok avantajlar vardır. "Real-time PCR"ın tipik kullanım alanları patojen saptanması, gen anlatımının analizi, kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizi ve son zamanlarda "real-time" immüno PCR ile protein belirlemesidir. Ticari olarak satılan birçok "real-time" cihazı vardır. Birbirleri arasındaki temel farklılıklar "eksitasyon" ve "emisyon" dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir. "Real-time PCR" teknolojisinin, kullanıcılar tarafında tercih edilen çeşitli alanlardaki önemi gittikçe artmaktadır. Gen ekspresyonunda daha hassas, verimli, hızlı ve daha üretken grubu olan sağlıklı bireyler üzerinde yapılan BMPR2 ekspresyon düzeyi karşılaştırılmıştır. Çıkan ekspresyon düzeylerine göre hasların klinik seyri pulmoner yüksek tansiyona sahip olup olmadıkları dikkate alınarak ilişkilendilmiştir. Burada amaç skleroderma hastalarının BMPR2 gen ekspresyon düzeyi klinik seyrine olması tercih edilmesinin sebebidir (Günel, 2007).

1.3. Çalışmanın Amacı

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bölümüne 2011 yılında başvuran ve tedavi görmekte olan skleroderma hastaları üzerinde yapılan araştırmada hastaların Real-Time PCR yöntemi ile BMPR2 gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Çıkan sonuçlar kontrol grubu olan sağlıklı bireyler üzerinde yapılan BMPR2 ekspresyon düzeyi karşılaştırılmıştır. Çıkan ekspresyon düzeylerine göre hastaların klinik seyri, pulmoner yüksek tansiyona sahip olup olmadıkları dikkate alınarak ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmada skleroderma hastalarının BMPR2 gen ekspresyon düzeylerinin hastanın klinik seyrine bağlı olarak değişkenlik gösterip göstermediği belirlenmeye çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

D'Angelo (1969), sistemik skleroderma veya progresif sistemik ilk kez Napoli'de Curzio tarafından 1754'te tanımlanmış ancak isimlendirmesi daha sonraki yıllarda olmuştur. Sistemik tutulum, başlangıçta Lewin ve Heller ile Osler tarafından ortaya konulmuşsa da, iç organ lezyonlarının önemine Matsui 1924' de dikkat çekmiş, 1945'te 'Goetz progresif sistemik skleroz' terimini kullanmıştır.

Hirose ve ark (2000), pulmoner endoteliyal hücrelerin devamlılığının sağlanmasında rol aldığı tahmin edilen vasküler endotel büyüme faktörün (VEGF) PAH'lı olgularda pleksiform lezyonlarda ekspresyonunun arttığı göstermişlerdir. VEGF biyoaktivitesini VEGFR-1 ve VEGFR-2 isimli tirozin kinaz reseptörleri aracılığı ile gösterilmiştir. VEGF izoformlarından VEGF-A'nın pulmoner hipertansiyon gelişiminde koruyucu rolü olduğunu gösteren ve pulmoner vasküler yeniden şekillenmeden VEGF-B' nin sorumlu olduğunu destekleyen hayvan modelli çalışmalar bulunmaktadır. İdiyopatik PAH olgularında VEGFR-1 ekspresyonu artmışken, pleksiform lezyonlarda VEGFR-2' nin eksprese edildiği gösterilmiştir.

Morse ve ark (2002), kemik morfogenetik protein reseptörü 2 geni (BMPR 2) mutasyonunun olup olmadığını belirlemek için pulmoner hipertansiyon ve skleroderma spektrumu olan hastalarda primer pulmoner hipertansiyon rapor etmişlerdir. Pulmoner hipertansiyon ve skleroderma spektrumu olan 24 hastada ve 2 kontrol grubu, 96 sağlıklı Kuzey Amerika bireylerinde ve 100 İsrailli Aşkenaz Yahudilerinde BMPR 2 gen mutasyonları nükleik asit sekans yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hastalar da antinükleer antikor tayini ve sağ kalp kateterizasyonu uygulanmıştır.

Lingling ve ark (2003), biyokimyasal, genetik ve klinik açıdan küçük akciğer damarları çevresinde ki düz kas proliferasyonun pulmoner hipertansiyon patogenezinde önemli bir parçası parçası olduğunu göstermişlerdir. Kemik morfogenetik protein reseptörü tip 2 mutasyonlar (BMPR 2), fakat pulmoner hipertansiyon ailesel olgularla bağlantılıdır, ailesel olmayan formların ise moleküler temeli bilinmemektedir.

Manes ve ark (2003), PPH'ın ailesel formu için genetik kusurları ve ailesel oluşumu tespit etmişlerdir. Kemik morfogenetik protein reseptörü 2 (BMPR 2) genini kodlayan bu mutasyonda anjiyogenez, vasküler farklılaşma, akciğer organogenez, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik fonksiyonları yer aldığını göstermişlerdir.

Özol ve Erdinç (2004), primer pulmoner hipertansiyonun (PPH), nadir görülen ve etyolojisi net olarak belirlenememiş bir hastalık olduğunu tespit etmişlerdir. Hastalığın tanısı öncelikle diğer sebeplerin dışlanması ile konulmaktadır. Ciddi pulmoner hipertansiyon, fiziksel aktiviteyi kısıtlayan, beklenen yaşam süresini azaltan ve tedavisi oldukça zor olan bir hastalıktır. Bu derlemede, PPH'nin klinik bulguları ve bu hastalığın gelişiminde rol oynayabilecek risk faktörleri ve ilişkili durumlar gözden geçirilmiştir.

Roberts ve ark (2004), BMPR 2 geni iki kohortlarında gösterilmiştir; 40 yetişkin ve PAH / KKH ile 66 çocuk. CHDs patent duktus arteriyozus, atriyal ve ventriküler septal defekt, parsiyel pulmoner venöz dönüş anormalisi, büyük arter, atriyoventriküler kanal transpozisyonu ve sistemik-pulmoner şantta nadir lezyonlar saptanmışlardır. Kemik morfogenetik protein reseptörü 2 mutasyonları yetişkin ve çocuklarla yapılan karma grupta pulmoner hipertansiyon/konjenital kalp defekti %6 oranında bulunmuştur. Kemik morfogenetik protein üyelerinin fare modellerinde/septal defekt ve konotrunkal konjenital kalp kusurlarının insan atrioventriküler kanalları kalp anormalileri içeren büyüme faktörü-β da benzer yolla dönüştürülmesi mevcut bulgulardır. Çalışılan hasta sayısının azlığı ve pulmoner arteryel hipertansiyon tespiti seçimi konusunda daha fazla araştırma gerektirmektedir.

Nicolls ve ark (2005), otoimmunite ile pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) arasındaki ilişki 40 yıldan fazla bir zamandır bilinmektedir, fakat otoimmun zararın bu hastalık patogenezine ne şekilde katkı yapabildiğini, yalnızca olguya spesifik şekilde incelemişlerdir.

Barreto ve ark (2005), son yıllarda pulmoner arteryel hipertansiyon (PAH), pulmoner hipertansiyon patofizyolojik mekanizmalarının anlaşılması bu konuya olan ilgi artmıştır. Zamanla idiyopatik PAH (ailesel ve sporadik, daha önce primer

pulmoner hipertansiyon olarak adlandırılır) ile ilgili olduğu ve genle ilgili olan değişiklerin BMPR 2 ile ilişkili olduğu belirlenmişlerdir. Diğer genler kolaylaştırıcılar (serotonin taşıyıcı) olarak tespit etmişlerdir.

Satoh ve ark (2005), karışık bağ doku hastalığı (MCTD) olan hastalarda BMPR 2 veya benzer reseptör ALK-1 (aktivin karşıtı otoantikorkinaz 1) PAH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmada PAH olmayan 37 MCTD hasta ve idiopatik PAH olan 6 hasta ile birlikte 30 hasta ve 30 sağlıklı kontrol grubu kullanılmıştır. İmmüneflorosan tekniği kullanılarak anti-BMPR 2 antikorları ve anti ALK 1 antikorları kültürlü hücrelerden indirekt immunflorasan tarafından üretilen rekombinant antijenleri immunopresipitasyon kullanılarak saptanmıştır. Sonuç olarak; anti-BMPR 2 ve anti- ALK 1 otoantikorlar PAH dan bağımsız MCTD hastalarında değil idiopatik hastalarında gözlemlenmiştir. Bu durumda BMPR 2 veya ALK 1 antikor aracılığı sinyallerinin düzensizliği bağ dokusu hastalığı olan hastalarda PAH gelişimi hipotezini desteklediğini göstermişlerdir.

Mouthon ve ark (2005), pulmoner arteryel hipertansiyon (PAH) küçük pulmoner arter endotel hücre, damar düz kas hücre ve fibroblast disfonksiyon ve çoğalması nedeniyle kronik tıkanması sonucu olarak ortaya çıkan nadir bir durum olduğu belirtilmiştir. Endotelin-1 gibi vasoconstrictorun aşırı ekspresyonu ile birlikte, pulmoner arteriel endotel disfonksiyonu kronik olarak bozulmuş nitrik oksit ve prostasiklin gibi vazodilatörlerin kararlı bir şekilde üretimine neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarına göre; genetik çalışmalarda ailesel ve idiyopatik PAH hastaların bir kısmı kritik bir rol oynayan gen mutasyonları germline kemik morfogenetik protein reseptörü tip II (BMPR 2) de kesinlikle kodlama göstermiştir.

Nicholas (2006), ailesel pulmoner arteryel hipertansiyon (FPAH) genetik çalışmalar kemik morfogenetik protein tip II reseptör (BMPR 2), transforme edici büyüme faktörü (TGF) -ß/bone morfogenetik protein (BMP) reseptör heterozigot germline mutasyonlarını ortaya koymuşlardır. PAH myofibroblast ve düz kas proliferasyonu küçük pulmoner arterlerin yoğun yapılanması ile karakterizedir. Pulmoner arter düz kas hücrelerinde BMPR 2 mutasyon BMPs ve TGF-ß anormal büyüme yanıtları katkıda bulunur. Muhtemel mekanizma BMP ve TGF-ß-regüle Smad yollar arasında bir etkileşim içerdiğini belirlemişlerdir.

Callaghan ve ark (2006), pulmoner hipertansiyon, özellikle sistemik skleroz, sistemik otoimmün hastalıklarda tanınmış klinik bir bileşenidir. Ailesel ve sporadik primer pulmoner hipertansiyon olan kemik morfogenetik protein reseptörü 2 (BMPR 2) genindeki mutasyonlar ya skleroderma spektrum hastalığı ya da bir bağ dokusu hastalığına bağlı olarak yatan hastalarda tespit edilmesinin başarısız olduğu görülmüştür. Aktivin reseptör-kinaz gibi 1 (ALK-1) geni son zamanlarda CREST sendromu ile bazı benzerlikler olan herediter hemorajik telenjiektazi, hastalarda pulmoner hipertansiyon patogenezi ile bağlantılı olmuştur. Bağ dokusu hastalığına bağlı olarak yatan on hastada ALK-1 geninde mutasyon varlığı araştırılmıştır.

Jones ve ark (2008), BMPR 2 mutasyonları için klinik genetik testler kullanılabilir olduğu belirlenmişlerdir. Bu çalışmanın amacı PAH genetik testleri ile bireylerin etkilenme tutumunu değerlendirmektir. Yapılan çalışmada %20 PAH hastasının BMPR 2 mutasyonundan etkilendiği belirlenmiştir ve bu hastalık tedavisi için önemlidir.

