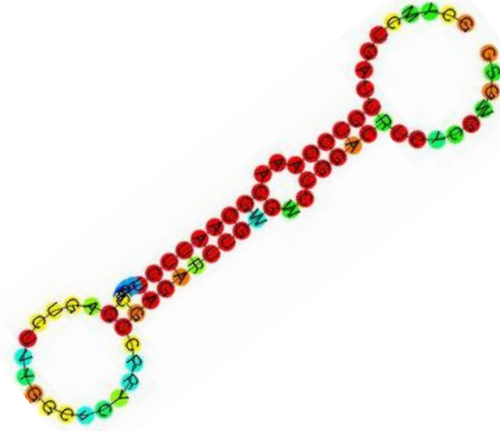




XXXVII. Türk
Mikrobiyoloji
Kongresi



ÇUKUROVA BÖLGESİNDEKİ AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA PLAZMA VE MONONÜKLEER HÜCRELERİN MİKRORNA DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Fırat Karslı¹, Begüm Kayar², Emel Yarar¹, Gülfer Yakıcı¹, Ali Üçkayabaşı¹, Toğrul Nagiyev¹,
Fatih Köksal¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AbD

²Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi

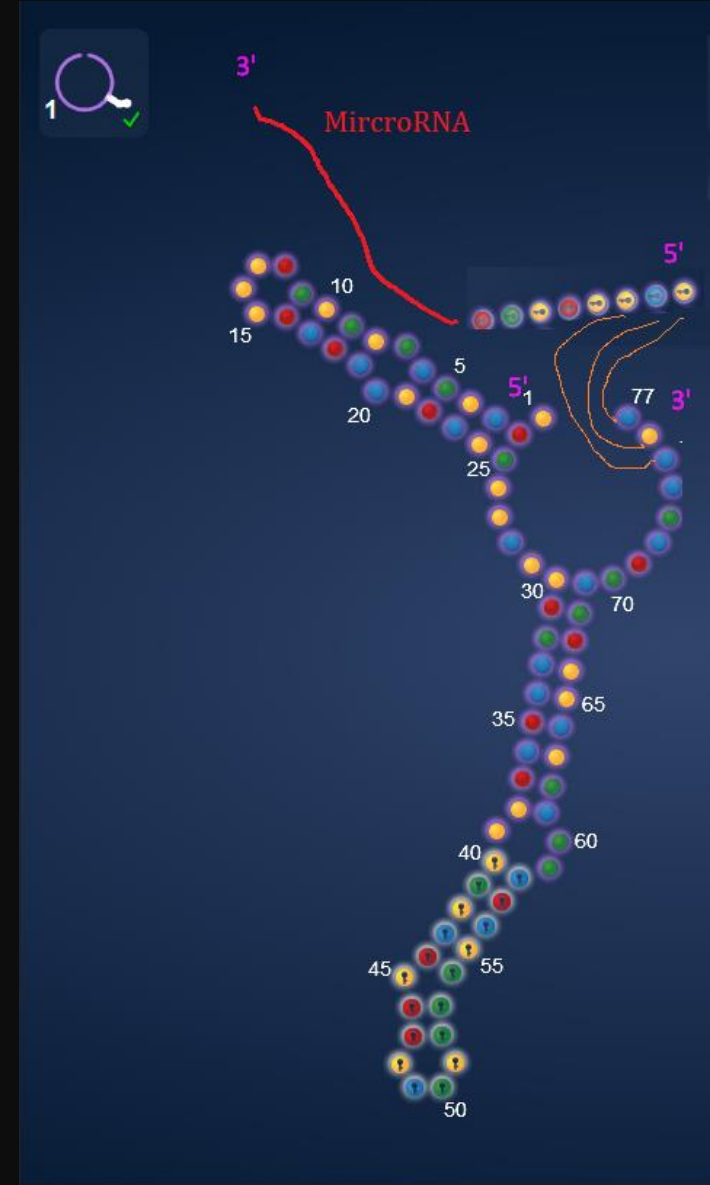
Giriş



- ✓ Dünya nüfusunun 1/3'ü tüberküloz,
- ✓ İnfekte bireylerin sadece %5-10'unda aktif tüberküloz,
- ✓ Her yıl 9 milyon yeni TB vaka, 1,5 milyonu ölüm,
- ✓ Ölenlerin en az 400.000'ini HIV ile infekte hastalar.

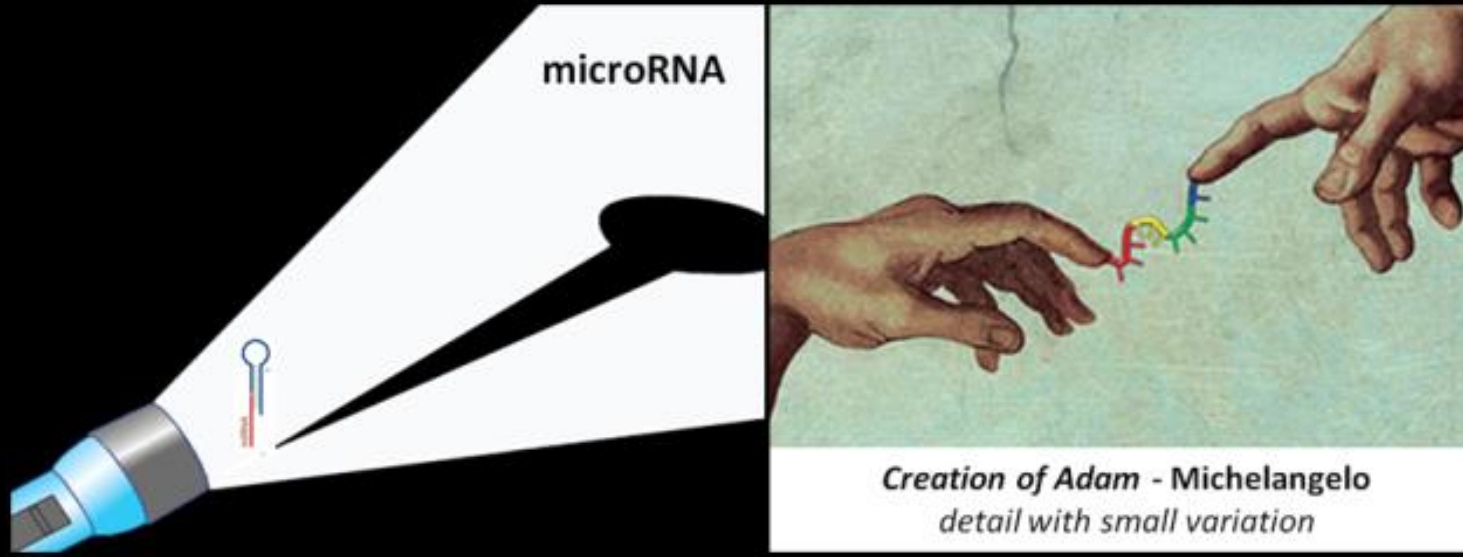
mikroRNA'lar

- Yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğunda,
- Transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyede **gen ekspresyonunun negatif düzenleyicileri** olarak görev alan,
- Proteine traslasyonu gerçekleşmeyen,
- Tek zincirli RNA molekülleri.



