



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ' NE BAŞVURAN
ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA MVK (MEVALONAT
KİNAZ) VE NLRP12 (NOD BENZERİ RESEPTÖR PROTEİN 12)
GENLERİNİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

Duygu BİRCAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DANIŞMAN
Doç. Dr. Recep ERÖZ

Düzce 2016

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“**Düzce Üniversitesi Hastanesi’ ne Başvuran Romatoid Artritli Hastalarda MVK (Mevalonate
Kinaz) Ve NLRP12 (NOD Benzeri Reseptör Protein 12) Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin
İncelenmesi**” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 09.06.2016

TEZ SINAV JÜRİSİ



Doç. Dr. Recep ERÖZ
Düzce Üniversitesi
Başkan



Prof. Dr. Hüseyin YÜCE
Düzce Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ
Düzce Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 10 /06 /2016 tarih ve 2016/74 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Bu tez Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından DÜ BAP 2016.04.03.423 numaralı proje ile desteklenmiştir.

09.06.2016

Duygu BİRCAN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan, tez çalışmamda bana yol göstererek ufkumu açan, insani değerleri, hoş görüsü, etik değerleri ve derin tevazusu ile ömür boyu saygıyla anacağım hocam sayın Doç. Dr. Recep ERÖZ' e, Düzce' de geçirdiğim günlerde iyi günde ve kötü günde her zaman yanımda olan, daima minnetle anacağım, misafir perverliği ile birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Görkem DÜLGER' e ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim ve tüm nezaketi ile öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam sayın Prof. Dr. Hüseyin YÜCE' ye, Tezimdeki özverili ve titiz katkılarından dolayı hocam sayın Prof. Dr. Safinaz ATAÖĞLU' na ve verdiği destekle bu tezi yapabilmeme olanak sağlayan sevgili Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon servisi hemşirelerine, Bu günlere gelmemde en büyük pay sahipleri olan fedakâr anne ve babama, sevgi, saygı ve minnet duygularımı sunarım.

09 Haziran 2016, Düzce

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Romatoid Artrit.....	5
2.2. Epidemiyoloji.....	6
2.3. Etiyoloji ve Risk Faktörleri.....	7
2.3.1. Genetik faktörler.....	7
2.3.1.1. HLA (Human Leukocyte Antigen/İnsan Lökosit Antijeni).....	8
2.3.1.2. HLA dışı genler	10
2.3.2. Enfeksiyon ajanları	10
2.3.3. Cinsiyet, gebelik ve hormonal Faktörler.....	11
2.3.4. Çevresel faktörler.....	12
2.3.5. Otoimmünite	12
2.4. Patoloji ve Patogenez.....	13
2.5.1.3. Radyolojik bulgular	26
2.5.1.4. Laboratuvar bulguları	27
2.5.2. Hastalık aktivasyonunun / remisyonunun değerlendirilmesi.....	32
2.5.3. Ayırıcı tanı	33
2.6. Tedavi	33
2.6.3.1. Non steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ).....	35
2.6.3.2. Kortikosteroidler	35

2.7.2. NLRP12 tanımı ve lokasyonu.....	46
2.7.3. NLRP12 gen ürününün işlevleri	48
2.7.5. NLRP12 genindeki mutasyon	53
2.8. MVK Geni	55
2.8.1. MVK geni tanımı ve lokasyonu.....	55
2.8.2. MVK geni işlevi.....	57
2.8.4. MVK geni polimorfizmi	59
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	60
3.1. Grupların Çalışmaya Alınma Kriterleri	60
3.2. Demografik ve Klinik Değerlendirme	61
3.2.1. Görsel ağrı skoru (GAS).....	61
3.2.2. HAQ (Sağlık değerlendirme anketi).....	61
3.3. Laboratuvar Değerlendirme	62
3.3.1. Materyal	62
3.3.2. Method	62
3.3.2.1. Kandan mRNA izolasyonu	68
3.3.2.2. cDNA sentezi	70
3.3.2.3. Real-Time PCR ile genlerin ekspresyonlarının saptanması	71
4. BULGULAR.....	75
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	87
KAYNAKLAR	93
EKLER:	111
ÖZGEÇMİŞ	112