Alan ve Nalbantgil (2010), PAH'ta genetik geciş olabileceği ilk kez 1954'te Dresdale tarafından gündeme getirilmiştir ve Alan ve Nalbantgil kalıtsal geçiş otozomal dominant olup, değişken ve tam olmayan ekspresyon gösterdiği üzerine araştırma yapmışlardır. Kadın:erkek oranı 1.7:1 olarak bildirilmektedir. Kadınlarda olan yatkınlık BMPR 2 mutasyonun hormonlar gibi diğer çevresel faktörlerden etkilendiğini düşündürmektedir. PAH olgularının yalnız %6'sında aile anamnezi mevcuttur. Değişken ve komplet olmayan mutasyon idiyopatik olgularda, ailesel geçişi maskelediğine veya 'de novo' mutasyonların olabileceğine inanılmaktadır. Heterozigot BMPR 2 mutasyonu fenfluramine bağlı ve konjenital kalp hastalığına gelişen PAH olgularının ufak bir bölümünde saptanmışlardır. Skleroderma olgularında ise PAH ile bu gen arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Jardim ve ark (2010), yapmış oldukları çalışmaya göre kemik morfogenetik protein reseptörü (BMPR) 2 mutasyonlarına sahip hastaların %70'inde ailesel PAH oluşur. Buna ek olarak, PAH aile öyküsü (bu tip olguların %40) olanlarda bir mutasyon olgusu da bulunabilir. Böylece, buna 'kalıtsal PAH' yerine 'ailevi PAH' demek daha uygun olmaktadır. BMPR 2 ve aktivin reseptör kinaz-1 veya endoglin gibi bu alt grup olarak tanımlanan mutasyonlar olarak kabul edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji kliniğine 2011 yılında başvuran *sklerodermа* hastalarından tam kan örneği alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Skleroderma hastalarında BMPR 2 ekspresyon düzeyi saptanarak klinik seyri ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan kan örnekleri 9 mL'lik EDTA'lı tüplere alınmıştır. Kan örneklerinden lökositleri ayırmak için eritrosit paçalama tamponu (Red Blood Cell Lysing Buffer, ROCHE katalog no; 11814389001) kiti kullanılmıştır. Eritrositlerin parçalanması için çalkalayıcı (shaker) cihazı kullanılmıştır.



Şekil.3.1. Çalkalayıcı (shaker) cihazı

Lökosit hücrelerinden mRNA izolasyonu için yüksek saflıkta RNA izolasyon kiti (high pure RNA isolation kit, ROCHE katalog no; 11828665001) kullanılmıştır. mRNA izolasyonu aşamasında Nüve marka santrifüj (ependorf tüpler için) ve karıştırıcı (vorteks) cihazı kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Vorteks cihazı



Şekil 3.3. Eppendorf santrifüj cihazı

mRNA örneklerini komplementer DNA'ya (c-DNA) çevirmek için;

-transkriptör c-DNA sentez kiti (ROCHE katalog no; 05081955001),

-kuru ısı bloğu ve thermalcycler cihazı kullanılmıştır.

-*universal probe library primer probe* dizaynı kullanılarak Lightcycler 480 Real-Time PCR cihazı ile örneklerin analizi sağlanmıştır.



Şekil 3.4. Lightcycler 480 Real-Time PCR cihaz

3.2. Metod

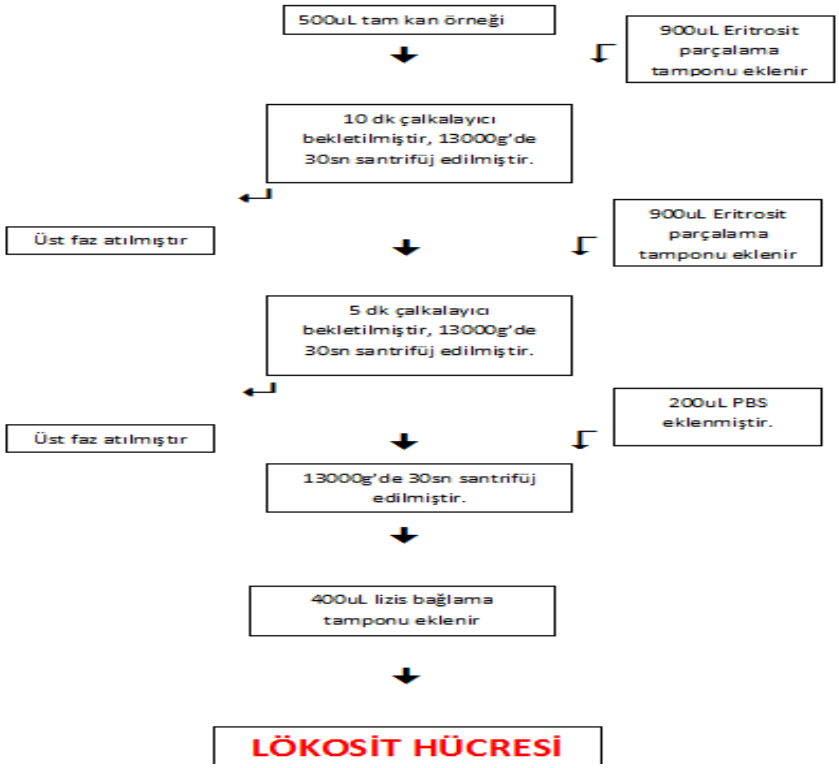
3.2.1. Örnek Toplama

Skleroderma hastalarından 7 mL kan örneği 9 mL'lik EDTA'lı tüplere alınmıştır. Alınan kanların lökositleri ayrılarak bu örneklerden mRNA izolasyonu yapılmış ve c-DNA'ya dönüştürüldükten sonra Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polimerase Chain Reaction) ile ekspresyon analizi için uygun hale getirilmiştir.

BMPR2 (Bone morphogenetic protein receptor-2) ekspresyonu aşağıda verilen sıra ile Real-Time PCR yöntemi kullanılak LightCycler 480 (ROCHE) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Kan Örneklerinden Lökositlerin Ayrılması

Hasta ve kontrollerden alınan kan örneklerinin lökosit değerleri Beckman Coulter Gen S System II cihazı ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Lökositlerin belirli bir sayıda olması, mRNA izolasyonunu kantitatif anlamda etkilemektedir bu sebeple, kullanılacak hücre sayısı 3000000/WBCX1000 formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Kanlar vida kapaklı ependorf tüp içerisine alınarak üzerine 900 µL eritrosit parçalama tamponu (ROCHE) eklenmiştir. 10 dk çalkalayıcıda (shaker) bekletilmiştir. 13.000 x*g* devirde 30 sn santrifüj edilmiştir. Üst faz dikkatli bir şekilde atılmış ve eğer tüpün dibinde beyaz çökelti oluşmamış ise tekrar 900 µL eritrosit parçalama tamponu eklenmiştir. 2 dk tüpler alt üst edilerek santrifüj aşaması tekrar uygulanmış ve üst faz atılmıştır. Daha sonra 200 µL PBS (Phosphate Buffered Saline: Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solüsyonu) eklenmiş ve karıştırılmış 13.000 x*g* devirde 30 sn santrifüj edilmiştir. Üst faz dikkatli bir şekilde atılarak çökelti üzerine 400 µL lizis binding buffer (ROCHE) ilave edilerek tüp birkaç defa alt üst edildikten sonra hücreler RNA izolasyonu yapılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

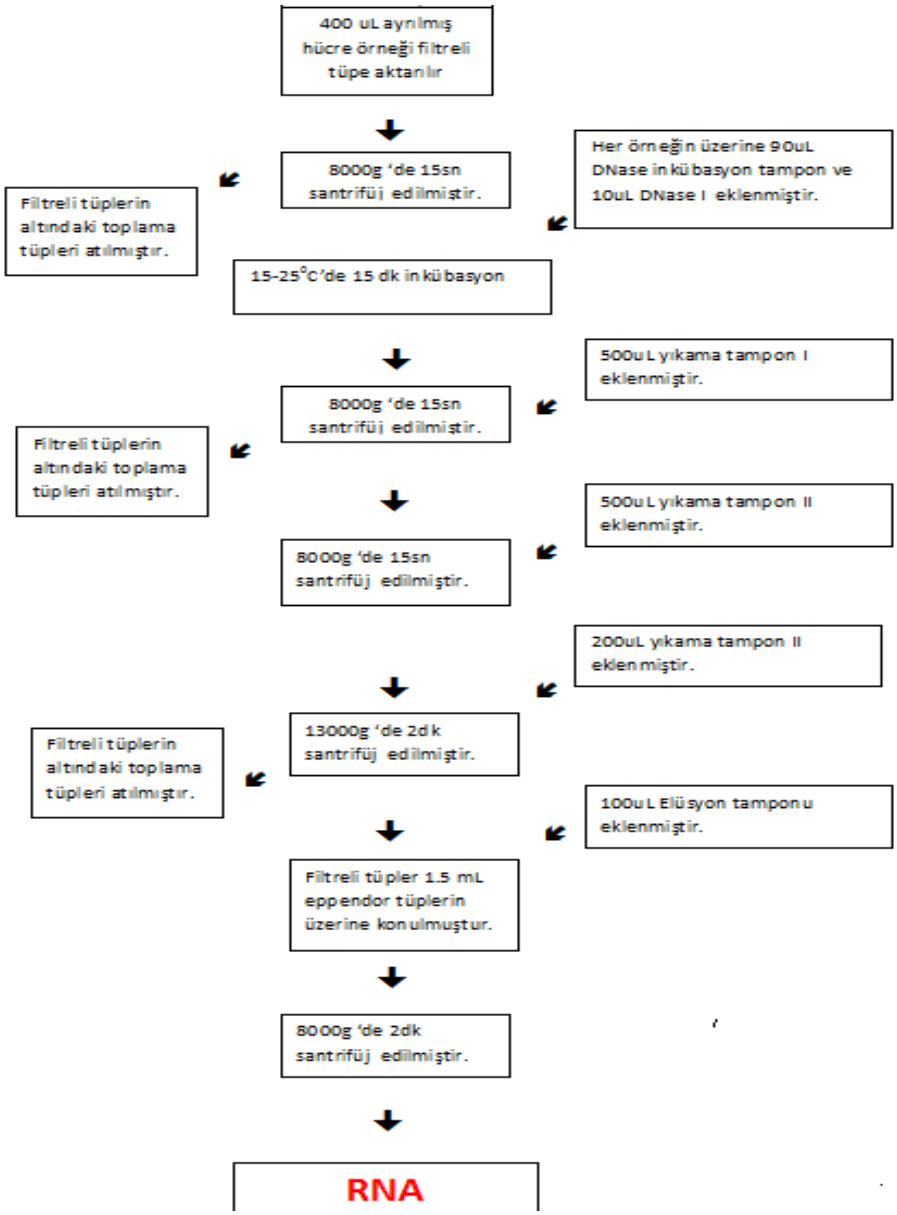


Şekil 3.5. Lökosit ayrımı şeması

3.2.3. mRNA İzolasyonu

İzolasyon yüksek saflıkta RNA izolasyon kiti (High Pure RNA isolation kit) (ROCHE) kullanılarak yapılmaktadır. Örnek sayısı kadar filtreli toplama tüpleri hazırlanarak numaralandırılmış ve hazırlanan karışım filtreli tüp içerisine konularak tüplerin kapakları kapatılmıştır. 15 sn 8000 x*g*'de santrifüj edilerek toplama tüpleri atılmıştır. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktarılarak her bir örneğe 90 µL DNaz inkübasyon buffer ve 10 µL DNaz-I eklenmiştir. 15 dk $^{+}$15-$^{+}$25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Filtreli tüplerin içerisine 0,5 mL yıkama tamponu-I ilave edilerek 15 sn 8000 x*g*'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpleri atılmıştır. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerine konulmuştur. Filtreli tüplerin içerisine 0,5 mL yıkama tamponu-II eklenerek 15 sn 8000 xg'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpleri atılmıştır. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerinin üzerine konularak filtreli tüplerin içerisine 0,2 mL yıkama tamponu-II ilave edilerek 2 dk 13000 x*g*'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpleri atılmıştır. Filtreli tüpler kapaklı 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarılmış, her

örneğe 100 µL elüsyon buffer eklenerek 1 dk 8000 x*g*'de santrifüj edilerek RNA izolasyon protokolü sonlandırılmıştır. İzolayonun tamamlanmasını takiben elüsyon tampon içerisindeki mRNA'lar -80^{0}C'de saklanmıştır.