mikroRNA'lar

- Hücre farklılaşması,
- Apoptozis,
- Anti-viral savunma,
- Antikor üretimi ve inflamatuvar mediatör salınımı,
- Bağışıklık hücrelerinin farklılaşması ve sağ kalımı.



mikroRNA'lar

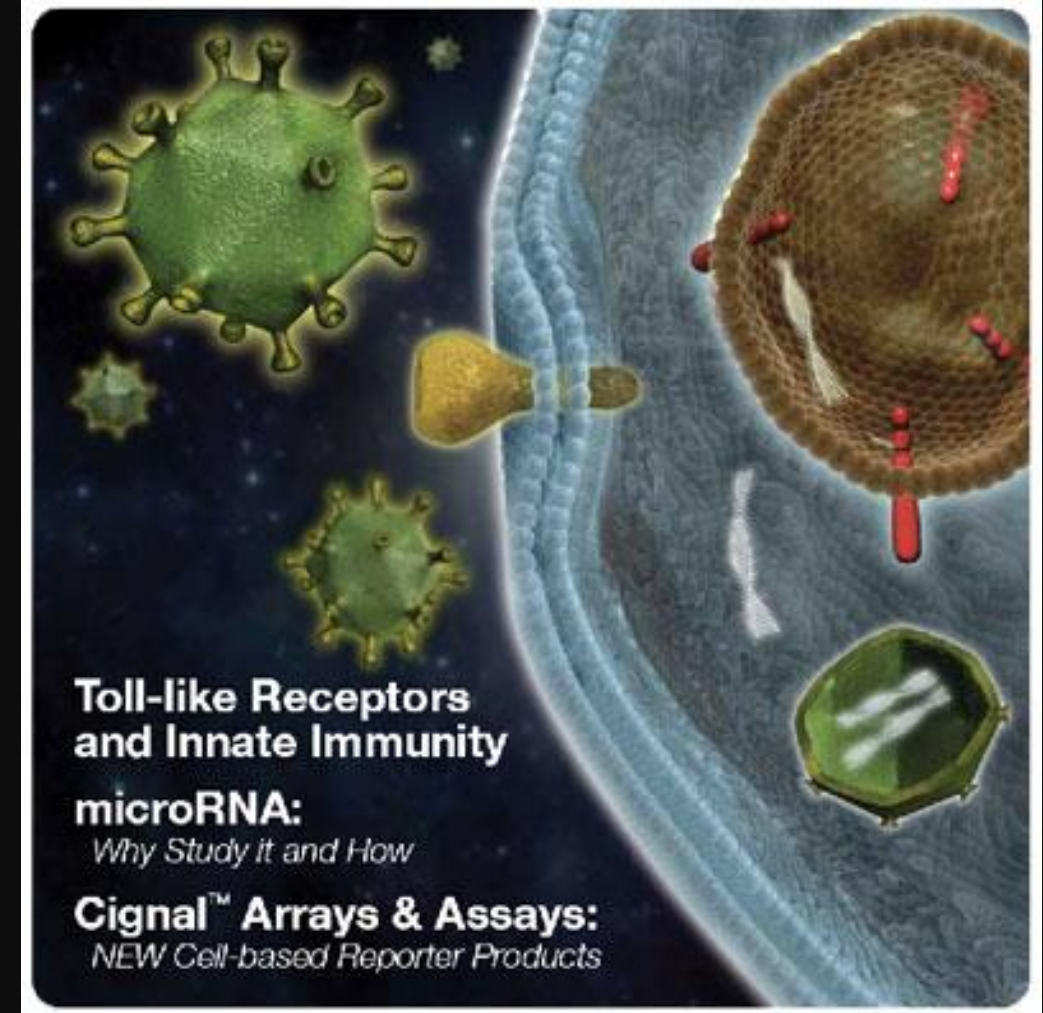
miRNA'ların mutasyonları veya anormal ekspresyonları (up/downregölasyonu);

- Kanser,
- Kalp-damar bozuklukları,
- Şizofreni,
- Kas-iskelet bozuklukları,
- Akciğer hastalıkları,
- Gelişim bozuklukları gibi daha bir çok hastalığın gelişimine katkı sağlar.



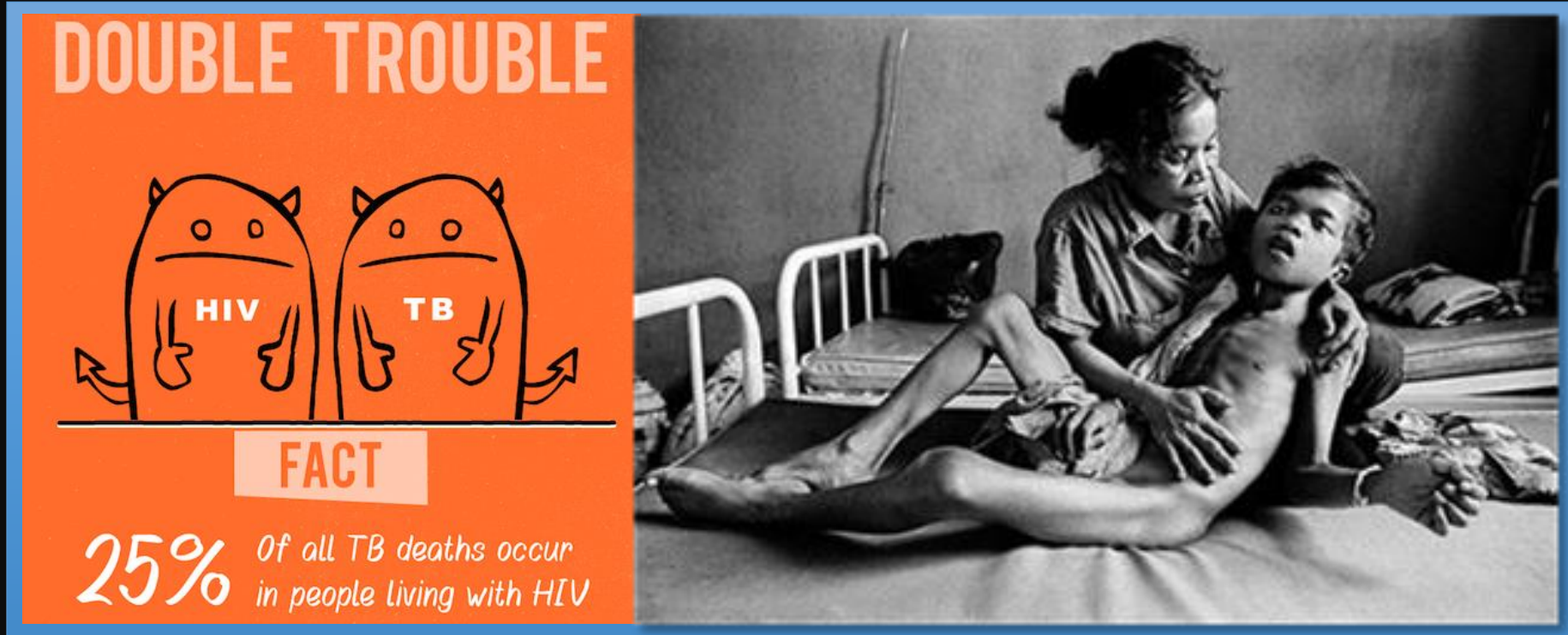
İmmün Sistemin Düzenlenmesinde miRNA'lar

- İmmün sistemde hücre gelişimini düzenler,
- TLR **sinyalleşmesinin negatif düzenleyicileri** olarak rol oynarlar.
 - TLR patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMPs) olan mikrobiyal ürünleri tanır ve bağlanır,
 - TLR sinyalizasyonu, negatif düzenleyicilerin farklı sınıfları tarafından, kuvvetli inflamasyonu önlemek için sıkıca in vivo olarak kontrol edilir.



