

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**RENAL TRANSPLANT ALICILARINDA PROTEOMİK
YÖNTEMLERLE YENİ BİYOBELİRTEÇLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Filiz ÖZCAN

Doktora Tezi

Antalya, 2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**RENAL TRANSPLANT ALICILARINDA PROTEOMİK
YÖNTEMLERLE YENİ BİYOBELİRTEÇLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Filiz ÖZCAN

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. S. Gültekin YÜCEL**

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2013.03.0122.003)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 07/09/2015

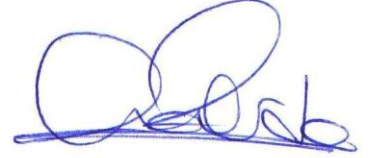
Tez Danışmanı : Prof. Dr. S.Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Gültekin SÜLEYMANLAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Onay:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun /..... /..... tarih ve /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayın ve diğer yayınlar aşağıdadır.

1. Derin N, Akpınar D, **Ozcan F**, Yargıçoğlu P, Aslan M. Protective Effects of Erdosteine on Amikacin Induced Visual Evoked Potentials and Lipid Peroxidation Alterations. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2011 Apr; 27(2):131-5. doi: 10.1089/jop.2010.0122. Epub 2011 Feb 15.
2. **Ozcan F**, Ozmen A, Akkaya B, Aliciguzel Y, Aslan M. Beneficial effect of myricetin on renal functions in streptozotocin-induced diabetes. *Clin Exp Med.* 2012 Dec;12(4):265-72. doi: 10.1007/s10238-011-0167-0. Epub 2011 Nov 15.
3. Aslan M, **Ozcan F**, Kucuksayan E.; Increased Small Dense LDL and Decreased Paraonase Enzyme Activity Reveals Formation of an Atherogenic Risk in Streptozotocin-Induced Diabetic Guinea Pigs; *J Diabetes Res.* 2013; 2013:860190. doi: 10.1155/2013/860190. Epub 2013 Mar 27.
4. Aslan M, **Özcan F**, Aslan I, Yücel G. LC-MS/MS analysis of plasma polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetic patients after insulin analog initiation therapy. *Lipids Health Dis.* 2013 Nov 6; 12:169. doi: 10.1186/1476-511X-12-169.
5. Aslan M, Aslan I, **Özcan F**, Eryılmaz R, Ensari CO, Bilecik T.; A pilot study investigating early postoperative changes of plasma polyunsaturated fatty acids after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Lipids Health Dis.* 2014 Apr 3;13:62. doi: 10.1186/1476-511X-13-62.
6. Aslan M, Celmeli G, **Ozcan F**, Kupesiz A. LC-MS/MS analysis of plasma polyunsaturated fatty acids in patients with homozygous sickle cell disease. *Clin Exp Med.* 2014 Jun 13. doi: 10.1007/s10238-014-0293-6 (Epub ahead of print)
7. Aslan Mutay, **Ozcan Filiz**, Tuzcu Hazal, Kirac, Ebru, Elpek Gulsum O. Inhibition of neutral sphingomyelinase decreases arachidonic acid mediated inflammation in liver ischemia–reperfusion injury. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Oct 15;7(11):7814-23. eCollection 2014.
8. Ercan, S; Kencebay, C; Basaranlar, G; **Ozcan, F**; Derin, N; Aslan, M. Induction of omega 6 inflammatory pathway by sodium metabisulfite in rat liver and its attenuation by ghrelin. *Lipids Health Dis.* 2015 Feb 17;14(1):7. doi: 10.1186/s12944-015-0008-3.
9. Kirac E, **Ozcan F**, Tuzcu H, Elpek Gulsum O, Aslan M; Analysis of Polyunsaturated Fatty Acids and Omega-6 Inflammatory Pathway in Hepatic

Ischemia- Reperfusion Injury; Mol Med Rep. 2015 Sep;12(3):4149-56. doi: 10.3892/mmr.2015.3908. Epub 2015 Jun 11. PMID: 26062838.

10. Unal B, **Ozcan F**, Tuzcu H, Kirac E, Elpek GO, Aslan M; Inhibition of Neutral Sphingomyelinase Decreases Elevated Levels of Nitrate and Oxidative Stress Markers in Liver Ischemia–Reperfusion Injury. Hepatology Research. Değerlendirme aşamasında.

11. **Ozcan F**, Akbas H, Kirac E, Suleymanlar G, Aslan M, Yucel G; Mass Spectrometric Quantification of Urinary Human Liver Fatty Acid Binding Protein in Renal Transplant Recipients. Rapid Commun Mass Spectrom. Değerlendirme aşamasında

12. **Ozcan F**, Akbas H, , Suleymanlar G, Aslan M, Yucel G; Mass Spectrometric Quantification of Urinary Human Netrin-1 Protein in Renal Transplant Recipients. Current Proteomics. Değerlendirme aşamasında.

ÖZET

Renal transplantasyon, son dönem böbrek hastalığının tedavisinde en iyi seçenektir. Renal allogreft biyopsi rejeksiyonun tanısında referans yöntemdir. Ancak invaziv doğası nedeniyle, rejeksiyonun erken tanısını sağlayan yeni klinik ve biyokimyasal belirteçler böbrek nakli bir öncelik olmuştur. İdrar karaciğer- yağasidi bağlanma proteini (L-FABP) insan böbrek transplant hastalarında renal iskeminin umut vadeden erken bir biyobelirteci olarak değerlendirilmektedir. Netrin-1 renal transplantasyon sonrası akut böbrek hasarının (AKI) yararlı bir erken diagnostik biyobelirteci olabilir. Klinik pratikte L-FABP ve netrin-1 kullanımının bu biyobelirteçler ile özgüllük, doğruluk ve sağlamlığı birleştiren bir analitik yöntem ile ilişkili olması gerekir. Bu çalışmada renal transplantasyon hastalarında idrar L-FABP ve netrin-1 düzeylerini ölçmek için tandem kütle spektrometresi-ultra hızlı sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) kullanılarak optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemini geliştirmeyi amaçladık. Rekombinant insan L-FABP ve netrin-1 triptik standartları, Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- uçuş zamanlı kütle spektrometre (MALDI TOF) MS/MS ve LC-MS/MS cihazlarında, kantitasyon amacıyla MRM metodu geliştirmede kullanılacak peptidlerin seçimi için analiz edildiler. L-FABP ve netrin-1'in kütle spektrometrik analizinden önce, renal transplant alıcılarından alınan idrar örneklerinde izolasyon, konsantrasyon, çöktürme ve triptik kesim işlemleri yapıldı. Netrin- ve L-FABP düzeyleri hem serum hem de idrar örneklerine enzim immunoassay ile ölçüldü. LC-MS/MS analizleri için L-FABP kantitasyonunda en iyi sinyal MH^+ of $^{50}FTITAGSK^{57}$ (m/z 824) triptik peptidinden sağlandı. MALDI-TOF MS/MS spektralarından elde edilen $^{50}FTITAGSK^{57} MH^+$ iyonunun, çarpışma indüklü parçalanması (CID) sonucunda belirlenen y3 fragment iyonu kantitatif MRM metodu için kullanıldı. Benzer bir şekilde netrin-1'in LC-MS/MS kantitasyonu için $^{270}DSYFYAVSDLQVGGR^{284} MH^{+2}$ (m/z 839) iyonu en iyi sinyali sağladı. MALDI-TOF MS/MS spektralarından elde edilen $^{270}DSYFYAVSDLQVGGR^{284} MH^{+2}$ iyonunun, çarpışma indüklü parçalanması (CID) sonucunda belirlenen y8, y9, ve y11 fragment iyonları kantitatif MRM metodu için kullanıldı. Serum L-FABP ve netrin-1 düzeyleri ELISA ve LC-MS/MS metodları ile ölçüldü. Serum örneklerinde transplantasyon öncesi ve sonrasında her iki protein için herhangi bir fark gözlemlenmedi. ELISA ile analiz edilen idrar L-FABP düzeyleri transplantasyon sonrası anlamlı düzeyde artmış bulundu. LC-MS/MS ile ölçülen transplantasyon sonrası idrar L-FABP ve netrin-1 anlamlı derecede yüksek bulundu. İki metod arasındaki sperman korelasyon katsayısı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Gün içi ve günler arası ölçümlerin varyasyon katsayıları LC-MS/MS analizinin validasyonu için yüksek tekrarlanabilirlik sağladı. L-FABP ve netrin-1'in LC-MS/MS ile kantitasyonu insan böbrek transplant hastalarında bu potansiyel biyobelirteçlerin değişimlerini belirlemek için yeni referans metod olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Netrin-1, L-FABP, Tandem kütle spektrometri, Renal Transplantasyon

ABSTRACT

Renal transplantation is the best choice for the treatment of end-stage kidney disease. Renal allograft biopsy is the reference standard for diagnosis of rejection, however due to its invasive nature, new clinical and biochemical diagnostic markers allowing early prediction of rejection has been a priority in renal transplantation. Urinary liver-fatty acid binding protein (L-FABP) has been evaluated as a promising early biomarker of renal ischemia in human kidney transplant patients. Netrin-1 can be a useful early diagnostic biomarker of acute kidney injury (AKI) after renal transplantation. The use of L-FABP and netrin-1 in clinical practice requires that these biomarkers be associated with an analytical method that combines specificity, accuracy and robustness. This study aimed to develop an optimized multiple reaction monitoring (MRM) method using ultrafast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to measure urinary L-FABP and netrin-1 levels in renal transplant recipients. Purified recombinant human L-FABP and netrin-1 tryptic standards were analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) MS/MS and LC-MS/MS to select for peptides that provided specificity and adequate response in developing an MRM method for urinary L-FABP and netrin-1 quantification. Human urine samples collected from kidney transplant recipients were isolated, concentrated, precipitated and trypsin digested before mass spectrometric analysis of L-FABP and netrin-1. Netrin-1 and L-FABP levels were also measured in urine and serum samples by enzyme immunoassay. The tryptic peptide ion MH^+ of $^{50}FTITAGSK^{57}$ (m/z 824) provided an adequate signal and was used for quantification of L-FABP under conditions employed for LC-MS/MS analysis. MALDI-TOF MS/MS spectra obtained by collision-induced dissociation of the parent MH^+ ion $^{50}FTITAGSK^{57}$ resulted in an y_3 product ion that was used for quantitative analysis by MRM method. Likewise, the tryptic peptide ion MH^{+2} of $^{270}DSYFYAVSDLQVGGR^{284}$ (m/z 839) provided an adequate signal and was used for quantification of netrin-1 under conditions employed for LC-MS/MS analysis. MALDI-TOF MS/MS spectra obtained by collision-induced dissociation of the parent MH^{+2} ion $^{270}DSYFYAVSDLQVGGR^{284}$ resulted in y_8 , y_9 and y_{11} product ions that were used for quantitative analysis by MRM method. Serum L-FABP and netrin-1 levels were evaluated via ELISA and LC-MS/MS methods. But there were not any difference between protein levels in serum samples before and after transplantation. Urinary L-FABP levels analyzed with ELISA was significantly increased after transplantation. Urinary L-FABP and netrin-1 contents measured by LC-MS/MS after transplantation was significantly higher compared to before transplantation levels. The Spearman correlation coefficient between the two methods was statistically significant. Intra-day and inter-day coefficient of variation provided good repeatability and reproducibility for validation of LC-MS/MS analysis. LC-MS/MS quantification of L-FABP and netrin-1 may provide a new reference method to determine changes of this potential biomarker in human kidney transplant patients.

Key words: Netrin-1, L-FABP, Tandem mass spectrometry, Renal transplantation

TEŐEKKÖR

Bu araŐtırmanın planlanması ve yapılmasında yardımlarını esirgemeyen proje yürütücüsü ve akademik danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. S. Gültekin YÜCEL başta olmak üzere tüm bölüm hocalarıma;

Akademik hayatımın her aşamasında bilgi ve desteğini esirgemeyen, bu projenin tamamlanmasında beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mutay ASLAN'a;

Bu araŐtırmanın yapılmasında bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen ve katkıda bulunan değerli hocam Sayın Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ'a;

ÇalıŐmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm Organ Nakli Ünitesi çalışanlarına;

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma;

Tez çalışmam da dahil olmak üzere hayatımın her aşamasında desteklerini esirgemeyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbreklerin Yapısı ve Fonksiyonları	3
2.1.2. Nefron Yapısı ve Fonksiyonları	4
2.2. Böbrek Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi	5
2.2.1. Glomerular Filtrasyon Hızının Ölçülmesi	5
2.3. Böbrek Yetmezliği	9
2.3.1. Akut Böbrek Hastalığı	9
2.3.2. Kronik Böbrek Hastalığı	9
2.4. Son Dönem Böbrek Yetmezliğinde Renal Replasman Tedavileri	12
2.4.1. Renal Transplantasyon	13
2.5. Renal Transplantasyonda Biyobelirteçler	15
2.5.1. Netrin-1 Proteini	17
2.5.2. Karaciğer Tip –Yağ Asidi Bağlanma Proteini (L-FABP)	18
2.6. Proteomik Yöntemler	20
2.6.1. Proteomiks Nedir?	20
2.6.2. Kütle Spektrometri Teknikleri	21
2.6.3. İyonizasyon Teknikleri	22
2.6.4. Kütle Analizörleri	23

MATERYAL VE METOD	26
3.1. Hasta Seçimi	26
3.2. Laboratuvar ölçümleri	26
3.3. Kütle Spektrometrik Analizler İçin Örnek Hazırlanması	26
3.3.1. L-FABP ve Netrin-1 proteinleri İçin Triptik Peptid Kesimi	26
3.3.2. Plazmadan Yüksek Yoğunluklu Proteinlerin Uzaklaştırılması	28
3.3.3. İdrar Konsantrasyon İşlemi	29
3.3.4. Protein Çöktürme İşlemi	30
3.4. Proteomik Teknikler	31
3.4.1. MALDI TOF Kütle Spektrometri Çalışmaları	31
3.4.2. Elektrospray İyonizasyon Kütle Spektrometri Çalışmaları	34
3.5. Netrin-1 Düzeylerinin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi	35
3.4. L-FABP Düzeylerinin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi	36
3.6. İstatistiksel Analiz	36
BULGULAR	37
4.1. Hasta Bilgileri ve Laboratuvar Değerleri	37
4.2. MALDI-TOF Kütle Spektrometri Bulguları	38
4.3. LC-MS/MS Metod Bulguları	43
4.4. Netrin-1 ELISA ve LC-MS/MS Ölçüm Bulguları	46
4.5. L-FABP ELISA ve LC-MS/MS Ölçüm Bulguları	49
TARTIŞMA	53
SONUÇLAR	59
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	619

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABY	: Akut böbrek yetmezliği
BUN	: Kan üre nitrojeni
CAPD	: Sürekli ayaktan periton diyalizi
CCPD	: Sürekli siklik periton diyalizi
C-G	: Cockcroft-Gault
CKD-EPI	: The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
ESRD	: End stage renal disease
GFH	: Glomerüler filtrasyon hızı
IL-18	: İnterlökin-18
IPD	: Aralıklı1 periton diyalizi
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
LC	: Likid kromatografi
LC-MS/MS	: Likid kromatografi- üçlü kuadrupol kütle spektrometrisi
L-FABP	: Karaciğer-tip yağ asidi bağlama proteini
MALDI	: Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
MDRD	: The Modification of Diet in Renal Disease
MRM	: Çoklu reaksiyon izleme
MS	: Kütle spektrometri
NGAL	: Nötrofil jelatin ilişkili lipokalin
NKF	: National Kidney Foundation
RRT	: Renal replasman tedavisi
SDBY	: Son dönem böbrek yetmezliği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Kaynağı	22
2.2. Elektrosprey İyonizasyonun Şematik Gösterimi	23
2.3. TOF-TOF Kütle Analizörünün Şematik Gösterimi	24
2.4. Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM)	25
3.1. MALDI TOFMix™ kalibratör spektrumu	33
3.2. Teorik Triptik Peptid Kesimi İçin Kullanılan Web Sitesi	33
3.3. Netrin-1 LC-MS/MS Kalibrasyon Eğrisi	34
3.4. L-FABP LC-MS/MS Kalibrasyon Eğrisi	35
3.5. Netrin-1 ELISA standart eğrisi	35
3.6. L-FABP ELISA standart eğrisi	36
4.1. L-FABP'in m/z 824 MH^{+2} ana iyonunun MALDI-TOF MS spektrumu	39
4.2. L-FABP'in m/z 824 MH^{+2} ana iyonunun MALDI-TOF MS/MS spektrumu.	40
4.3. Netrin-1proteininin m/z 839 MH^{+2} ana iyonunun MALDI-TOF MS spektrumu.	42
4.4. Netrin-1proteininin m/z 839 MH^{+2} ana iyonunun MALDI-TOF MS/MS spektrumu	42
4.5. L-FABP ESI-MS/MS Spectra.	44
4.6. Netrin-1 ESI-MS/MS Spectra.	45
4.7. İnternal Standart $^{13}C_6$ -Fenilalanin LC-MS/MS verileri	46
4.8. İnsan Netrin-1 proteininin idrar örneklerinde analizi	47
4.9. Serum Netrin-1 Değerleri	49
4.10. İnsan L-FABP'nin idrar örneklerinde analizi	50
4.11. Serum L-FABP ELISA sonuçları	52

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Kronik böbrek hastalığının evreleri.	10
2.2. Ülkemizdeki 2013 yılı sonunda kronik hemodiyaliz programında izlenmekte olan hastalarda KBH nedenleri	11
2.2. Ülkemizdeki 2013 yılı sonunda kronik hemodiyaliz programında izlenmekte olan hastalarda KBH nedenleri	11
2.3. Ülkemizde 2013 yılı içinde renal transplantasyon yapılmış olan hastalarda etyolojik nedenlere göre dağılım	12
3.1. TOFMix TM Kalibrasyon Kitindeki Standart Peptidlerin Kütle Değerleri	32
4.1. Hastalara ait bilgiler	37
4.2. Hasta Laboratuvar Değerleri	38
4.3. İnsan L-FABP'nin Primer Yapısı	39
4.4. İnsan Netrin-1 Proteininin Primer Yapısı	41
4.5. LC-MS/MS Sisteminde Kullanılan Ana İyon ve Fragment İyonlar	43
4.6. İnsan Netrin-1 proteini için validasyon parametreleri	48
4.7. İnsan L-FABP için validasyon parametreleri	51

GİRİŞ

Böbrek transplantasyonu geri dönüşümsüz böbrek hasarı veya son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) olan hastalarda yaşam kalitesini arttıran modern tıbbın başlıca gelişmelerinden biridir. 50 yıl önce deneysel, riskli ve oldukça sınırlı bir tedavi seçeneği iken, günümüzde klinikte pratik olarak 80'den fazla ülkede kullanılan bir yöntemdir. Tip 2 diyabetin ve kronik böbrek hastalıklarının diğer nedenlerindeki artışın sonucunda, dünya çapında SDBY hastalığına sahip insan sayısı hızlı bir şekilde artmaktadır [1].

Böbrek transplantasyonu günümüzde, SDBY hastalarında sağlığı ve yaşam kalitesini arttırdığı için en iyi tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Renal greft sağkalımı başarılı immünsupresyon tedavileri ile sağlanmaktadır [2]. Ancak başlangıçta greft sağkalımı başarılı olsa bile, uzun dönemde böbrek transplantının reddi önemli bir klinik problem olarak karşımıza çıkmaktadır [3].

Böbrek hasarı biyobelirteçleri ile non-invaziv olarak allograft hasarın değerlendirilebileceği ve böbreğe spesifik çeşitli proteinler ölçülerek hasarın tanımlanabileceği düşünülmektedir. Önceki çalışmalar bazı biyobelirteçlerin renal tübül hücre hasarı sırasında idrara salındığını ve non-invaziv olarak ölçülebildiğini göstermişlerdir. Bu biyobelirteçlerin allograft hasarı erken dönemde değerlendirmek ve uzun vadeli allograft fonksiyonunu korumak için gerekli olduğu düşünülmektedir [4].

Böbrek allograft rejeksiyonu erken teşhisi ve tedavisi için non-invaziv yeni belirteçler ile ilişkili çalışmalar sürmektedir. Yeni protein biyobelirteçlerinin tespiti genellikle ELISA ve flow sitometri gibi floresan sistemler ile çalışılmaktadır. Günümüzde proteomik çalışmalarında greft durumu belirlemek üzerinde durulmaktadır. Proteomik yaklaşımlar doku örnekleri, plazma ve idrar gibi biyolojik örneklerde kütle spektrometri, kromatografi ya da elektroforez sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir [5].

Teknolojik gelişmeler, hastalığın ilerlemesi, tanı veya tedaviye yanıt ile ilgili belirteçlerin bulunmasına yönelik proteomik çalışmaların ilerlemesine sebep olmuştur. Renal hastalıklar bu tür çalışmalar için idealdir. İdrar gibi kolay ulaşılabilir biyolojik sıvılar ve bu sıvıların içerdiği proteinler çoğunlukla böbrek kökenlidir. Geçerli renal tanı belirteçleri kısıtlıdır ve renal biyopsi tanı için çözüm metodu olarak kalmıştır. Yüzlerce proteini nanomolar hatta femtomolar konsantrasyonlarda

ölçebilen kütle spektrometri cihazları, hastalık seyri, tanı ve tedaviye yanıt için yeni belirteçlerin bulunmasına olanak sağlayabilecektir. Renal hastalıklar için tedavinin etkinliği diagnostik, prognostik ve terapötik belirteçlerin eksikliği ile sınırlıdır. Biyopsi tanı testlerinde altın standart olarak kabul edilir, ancak kanama ağrı ve ölüm sebebiyle risklidir. Tanıda en yaygın kullanılan biyokimyasal indikatör serum kreatinin ve idrar proteindir. Serum kreatinini renal disfonksiyon için geç bir belirteçtir ve kullanımında ilave sakıncaları vardır. Glomerular filtrasyon hızını ölçmek için kullanılır, ancak diyet ve kas kitlesi ile düzeyi değişebilir. İdrar proteini yetersizlikleri olmasına rağmen mevcut en iyi tanısal belirteçtir, ancak nonspesifiktir ve riskle ilişkili düzeyleri farklı hastalıklar arasında değişir. Daha spesifik proteinlerdeki bozukluklar hakkında bilgi sahibi olmak renal hastalıkların en iyi şekilde kontrolünü sağlayabilecektir. Proteomiks günden güne gelişmektedir ve bu yöntemin temelini anlamak için klinisyenler ile bilim adamlarının ilgisi artmaktadır [6].

Bu çalışmada renal transplantasyon yapılan hastalardaki bazı protein belirteçlerinin transplantasyon öncesi ve sonrasındaki değişimleri kütle spektrometrik yöntemler ile takip edilerek biyobelirteç çalışmalarına yeni bilgiler sunulması hedeflenmiştir. Bu amaçla, son zamanlarda yapılan insan ve hayvan çalışmalarında serum kreatinin artışı gerçekleşmeden önce idrarda değişim gösteren netrin-1 ve karaciğer tip –yağ asidi bağlanma proteini (L-FABP) gibi proteinler üzerinde odaklanılmıştır. Netrin-1 böbrek kaybını izlemeye, tanıya ve tedavide oluşturulacak belirteç panelinde önemli bir üye olabilme potansiyelindedir. Netrin-1 böbrek transplantasyonu sonrası gecikmiş greft fonksiyonu için prediktif biyomarker olup olmadığını test etmenin ilginç olacağını düşünmektedirler [7]. Kronik böbrek hastalıkları ve onunu ilerleyişini öngörmek için L-FABP’ın incelendiği yeni büyük çalışmalara ihtiyaç duyulduğu aşikardır [8].

Netrin-1 ve L-FABP’ın ölçümü için standardize edilmiş bir klinik platform bulunmamaktadır. Yapacağımız bu çalışmada L-FABP ve netrin-1 için likid kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) siteminde standardize edilmiş bir metod uygulaması yapmayı hedeflenmiştir. Biyobelirteçlerden oluşturulmuş panellerin, ilgili klinik bilgilerle birlikte, akut böbrek hasarı olan yoğun bakım hastalarında, erken ve doğru tanı için gerekli olacak olması muhtemeldir. Bu çalışmamızda idrar netrin-1 ve L-FABP ölçümleri akut böbrek hasarı için çok yararlı parametreler olabilir. Yapılacak çalışmalar sonucunda, netrin-1 ve L-FABP ölçümleri çeşitli etiyojilerdeki akut böbrek hasarı olan ve yüksek risk taşıyan hastalarda, hastalığın şiddeti ve prognozunu belirlemede kullanılabilecek biyobelirteç panelinin önemli üyeleri olabilecek potansiyelindedir. L-FABP ve netrin-1 gibi biyobelirteçler birleştirilerek oluşturulmuş biyobelirteç panelleri ile, renal transplantasyon yapılan heterojen bir hasta grubunda dahi akut böbrek hasarı teşhisi daha erken ve kolay bir şekilde konabilir. Farklı duyarlılık ve özgülükteki belirteçlerin kombinasyonunun, biyobelirteçlerin tanısal performansını artırmak için makul bir strateji sunacağını düşünmekteyiz. Özet olarak, otomatize ve yüksek verimlilikteki proteomik teknolojilerinin gelişmesi bilimsel araştırmalara hız katacaktır. Araştırmaların daha da artması için, klinisyen ve proteomik konusunda uzman bilim insanlarının birlikte çalışabileceği uluslararası standartlarda laboratuvarlar önem taşımaktadır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreklerin Yapısı ve Fonksiyonları

Böbrekler lomber bölgede yer alan ikili organ sistemini oluşturur. Bu organlar kanı filtre eder, hücre dışı sıvıda bulunan hidrojen, sodyum, potasyum, fosfat ve diğer iyonların konsantrasyonlarını düzenler ve metabolizmanın son ürünlerini idrar formunda dışarı atar [9]. Yetişkin bir insanda her bir böbrek yaklaşık 12 cm uzunluğunda yaklaşık 150 g ağırlığındadır [9-11].

Böbrek korteks ve medulla kısımlarından oluşur [9, 10]. Medüller madde, tabanları kortekste yer alan uç kısımları papilla adını alan ve böbreğin kaliksleri içine uzanan piramitleri oluşturur. Böbrek piramitlerinin sayısı 10-15 kadardır. Her bir böbrek parankimi bağ dokusuyla birbirine bağlı nefronlardan oluşmuştur. Nefronlardan gelen idrar pelviste toplanır ve ureteropelvik birleşme yerinden ureter içine akar. Üreterler her bir böbrekte oluşan idrarı, uretradan dışarı atılincaya kadar depolandığı mesaneye taşır. Böbreklerin sempatik ve parasempatik sinir yapıları ve lenf direnajları vardır[9].

Böbrekler, vücut için önemli işlevleri olan organlardır. Böbreklerin 3 önemli fonksiyonu vardır. Bunlardan birincisi atılım fonksiyonu (idrar oluşumu), ikincisi düzenleyici fonksiyon (sıvı-elektrolit dengesi) ve üçüncüsü metabolik fonksiyondur (hormonların yapım ve yıkımı, glukoneogenez) [9, 10].

Böbrekler, metabolizmanın son yıkım ürünlerini ve diyetle sindirilen inorganik maddelerin fazlasını vücuttan uzaklaştıran idrarı üretir ve dışarı atar. İdrar, böbrekler tarafından salgılanan, ureterlerden geçen, mesanede depolanan ve uretra yoluyla dışarı atılan bir sıvıdır [9]. Böbreklerin atılım fonksiyonu glomerüllerden plazmanın filtrasyonu, tübüler lümeninden kana suda çözünen maddelerin taşınması (tübüler geri emilim) ve tübüler hücrelerden lümene madde taşınmasını (tübüler sekresyon) kapsamaktadır [12]. Sağlıklı kişilerde günde ortalama 170-200 L filtrat oluşmaktadır [9, 12]. Oluşan filtratın yaklaşık %99'u geri emilir [12] ve kalan %1'lik kısmı 0,4-2 L'lik idrar hacmini oluşturur [9].

Böbreklerin düzenleyici fonksiyonu homeostazda önemli rol oynar. Nefron tübülünde yerleşik farklı geri emilim ve salgılama mekanizmaları vardır. Mekanizmalar böbrek içi ve dışı humoral faktörlerin de eşlik ettiği karmaşık bir kontrol sisteminde işlev görürler. Proksimal tübül çoğunlukla geri emilim işlemiyle ilişkilidir. Ultrafiltratta bulunan sodyum klorür ve suyun %75'i i bikarbonat, fosfat, kalsiyum ve potasyumun ise çoğu proksimal tübülde geri emilir. Normal olarak yüksek eşik değeri olan (glukoz ve aminoasitler gibi) maddeler hücre içi özel aktif taşıma sistemleri ile proksimal tübülde geri emilirler [9]. Proksimal tübülü terk eden sıvı izotoniktir. Henle kulpunun inen kolu suya ileri derecede geçirgendir [12]. Yukarı çıkan henle kulpunda filtre edilmiş sodyumun %20-25 kadarı susuz geri emilir. Bu işlem sonucu seyreltik idrar oluşturulur. Suyun geri emilimi ise antidiüretik hormon tarafından düzenlenir. Distal tübül, plazma asit-baz düzeyleri ve plazma elektrolitlerinin homeostatik düzenlenmesinde nefronun işlevsel olarak en aktif olan bölgesidir. Bu bölgede salgılama ve geri emilim işlemleri Na^+ , K^+ ve H^+ arasındaki kombinasyon ile gerçekleşir. Distal tübülde, özellikle Na^+ 'un tutulması gerektiğinde Aldosteron Na^+ 'un geri emilimi için güçlü bir modülatördür [9].