Şekil 3.6. mRNA izolasyonu şeması

3.2.4. c-DNA Sentezi

Elde edilen RNA'ları komplementer c-DNA'ya dönüştürmek için Transkriptör First Strand c-DNA sentez kiti (ROCHE) kullanılmıştır.

Kitin içeriği;

Random primer

PCR için gerekli saflıkta su

Transkriptör revers traskriptaz reaksiyon tamponu

Koruyucu RNaz inhibitör

Deoksinükleotit karışımı

Transkriptör revers traskriptaz enzimi

Kullanıma başlamadan önce bütün solüsyonlar ve RNA örnekleri buz üzerinde tutularak çözdürülmüştür. c-DNA sentezi 2 basamakta gerçekleştirilmiştir. 1. basamakta hazırlayacağımız karışımın içeriğinde her örnek için;

2 µL random primer

1 µL PCR için gerekli saflıkta su

10 µL RNA örneği kullanılmıştır.

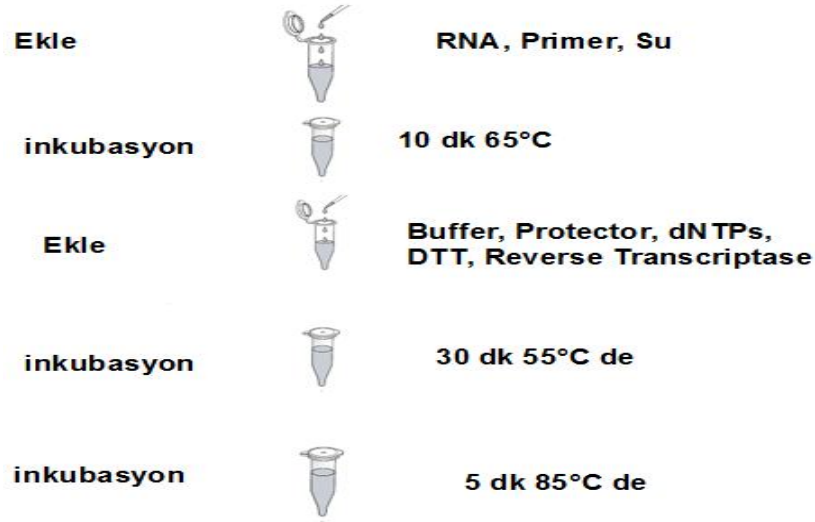
Kuru ısı bloğunda 65^{o}C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkubasyondan sonra 2. basamağa geçilmiştir. 2. basamakta hazırlanacak karışımın içeriği;

4 µL transkriptör revers traskriptaz reaksiyon tamponu,

0,5 µL korucuyu RNaz inhibitör,

2 µL deoksinükleotit karışım

0,5 µL transkriptör revers traskriptaz enzimden oluşturulmuştur.



Şekil 3.7. c-DNA sentez şeması

2. basamakta hazırladığımız karışım, 1. basamakta hazırlanan karışım (*inkübasyondan sonra buz üzerinde soğutulan*) üzerine eklenmiştir.

Karışımın son hali termalcycler cihazına yüklenmiş ve aşağıdaki protokol uygulanmıştır;

25^{o}C'de 10 dakika

50^{o}C'de 60 dakika

85^{o}C'de 5 dakika

Yukardaki ısı döngüleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiş, c-DNA sentezi tamamlanmıştır. Bu aşamadan sonra c-DNA örnekleri 1,5 mL'lik kapaklı eppendorf tüplere alınarak -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. c-DNA protokolü

3 µL H_2O
2 µL Random Hekzamer Primer
8 µL RNA

13 µL → 10 dk 65°C'de inkübe edilir.

13µL +7µ L=20 µL

4.0 µL H_2O (tüp 2)
0.5 µL (tüp 3)
2.0 µL (tüp 4)
0.5 µL (tüp 1)

7 µL → 10 dk Oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

RT-PCR'da c-DNA için aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

Protokol;

İnkübasyon	: 55°C 1 saat
Çoğaltma (amplifikasyon)	: 85°C 5 dk
Soğutma (cooling)	: 40°C 1 sn

3.2.5. Real-Time PCR Aşaması

Skleroderma Hastalarında BMPR2 ekspresyonu çalışması için gerekli cihazlar ve kitler;

-Lightcycler 480 II cihazı (ROCHE)

-Lightcycler 480 multiwell plate 96 (ROCHE kat no: 04729692001); örnekleri pipetlemek için kullanılmıştır.

-Lightcycler 480 sealing foil (ROCHE katalog no:04729757001); plate içine pipetlenen örnekleri örtmek için kullanılan şeffaf kapatıcı.

-Realtime ready catolog assay primer probe dizaynı (ROCHE kat.no: 05532957001)

-Master Mix; Lightcycler 480 probe master (ROCHE kat.no:04707494001)

-Red blood cell lysis buffer (ROCHE kat no; 11814389001)

-High pure RNA isolation kit (ROCHE kat no; 11828665001)

-Transcriptor first strand c-DNA synthesis kit (ROCHE kat no; 05081955001)
c-DNA sentezi için.

3.2.5.1. Ekspresyon Çalışması İçin İzlenilen Yöntem

Real-Time PCR da kullanılan karışım;

-4.0 µL PCR için uygun saflıkta su

-10 µL Reaksiyon enzimi (Probe master)

-1.0 µL Primer-probe karışımı (Realtime ready assay) .

-5 µL c-DNA

Real-Time PCR protokolünün ilk aşamasında;

*İnkübasyon aşaması

95ºC'de 10 dakika DNA polimerazın aktive olması için bekletilmiştir.

*Amplifikasyon aşaması

3 aşamada gerçekleştirilmiştir, aşağıdaki döngü 45 defa tekrarlanmıştır.

1.Basamak; 95ºC'de 10 saniye DNA'nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi (denatürasyon)

2.Basamak; 60ºC'de 30 saniye primerlerin bağlanması (annealing)

3.Basamak; 72°C'de 1 saniye DNA zincirinin uzaması (elongation) sağlanmıştır.

*Soğutma aşaması;

40ºC'de 30 sn bekletilmiştir.

Bu işlemler Lightcycler 480 II Real-Time PCR cihazı (ROCHE) ile gerçekleştirilmiştir. Değerlendirilme cihazın kesin kantitasyon analiz kısmında yapılmıştır. Bu yöntemler ve kullanılan standart değerleri her bir hasta için optimize edilmiş ve standartlardan yola çıkarak kantitatif sonuçlar hesaplanmıştır.

Real-Time PCR çalışması için her bir örnek için önceden PCR tüplerine hazırlanmış olan 10 µL RNA dan elde edilen c-DNA'lar -20°C'den çıkartılarak oda ısısına getirilmiştir. Real-Time PCR çalışması için reaksiyonda kullanılacak olan karışım 1,5 mL'lik eppendof tüpler içerisinde hazırlanmıştır.

Reaksiyon karışımının hazırlanması;

H_2O	4 µL
Probe master	10 µL
Primer-probe	1 µL
Toplam karışım hacmi	15 µL
c-DNA	5 µL

Multiwell plate içerisine her bir örnek için 15 µL karışım ve karışımın üzerine 5 µL c-DNA eklenmiştir, cihaza yükleme yapılmıştır.

Örnekleri cihaza yükleme aşamasında çalışmaya özgü protokol oluşturulmuştur (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Real-Time PCR protokolü

PROGRAM	döngü	mod
Ön inkübasyon	1	NONE
sıcaklık	mod	zaman
95	NONE	10DK
PROGRAM	döngü	mod
Çoğaltma	45	miktar saptama
sıcaklık.	mod	zaman
95	NONE	10SN
60	NONE	30SN
72	SINGLE	1SN
PROGRAM	döngü	mod
Soğutma	1	NONE
sıcaklık.	mod	zaman
40	NONE	30SN

None: cihazın okuma yapmadığı mod, single: cihazın okuma modu

Çalışmada kullanılan farklı sıcaklıklar ve nedenleri;

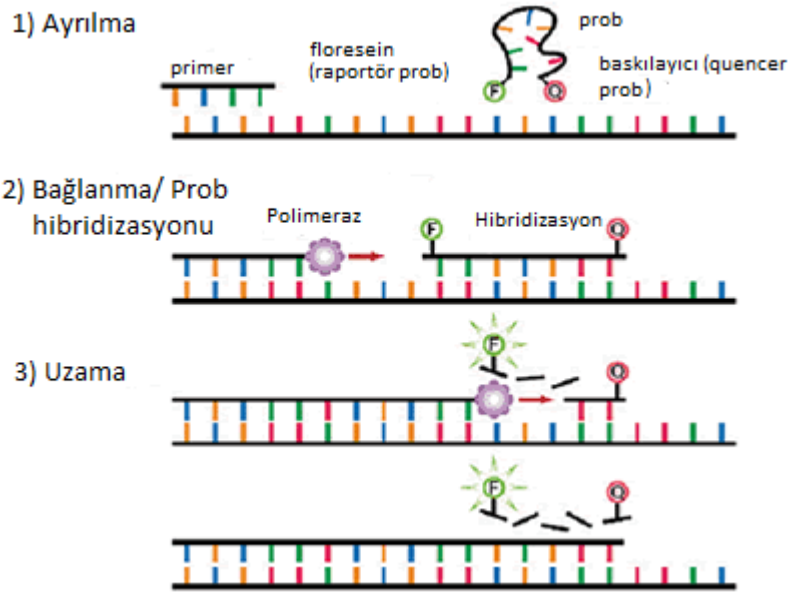
1-95°C'de 10 dakika bekletilerek ortamdaki DNA polimerazın aktif hale geçmesi sağlanmıştır.

2-95°C'de 10 sn, amplifikasyon programı başladığında c-DNA'lar tek iplikli hale geçirilmiştir.

3-60°C'de 30 sn çoğaltılması istenilen spesifik bölgeye uygun primerlerin bağlanması sağlanmıştır.

4-72°C'de 1 sn; Primerlerin uzaması aşamasıdır. *Buradaki single modu okuma yapılacağı anlamına gelmektedir.*

5-40°C'de 30 sn soğutma aşamasıdır, kullandığımız ürünleri cihazdan çıkarabilmemiz için soğutma modu uygulanmıştır.



Şekil 3.8. Taqman Prob Metodu

Çalışma sonucunda çıkan sonuçların amplifikasyon eğrileri gözlemlenerek kantitatif modda crossing point (Cp) değerleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmada hem referans gen hemde hedef gen olduğu için, çıkan sonuçlar aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Formülde veriler yerine konulduğunda çıkan sonuç ekspresyon düzeyi saptanmıştır.