Tüberküloz ve mikroRNA

- Aktif tüberküloz gelişimi, kronik infeksiyon, reaktivasyonlar ve asemptomatik taşıyıcılığın sebepleri tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte **aktif tüberküloz gelişiminde konağın immun yapısının** önemli rol oynadığını düşünülmektedir.
 - Gelişmiş ülkelerde de tüberkülozun HIV pozitif vaka sayısına paralel olarak artış göstermesi



Tüberküloz ve mikroRNA

- MikroRNA'ların T hücre farklılaşması, dentritik hücreler, NK hücreleri, makrofajlar gibi doğal immün cevapta rol oynayan hücrelerin regülasyonunda rol oynar,
- Aktif tüberkülozlu hastaların, latent tüberkülozlu hastaların ve sağlıklı bireylerin makrofaj ve NK hücrelerinde immün cevapla ilişkili genlerin ekspresyonunda değişiklikler olduğu belirtilmiştir

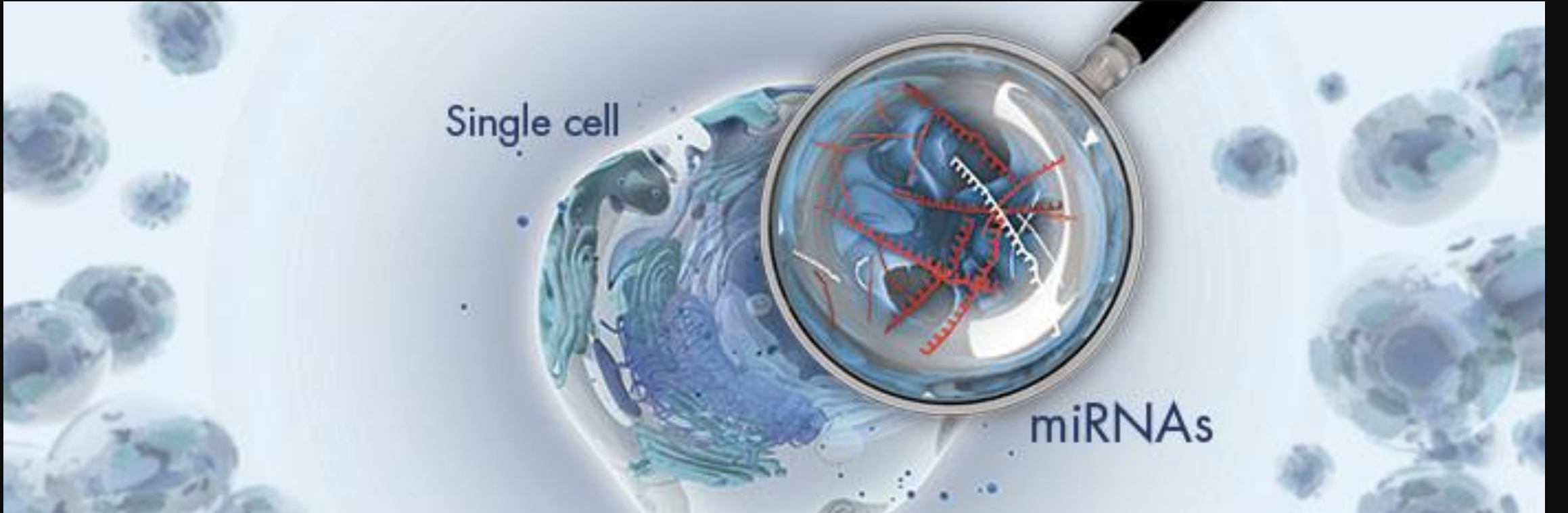


Amaç

Çukurova bölgesindeki akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen mononükleer hücrelerinde ve plazmalarında **miR146a**, **miR424**, **miR365**, **miR223**, **miR144**, **miR421** mikroRNA ifade düzeylerindeki değişimin incelenmesi ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının irdelenmesi amaçlanmıştır.



Çalışmamızın öncelikli hedefi, tüberküloz **tanısında**, **takibinde** ve **konağa yönelik direk immüterapi**de mikroRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımının irdelenmesidir.



Gereç ve Yöntem

Kan örneklerinin toplanması

Mart 2014 - Mart 2015 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarına Adana ilindeki hastane ve dispanserlere başvuran, ARB pozitifliği veya kültür pozitifliği tespit edilmiş fakat tedavi almamış yada henüz tedavinin başlangıç aşamasında olan hastalar dahil edilmiş ve hastalara onam formları okutulup imzalandıktan sonra her birinden 8'er cc kan örneği EDTA'lı tüp içerisine alınmıştır.