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ACR	:Amerikan Romatoloji Derneği
BCR	: B Cell Receptor
bç	: Baz çifti
cDNA	: Komplementer DNA
CRP	: C-reaktif protein
CCP	: Cyclic Citrullinated Peptide
COX	: Siklooksijenaz
Ct	: Treshold cycle
DAS 28	: Hastalık Aktivite Skoru
DMARD	: Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs
EBV	: Ebstein Bare Virus
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assays
ESH	: Eritrosit Sedimentasyon Hızı
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HAQ	: Sağlık değerlendirme anketi
HLA	: Human Leukocyte Antigen
IFN-γ	: İnterferon gama
IL	: Interleukin
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MKP	: Metakarpofalangeal
MR	: Magnetik rezonans
MTP	: Metatarsofalangeal
MTX	: Metotreksat
NF-κB	: Nuclear Factor-kappa B
NK	: Natural Killer
NSAİİ	: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
PİP	: Proksimal interfalangeal
RA	: Romatoid Artrit
RF	: Romatoid Faktör
rpm	: Rotations per minute

RT-PCR	: Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction
TNF	: Tumor Necrosis Factor
Tm	: Melting temperature
USG	: Ultrasonografi
X-Ray	: X ışınları radyografisi
μl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram



TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. ACR tarafından 1987 yılında revize edilmiş RA tanı kriterleri	19
Tablo 2.2. Avrupa Romatoloji Derneği (EULAR) ve ACR 2010 yılından bu yana kullanmakta olduğumuz tanı kriterleri	20
Tablo 2.3. Romatoid Artrit ile İlişkili Laboratuar Bulguları.....	31
Tablo 2.4. İnsan ve fare NLR proteinlerinin işlevleri	44
Tablo 2.5. İnsan NLRP12 Gene Kesip Çıkarılma varyantları	47
Tablo 2.6. İnsan MVK Gene Kesip Çıkarılma varyantları	56
Tablo 3.1. cDNA Reaksiyonun ilk basamağı için master mix bileşenleri.	70
Tablo 3.2. High Capacity cDNA Reverse Trancription reaksiyonu için gerekli termal siklus aşamaları.....	70
Tablo 3.3. MVK, NLRP12 ve GAPDH primer ve prob dizini	71
Tablo 3.4. Real-Time PCR Reaksiyon Protokolü	72
Tablo 3.5. Real-Time PCR koşulları.....	72
Tablo 4.1. Romatoid artritli hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda demografik, klinik ve laboratuar özellikleri.....	75
Tablo 4.2. MVK ekspresyon düzeyi için hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması ..	77
Tablo 4.3. NLRP12 ekspresyon düzeyi için hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması	77
Tablo 4.4. Hasta ve kontrol gruplarında NLRP12 ve MVK ekspresyonlarının diğer değerlerle ilişkisi.....	78
Tablo 4.5. Hastaların almış oldukları tedavi içerikleriyle genlerin ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki	86

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. HLA gen bölgesi .	10
Şekil 2.2. Sağlıklı insana ait eklem.....	13
Şekil 2.3. Pannus gelişimi	15
Şekil 2.4. T hücresi ve RA arasındaki ilişki	17
Şekil 2.5. İnsan NLR ailesinin şematik gösterimi.	42
Şekil 2.6. İnsan NLRP12 geni ve proteini.	47
Şekil 2.7. NLRP12' nin işlevleri.	48
Şekil 2.8. İnsan MVK genin kromozom üzerindeki yeri.....	56
Şekil 3.1. PCR sıcaklık döngüsü	63
Şekil 3.2. Taqman Probu	67
Şekil 4.1. Real Time PCR cihazından alınan sonuçlar	80
Şekil 4.2. NLRP12 geninin her hasta için ekspresyonlarının gösterilmesi	81
Şekil 4.3. MVK geninin her hasta için ekspresyonlarının gösterilmesi	81
Şekil 4.4. Tüm bireyler için iki genin ekspresyonunu gösteren grafik.....	82
Şekil 4.5. Hasta ve kontrol grubunda NLRP12 ekspresyonunun karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.6. Hasta ve kontrol grubunda MVK ekspresyonunun karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.7. Hastaların almış oldukları tedavi içeriklerine göre dağılımı	85

ÖZET

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ' NE BAŞVURAN ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA MVK (MEVALONAT KİNAZ) VE NLRP12 (NOD BENZERİ RESEPTÖR PROTEİN 12) GENLERİNİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Duygu BİRCAN