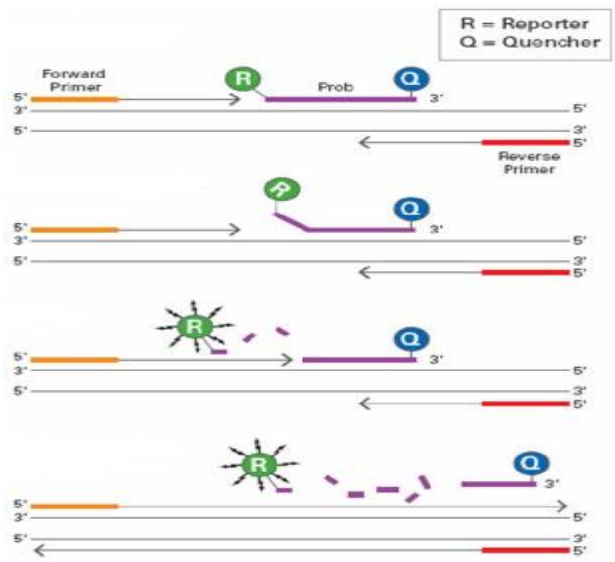
$$\frac{\text{Hedef gen (BMPR2)}}{\text{Referans gen (Beta actin)}} \qquad (3.1.)$$

Referans gen ekspresyon düzeyi ve BMPR2 gen ekspresyon düzeyi aynı zamanda, Lightcycler 480 Real Time PCR cihazında (ROCHE) incelenmiştir. Çalışmada skleroderma hastaları kullanılmış, primer-prob seçimleri özgül olmayan

bağlanmayı engelleyecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında Beta actin referans geni ve BMPR2 hedef gen bölgesine özgü primerler sentezletilmiştir.
c-DNA'lar Real-Time PCR tekniği ile taqman prob yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu amplifikasyon sırasında çift zincirli DNA taqman prob yöntemi kullanılmıştır.

3.2.6. Taqman Prob Yöntemi

Hedefe özgül problar kullanılmıştır. Bu testte problarla testin özgüllüğü artırılmıştır. Problardan biri 3' ucundan floresans boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya ile işaretlenmiştir. Problar hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. "Fluoresance resonance energy transfer (FRET)" olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir ifade ile PCR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır.



Şekil 3.9. Polimerizasyon (R; Florokrom (raportör floresein) prob Q; Baskılayıcı (quencer) kromofor).

Taqman sisteminde 5’ ve 3’ uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob’un 5’ ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein=6-FAM), 3’ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine =TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek iplikli hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3’ uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob’un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için taq DNA polimeraz enzimi 5’→3’ nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5’ uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır.

LC 480 cihazı, amplifikasyon eğrisi analizi özelliği ile primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi hataları gözlemlemeye de olanak sağlamaktadır. RT-PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla herhangi bir skleroderma hastasından elde edilen c-DNA örneğinden 1/10, 1/100 ve 1/1000 şeklinde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır ve ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında analiz programı ile standart eğriler çizilmiştir. Deneylerde tüm c-DNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3’er kez çalışılarak bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanılmıştır. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır. Seçilen zaman noktalarında eksprese olan housekeeping gen miktarı ve BMPR 2 ekspresyon düzeyi belirlenmiştir.

3.3. Verilerin Analizi

Bu çalışma süresince yapılan tüm deneyler, ölçümler, incelemeler ve değerlendirmelerde skleroderma hastalarından alınan örnek ile housekeeping gene (referans gen, Beta actin) ve hedef gen (target gen, BMPR2) değerlendirmesi yapılmıştır. Real- Time PCR ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi, *LightCycler® 480 Software Version 1.5* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin

crossing point (Cp) değerlerinden yola çıkarak cihaz konsantrasyon değerlerini hesaplamıştır ve veriler bu datalara göre hesaplanmıştır. Crossing point değeri örneğin DNA yoğunluğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir.

Sonuçlar crossing point değerleri doğrultusunda konsantrasyon belirleme yöntemi ile hesaplanmıştır. Bu yöntemde önce hasta ve kontrol grubu örneklerinin ortalama konsantrasyon değerleri hem beta actin hemde BMPR2 için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Daha sonra BMPR2 geninin ekspresyon düzeyinin ortalama değeri beta actin geninin ekspresyon düzeyinin ortalama değerine oranlanarak, ayrı ayrı hasta ve kontrol gruplarının konsantrasyon değeri ve bunlara ait standart sapma değeri hesaplanmıştır. Beta actin gen ekspresyon düzeyleri internal kontrol olarak kullanılmıştır ve hasta sonuçları buna bağlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada 20 skleroderma hastası ve 29 kontrol grubu kullanılmıştır. Tüm hastalardan tam kan örneği alınarak çalışma yapılmıştır. Hastalardan alınan tam kan örnekleri EDTA'lı tüpe alınmış ve gerekli işlemlerden geçirildikten sonra Real-Time PCR yöntemiyle ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

Literatür bilgilerine göre skleroderma hastalığına yakalanma insidansı kadınlarda erkeklere oranla daha yüksektir ve bu araştırmaya dahil edilen bireylerin çoğunluğu bayanlardan oluşmaktadır (*18 bayan, 2 erkek, toplam 20 hasta*).

4.1. Beta Actin (Housekeeping Gen, Referans Gen) ve BMPR2 Geninin Ekspresyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Beta actin geni ve BMPR2 geninin ekspresyon düzeyleri aşağıdaki basamaklarda incelenmiştir;

Hastalardan alınan kan örneklerinden hücre ayrımı (lökositler ayrılmıştır) yapıldıktan sonra hücrelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Real-Time PCR ile DNA amplifikasyonu yapabilmek için öncelikle RNA örnekleri c-DNA'ya çevrilmiştir. c-DNA örnekleri Real-Time PCR işlemi ile çoğaltılmıştır.

Real-Time PCR işlemi yapılırken hasta örneği için bir referans gen (housekeeping gene) bir de BMPR2 ekspresyon düzeyi ölçümü yapılmıştır.

Referans gen, her insanda bulunan ve eksprese olan gendir.

Referans gen sayesinde izolasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemleyip çalışmanın doğruluk derecesi belirlenmiştir.

Genlerin ekspresyonlarının kantitatif analizi için standart örnek hasta örnekleri içerisinden seçilmiştir. Yani Real-Time PCR ile analiz edildiğinde amplifikasyon veren örnek standart alınmıştır. Standart (ST) örnekten 1/10, 1/100, 1/1000 gibi oranında seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Standart ve dilüsyonların konsantrasyonları aşağıda varsayılan birimlerle ifade edilmiştir;

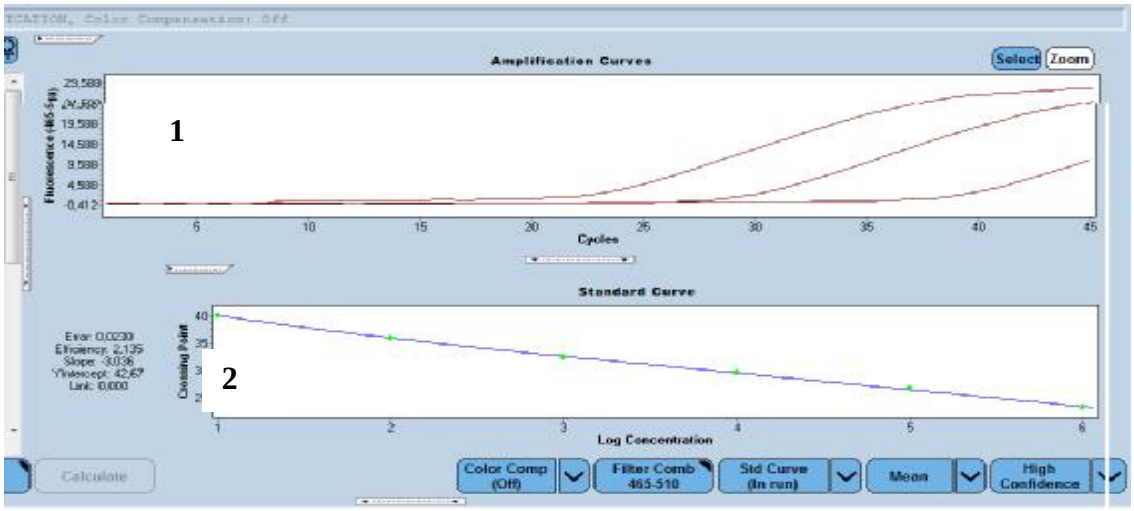
ST=1, **ST**-1=10, **ST**-2= 100, **ST**-3=1000 **ST**-4=10000 **ST**-5=10000 **ST**-6=100000 şeklinde seri dilüsyonlar yapılmıştır.

Amplifikasyon sırasında standartların Cp değerleri belirlenmiş ve varsayılan konsantrasyonlarla standart eğriler elde edilmiştir. Örneklerin Cp değerlerinin standart eğri ile karşılaştırılarak ekspresyon miktarının göreceli olarak belirlenmesi işlemi Light Cycler 480 cihazı, software version 1,5 ile gerçekleştirilmiştir. ***Cp değeri:*** *Real-Time PCR sırasında örneğin flörasan ışığı etkisiyle içerdiği DNA yoğunluğuna göre verdiği pikler dolayısıyla oluşmaktadır. .*

4.1.1. Beta Actin Gen Ekspresyonu Bulguları

Beta actin ekspresyonunun kantitatif analizinde skleroderma hastalarından elde edilen c-DNA ile hazırlanan standartların ve örneklerin amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür, Crossing point (Cp) değerlerinin doğruluğu ile standart eğri oluşturulmuştur ve cihaz örneklerin konsantrasyon değerlerini standartlar için belirlenen konsantrasyon değeri ile Cp değerlerini karşılaştırarak hesaplamıştır.

Cihaz standart eğriyi örneklere verilen konsantrasyon değerlerine göre otomatik olarak çizmektedir. Standartların crossing point değerlerine göre Şekil 4.1'de verilen ve 2 nolu grafikte gösterilen yeşil noktalar standart eğri oluşumu için otomatik olarak cihaz tarafından yerleştirilmiştir. Cihaz tarafından yerleştirilen yeşil noktalar doğrultusunda standart eğri oluşturulmaktadır. Standart eğrinin noktaların tam üzerinden geçmesi çalışmanın optimizasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir. Ayrıca hata oranı (cihaz üzerinde belirtilen error) değeri sıfıra ("0") yakın olmalıdır. Standart eğrinin doğru olması çalışmanın doğruluk derecesini önemli derecede etkilemektedir, çünkü hasta sonuçları standart eğride belirlenen konsantrasyon değerlerine göre hesaplanmaktadır.

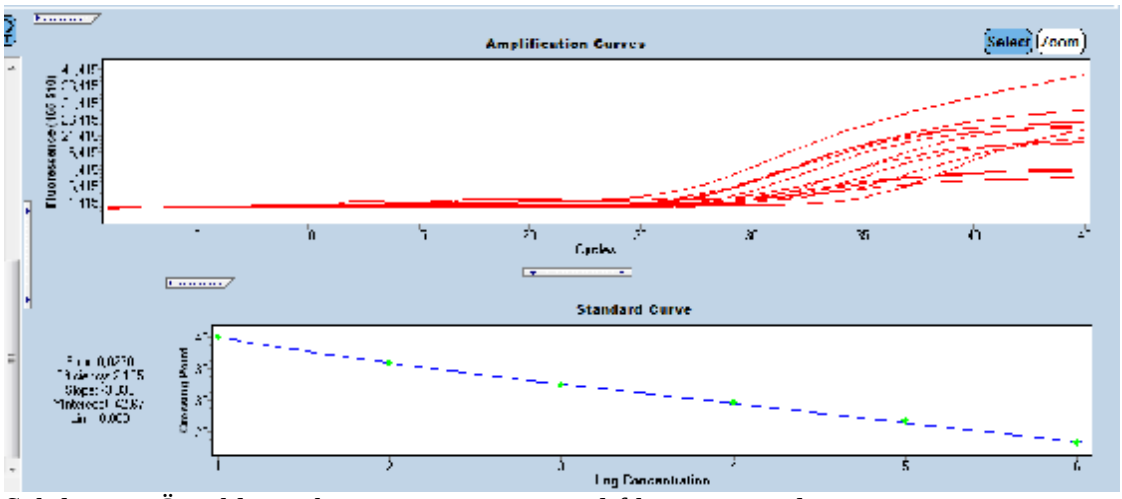


Şekil 4.1. Standart eğri grafiği

1-Standart dilüsyonlar için, gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri.