Böbreğin diğer bir önemli işlevi metabolik fonksiyondur. Böbrekler, hem kendileri hormon sentezler hem de herhangi bir yerde üretilen veya aktive edilen hormonların hedef bölgesidir. Ayrıca insülin ve aldosteron gibi hormonların yıkılma bölgesidirler. Böbrekler tarafından üretilen hormonlar eritropoetin, renin, prostoglandin, tromboksan ve 1,25-(OH) vitamin D'dir [9].

2.1.2. Nefron Yapısı ve Fonksiyonları

Nefron, mikroskobik olarak böbreğin en küçük anatomik ve fonksiyonel birimidir [9, 10]. Takriben 50 mm uzunluğunda ve her iki böbrekte yaklaşık 2 milyon kadar bulunur. Nefron sayısı insandan insana değişebilir [10]. Her bir nefronda bir glomerül, proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı kanal bulunur [9, 10].

Glomerül özelleşmiş bir kılcak damar ağından oluşmuştur [9]. Glomerül, renal tübülün kör ve genişlemiş ucu tarafından oluşturulan Bowman kapsülü ile sarılmıştır. Bowman kapsülü proksimal kıvrımlı tübülün başlangıcını oluşturur. Bowman kapsülü olarak bilinen renal tübülün genişlemiş son bölümü tarafından çevrelenmiş kapiller yumaklardır. Kapiller yumak ve mezangium, podosit denen epitelyal hücrelerce sarılmıştır. Bowman kapsülünün katları arasında yer alan ve tübüler alana açılan bölge idrar boşluğudur [12]. Glomerülün esas fonksiyonu; dış kaynaklı ilaç ve toksinlerin vücuttan atılmasında ve üre, kreatinin, ürik asit gibi sabit metabolik ürünlerin ve ayrıca sodyum başta olmak üzere elektrolitlerin filtrasyonunda rol oynamaktır. Glomerülün filtrasyon kabiliyeti sabit olamayıp diğer kapillerler gibi bazı faktörlere de bağlıdır. Bu faktörlerden hidrostatik ve onkotik basınç, filtrasyon yüzeyindeki kan akımı ve permabilite değişiklikleri ön plana gelir. Ayrıca diğer kapillerler gibi bazı otonomik sinirler ve hormonlardan etkilenir. Fakat diğer kapillerden farklı olarak distal tübüldeki sodyum miktarındaki değişikliklere bağlı olarak, glomerülde üretilen angiotensin II, mezengiumdaki düz kas hücreleri gibi hücrelerde ve efferent arteriolde kontraksiyon yaparak glomerül kan akımı, filtrasyon yüzeyi ve hidrostatik basınç değişikliklerinin ayarlanmasında rol oynar [10].

Proksimal tübül nefronun metabolik olarak en aktif bölümüdür [9]. Glomerül filtrat hacminin %60-80'i proksimal tübül kısmından geri emilmektedir. Filtre edilmiş sodyum ve klorun %70'inin, böbrekten atılan H⁺'nin %90'nünün ve ayrıca sülfat, fosfat, bikarbonat, glukoz ve potasyumun büyük bölümünün geri emilimini sağlar [9, 10]. Proksimal tübül henle kulpuna boşalır. Henle kulpunun ana görevi seruma kıyasla daha hipertonik ve konsantre idrar üretimini sağlamaktır [9]. Distal tübül yukarı doğru çıkan henle kulpunu toplayıcı kanalla birleştirir. Sodyum, potasyum, klor ve hidrojen iyon atılımı ve geri emiliminde rol alır [9]. Distal tübülün açıldığı bir toplayıcı kanala toplamda ortalama 11 nefron açılır. Toplayıcı kanallar suya geçirgendir ve antidiüretik hormon ile aktive olurlar ve böylece idrarın konsantrasyonunda önemli rol oynarlar [10].

Nefronların temel işlevi istenmeyen maddeleri böbrek içinden geçtiği süre içinde plazmadan temizlemektir. Bunun için etkili olan temel mekanizmalar şunlardır [11]:

- 1) Glomerular filtrasyon: Glomeruldaki kanın plazmasının önemli bir bölümü glomerular membrandan tübül sistemine filtre eder [11].
- 2) Tübüler reabsorbsiyon: Bu filtre edilen sıvı tübüllerde seyrederken başta su olmak üzere gereken maddeler peritübüler kapiller ağdaki plazma içine reabsorbe edilirken, istenmeyen maddeler geri emilemez ve idrar oluşumuna katkıda bulunur [11].
- 3) Tübüler sekresyon: İstenmeyen maddelerin idrar ile atılmasını sağlayan önemli bir mekanizma da sekresyondur. Plazmadaki bazı maddeler tübüllerini döşeyen epitel hücrelerince doğrudan tübül sıvı içine sekrete edilirler [11].

Glomerüler filtrat tübüllerden geçerken su içeriğinin % 99'u ve solüt içeriğinin değişen miktarları vasküler sisteme geçerken, az sayı ve miktardaki bazı maddeler de tübül içine sekrete edilir. Bu işlemler sonunda geri kalan tübül su ve solütler idrarı oluşturur. İdrar geri emilmeyen ve az miktarda da sekrete edilen maddelerden oluşur [11].

2.2. Böbrek Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Kan ve idrarın niteliği, sadece nefronun fonksiyon bozukluklarını yansıtmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli sistemik hastalıkların varlığını da yansıtır. Renal hastalığa sahip bireylerde böbreğin durumunun pratik değerlendirilmesi (1) protein olmayan azotlu bileşiklerin dolaşımdaki düzeylerini, (2) nefron işlevleri açısından glomerular filtrasyonun değerlendirilmesini, (3) belirli endojen ve eksojen bileşiklerin salgılanma kapasitelerini ve (4) idrarın yoğunlaştırılması yeteneği ile ilgili böbreğin su ve elektrolitler için geri emilim kapasitesinin incelenmesini içerir. Buna ek olarak, protein olmayan azotlu metabolitlerin kan ve idrar düzeyleri ölçülerek böbrek işlevlerinin değerlendirilmesinde kullanılır [9].

2.2.1. Glomerular Filtrasyon Hızının Ölçülmesi

Glomerular filtrasyon hızı kreatinin ve üre gibi maddelerin böbrek glomerüllerinden dakikada ml cinsinden filtre edilme hızıdır [9]. Glomerular

filtrasyon hızının ölçümü tüm böbrek fonksiyon testleri içinde beklide en önemlisidir [11, 13]. Böbreğin işlevsel kapasitesinin en güvenilir ölçüsü olarak kabul edilir ve çoğunlukla işlevsel nefron sayısının göstergesi olarak değerlendirilir [9, 13]. Fizyolojik bir ölçüm olarak renal işlevin tamamının en duyarlı ve özgül değişim belirteci olduğu kanıtlanmıştır [9].

Glomerular filtrasyon hızı değerinin en sık kullanılan birimi ml/dk'dır ve normal değeri 70-145 ml/dk'dır. 40 yaşından sonra bu değer her yıl için 1 ml/dk azalır. Klinikte GFH ölçülürken klirens formülleri kullanılır [11].

2.2.2.1. Renal Klirens

Renal klirens, böbrekler tarafından belirli bir zamanda bir maddeden temizlenen plazma miktarı olarak tanımlanır.

$$\text{Klirens} = \frac{\text{Maddenin idrar konsantrasyonu} \times \text{İdrar hacmi (ml/dk)}}{\text{Maddenin plazma konsantrasyonu}}$$

Uygulamada, tüm klirens hesapları 1.73 m²'lik standart vücut yüzey alanına göre ayarlanmıştır [9].

Klirens ölçümü, kullanılan belirtecin plazma ve idrar konsantrasyonlarının doğru ölçümünün yanı sıra, idrarın da doğru bir şekilde toplanmasını gerektirir. Bir molekülün GFH belirteci olarak kabul edilebilmesi için belirli özellikleri olması gerekir: (1) glomerüllerden serbestçe süzülebilir olması (2) tübüllerden geri emilmemesi, (3) tübüller tarafından salgılanmamış olması ve (4) plazma konsantrasyonunun sabit olması gereklidir. GFH'yi ölçmek için hem endojen hem de ekzojen belirteçler kullanılır [9, 11, 13].

Kan üre nitrojeni (BUN) böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan tanısal test olmasına karşın böbrek fonksiyonunun ölçütü olarak iyi bir gösterge değildir. İdeal GFH biyobelirteç koşullarının birçoğuna sahip değildir. Ürenin yapım hızı sabit olmayıp, alınan protein miktarı ve doku yıkımı ile değişime uğrar. Üre glomerüllerden serbestçe filtre olmasına rağmen tübülüslerden de önemli ve değişen düzeylerde reabsorbsiyona uğramaktadır. Reabsorbsiyon derecesi böbrek kan akımı ve idrar miktarlarından etkilenmektedir. Normal BUN konsantrasyon aralığı 7-21 mg/dl'dir [13].

Kreatinin çizgili kaslarda bulunan kreatin ve ve fosfokreatin'in bir metabolitidir. Serum kreatinin kas kitlesini yansıtır ve olağan koşullarda günlük değişimi çok azdır. Ancak bir şahısta kas kitlesinde değişiklikler veya masif kas yıkımı kreatinin yapımında önemli değişkenlik yaratır. Yaş ve cinsiyetle ilgili olarak kreatinin yapımında oluşan değişikliklerde kas kitlesi ile ilgilidir [13].

Kreatinin küçük bir molekül olup kanda proteine bağlı değildir. Bu nedenle glomerüllerden serbestçe filtre olur. Ancak, değişen miktarlarda proksimal tübüllerden sekrete edilmektedir. Sekresyon oranı aynı kişide değişik zamanlarda farklı olabileceği gibi kişiler arasında da farklılık gösterebilir. Böbrek fonksiyonunun düzeyi sekresyon oranını etkileyen önemli bir faktördür. Kreatinin düzeyini etkileyen böbrek dışı etkenler de (ağır egzersiz, anabolik steroid kullanımı, fazla et tüketimi gibi) vardır [13].

BUN/serum kreatinin oranı, akut böbrek yetmezliği hastalarının değerlendirilmesinde yararlı bir indekstir [13]. Bu oran ekstrasellüler sıvı durumunun bir göstergesidir ve normal değeri 10/1'dir. Bu oranın 10'dan büyük olması ekstrasellüler sıvı hacminde azalmanın bir bulgusudur [11, 13].

Serum kreatinin, pratikliği ve giderlerinin düşük olması nedeniyle böbrek fonksiyonunun standart laboratuvar ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Ancak GFH'nin iyi bir göstergesi olduğunu söylemek zordur. Hafif ve orta dereceli böbrek yetmezliğinin saptanmasında sıklıkla yetersizdir. Çünkü serum kreatinin ve GFH arasında nonlineer bir ilişki vardır ve ters orantılı olarak değişir. Serum kreatinindeki artış hastalığın ilerlediğini gösterir [13].

Klinikte GFH'nin ölçümünde en sık kullanılan yöntem endojen kreatinin klirensidir. Serum kreatinin konsantrasyonu stabil olma eğilimindedir. Stabil renal fonksiyonlu kişilerde seri olarak yapılan ölçümlerde serum kreatinin düzeyleri gün içinde sadece % 6'lık değişkenlik gösterir. Normal böbrek fonksiyonlu kişilerde ıtrah edilen kreatinin miktarı filtre edilen miktarı yaklaşık olarak %10-20 geçer. Sonuçta, hesaplanan serum kreatinini gerçek GFH değerini aşabilir.

Artmış serum kreatinin düzeyleri genellikle bozulmuş böbrek işlevlerine işaret etse de referans aralıktaki serum kreatinini mutlaka normal böbrek işlevlerini göstermez. Bu özellikle yaşlı bireylerde önemli bir sorundur. Kreatinin klirensi böbrek bozukluğunun saptanmasında serum kreatinin ölçümüne göre daha duyarlıdır. Klinik kullanımda en sık başvuru yöntemler kreatinin klirensi veya serum kreatinin konsantrasyonuna dayanmaktadır. Serum kreatinin düzeyleri birçok faktörden etkilendiğinden, sadece serum kreatinin konsantrasyonu göz önünde bulundurularak GFH'yi değerlendirmek hata payını arttırabilmektedir [14]. GFH diürenal ritim gösterdiğinden kreatinin klirensi ölçümü için tercih edilen idrar örneği 24 saatlik olmalı, beraberinde kan örneği de alınmalıdır [10, 14]. İdrar örneğinin toplanma ve işlenme aşaması, klirens testlerinin geçerliliğini etkileyen önemli bir faktördür. İdrar toplamak hastalar için oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır. Hatalı, eksik idrar toplanması (özellikle çocuklar ve yaşlılar) kreatinin klirensi testinin hassasiyetini ve tekrarlanabilirliğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Diğer önemli bir nokta da toplama süresince idrarın saklanma koşullarıdır. Buzdolabına konulmadığında veya uygun koruyucu maddelerin yokluğunda bakterilerin etkisi ile kreatinin kaybı olur. Tüm bu faktörler klirens formülünü direkt olarak etkilediklerinden hatalı klirens sonuçlarına neden olurlar [14].

GFH klinikte, serum kreatinini, vücut ağırlığı, yaş veya cinsiyet gibi bazı değişkenler kullanılarak hesaplanabilir. Bu amaçla çeşitli formüller üretilmiştir [13-15]. En çok kullanılan formüller Cockcroft-Gault (C-G), The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) ve The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) denklemleridir [15].

Cockcroft-Gault (C-G) formülünde, tahmini kreatinin klirensini hesaplamak için serum kreatinini, yaş, cinsiyet ve vücut ağırlığı parametreleri kullanılır [16].

$$\text{GFH (C-G) (mL/dakika/1.73 m}^2) = (140 - \text{Yaş}) \times \text{Vücut Ağırlığı(kg)} \times 0.85 \text{ (kadın ise)} / \text{Serum Kreatinin (mg/dl)} \times 72$$

The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) denklemi 4 ve 6 değişkenli olarak iki ayrı denklem kullanılabilir [17]. MDRD formülünde 4 değişken (serum kreatinin, yaş, cinsiyet etnik köken), 6 değişkenli MDRD formülünde ise bu değişkenlere ek olarak kan üre azotu (BUN) ve albumin sonuçları da değerlendirilmeye alınmıştır [17, 18].

4 değişkenli MDRD formülü:

$$\text{GFH}_{\text{MDRD}} = 175 \times (\text{serum kreatinin})^{-1.154} \times (\text{yaş})^{-0.203} \times 0.742 \text{ (kadın ise)} \times 1.212 \text{ (siyah ise) mL/dk/1.73m}^2$$

6 değişkenli MDRD formülü:

$$\text{GFH}_{\text{MDRD}} = 175 \times (\text{serum kreatinin})^{-0.999} \times (\text{yaş})^{-0.176} \times (\text{BUN})^{-0.17} \times (\text{Alb})^{0.318} \times 0.762 \text{ (kadın ise)} \times 1.18 \text{ (siyah ise) mL/dk/1.73m}^2$$

Yaş: yıl, Alb: g/dl, SCr: mg/dl, BUN: mg/dl,

The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formülü (mL/dakika/1.73 m²) serum kreatinin, yaş, cinsiyet ve etnik köken gibi değişkenleri içerir [17, 19].

$$\text{GFH (CKD-EPI)} = (141 \times \min(\text{Scr} / \kappa, 1)^a \times \max(\text{Scr} / \kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{yaş}}) \times 1.018 \text{ (kadın ise)} \times 1.159 \text{ (siyah ırk),}$$

Yaş: yıl, SCr: mg/dl, κ : 0.7 (kadın ise) veya 0.9 (erkek ise), a: -0.329 (kadın ise) veya -0.411 (erkek ise)

Formüllerde, yaş, cinsiyet ve etnik köken gibi bireysel özelliklere bağlı farklılıklar göz önünde bulundurulmuştur. Bu nedenle bu formüller, GFH'yi öngörmekte tek başına serum kreatinin konsantrasyonuna göre daha doğru bilgi vermektedir. Yapılan çalışmalarda kreatinin klirensi ölçümünün serum kreatinin düzeyine dayanan hesaplama formülleri kadar güvenilir olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenlerden dolayı günümüzde GFH'nin değerlendirilmesinde serum kreatinin konsantrasyonuna dayanan hesaplama formüllerinin kullanımı önerilmektedir [14].

2.3. Böbrek Yetmezliği

Böbrek yetmezliği, böbreklerin homeostatik düzenlenme yeteneklerini kaybetmeleri sonucu ortaya çıkar. Nefronlar, öncelikle glomerül veya tübül ya da her ikisine zarar veren toksik, anoksik veya immünolojik yaralanmalar sonucu kaybedilirler. Böbreklerin yaralanmaya yanıt olarak işlevsel kapasitelerini belirgin şekilde arttırma yetileri vardır. Bu nedenle böbrek işlevsel kütlesindeki önemli miktarda bir azalma (%50-60) herhangi bir belirgin biyokimyasal değişim ya da herhangi bir önemli belirti açığa çıkarmadan gerçekleşebilir. İşlevsel değişimin en duyarlı ve özgül ölçümü GFH'dir. En küçük bir akut böbrek yetmezliği semptom ve bulgusu olmadan GFH 50 ml/dk/1.73 m²'nin altına inebilir. Nefron başına düşen iş yükünün artışının tek başına ilerleyici böbrek yetmezliğinin önemli bir nedeni olduğu düşünülür. İyi bilinen bir varsayıma göre, nefron sayısındaki azalma primer renal yaralanmadan bağımsız olarak öyle bir noktaya gelir ki, bundan sonraki kayıplar interstisyel fibrozise gidişin hızlanmasına neden olur [9].

2.3.1. Akut Böbrek Hastalığı

Akut böbrek hastalığı (ABH), sıklıkla iskemik veya nefrotoksik olaylar sonucunda, yaygın olarak hastane ortamında gelişen bir hastalıktır [9]. Akut böbrek hastalığı böbrek fonksiyonlarında saatler veya birkaç gün içerisinde bozulmanın yol açtığı üre ve kreatinin gibi nitrojen artık ürünlerinin birikmesi olarak tanımlanabilir. ABH sıklıkla akut tübüler nekroz ile aynı anlamda kullanılmaktadır. Ancak bunun prerenal azotemi, obstrüktif üropati gibi ABH nedenlerini kapsamamaktadır. ABH hekimin karşılaşılabileceği en kompleks hastalıklardan birisidir [20]. Değişik gerekçeler ile hastaneye yatan hastalardan ortalama %2-5'inde, kardiyopulmoner cerrahi uygulanan hastaların %4-5'inde, yoğun bakım ünitelerindeki hastaların ise %30'unda ABH gelişebilmektedir [20].

Akut böbrek hastalığı hızlı gelişir ve bu nedenle kontrol edilmesi zor olan hızlı bir sıvı, asit-baz ve elektrolit dengesizliği ortaya çıkar ve ölüm oranı yüksektir. ABH hasarın olduğu bağı olarak üç ana kategoriye ayrılır: prerenal, intrarenal ve postrenal. Patogenezi tam olarak bilinmemesine karşın, çok iyi bilinen bir kliniği vardır [9].

Akut böbrek hastalığının değerlendirme ve izlenmesinde klinik laboratuvarın rolü elektrolit bozukluğu ve sıvı durumunun ölçümü ile sınırlıdır. İyileşme sırasında bir başlangıç poliüri dönemi oluşur, bunun nedeni glomerüler işlevin tübüler işlevden önce iyileşmesidir. Bu poliürik dönem birkaç gün veya hafta sürer ancak sıvı ve elektrolitlerin uygun ve yeterli şekilde yerine konması için çok dikkatli izlenmesi gerekir [9].

2.3.2. Kronik Böbrek Hastalığı

Kronik böbrek hastalığı (KBH), işlevsel nöronların ilerleyici bir şekilde kaybıdır [9]. KBH glomerular filtrasyon değerinde azalmanın sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ve metabolik- endokrin fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bozulma hali olarak tanımlanabilir [21]. KBH, GFH'nin 3 aydan uzun bir süre 60 ml/dk/1.73 m²'den düşük olması veya GFH'de azalma olsun veya olmasın,

böbrekte 3 aydan uzun süren yapısal veya işlevsel bozukluklarla giden; idrar, kan analizleri ya da görüntüleme yöntemleri ile saptanan bir hasar olması olarak tanımlanmaktadır [22].

Kronik böbrek hastalığı birçok nedenle gelişebilir. KBH'da orijinal böbrek hastalığı ne olursa olsun histolojik incelemede glomerular skleroz, ekstrasellüler matriks artışı, periglomerüler ve interstisyel fibrozis, tübüler atrofi gözlenir; bu durum primer hastalıktan bağımsız olarak ilerleyici böbrek hasarında ortak mekanizmaların rol oynadığını düşündürmektedir [21].

Üremi KBH'nın neden olduğu tüm klinik ve biyokimyasal anormallikleri içeren bir deyimdir ve birçok kaynakta KBH ile eş anlamda kullanılır [21]. Üremi kanda, üre, kreatinin, aminoasit ve protein metabolizmasının azotlu son ürünlerinin fazlalığı olarak tanımlanır. Üremik sendrom böbrek hastalığının klinik olarak ölümle sonuçlanan son aşamasıdır. Böbreklerin çeşitli işlevlerini yeterli biçimde sürdürememesinden kaynaklanır. Üremik sendromun klasik belirtileri, giderek zayıflama, çabuk yorulma, iştah kaybı ve onu takiben bulantı ve kusma, kas erimesi, titreme, anormal mental işlev, sık fakat yüzeysel soluma ve metabolik asidozdur [9].

Kronik böbrek hastalığı, kanda üre ve kreatinin aşikar ve devamlı olarak yüksek bulunduğu üremik sendromdan önceki ve sonraki devre olarak ikiye ayrılabilir. Preüremik evrede GFH 30-125 ml/dk/1.73m² iken üremik evrede GFH <30 ml/dk/1.73m² düzeylerindedir [10].

National Kidney Foundation (NKF) sınıflamasına göre, KBH böbrek fonksiyonlarının derecesine göre 5 evreye ayrılmıştır [23, 24].

Tablo 2.1. Kronik böbrek hastalığının evreleri.

Evre	Tanım	GFH (ml/dk/1.73 m ²)
1	Böbrek hasarı (Normal veya artmış GFH ile)	≥90
2	Hafif KBH	60-89
3	Orta derecede KBH	30-59
4	Ağır derecede KBH	15-29
5	Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY)	<15

Evre 1, GFH'nin korunduğu ancak böbrek hasarının var olduğu evredir; bu evre albuminüri varlığının veya böbrek görüntüleme testlerinde anormalliklerin olduğu durumları kapsamaktadır. Evre 2, azalmış GFH (60-89 ml/dk/1.73 m²) ile birlikte böbrek hasarı bulgularının bir arada olduğu hastaları içerir. Son olarak, GFH'si < 60 ml/dk/1.73 m² olan tüm hastalar, böbrek hasarı olsun veya olmasın kronik böbrek hastası olarak sınıflandırılır [24].

Kronik böbrek hastalığı artan sıklığı, yüksek tedavi maliyeti nedeniyle ülkemizde ve dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunudur. KBH etiolojisinde diyabet, hipertansiyon ve glomerüler hastalıklar önemli yer tutar. Türkiye’de de kronik böbrek hastalığının en sık sebebi bu üç kronik hastalıktır [25]. SDBY etiolojisinde diabetes mellitus % 33.83 oranla ilk sırada yer almaktadır. Yüksek oranda bulunan hipertansiyonun primer mi, yoksa tespit edilmemiş başka bir nedene bağlı olarak gelişen renal yetersizliğe sekonder mi olduğu tartışmalıdır [26]. Ülkemizdeki 2013 yılı sonunda kronik hemodiyaliz programında izlenmekte olan hastalarda KBH nedenleri tablo 2.2’de listelenmiştir.

Tablo 2.2. Ülkemizdeki 2013 yılı sonunda kronik hemodiyaliz programında izlenmekte olan hastalarda KBH nedenleri (%)

	%
Diabetes Mellitus	33.83
Tip 1 DM	4.51
Tip 2 DM	29.32
Hipertansiyon*	28.47
Glomerülonefrit	7.37
Polikistik Böbrek Hastalıkları	4.41
Amiloidoz	1.91
Tübülointerstisyel Nefrit	1.58
Renal Vasküler Hastalık	0.92
Diğer	7.39
Etiyoloji Bilinmiyor	14.12
Toplam	100,0
*Hipertansiyonun primer değil, kronik böbrek yetmezliğine bağlı oluşan sekonder hipertansiyon olduğuna dair kuvvetli şüpheler vardır.	

Renal transplantasyon yapılan hastalarda da, SDBY nedeni olarak %17,63’lük oranla hipertansiyon birinci sırada, %12.86’lık oranla glomerülonefrit ikinci sırada ve %9.39’lık oranla Diabetes Mellitus üçüncü sıradadır. 2013 yılı içinde Btx yapılan hastalarda etiyolojik nedenlere göre dağılım Tablo 2.3’de gösterilmiştir [26].

Tablo 2.3. Ülkemizde 2013 yılı içinde renal transplantasyon yapılmış olan hastalarda etyolojik nedenlere göre dağılım (% olarak).

	%
Hipertansiyon	17.63
Glomerülonefrit	12.86
Diabetes Mellitus	9.39
Tip 1 DM	1.73
Tip 2 DM	7.66
Polikistik Böbrek Hastalıkları	4.48
Amiloidoz	2.46
Tübülointerstisyel nefrit	1.60
Renal Vasküler Hastalık	0.14
Diğer	37.28
Etiyoloji Bilinmiyor	14.16
Toplam	100

Böbrek yetmezliği, görülme sıklığı giderek artan klinik sorunlardan biridir. Tüm sistemleri etkilediğinden öncelikle koruyucu önlemlerin alınması, hastalık gelişince ilerlemesinin yavaşlatılması ve uygun şekilde tedavi edilmesi gereklidir. Zamanında yapılan uygun müdahaleler sayesinde hem böbrek yetmezliği ile mücadele daha etkin sağlanmış olur hem de gelişebilecek komplikasyonlar da önlenir. Böbrek yetmezliği saptandığında altta yatan sistemik hastalıklar dikkatlice araştırılmalıdır [25].

2.4. Son Dönem Böbrek Yetmezliğinde Renal Replasman Tedavileri

Renal replasman tedavisi (RRT), SDBY’inde eksik olanı yerine koyma tedavileri olarak tanımlanan ve böbreklerin görevini yerine getirecek diyaliz ve böbrek transplantasyonudur [10].

2013 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı Ve Türk Nefroloji Derneği Ortak Raporu’na göre, Türkiye’de RRT gerektiren son dönem kronik böbrek yetmezliği (SDBY) nokta prevalansı milyon nüfus başına 870 olarak saptanmıştır ve bu sayıya bu sayıya çocuk hastalar dahildir. 2013 yılı verilerine göre Türkiyede hemodiyaliz yapılan hasta sayısı 52675, renal transplantasyon yapılan hasta sayısı ise 2944 olarak verilmiştir. [26].

Böbrek fonksiyonlarının azalması sonucu artık ürünlerin birikerek yaşam fonksiyonlarını bozmaya başladığı noktada vücut için zararlı olan fizyolojik değişiklikler oluşur ve bu değişiklikler ilaç ya da diyetle kontrol edilemediğinde RRT gerekir. Serum kreatinin düzeyi 4 mg/dl’ye yaklaşmaya başlayınca, hasta renal replasman tedavisi açısından değerlendirilmelidir [10]. Dirençli hiperkalemi, asidoz, üremik semptomlar, bulantı, kaşıntı, halsizlik, gibi mutlak diyaliz endikasyonları

tedaviye başlama zamanını tayin eder. Genel olarak klinik böbrek yetmezliği evre 5 sınırında olanlar yani GFH <15 ml/dk olan hastalar RRT açısından değerlendirilir [22]. SDBY’de tedavide üç ana seçenek bulunmaktadır. Bunlar; 1) Hemodiyaliz, 2) Periton diyalizi ve 3) Böbrek naklidir. SDBY bulunan hastalar her üç tedaviden de zaman içerisinde yararlanmak durumunda kalabilirler [27]. Diyaliz tedavisi akut veya kronik olarak uygulanabilir. Akut diyalizde hemodiyaliz, periton diyalizi veya yavaş-sürekli yöntemler uygulanabilir. Kronik diyaliz tedavisinde ise hemodiyaliz veya periton diyalizi uygulanabilir [28].