Düzce Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı; Doç. Dr. Recep ERÖZ

Haziran, 2016 112 sayfa

Bu çalışmanın amacı romatoid artrit (RA) hastalarında NLRP12 ve MVK genlerinin ekspresyon düzeylerini sağlıklı kontrollerle karşılaştırmak ve bunların RA' daki klinik önemini belirlemektir. Amerikan romatoloji cemiyetinin RA tanı kriterlerini karşılayan ve en az bir yıldır bu tanıyla takip edilen 38 RA' lı hasta (25 kadın, 13 erkek) ve 12 sağlıklı kontrol (9 kadın, 3 erkek) çalışmaya dahil edilerek karşılaştırıldı. Hastalık aktivitesini değerlendirmek için fiziksel fonksiyon kapasitesi sağlık değerlendirme anketinin (HAQ) Türkçe versiyonuyla değerlendirildi. TSH, Sedimentasyon, Lökosit, Trombosit, Karaciğer fonksiyon testleri, C-reaktif protein (CRP) ve Romatoid faktör (RF) düzeyleri rutin labortuvar metodlarıyla belirlendi. NLRP12 ve MVK genlerinin ekspresyon düzeyleri ise kantitatif RealTime PCR yönteminde RQ (rölatif ölçüm) değerleri göz önünde bulundurularak hesaplandı. Yaş ve cinsiyet açısından RA' lı hastalarla sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p = 0,505$ ve $p = 0,728$). Ortalama hastalık süresi $8,58 \pm 8,56$ (1-33) yıl ve ortalama HAQ skoru $0,81 \pm 0,73$ (0,1-2,4) olarak bulundu. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında RA' lı hastalarda NLRP12 ve MVK ekspresyon düzeyleri için anlamlı derecede bir fark bulundu (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,001$), ancak hastalık remisyon değerleri ve rutin laboratuvar değerleri açısından korelasyon yoktu. Hastalarda MVK ekspresyon seviyesi 4,39 kat ve NLRP12 ekspresyon seviyesi 5,72 kat kontrollerden fazla bulunmuştur. Hastalarda diğer hastalık parametreleri ile hem NLRP12 hemde MVK ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0,05$). NLRP12 ve MVK gen ekspresyon düzeyleri arasında hasta grubu için güçlü bir anlamlı ilişki varken ($p=0,000$), kontrol grubunda anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,491$). Sonuç olarak MVK ve NLRP12 genlerinin ifade düzeylerinin RA' lı hastalarda arttığı, bu iki genin ifade düzeyinin birbiri ile hastalığın patogenezinde ilişkili olduğu ve hastalığın erken tanısında bu genlerin bir belirteç olarak kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır. Bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışma olmasından dolayı daha fazla bilgi elde edebilmek için çok sayıda katılımcının olduğu longitudinal çalışmalar gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Gen ekspresyonu, MVK, NLRP12, Real Time PCR, Romatoid artrit

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MVK (MEVALONATE KINASE) AND NLRP12 (NOD-LIKE RECEPTOR PROTEIN 12) GENES EXPRESSION LEVELS IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS WHO ADMITTED TO DUZCE UNIVERSITY HOSPITAL

Duygu BİRCAN

Duzce University Department of Medical Biology and Genetics

Thesis advisor; Assoc. Prof. Dr. Recep ERÖZ

June, 2016 112 pages

The aim of this study was to compare NLRP12 and MVK genes expression levels in patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy controls, and to determine their clinical significance in patients with RA. Thirty-eight patients (25 women, 13 men) with RA according to American Collage of Rheumatology criteria and at least one year follow up, enrolled in this study and compared with twelve healthy controls (9 women, 3 men). To evaluate disease activity, physical function capacity was assessed with Turkish version of the health assessment questionnaire (HAQ). TSH, sedimentation rate, white blood cells, platelet, liver functions tests, C-reactive protein (CRP) and rheumatoid factor (RF) levels were determined by routine laboratory methods. Levels of expression of NLRP12 and MVK genes were calculated by quantitative RealTime PCR method considering RQ (relative quantification) values. There was no significant difference with respect to the age ($p = 0.505$) and gender ($p = 0.728$) between patients with RA and healthy controls. The mean disease period was 8.58 ± 8.56 (1-33) years and the mean HAQ score was 0.81 ± 0.73 (0.1-2.4) in patients with RA. There was a significant different NLRP12 levels or MVK levels (respectively $p=0.000$ ve $p=0.001$), but there was no correlation disease remmision values and routine laboratory values in patients with RA compared to healthy controls. Patients' NLRP12 expression levels were 5.72 times and MVK expression levels were 4.39 times greater than controls. There was no significant correlation between disease parameters and both NLRP12 and MVK expression levels ($p>0.05$). While there was a strong significant correlation between NLRP12 and MVK ekspression levels in patients ($p=0.000$), no meaningful association was found in the control group ($p=0.491$). As a result, the expression levels of MVK and NLRP12 genes increased in RA patients, associated with each other and pathogenesis of the disease, and also we found out these genes can be used as a marker of early diagnosis of the disease. Because this is the first study on this topic, longitudinal studies including more participants are necessary to obtain more information.