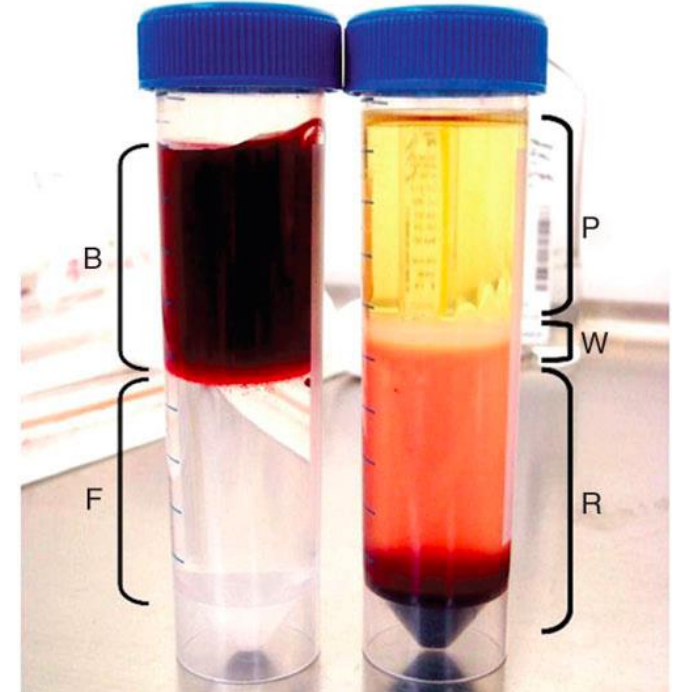
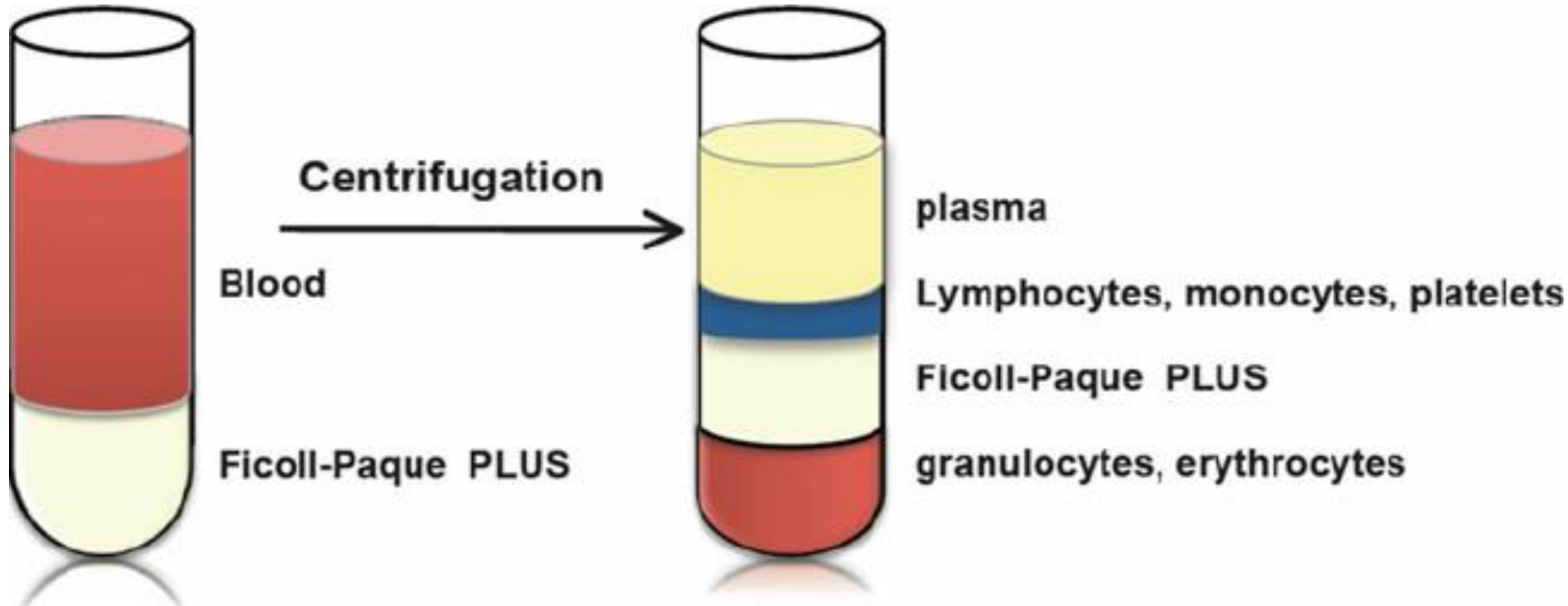


Gereç ve Yöntem



Fycoll ile Mononükleer Hücre Eldesi

- 4 ml kan örneğinden mononükleer hücreler *“Fycoll paque yoğunluk gradienti santifigürasyon yöntemi”* ile elde edildi ve -70 C saklandı.

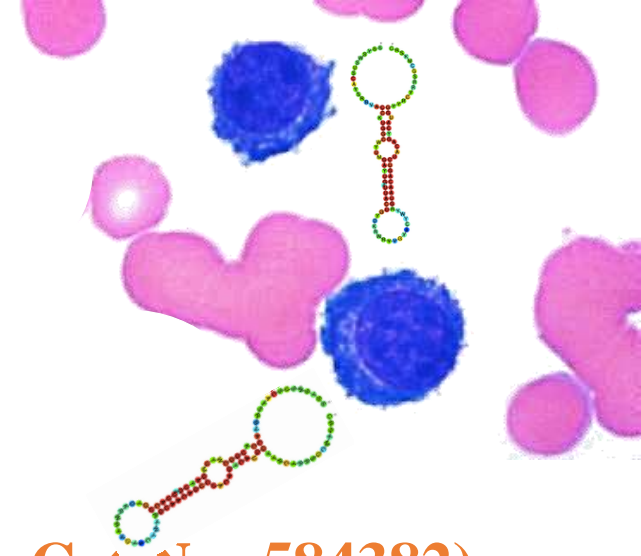


Gereç ve Yöntem

Mononükleer hücrelerden miRNA eldesi

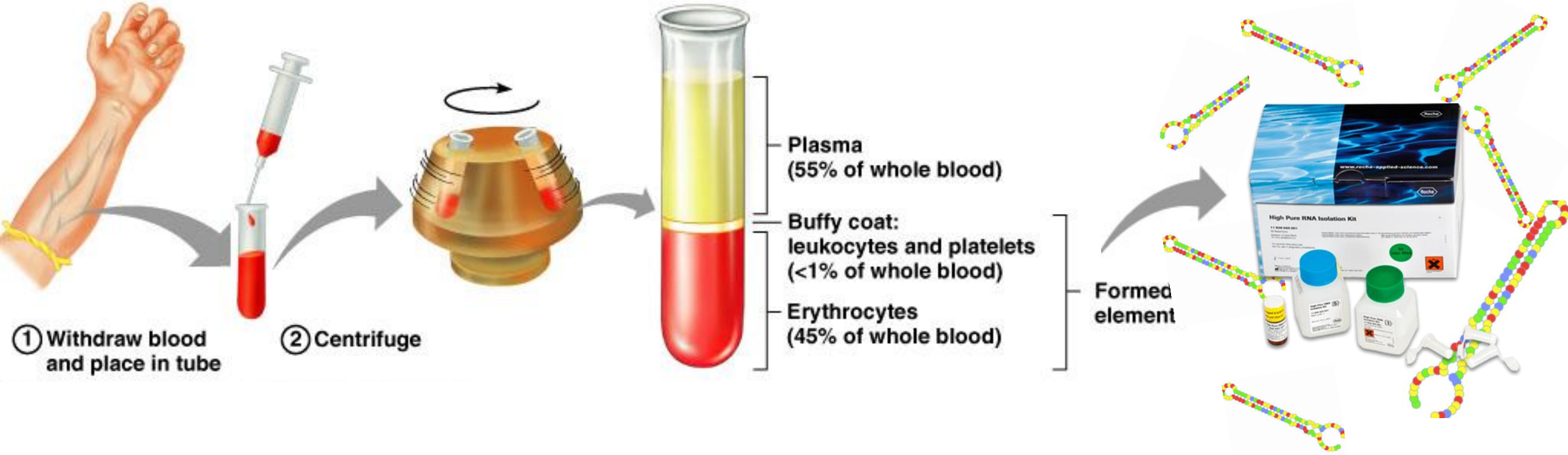
Ekstraksiyon kiti (**ExiQon miRCURY RNA Isolation Kit-Cell&Plant, Cat No: 584382**)

kullanılarak gerçekleştirildi. Elüye edilen Total RNA -70 °C saklandı.