Hemodiyaliz yarı geçirgen bir zar aracılığı ile belirli elementlerin kandan difüzyon hızlarının farklılığını kullanarak ayrılması işlemidir [9, 10]. Kronik hemodiyaliz tedavisi hastanın kalan böbrek fonksiyonlarına ve diyetle aldığı protein miktarına bağlı olmak üzere haftada 2-3 kez 4-6 saat süre ile uygulanır. Yetersiz diyaliz bu hastalarda morbidite ve mortaliteyi artıran önemli bir nedendir. Hemodiyaliz tedavisi uygun cihaz ve ekipmanla evde veya hastanede yatak başında da yapılabilir [28].

Periton diyalizi, karın boşluğunu kaplayan ince bir doku olan periton içerisine bir tüp aracılığı ile özel bir çözelti verilmesidir. Artık ürünler tüp yolu ile uzaklaştırılır. Sürekli ayaktan periton diyalizi (CAPD) veya sürekli siklik periton diyalizi (CCPD) veya aralıklı periton diyalizi (IPD) şeklinde yapılır [9]. En yaygın kronik periton diyalizi yöntemi CAPD’dir. Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi, periton boşluğuna doldurulan diyalizatın birkaç saatlik bir dengelenme süresinden sonra, yenisi ile değiştirildiği basit bir yöntemdir. Genellikle günde dört kez yapılan işlem, hasta tarafından ve hastane dışında gerçekleştirildiği için, CAPD tedavisinin başarısı eğitimi de içeren alt yapının yeterliliğine bağlıdır [28].

2.4.1. Renal Transplantasyon

Böbrek transplantasyonu geri dönüşümsüz böbrek hasarı veya SDBY olan hastalarda yaşam kalitesini arttıran modern tıbbın başlıca gelişmelerinden biridir. 50 yıl önce deneysel, riskli ve oldukça sınırlı bir tedavi seçeneği iken, günümüzde klinikte pratik olarak 80’den fazla ülkede kullanılan bir yöntemdir. Tip 2 diyabetin ve kronik böbrek hastalıklarının diğer nedenlerindeki artışın sonucunda, dünya çapında SDBY hastalığına sahip insan sayısı hızlı bir şekilde artmaktadır [1].

Transplantasyon SDBY’nin seçkin tedavi şeklidir. Böbrek transplantasyonu, daha uygun maliyetli olması ve hastalara daha kaliteli bir yaşam sağlaması nedeni ile seçkin bir tedavi yöntemidir [29]. Gerek canlı vericiden, gerekse kadavradan yapılan başarılı böbrek transplantasyonlarında, diyaliz tedavilerinde olduğu gibi böbrek fonksiyonlarının bazıları değil, tamamı yerine getirilir. Buna ek olarak, hem tüm böbrek fonksiyonları yerine getirildiğinden, hem de hastalar için sürekli diyaliz işlemlerinin oluşturduğu fiziksel ve psikolojik zorluklar ortadan kalktığından dolayı yaşam kalitesi daha iyidir. Canlı vericiden yapılan transplantasyon ile 5 yıllık hasta yaşamı % 90-95, kadavradan yapılan transplantasyonda ise % 80-85 civarındadır [30].

Böbrek transplantasyonu yapılabilmesi için alıcı ile verici arasında ABO kan grubu sisteminde uyum olmalıdır. Uyum kuralları kan transfüzyonunda olduğu gibidir, Rh sisteminin bir önemi yoktur. Renal transplantasyonda alıcı ile verici arasında uyum aranan ikinci sistem doku grubu olarak bilinen HLA sistemidir. HLA sistemi 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşmiş doku uygunluk antijenlerini içerir. HLA sistemi anne ve babadan alınan birer haplotipten oluşur. HLA bölgesindeki antijenler 1. Sınıf (A,B,C) ve 2. sınıf (D, DR, DP, DQ) olmak üzere ikiye ayrılır. Renal transplantasyonda önemli olan A, B ve DR antijenleridir. Renal transplantasyonda en iyi sonuç doku uygunluk antijenlerinde tam uyum olduğu durumlarda alınmaktadır, vericide alıcıda olmayan DR, B, A antijenleri arttıkça alıcının böbreği reddetme olasılığı artmaktadır [30].

Böbrek naklinden sonra grefte karşı immün cevap baskılanmalıdır. Aksi takdirde vücut yabancı antijenlere karşı immün mekanizmayı devreye sokar ve nakledilen böbrekte rejeksiyon olur. Bu amaçla immunsupresif tedavi uygulanır.

Rejeksiyon, alıcının donör dokusuna karşı göstermiş olduğu immunolojik bir yanıttır. En sık olarak transplantasyonun ilk üç ayı içinde gelişir. Günümüzdeki immunsupresif ilaçlara rağmen greft kayıplarının primer nedeni rejeksiyonlardır. [29]. Rejeksiyon, greft yetmezliğin en önemli sebebidir ve temelde 3 şekli gözlenir [29, 31]:

1. Hiperakut rejeksiyon
2. Akut rejeksiyon
3. Kronik rejeksiyon

Hiperakut rejeksiyon transplantasyon sonrası 24 saat içerisinde gerçekleşebilir [31]. Greft fonksiyonun hızla kaybına neden olan bir durumdur. Alıcının kanında donör antijenlerine karşı önceden oluşmuş antikorlar hiperakut rejeksiyondan sorumludur. Bu antikorlar ya ABO uyumsuzluğundan ya da kan transfüzyonu, gebelik ve önceki transplantlara bağlı olarak gelişir [29]. Erken tedavisi yoktur ve nefrektomi gerektirir [29-31].

Akut rejeksiyon alıcı ile verici arasındaki antijenik farktan kaynaklanan sıklıkla hücresel veya seyrek olarak da humoral immün yanıtın bir sonucudur. Genellikle transplantasyondan sonra ilk üç ay içinde gelişir. İlk haftalar içinde en siktir [29]. En sık rastlanılan rejeksiyon tipidir. Erken dönemde tedaviye yanıt alınabilir, fakat geç dönemde çoğu kez greft kaybı olur [30].

Kronik rejeksiyonun başlangıcı, transplantasyonu izleyen ilk aylara kadar uzanabilse de, belirtiler çoğu zaman transplantasyondan yıllar sonra görülür [30, 31]. Böbrek fonksiyon bozukluğuna sıklıkla önemli proteinüri ve hipertansiyon eşlik eder. Kronik rejeksiyonun mekanizması belli değildir [29]. Humoral ve bir ölçüde sellüler mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir. Etkin bir tedavisi yoktur ve Greft kaybı ile sonuçlanır [30].

2.5. Renal Transplantasyonda Biyobelirteçler

Spesifik hastalıklarda tanı koyma ve belirlemede, biyobelirteçlerin kullanımı önemli bir araştırma alanıdır. Non-invaziv diaagnoz ve hastalıkların izlemi için basit metodlar klinik olarak açık bir şekilde ilgi uyandırmaktadır. Transplantasyonda, non-invaziv diyagnoz yapabilmek ve allograf disfonksiyonun sebeplerinin izlenebilmesi, hasta ve greft sonuçlarının daha iyi olması ile sonuçlanabilecektir. Birçok bilim adamı biyobelirteçlerin çeşitli özelliklerini tanımlamak için çalışmaktadır [32]. Parikh and Deverajan et al. biyobelirteçler için istenilen özellikleri şu şekilde belirtmişlerdir [33]:

(1) kolay bir şekilde ölçülebilmeli, basit hasta başı ya da standart klinik laboratuvar teknikleri kullanılmalı ve idar ve kan gibi klinik örnekler kolay bir şekilde elde edilebilmeli;

(2) biyobelirteç kolay, hızlı ve güvenilir olmalı

(3) biyobelirteç ilgili hastalığı erken belirlemek için yüksek hassasiyete sahip olmalı.

(4) biyobelirteç risk sınıflandırması için izin verecek cutoff noktaları olmalıdır

(5) biyobelirteç istatistiksel analizlerde yüksek performans vermelidir [32, 33]. Bu tanımlamalar geniş bir şekilde tüm biyobelirteçler için uygulanabilmelidir.

Teknolojik gelişmeler hastalığın ilerlemesi, tanı veya tedaviye yanıt için belirteçleri bulmaya yönelik proteomik çalışmalara ilginin artmasını sağlamıştır. Renal hastalıklar bu tarz çalışmalar için idealdir. İdrar kolayca alınabilen ve protein içeriği başlıca böbreklerden kaynaklanan biyolojik bir sıvıdır [6]. Güncel renal prognostik belirteçler sınırlı bir değere sahiptir ve renal biyopsi tanı koymak için altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak doku biyopsisi hemoraji, ağrı ve hatta ölüm gibi riskler içermektedir [5, 6]. En yaygın kullanılan biyokimyasal parametrelerden serum kreatinin ve idrar protein, renal disfonksiyonun son dönem belirteçleridir ve bunların kullanımı ek dezavantajlara sahiptir. İdrar proteini, eksik yönlerine, nonspesifik oluşuna ve hastalık çeşidine göre risk seviyelerinin değişmesine rağmen son zamanlarda en iyi prognostik belirteçtir. Ancak tedaviye ne zaman başlanacağı ve protein seviyelerinin hangi değerde tutulacağı belirsizliğini korumaktadır. Renal hastalıkların kontrolünde spesifik proteinlerin belirlenmesi daha iyi bilgi verebilecektir. Birçok proteini nanomolar hatta femtomolar konsantrasyonlarda ölçebilen kütle spektrometri cihazları, hastalığın ilerleyişi, tanısı ve tedaviye yanıt için biyobelirteç bulma ve geliştirmek için kullanılabilir. Proteomiks alanı günden güne gelişmektedir ve klinisyenler ile bilim insanlarının bu sistemlerin temelini anlama isteği artmaktadır [6].

Böbrek transplantasyonu günümüzde, SDBY hastalarında sağlığı ve yaşam kalitesini arttırdığı için en iyi tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Renal greft sağkalımı başarılı immüsupresyon tedavileri ile sağlanmaktadır [2]. Ancak başlangıçta greft sağkalımı başarılı olsa bile, uzun dönemde böbrek transplantının reddi önemli bir klinik problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Son çalışmalar bazı

transplantların antikor-aracılı rejeksiyon ve tekrarlayan hastalıklar gibi sebeplerden dolayı başarısız olabildiğini göstermektedir [3].

Böbrek hasarı biyobelirteçleri ile non-invaziv olarak allograft hasar değerlendirilebilir ve böbreğe spesifik çeşitli proteinler ölçülerek hasar tanımlanabilir. Nötrofil jelatin ilişkili lipokalin (NGAL) ve interlökin-18 (IL-18) umut verici biyobelirteçlerden iki tanesidir. Önceki çalışmalar bu biyobelirteçlerin renal tübüler hücre hasarı sırasında idrara salındığını ve her iki biyobelirteçinde non-invazif olarak ölçülebildiğini göstermişlerdir. NGAL ve IL-18 benzeri biyobelirteçler transplant merkezlerinde non-invazif bir şekilde allograft hasarı erken dönemde değerlendirmek ve uzun vadeli allograft fonksiyonunu korumak için gereklidirler [4].

Böbrek allograft rejeksiyonu erken teşhisi ve tedavisi için non-invaziv yeni belirteçler ile ilişkili çalışmalar sürmektedir. Yeni protein biyobelirteçlerinin tespiti genellikle ELISA ve flow sitometri gibi fluoresan sistemler ile çalışılmaktadır. Günümüzde proteomik çalışmalarında greft durumu belirlemek üzerinde durulmaktadır. Proteomik yaklaşımlar doku örnekleri, plazma ve idrar gibi biyolojik örneklerde kütle spektrometri, kromatografi ya da elektroforez sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir [5].

Proteomik teknolojileri, transplantasyonla ilgili olarak yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. Akut rejeksiyonda, idrar proteomik profili sınırlı çalışmada incelenmiştir. SELDI-TOF MS kullanarak yapılan bir çalışmada, akut rejeksiyonu olan hastaların idrar örneklerinde, renal fonksiyonları stabil hastalarla karşılaştırıldığında farklılık gösteren protein pikleri gözlenmiştir [34]. Bir başka çalışmada, stabil greft fonksiyonu olan 22, akut rejeksiyonlu 18, akut tubular nekrozlu 5 ve rekürren glomerulopatisi olan 5 hastaya ait idrar örneklerinden elde edilen proteomik profiller sağlıklı kontroller ile karşılaştırılmıştır [35]. SELDI-TOF MS kullanılarak yapılan bu çalışmada özel bir rejeksiyon paterni tanımlanmış olup, bu patern, akut rejeksiyonlu 18 hastanın 17'sinde ve stabil greft fonksiyonu olan 22 hastanın 4'ünde gözlenmiştir. Bu patern, diğer hastalarda ve sağlıklı kontrollerin hiçbirinde gözlemlenmemiştir. O'Riordan ve arkadaşları, biyopsi ile akut rejeksiyon tanısı alan 23 transplant hastasında, %90 sensitivite ve % 80 spesifite ile seçilen bir grup protein pikinin, akut rejeksiyon hastaları ve stabil greft fonksiyona sahip hastalarda birbirinden farklı olduğunu tanımlamışlardır. Bunun yanında stabil greft fonksiyona sahip hastalarda tanımlanan bir protein pikinin %100 sensitivite ve spesifite ile sağlıklı kontrollerden farklı olduğunu gözlemlenmişlerdir [36]. Bu çalışmalarda sadece farklı protein pikleri bulunmuş olup, bu proteinlerin identifikasyonu ve/veya kantitasyonu yapılmamıştır.

Bu çalışmada renal transplantasyon yapılan hastalardaki bazı protein belirteçlerinin transplantasyon öncesi ve sonrasındaki değişimleri kütle spektrometrik yöntemler ile takip edilerek biyobelirteç çalışmalarına yeni bilgiler sunulmuştur. Bu amaçla, son zamanlarda yapılan insan ve hayvan çalışmalarında serum kreatinini artışı gerçekleşmeden önce idrarda artış gösteren netrin-1 ve karaciğer tip –yağ asidi bağlanma proteini (L-FABP) gibi proteinler üzerinde odaklanılmıştır. Bu iki protein için uygun standartlar alınarak MALDI-TOF/TOF ve LC-MS/MS çalışmaları

yapılmıştır. Netrin-1 ve L-FABP'nin ölçümü için standardize edilmiş bir klinik platform bulunmamaktadır. Bu çalışmada L-FABP ve netrin-1 için likid kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) sisteminde standardize edilmiş yeni bir metod geliştirmesi yapmak hedeflenmiştir.

2.5.1. Netrin-1 Proteini

Netrin-1 ismi Sanskrit dilinde "önderlik eden" anlamına gelen Netr kelimesinden türemiştir [37, 38]. *Caenorhabditis elegans* ile yapılan çalışmalarda çevresel akson gelişimini yönlendirmek için gerekli genlerde tanımlanmıştır. Tanımlanan genlerden birisi olan UNC-6 lamininler ile sekans homolojisi gösteren salgılanmış proteini kodlar. 1994'de ratlarda akson gelişimi ile ilgili yapılan bir çalışmada, iki protein saflaştırılmış ve UNC-6 ile homolog olduğu bulunmuştur. [37, 38]. Bu proteinler netrin-1 ve netrin-2 proteinleridir. Netrin-1 başlangıçta gelişen omuriliğin ventral yapısı tarafından üretilen difüze olabilen laminin-ilişkili bir molekül olarak keşfedilmiştir. Netrin-1 sinir sisteminin gelişimi sırasında nöron ve aksonların migrasyonunda kemoatraktif ya da kemorepulsif bir belirti olarak rol oynadığı gösterildi. Şimdiye kadar omurgalı canlılarda 5 adet netrin tanımlanmıştır [38]. Bunlar netrin 1-5 ve netrin G1-2'dir [38]. Tüm netrinler yaklaşık 600 adet amino asitten oluşmaktadır ve 70 kDa moleküler ağırlığına sahiptirler. Netrin-1 başlıca DCC ve UNC5 reseptörleri aracılığı ile etkilerini gösterir [37, 38]. Bunlara ilaveten son zamanlar 5 tane daha reseptör ile ilgisi olduğu gösterilmiştir: DSCAM, integrin $\alpha3\beta1$ ve $\alpha6\beta3$, cerebellin 4 (CBLN4) ve A2bR reseptörleri[38].

Netrin-1 sinyal iletimi komplekstir ve her zaman stimülatör ya da atraktif değildir. Netrin-1 DCC reseptörüne bağlandığında aksonal etkileşimi indüklerken, UNC5 reseptör ailesi ile repulsiyona sebep olur. DCC ve UNC5B reseptörüne bağlandığında MAPKs, PKC, src, PI3 kinaz, Rac ve Rho kinaz ve bunlar gibi bazı sinyal yollarının aktivasyonunu indükler. DCC ve UNC5B Netrin-1 reseptörleri bağımlı reseptör olarak adlandırılır. Bu reseptörler sinyalleri ligandları olmasa bile iletirler. Ligand olduğu durumda, bu reseptörler hücrel proliferasyon, farklılaşma, migrasyon ya da hayatta kalım gibi pozitif sinyal yollarını aktive ederler. Ancak ligand yokluğunda klasik reseptörler gibi inaktif değildirlir ve kaspaz bağımlı apoptotik hücre ölümünü tetikleyen bir "negatif sinyalizasyona" neden olurlar. Bununla birlikte her iki reseptörde netrin-1 ligand yokluğunda apoptozisi indükleme kabiliyetine sahiptirler [38].

İmmunolokalizasyon çalışmaları DCC ekspresyonunun renal epitelyumda bulunmadığını, bunun aksine UNC5B'nin sadece proksimal tübüler epitelyal hücrelerde ve vasküler endotelyal hücrelerde olduğunu göstermiştir. Netrin-1 beyin, akciğer, kalp, bağırsaklar ve böbrek gibi birçok organda ekspresse edilir. Böbrek bunlar arasında çalışma yapılmış en yüksek netrin-1 ekspresyonu yapan organdır. Bu yüksek ekspresyona rağmen, netrinlerin böbrek fizyolojisi ve patofizyolojindeki rolü bilinmemektedir. İskemi-reperfüzyon hasarı hayvan modellerinden elde edilen veriler ilk bulgulardır. Yapılan çalışmalarda endotelyal netrin-1'in disregülasyonu ile iskemi sonrası organ yetersizliğine katkıda bulunan homeostatik bir protein olduğu sunulmuştur [38].

Yapılan bir çalışmada, akut böbrek hasarı hayvan modellerinde netrin-1'in evrensel bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir [39, 40]. Bir çalışmada iskemik, septik, ilaç-indüklü ve radyokontrast-indüklü akut tübüler nekrozis gibi akut böbrek hasarının çeşitli formlarında, hasta idrarlarında netrin -1'in anlamlı derecede yükseldiğini göstermişlerdir [40]. Ramesh ve ark. yaptığı bir araştırmaya göre [40], netrin-1 hasar oluşumundan sonra 1 saatten daha kısa bir sürede idrara çıkmakta ve 3 saatte 30-40 kat artmakta ve 6 saat sonra pik yapmaktadır. Netrin-1 ekskresyonu kan üre azotu ve serum kreatinini artışı olmadan saatler önce gerçekleşmektedir. Araştırmacıların sunduğu veriler netrin-1'in AKI biyobelirteci olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Bu tarz biyobelirteçlerin hasar oluştuktan sonra oldukça erken zamanda ortaya çıkacağı ve böbrek için hasas ve spesifik olabileceği beklenmektedir. Erken teşhis için, AKI biyobelirteçleri optimal olarak non-invaziv prosedürlerle en hızlı şekilde ölçülebilmelidir. İdrar netrin-1 düzeylerinin reperfüzyon sırasında normal seviyelerine geri dönmesi, renal iyileşme için prognostik bir belirteç olarak kullanılabilirliğini düşündürürerek bu belirtecin klinik değerini anlamlı şekilde yükseltmektedir. Ramesh ve ark. [40] da insanlarda çeşitli nedenlere bağlı akut böbrek yetmezliği için bir belirteç olarak netrin-1'in önemini incelenmiştir. Yaptıkları çalışmada sağlıklı gönüllülerin idrarlarında netrin-1 seviyeleri değişmezken, hastaların büyük çoğunluğunda netrin-1 seviyeleri anlamlı olarak artmıştır. Netrin-1 böbrek kaybını izlemeye, tanıya ve tedavide oluşturulacak belirteç panelinde önemli bir üye olabilme potansiyelindedir. Netrin-1 böbrek transplantasyonu sonrası gecikmiş greft fonksiyonu için prediktif biyomarker olup olmadığını test etmenin ilginç olacağını düşünmektedirler [7].

2.5.2. Karaciğer Tip –Yağ Asidi Bağlanma Proteini (L-FABP)

Memelilerdeki intrasellüler FABP geniş bir multigen ailesi tarafından kodlanan ve lipid bağlayıcı protein süper ailesinin bir üyesi olan 14 kDa'luk bir proteindir [41]. Doku dağılımlarına göre dokuz farklı FABP tanımlanmıştır: L (karaciğer), I (bağırsak), H (kas ve kalp), A (adiposit), E (epidermal), IL (ileum), B (beyin), M (miyelin) ve T (testis). Bütün FABP üyeleri yağ asidi metabolizması ve intrasellüler transportunda önemli rol oynarlar [42].

L-FABP sadece karaciğerde değil aynı zamanda bağırsak, pankreas, mide, akciğer ve böbrekte de bulunur [43]. L-FABP gen lokasyonu kromozom 2'dedir [43]ve içerisinde üç metiyonin ve bir sistein bulunan 127 aminoasit içerir [44]. L-FABP tübüler endotelial hücreler için β -oksidasyon aracılığı ile metabolize edilmesi amacıyla yağ asitlerine bağlanır ve mitokondri ya da peroksizomlara taşır. Bu süreç yağ asidi homeostatizisinde önemli rol oynar [45]. L-FABP yağ asidi metabolizmasında indirekt rol oynar. Uzun zincirli yağ asidlerinin sitozolden çekirdeğe taşınmasını ve bunların β -oksidasyonunda görev alan enzimlerin aktifleşmesini sağlayan nüklear protein peroksizom proliferatör aktive reseptöre (PPAR) ulaşımını sağlar [46]. Buna ilaveten, L-FABP yağ asidi peroksizasyon ürünlerine yüksek bir afinite ile bağlanma gücüne sahiptir ve bunların idrara atılımını sağlar. Bu nedenle, L-FABP etkili bir endojen antioksidan olabilir [47].

İdrar L-FABP prelinik ve klinik modellerde geniş bir şekilde çalışılmıştır. Kronik böbrek hastalıkları, diyabetik nefropati, IgA nefropatisi ve kontrast

nefropatiyi de içine alan birçok patolojik durumda potansiyel bir biyobelirteç olduğu bulunmuştur [48]. Yapılan bir çalışmada diyabeti olmayan CKD grubunda renal fonksiyonlardaki kötüleşme ile birlikte idrar L-FABP seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir [49]. Nakamura et al. idrar L-FABP'nin IgA nefropati ve ince bazal membran hastalığı arasındaki ayrımı yapabilecek non-invaziv bir biyobelirteç olabileceğini [50] ve aynı zamanda kontrast indüklü nefropati için potansiyel bir belirteç olabileceğini göstermiştir [51]. Yamamoto et al. idrar L-FABP'nin iskemi süresi ile ve aynı zamanda canlı donörden transplantasyonu yapılan küçük bir grupta hastanede kalış süresi ile de anlamlı derecede korele olduğunu bulmuşlardır [41]. Buna ilaveten yapılan bir çalışmada L-FABP'nin serum kreatinin seviyelerinde değişim olmadan önce, aminoglikozid uygulamasında AKI için erken dönem indikatör olduğu gösterilmiştir [52].

Renal transplantasyon sonrası akut böbrek hasarı yaygın bir komplikasyondur [53]. Renal transplantasyon alıcılarında akut böbrek hasarı mortalite ve morbidite ile pozitif koreledir. Renal transplantasyon sonrası akut böbrek hasarı iskemi-reperfüzyon hasarının tipik bir modelidir [54]. L-FABP'nin böbrek hastalıkları için değerli ve güvenilir bir belirteç olduğu düşünülmektedir [45].

L-FABP renal proksimal tübülde ekspresse edilir. Akut böbrek hasarı olan insanlarda ve hayvan modellerinde L-FABP ekspresyonunun artışı ve idrara salınımı gösterilmiştir [8, 55, 56]. Renal transplantasyon sonrasında hem hastalarda hem de hayvan modelinde, L-FABP seviyeleri renal kapiller kan akımı, iskemik süre ve hastanede yatış süresi ile anlamlı derecede korele bulunmuştur [41]. L-FABP'nin rodent böbreğinde ekspresse edilmediğini düşünürsek, bu çalışmayı yapan araştırmacılar hL-FABP genini C57Bl/6 farelerinin spesifik 5' promoter bölgesine h-L-FABP-Tg (transgenik) fare üretebilmek için transfer etmişlerdir. L-FABP'nin translokasyonunu iskemik koşullar altında üriner boşluktaki proksimal tübüllerden immunohistokimyasal metod ile göstermişlerdir. Bu çalışma L-FABP'nin perikapiller kan akımı ile birlikte insan proksimal tübüllerinde lokasyonunu gösteren ilk çalışmadır. Araştırmacılar bu çalışma ile idrar L-FABP seviyelerindeki artışın iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası akut böbrek hasarında önemli bir biyobelirteç olabileceğini göstermişlerdir [41].

Ancak, Kawai et al. [57] idrar örnekleri her zaman alınmadığı için gecikmiş greft fonksiyon durumunda idrar L-FABP'in faydasının sınırlı olduğuna dikkat çekmişlerdir. Birçok hasta transplantasyon sonrası anüri durumu ile karşılaşmaktadır. Dolayısı ile bu araştırmacılar idrar L-FABP yerine serum L-FABP'nin yararını araştırmışlardır ve böbrek transplantasyonundan sonra renal hasar için serum L-FABP'nin de biyobelirteç olabileceğini göstermişlerdir. Buna ilaveten serum L-FABP seviyeleri greft iyileşmesini ve hemodiyaliz gereksinimini de belirleyebilmiştir.[57]. Ancak, serum L-FABP seviyelerindeki artışın altında yatan mekanizma belirsizdir ve ileri çalışmalara gereksinim vardır [45].

L-FABP'ın üriner salınımı kronik böbrek hastalıklarında artmaktadır. Yapılan bir çalışmada diyabetik olmayan 120 kronik böbrek hastasında üriner L-FABP düzeyi artış göstermiş ve bu protein kronik böbrek hastalıkları (CKD) için belirteç

olarak tanımlanmıştır [8, 49]. İdrar L-FABP düzeyleri idrar proteini ve serum kreatinin seviyeleri ile korelidir. Özellikle hastalığın ilerlemiş dönemlerinde erken dönemlere göre L-FABP düzeyleri anlamlı derecede yükselmektedir. Oysa aynı gruplarda ne serum kreatininini ne de idrar proteininde herhangi bir fark yoktur. [8]. Büyük bir sağlık taraması çalışmasında üriner L-FABP salınımı ileri böbrek hasarı bulunmayan hipertansiyon ve diyabet hastalarında yüksek olarak bulunmuştur [58]. CKD ve onun ilerleyişini öngörmek için L-FABP'in incelendiği yeni büyük çalışmalara ihtiyaç duyulduğu aşikardır [8].

2.6. Proteomik Yöntemler

2.6.1. Proteomiks Nedir?

Geçtiğimiz on yıl boyunca, yaşam bilimlerinde çığır açan birçok buluş yapılmıştır. İnsan genom projesinin tamamlanması, önemli bir bilgi veritabanı sağlanmıştır ve bunun sayesinde yaşam bilimi kökenli araştırmalarda hızlı bir gelişim gerçekleştirilmiştir [59].

“Proteome” terimi ilk defa 1994’de kullanılmıştır ve belirli bir genom tarafından ifade edilen tüm proteinlerin dizisini tanımlar. Dinamik doğasını vurgulamak için daha doğru bir tanımlama yapılacak olursa, bileşimi dokudan dokuya ya da hücreden hücreye değişiklik gösterebilen, ayrıca, belirli bir zaman ve mekan içerisindeki proteinler kümesi proteomu belirtir. Buna ilaveten proteom yapısı geniş bir çeşitliliği olan yaş, cinsiyet veya hastalıklar gibi iç ve dış etkenlere bağlıdır ve bu durum genom doğası ile keskin bir tezatlık içerir [59].

Proteomiks, proteomun geniş çaplı protein ayırma ve tanımlama teknikleri ile analiz edilmesi şeklinde tanımlanan dinamik bir terimdir ve farklı koşullara maruz kalmış hücre, doku, organ veya vücut sıvılarındaki proteinlerin kalitatif ve kantitatif analizlerini içerir [60].