Key Words: Gene expression, MVK, NLRP12, Real Time PCR, Romatoid arthritis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Romatoid artrit (RA) etiyojisi tam olarak bilinmeyen, daha çok sinoviyal eklemleri tutan, artiküler yapılarda progresif dekstrüksiyonla seyreden, kronik, inflamatuvar, sistemik ve otoimmün bir hastalıktır ¹. Etiyojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte genetik, hormonal, enfeksiyöz nedenleri kapsayan multifaktöryel orjinli olduğu düşünülmektedir. RA' nın prevalansı değişik toplumlarda % 0,3-1,5 arasında değişmektedir ve kadınlarda erkeklerden 2-3 kat daha sık görülmektedir ². Ülkemizde yapılan bölgesel çalışmalarda prevalansı % 0,36 ile % 3,7 arasında bulunmuştur ². RA her yaşta ortaya çıkabilmekle birlikte, hastaların %80' inde başlangıç yaşı 30-55 yaşları arasındadır. RA' da eklemlerdeki kıkırdak ve kemik dokunun yıkımına yol açan çeşitli inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve sinoviyal doku hiperplazisi mevcuttur.

Mevalonat kinaz (MVK) geni, kromozomda 12q24 lokasyonunda bulunan, kodlama yapan 10 ekzon ile kodlama yapmayan intron 1 içeren 21kb' lık bir gen bölgesidir ³. Bu gen tarafından, 5' UTR bölgesi farklı olan iki farklı transkripti bulunan MVK proteini üretilir. MVK çok sayıda hücrel süreçte önemli fonksiyonlara sahiptir ve Mevalonat yolu için kritik önem taşır. MVK, enzimatik aktivitesi için çok önemli olan dört korunmuş fonksiyonel bölge ve dört aminoasit (K13, E19, E193 ve D204) içerir ⁴. MVK geni tarafından kodlanan MVK, kolesterol biyosentezinde ilk aşamayı katalizler. İnsanlarda MVK mutasyonu için homozigot taşıyıcı olan bireylerde, sendrom ateş ve artan konsantrasyondaki immünoglobülinler D ve A ile karakterize olan hiperimmünoglobülinemi D sendromu (HIDS) görülür. Yapılan çalışmalarda MVK geninde meydana gelen mutasyonların, dissemine yüzeysel aktinik porokeratoz (DSAP) semptomlarına neden olduğu gösterilmiştir ^{5,6}.

NLRP (Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı, Lösince zengin tekrar ve Pyrin domain içeren) sitoplazmik proteinlere benzer yapıda 14 üyeden oluşan gen ailesidir. İnsan kromozomu üzerinde iki küme halinde 11p15 (NLRP6, 10 ve 14) ve 19q 13.4 (NLRP2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12 ve 13) bölgelerinde bulunurlar. Ailenin çoğu üyesi çeşitli dokularda yüksek düzeyde ifade edilmektedir. Bu gen ailesi C.elegans, D. melanogaster, fare, sıçan ve insanda çok iyi korunmuşlardır. NLRP' ler kaspaz aktiviteleriyle inflamasyon ve apoptoz yolaklarına dâhil olmuşlardır [7]. Bu ailenin üyesi NLRP12

geni, PYPAF7 olarak da bilinir ve NLRP12'nin ekspresyonunun başışıklık hücresinde oldukça sınırlı olduğu ve inflamatuvar sinyal yollarını aktivite ettiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir ^{8,9}. Bu gen aile üyelerinin ifade düzeylerinin RA' da araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon anabilim dalındaki görevli hekimlerle yapılan görüşmelerde RA hastalığının insidansının bölgemizde yüksek olduğu ve bu hastalıktan mustarip olarak hastanemize dikkate değer bir sayıda kişinin başvurarak daha sonraki dönemlerde de düzenli olarak rutin kontroller için hastaneye geldiği belirlenmiştir.