2 Standart dilüsyonların Crossing point (Cp) değerleri ve standartlara verilen (dilüsyon oranları gözönünde bulundurularak) değerler kullanılarak elde edilen standart eğri.

Cihaz tarafından çizilen standart eğri için hata oranı sıfıra yakındır ve standart eğri uygun şekilde oluşturulmuştur. Standart eğri uygun olduğu için örnekler standart eğriye göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.2. Örneklerin beta actin geni amplifikasyon eğrileri ve crossing point sonuçlarına göre konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi

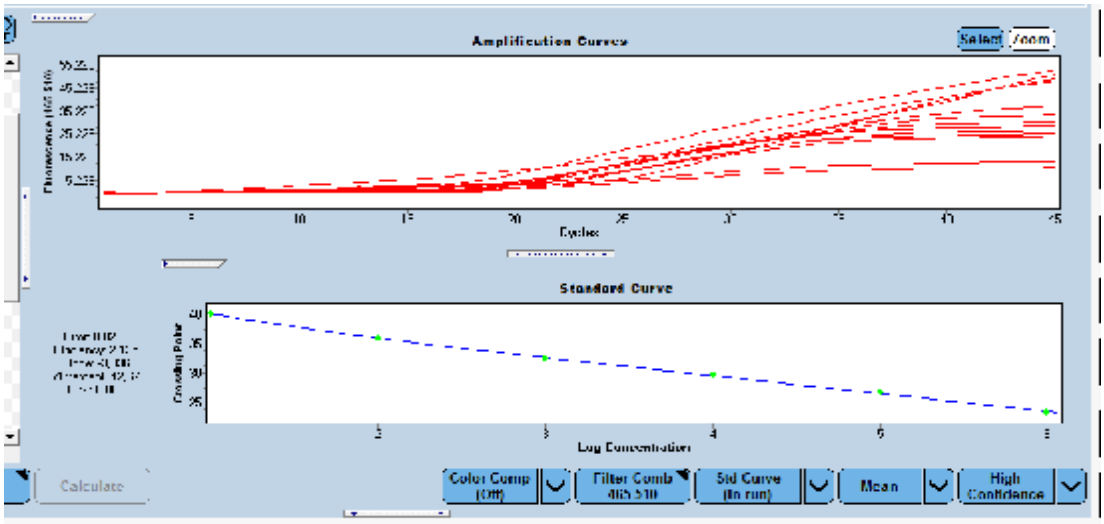
Referans gen olarak kullanılan beta actin geni için belirlenen konsantrasyon değerleri şekil 4.2.'deki crossing point değerlerine bağlı olarak değişkenlik

göstermektedir. Çalışmaya dahil edilen tüm örneklerin amplifikasyonu başarı bir şekilde gerçekleşmiştir. Amplifikasyon eğrilerini dikkate alacak olursak her örnek 40. döngüden önce DNA yoğunluğuna bağlı olarak yükselmeye başlamış yani crossing point değeri vermiştir. 40. döngüden sonra amplifikasyon eğrileri yükselmemiştir çünkü DNA yoğunluğu tespit edilemeyecek düzeyde veya DNA bulunmamaktadır, bu durumda örnek negatif kabul edilmiştir.

Çalışmada hem hasta grubu hemde sağlıklı kontrol grubu için Beta actin geni çalışılmış ve konsantrasyon değerleri her örnekte farklılık göstermiştir. Hasta grubu için Beta actin geni için ortalama konsantrasyon değeri 28.649.400, sağlıklı kontrol grubu için Beta actin ortalama konsantrasyon değeri ise 38.420.241 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre hasta grubunda Beta actin gen ekspresyon düzeyinde, konsantrasyon değeri sağlıklı bireylere oranla yaklaşık %10 azalmıştır.

4.1.2. BMPR2 Gen Ekspresyonu Bulguları

BMPR2 geni ekspresyonunun kantitatif analizinde skleroderma hastalarından elde edilen c-DNA ile hazırlanan standartların ve örneklerin referans gen ve hedef gen amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. Örneklerin BMPR2 geni amplifikasyon eğirleri ve crossing point sonuçlarına göre konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi

BMPR2 geni için belirlenen konsantrasyon değerleri şekil 4.3.'teki crossing point değerlerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Çalışmaya dahil edilen tüm örneklerin amplifikasyonu başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Amplifikasyon eğrilerini dikkate alacak olursak her örnek 40. döngüden önce DNA yoğunluğuna bağlı olarak yükselmeye başlamış yani crossing point değeri vermiştir.

Çalışmada hem hasta grubu hemde sağlıklı kontrol grubu için BMPR2 geni çalışılmış ve konsantrasyon değerleri her örnekte farklılık göstermiştir. Hasta grubu için BMPR2 geni için ortalama konsantrasyon değeri 20.044,45 sağlıklı kontrol grubu için BMPR2 gen ortalama konsantrasyon değeri ise 39.362,07 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre hasta grubunda BMPR2 geni konsantrasyon değeri sağlıklı bireylere oranla yaklaşık %19 azalmıştır.

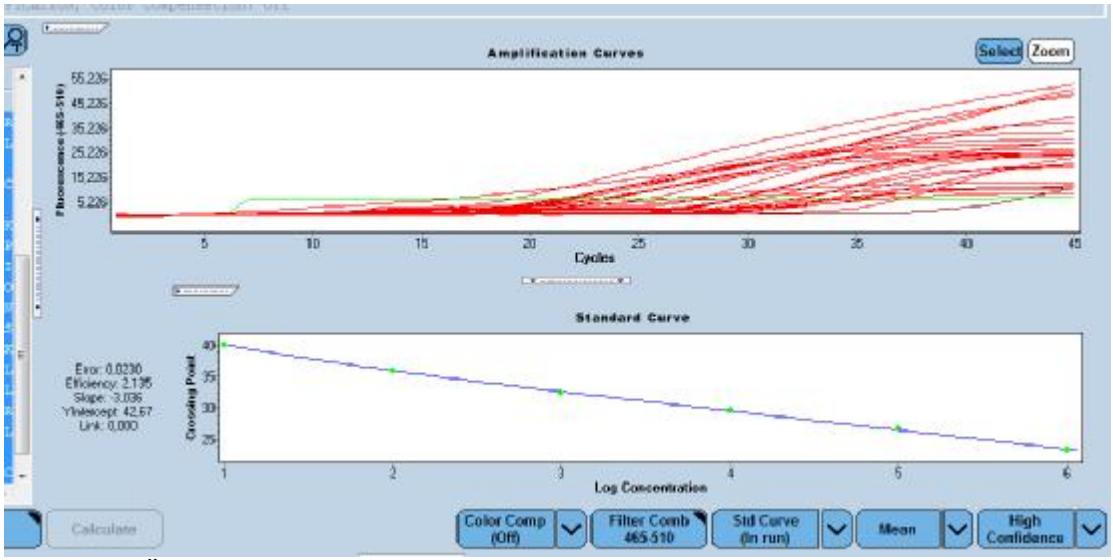
Skleroderma hastalarında BMPR2 geninin ekspresyon düzeyinde azalma dikkat çekmektedir.

4.1.3. BMPR2 Gen Ekspresyon Bulgularının Referans Gen İle Oranlanması

BMPR2 geni ekspresyon düzeyini belirlemek için çalışma esnasında hastanın hem referans gen (house keeping gene) hem de BMPR2 gen bölgesi taranarak amplifikasyon eğrileri ve çalışma sonucunda oluşan konsantrasyon değerleri kıyaslanarak sonuca varılmıştır. Housekeeping gene ile BMPR2 geni birbirine oranlanarak ekspresyon düzeyleri belirlenmiştitr. Burada house keeping gen internal kontrol olarak kullanılmıştır. House keeping gen çalışmadığı taktirde izolasyon aşamasında veya c-DNA'ya çevirme aşamasında bir problem olabileceği düşünülerek örnek değerlendirmeye alınmamıştır.

Cihaz herhangi sayısal değer veren örneklerin amplifikasyon eğrisini kırmızı olarak belirlemiştir ve bu durum ortamda DNA olduğunu göstermektedir yani örnekler pozitif olarak sınıflandırılmıştır. Şekil 4.4.'de örneklerin içerisinde yeşil renkte görünen amplifikasyon eğrisi ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrolün bu tür araştırmalarda mutlaka çalışmaya dahil edilmesi gerekmektedir.

Çünkü herhangi bir kontaminasyon olup olmadığını saptamak çalışmanın güvenliği ve güvenilirliği açısından önem arzetmektedir.



Şekil 4.4. Örneklerin beta actin geni ve BMPR2 amplifikasyon eğirleri ve crossing point sonuçlarına göre konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi

Örneklerin sonuçları hesaplanmadan önce amplifikasyon eğrileri ve her bir örneğin Crossing point değerlerinin istenilen düzeyde olup olmadığı kontrol edilmiştir. Daha sonra örneklerin crossing point sonuçlarına göre belirlenen konsantrasyon değerleri ile sonuçlar elde edilmiştir. Bu konsantrasyon değerini hesaplamak için çalışmaya aynı anda dahil edilen hedef genin konsantrasyon değeri ile referans genin konsantrasyon değeri birbirine oranlanmıştır. Cihazın hesaplamış olduğu konsantrasyon değerleri her örnek için; referans gen ve hedef gen birbiri ile doğru orantılıdır. Sonuçları değerlendirmek için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

BMPR2 Gen /Referans gen (Beta actin) = BMPR2 gen ekspresyon düzeyi (4.1.)

Çalışmada Beta actin ve BMPR2 genleri için belirlenen ortalama konsantrasyon değerlerine göre genel ortama değerlerini göz önüne aldığımız zaman Beta actin geni ile hasta grubu için belirlenen konsantrasyon değeri sağlıklı kontrol grubuna oranla %10 azalma göstermektedir. BMPR2 geni ile hasta grubu düzeyleri ve sağlıklı kontrol grubu düzeyleri karşılaştırlıdığı zaman, hasta grubu kontrol grubuna oranla %19 azalma göstermektedir.

Örnekler çalışmaya aynı anda dahil edildiği için hasta ve kontrol grubu konsantrasyon düzeylerinin azalma oranının birbiri ile yaklaşık olarak aynı oranda azalması beklenirken, BMPR2 geninin konsantrasyon düzeyinin hasta grubuna oranla beklenen düzeyden %9 oranında daha fazla azaldığı gözlenmiştir.

Konsantrasyon değerleri ve gen ekspresyon düzeyleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Skleroderma hasta grubu Real-Time PCR ekspresyon sonuçları

Hasta	BMPR2 Hedef gen[a]	BETA ACTIN Referans gen[b]	Hedef gen/referans gen BMPR2/Beta actin gene[c]
1	431	67300000	0,0000064042
2	5620	5730000	0,000980803
3	9260	17700000	0,000523164
4	3220	9040000	0,000356195
5	27800	34900000	0,000796562
6	56700	60700000	0,000934102
7	21300	34700000	0,000613833
8	4800	11500000	0,000417391
9	42100	36500000	0,001153425
10	84600	125000000	0,0006768
11	80900	64900000	0,0012465331
12	178	318000	0,000559748
13	13300	13500000	0,000985185
14	6430	6180000	0,0010404531
15	9180	15200000	0,0006039474
16	9810	12400000	0,0007911290
17	4560	5280000	0,0008636364
18	8170	34600000	0,0002361272
19	3890	3240000	0,0012006173
20	8640	14300000	0,0006041958

[a]: Target, [b]: House keeping gene, [c]: Target/ House keeping gene

Çalışmada hastalara ait kanlarla yapılan konsantrasyon düzeyi ölçümü sonucunda ortalama ekspresyon değeri 0,0007295126 (yaklaşık %0,07) olarak bulunmuştur.