Proteomik yöntemlerin kullanım alanının büyük kısmını “klinik proteomiks” olarak adlandırılan alan oluşturmaktadır. Klinik proteomiks alanındaki çalışmaların çoğu hastalıklara özgü yeni biyobelirteç tanımlanması ile ilişkilidir. Bunun dışında hastalık takibi, ilaç geliştirme ve toksikolojiye kadar birçok farklı alanda proteomik yöntemler kullanılmaktadır [60]. Proteomiks, proteinlerin spesifik özelliklerinden yola çıkarak, yeni proteinlerin tespit edilmesi, miktarlarının ölçülmesi, post translasyonel modifikasyonların, protein yapısının ve fonksiyonlarının belirlenmesi ve olası etkileşimlerin tespit edilmesi amacıyla kullanılan ve hızla gelişmekte olan önemli bir alan haline gelmiştir [59]. İdrar gibi vücut sıvıları ile yapılan proteomiks çalışmaları dokularda ya da hücrel proteomda hastalık ilişkili proteinlerdeki değişiklikleri değerlendirir. Bu yüzden hasta bakımında daha düşük maliyet ve yüksek hassasiyetle yeni non-invaziv diagnostik testlerin ve prosedürlerin geliştirilmesi için yeni fırsatları destekler. Çeşitli böbrek spesifik yada ilişkili hastalıklarda ileri klinik semptomlar gelişmeden önce renal gerilemenin erken belirlenmesi ve ayırımın yapılabilmesi için özellikle İdrar kullanılan diagnostik araçlar umut vericidir. Genelde, klinik proteomiks özellikle renal proteom

patolojisinin daha iyi ayrımının temeli üzerinde, non-invaziv üriner protein tanımlanmasının genişlemesi ve gelişmesi için büyük bir potansiyele sahiptir. Bununla beraber, protein ekspresyonlarındaki değişimin belirlendiği test sistemlerinde dayanıklılık, hassasiyet, güvenilirlik, tutarlılık ve buna ilaveten renal diagnostikte proteomik çalışmaların kabulü için çalışma ve harcama giderleri çok önemlidir. Günümüzde birçok proteomik teknik hala daha yetersiz standardizasyondan muzdariptir ve çok azı ileri klinik uygulamalar için gerekli kriterleri tamamlama potansiyeline sahiptir [61].

Kütle spektrometri artan bir şekilde kompleks protein örneklerinin analizi için tercih edilen bir metod olmaktadır. MS- tabanlı proteomiks gen ve genom sekans veritabanlarında kullanılabilirliği mümkün olan ve birçok alanda kavramsal veya teknik avantajlar kazandırabilecek bir disiplindir. En önemlisi de protein iyonizasyon tekniklerinin keşfi ve gelişimi 2002'de kimya alanında Nobel ödülü kazandırmıştır [62].

2.6.2. Kütle Spektrometri Teknikleri

Kütle spektrometri ölçümleri iyonize analitler ile gaz fazında gerçekleştirilebilmektedir [63]. Tanım olarak, kütle spektrometri cihazı bir iyon kaynağı, iyonize analitlerin kütle-yük oranlarını ölçen bir kütle analizörü ve her bir m/z değerindeki iyonların sayısını kaydeden bir dedektör içerir [62]. Kimyasal iyonizasyon, fotoiyonizasyon, hızlı atom bombardıman, elektrosprey ve matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonunu içeren çok sayıda farklı iyonizasyon metodları tanımlanmıştır [64].

Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI) kütle spektrometrik analizlerde protein ve peptidleri uçurmak ve iyonize etmek için en çok kullanılan iki tekniktir [62, 63]. ESI çözelti içerisindeki analitleri iyonize eder ve bu yüzden likid-tabanlı (kromatografik ve elektroforetik gibi) ayırma metodları ile birleştirilir. MALDI kuru, kristalize matriks ortamındaki örnekleri lazer atışları ile gaz haline geçirir ve iyonize eder [62, 65]. MALDI-MS normalde kısmen basit peptid karışımlarını analiz etmek için kullanılır. Oysa sıvı kromatografi-ESI-MS sistemleri (LC-MS) kompleks örneklerin analizi için tercih edilir [62]. Güçlü bir fraksiyon ayırma metodu olan likid kromatografisi (LC) elektrosprey iyon kaynağına (ESI) sahip bir kütle spektrometresi ile oldukça uyumludur. Bu yöntem yüksek hassasiyeti olan HPLC kolonunda analitleri büyük miktarlarda ayırır ve otomatize olabilir [66]. Üçlü kuadropol-tandem kütle spektrometri (MS/MS) likid kromatografi ve veritabanları birleşince, protein tanımlama ve karakterizasyonunda güçlü bir teknik olarak ortaya çıkar [67].

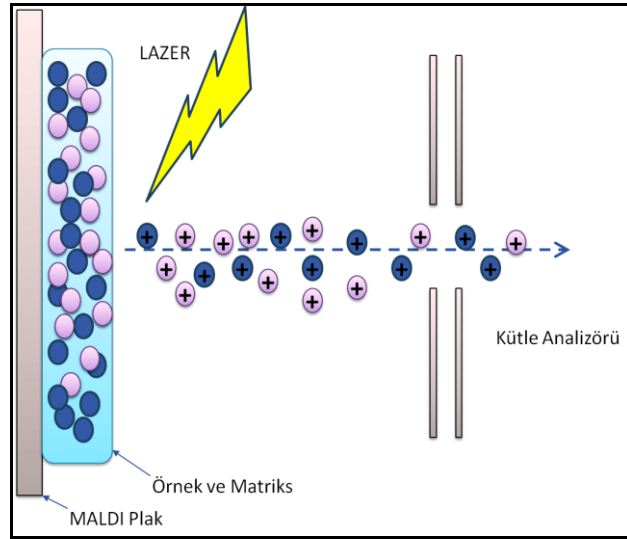
Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analiz etme esasına göre çalışmaktadır. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler. Oluşan her bir iyon spesifik bir moleküler kütle ve yüke

sahiptir ve m/z değerlerinin yoğunluğa karşı gösterildiği bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanır [66].

2.6.3. İyonizasyon Teknikleri

2.6.3.1. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI)

Tipik bir MALDI analizinde, örnek solüsyonu ve matriks çok küçük hacimlerde karıştırılarak direkt olarak MALDI plak üzerine ekimi yapılır. Solüsyonlar genellikle oda ısısında kristalize heterojen yüzey elde etmek için uçurular [63, 68].

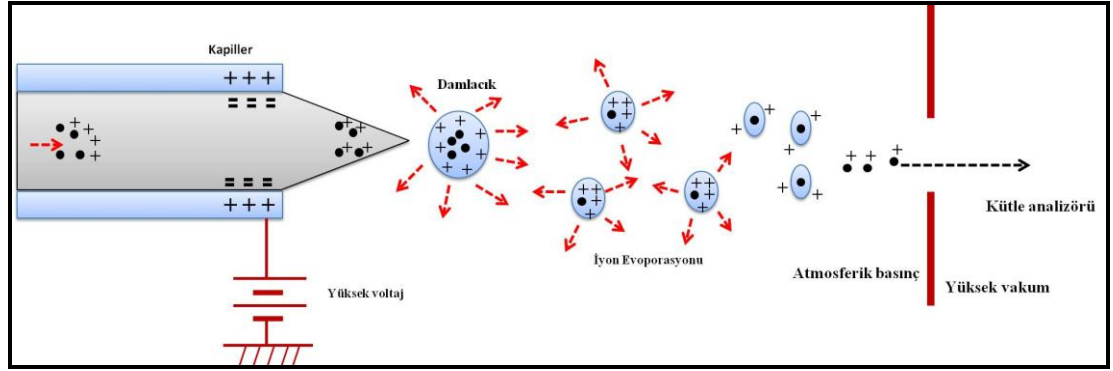


Şekil 2.1: Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Kaynağı

MALDI çalışmalarında matriks olarak genellikle protein ve peptidler için sinamik asit; peptidler için α -siyano-4-hidroksisinnamik asit; peptid, karbonhidrat ve glikolipidler için 2,5-dihidroksibenzoik asit; oligonükleotidler için 3-hidroksipikolinik asit kullanılır. Darbeli lazer ışını hedef plak üzerine gönderilir ve kristalize hedef içerisinde yüksek yoğunluklu enerji birikimine sebep olur. Bu enerji konsantrasyonu ile hem analit hemde matriks molekülleri buharlaşır. Bu yüzeyden bırakılma süreci matriks ve analitler arasında proton transferi ile sonuçlanır. Bu nedenle, hedef analit katı homojen matriks molekülleri ile çevrelenmiş şekilde bulunmalıdır. MALDI darbeli lazer ışık saçılımını kullanır, bu yüzden tipik olarak TOF (time of flight) kütle spektrometresi ile bağlıdır. MALDI protein kesimlerinin analizi için rutin bir metoddur. Proteomik çalışmalarda protein ve peptidler için en yaygın kullanılan analitik teknik MALDI-TOF kütle spektrometrisidir [63].

2.6.3.2. Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

ESI makromoleküllerin kütle analizi için uygun olan bir hassas bir iyonizasyon metodudur. Çünkü herhangi bir ısıtma, elektron ya da atom gibi partiküllerle etkileme ya da enerji ışınlama olmaksızın iyonları hassas bir şekilde gaz faza geçirir. Tek tip elektriksel yoğunluğa sahip sıvı solüsyon ince kapillerlerden akar, kapillerlerin ucunda çeşitli kV'ta yüksek voltaj uygulanmasıyla yük ayrımı sağlanır. Bu durum solüsyonda hem pozitif hem negatif yüklü kısımların oluşumunu sağlar. Böylece tek tip yük dağılımı bozulmuş olur. Mesela, iğnenin ucuna yüksek pozitif potansiyelin eklenmesi pozitif yüklü bölümün püskürtülmesini sağlar. Aynı anda, coulomb kuvveti zıt elektrotta etki gösterir. Diğer sıvı kısmı sürükleyerek uzaklaştırır ve küçük yüklü damlacıklar iğnenin ucundan atmosferik basınçta püskürtülür. Havada uçarken, yüklü damlacıklar organik solventlerini bırakırlar ve hacimce küçülürler. Damlacık hacmindeki bu küçülme aşırı yüklü damlacıkların oluşumuna sebep olur. Yüklü damlacıklar seri bir şekilde daha küçük damlacıklara dönüşürler ve finalde analit molekülü gaz faza ulaşır [63].

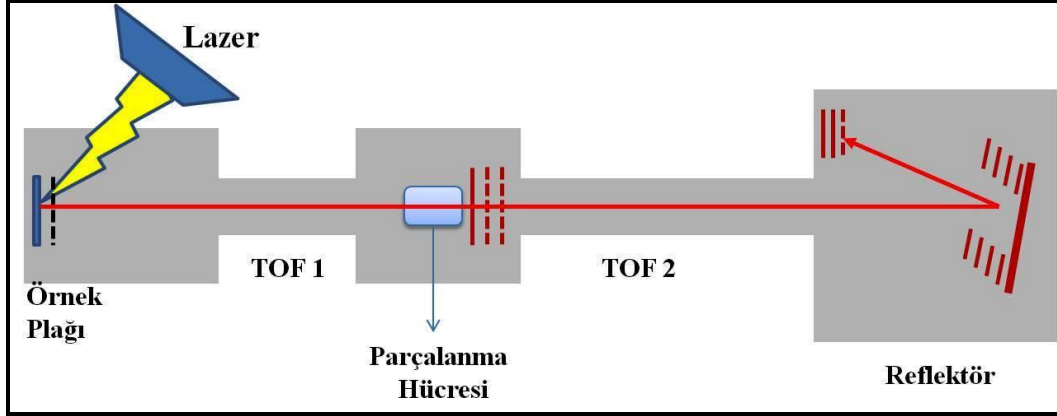


Şekil 2.2: Elektrosprey İyonizasyonun Şematik Gösterimi

2.6.4. Kütle Analizörleri

2.6.4.1. TOF (Time of Flight) Kütle Analizörü

TOF kütle spektrometrisi altında yatan mekanizma çok basittir. İyonların uçuş sürelerini iyon dedektöründe ölçer. Voltajı arttırarak enerji kazanır. Ağır iyonlar uzun uçuş süresine sahiptir; bu sebeple, prensipte, herhangi bir sınırlama olmaksızın analizöre çok miktarda iyon alınabilir ve uçuş tüpündeki tüm iyonlar belirlenebilir. TOF analizörünün bir başka avantajı, kütle aralık sınırı yoktur. Bu analitik mekanizma ile iyon kaynağında üretilen iyon yükünün aşırı büyük olmasına rağmen dedektöre tam vaktinde ulaşır. TOF kütle analizörlerinin reflectron tipleri MS/MS analizlerine olanak verir. Reflectrondan sonra parçalama aktivasyonu gösteren fragment iyonların MS/MS spektrumlarını analiz edebilen cihazlar mevcuttur. MALDI TOF MS/MS kütle analizörleri yüksek enerjili CID özelliğine sahiptir [63].



Şekil 2.3: TOF-TOF Kütle Analizörünün Şematik Gösterimi

MALDI intact peptidlerin analizi için genellikle TOF analizörler ile birlikte kullanılır. Basitliği, mükemmel kütle doğruluğu, yüksek rezolüsyon ve hassaslığı ile MALDI-TOF proteinlerin tanımlanması, peptid haritalarının oluşturulması, peptid kütle haritalama veya peptid-kütle parmak izi çalışmalarında oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [62].

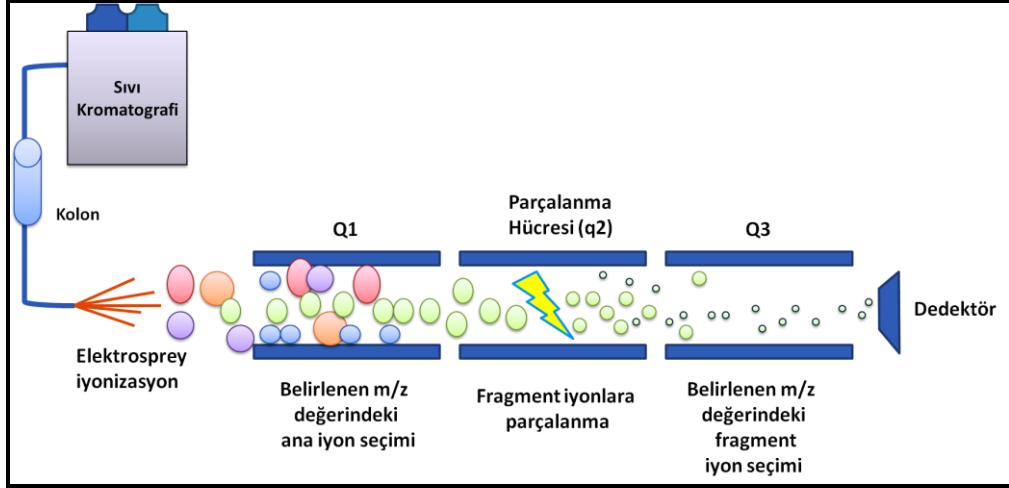
2.6.4.2. Üçlü Kuadrupol (Tandem) Kütle Analizörü

Kuadrupol analizörler dört adet paralel metal çubuk seti içerir [69, 70]. Voltajların sabit ve değişken kombinasyonu demir çubukların eksenini boyunca m/z değerlerinin dar bir bantta iletimine izin verir. Süre ile birlikte voltaj değişimiyle, bir kütle spektrumu elde edilen, m/z değerleri aralığında tarama yapılması mümkündür. Tarama moduna alternatif olarak, kuadrupoller spesifik m/z değerlerini izlemek için ayarlanabilir; sonrasında başka bir m/z değeri eklenebilir. Bu teknik hedef analitin ölçüm limitlerinin belirlenmesinde kullanışlıdır. Çünkü dedektör analit tarafından üretilmeyen iyonları taramak yerine spesifik iyonları taramak için zaman harcar. Adım birkaç milisaniye içinde gerçekleştirilebilir ve m/z değerlerinden oluşan bir panel, çeşitli analitlerin saptanması için kullanılabilir [70].

İyonlar, azot ya da argon gibi bir inert gaz ile fragmentasyona maruz bırakılır, bu süreç çarpışma indüklü disosiyasyon (CID) olarak adlandırılır [69, 70]. Parçalanma hücresi de kuadrupollerden bir tanesidir. Düşük basınçta gerekli gaz ile fragmentasyonun yapılabilmesi ve iyonların iletilebilmesi için tasarlanmıştır. Özellikle kullanışlı bir kütle spektrometrisinde parçalanma hücresi diğer iki kuadrupolün arasında yer alır. Bu düzenlenme üçlü kuadrupol kütle spektrometresi (tandem MS) olarak isimlendirilir. Tandem MS'in avantajı tek evre kütle analizlerine göre analiz hassasiyetinin önemli derecede yüksek olmasıdır [70].

2.6.4.2.1. Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM)

Çoklu reaksiyon izleme; hem Q1 hemde Q2'nin daha önceden belirlenmiş ana iyon ve fragment iyon çiftlerini saptamasıdır (Şekil 2.4). Bu yöntem oldukça yüksek seçicilik ve hassaslık kazandırır ve ESI-MS/MS kantitasyon çalışmalarında oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadır [69].



Şekil 2.4: Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM)

İlk ve üçüncü kuadrupol eş zamanlı olarak farklı m/z değerlerini ölçebilir ve ana iyon/fragment iyon çifti paneli çok sayıda hedef analit için spesifik bir biçimde oluşturulabilir. Bu mekanizma çoklu reaksiyon izleme (MRM) olarak isimlendirilir [70]. MRM ölçümü için kullanılacak kütle spektrometresinde Q1 yalnızca ana iyonu seçmek için ayarlanır. Seçilen bu iyon fragmentasyon için Q2 denilen parçalanma hücresine geçer. Spesifik fragment iyonu Q3'de tespit edilir. Q3 fragmentin intensitesi zamana karşı grafik haline getirilir. Bu şekilde örnekteki peptid miktarı ile korele kromatografik pik elde edilir [59].

MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışmaya, Aralık 2012-Mart 2013 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Organ Nakli Merkezi'nde, canlı vericiden böbrek transplantasyonu yapılmış olan 18 yaş üstü 18 (5 kadın-13 erkek) hasta alınmıştır. Bu çalışma Helsinki Bildirgesi uyarınca Akdeniz Üniversitesi Kurumsal Etik Kurulu etik standartlara uygun olarak yapılmıştır. Hastalarla ilgili yaş, cinsiyet ve primer hastalığı gibi demografik bilgiler toplanmıştır. Enfeksiyon gelişen, ikinci defa transplantasyon gerektiren hastalar çalışma kapsamına alınmamıştır. Çalışma için kan ve idrar örnekleri transplantasyon operasyonundan 1 gün önce ve posttransplant 6. saatte alınmıştır.

3.2. Laboratuvar ölçümleri

Çalışma kapsamına alınan kişilerden, venöz kan örnekleri jelli biyokimya tüpüne. Alınan kan örnekleri 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen serumlar analiz zamanına kadar -80°C'de saklanmıştır. Aynı zamanlarda toplanan idrar örnekleri 3000 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra analiz zamanına kadar -80°C'de saklanmıştır. Glukoz, kan üre azotu (BUN), idrar kreatinin, serum total protein, serum albumin, C-reaktif protein (CRP), idrar total protein ve serum kreatinin rutin biyokimya ölçümleri ticari kit kullanılarak Cobas 8000 otoanalizöründe (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ölçülmüştür. Glomerular filtrasyon hızı (eGFR) "Chronic Kidney Disease Epidemiology" (CKD-EPI) formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Eritrosit sedimentasyon hızı Test 1 Alifax (Padova, İtalya) tam otomatik analizörde ölçülmüştür. Hemoglobin seviyeleri Siemens ADVIA 2120 hematoloji analizöründe (Tarrytown, NY, USA) ölçülmüştür.

3.3. Kütle Spektrometrik Analizler İçin Örnek Hazırlanması

Rekombinant insan L-FABP, ThermoFisher Scientific (catalog # RP75549) firmasından temin edilmiştir. Rekombinat insan netrin-1 proteini R&D systems (catalog # 6419-N1-025/CF) firmasından temin edilmiştir.

3.3.1. L-FABP ve Netrin-1 proteinleri İçin Triptik Peptid Kesimi

Proteinlerin triptik kesimi protein tanımlanması ve karakterizasyonu için proteomik çalışmalarında standart bir yöntemdir. MALDI-MS ve ESI-MS kütle spektrometri çalışmaları öncesi hızlı, verimli, tekrarlanabilir ve kolay kesim protokolü sağlamaktır. "In-Solution Digestion" kit protokolü kullanılarak

triptik peptid kesimi yapılmıştır. Kitin içerisinde kimotripsin ya da diğer proteazların rezidüel aktivitesi olmayan affinity-purified protein-sequencing grade tripsin bulunmaktadır. Bu tripsin ile kesim işlemi arjinin ve lizin rezidülerinin karboksil uçlarına oldukça hassastır ve sınırlı sayıda peptid fragmentlerinin oluşumuna sebep olur.

Triptik peptid kesim işlemi için “ProteoExtract all-in one trypsin digestion kit” (Calbiochem catalog #650212, Darmstadt, Almanya) ticari kiti kullanılmıştır. L-FABP için 50 µg protein üzerine 30 µl ekstraksiyon tamponu eklenerek işleme başlanmıştır. Netrin-1 proteini için 25 µg protein üzerine 30 µl ekstraksiyon tamponu eklenerek işleme başlanmıştır. Kit prosedürü aşağıda ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır:

“In solution Digestion” İşlemi İçin Kit İçeriği

- A. **Extraction Buffer 1** (Cat. No. KP31470)
- B. **E-Buffer Solvent 1** (Cat. No. KP31471)
- C. **D-Buffer Reagent** (Cat. No. KP31473)
- D. **Digest Buffer** (Cat. No. KP31474)
- E. **Reducing agent** (Cat. No. KP31475) 1
- F. **Blocking agent** (Cat. No. KP31476)
- G. **Trypsin** (Cat. No. KP31477)

Solüsyonların hazırlanması

1. **Extraction Buffer 1:** (B) E-Buffer Solvent 1’in tamamını eklenmiştir ve toz tamamıyla çözülmüştür (final volüm 15 mL olacaktır).
2. **Digest Buffer:** D-Buffer Reagent (D) liyoflizatının çözülebilmesi için 0,5 mL digest buffer solution kullanılmıştır ve total volümü vial (E)’ye transfer edilmiştir. Dikkatli bir biçimde karıştırılmıştır.
3. **Reducing agent:** 120 µl ultra saf su ile çözülmüştür.
4. **Blocking agent:** 120 µl ultra saf su ile çözülmüştür.
5. **Trypsin:** Her bir vialde 50 µl ultra saf su ile çözülmüştür.

Deney Prosedürü:

Pürifiye protein standartları ve protein çöktürme işlemi (Bölüm 3.3.4’e bakınız) yapılan serum ve idrar örneklerinin herbiri 30 µl **Extraction Buffer 1** içinde tamamen çözülmüştür ve 15 dk 10000 x g’de santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 25 µl’si yeni bir tüpe transfer edilmiştir ve üzerine 25 µl **Digest Buffer** eklenmiştir. Karışımın üzerine 1 µl **Reducing agent** eklenmiştir ve karıştırılmıştır. 10 dk 37°C’de inkübe edilmiştir. Ardından ısıtıcıdan çıkartılarak, Oda ısısına gelmesini beklenmiştir ve 1 µl **Blocking agent** ile karıştırılmıştır. 10 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 1 µl **trypsin** eklenmiş ve karıştırılmıştır. Ardından

2 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler analiz için -20°C'de saklanmıştır.

Kesimi zor olan örnekler için ya tripsin konsantrasyonu iki katına çıkartılır ya da inkübasyon süresi birkaç saat daha uzatılabilir.

3.3.2. Plazmadan Yüksek Yoğunluklu Proteinlerin Uzaklaştırılması

Plazmadan yüksek yoğunluklu proteinlerin uzaklaştırılması için Norgen Biotek marka ProteoSpin™ Abundant Serum Protein Depletion Kit (Cat No: 17300, Thorold, ON, Kanada) kullanılmıştır.

ProteoSpin™ Abundant Serum Protein Depletion Kit, albumin, α -antitripsin, transferin ve haptoglobin gibi majör serum proteinlerini, serum ve plazma örneklerinden hızlı ve basit bir prosedür ile etkili bir biçimde uzaklaştırmak için kullanılmıştır. Kit iyon- değişim mekanizmasına bağlı olarak bu işlemi gerçekleştirir. Sonuç olarak albumin yaklaşık olarak %70, α -antitripsin %90, transferin ve haptoglobin %50 oranında uzaklaştırılabilir. Böylece örneğin kompleksliği büyük oranda azaltılmış olur. Elde edilen elüe örnekler ileri LC-MS/MS çalışmaları için hazır olur.

Deney Prosedürü:

Kolon Aktivasyonu:

Spin kolonlar toplama tüpleri ile birleştirilmiş ve kolonun kapağını açılmıştır. Kolona 500 μ l *Wash solution G* eklenmiş ve kapağı kapatıldıktan sonra 1 dk 6700 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası alttaki tüpe akan sıvı atılmıştır. Bu işlem bir kez daha tekrarlanarak kolon aktivasyonunu tamamlanmıştır.

Örnek Hazırlama:

50 μ l serum örneği 450 μ l *Wash solution G* ile dilue edilmiş ve iyice karıştırılmıştır.

Protein Bağlama:

Toplam 500 μ l dilue serum örneği aktive edilmiş kolonun üzerine eklenmiş ve 1 dk 6700 x g'de santrifüj edilmiştir ve toplama tüpüne akan sıvı atılmıştır. Spin kolon tekrar toplama tüpü üzerine yerleştirilmiştir.

Kolon yıkama:

Kolona 500 μ l *Wash Solution G* eklenmiştir ve 1 dk 6700 x g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan kısım atılmıştır ve kolon toplama tüpü ile yeniden birleştirilmiştir. Yıkama işlemi toplamada iki kez yapılmıştır.

Protein Elüsyonu ve Nötralizasyon:

Protein Neutralizer (18.6 μ l) temiz elüsyon tüplerine eklenmiştir. Spin kolonları elüsyon tüplerine transfer edilmiştir. Üzerine 100 μ l *Elution Buffer C* eklenmiştir ve bağlı proteinleri elüe etmek için 1 dk 6700 x g'de santrifüj edilmiştir. Elüsyon işlemi aynı santrifüj tüpünde bir kez daha tekrarlanmıştır.

Bu işlemler ile yaklaşık %70 albumin, %90 antitripsin, %50 transferrin ve haptoglobin uzaklaştırılmıştır. Serum örneği ileri LC-MS/MS çalışmaları için hazırdır.

3.3.3. İdrar Konsantrasyon İşlemi

Total protein içeriği toplam 1.5 ml idrar örneğinden, Norgen Biotek marka ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit (Cat No: 17400, Thorold, ON, Kanada) kullanılarak elde edilmiştir. ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit küçük hacimli idrar örneklerinin protein içeriğinin hızlı ve basit bir prosedür ile konsantre edilmesi için kullanılmıştır. Saflaştırma Norgen tescilli iyon değişim spin kolon kromatografisi prensibi ile yapılmaktadır. İdrar proteinleri kolona bağlanır, tuzlar spesifik olmayan materyaller örnekten uzaklaştırılır. Dilue idrar solüsyonunun konsantre edilmesi ve tuzların uzaklaştırılması işlemi LC-MS/MS gibi ileri çalışmalar için uygun protein örneklerinin hazırlanmasına olanak sağlamaktadır.

Deney Prosedürü:

İdrar Örneklerinde pH Ayarlanması:

İdrar protein örneği hazırlamada en önemli adım, kolona uygulanan solüsyonun pH ayarının düzgün yapılmasıdır. Kişilerin asit-baz durumuna bağlı olarak, idrar örneğinin pH aralığı 4.5-8 aralığındadır. İdrar proteinlerini konsantre edebilmek için, idrar örneğinin pH'sı, bağlanma pH'sı 3.5 olmalıdır.

Toplamda 1.5 ml idrar örneğine 60 µl **Binding Buffer A** eklenmiştir ve iyice karıştırılmıştır. pH'nın 3.5 olduğu pH stripleri ile doğrulanmıştır. Eğer gerekli ise bir miktar daha **Binding Buffer A** eklenebilir.

Kolon aktivasyonu:

Spin kolonları toplama tüpleri ile birleştirilmiş ve kolonun kapağını açılmıştır. Kolona 500 µl **Wash solution C** eklenmiş ve kapağını kapatılmıştır. Kolon toplama tüpleri içerisinde 2 dk 3300 x g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpleri içine akan sıvı atılmıştır. Kolon yıkama işlemi toplamda iki kez yapılmıştır.

Protein Bağlama:

650 µl pH'ı ayarlanan idrar örneği aktive kolona eklenmiştir. 2 dk 3300 x g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan sıvı atılmıştır. Spin kolonu toplama tüpü ile yeniden birleştirmiştir. Aynı spin kolona 650 µl daha pH'ı ayarlanan idrar örneği eklenmiş ve devamındaki işlemler tekrarlanmıştır.