Bildiğimiz kadarıyla MVK ve NLRP12'nin ekspresyon düzeyiyle ilgili RA' lı hastalarda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Biz bu çalışmada Düzce Üniversitesi Hastanesine RA tanısıyla başvuran hasta ve kontrol grubundaki MVK ve NLRP12' nin ekspresyon düzeylerini tespit edip, bunların ekspresyon düzeyleri ile hastaların demografik özellikleri ve hemogram, sedimantasyon, CRP (C-reaktif protein), RF (Romatoid faktör) sonuçları arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık. Böylece RA hastalığında MVK ve NLRP12' nin ekspresyon düzeylerinin hastalığın erken dönemdeki tanısında bir belirteç olarak kullanılabilirliği, bu genlerin ekspresyon düzeyleri ile hastaların demografik özellikleri ve tahlil sonuçları arasında bir ilişkinin olup olmadığı tespit edilerek literatürdeki bu eksiklik giderilmiş olacaktır. Böylece bu araştırma sonucunda elde edilen veriler sayesinde hastalığın erken tanısı ile hastalara erken tedavi uygulanarak hastalık ilerlemeden hastanın tedavisi yapılmış olacaktır. Aynı zamanda uygulanan tedavi stratejisinin başarısı hakkında da bilgiler edinilerek hekime bu konuda katkı sağlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit

Romatoid artrit (RA) hastalığı ilk kez 1859 yılında İngiliz genetikçi ve klinisyen olan Sir Alfred Garrot isimli bir araştırmacı tarafından kullanılmıştır. 1940 yılında Waaler isimli araştırmacı, romatoid Artritli hastaların serumlarında IgG antikorları ile duyarlılaştırılmış kırmızı kan hücrelerini aglutine eden bir faktör gözleyip bunu romatoid faktör (RF) olarak isimlendirmiştir. Waaler tarafından RF'nin bulunması ve bunu takiben kaydedilen gelişmeler, RA'da otoimmün mekazimaların rolünü açıklamayı hedef alır ^{10,11}. RA, özellikle periferik sinovyal eklemleri simetrik tutan, kronik, sistemik, progressif, multifaktoryel orjinli otoimmün bir hastalıktır. Uygun genetik zeminde immün yanıt ve kronik inflamasyonla karakterize, bazen yoğun şekilde eklem dışı tutulumun da eşlik ettiği bu hastalık, fonksiyon kaybına ve uzun dönemde mortaliteye neden olabilir ¹¹. Hastalık eklem sinovyasında inflamasyonla başlar. Zamanla sinovyalda pannus formasyonu oluşturup kıkırdak, kemik ve diğer komşu dokularda yıkıma neden olarak eklem deformitelerine yol açar. Sıklıkla dalgalanmalarla seyrederek ve tedaviye rağmen kronikleşerek progresif eklem destrüksiyonu, deformite ve fonksiyon kaybına neden olabilir. Sonuçta hastanın günlük yaşam kalitesi etkilenir ¹. Sistemik otoimmün bir hastalıkve en sık görülen kronik inflamatuvar artropati olan RA'lı hastalar kronik inflamasyonun neden olduğu eklem hasarına bağlı olarak ağrı ve fonksiyon kayıplarından yakınırırlar ¹¹.

Hastalık küçük sinovyal eklemleri daha sık etkilemekle birlikte ağırlık taşıyan büyük eklemler ve aksiyel iskelet tutulumu da görülebilmektedir. Hastalığın seyri sırasında eklemler dışında diğer organların tutulumlarının da görüldüğü ekstraartiküler tutulumlar vardır ¹². Önceleri kronik benign seyirli ve mortaliteyi arttırmayan bir hastalık olarak bilinse de, tarihi akış içerisinde bu görüş tam tersi yönde değişmiştir. Bu gün hastalığın yaşam kalitesini ciddi şekilde bozduğu, normal popülasyona göre mortalite riskini arttırdığı, artmış tedavi gideri ve iş gücü kaybına bağlı olarak topluma büyük bir mali yük getirdiği bilinmektedir. Bu ciddi hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi ve daha etkili tedavisi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir ¹³.