Gereç ve Yöntem

Plazma ve Plazmadan miRNA eldesi



Ekstaksiyon kiti (Roche High Pure miRNA Isolation Kit, Cat

No:05080576001) ile gerçekleştirildi, Elüye RNA'lar -70 °C'de saklandı.

Gereç ve Yöntem

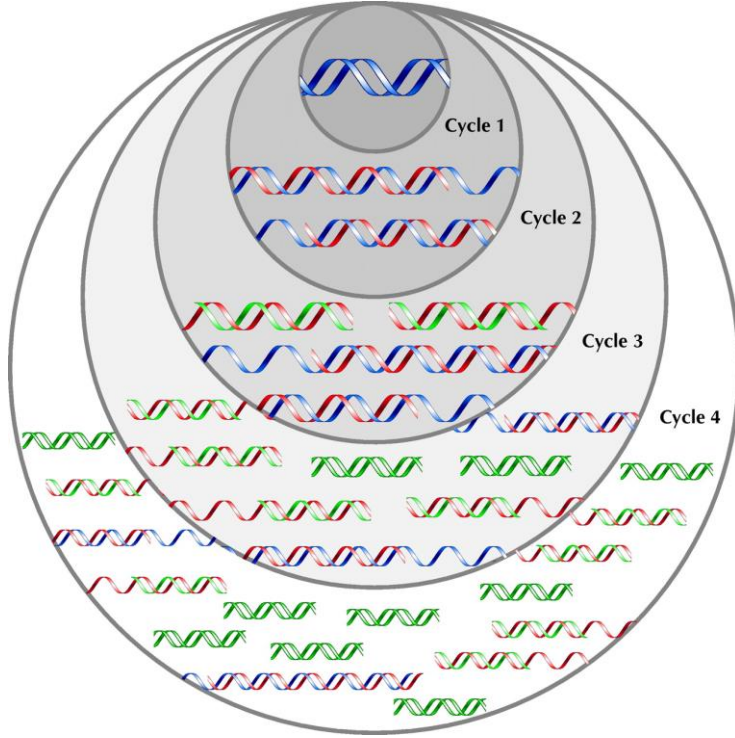
MikroRNA düzeylerinin RealTime PCR ile ölçümü

Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

Total RNA (**Exiqon miRCURY LNA™ universal cDNA shythesis kit**) ile komplementer DNA elde edildi ve reamplifikasyon adımına kadar 20°C de saklandı.

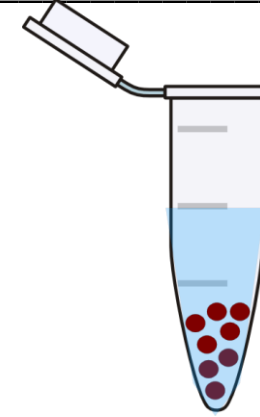


PreAmplifikasyon Hazırlanması (Preamplifiye cdna. Real time daha etkin çalışması)



TaqMan PreAmp Master Mix 300 μ l (Life Technologies P/N 4361128)

Pool Primer Mix 150 μ l



TOPLAM 450 μ l

PreAmp Protokolü

95° C 10 dakika

95° C 15 saniye 15 döngü

60° C 4 dakika

4° C ∞

- 54 er μ l 8'li stripe transfer edilir
- 8 kanallı pipet ile 3.75 er μ l alınarak 96'lık piko Plate'in tüm kuyularına pipetlenir
- 1.25 er μ l cDNA eklendi (toplam 5)
- Plate, film ile kaplandı, plate karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırıldı.

Ekzonükleaz Adımı (Bağlanmayan primerler ve pcr artıklarının uzaklaşması)

Exonuclease Buffer 24 μ l (BioLabs P/N 191502)

Exonuclease I 48 μ l (BioLabs P/N 11502)

Dnase-Rnase Free su 168 μ l

TOPLAM 240 μ l



7°C 30 dakika

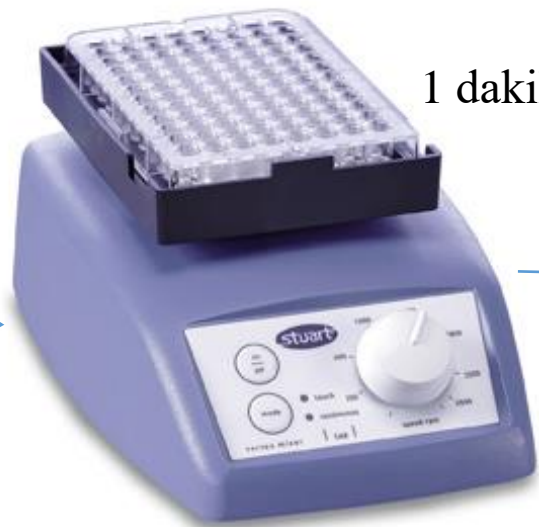
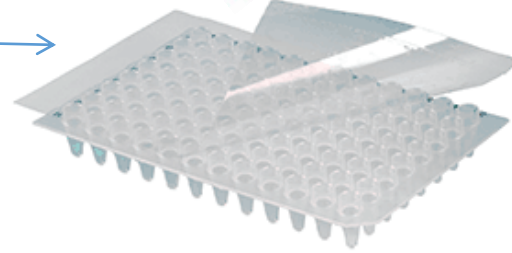
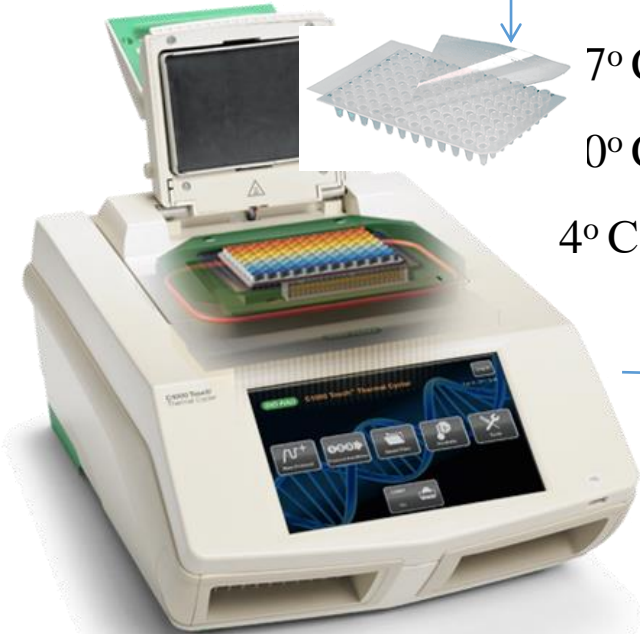
0°C 15 dakika