Hasta ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla her bir hasta örneği için hem referans gen (Beta actin geni) hem de hedef gen (BMPR2) aynı anda çalışmaya dahil edilmiştir.

Hasta ekspresyon düzeyleri belirlenirken yapılan işlem her bir hasta örneği için aynı çalışma içerisinde hem referans gen (Beta actin gen) hemde hedef gen (BMPR2) aynı anda çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta sonuçları değerlendirilirken her hasta örneğinin öncelikle referans geninin çalışmış olduğu ve Crossing point değerlerinin doğru aralıkta olduğu saptanmıştır. Hedef gen konsantrasyon değeri referans genin konsantrasyon değerine oranlanmış ve buna göre BMPR2 geni ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

Çalışmada referans gen aynı zamanda internal kontrol olarak kullanılmıştır. Eğer çalışmanın herhangi bir aşamasında sorun varsa referans gen çalışmaz ve bu durumda hasta sonucu değerlendirmeye alınmaz. Çünkü referans gen, ortamda DNA varsa mutlaka reaksiyona gireceğini bildiğimiz yani çalışma datalarına göre konsantrasyon değeri vereceğine emin olduğumuz kontrol gendir. Bu nedenle ilk önce referans genin çalışmış olduğu kanıtlanmış olur böylece değerlendirmeye alınır.

Çizelge 4.2'de kontrol gurubu ekpresyon düzeyi sonuçları verilmiştir. Sağlıklı kontrol gurubu ekspresyon düzeylerinin ortalaması 0,0023875883 (yaklaşık %0.2) bulunmuştur. Kontrol grubu sağlıklı (***skleroderma hastalığı olmayan ve yüksek tansiyon riski taşımayan***) ve gönüllü bireyler arasından seçilmiştir. Bu genin ifade (eksprese) edilip edilmediği ve normal değerlerin hangi düzeyde olduğunu ortaya koymak amacıyla skleroderma tanısı almamış sağlıklı bireyler tercih edilmiştir. Kontrol gurubunun ekspresyon düzeyine bakılarak hedef genin eksprese olup olmamasının önemi saptanmıştır.

Çalışmada, referans gen (beta actin geni) ve hedef genin (BMPR2 geni) her ikisi de aynı zamanda çalışılmıştır.

Çizelge 4.2. Kontrol grubu Real-Time PCR ekspresyon sonuçları

Kontrol	BMPR2 Hedef gen[a]	BETA ACTIN Referans gen[b]	Hedef gen/referans gen BMPR2/Beta actin gene[c]
1	1570	337000	0,0046587537
2	2880	1350000	0,002133333
3	41300	16000000	0,0025858125
4	61100	20000000	0,003055
5	24200	12700000	0,0019055118
6	24200	19900000	0,0012160804
7	85100	34400000	0,0024738372
8	26000	72700000	0,0003576341
9	16800	37300000	0,0004504021
10	79900	91700000	0,0008713195
11	50000	42500000	0,0011764706
12	36900	18400000	0,00200543348
13	29200	22500000	0,0012977778
14	57200	20400000	0,0028039216
15	30100	14000000	0,00215
16	21700	11300000	0,001920354
17	27400	19200000	0,0014270833
18	6200	20600000	0,0030097087
19	14500	36200000	0,0004005525
20	97300	330000000	0,0002948485
21	11100	97600000	0,0001137295
22	12200	8640000	0,001412037
23	1980	215000	0,0092093023
24	1670	435000	0,0038390805
25	68900	27100000	0,0025424354
26	98200	74400000	0,0013198925
27	62900	23400000	0,0026880342
28	89000	8910000	0,0099887767
29	62000	32000000	0,0019375

[a]: Target, [b]: House keeping gene, [c]: Target/ House keeping gene

Hastaların ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre yaklaşık %0,13 düzeyinde azalmıştır. Kontrol grubunda gen ekspresyon düzeyleri ortalaması 0,0023875883 (*yaklaşık %0,2*), hasta grubunda bu değer 0,0007295126 (*yaklaşık %0,07*) şeklinde belirlenmiştir.

Çalışmada hastaların ekpresyon düzeyleri tek tek incelendiğinde, 16 hastada BMPR2 geni eksprese edilme oranı sağlıklı kontrol grubuna oranla düşmüştür, 4 hastada ise ekspresyon düzeyinin diğer hastalara oranla daha yüksek olduğu

saptanmıştır. Söz konusu bu 4 hastanın pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tanısı almış hastalar olduğu dikkat çekicidir.

4 PAH'lı hastanın gen ekspresyon düzeyi yaklaşık 0,001 (*yaklaşık %0,1*) düzeyinde saptanmıştır. Pulmoner arteriyel hipertansiyona sahip olan hastaların tamamı kadın olup BMPR2 gen ekspresyon düzeyi çalışmada incelenen diğer hastalara oranla yaklaşık %0,03 oranda artmıştır. Bu çalışmada örnekleme sayısı yetersizdir ancak, çalışmaya dahil edilen hastalar içindeki orana göre PAH tanısı almış hastalar %20 (*20 hasta çalışmaya dahil edilmiş, 4 tanesi PAH tanısı almış*) oranındadır ve bu bireylerin hepsinde BMPR2 gen ekspresyon düzeyi artmıştır sonucu kanısına varılmıştır.

Korniszewski ve ark (2003), BMPR2 mutasyonlarının normal gelişme, olgunlaşma, büyümenin durması ve lenfositlerin ölümünü olumsuz şekilde etkileyebildiğini ve BMPR2 mutasyonlarının kısmen PAH ile sonuçlandığını saptamışlardır.

Manes ve ark (2003), yapmış oldukları çalışmada Kemik Morfogenetik Protein Reseptörü 2 (BMPR2) genindeki mutasyonların vasküler farklılaşma, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik fonksiyonların etkilendiğini göstermişlerdir.

Barreto ve ark (2005), PAH'ın BMPR2 genindeki değişiklerle ilgili olduğunu göstermişlerdir.

Machado ve ark (2009), 24 hasta ve 196 sağlıklı kontrol grubu ile yapmış oldukları çalışmada PAH'lı hastalarda BMPR2 mutasyon tipleri arasında missense, nonsense, çerçeve kayması, RNA düzenlenmesinde hatalar ve delesyon mutasyonlarını tanımlamışlardır.

Morse ve ark (1997), PAH'ın %10-20 oranında otozomal dominant kalıtsal olduğunu genetik olarak belirlenen bazı PAH olgularında göstermişlerdir. Olguların %6'sında ailesel PAH saptamışlardır. BMPR2 mutasyonunun PAH hastalığının genetik dayanağı olduğunu belirtmişlerdir.

Newman ve ark (2004), yapmış oldukları çalışmada ailesel PAH'da BMPR2'nin mutasyonu saptanmış ancak bu mutasyon saptanan diğer hastaların %20'sinde PAH gelişmemiştir.

Roberts ve ark (2004), çalışmalarına 40 yetişkin ve PAH/KKH ile 66 çocuk dahil etmişlerdir. Kemik morfogenetik protein reseptörü 2 mutasyonları yetişkin ve çocuklarla yapılan karma grupta pulmoner hipertansiyon/ konjenital kalp defekti %6 oranında bulunmuştur.

West ve ark (2008), BMPR2 mutasyonu tespit edilen hastaların %20'sinde PAH saptamışlardır. BMPR2 mutasyonuna sahip olan hastalardan %58'i ailesel PAH'a sahip, %26'sı ise idiopatik PAH'a sahip hasta olarak rapor edilmiştir.

BMPR2 mutasyonunun saptanmasına dair yapılan çalışmalarda Morse ve ark, %6, Newman ve ark, %80, Roberts ve ark, %6, West ve ark, %26 oranında PAH geliştiğini saptamışlardır.

Yapılan bu yüksek lisans tez çalışmasında PAH'lı 4 hastada BMPR2 gen ekspresyonunda artış görülmesi ve çalışmaya dahil edilen hastalardan %20'sinde bu durumun saptanması anlamlı bulunmuştur.

Thomson ve ark (2000), BMPR2 genindeki mutasyonları, genetik PAH'ın ana sebebi olarak tanımlamıştır. Bu mutasyonlar ayrıca FPAH'lı (ailevi PAH) hastaların %70'inde, sporadik olan idiyopatik PAH'lı hastaların %26'sında ve fenfluramin kullanımı ile ilişkili PAH'lı hastaların %9'unda tespit etmiştir. Ancak, apoptozis ve proliferasyon ile ilişkili olan BMPR2, TGF ailesinin bir üyesi olduğunu, hala BMPR2 sinyalindeki azalmanın PAH'a nasıl sebep olduğunun tam anlaşılmadığını bildirmiştir.

Naeije ve Dorfmu (2003), PAH'lı 19 ailenin 9'unda ve 8 ailenin 7'sinde BMPR2 geninin sorumlu olduğunu ancak hastaların tamamının kalıtımsal PAH'lı olmadığını, başlangıçtaki hafif PAH'lı hastaların %26 düzeyinden daha fazlasında BMPR2 mutasyonu gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Özol ve Erinç (2004), PAH olgularının %6-10 kadarında ailevi yatkınlık tespit etmişlerdir. Ailevi PAH'lı 19 olgunun dokuzunda bu mutasyonu saptamışlardır. BMPR2'deki fonksiyon kaybının; bazı hücrelerde apoptozisi arttırarak, anormal endotel hücre büyümesi ve çoğalmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir.

McLaughlin ve ark (2006), PAH'lı hastalarda yapılan çalışmada hastaların sadece yaklaşık %10-20'sinde BMPR2 gen mutasyonu saptanmıştır.

Zhang ve ark (2006), anneler ve çocukları üzerinde yaptıkları çalışmada ailesel PAH'lı hastaların yarısında hastalık sebebinin BMPR2 gen mutasyonundan kaynaklandığını belirlemişlerdir. Ailesel olmayan PAH'ın ise %25'inin BMPR2 gen mutasyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mark ve ark (2009), PAH hastalarının %6-8 oranında ailesel PAH'lı olduğunu ve bunlarda %50-90 arasında ortak BMPR2 gen mutasyonu belirlemişlerdir.

Skleroderma hastalarında söz konusu BMPR2 gen ekpresyon düzeyleri yaklaşık olarak %0,07 olarak saptanmıştır. Sağlıklı kontrol grubunun ekspresyon düzeyi yaklaşık olarak %0,2 olarak saptanmıştır. Hastaların ekpresyon düzeyi sağlıklı kontrol grubunun ekspresyon düzeyine oranla yaklaşık %0,13 azalmıştır.

Hastaların gen ekspresyon düzeyleri tek tek incelendiği zaman 16 hastada ekpresyon düzeyi %0,07 yani ortalamaya yakın saptanmışken, 4 bayan hastada ekspresyon düzeyi yaklaşık %0,1 olarak belirlenmiştir. Hastaların klinik seyrine bakıldığında bu hastaların PAH'lı olduğu gözlenmiştir. Bu sonuca göre, pulmoner arteriyel hipertansiyonu olan hastalarda BMPR2 geninin eksprese edilme düzeyi PAH'lı olmayan hastalara oranla %0,03 daha fazla yükselmiştir fakat sağlıklı kontrol grubuna oranla %0,1 daha az eksprese edilmiştir.