2.2. Epidemiyoloji

RA yaklaşık olarak bütün dünya genel popülasyonunu % 0,5-1 oranında etkilemektedir¹⁴. RA dünyanın hemen her bölgesinde görülmekle beraber, prevalansı coğrafi bölgelere göre değişmekte ve toplumlar arası farklılıklar göstermektedir. Birçok çalışmada beyaz ırkta, Avrupalı toplumlarda ve Kuzey Amerikalılarda RA prevalansı % 0,5' ten % 2'ye kadar değişmektedir¹⁵. Bariz coğrafik ve iklimsel etki saptanamamış olmasına rağmen, Akdeniz ülkelerinde prevalans Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinden daha düşüktür. Merkez ve Güney Avrupa'da görülme sıklığı % 0,5 ile % 1 arasında iken, Kuzey Avrupa'da daha yüksektir¹⁵. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada' da kadınlarda romatoid artrit görülme sıklığı % 1 civarında olup, erkeklerden 3-4 kat daha siktir¹⁴. Literatürde Çin'in Kinmen adasında romatoid artrit vakası görülme oranı % 0,3 iken, Arizona'daki Pima yerlilerinde %5,3 gibi yüksek görülme oranlarında belirtilmiştir¹⁶. 847 Aborjin üzerinde yapılan bir çalışmada ise, hiç romatoid artrit vakası görülmemiştir¹⁷. Ülkemizde RA epidemiyolojisine yönelik yapılan ilk çalışma 1968 yılında ve yaklaşık 10.000 kişi taranarak yapılmış ve prevalansı % 0,22 oranında bulunmuştur. Daha sonra yapılan bölgesel çalışmalarda da hastalığın prevalansı %0,36 ile %3,7 arasında bulunmuştur². Tek yumurta ikizlerinde konkordansın çift yumurta ikizlerine göre 4 kat artmış olduğunun belirlenmesi, genetik ve çevresel faktörlerin hastalık gelişiminde birlikte etkili olabileceğini düşündürmüştür^{15,18}.

RA kadınlarda erkeklere göre daha sık olup, kadınların erkeklere oranı 2:1 ile 4:1 arasında değişmektedir ve yaş ilerledikçe cinsiyet farkı azalır. Hastalığın başlangıç yaşı en sık (%80) 35-50 yaş arasında görülür. İnsidansı 60-64 yaş arası kadınlar da 18-29 yaş arası kadınlara göre 6 kat daha fazladır¹⁹. Hastalık görülme oranları her iki cinsten yaşla beraber artış göstermektedir. 35 yaşın altındaki popülasyonda % 0,3 iken, 65 yaş üzerinde % 10 dur¹¹. İsveç Göteborg' da yaş ortalaması 79 olan yaşlı popülasyonda RA görülme sıklığı % 10 olarak tespit edilmiştir²⁰. Ancak yeni insidans çalışmaları son yıllarda bir düşüş göstermektedir. İngiltere Galler' de yapılan bir nüfus çalışmasında kadınlarda yıllık RA görülme oranı 1970 ile 1981 yılları arasında her 1000 kişi/yıla göre yılda 3,3 olgudan 2,6 olguya düşmüştür. Bu bulgular son on yıl içerisinde kadınlarda RA görülme oranının azaldığını göstermektedir¹⁸. Kadınlardaki görülme sıklığının erkeklerden fazla olmasının sebebi fareler üzerinde yapılan bir deneyde, östrojen hormonunun immün sistem üzerine olan uyarıcı etkisinden kaynaklanır. Östrojen, süpresör T hücrelerinin fonksiyonlarını inhibe eder ve Th yardımcı hücrelerinin

fonksiyonlarını artırır²¹. Ek olarak östrojen reseptörleri sinovyal hücrelerde ve T bellek hücrelerinde gösterilmiştir. Bu reseptörlerde tespit edilen polimorfizmler hastalıkla ilişkili bulunmuştur²².

2.3. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

RA' nın nedeni kesin olarak aydınlatılmamış olmakla beraber genetik, çevresel, hormonal faktörler, infeksiyöz etkenler ve otoimmüitenin hastalık gelişimi için risk faktörü olduğu düşünülmektedir¹¹. Tek başına veya birlikte, RA etiyojisinde rol oynayan birçok mekanizma vardır. Romatoid artrit için risk faktörlerini tespit ederken çevresel ve genetik faktörler dikkate alınmalıdır.

2.3.1. Genetik faktörler

Genetik olmayan faktörler büyük ihtimalle artrit oluşumunu tetikleyen başlangıç uyarısını (artritogenik uyarı) yaparlar. Oysa genetik faktörler hastalığın nihai görünümünü belirler. Hastalık kendiliğinden sınırlı, kronik veya eroziv olabilir. Yapılan tahminlerde RA' da genetik faktörlerin % 15 oranında, genetik olmayan faktörlerin ise % 85 oranında etkili olduğu düşünülmektedir²³. 1970' lerden beri tekrarlanan "genetik risk taşıyan hastalarda, bilinmeyen bir patojen ya da antijen sonucu tetiklenen ve bunun sonucu oluşan kalıcı immün yanıt" hipotezi hala geçerliliğini korumaktadır. Genetik faktörlerin yanında eşey hormonları, enfeksiyon ve çevresel faktörler gibi bazı immün tetikleyici etkenlerin de patogeneizde rol oynadığı düşünülmektedir²⁴.