4°C ∞

DNase RNase free su

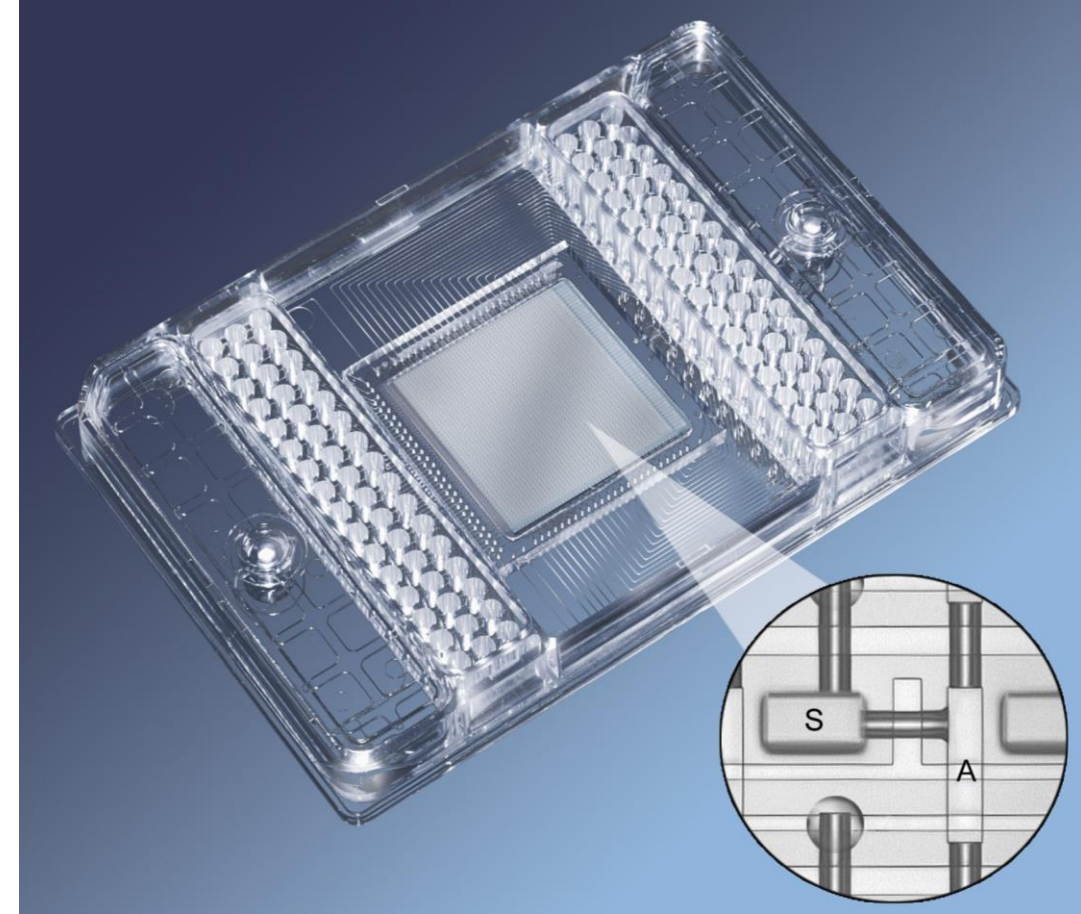
3000 rpm 3 dk

1 dakika santrifüj



Dynamic Array

1. Dynamic Array'in hazırlanması,
2. Primer Plate'inin hazırlanması,
3. Örneklerin hazırlanması,
4. Dynamic Array'e pipetlemelerin yapılması,
5. Dynamic Array'in yüklenmesi,
6. Dynamic Array'in BioMark da çalışılması.



<http://www.selectscience.net/selectscience-tv/videos/biomark-system-9696-dynamic-array/?videoID=101>

<http://www.selectscience.net/SelectScience-TV/Videos/biomark-system-software-suite-in-genetic-analysis/?&classID=0&compID=6059&videoID=100>

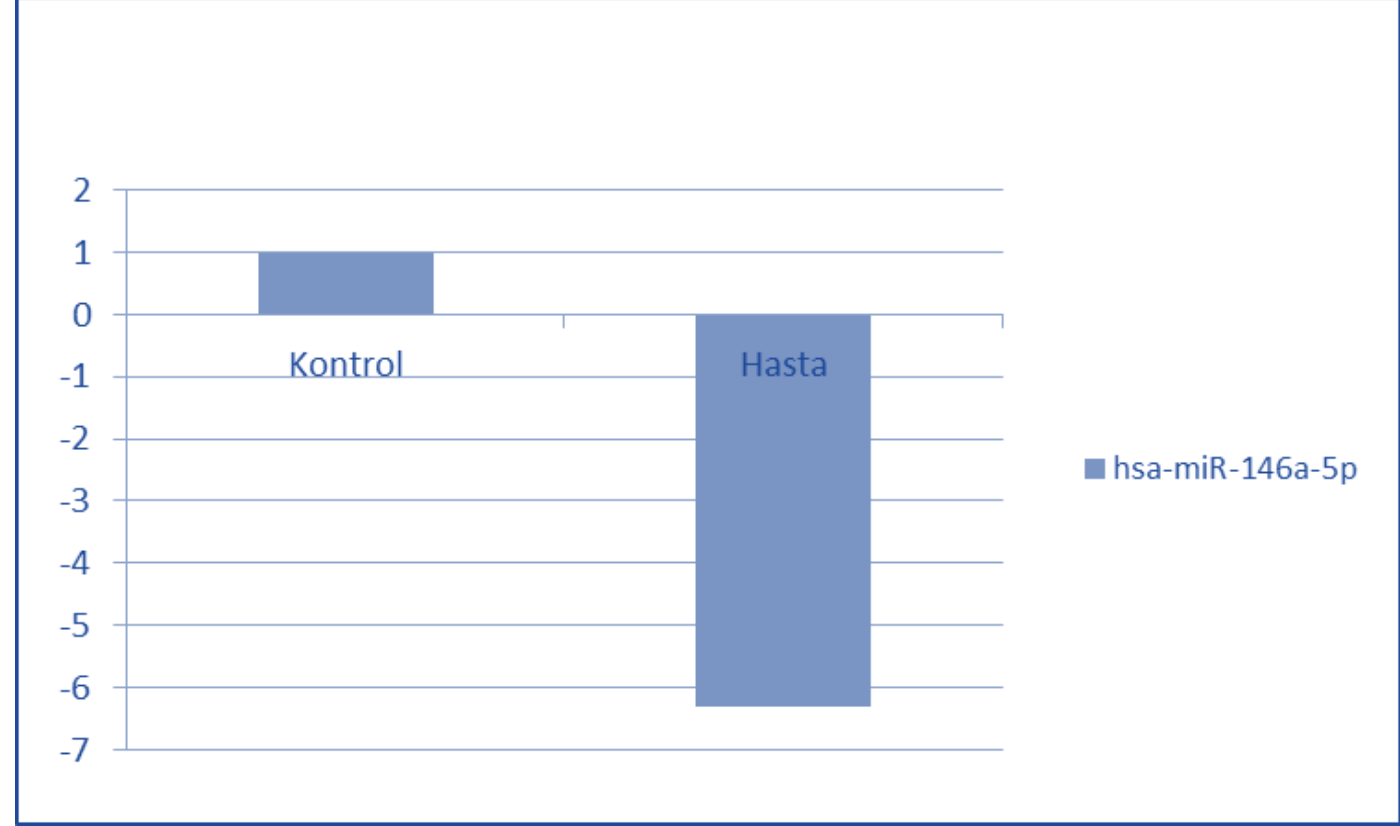
Bulgular

- Tbc tanısı almış, tedavi almamış 50 hasta, 30 sağlıklı birey,
- Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyetleri benzer,
- Her iki grup cinsiyet açısından karşılaştırıldığı zaman ise istatiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. (p: 0,682)