Kolon Yıkama:

Protein bağlama işlemi tamamlanan spin kolona 500 ul **Wash solution C** eklenmiştir ve 2 dk 3300 x g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan sıvı atılmıştır ve spin kolonları toplama tüpleri ile yeniden birleştirilmiştir. Yıkama işlemi aynı sırada bir kez daha yapılmıştır.

Protein Elüsyonu ve pH Ayarlaması

Elution Buffer C 10 mM sodyum fosfat içerir (pH 12.5). Temiz elüsyon tüplerine 9.3 µl *Protein Neutralizer* eklenmiştir. Yıkama işlemi tamamlanan spin kolonlar elüsyon tüpü üzerine yerleştirilmiştir. Üzerine 100 µl *Elution Buffer C* eklenmiştir ve bağlı proteinleri elüe etmek için 2 dk 3300 x g'de santrifüj edilmiştir.

3.3.4. Protein Çöktürme İşlemi

Protein çöktürme işlemi için Calbiochem marka ProteoExtract® Protein Precipitation Kit (Cat. No. 539180, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Bu kit ile "Plazmadan Yüksek Yoğunluklu Proteinlerin Uzaklaştırılması" işlemine tabi tutulmuş serum örnekleri ve "İdrar Konsantrasyon İşlemi" uygulanmış idrar örneklerinde bulunan protein içeriğinin, konsantrasyon ve arındırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Proteomik örnek analizleri genellikle elektroforetik yöntemler veya enzimatik kesim uygulamaları, tamponlar, tuzlar ve deterjan gibi protein olmayan yabancı maddelerin varlığı ile engellenmektedir. Buna ilaveten solüsyonlarda bulunan proteinler sıklıkla ileri deneyler için çok dilüe bir şekilde bulunurlar. Protein presipitasyonu hem proteinleri konsantre eder hemde interferans veren maddelerin tek adımda uzaklaştırılmasını sağlar. ProteoExtract® Protein Precipitation Kit çeşitli kaynaklardan alınan proteinlerin hem konsantre edilmesi hem de temizlenmesi için hızlı ve etkili bir çözümdür. Proteinleri çöktürürken, deterjan, tampon içerikleri, tuzlar ve diğer interferans verebilecek maddeler sıvı kısımda kalır. Çöktürülen proteinler ileri deneyler için kullanılacak uygun tamponların içerisinde kolay bir şekilde yeniden çözülür.

Reaktif hazırlama:

Kit ilk kez çalışılacağında *Precipitation Agent* ve *Wash Solution* hazırlanmalı ve -20°C'de saklanmalıdır.

1. *Precipitation Agent* hazırlanması:

Precipitant 1 şişesinin içerisine 1.7 ml *Precipitant 2*, 1.7 ml *Precipitant 3*, 1.7 ml *Precipitant 4* eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Bu karışım *Precipitation Agent* olarak isimlendirilir. *Precipitation Agent* -20°C'de 2 ay saklanabilir.

2. *Wash Solution* hazırlanması:

150 ml yüksek kalite etanol, *Wash Solution* şişesine eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Bu solüsyon -20°C'de 1 yıl saklanabilir.

Deneysel Prosedürü:

Konik tabanlı mikrosantrifüj tüpüne 200 µl örnek ve 800 µl soğuk (-20°C) *Precipitation Agent* eklenmiştir ve iyice vortex yapılmıştır. Ardından 60 dk -20°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde örnek 10 dk 10000 x g'de (14000 rpm) oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant dikkatli bir şekilde pelleti dağıtmadan tamamen aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Pellet 500 µl soğuk (-

20°C) *Wash Solution* ile yıkanıp ve vorteks yapılmıştır. 2 dk 10000 x g'de (14000 rpm) oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde pelleti dağıtmadan tamamen aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi toplamda 2 kez yapılmıştır. Yıkama işlemleri bittikten sonra, pellet, oda sıcaklığında tüpün ağzını açık bırakarak 5 -10 dk kadar kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan pellet üzerine triptik kesim için uygun olan tampon konularak bölüm 3.3.3'de anlatılan ProteoExtract all-in one trypsin digestion kit kullanılarak triptik kesim işlemine tabi tutulmuştur.

3.4. Proteomik Teknikler

3.4.1. MALDI TOF Kütle Spektrometri Çalışmaları

Netrin-1 ve L-FABP proteinlerine ait ana iyon ve fragment iyon piklerinin belirlenmesi için Shimadzu Biotech marka AXIMA-Performance model Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu Kütle Spektrometresi (MALDI TOF-MS/MS) (Shimadzu, Manchester, UK) cihazı kullanılmıştır.

3.4.1.1. MALDI TOF-MS/MS Cihazının Kalibrasyonu

MALDI-TOF-MS/MS cihazını kalibre etmek için LaserBio Labs marka MALDI TOFMixTM kit (Cat No: SHZ-001) kullanılmıştır.

Kit İçeriği:

1. TOFMixTM sekiz peptidli kalibrasyon standartı
2. α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) matriks
3. Standart diluent (Asetonitril/ultra saf su/trifluoroasetik asit (30:70:0.1))
4. Matriks dilüent (Asetonitril/ultra saf su/trifluoroasetik asit (50:50:0.1))

CHCA Matriks Solüsyonunun Hazırlanması

5mg/ml CHCA matriksinin üzerine 1 ml matriks dilüent eklenmiş ve matriksin tam olarak çözünebilmesi için 30 sn vorteks yapılmıştır. Ardından hava kabarcıklarının yok edilmesi için 30 sn spin yapılmıştır. MALDI plate üzerinde her bir spot için hazırlanan bu matriks solüsyonundan 0.5 μ l kullanılmıştır.

TOFMix Standart Solüsyonunun Hazırlanması

TOFMix stok tüpüne 50 μ l standart diluent eklenerek çözülmüştür. TOFMix stok tüp içerisinde ACTH 75 pmol/ μ l, Bradikinin 200 pmol/ μ l ve diğer tüm peptidler 50 pmol/ μ l konsantrasyonunda bulunur. Standart içerisindeki peptidlerin listesi tablo 3.1'de verilmiştir. TOFMix stok solüsyonundan 2 μ l alınarak ve 23 μ l standart diluent ile dilue edilmiştir. TOFMix solüsyonunun final konsantrasyonu ACTH 6 pmol/ μ l, Bradikinin 16 pmol/ μ l ve diğer tüm peptidler 4 pmol/ μ l olur. TOFMix solüsyonundan 0.5 μ l alınıp ve 384 kuyucuklu MALDI plağına ekilmiştir. Üzerine hızlı bir şekilde 0.5 μ l CHCA matrix solüsyonu eklenmiştir. Spot üzerinde

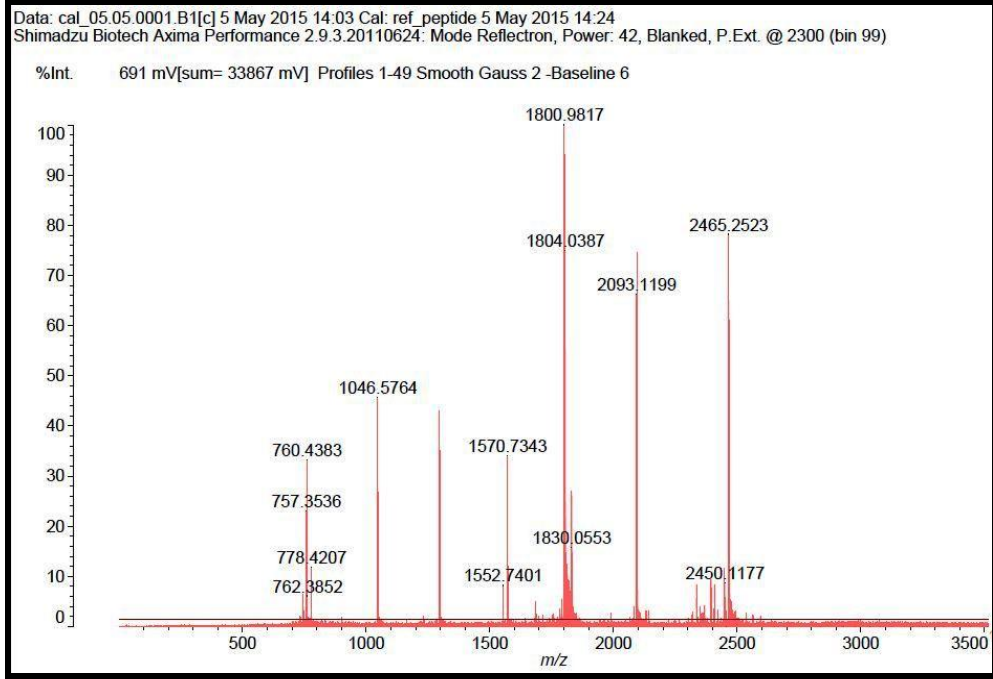
final konsantrasyon ACTH 3 pmol/ µl, Bradikinin 8 pmol/ µl ve diğer tüm peptidler 2 pmol/ µl olmuştur.

Tablo 3.1. TOFMix™ Kalibrasyon Kitindeki Standart Peptidlerin Kütle Değerleri

TOFMix™ Peptid	Aminoasit Dizisi	<i>m/z</i> Değeri
Bradikinin 1-7	RPPGFSP	757.3536
Angiotensin II	DRVYIHPF	1046.5764
Angiotensin I	DRVYIHPFHL	1296.6848
Glu1-Fibrinopeptid B	EGVNDNEEGFFSAR	1570.7343
N-Asetil Renin Substrat	DRVYIHPFHLLVYS	1800.9817
ACTH clip 1-17	SYSMEHFRWGKPVGKKR	2093.1199
ACTH clip 18-39	RPVKVYPNGAEDESAAEAFPLEF	2465.2523

3.4.1.2. MALDI TOF-MS/MS Cihazında L-FABP ve Netrin-1 Protein Triptik Standartlarının *m/z* Değerlerinin Belirlenmesi

Tripsin enzimi ile kesilmiş netrin-1 ve L-FABP standartları α -cyano-4-hidroksisinammik asid (α -CHCA) (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis Cedex, Fransa) (1:1, v/v) ile beraber MALDI- plate üzerine uygun spotlara ekilmiştir. Peptidlerin moleküler iyonları AXIMA Performance MALDI TOF-MS/MS (Shimadzu, Manchester, UK) cihazında pozitif iyon modunda analiz edilmiştir. Ölçümler Reflectron modda 300-3000 Da aralığında yapılmıştır. Kalibrasyon için 757-2465 Da aralığında peptidler içeren MALDI TOFMix kit (LaserBio Labs, catalog# SHZ-001, Sophia-Antipolis Cedex, Fransa) kullanılmıştır (Şekil 3.1). Tüm MS/MS analizleri çarpışma indüklü ayırım (CID) kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3.1. MALDI TOFMix™ kalibratör spektrumu

L-FABP ve Netrin-1 proteinleri için teorik triptik peptid kesim listeleri <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest> web adresinden elde edilmiştir (Şekil 3.2).

MS-Digest

Database: User Protein | Retrieve Entry by: Accession Number

Output: HTML | Hits to file: Name: lastres | N Term AA Limit:

Digest: Trypsin | Max. Missed Cleavages: 1

[+] End Terminus Parameters

- Abu (N-term)
- Acetohydrazide (C-term)
- Acetohydrazide (DE)

Constant Mods

- Acetyl (K)
- Acetyl (N-term)
- Acetyl (R)

[+] Present Amino Acids(see instructions)

Perform Digest

Variable Mods

- Acetyl (Protein N-term)
- Gln->pyro-Glu (N-term Q)
- Met-loss (Protein N-term M)
- Met-loss+Acetyl (Protein N-term M)
- Oxidation (M)

Peptide Mass: 800.0 to 4000.0

Min Peptide Length: 5

Hide Protein Sequences:

Hide HTML Links:

Report Multiple Charges:

Bull Breese Indices: HPLC Indices:

Separate Proteins:

For digestion of a user supplied sequence select User Protein above.

User Protein: MKAVVLTLLAVLFLTGSQARHFWDQDDPQSSWDRVVKDFATVYVEAIKDSGRDYVAGFEASALGFQNLKLLDNWDTLASTL SKVREGLGFTQEFWDNLEKETASLRQEMHKDLEEVKGVQVYDFQKKNHVEEIVYRQVAPLGEFFREGARQKVOEL QDKLSFLAQELRDRARAHVETLRQQLAFYSDDLRQLRLARLEALKEGGSLAEYHAKASEQLKALGEKAPVLEDLRQGL LPVLESLEKVSILAAIDEASKKLNAG

Şekil 3.2. Teorik Triptik Peptid Kesimi İçin Kullanılan Web Sitesi

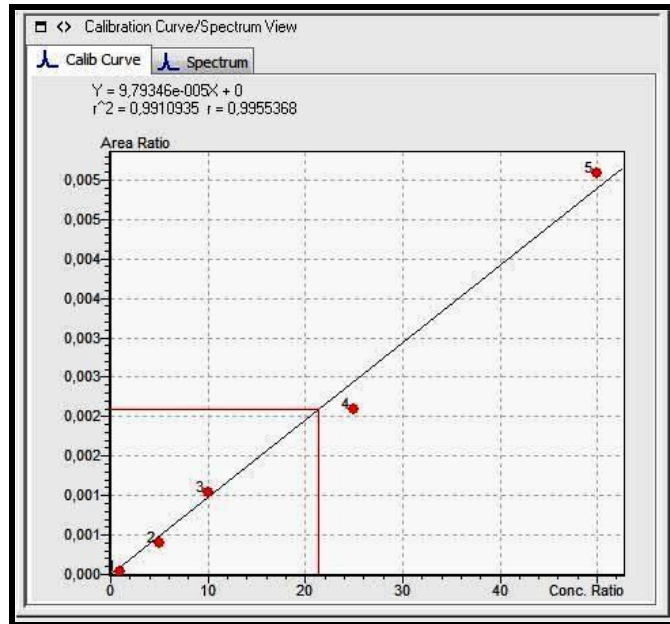
Kütle spektrum taramasındaki m/z değerleri, teorik m/z listeleri ile karşılaştırılmış ve her iki protein için en uygun ve tekrarlanabilirliği en yüksek iyon çiftleri seçilmiştir.

3.4.2. Elektrospray İyonizasyon Kütle Spektrometri Çalışmaları

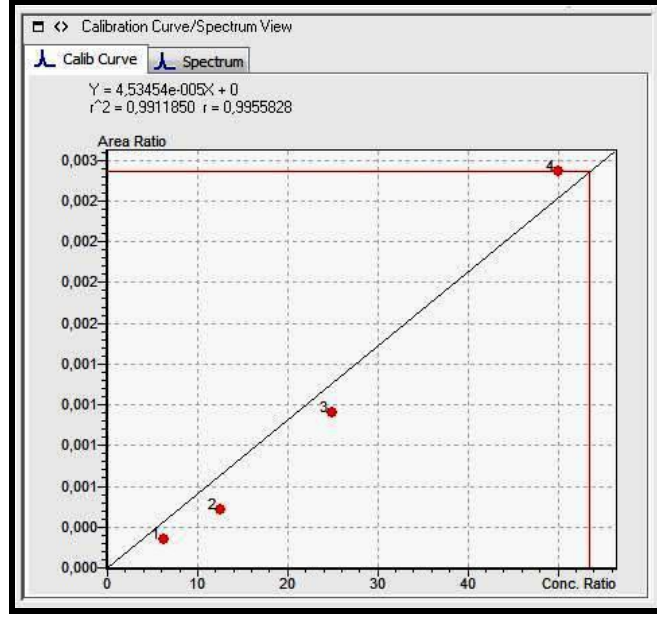
İşaretli internal standart (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) içeren L-FABP ve netrin-1 triptik standartları % 0.1'lik formik asid içeren metanol (Merck, Darmstadt, Almanya) içerisinde hazırlanmıştır. Optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme metodu, ultra-hızlı likid kromatografi (UFLC) tandem kütle spektrometre cihazı kullanılarak geliştirilmiştir. UFLC sistemi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya), LCMS-8040 üçlü kuadruol kütle spektrometre cihazı (Shimadzu Corporation, Japonya) ile eşleştirilmiştir.

Kromatografik ayrımlar, Inertsil HPLC kolon (ODS-4, 2.1 x 50 mm, 3 μ m; GL Sciences Inc. Tokyo, Japonya) kullanılarak 40°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Peptidler akış hızı 0.4 ml/dk olan gradient elüsyon kullanılarak ayrılmıştır. Mobil faz A % 0.1 formik asid içeren distile su ve mobil faz B % 0.1 formik asid içeren metanol olarak belirlenmiştir. Mobil faz B'nin gradient programı % 20 (0 dk), % 44 (3 dk), % 95 (3.01–7 dk), % 95 (7.01–10 dk) ve % 20 (10.01-12 dk) olarak kullanılmıştır. MRM geçişleri her peptid ayrı ayrı otomatik olarak pozitif elektrosprey iyonizasyon (ESI) modunda optimize edilmiştir.

Pozitif ESI-MS modundan elde edilen m/z değerleri bulgular bölümünde verilmiştir. L-FABP standartlarının linear kalibrasyon aralığı 6.25 μ g/ml - 50 μ g/ml olarak seçilmiştir. Netrin-1 protein standartlarının linear kalibrasyon aralığı 1 μ g/ml-50 μ g/ml olarak seçilmiştir. Her iki protein için analiz süresi 12 dk sürmüştür. Proteinlere ait LC-MS/MS kalibrasyon eğrileri Şekil 3.3 ve 3.4'de gösterilmiştir.



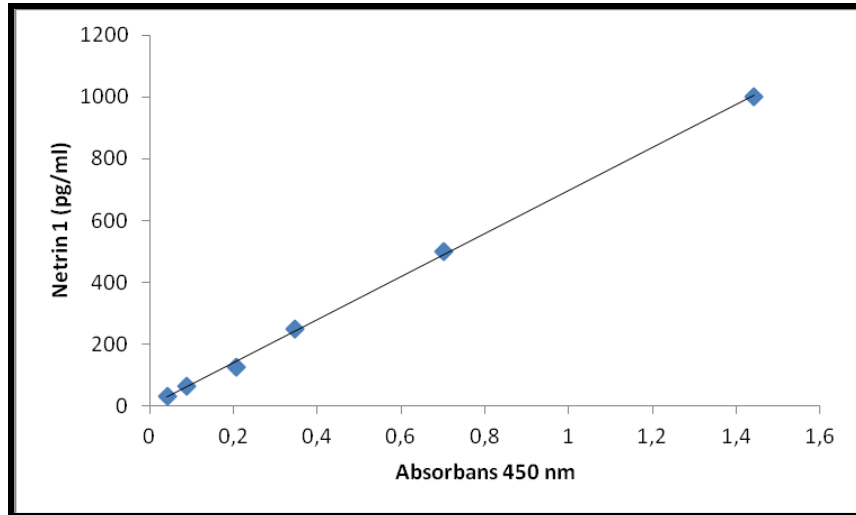
Şekil 3.3. Netrin-1 LC-MS/MS Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 3.4. L-FABP LC-MS/MS Kalibrasyon Eğrisi

3.5. Netrin-1 Düzeylerinin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi

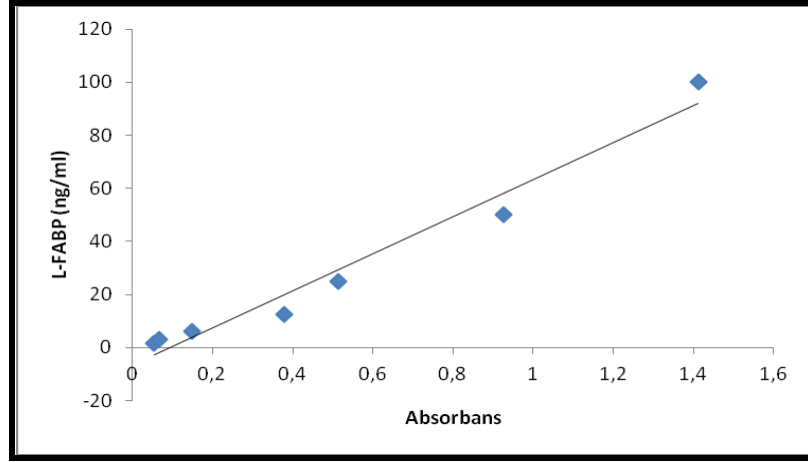
Çalışmamızda idrar ve serum örnekleri içerisindeki netrin-1 miktarı ticari bir enzim immünassay kit (Cloud-Clone, SEB827Hu 96 Tests, Houston, TX, USA) ile ölçülmüştür. Standartlar 0-1000 pg/ml aralığında hazırlanmıştır. Kan ve idrar örneklerindeki netrin-1 düzeylerinin ölçümü üretici talimatlarına göre yapılmıştır. Tüm örnekler çalışılarak kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.5) ile netrin-1 miktarları pg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. Netrin-1 ELISA Standart Eğrisi

3.6. L-FABP Düzeylerinin ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi

Çalışmamızda idrar ve serum örnekleri içerisindeki L-FABP miktarı ticari bir enzim immünassay kit (Cloud-Clone, SEB566Hu 96 Tests, Houston, TX, USA) ile ölçülmüştür. Standartlar 0-100 ng/ml aralığında hazırlanmıştır. Kan ve idrar örneklerindeki L-FABP düzeylerinin ölçümü üretici talimatlarına göre yapılmıştır. Tüm örnekler çalışılarak kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.6) ile L-FABP miktarları ng/ml olarak hesaplanır.



Şekil 3.6. L-FABP ELISA Standart Eğrisi

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Sigma Stat (version 2.03) paket programı ile yapılmıştır ve p değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Elde edilen verilerin karşılaştırılmasında uygulanan istatistiksel metodlar bulgular kısmında ayrıntılı olarak yazılmıştır.

BULGULAR

4.1. Hasta Bilgileri ve Laboratuvar Değerleri

Hastalar ile ilgili bilgiler tablo 4.1’de ve rutin laboratuvar ölçümleri tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastalara ait bilgiler (n=18)

	N	%
Erkek	13	72.2
Kadın	5	27.8
Primer Hastalık		
Etiyoloji Bilinmiyor	8	44.4
Hipertansiyon	3	16.7
Tip 1 Diabetes Mellitus	2	11.1
Tip 2 Diabetes Mellitus	1	5.6
İlaça bağlı böbrek hasarı	1	5.6
Medüller Kistik Böbrek Hastalığı	1	5.6
Membranöz Glomerulonefrit	1	5.6
Nefrotik Sendrom	1	5.6
Renal Replasman Terapi		
Hemodiyaliz	9	50
Peritoneal diyaliz	1	5.6
Preemptif transplantasyon	8	44.4

Hastaların %72.2’si erkek ve % 27.8’i kadındır. Hastaların transplantasyon öncesi tedavilerine bakıldığında % 50’sine hemodiyaliz ve % 5.6’sına periton diyalizi uygulanmıştır. Hastaların % 44.4’ünde etiyoloji bilinmemektedir. Primer hastalıklar incelendiğinde %16.7 ile hipertansiyon birinci sırada yer almaktadır. Hastalar ile ilgili tüm veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Veriler ile

ilgili referans değerleri de tablo 4.2’de gsterilmiştir. İstatistiksel analizler Sigma Stat (version 2.03) paket programı kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 4.2. Hasta Laboratuvar Değerleri

Parametre	Pre-KTx Ortalama \pm SD (n=18)	Post-KTx 6.saat Ortalama \pm SD (n=18)	Referans Değerler
Glukoz (mg/dl)	107.44 \pm 48.39	ND	74 - 106
BUN (mg/dl)	63.83 \pm 22.17	ND	6 - 20
Serum Kreatinin (mg/dl)	7.40 \pm 1.73	4.30 \pm 0.94*	0.7 – 1.2
CKD-EPI eGFR (ml/dk/1.73 m ²)	8.30 \pm 1.77	18.80 \pm 5.62*	60 - 150
Serum Total Protein (g/dl)	7.16 \pm 0.56	ND	6.6 – 8.7
Serum Albumin (g/dl)	4.61 \pm 0.32	ND	3.97 -4.94
CRP (mg/dl)	0.69 \pm 0.94	0.70 \pm 0.67	0 -0.5
Sedimentasyon hızı (mm/saat)	24.24 \pm 12.82	ND	0 -20
Hemoglobin(g/dl)	10.89 \pm 1.77	ND	12 - 16
İdrar Total Protein (spot) (mg/dl)	133.70 \pm 95.15	18.30 \pm 10.71*	0 - 15
İdrar Kreatinin (spot)	63.99 \pm 35.52	15.30 \pm 4.09*	39 - 259
Spot İdrar Protein/Kreatinin	2.74 \pm 2.74	1.20 \pm 0.68	0-0.2
Yaş	38.83 \pm 14.76		

KTx, renal transplantasyon; ND, ölçülmedi; BUN, Kan üre nitrojeni; CKD-EPI, Chronic kidney disease epidemiology collaboration; eGFR, tahmini glomerüler filtrasyon hızı; CRP, C-reaktif protein. İstatistiksel analiz Paired t-test ve Wilcoxon Signed Ranks Test kullanılarak yapılmıştır. *, p <0.001 vs. pre-KTx.

4.2. MALDI-TOF Kütle Spektrometri Bulguları

İnsan L-FABP (GenBank accession number: AAA52419.1) ve netrin-1 (GenBank accession number: AAD09221.1) proteinlerinin primer yapıları sırası ile tablo 4.3 ve tablo 4.4’de gsterilmiştir.

LC-MS/MS sisteminde protein ayırımında ön koşul, geçerli ve güçlü ölçüm yöntemi geliştirmek için uygun ve özgül yanıtı sağlayan peptidlerin seçimidir. İnsan L-FABP standartlarının triptik fragmantları ile yapılan hem MALDI-TOF-MS/MS hem de LC-MS/MS çalışmalarının verileri sonucunda, ⁵⁰FTITAGSK⁵⁷ (m/z 824) triptik peptid iyonu MH⁺ seğilmiştir. L-FABP için, ³⁷GVSEIVQNGKHF⁴⁹ (MH⁺², m/z 723) ve ⁵⁸VIQNEFTVGECELETMTGEKVK⁸⁰ (MH⁺³, m/z 871) gibi başka

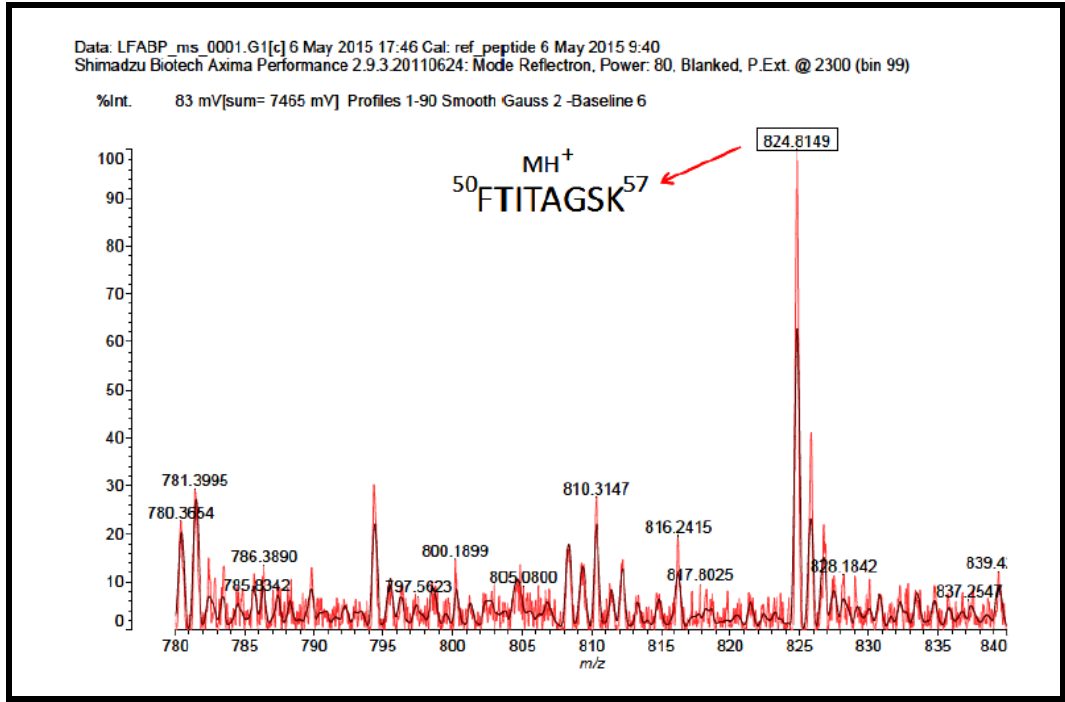
triptik fragmentler de incelenmiştir. Ancak bu iyonlar LC-MS/MS çalışmalarında miktar tayini için yetersiz sinyal alındığı için uygun bulunmamışlardır.