Romatoid artrit hastalığının oluşumunda yapılan aile çalışmaları birçok genetik faktörün riski belirlediğini göstermektedir. Şiddetli RA olan hastaların birinci derece akrabalarında RA oluşma olasılığı 4 kat daha fazladır. Genetik faktörlerin önemini vurgulayan en önemli örnek, monozigot ikizlerinden biri hastalandığında diğer ikizde de hastalığın görülme oranı %30-50 arasındayken, genel toplumda bu oran %1 olup, oysa genlerinin %50 kadarını paylaşan dizigot ikizinde hastalık gelişme riskinin ise %2-5 oranında olduğu düşünülmektedir^{1,11}. Bunlar genetik faktörlerin hastalığa eğilimde %60 civarında rol oynadığını düşündüren verilerdir. Etiyoloji mültifaköriyel olup genetiği kompleks ve poligeniktir²⁵. Bugüne kadar MHC (Major Histocompatibility Complex) diğer adıyla HLA (Human Leukocyte Antigen) alelleri en iyi risk faktörü olarak belirlenmiştir. RA için HLADR4 sınıf II major histokompatibilite kompleksi alleli ve ilişkili allellerin yatkınlık ve hastalık şiddeti üzerinde etkili temel genetik

risk unsurları olduğu bilinmektedir. Bu genetik faktörlerin 6. Kromozom üzerinde yer alan HLA sistemi genlerine bağlı olduğu ve birden çok genin RA' yı etkilediği düşünülmektedir. Özellikle HLA-DR4 ile RA arasındaki ilişkinin tanımlanmasından sonra, hastalığa sebep olan genetik faktörlerle ilgili bilgiler ve araştırmalar hızla artmıştır ²⁶.

HLA genleri immün sistemde antijenlerin T hücrelerine iletimi ve bu hücrelerin aktivasyonlarında rol oynarlar. Ayrıca olgunlaşmamış T hücrelerinin Timus dokusundaki seçilimini de düzenlerler. 1978 yılında yapılan bir çalışmada, HLA-DR ve romatoid artrit arasında genetik bir ilişki tespit edilmiştir ²⁷. Aynı çalışmada HLA-DR4' ün romatoid artritli hastalarda % 70, kontrol grubunda ise % 28 oranında pozitif olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak HLADR4 pozitif kişilerde romatoid artrit oluşumu için relatif riskin 4-5 kat olduğu belirtilmiştir ²⁷. Ancak yeni çalışmalarda HLA ve romatoid artrit arasındaki ilişkinin hastanın gelişiminden ya da diğer bir deyişle sinovite olan yatkınlığından çok, hastalığın derecesi ve kronikliğe gidiş eğilimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Örneğin HLA DRB1 pozitif olan hastalarda romatoid artrit daha ciddi bir formu olan Felty's sendromu gelişme riski çok daha yüksektir ²⁸.

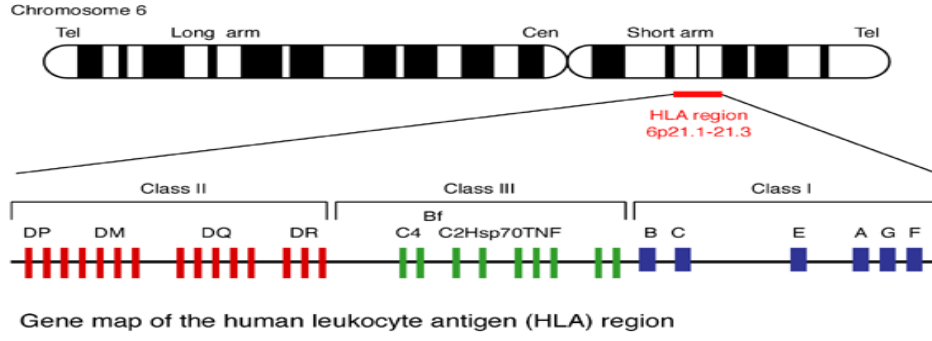
2.3.1.1. HLA (Human Leukocyte Antigen/İnsan Lökosit Antijeni)