Mononükleer hücrelerde eksprese olan mikroRNA'ların p değerleri

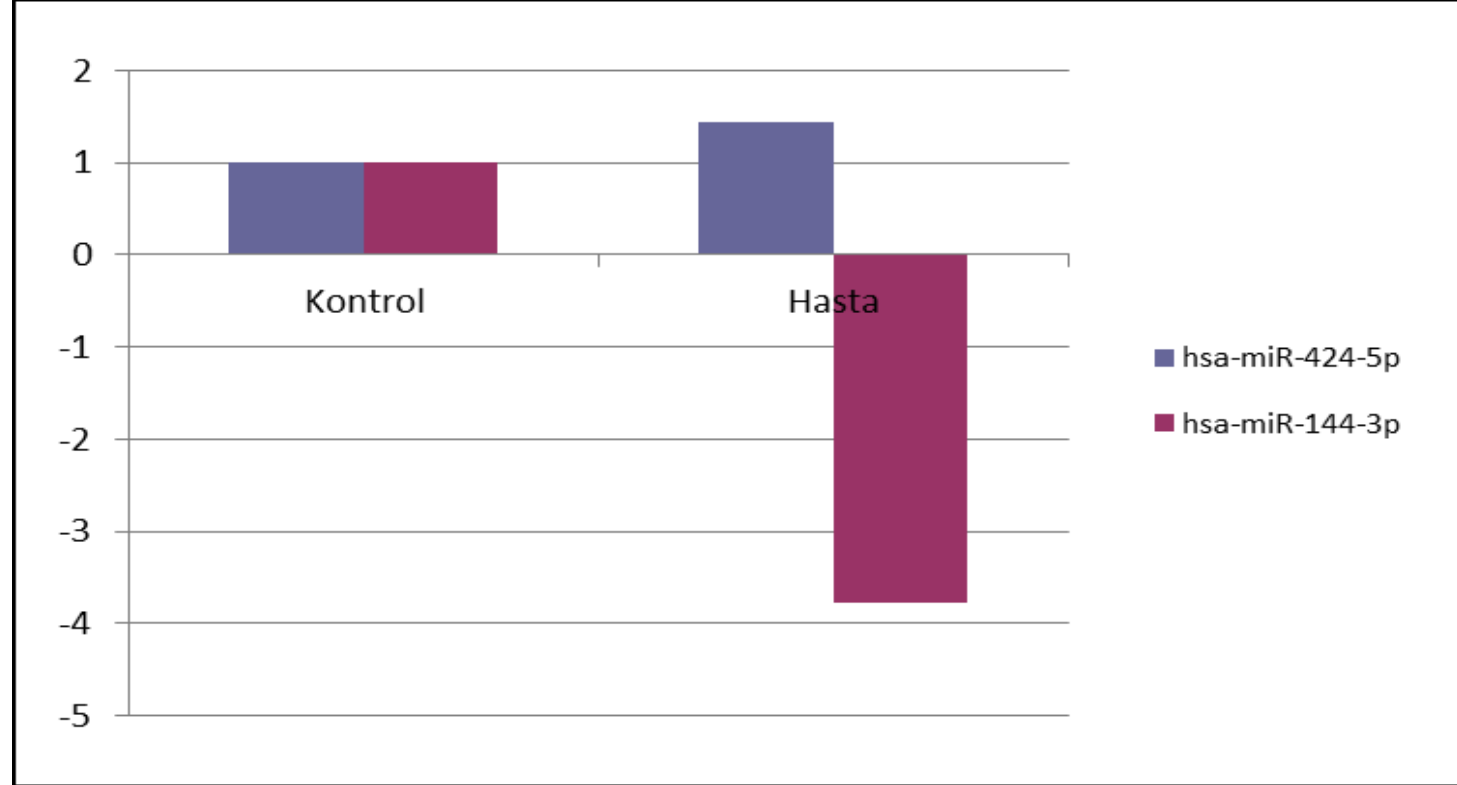
Position	Fold Regulation	P değeri
hsa-miR-146a-5p	-6,3085	0,046437
hsa-miR-421	-3,9378	0,978989
hsa-miR-223-3p	-3,3466	0,97132
hsa-miR-424-5p	-1,8068	0,574529
hsa-miR-365a-3p	-6,3655	0,087621
hsa-miR-144-3p	2,2828	0,10207
5S	1	0



miRNA	Kontrol	Hasta	p Değeri
hsa-miR-146a-5p	1	-6,3085	0,046437

Plazmada Eksprese olan mikroRNA'ların p değerleri

Position	Fold Regulation	P Değeri
hsa-miR-146a-5p	4,0102	0,130258
hsa-miR-421	1,2784	0,430189
hsa-miR-223-3p	2,0076	0,238731
hsa-miR-424-5p	1,4413	0,034614
hsa-miR-365a-3p	5,8673	0,100827
hsa-miR-144-3p	-3,7746	0,000518
hsa-miR-30e-5p	1	0



miRNA	Kontrol	Hasta	p Değeri
hsa-miR-424-5p	1	1,4413	0,034614
hsa-miR-144-3p	1	-3,7746	0,000518

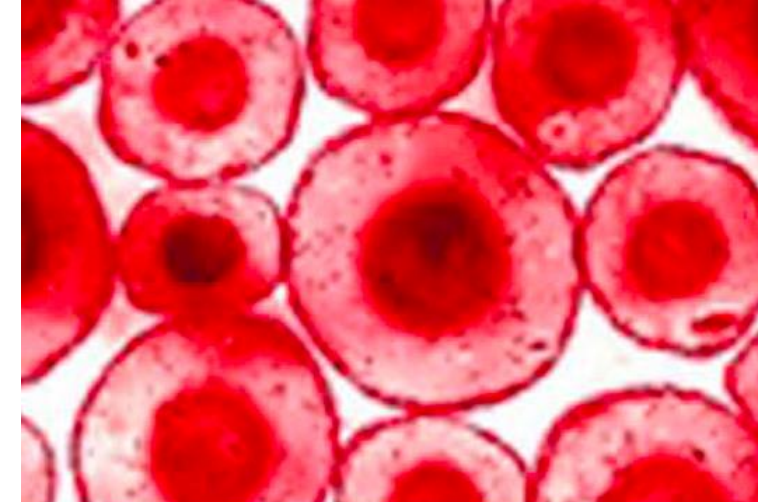
Tartışma

- Başarılı bir tüberküloz kontrolü ve tedavisi için **erken tanı** son derece önemlidir.
- Mevcut tanısal yaklaşımlar **klirik örnekte patojenin tanınması** esasına dayanmaktadır.
- Akciğer ve akciğer dışı tüberkülozda latent ve aktif tüberküloz hastalığının heterojen klinik özellikler taşımasından dolayı tüberküloz tanısında daha etkin ve olguların mikrobiyal olarak doğrulanmasını beklemeksizin **konağa ait biyobelirteçler** kullanılan tanısal testler geliştirilmesi en acil ihtiyaçtır.