Tablo 4.3. İnsan L-FABP'nin Primer Yapısı

1 MSFSGKYQLQ SQENFEAFMK AIGLPEELIQ KGGDIKGVSE IVQNGKHKF **F TITAGSK** VIQ
61 NEFTVGEECE LETMTGEKVK TVVQLEGDNK LVTTFKNIKS VTELNGDIIT NTMTLGDIVF
121 KRISKRI

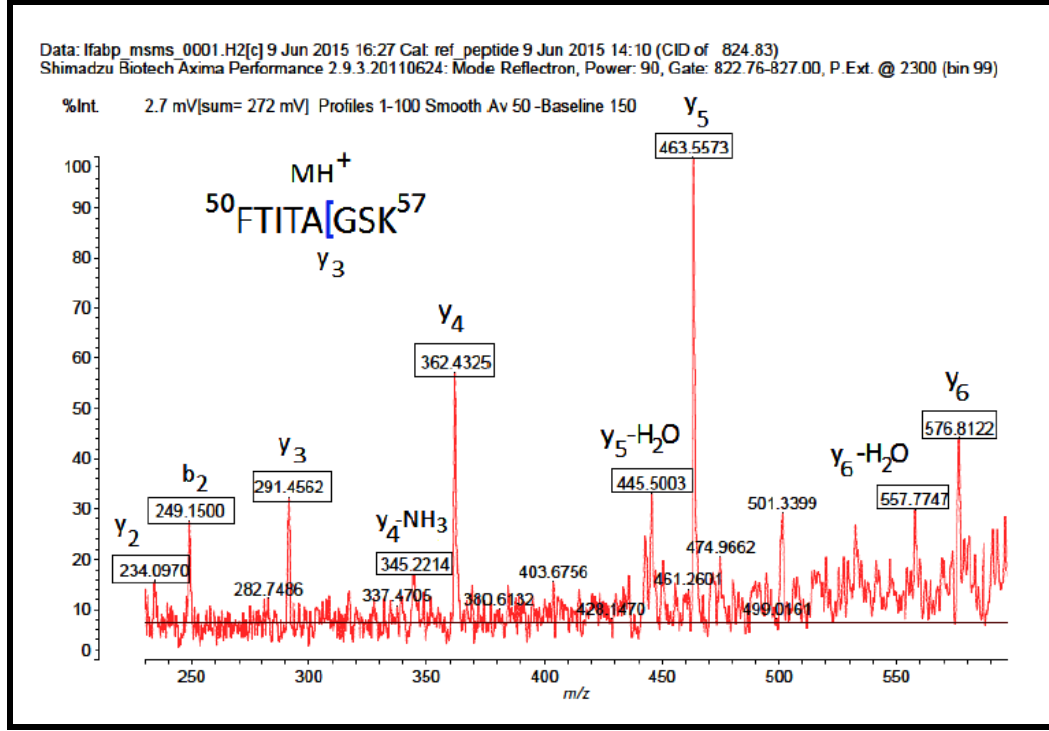
GenBank accession number: AAA52419.1. Seçili olan sekans gözlemlenen $^{50}\text{FTITAGSK}^{57}$ (m/z 824) triptik fragmentinin MH^+ iyonunu göstermektedir.

$^{50}\text{FTITAGSK}^{57}$ (m/z 824) rezidüsünün triptik fragmenlerinin MALDI-TOF kütle spektrumu Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. L-FABP'in m/z 824 MH^{+2} ana iyonunun MALDI-TOF MS spektrumu

$^{50}\text{FTITAGSK}^{57}$ (m/z 824) MH^+ ana iyonunun CID ile elde edilmiş b ve y iyonlarının MALDI-TOF MS/MS spektrumu Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Elde edilen iyonlar sekanstaki pozisyonlarına bağlı olarak numaralandırılmıştır.



Şekil 4.2. L-FABP'in m/z 824 MH^{+2} ana iyonunun MALDI-TOF MS/MS spektrumu.

LC-MS/MS sisteminde kantitatif MRM analizleri için seçilen 50–57 rezidüsünün (ana iyon, m/z 824) fragment iyonunun y_3 (m/z 291) iyonu olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.5). y_3 (m/z 291) fragment iyonu LC-MS/MS şartları altında en yüksek intensiteye sahip iyon olarak gözlemlenmiştir. Bu sebeple, MRM transisyonu için muhtemel en hassas iyon çiftidir.

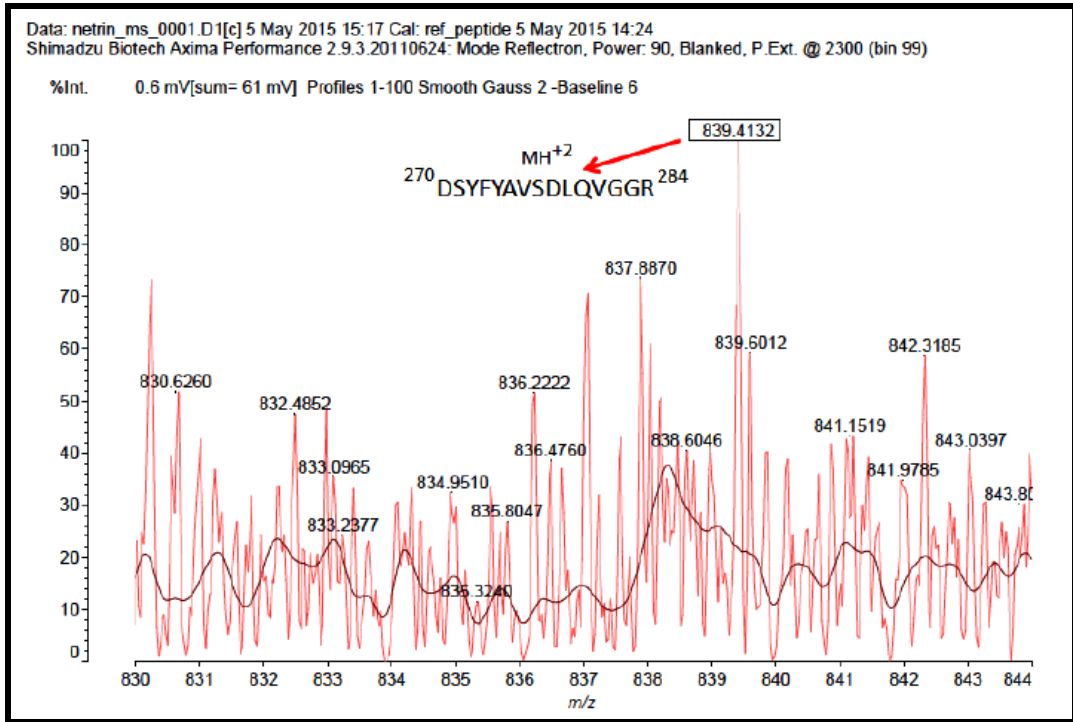
Tablo 4.4. İnsan Netrin-1 Proteininin Primer Yapısı

I MMRAVWEALA ALAAVACLVG AVRGGPGLSM FAGQAAQDPD CSDENGHPRR CIPDFVNAAF
61 GKDVRSSTC GRPPARYCVV SERGEERLRS CHLCNASDPK KAHPPAFLTD LNNPHNLTCW
121 QSENYLQFPN NVTLTSLGK KFEVTYVSLQ FCSRPESMA IYKSMDYGRW WVPFQFYSTQ
181 CRKMYNRPHR APITKQNEQE AVCTDSHTDM RPLSGGLIAF STLDGRPSAH DFDNSPVLQD
241 WVTATDIRVA FSRLHTFGDE NEDDSELAR **D SYFYAVSDLQ VGGR** CKCNGH AARCVRDRTD
301 SLVCDRHNT AGPECDRCKP FHYDRPWQRA TAREANECVA CNCNLHARRC RFNMELYKLS
361 GRKSGGVCLN CRHNTAGRHC HYCKEGYYRD MGKPITHRKA CKACDCHPVG AAGKTCNQTT
421 GQCPCDGVGT GITCNCAKG YQQRSPAP CIPVAPPT TAASSVEEPE DCDSYCKASK
481 GKLKINMKKY CKKDYAVQIH ILKADKAGDW WKFTVNIISV YKQGTSRIRR GDQSLWIRSR
541 DIACKCPKIK PLKKYLLGN AEDSPDQSGI VADKSSLVIQ WRDTWARRLR KFQQREKKGK
601 CKKA

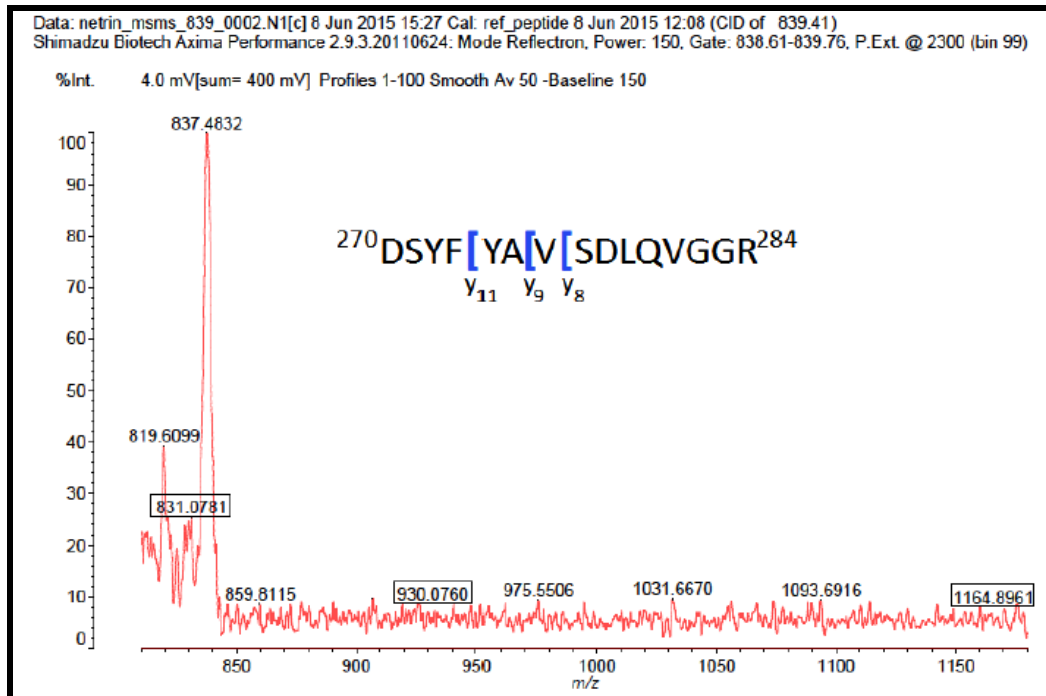
GenBank accession number: AAD09221.1. Seçili olan sekans gözlemlenen

$^{270}\text{DSYFYAVSDLQVGGR}^{284}$ (m/z 839) triptik fragmentinin MH^{+2} iyonunu göstermektedir.

İnsan netrin-1 protein standartının MALDI-TOF MS/MS ve LC-MS/MS deneysel çalışmaları sonucunda $^{270}\text{DSYFYAVSDLQVGGR}^{284}$ (m/z 839) MH^{+2} peptid iyonunu kantitasyon yapmak için seçilmiştir. Seçilen m/z 839 ana iyon dışında MH^{+2} $^{379}\text{HCHYCKEGYYR}^{389}$ (m/z 729) ve MH^{+3} $^{403}\text{ACDCHPVGAAAGKTCNQTTGQCPC}^{426}$ (m/z 798) iyonları gibi başka iyonlar üzerinde de kütle spektrometrik deneyler yapılmıştır. Ancak bu iyonlardan elde edilen yetersiz sinyaller sebebiyle LC-MS/MS şartlarında kantitasyon için uygun olmadıkları görülmüştür. $^{270}\text{DSYFYAVSDLQVGGR}^{284}$ (m/z 839) MH^{+2} triptik peptid iyonunun MALDI-TOF MS spektrumu Şekil 4.3’de gösterilmiştir. $^{270}\text{DSYFYAVSDLQVGGR}^{284}$ (m/z 839) ana iyonunun CID fragmentasyonu sonucu y tipi iyonlar ağırlıklı olarak gözlemlenmiştir. Bu iyonlar ana iyon sekansındaki pozisyonlarına göre isimlendirilmiştir. 270–284 (MH^{+2} ana iyon, m/z 839) rezidüsünün y8 (m/z 831), y9 (m/z 930) ve y11 (m/z 1164) fragment iyonları gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). y8 (m/z 831), y9 (m/z 930) ve y11 (m/z 1164) fragment iyonları LC-MS/MS sisteminde kantitatif MRM analizinde kullanılmıştır. Seçilen bu fragment iyonlar LC-MS/MS şartlarında en yüksek intensiteye sahiptir ve MRM transisyonları için en hassas sonuçları vermiştir.



Şekil 4.3. Netrin-1proteininin m/z 839 MH^{+2} ana iyonunun MALDI-TOF MS spektrumu.



Şekil 4.4. Netrin-1proteininin m/z 839 MH^{+2} ana iyonunun MALDI-TOF MS/MS spektrumu

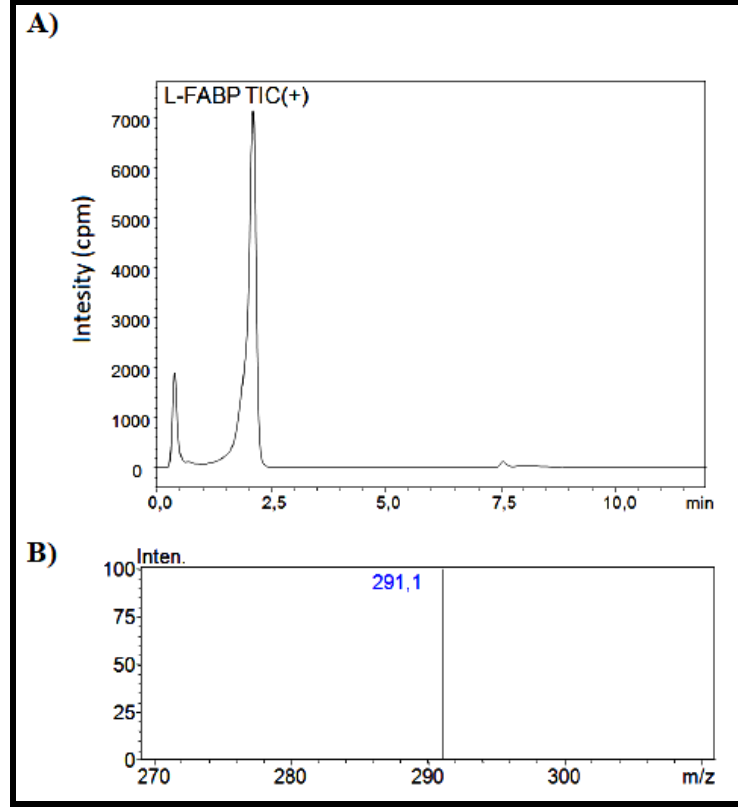
4.3. LC-MS/MS Metod Bulguları

Netrin-1 ve L-FABP için kütle spektrometrik miktar belirleme deneyleri UFLC sistem (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan), LCMS-8040 üçlü kuadropol kütle spektrometresi (Shimadzu Corporation, Japan) ile kombine LC-MS/MS siteminde optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme metodu (MRM) ile yapılmıştır. MALDI TOF-MS/MS cihazı ile uyumlu olarak bulunan ana iyonlar ve fragmentasyon işlemi sonrasında belirlenen fragment iyonların listesi Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5. LC-MS/MS Sisteminde Kullanılan Ana İyon ve Fragment İyonlar

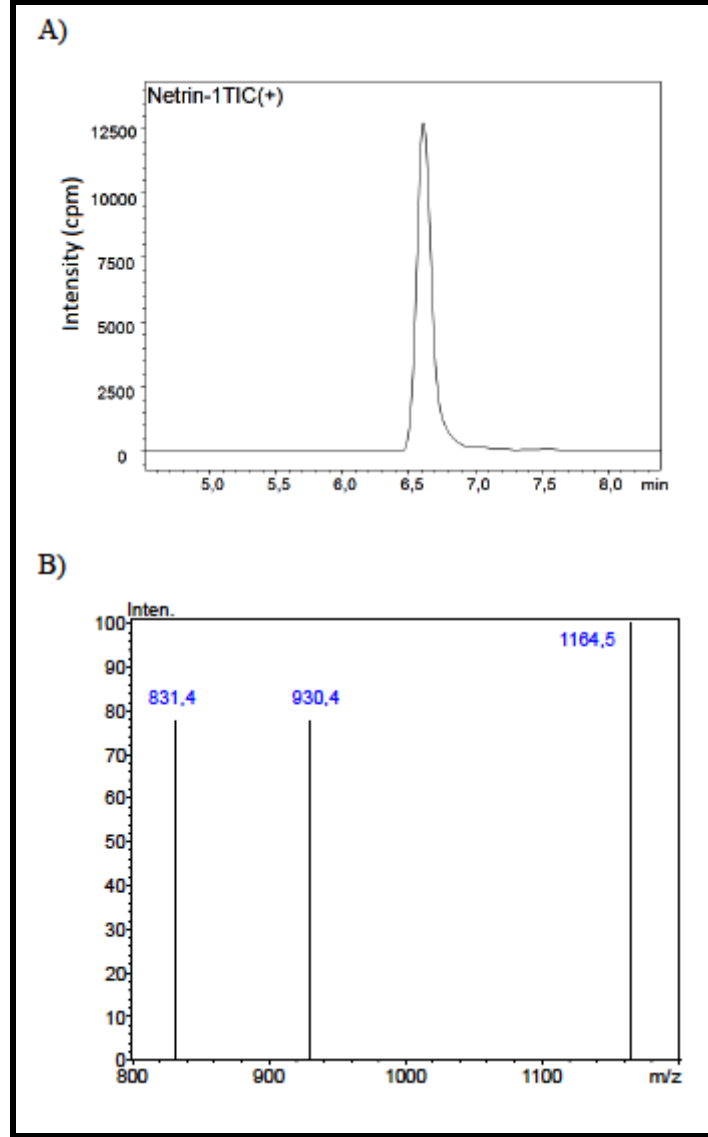
Protein	Ana İyon	Fragment İyon
Netrin-1	839.2	1164.5
		930.4
		831.4
L-FABP	824.2	291.1
İnternal Standart	Ana İyon	Fragment İyon
¹³C₆-Fenilalanin	171.8	126.1

L-FABP’a ait triptik peptidlerde ⁵⁰FTITAGSK⁵⁷ peptidi ana iyon olarak analiz edilmiştir. Bu peptide ait ana iyon *m/z*: 824.2 ve fragment iyon *m/z*: 291.1 değerleri MRM transisyonu olarak belirlenmiştir. L-FABP protein standartının LC-MS/MS siteminden elde edilen ESI-pozitif iyon modna ait spektrum görüntüsü Şekil 4.5-A’da gösterilmiştir. L-FABP’nin alıkonma zamanı 2.057. dk olarak gözlemlenmiştir. Şekil 4.5-B’de CID fragmentasyonundan elde edilen y3 fragment iyonunun spektrumu gösterilmektedir.



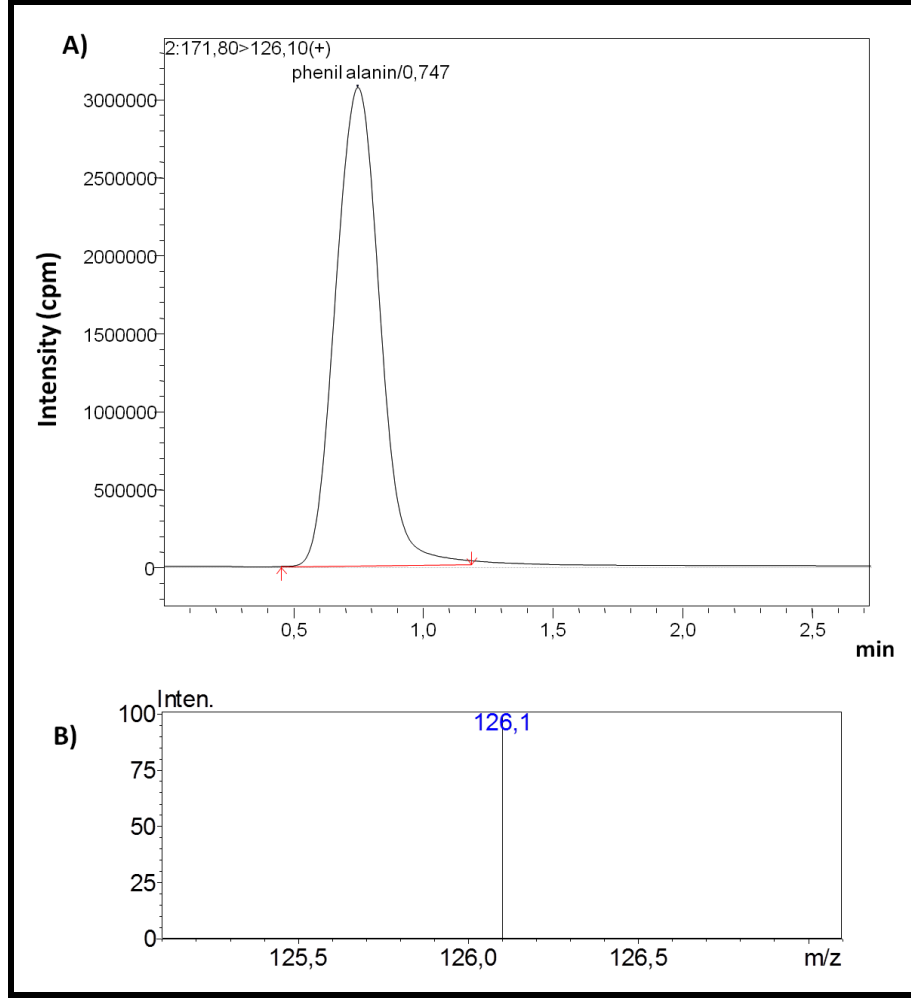
Şekil 4.5. L-FABP ESI-MS/MS Spectra. A) İnsan L-FABP'nin pozitif iyon modunda elde edilmiş örnek kromatogram görüntüsü B) Fragmen iyon m/z 291.1 tandem mass spectra görüntüsü.

Netrin-1 proteinine ait triptik peptidlerde 270 DSYFYAVSDLQVGGR 284 peptidi ana iyon olarak analiz edilmiştir. Bu peptide ait ana iyon m/z : 839.2 ve fragment iyonlar m/z : 831.4, 930.4 ve 1164.5 değerleri MRM transisyonu olarak belirlenmiştir. L-FABP protein standartının LC-MS/MS siteminden elde edilen ESI-pozitif iyon modna ait spektrum görüntüsü Şekil 4.6-A'da gösterilmiştir. Netrin-1'in alıkonma zamanı 6.504. dk olarak gözlemlenmiştir. Şekil 4.6-B'de CID fragmentasyonundan elde edilen y8, y9 ve y11 fragment iyonlarının spektrumu gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Netrin-1 ESI-MS/MS Spectra. A) İnsan Netrin-1 proteininin pozitif iyon modunda elde edilmiş örnek kromatogram görüntüsü B) Fragmen iyonlar m/z 831.4, 930.4, 1164.5'e ait tandem mass spectra görüntüsü.

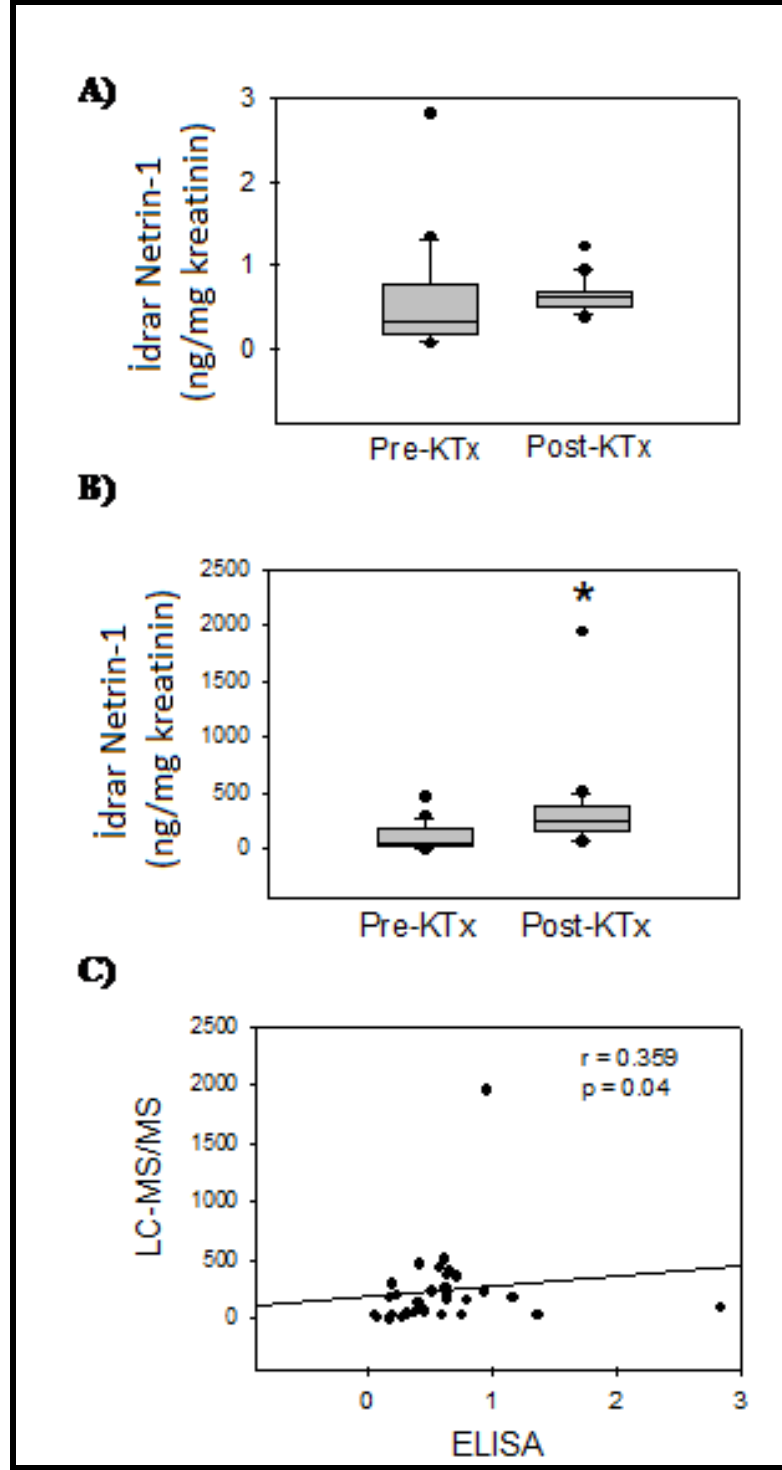
İnternal standart olarak $^{13}\text{C}_6$ -Fenilalanin kullanılmıştır. $^{13}\text{C}_6$ -Fenilalanin için LC-MS/MS cihazında yapılan optimizasyon deneylerinde kullanılan ana iyon m/z 171.8 olarak belirlenmiştir. LC-MS/MS cihazında kantitasyon için iyon çifti m/z 171.8 \rightarrow 126.1 olarak kullanılmıştır. Bu iyonun ait fragment iyon spektrumu ve elde edilen LCMS/MS piki Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. İnternal Standart $^{13}\text{C}_6$ -Fenilalanin LC-MS/MS verileri. A) LC-MS/MS pozitif iyon modunda çalışılmış internal standarta ait pik gösterimi. B) İnternal standartın m/z 171.8 MH^{+2} ana iyonunununa ait LC-MS/MS fragment iyon spektrumu.