Bu çalışmaya 20 skleroderma hastası, 29 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. Bu hastalardan 18'i kadın, 2'si erkektir (kadın:erkek oranı 9:1) ve hastaların tamamı orta yaş grubudur (35-50 yaş grubu). Kontrol grubu olarak 19 kadın, 10 erkek dahil edilmiştir. Hastaların %10'u erkek, %90'ı ise kadındır. Hastalığın kadınlarda daha yüksek oranda görülmesi, çalışmaya dahil edilen kadın bireylerin sayıca fazla olduğunu açıklamaktadır.

Çalışmaya dahil edilen kadınların %20'sinde PAH geliştiği saptanmıştır. Skleroderma hastalarında BMPR2 gen ekpresyon düzeyi sağlıklı bireylere oranla azalmıştır, fakat skleroderma hastası ve PAH'lı hastalarda BMPR2 gen ekspresyon düzeyi, hastaların ekspresyon düzeyi içerisinde irdelendiğinde daha yüksek bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Skleroderma kökeni tam olarak bilinmeyen, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık ilişkileri sonucu oluştuğu düşünülen fibrotik otoimmün bir hastalıktır. Hastalığın genel özelliği olan çesitli doku ve organlardaki fibroz oluşumu bağ dokusunda hücreler arası matriksin aşırı birikimi ile karakterize edilmiştir. Hücreler arası matriks bileşenlerinden biri olan kollajen proteinlerinin fibroblastlardaki sürekli ve düzensiz anlatımının nedeni hala tam olarak açıklanamamıştır.

Skleroderma hastalarının bazılarında pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) geliştiği bilinmektedir ve pulmoner hipertansiyon tedavisinin günümüzde zahmetli, pahalı ve uzun soluklu bir süreç olması nedeniyle hala pratikte klinisyenleri zorlayan yönleri ile korkulu bir rüya olmayı sürdürmektedir. Etiyolojisinde ve patogenezinde, bir çok faktörün (*radyoaktif maddeler, yandaş hastalıklar, genetik yatkınlık, toksik maddeler vs*) rol alması nedeniyle, etiyopatogenezin hedef noktalarının ele alınması tedavi başarı şansını arttırmaktadır. Son yıllarda ilerleyen genetik tanı metotları, subsellüler düzeyde ortaya konmuş mekanizmalar ve geliştirilmekte olan ilaçlar tedavi başarısı yönünde umutları arttırmaktadır.

PAH'ta genetik geçiş olabileceği ilk kez 1954'te Dresdale tarafından gündeme getirilmiştir. Kalıtsal geçiş otozomal dominant olup, değişken ve tam olmayan ekspresyon göstermektedir. Kadınlarda daha sık izlenmektedir, kadın:erkek oranı 8:1 olarak bildirilmektedir. Kadınlarda olan yatkınlık BMPR2 mutasyonunun hormonlar gibi diğer çevresel faktörlerden etkilendiğini düşündürmektedir. PAH olgularının yalnız %6'sında aile anamnezi mevcuttur. Değişken ve komplet olmayan mutasyon idiyopatik olgularda, ailesel geçişi maskelediğine veya '*de novo*' mutasyonların olabileceğine inanılmaktadır.

BMPR2 mutasyonu ile akciğer dokusunda BMPR2 geninin kodladığı protein sentezi tahminen polipeptit zincirinin kopması nedeniyle ciddi düzeyde azalır.

Skleroderma hastaları için BMPR2 geni oldukça büyük önem taşımaktadır. BMPR2 gen ekspresyonu hastalığın klinik seyrini etkilemekte, hastalara ve hastalığın seyrine göre değişkenlik göstermektedir.

Bu çalışmada skleroderma hastaları ve kontrol grubunda BMPR2 gen ekspresyon düzeyleri ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışmanın güvenilirliği ve doğruluğunu test etmek için paralel olarak referans gen yani beta actin gen ekspresyon düzeyleri de saptanmıştır.

Elde edilen verilere göre; beta actin gen ekspresyon düzeyinin BMPR2 geni ile ilişkilendirilmesi sonucunda ekspresyon düzeylerinin ortalaması 0,0007295126 düzeyinde saptanmıştır. Skleroderma hastalarının ekspresyon düzeyleri incelendiğinde hastalığın belirtisi ve şiddeti arttıkça ekspresyon düzeyinin azaldığı PAH'lı hastalarda, -kontrol grubuna göre düşük- hasta grubuna göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Hastalığın seyrine bağlı olarak ekspresyon düzeyi değişkenlik göstermektedir.

Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin ortalaması 0,0023875883 olarak saptanmıştır. Hastalarda ekspresyon düzeyleri ortalama olarak kontrol grubuna oranla düşük saptanmıştır. Ancak bazı hastalarda ekspresyon düzeyi fazla değişmemiştir.

Özetle; hastaların ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre yaklaşık %0,13 düzeyinde azalmıştır. Kontrol grubunda gen ekspresyon düzeyleri ortalaması 0,0023875883 (*yaklaşık %0,2*), hasta grubunda bu değer 0,0007295126 (*yaklaşık %0,07*) şeklinde belirlenmiştir.

4 PAH'lı hastanın gen ekspresyon düzeyi yaklaşık 0,001 (*yaklaşık %0,1*) düzeyinde saptanmıştır. Pulmoner arteriyel hipertansiyonlu hastaların tamamı kadın olup BMPR2 gen ekspresyon düzeyi çalışmada incelenen diğer hastalara oranla yaklaşık %0,03 oranda artmıştır. Bu çalışmada örnekleme sayısı yetersizdir ancak, çalışmaya dahil edilen hastalar içindeki orana göre PAH tanısı almış hastalar %20 (*20 hasta çalışmaya dahil edilmiş, 4 tanesi PAH tanısı almış*) oranındadır ve bu bireylerin hepsinde BMPR2 gen ekspresyon düzeyi artmıştır sonucu kanısına varılmıştır.

Ç.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalında skleroderma tanısı almış 20 hasta ve 29 kontrol grubu olarak belirlenmiş bireylerden onam formu alınarak bu çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta sayısının yeterli olmayışı kesin bir sonuç ortaya koymak için yeterli olmasa da bize bir yön vermiştir. Şöyleki

BMPR2 genindeki ekspresyon düzeyi sklerodermalı hastalarda kontrole göre düşük, PAH'lı hastalarda kontrole göre düşük ancak hasta grubu ile kıyaslandığında yüksek bulunmuştur.

Daha fazla hastanın dahil edildiği, her bir hastanın ekspresyon düzeyi ile hastalık seyrinin yakından ilişkilendirildiği özellikle PAH'lı hastalarda ekspresyon düzeyinin kan basıncı değişimi ve ailesel öykünün detaylı irdelendiği yeni bir çalışma için temel oluşturan bir araştırma olması önem arzetmektedir. Bundan sonraki adım bu çalışmada edinilen deneysel tecrübelerin daha fazla hasta katılımıyla kurgulanacak bir çalışma ile güçlendirilmesi olmalıdır.

Mutasyonlar ve gen ekspresyon çalışmaları elbetteki hastalığın tedavisinde primer etkili parametreler değildir. Ancak; hastalığın seyri, ileriki yaşlarda bireyi nelerin beklediği, ailesel hastalıklarda erken tanı, klinisyenin tedavi şeklini belirlemesindeki katkısı v.b. faydaları günümüzde moleküler yöntemlerin kullanılmasındaki önemi arttırmaktadır. İnsan genom projesinin bu yöndeki çalışmaları ile her geçen gün tanılanmış gen sayısı artmaktadır. Böylece moleküler biyologlarla klinisyenler ortak akıl yürüterek hastalıkların oluşumunda ve seyrinde neler olduğunu/olabileceğini tahmin edebilmektedirler.

KAYNAKLAR

ALAN, B., ve NALBANTGİL, S., 2010. Pulmoner arteriel hipertansiyonda genetik, hücresel ve moleküler mekanizmalar. Anadolu Kardiyol Derg., 1; 9-13.

ARNETT., F., C., HORWARD., R., F., TAN., F., MOULDS., J., M., BIAS., W., B., DURBAN., E., CAMERON., H., D., PAXTON., G., HODGE., T., J., WWATHERS., P., E., and REVEILLE., J., D., 1996. Increased prevalence of systemic sclerosis (scleroderma) in a Native American tribe in Oklahoma. Arthritis and Rheum, 39: 1362-1370.

ATKINSON, C., STEWART, S., UPTON, P., D., MACHADO, R., THOMSON, J., R., and TREMBATH, R., C., 2002. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. Circulation, 105: 1672-8.

BARRETO, A., C., FRANCHI, S., M., PEREIRA, A., C., and LOPES, A., A., 2005. Pulmonary Arterial Hypertension, Pathophysiology, Genetic Aspects and Response to the Chronic use of Sildenafil. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 85: 1.

BELCH, J., J., P., 1991., Raynaud's phenomenon: its relevance to scleroderma. Ann Rheum Dis., 50: 839-45.

BRANDT, K., D., and KREY, P., R., 1977. Chalky joint effusion: the result of massive synovial deposition of calcium apatite in progressive systemic sclerosis. Arthritis Rheum, 20: 792–796.

CALLAGHAN, A., S., BALADA, E., SERRANO, S., AZNAR, C., P., S., and ORDİ-ROS, J., 2006. Mutations of activin-receptor-like kinase 1 (ALK-1) are not found in patients with pulmonary hypertension and underlying connective tissue disease. Clinical Rheumatology, 26: 947–949.

CANTOR, C., R., and, SMITH, C., L., 1999. The Science and Technology Behind the Human Genome Project. Genomics.

CHAMPION, H., C., 2008. The heart in scleroderma. Rheum Dis Clin North Am., 34: 181-190.

CLEMENTS, P., LANHENBRUCH, P., and SEIBULD, J., 1995. Inter- and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. J Rheumatol, 22: 1281–1285.

D'ANGELO, W., A., 1969. Pathology of progressive systemic sclerosis 'scleroderma'. AM J Med., 46: 428.

D'ALONZO, G., E., BARST, R., J., and AYERS, S., M., BERGOFSKY, E., H., BRUNDAGE, B., H., DETRE, K., M., FISHMAN, A., P., GOLDRING, R., M., GROVES, B., M., and KERNIS, J., T., 1991. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Ann Intern Med., 115: 343–9.

DESWALL, A., and FOLLANSBEE, W., 1996. Cardiac involvement in scleroderma. Rheum Dis Clin North Am., 22: 841-849.

DESWALL, A., and FOLLANSBEE, W., F., 1996. Cardiac involvement in scleroderma. Rheum Dis North Am., 22: 841–860.

DENTON, C., P., and BLACK, C., M., 2004. Scleroderma – clinical and pathological advances. Best Pract Res Clin Rheumatol, 18: 271-290.

DHEKA, K., HUGGETT, J., F., BUSTIN, S., A., JOHNSON, M., A., ROOK, G., and ZUMLA, A., 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques, 1: 112-4.

DU, L., CHRISTOPHER, C., SULLIVAN, C., C., CHU, D., CHO, A., J., KIDO, M., WOLF, P., L., YUAN, J., DEUTSCH, R., JAMIESON, S., W., and THISTLETHWAITE, P., A., 2003. Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. N Engl J Med., 348: 500–9.

DUNKIN, M.A., 2001. Handout on Healt: Skleroderma. National institutes of Healt, 01: 2471.