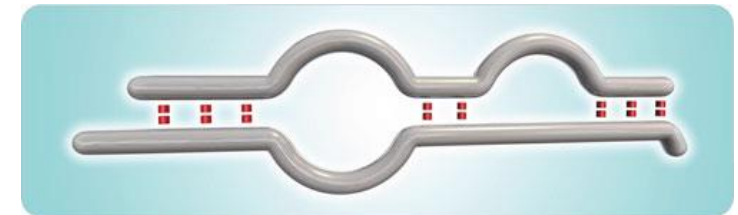
Tüberküloz patogenezinde mikroRNA'ların rolünü anlamaya yönelik;

- **Wang ve ark;** (2011) **aktif** tüberkülozlu hastaların **mononükleer** hücrelerinde sağlıklı ve latent tüberkülozlu hastalara kıyasla **miR-223 ve miR424**'ün **aşırı** eksprese olduğunu göstermişlerdir.
- **Yanhua Liu ve ark;** (2011) **mononükleer** hücre mikroRNA seviyeleri belirlendikleri çalışmada **miR-144** belirgin **artış** göstermiştir.
 - miR144'ün T hücre proliferasyonu, interferon gama ve TNF- α üretimini regüle ederek hastalığın gelişimi ve tüberkülozla sonuçlanmasında rol oynadığı görüşünü bildirmişlerdir.



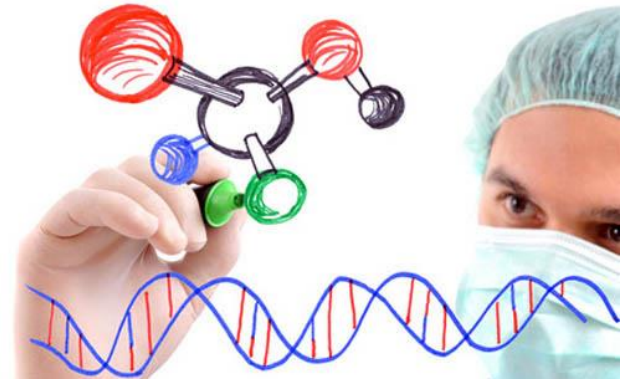
- **Spinelli ve ark (2012); mononükleer** hücrelerinde 6 miRNA (miR-223, miR-144*, miR-421, miR-424, miR-146a, miR-365) incelemişler ve **mir-146a**'nın hem periferal kanda hem de plevral sıvıda sağlıklı bireylere kıyasla ciddi derecede **downregüle** olduğu, **miR-424**'ün ise sadece periferal kan mononükleer hücre ifade düzeyinde istatikselsel olarak anlamlı derecede **artış** gösterdiği bildirilmiştir.
- Bizim çalışmamızda Spinelli ve ark. yaptığı çalışma ile uyumlu olarak **mir-146a**'nın **mononükleer** hücrelerde ciddi derecede **downregüle** olduğu görülürken, miR-424 **sadece plazma** ifade düzeyinde istatikselsel olarak anlamlı derecede **artış** görülmüştür.

(ek olarak yine sadece plazmada **miR-144**'ün ifade düzeyinde anlamlı bir **azalma** gözlenmiştir)

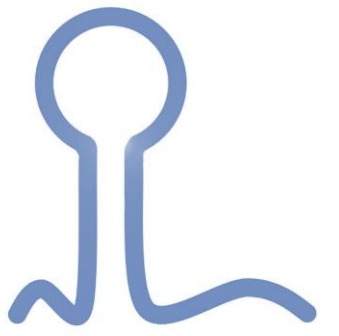


- **Zhen Liu ve ark;** (2014) aktif tüberkülozlu hastalarla yaptıkları çalışmada bizim çalışmamıza paralel olarak **miR-146a**'nın ifade düzeyinde **azalma** olduğu gösterilmiştir.

Çoğu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da benzer sonuçların yanı sıra farklılıkların gözlenmesinde analiz altındaki hastaların ve kontrol grubunun sayısı, tüberküloza olan yatkınlığı, genetik varyasyonlar gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir.

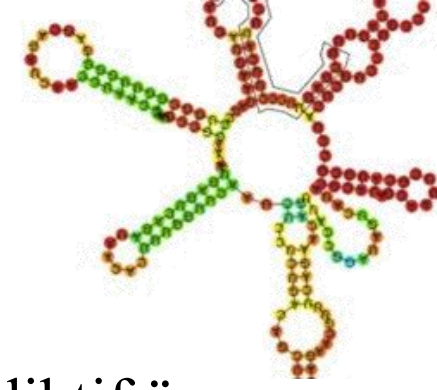


Sonuç ve Öneriler



Çalışmamızda tüberküloz tanısı almış fakat tedavi almamış hastaların mononükleer hücre ve plazmalarında 6 farklı miRNA ifade düzeyleri ile sağlıklı bireylerde miRNA ifade düzeylerinin kıyaslanması sonucunda;

- Mononükleer hücrelerden elde edilen **miRNA 146a**'nın aktif tüberkülozlu hastalar ile kontrol grubu kıyaslandığında ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.
 - Aktif tüberkülozlu hastalarda kontrol grubuna kıyasla miRNA 146a'nın downregüle olduğu gözlenmiştir.
- Plazmadan elde edilen **miRNA-424/144** aktif tüberkülozlu hastalar ile kontrol grubu kıyaslandığında ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.



MikroRNA'lar

- MikroRNA'lar aktif tüberkülozun **erken tanısında**, tedavinin **prognozunda** prediktif öneme sahip ideal potansiyel biomarker ve terapötik ajanlar olarak umut vadeden biyobelirteçlerdir.
- **kolay izole edilmesi** noninvazif yöntemlerle mikroRNA analizini kolaylaştırmaktadır,
- Çalışmamız ile elde ettiğimiz bulgular, bu alanda yapılmış olan çok az sayıdaki çalışmaya **önemli katkılar** sağlar nitelikte olup ülkemizde bu konuda yapılan **sayılı** çalışmalar arasındadır,
- Çalışmanın daha geniş hasta örneklerinde çalışılması ile miR-146a, miR-144 ve miR-424'ün tanısal prediktif değerinin daha da desteklenmesi gerekmektedir.

Aktif Akciğer Tüberkülozünün Erken Tanısında ve Prognozunda mikroRNA-29a, mikroRNA-144, mikroRNA-146a ve mikroRNA-155'in ile IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17 ve IL1- β 'nin İmmünoyolojik Marker Olarak Değerlendirilmesi



THAUM Tüberküloz Ekibi



Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

Öğr. Gör. Dr. Begüm KAYAR

Arş. Gör. Gülfer YAKICI



Dok. Öğr. Emel YARAR

Dok. Öğr. Fırat KARSLI

Yük. Lis. Öğr. Ali ÜÇKAYABAŞI



T.H.A.U.M

Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi Balcalı/ADANA

Tel:+90 322 338 60 60-3425 <http://www.tropikalhastaliklar.com>