4.4. Netrin-1 ELISA ve LC-MS/MS Ölçüm Bulguları

İdrar netrin-1 ölçümlerinin ELISA bulguları Şekil 4.8-A'da gösterilmiştir. Tüm veriler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. Transplantasyon sonrası (post-KTx) düzeyler (0.65 ± 0.22 ng/mg kreatinin) ile karşılaştırıldığında, transplantasyon öncesi (pre-KTx) netrin-1 düzeyleri (0.58 ± 0.68 ng/mg kreatinin) daha düşük bulunmuştur. Pre-KTx ve post-KTx idrar numunelerdeki ELISA ölçümlerinin dağılımı *box plot* grafik verisi olarak gösterilmiştir. *Box plot* grafik üzerinde, sifıra en yakın sınır %25'lik alt çeyrekliği (Q1), kutunun ortasındaki çizgi ortancayı (Q2) ve sifır çizgisine en uzak sınır %75'lik üst çeyrekliği (Q3) gösterir. Alt ve üst sınırlar %10 ve 90'lık çeyrekleri veririler. Pre-KTx için Q1,Q2 ve Q3 ELISA seviyeleri sırasıyla 0.19, 0.31 ve 0.76 ng/mg kreatinin olarak bulunmuştur. Post-KTx için Q1,Q2 ve Q3 ELISA seviyeleri sırasıyla 0.51, 0.63 ve 0.67 ng/mg kreatinin olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. İnsan Netrin-1 proteininin idrar örneklerinde analizi **A)** Transplantasyon öncesi (Pre-KTx) ve transplantasyon sonrası (Post-KTx) idrar netrin-1 proteininin ELISA ile ölçümü **B)** Pre-KTx ve Post-KTx idrar netrin-1 proteininin LC-MS/MS ile ölçümü. İstatistiksel analiz Wilcoxon Signed Rank Test ile yapılmıştır. *, $p = 0.005$ **C)** İnsan netrin-1 proteininin ELISA ve LC-MS/MS ölçümlerinin (ng/mg kreatinin) karşılaştırılması. İki metod arasındaki Spearman korelasyon katsayısı 0.359 ve $p = 0.041$

LC-MS/MS metodu ile ölçülen idrar netrin-1 düzeyleri Şekil 4.8-B’de gösterilmiştir. Tüm veriler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. Post-KTx düzeyler (354.81 ± 433.40 ng/mg kreatinin) ile karşılaştırıldığında, pre-KTx netrin-1 düzeyleri ($118.03 \pm 124,50$ ng/mg kreatinin) anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0,005$). Pre-KTx ve post-KTx idrar numunelerdeki LC-MS/MS ölçümlerinin dağılımı box plot grafik verisi olarak gösterilmiştir. Pre-KTx için Q1,Q2 ve Q3 LC-MS/MS seviyeleri sırasıyla 32.02, 51.85 ve 182.47 ng/mg kreatinin olarak bulunmuştur. Post-KTx için Q1,Q2 ve Q3 LC-MS/MS seviyeleri sırasıyla 162.83, 241.94 ve 381.51 ng/mg kreatinin olarak bulunmuştur.

İdrar netrin-1 proteinin ölçümünde kullanılan ELISA ve LC-MS/MS yöntemlerinin karşılaştırılması Şekil 4.8-C’de gösterilmiştir. İki metod arasındaki Spearman korelasyon katsayısı 0.359 olarak bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

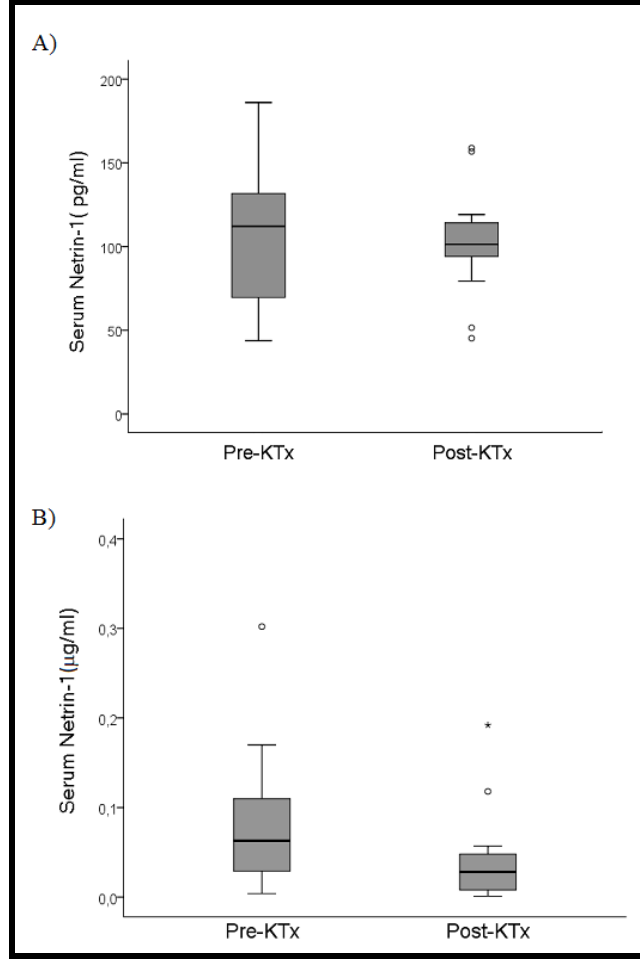
İdrar numunelerinde ölçülen insan netrin-1 proteini için LC-MS/MS validasyon parametreleri Tablo 4.6’da verilmiştir. Ölçüm tekrarlanabilirliği (intra-day ve inter-day CV) ve doğruluğu (accuracy) netrin-1 protein standartları için belirlenmiştir. Genel olarak, netrin-1 için LC-MS/MS metodu tekrarlanabilirlik göstermektedir.

Tablo 4.6 İnsan Netrin-1 proteini için validasyon parametreleri

Standart (μ g/ml)	Intra-day CV (n=3)	Inter-day CV (n=3)	Accuracy (n=3)
10	10.65 %	7.21 %	105.8%
50	9.58 %	13.22 %	103.7%

CV, varyasyon katsayısı. Intra-day CV parametresi için standartlar aynı gün içerisinde tekrarlı bir şekilde analiz edilmiştir. Inter-day CV parametresi için standartlar en az 2 günden fazla tekrarlı bir şekilde analiz edilmiştir.

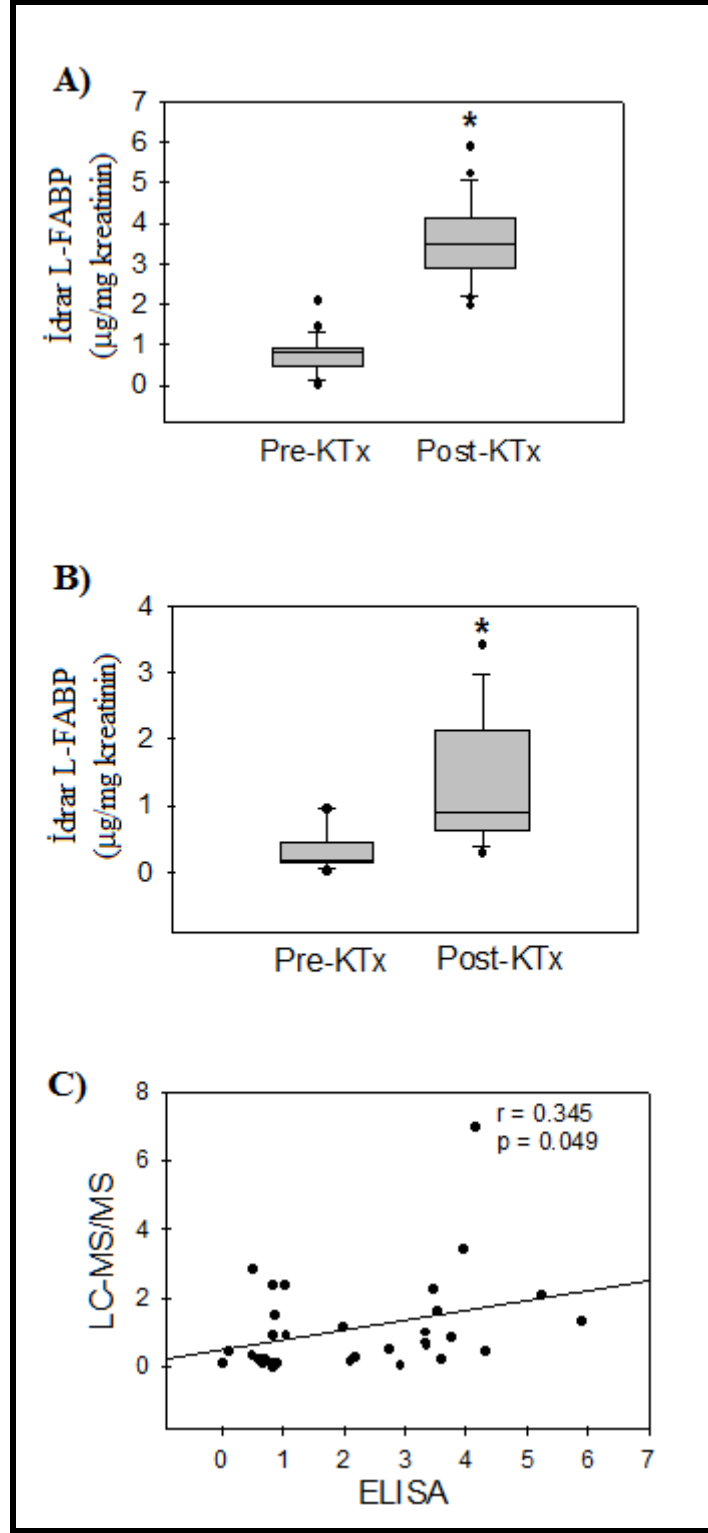
Transplantasyon öncesi ve sonrası ELISA ve LC-MS/MS metodları ölçülen serum netrin-1 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Serum Netrin-1 Değerleri A) ELISA sonuçları B) LC-MS/MS sonuçları

4.5. L-FABP ELISA ve LC-MS/MS Ölçüm Bulguları

İdrar L-FABP ölçümlerinin ELISA bulguları Şekil 4.10-A'da gösterilmiştir. Tüm veriler ortalama±SD olarak verilmiştir. Transplantasyon sonrası (post-KTx) düzeyler ($3.59 \pm 1.02 \mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinin) ile karşılaştırıldığında, transplantasyon öncesi (pre-KTx) L-FABP düzeyleri ($0.78 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinin) anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.001$). Pre-KTx ve post-KTx idrar numunelerdeki ELISA ölçümlerinin dağılımı *box plot* grafik verisi olarak gösterilmiştir. *Box plot* grafik üzerinde, sıfıra en yakın sınır %25'lik alt çeyrekliği (Q1), kutunun ortasındaki çizgi ortancayı (Q2) ve sıfır çizgisine en uzak sınır %75'lik üst çeyrekliği (Q3) gösterir. Alt ve üst sınırlar %10 ve 90'lık çeyrekleri veririler. Pre-KTx için Q1, Q2 ve Q3 ELISA seviyeleri sırasıyla 0.50, 0.81 ve 0.91 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinin olarak bulunmuştur. Post-KTx için Q1, Q2 ve Q3 ELISA seviyeleri sırasıyla 2.92, 3.50 ve 4.14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinin olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10. İnsan L-FABP'nin idrar örneklerinde analizi **A)** İdrar L-FABP transplantasyon öncesi (Pre-KTx) ve transplantasyon sonrası (Post-KTx) idrar örneklerinde ELISA ile ölçümü **B)** İdrar L-FABP'nin pre-KTx ve post-KTx idrar örneklerinde LC-MS/MS ile ölçümü. İstatistiksel analiz Wilcoxon Signed Rank Test ile yapılmıştır. *, $p=0.002$ **C)** İnsan L-FABP'nin ELISA ve LC-MS/MS ölçümlerinin (µg/mg kreatinin) karşılaştırılması. İki metod arasındaki Spearman korelasyon katsayısı 0.345 ve $p=0.049$

LC-MS/MS metodu ile ölçülen idrar L-FABP düzeyleri Şekil 4.10-B'de gösterilmiştir. Tüm veriler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. Post-KTx düzeyler ($1.32 \pm 1.05 \mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinin) ile karşılaştırıldığında, pre-KTx netrin-1 düzeyleri ($0.33 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinin) anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.002$). Pre-KTx ve post-KTx idrar numunelerdeki LC-MS/MS ölçümlerinin dağılımı *box plot* grafik verisi olarak gösterilmiştir. Pre-KTx için Q1,Q2 ve Q3 LC-MS/MS seviyeleri sırasıyla 0.14, 0.18 ve 0.44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinin olarak bulunmuştur. Post-KTx için Q1,Q2 ve Q3 LC-MS/MS seviyeleri sırasıyla 0.61, 0.89 ve 2.14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinin olarak bulunmuştur.

İdrar L-FABP ölçümünde kullanılan ELISA ve LC-MS/MS yöntemlerinin karşılaştırılması Şekil 4.10-C'de gösterilmiştir. İki metod arasındaki Spearman korelasyon katsayısı 0.345 olarak bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

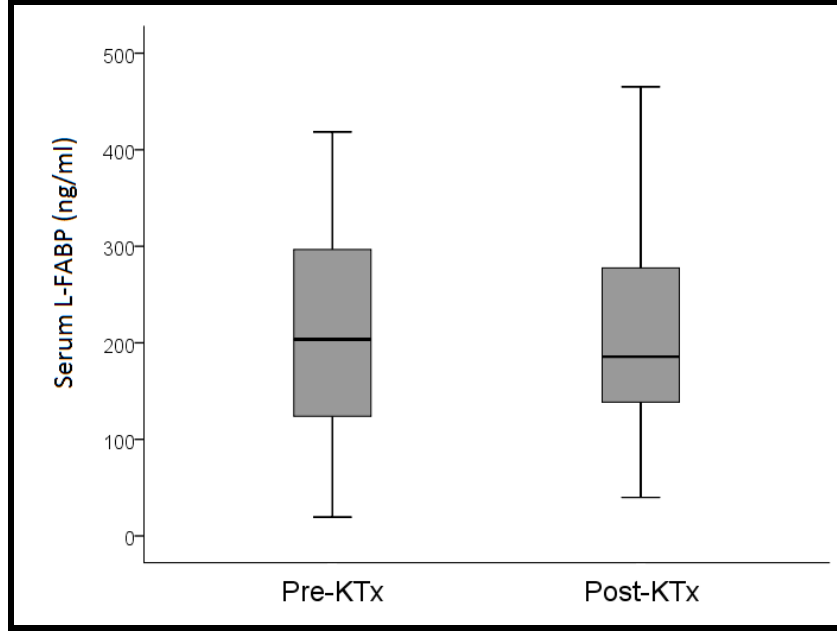
İdrar numunelerinde ölçülen insan L-FABP için LC-MS/MS validasyon parametreleri Tablo 4.7'de verilmiştir. Ölçüm tekrarlanabilirliği (intra-day ve inter-day CV) ve doğruluğu (accuracy) L-FABP standartları için belirlenmiştir. Genel olarak, L-FABP için LC-MS/MS metodu iyi derecede tekrarlanabilirlik göstermektedir.

Tablo 4.7 İnsan L-FABP için validasyon parametreleri

Standart ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Intra-day CV (n=3)	Inter-day CV (n=3)	Accuracy (n=3)
6.25	2.63 %	4.93 %	67%
12.5	1.28 %	2.59 %	73.5%
25	2.71 %	2.73 %	93.3%
50	0.77 %	0.95 %	103.8%

CV, varyasyon katsayısı. Intra-day CV parametresi için standartlar aynı gün içerisinde tekrarlı bir şekilde analiz edilmiştir. Inter-day CV parametresi için standartlar en az 2 günden fazla tekrarlı bir şekilde analiz edilmiştir.

Transplantasyon öncesi ve sonrası ELISA ile ölçülen serum L-FABP değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.11). LC-MS/MS çalışmasında L-FABP ölçümü yapılamamıştır.



Şekil 4.11. Serum L-FABP ELISA sonuçları

TARTIŞMA

Son dönem böbrek yetmezliği renal fonksiyonların geri dönüşümsüz olarak kaybı ile karakterize ve hastaların üreminin tehlikelerinden kaçınmak için diyaliz yada transplantasyon gibi renal replasman tedavilerine ihtiyaç duydukları klinik bir durumdur [71]. Böbrek yetmezliği, görülme sıklığı giderek artan klinik sorunlardan biridir. Tüm sistemleri etkilediğinden öncelikle koruyucu önlemlerin alınması, hastalık gelişince ilerlemesinin yavaşlatılması ve uygun şekilde tedavi edilmesi gereklidir. Zamanında yapılan uygun müdahaleler sayesinde hem böbrek yetmezliği ile mücadele daha etkin sağlanmış olur hem de gelişebilecek komplikasyonlar önlenir [25]. Diyaliz veya transplantasyon gibi renal replasman terapi uygulanması SDBY tanısının artması ile birlikte daha yaygın olmaya başlamıştır. Renal transplantasyon tercih edilen tedavi opsiyonu olması ile birlikte diyaliz ile karşılaştırıldığında hayat kalitesini arttıran bir yöntemdir [72]. Renal transplantasyon yaşam kalitesini düzeltmesi ve maliyeti azaltması nedeniyle en iyi tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bekleme listesindeki hasta sayısında ve mortalitede artış, diyalize başlanmadan hastalara renal transplantasyon yapılmasını gündeme getirmiştir. Preemptif renal transplantasyon, son dönem böbrek yetmezliği gelişmeden veya henüz gelişmişken, diyalize başlanmadan ilk renal replasman tedavisi olarak böbrek transplantasyonunun seçilmesidir. Bu yaklaşım hastalarda diyaliz nedeniyle gelişebilecek komplikasyonları ve tedavi maliyetlerini azaltabilir. [73]. Çalışmamızda transplantasyon öncesinde 9 hastaya hemodiyaliz, 1 hastaya da periton diyalizi uygulanmıştır. Geriye kalan 8 hastaya ise preemptif renal transplantasyon yapılmıştır. Preemptif renal transplantasyon diyalize bağlı gelişebilecek komorbiditeleri önleme açısından önemli bir alternatiftir.

Diabetes mellitus ve hipertansiyon gibi hastalıklar SDBY'nin önde gelen nedenleridir [74] ve kronik böbrek hasarının artışında en önemli risk faktörleridir [75]. Çalışmamızda hastaların yaklaşık %44'ünde primer hastalık etiyojisi bilinmezken, hipertansiyon %16 ile primer hastalıklarda ikinci sırada ve bunu takiben diyabet primer hastalık yönünden üçüncü sırada yer almaktadır.

Glomeruler filtrasyon hızı (GFR) renal fonksiyonun değerlendirilmesi için gereklidir. Optimum GFR belirteci yaş, ağırlık, kas kitlesinden bağımsız olmalı, tübüler sekresyon ve reabsorbsiyona uğramamalı ve sabit hızda endojen üretilmelidir. Cr-EDTA ve inülin gibi eksojen maddelerin renal klirensi GFR'nin değerlendirilmesi için altın standarttır. Ancak maliyet ve uygulanmasının zor olması nedeniyle bu maddelerin yerine kreatinin kullanılarak hesaplanan GFR ile renal fonksiyonun değerlendirilmesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Serum kreatinini tek

başına böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için kullanılmamalıdır. Glomeruler filtrasyon hızı hesaplamak için kullanılması tercih edilmelidir. Hesaplanmış GFR (estimated GFR = eGFR) gerçek GFR olmamakla birlikte eksojen bir madde ile ölçülmüş GFR (measured GFR = mGFR) ile yüksek korelasyon göstermektedir [15]. Çalışmamızda hastaların GFR değerini yansıtabilen serum kreatinini kullanılarak oluşturulmuş formül ile hesaplanmış CKD-EPI eGFR değerleri transplantasyon öncesinde 8.30 ± 1.77 ml/dk/1.73 m² olarak bulunmuştur. CKD 3 ay ya da daha uzun sürelerde GFR değerinin 60 ml/dk'dan daha düşük değerlerde izlenmesi ile tanımlanır [75].

Son yıllarda renal transplantasyon komplikasyonları için efektif izlem sıklıkla invazif prosedürlere bağlıdır. Klinik muhakeme ve serum laboratuvar değerleri yeni nakledilen böbreğin akut hasarı için uyarı niteliği taşısa da, kreatinin artışı post-transplant allograft hasarın etiolojisini ayırt etmez. Tanı için altın standart böbrek biyopsisidir. Çünkü yalnızca etkilenen böbrek dokusunun histolojik incelenmesi akut rejeksiyon, virüs enfeksiyonu veya tübüler nekroz gibi hasar tiplerinin ayrımının yapılmasını sağlayabilir. Ancak ihtiyaç olarak tekrarlanan doku biyopsisi hastalara ek olarak post-operatif risk yükler. Non-invazif olarak biyobelirteçlerin izlenmesi uzun yıllardır ilgi çeken bir konu olmuştur. Ameliyat sonrasında böbrek hasarı duyarlı ve spesifik biyobelirteçlerin tanımlanması, sadece tekrarlanan invaziv izleme riskini ortadan kaldırmaz; bunun yanında transplantasyon hastalarında post-operatif komplikasyonların hızlı ve doğru bir biçimde tanımlanması uzun dönem greft sağkalımı için en iyi şansın yakalanmasını sağlar. Buna ek olarak bu tarz yüksek verimli metodların kullanımı biyolojik sıvı numunelerinde nispeten dakikalar içinde potansiyel hastalık biyobelirteçlerinin hızlı bir şekilde ölçümüne izin verecektir. Yararlı klinik biyobelirteçlerin tanımlanması ve bu ölçümlerin geliştirilmesi ile çalışan araştırmacılar için zorluk, tanımlanan herhangi bir klinik belirteç için validasyon çalışmalarının var olmayışıdır [76]. Klinik tablo ile korele edilen –omics bulguları ya da biyobelirteç tanımlama girişimleri yapılırken hedefsiz yaklaşımlardan dolayı; kompleks hastalıklara klinik yaklaşımda uygulanabilecek güçlü çalışmaları geliştirmek oldukça zordur. Bunun yanı sıra, proteomiks ve metabolomiksin bir alanı olan süregelen biyobelirteç keşifleri, hastalık prosesinin daha iyi anlaşılabilmesine ışık tutabilecek olan ileriki çalışmalara rehberlik yapabilecek spesifik hasar oluşumları için potansiyel ve umut verici belirteçlerin tanımlanması ile sonuçlanmaktadır. Post-transplant hastalarda akut rejeksiyon ve böbrek hasarı için potansiyel biyobelirteç araştıran çoğu çalışmacı, hasarda yükselen belirteçleri tanımlamak için non-invaziv örneklerde araştırmalar yapmaktadır [76].

Bu çalışmadaki amacımız; daha önce yapılan çalışmalar sonucunda böbrek hasarında potansiyel biyobelirteç olabileceği düşünülen L-FABP ve Netrin-1 proteinlerinin ölçümünde, renal transplantasyon hastalarından toplanan kan ve idrar örnekleri kullanılarak proteomik temelli yöntemler ile yeni ve hassas metodların geliştirilmesidir. Araştırma projesi tasarlanma sürecinde, yapılan literatür taramalarında, bu proteinlerin renal transplantasyonda tanımlanmış herhangi bir proteomik verisine rastlanmamıştır. Bu düşünceden yola çıkılarak her iki protein için yeni ve hassas bir proteomik ölçüm metodu geliştirilmesine karar verilmiştir.

Bu çalışmada, insan idrar örneklerinden L-FABP ve netrin-1 proteini ölçümü için geliştirilen LC-MS/MS metodu ve elde edilen sonuçlar, ELISA ile elde edilen ölçüm sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Her iki metod klinik bir çalışmanın ölçümlerini yapabilmek için geliştirilmiştir. Bununla beraber tekrarlanabilirlikleri ve doğrulukları belirlenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma insan numunelerinde LC-MS/MS cihazı kullanılarak L-FABP ve netrin-1 konsantrasyonlarının ölçüldüğü ilk çalışmadır. Bu çalışmada, klinik kısıtlamalar ve örnek konsantrasyonu ile sınırlı numune hacimleri dikkate alınarak iyi derecede tekrarlanabilirlik sağlayan kütle spektrometri yaklaşımı optimize edilmiştir.

Çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu ile protein miktar analizi, enzimatik kesim sonrası salınan bir ya da daha fazla proteotipik peptidin iyon geçişlerinin izlenmesi esasına dayanır. Metod geliştirmedeki ilk adım iyon çiftlerinin seçimidir. Proteotipik peptidler açık bir şekilde belirli bir proteini temsil peptidler olarak tanımlanmaktadır. Hassas bir miktar ölçümünde kullanılabilmesi için seçilen peptidlerin hedef proteine spesifik olması gerekmektedir. Buna ilaveten, kantitasyon için kullanılan MRM geçişleri mümkün olduğunca yoğun olmalı ve izlenen MRM matriks kaynaklı diğer maddeler ile interferans göstermemelidir. Çoğu zaman unutulmuş bir kriter de peptid sekansındaki aminoasitlerin yapısıdır. Peptidler ilk aminoasit olarak sistein (C), metiyonin (M) veya glutamin (Q) içermemelidir. Çünkü bu aminoasitler kısmi kimyasal modifikasyona duyarlıdır [77]. LC-MS/MS sisteminde kantitatif MRM analizleri için seçilen L-FABP 50–57 rezidüsünün (⁵⁰FTITAGSK⁵⁷ ana iyon, m/z 824) fragment iyonunun y_3 (m/z 291) iyonu olduğu gösterilmiştir. Buna göre L-FABP için MRM analizlerinde 824 --> 291 iyon çiftinin LC-MS/MS şartları altında en yüksek intensiteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple, MRM transisyonu için muhtemel en hassas iyon çiftidir. Netrin-1 proteinine ait triptik peptidlerde ²⁷⁰DSYFYAVSDLQVGGR²⁸⁴ peptidi ana iyon olarak analiz edilmiştir. Bu peptide ait ana iyon m/z : 839.2 ve fragment iyonlar m/z : 831.4, 930.4 ve 1164.5 değerleri MRM transisyonu olarak belirlenmiştir.

Akut böbrek hasarında belirteç olarak kullanışlı olduğu bilinmesine rağmen, üriner L-FABP ELISA yöntemi ile ölçülebilmektedir. ELISA örneklerin tek tek ölçümleri zor olduğu için dezavantajları olan, külfetli ve sonuçların elde edilmesi için birkaç gün gecikme yaşanabilen bir yöntemdir. Bu yüzden L-FABP AKI için yararlı bir belirteç olmasına rağmen, sonuçlar çıkana kadar gecikme zamanı önemli bir konudur. Acil ve yoğun bakım hastaları için, önemli olan konu, test sonuçları hemen elde edilebilecek belirteçlerin bulunmasıdır [78].

Önceki bir çalışmanın verilerine göre, 412 sağlıklı insandan toplanan idrar örneklerinde ölçülen L-FABP konsantrasyonları, bireylerde 0.3-8.4 µg/g kreatinin aralığında değişen değerlere göre ortalama 1.6 µg/g kreatinin olarak belirlenmiştir [79]. Renal alıcılardan seçilen hasta populasyonundan alınan idrar örneklerinde saptanabilir L-FABP konsantrasyonlarını belirlemeyi hedefledik ve L-FABP için 6.25-50 µg/ml konsantrasyon aralığında linear standart eğri kullandık.

Önceki çalışmalara benzer bir şekilde [56, 80], hem ELISA hem de LC-MS/MS metodunda hasta değişkenliği ile ilişkili olarak idrar L-FABP için geniş bir

ölçüm aralığı belirledik. Akut böbrek hasarı hastalarında ELISA ile ölçülen idrar L-FABP düzeylerinin ortanca değeri 0.24 µg/mg kreatinin olarak rapor edilmiştir [56]. Bu çalışmada, son dönem böbrek hastalığı hastalarında ELISA ve LC-MS/MS metodları ile ölçülen L-FABP seviyelerinin ortanca değeri sırası ile 0.81 ve 0.18 µg/mg kreatinin olarak bulunmuştur (Şekil 4.10-A ve B). Her iki yöntem ile ölçülen idrar L-FABP konsantrasyonları arasında anlamlı bir pozitif korelasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.10-C).

Bu çalışmada L-FABP kantitasyonu için kullanılan ELISA metodu insan idrar örneklerinde ölçüm için valide edilmiştir. ELISA metodu için gün içi ve günler arası CV değerleri sırası ile <% 12 ve <%10 olarak belirlenmiştir. Yaptığımız bu çalışmada, L-FABP LC-MS/MS analizleri için gün içi ve günler arası CV değerlerini belirlenmiştir ve her ikisi için bu değer %5'den düşük olduğunu bulunmuştur (tablo 4.7). Her iki yöntem birbiri ile korele olmasına rağmen; ELISA ölçümlerinde elde edilen idrar L-FABP değerlerinin LC-MS/MS yöntemine göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Buna ilaveten her iki metoda da transplantasyon öncesinde ve sonrasında ölçülen L-FABP konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.

L-FABP azalmış peritübüler kılcal kan akışının neden olduğu hipoksiye cevap olarak idrarla atılır [41]. L-FABP geni iskemi-reperfüzyon hasarı sebebiyle oluşan hipoksik strese yanıt verir [81] ve sentezlenen L-FABP zararlı lipid peroksidlerine bağlanarak bunların idrardan atılımını sağlar [41]. Bu nedenle, L-FABP'nin idrara atılımı tübüler hasarın şiddeti ile ilişkili olarak proksimal tübüler epitel hücrelerindeki stresi yansıtır [82, 83].

Bir çalışmada transplantasyon öncesinde ve transplantasyon sonrası 4, 10, 24 ve 48. saatlerde seri L-FABP ölçümleri yapılmıştır [84]. Bu çalışmaya göre, idrar L-FABP düzeyleri transplantasyon sonrası 4. saatte yaklaşık 4 kat artmıştır ve operasyonu takiben 48. saate transplantasyon öncesi seviyelerinin altına düşmüştür. Bu çalışmada, idrar L-FABP konsantrasyonlarında benzer bir şekilde transplantasyon öncesi ile karşılaştırıldığında, transplantasyon sonrası 6. saatte anlamlı artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).