GALIE, N., HOEPER, M., M., HUMBERT, M., TORBICKI, A., VACHIERY, J., L., BARBERA, J., A., BEGHETTI, M., CORRIS, P., GAINE, S., GIBBS, J., S., SANCHEZ, M., A., G., JONDUAU, G., KLEPETKO, W., OPITZ, C., PEACOCK, A., RUBIN, L., ZELLWEGER, M., and SIMONNEAU, G., 2009. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Heart J., 30: 2493-537.

GIBBS, J., S., R., and HIGENBOTTAM., 2001. TW for the British Cardiac Society Guidelines and Medical Practise Committee, Recommendations on the management of the pulmonary hypertension in clincal practice. Heart, 86.

GROSSMAN, W., and BRAUNWALD, E., 1992. Pulmonary hypertension. In: Braunwald E, ed. Heart Disease. 4: 790–817.

GU, Y., S., KONG, J., CHEEMA, G., S., KEEN, C., L., WICH, G., and GERSHWIN, M.,E., 2008. The immunobiology of systemic sclerosis. Semin Arthritis Rheum, 38: 132-60.

GUNDUZ, O., H., FERTIG, N., and LUCAS, M., 2001. Systemic sclerosis with renal crisis and pulmonary hypertension. Arthritis Rheum, 44: 1663–1666.

GÜNEL, T., 2007. Gen anlatımı kantitatif analizi 'Real-time PCR'. Turkiye Klinikleri J Med Sci., 27: 763-767.

JARDIM, C., HOETTE, S., and SOUZA, R., 2010. Contemporary issues in pulmonary hypertension. Eoropean Respiratory Review, 19: 118.

JIMENAZ, S., A., and DERK, C., T., 2004. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. Ann Intern Med., 140: 37-50.

JONES, D., L., SANDBERG, J., C., ROSENTHAL, M., J., SAUNDERS, R., J., HANNIG, V., L., and CLAYTON, E., W., 2008. What Patients and Their Relatives Think About Testing for BMPR2. J Genet Counsel, 17: 452-458.

HIROSE, S., HOSODA, Y., FURUYA, S., OTSUKI, T., and IKEDA, E., 2000. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion human pulmonary hypertension. Pathol Int., 50: 472-9.

KENG, C., SEE, A., and SHUMACK, S., 2003. Epidemiology and Pathogenesis of Scleroderma. Australasian Journal of Dermatology, 44: 1-9

KORNISZEWSKI, L., KURZYNA, M., STOLARSKI, B., TORBICKI, A., SMERDEL, A., and PLOSKI, R., 2003. Fatal primary pulmonary hypertension in a 30-yr-old female with “apeced syndrome”. Eur Respir J., 22: 709–711.

KRIEG, T., and MEURER, M., 1988. Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiologic aspects. J Am Acad Dermatol, 18: 457-481.

LEROY, E., C., BLACK, C., FLEISCHMAJER, R., JABLONSKA, S., KRİEG, T., and MEDSGER, T., A., 1998. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol, 15: 202-205.

LINGLING DU, M., D., CHRISTOPHER, C., SULLIVAN, M., S., DANNY CHU, M., D., AUGUSTINE, J., CHO, B., A., MASAKUNI KIDO, M., D., PAUL, L., WOLF, M., D., JASON, X., J., YUAN, M., D., PH. D., REENA, D., PH. D., STUART, W., JAMIESON, M., B., F.R.C.S., and PATRICIA, A., THISTLETHWAITE, M., D., Ph.D., 2003. Signaling Molecules in Nonfamilial Pulmonary Hypertension. N Engl J Med., 348: 500-9.

MACHADO, R., EICKELBERG, O., ELLIOT, C., G., GERACI, M., HANOAKA, M., and LOYD, J., 2009. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. J. Am Coll Cardiol, 54: 32-42.

MANES, A., GALIE, N., and BRANZI, A., 2003., Women and pulmonary arterial hypertension. Eur Respir Mon, 25: 219–227.

MARK, A., THOMPSON, M., D., AVERY, P., MCKEE, R., N., and HAMANG PATEL, M., D., 2009. Pulmonary Hypertension for Primary Care Providers. Academic Division of Ochsner Clinic Foundation, 9: 234–240.

MARTIN, J., FERRARO, P., and DURANCEAU, A., 2001. Reflux esophagitis and scleroderma. Chest Surg Clin North Am., 11: 619–638.

MAYES, M., D., 1996. Scleroderma epidemiology. Rheum Dis Clin North Am., 22: 751-764.

MAYES, M., D., LACEY, J., V., BEBE-DIMMER, J., GILLESPIE, B., W., COOPER, B., and, LAING, T., J., Schottenfeld, D., 2003. Prevalence, Incidence, Survival, and Disease Characteristics of Systemic Sclerosis in a Large US Population. Arthritis and Reheum, 48: 2246-2255.

MCLAUGHLIN, V., V., and MCGOON., M., D., 2006. Pulmonary Arterial Hypertension. American Heart Association, 114: 1417-1431.

MEDSGER, T., A., and, Jr. KOOPMAN, W., J., 2000. Systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis and allied conditions, 14: 1590– 1624.

MORSE, J., H., ALISON, C., JONES, M., N., C., P., ROBYN, J., BARST, M., D., SUSAN, E., HODGE, D.,S., KIRK, C., WILHELMSEN, M., D., TORBJOERN, G., and NYGAARD, M., D., 1997. Mapping of familial primary pulmonary hypertension locus (PPH1) to chromosome 2q31-q32. Circulation, 95: 2603-6.

MORSE, J., BARST, R., HORN, E., CUERVO, N., DENG, Z., and KNOWLES, J., 2002. Pulmonary hypertension in scleroderma spectrum of disease: lack of bone morphogenetic protein receptor 2 mutations. J Rheumatol, 29: 2379-81.

MOUTHON, L., GUILLEVIN, L., and HUMBERT, M., 2005. Pulmonary arterial hypertension: an autoimmune disease. European Respiratatory Journal, 26: 6.

NAEIJE, R., and DORFMULLER, P., 2003. Pathophysiology of pulmonary arterial Hypertension. Eur Respir Mon., 27: 191–203.

NEEDLEMAN, B., W., WIGLEY, F., M., and STAIR, R., W., 1992. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4,interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. Arthritis Rheum, 35: 67-72.

NEWMAN, J., H., FANBURG, B., L., ARCHER, S., L., BADESCH, D., B., BARST, R., J., GARCIA, J., G., KAO, P., N., KNOWLES, J., A., LOYD, J., E., MCGOON, M., D., MORSE, J., H., NICHOLS, W., C., RABINOVITCH, M., RODMAN, D., M., STEVENS, T., TUDER, R., M., VOELKEL, N., F., and GAİL, D., B., 2004. Pulmonary arterial hypertension: future directions. report of a National Heart, Lung and Blood Institute/Office of Rare Diseases workshop, 22: 109-24/2947-52.

NICHOLAS, W., M., 2006. Pulmonary Hypertension Due to BMPR2Mutation. The Proceeding of the American Thoracic Society, 3: 680-686.

NICOLLS, M., R., STEWART, T., L., RAI, P., R., BADESTCH, D., B., and VOELKEL, N., F., 2005. Otoimmunite ve pulmoner hipertansiyon. Eur Respir J., 26: 1110–1118.

OKANO, Y., 1996. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). Rheum Dis Clin North Am., 4: 709-35.

OOR, G., C., MOK, M., Y., and, TSANG, K., W., T., 2003. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. An HRCT-clinical study, 44: 258–264.

ÖZOL, D., ve, ERDİNÇ, E., 2004., Primer Pulmoner Hipertansiyon ile İlgili Faktörler ve Klinik Bulgular. Solunum Hastalıkları, 15: 158-162.

RICHARD, M., SILVER, T., A., and MEDSGER, T., A., Jr., 1991. Systemic Sclerosis and Scleroderma Variants. Clinical Aspects Arthritis & Allied Conditions, 77: 1636-1670.

ROBERTS., K., E., MCELROY., J., J., WONG., W., P., K., YEN., E., WIDLITZ., A., BARST., KNOWLESS., J., A., and MORSE., J., H., 2004. BMPR 2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. Author Affiliations, 24:371–374.

SATOH, T., KIMURA, K., OKANO, Y., HIRAKATA, M., KAWAKAMI, Y., and, KUWANA, M., 2005. Lack of circulating autoantibodies to bone morphogenetic protein receptor-II or activin receptor-like kinase 1 in mixed connective tissue disease patients with pulmonary arterial hypertension. Rheumatology, 44: 192-196.

SINGH, D., SHILL, M., and KAUR, H., 2001. The watermelon rectum. J Clin Gastroenterol, 33: 164–166.22.

STEEN, V., D., POWELL, D., L., and MEDSGER, T., A., Jr., 1988. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum, 31: 196-203.

STEEN, V., D., CONTANTINO, J., P., and SHAPIRO, A., P., 1990. Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation to availability to angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. Ann Intern Med, 113: 352–357.

SUZUKI, T., HIGGINS, P., J., and CRAWFORD, D., R., 2000. Control selection for RNA quantitation. Biotechniques, 2: 332-7.

THOMSON, J., R., MACHADO, R., D., PAUCIULO, M., W., MORGAN, N., V., HUMBERT, M., ELLIOTT, G., C., WARD, K., YACOUB, M., MIKHAIL, G., ROGERS, P., NEWMAN, J., WHEELER, L., HIGENBOTTAM, T., GIBBS, J., S., R., EGAN, J., CROZIER, A., PEACOCK, A., ALLCOCK, R., CORRIS, P., LOYD, J., E., TREMBATH, R., C., and NICHOLS, W., C., 2000. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. J Med Genet, 37: 741-5.

TUFANELLI, D., L., 1989. Systemic Scleroderma. Medical Clinics of North America, 73: 1167-1180.

WEISS, J.,W., LAUNOIS, S., H., ANAND, A., and GARPESTAD, E., 1999. Cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea. Prog Cardiovasc Dis., 41: 367-76.

WEST, J., COGAN, J., GERACI, M., ROBINSON, L., NEWMAN, J., PHILLIPS, J., A., LANE, K., MEYRICK, B., and LOYD, J., 2008. Gene expression in BMPR2 mutation carriers with and without evidence of Pulmonary Arterial Hypertension suggests pathways relevant to disease penetrance. BMC Medical Genomics, 1: 45.

ZHANG, L., VISSCHER, D., RIHAL, C., and AUBRY, M., C., 2007. Pulmonary veno-occlusive disease as a primary cause of pulmonary hypertension in a patient with mixed connective tissue disease. Rheumatol Int., 27: 1163–1165.

http://www.dogaltedavi.net/f201/skleroderma_derinin_sertlesmesi_skleroderma_belirtileri_skleroderma_pdf_skleroderma-3061.html (Erişim tarihi: 3 Şubat 2011)

http://biyoinformatik.wordpress.com/2007/02/21/pcr-polimeraze-chain-reaction nedir/ (Erişim tarihi: 18 Şubat 2011)

http://www.romatizmadoktorum.com (Erişim tarihi: 15 Mart 2011)

http://www.drlawrencejaeger.com (Erişim tarihi: 15 Mart 2011)

http://www.aurorahealtcare.org (Erişim tarihi: 23 Mayıs 2011)

http://onlinehastane.net (Erişim tarihi: 21 Temmuz 2011)

http://zehirlenme.blogspot.com (Erişim tarihi: 21 Temmuz 2011)

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Kayseri'de doğdu. İlköğretimini Kayseri Yahya Kemal Beyatlı İlköğretim okulunda tamamladı. Lise öğrenimini Kayseri Aydınlıkevler lisesinde tamamladı. 2003- 2007 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.