Yapılan başka bir çalışmada, renal transplantasyon sonrası 0. Saat, 2. ve 6. günlerde L-FABP düzeyleri ölçülmüştür. Bu çalışmada, 0. Saatte yüksek idrar L-FABP düzeyleri önemli bir risk faktörü olduğu ve uzun dönemde zayıf greft fonksiyonun göstergesi olduğu belirlenmiştir [85]. L-FABP için idrar örneğinde en uygun zaman transplantasyon sonrası 48. Saat olduğu rapor edilmiştir. Çünkü 48. saatte gecikmiş greft fonksiyon (DGF) ve yavaş greft fonksiyon (SGF) için en belirleyici değerler (%83) elde edilmiştir [84]. Tüm bu sonuçlara bakıldığında, idrar L-FABP düzeyleri de AKI için yararlı bir biyobelirteçtir ve idrar L-FABP kantitasyonu önemlidir. Çünkü renal transplantasyon sonrası L-FABP salınımindaki artış DGF ve SGF'nin yüksek olasılığını tahminde kullanılabilir.

Sağlıklı insanlardan toplanan idrar örneklerinde netrin-1 konsantrasyonunun ortalama 0.057 ± 0.022 ng/mg kreatinin olduğu rapor edilmiştir [40]. AKI

hastalarında netrin-1 atılımının yaklaşık 1000 kat arttığı bilindiği için [39], bu çalışmada renal alıcılardan seçilmiş hasta grubunun idrar örneklerinde saptanabilecek netrin-1 konsantrasyonlarının ölçülmesi hedeflenmiştir.

Daha önceki çalışmalara benzer bir şekilde [40, 86], hem ELISA hem de LC-MS/MS metodunda hasta değişkenliği ile ilişkili olarak idrar Netrin-1 için geniş bir ölçüm aralığı gözlemlenmiştir. Operasyon sonrası renal transplant alıcılarında (n=17) ELISA ile ölçülen idrar netrin-1 düzeyleri (ortalama \pm SEM) 1.98 ± 0.43 ng/mg kreatinin olarak rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda, renal transplant alıcılarında operasyon sonrası ELISA ve LC-MS/MS metodları ile ölçülen idrar netrin-1 konsantrasyonları sırası ile 0.65 ± 0.22 ve 354.81 ± 433.40 ng/mg kreatinin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8-A ve B).

Farklı iki metod ile ölçülen idrar netrin-1 konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.8-C). Bu çalışmada netrin-1 kantitasyonu için kullanılan ELISA metodu insan idrar örneklerinde ölçüm için valide edilmiştir. ELISA metodu için gün içi ve günler arası CV değerleri sırası ile $<12\%$ ve $<10\%$ olarak belirlenmiştir. Yaptığımız bu çalışmada, netrin-1 LC-MS/MS analizleri için gün içi ve günler arası CV değerlerini sırası ile $<13\%$ ve $\leq 11\%$ olarak bulduk (tablo 4.6). İki yöntemin sonuçları korele olmasına rağmen, LC-MS/MS ölçümlerinde idrar netrin-1 düzeyleri ELISA yöntemine göre daha yüksek seviyelerde bulunmuştur. LC-MS/MS metodunda transplantasyon öncesi ve sonrası idrar netrin-1 konsantrasyonları anlamlı bir farklılık göstermektedir. Ancak bu fark ELISA metodu ile yapılan ölçümde bulunamamıştır. Bu tutarsızlık netrin-1 ELISA yöntemiyle transplantasyon öncesi idrarlarında belirlenen büyük değişkenliğin bir sonucu olabilir.

Netrin-1'in böbrek patofizyolojisindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Yapılan önceki çalışmalarda, netrin-1'in hayvanlarda iskemik hasar sonrası proksimal tübüllerde ve insanlarda böbrek transplantasyonu sonrasında proksimal tübüler epitel hücrelerinde ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir [39]. Bundan başka, netrin-1'in tübüler epitel hücrelerinde fazla ekspresyonu olduğunda, iskemi-reperfüzyon indüklü apoptozisin baskılandığı gözlemlenmiştir [87]. Hayvan çalışmaları, lipopolisakkarit enjeksiyonundan, folik asit uygulaması ve sisplatin uygulamasından sonra 1-3 saat sonra netrin-1 seviyelerinin anlamlı olarak arttığını göstermiştir [39]. AKI hayvan modelindeki bu gözlemler netrin-1'in potansiyel tübüler hasar biyobelirteci olabileceğini göstermektedir.

Serum kreatinin ve kan üre azotu ölçümü, kreatinin klirensinin hesaplanması, idrar sedimentinin mikroskopik incelenmesi ve radyolojik çalışmalar ile insanlarda renal hastalıkların belirlenmesi hassas ve spesifik değildir. Ayrıca, bu parametreler hastalığın erken zamanda teşhisine izin vermez [88]. İnsanlarda AKI'nın tahmini için idrar netrin-1 ölçümünün yararı kardiyopulmoner baypas (CPB) geçiren hastalarda çalışılmıştır [86]. Yapılan bu çalışmada AKI, CPB sonrası serum kreatininindeki 50% ya da daha fazla düşüş ile tanımlanmıştır [86]. Serum kreatininini kullanarak, AKI ortalama CPB sonrası 48. saatte tespit edilebilmiştir. Aksine, idrar netrin-1 CPB sonrası 2. saatte artmıştır, 6. saatte pik yapmıştır ve 48. saate kadar yüksek

değerlerde kalmıştır. 6. Saatte idrar netrin-1 ölçümü AKI için güçlü ve bağımsız bir göstergedir. AKI'nın şiddeti, süresi ve bunun yanı sıra hastanede yatış zamanı ile güçlü bir korelasyon gösterir. Aynı şekilde yüksek netrin-1 seviyeleri operasyon sonrası renal transplant alıcılarında da raporlanmıştır ve greft fonksiyonun iyileşmesi ile netrin-1 seviyelerinin azaldığı görülmüştür [40].

Sonuç olarak; idrar netrin-1 seviyeleri AKI için yararlı bir biyobelirteç olabilir [86] ve idrar netrin-1 kantitasyonu önemlidir. Çünkü renal transplantasyonu takiben netrin-1 atılımındaki azalma greft fonksiyonun iyileştiğinin göstergesidir [40]. Benzer şekilde, idrar L-FABP düzeyleri de AKI için yararlı bir biyobelirteçtir [53] ve idrar L-FABP kantitasyonu önemlidir. Çünkü renal transplantasyon sonrası L-FABP salınımındaki artış DGF ve SGF'nin yüksek olasılığını tahminde kullanılabilir [84, 85]. Bu nedenle, idrar L-FABP ve netrin-1 ölçümlerini standardize etme çabası önceliklidir. Bizim çalışmamız, LC-MS/MS metodunun triptik kesim sonrası idrar L-FABP ve netrin-1 seviyelerini ölçmede referans bir yöntem olarak uygun bir seçenek olabileceğini göstermiştir. Greft yetmezliği ve başlıca postoperatif durumlar ile bizim sonuçlarımızı ilişkilendirebilmek için daha fazla sayıda hasta ile yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz:

1. L-FABP için MALDI TOF MS/MS cihazında en iyi sinyal cevabını ve tekrarlanabilirliği sağlayan peptid ⁵⁰FTITAGSK⁵⁷ (m/z : 824) ana peptitidir. Bu peptid için fragmentasyon işlemi yapıldığı zaman GSK y3 (m/z : 291) fragment iyonu elde edilmiştir.
2. L-FABP için LC-MS/MS cihazında yapılan optimizasyon deneylerinde kullanılan ana iyon m/z 824 olarak belirlenmiştir. L-FABP proteininin çıkış zamanı 2. dakika olarak belirlenmiştir. LC-MS/MS cihazında L-FABP kantitasyonu için iyon çifti m/z 824 → 291 olarak kullanılmıştır.
3. MALDI TOF-MS/MS cihazında netrin-1 proteinine ait ²⁷⁰DSYFYAVSDLQVGGR²⁸⁴ peptidi için fragmentasyon işlemi yapıldığı zaman SDLQVGGR y8 (m/z 831), VSDLQVGGR y9 (m/z 930) ve YAVSDLQVGGR y11 (m/z 1164) fragment iyonları elde edilmiştir.
4. Netrin-1 proteini için LC-MS/MS cihazında yapılan optimizasyon deneylerinde kullanılan ana iyonlar m/z 839 olarak belirlenmiştir. Netrin-1 proteininin çıkış zamanı 6.5. dakika olarak belirlenmiştir. Netrin-1 proteininin iyon çiftleri m/z 839 → 1164, 930, 831 olarak bulunmuştur.
5. Bulunan bu iyon çiftleri literatürde ilk kez tanımlanacaktır. Optimize edilen metodlar referans metod olarak kullanılabilir.
6. Transplantasyon öncesi ve sonrası serum netrin-1 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir.
7. LC-MS/MS metodu ile ölçülen idrar netrin-1 değerleri transplantasyon öncesi ile karşılaştırıldığında transplantasyon sonrasında anlamlı olarak artmıştır (*= p <0.05). ELISA metodu ile ölçülen netrin-1 değerlerinde de ameliyat sonrası artış gözlemlenmiştir ancak istatistiksel anlam görülememiştir.
8. İdrar netrin-1 proteininin ölçümünde kullanılan ELISA ve LC-MS/MS yöntemlerinin karşılaştırılması sonucu İki metod arasındaki Spearman korelasyon katsayısı 0.359 olarak bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır (p < 0.05).
9. Çalışmamızda transplantasyon öncesi ve sonrası serum L-FABP sonuçlarda istatistiksel anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

- 10.** ELISA ve LC-MS/MS ile ölçülen idrar L-FABP değerleri transplantasyon öncesi ile karşılaştırıldığında ameliyat sonrasında anlamlı olarak artmıştır (*= $p<0.05$). L-FABP'nin renal transplantasyon sonrası arttığı saptanmıştır.
- 11.** İdrar L-FABP ölçümünde kullanılan ELISA ve LC-MS/MS yöntemlerinin karşılaştırılması sonucu, iki metod arasındaki Spearman korelasyon katsayısı 0.345 olarak bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p< 0.05$).
- 12.** Her iki protein için yapılan ölçümlerine bakılacak olduğunda; böbrek hastalıklarında potansiyel biyobelirteç olabilecek bu iki protein için serum ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç vermemiştir. Böbrek hastalıkları için idrar ölçümlerinin daha anlamlı olabileceği düşünülmektedir.
- 13.** Bu çalışmada; insan serum ve idrar L-FABP ve Netrin-1 proteolizisi ve devamında LC-MS/MS cihazında ölçüm yönteminin kullanılabilir olacağını gösterdik. Her iki protein için LC-MS/MS cihazında geliştirilen MRM ölçüm metodu için iyonizasyonu en iyi şekilde yapılan iyon çiftleri seçilmiştir. Bu çalışma sonucu oluşturulan MRM metodları farklı tipte birçok hastalık için çeşitli biyolojik örneklerde ölçüm yapmak için kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Garcia GG, Harden P;Chapman J, The global role of kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 2012. 17(4): p. 362-7.
2. Keller AK, Jorgensen TM;Jespersen B, Identification of risk factors for vascular thrombosis may reduce early renal graft loss: a review of recent literature. *J Transplant*, 2012. 2012: p. 793461.
3. Braun H, Schmidt BMW, Raiss M, Baisantry A, Mircea-Constantin D, Wang SJ, Gross ML, Serrano M, Schmitt R;Melk A, Cellular Senescence Limits Regenerative Capacity and Allograft Survival. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2012. 23(9): p. 1467-1473.
4. Hall IE, Doshi MD, Reese PP, Marcus RJ, Thiessen-Philbrook H;Parikh CR, Association between Peritransplant Kidney Injury Biomarkers and 1-Year Allograft Outcomes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2012. 7(8): p. 1224-1233.
5. Ting YT, Coates PT, Walker RJ;McLellan AD, Urinary tubular biomarkers as potential early predictors of renal allograft rejection. *Nephrology*, 2012. 17(1): p. 11-16.
6. Konvalinka A, Scholey JW;Diamandis EP, Searching for New Biomarkers of Renal Diseases through Proteomics. *Clinical Chemistry*, 2012. 58(2): p. 353-365.
7. Basnakian AG, Netrin-1: a potential universal biomarker for acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. 294(4): p. F729-30.
8. Devarajan P, The use of targeted biomarkers for chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2010. 17(6): p. 469-79.
9. Atilla G, Renal Fonksiyon. 5 ed. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, ed. A.E. Burtis CA. p. 698-722. 2005: Palme Yayıncılık.
10. Erek E, Nefroloji. 5 ed. p. 31-65. 2005: Nobel Tıp Kitapevleri.

11. Sungur C; Akpolat T, Böbreklerin Temel Fonksiyonları ve Düzenlenmesi. 3 ed. Nefroloji El Kitabı, ed. U.C. Akpolat T, Süleymanlar G;. p. 1-16. 2000: Nobel Tıp Kitabevleri.
12. İşlekel H, Böbrek fonksiyonları ve bozuklukları. İnsan Biyokimyası. p. 37-42. 2002: Palme Yayıncılık.
13. Erek E.; Süleymanlar G., Böbreğin Yapısı ve fonksiyonları. 2 ed. İç Hastalıkları, ed. İliçin G; Biberoglu K; Süleymanlar G; Ünal S. Vol. 1. p. 1213-1251. 2003: Güneş Kitabevi.
14. Açıkgöz HE; Tüysüz Ö; Sarandöl E; Dirican M, Glomerüler Filtrasyon Hızı Tahmininde MDRD Formülünün Kreatinin Klirensi İle Karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Derg 2013. 11(1): p. 21-29.
15. Öztürk G; Sırmalı R; Giniş Z; Yalçındağ A; Delibaş N, Tip 2 Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Üç Farklı Formülle Hesaplanan Glomeruler Filtrasyon Hızının Karşılaştırılması. Bozok Tıp Derg 2011. 3: p. 1-6.
16. Cockcroft D W; Gault MH, Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron, 1976. 16(1): p. 31-41.
17. Chen YW, Chen HH, Wang TE, Chang CW, Chang CW;Wu CJ, Difference between CKD-EPI and MDRD equations in calculating glomerular filtration rate in patients with cirrhosis. World J Gastroenterol, 2011. 17(40): p. 4532-8.
18. Demir M; Aslan O; Atay A; Koseoglu MH; Barıs N; Cuhadar S, GFH Hesaplamasında Kullanılan MDRD Denklemine extended-MDRD ile Karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Derg., 2010. 8(3): p. 11-116.
19. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease; Kidney International Supplements 2013; 3 (1)
20. Dilek K, Akut Böbrek Yetmezliği,. 3. ed. Nefroloji El Kitabı, ed. Akpolat T; Utaş C; Süleymanlar G. p. 249-266. 2000,: Nobel Tıp Kitabevleri.
21. Yalçın AU; Akpolat T, Kronik Böbrek Yetmezliği,. Nefroloji El Kitabı,, ed. Akpolat T; Utaş C; Süleymanlar G. p. 272-305. 2000: Nobel Tıp Kitabevleri,.
22. Burden R; Tomson C; çeviri: Azak A; Aylı D, Kronik Böbrek Hastalığının Taranması ve Erken Müdahalesi. ABC Sersi Böbrek Hastalıkları, ed. Goldsmith D; Jayawardene S; Ackland P. p. 7-10. 2009: Atlas Kitapçılık.

23. Summary of Recommendation Statements. *Kidney Int Suppl* (2011), 2013. 3(1): p. 5-14.
24. Spiegel DM; Chonchol M; çeviri: Atasoyu EM, ed. *Kronik Böbrek Yetmezlikli Hasta*,. 7 ed. *Nefroloji El Kitabı*, ed. Schrier RW; çeviri ed. Suleymanlar G; Koçak H. 2013, Güneş Tıp Kitabevleri,. 185-193.
25. Taş FS; Cengiz K; Erdem E; Karataş A; Kaya C, *Akut ve Kronik Böbrek Yetmezliğinde Mortalite Nedenleri*. *Fırat Tıp Dergisi*, 2011. 16(3): p. 120-124.
26. T.C. Sağlık Bakanlığı Ve Türk Nefroloji Derneği Ortak Raporu; Türkiye 2013 Yılı Ulusal Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Kayıt Sistemi Raporu; *Türk Nefroloji Derneği Yayınları*; 2014; p7;
27. Erek E, Suleymanlar G;Serdengecti K, *Nephrology, dialysis and transplantation in Turkey*. *Nephrol Dial Transplant*, 2002. 17(12): p. 2087-93.
28. Akpolat T; Utaş C, *Renal Replasman Tedavisi*. *Nefroloji El Kitabı*, ed. Akpolat T; Utaş C; Süleymanlar G. p. 306-338. 2000: Nobel Tıp Kitabevleri.
29. Arık N; Sungur C; Ersoy F; Süleymanlar G, *Son Dönem Böbrek Yetmezliği Tedavisi*. 2 ed. *İç Hastalıkları*, ed. İliçin G; Biberoglu K; Süleymanlar G; Ünal S. Vol. 1. p. 2003: Güneş Kitabevi.
30. Ecdar T, *Renal Transplantasyon*. *Nefroloji El Kitabı*, ed. Akpolat T; Utaş C; Süleymanlar G. p. 328-338. 2000: Nobel Tıp Kitabevleri.
31. Braun WE, *Renal transplantation: basic concepts and evolution of therapy*. *J Clin Apher*, 2003. 18(3): p. 141-52.
32. Jani A, *Biomarkers in Kidney Transplantation*, in *Biomarkers in Kidney Disease*, 2011, Elsevier. p. 233-290.
33. Parikh CR;Devarajan P, *New biomarkers of acute kidney injury*. *Crit Care Med*, 2008. 36(4 Suppl): p. S159-65.
34. Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS;Molmenti EP, *Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis*. *Annals of Surgery*, 2003. 237(5): p. 660-664.
35. Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, Nicolle L, Karpinski M, Jeffry J;Nickerson P, *Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004. 15(1): p. 219-227.

36. O'Riordan E, Orlova TN, Mei JF, Butt K, Chander PM, Rahman S, Mya M, Hu R, Momin J, Eng EW, Hampel DJ, Hartman B, Kretzler M, Delaney V;Goligorsky MS, Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004. 15(12): p. 3240-3248.
37. Barallobre MJ, Pascual M, Del Rio JA;Soriano E, The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Research Reviews*, 2005. 49(1): p. 22-47.
38. Ranganathan P, Mohamed R, Jayakumar C;Ramesh G, Guidance Cue Netrin-1 and the Regulation of Inflammation in Acute and Chronic Kidney Disease. *Mediators of Inflammation*, 2014.
39. Reeves WB, Kwon O;Ramesh G, Netrin-1 and kidney injury. II. Netrin-1 is an early biomarker of acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. 294(4): p. F731-8.
40. Ramesh G, Kwon O;Ahn K, Netrin-1: a novel universal biomarker of human kidney injury. *Transplant Proc*, 2010. 42(5): p. 1519-22.
41. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Goto M, Shinozaki N, Ohshima S;Sugaya T, Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007. 18(11): p. 2894-902.
42. Chmurzynska A, The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet*, 2006. 47(1): p. 39-48.
43. Smathers RL;Petersen DR, The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics*, 2011. 5(3): p. 170-91.
44. Sharma A;Yogavel M, Utility of anion and cation combinations for phasing of protein structures. *J Struct Funct Genomics*, 2012. 13(3): p. 135-43.
45. Xu Y, Xie Y, Shao X, Ni Z;Mou S, L-FABP: A novel biomarker of kidney disease. *Clin Chim Acta*, 2015. 445: p. 85-90.
46. Petrescu AD, McIntosh AL, Storey SM, Huang H, Martin GG, Landrock D, Kier AB;Schroeder F, High glucose potentiates L-FABP mediated fibrate induction of PPARalpha in mouse hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1831(8): p. 1412-25.

47. Ek-Von Mentzer BA, Zhang F;Hamilton JA, Binding of 13-HODE and 15-HETE to phospholipid bilayers, albumin, and intracellular fatty acid binding proteins. implications for transmembrane and intracellular transport and for protection from lipid peroxidation. *J Biol Chem*, 2001. 276(19): p. 15575-80.
48. Ferguson MA, Vaidya VS;Bonventre JV, Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology*, 2008. 245(3): p. 182-93.
49. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Yamanouchi M, Hirata Y, Ishimitsu T, Numabe A, Takagi M, Hayakawa H, Tabei F, Sugimoto T, Mise N, Omata M;Kimura K, Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2006. 284(1-2): p. 175-182.
50. Nakamura T, Sugaya T, Ebihara I;Koide H, Urinary liver-type fatty acid-binding protein: Discrimination between IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. *American Journal of Nephrology*, 2005. 25(5): p. 447-450.
51. Nakamura T, Sugaya T, Node K, Ueda Y;Koide H, Urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein in contrast medium-induced nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 2006. 47(3): p. 439-44.
52. Ferguson MA, Vaidya, V., Waikar, S.S., Collings, F.B., Sunderland, K., Gioules, C., Bonventre, J.V., Liver-type fatty acid binding protein (L-FABP): a novel urinary biomarker of acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007. 18: p. 41A–42A.
53. Iguchi N, Uchiyama A, Ueta K, Sawa Y;Fujino Y, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and liver-type fatty acid-binding protein as biomarkers for acute kidney injury after organ transplantation. *J Anesth*, 2015. 29(2): p. 249-55.
54. Yalavarthy R, Edelstein CL;Teitelbaum I, Acute renal failure and chronic kidney disease following liver transplantation. *Hemodial Int*, 2007. 11 Suppl 3: p. S7-12.
55. Portilla D, Dent C, Sugaya T, Nagothu KK, Kundi I, Moore P, Noiri E;Devarajan P, Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int*, 2008. 73(4): p. 465-72.
56. Ferguson MA, Vaidya VS, Waikar SS, Collings FB, Sunderland KE, Gioules CJ;Bonventre JV, Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int*, 2010. 77(8): p. 708-14.

57. Kawai A, Kusaka M, Kitagawa F, Ishii J, Fukami N, Maruyama T, Sasaki H, Shiroki R, Kurahashi H;Hoshinaga K, Serum liver-type fatty acid-binding protein predicts recovery of graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. *Clin Transplant*, 2014. 28(6): p. 749-54.
58. Ishimitsu T, Ohta S, Saito M, Teranishi M, Inada H, Yoshii M, Minami J, Ono H, Hikawa A, Shibata N, Sugaya T, Kamijo A, Kimura K, Ohru M;Matsuoka H, Urinary excretion of liver fatty acid-binding protein in health-check participants. *Clin Exp Nephrol*, 2005. 9(1): p. 34-9.
59. Tambor V, Fucikova A, Lenco J, Kacerovsky M, Rehacek V, Stulik J;Pudil R, Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol Res*, 2010. 59(4): p. 471-97.
60. Demiralp D; Igci N; Peker S; Ayhan B, Temel Proteomik Stratejiler. p. 2014: Ankara Üniversitesi Yayinevi.
61. Muller GA, Muller CA;Dihazi H, Clinical proteomics--on the long way from bench to bedside? *Nephrol Dial Transplant*, 2007. 22(5): p. 1297-300.
62. Aebersold R;Mann M, Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003. 422(6928): p. 198-207.
63. Mano N;Goto J, Biomedical and biological mass spectrometry. *Anal Sci*, 2003. 19(1): p. 3-14.
64. Scherl A, Clinical protein mass spectrometry. *Methods*, 2015.
65. Canas B, Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Camafeita E;Calvo E, Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2006. 4(4): p. 295-320.
66. Niwa T, Biomarker discovery for kidney diseases by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008. 870(2): p. 148-53.
67. Liao H, Wu J, Kuhn E, Chin W, Chang B, Jones MD, O'Neil S, Clauser KR, Karl J, Hasler F, Roubenoff R, Zolg W;Guild BC, Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(12): p. 3792-803.
68. Duncan MW, Roder H;Hunsucker SW, Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2008. 7(5): p. 355-70.

69. Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, Ng KF, Suen MW; Tai HL, Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev*, 2003. 24(1): p. 3-12.
70. Pitt JJ, Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 2009. 30(1): p. 19-34.
71. Sayin A, Mutluay R; Sindel S, Quality of life in hemodialysis, peritoneal dialysis, and transplantation patients. *Transplant Proc*, 2007. 39(10): p. 3047-53.
72. Junaid Nazar CM, Kindratt TB, Ahmad SM, Ahmed M; Anderson J, Barriers to the successful practice of chronic kidney diseases at the primary health care level; a systematic review. *J Renal Inj Prev*, 2014. 3(3): p. 61-7.
73. Ersoy A; İlkaya S KG, Erek M, Senol E, Vuruskan H, Preemptif ve non-Preemptif Renal Transplant Alıcılarının Sonuçlarının Karşılaştırılması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2006. 32(3): p. 83-86.
74. Sezer S, Celik HT, Sahingoz S, Güngör O, Yıldırım kaya MM; Turhan S, Farklı cihazlarda ölçülen serum kreatinin değerlerinin formüle dayalı glomerüler filtrasyon hesapları üzerine etkisi. *Turk J Biochem*, 2012. 37 (4): p. 471-477.
75. Kopyt N, Management and treatment of chronic kidney disease. *Nurse Pract*, 2007. 32(11): p. 14-23.
76. Kim SC, Page EK; Knechtle SJ, Urine proteomics in kidney transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 2014. 28(1): p. 15-20.
77. Simon R, Lemoine J, Fonbonne C, Jaffuel A, Leonard JF, Gautier JC, Pasquier O; Salvador A, Absolute quantification of podocin, a potential biomarker of glomerular injury in human urine, by liquid chromatography-multiple reaction monitoring cubed mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2014. 94: p. 84-91.
78. Sato R, Suzuki Y, Takahashi G, Kojika M, Inoue Y; Endo S, A newly developed kit for the measurement of urinary liver-type fatty acid-binding protein as a biomarker for acute kidney injury in patients with critical care. *J Infect Chemother*, 2015. 21(3): p. 165-9.
79. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Yasuda T, Kawata T, Ota A, Tatsunami S, Kaise R, Ishimitsu T, Tanaka Y; Kimura K, Clinical significance of urinary

liver-type fatty acid-binding protein in diabetic nephropathy of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 2011. 34(3): p. 691-6.

80. Kamijo A, Kimura K, Sugaya T, Yamanouchi M, Hikawa A, Hirano N, Hirata Y, Goto A;Omata M, Urinary fatty acid-binding protein as a new clinical marker of the progression of chronic renal disease. *J Lab Clin Med*, 2004. 143(1): p. 23-30.
81. Susantitaphong P, Siribamrungwong M, Doi K, Noiri E, Terrin N;Jaber BL, Performance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in acute kidney injury: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis*, 2013. 61(3): p. 430-9.
82. Doi K, Noiri E, Maeda-Mamiya R, Ishii T, Negishi K, Hamasaki Y, Fujita T, Yahagi N, Koide H, Sugaya T;Nakamura T, Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new biomarker of sepsis complicated with acute kidney injury. *Crit Care Med*, 2010. 38(10): p. 2037-42.
83. Tanaka T, Doi K, Maeda-Mamiya R, Negishi K, Portilla D, Sugaya T, Fujita T;Noiri E, Urinary L-type fatty acid-binding protein can reflect renal tubulointerstitial injury. *Am J Pathol*, 2009. 174(4): p. 1203-11.
84. Pajek J, Skoberne A, Sosteric K, Adlesic B, Leskosek B, Bucar Pajek M, Osredkar J;Lindic J, Non-inferiority of creatinine excretion rate to urinary L-FABP and NGAL as predictors of early renal allograft function. *BMC Nephrol*, 2014. 15: p. 117.
85. Yang J, Choi HM, Seo MY, Lee JY, Kim K, Jun H, Jung CW, Park KT, Kim MG, Jo SK, Cho W;Kim HK, Urine liver-type fatty acid-binding protein predicts graft outcome up to 2 years after kidney transplantation. *Transplant Proc*, 2014. 46(2): p. 376-80.
86. Ramesh G, Krawczeski CD, Woo JG, Wang Y;Devarajan P, Urinary netrin-1 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010. 5(3): p. 395-401.
87. Wang W, Reeves WB, Pays L, Mehlen P;Ramesh G, Netrin-1 overexpression protects kidney from ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis. *Am J Pathol*, 2009. 175(3): p. 1010-8.
88. Waikar SS, Betensky RA;Bonventre JV, Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies? *Nephrol Dial Transplant*, 2009. 24(11): p. 3263-5.

ÖZGEÇMİŞ

Filiz ÖZCAN, 01.02.1982'de Antalya'da doğdu. İlkokulu 1993 yılında Antalya Barbaros İlkokulu'nda, ortaokulu 1996 yılında Antalya Faruk Tugayoğlu İlköğretim Okulu'nda, liseyi 1999 yılında Antalya Lisesi'nde ve lisans öğrenimini de 2004 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2009 yılında tamamladı. 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.