Otoimmün bir hastalık olan RA'da da genetik çalışmalar artarak devam etmektedir. RA ile genetik ilişki ilk olarak HLA ile gösterilmiştir. 6. kromozomun kısa kolunda yerleşen MHC bölgesi, yüzlerce gen bölgesi içermektedir. Bu genlerin büyük bölümünü HLA genleri oluşturmaktadır ve bu genler kişilerin bireysel doku tipini belirler. HLA bölgesi kodladığı proteinlere göre sınıf I, II, III olarak sınıflandırılır ²⁹ (Şekil 2.1). HLA Sınıf I ve II moleküllerin immün yanıt üzerine farklı etkileri vardır. Sınıf I moleküller CD8 + T lenfositlere antijen sunarken, sınıf II moleküller CD4 + T lenfositlere antijen sunmaktadır. Sınıf I moleküller, tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde bulunabilirken sınıf II moleküller sadece B lenfositlerde, profesyonel olarak antijen sunan monosit, makrofaj, dentritik hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır. Dağılımdaki bu farklılık, moleküllerin fonksiyonlarındaki farklılığı da yansıtmaktadır. Sınıf I moleküller endojen (hücre içi) peptidleri sunar ve CD8 taşıyan sitotoksik hücrelerin uyarılmalarına sebep olur. Doğal öldürücü (NK) hücre fonksiyonları da sınıf I moleküller ile kontrol edilmektedir. Sınıf I MHC molekülleri, sürekli olarak hücrelerin peptidlerini

sergilemelerine aracı olarak hücrelerin immun sistemin kontrolü altında kalmalarını sağlarlar. Sınıf II moleküller ise eksojen (hücre dışı) peptidleri sunarak CD4 taşıyan yardımcı T lenfositlerin uyarılmalarını sağlar, böylece immun yanıt oluşumunda rol alan B lenfosit, diğer T lenfositler gibi hücrelerin kontrol edilmesinde rol alırlar³⁰.

Sınıf II HLA genlerinden olan HLA-DRB1 ve romatoid artrit arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir³¹. HLA-DRB1 alt grubu olan HLA-DR4 pozitif RA' lı kişilerde özellikle şiddetli hastalık için artmış risk saptanmıştır³². HLA-DR molekülünün DR bölgesinde sabit bir alfa zinciri (tek gen kodlar) ve yüksek düzeyde polimorfik bir beta zinciri (9 farklı bölge) vardır. Bunlardan sadece DRB1, DRB3, DRB4 ve DRB5 kodlayıcı görevi olan genlerdir ve birbirinden farklı beta zincirlerini kodlarlar³³. HLA DR4 geni en az 22 allelden oluşmaktadır. Bu allellerden RA ile ilişkili bulunanların hepsinde benzer aminoasit dizilimi (leu-glu-lys-arg-ala) gösteren bir bölge saptanmıştır. Bu bölge, DRB molekülünün 67–74. aminoasitleri arasında bulunur ve 'ortak epitop' olarak adlandırılır. Bu epitoplar antijenin özgül antikoruyla birleşmesini sağlar^{34,35}.

Yapılan araştırmalar HLA-DRB1 alellini taşıyanlarda artmış RA riski ile birlikte siklik peptid içeren sitrulin antikorları (anti-CCP) geliştirmeye yatkınlığın da arttığını göstermektedir. Anti-CCP antikorların RA tanısı için spesifitesinin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir³⁶. Yaşlanma RA için bir risk faktörüdür. RA' li hastalarda immün sistem hücrelerinin daha erken yaşlandığı kromozomlarda bulunan telomer bölgesinin daha kısa olmasından anlaşılmaktadır. Yapılan araştırmalarda HLA-DR4 alellini taşıyanlarda immün sistem hücrelerinin daha erken yaşlandığı görülmüştür³⁷. T lenfositlerde genetik defekt sonucu bozulan apoptozis mekanizması (programlanmış hücre ölümü) RA patogenezinde suçlanan nedenler arasındadır. Bir tümör süpressör gen olan p53 genindeki defekt, bu genin ürünü tarafından düzenlenen apoptozisin bozulmasına ve defektif T lenfositlerin daha uzun yaşamasına neden olabilir. Yapılan çalışmalar RA' lı hastalarda sinoviyum ve periferik dolaşımdaki mononükleer hücrelerde bu gendeki fonksiyon bozukluğuna işaret etmektedir^{38,39}.



Şekil 2.1. HLA gen bölgesi (Molecular Medicine Review'den).

2.3.1.2. HLA dışı genler

RA' da PTPN22 (The Protein Tyrosine Phosphatase N22), STAT4 (Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 4), PADI-4 (Peptidylarginine Deiminases Citrullinating Enzyme-4) genlerindeki ve 6q23 gen bölgesindeki polimorfizm/mutasyonlar bazı toplumlarda hastalığa duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir^{40,41}. RA hastalarındaki Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) gen polimorfizmi, birçok çalışmada değerlendirilmiş ve çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır. Kore Cumhuriyetinde yapılan çalışma sonucunda VEGF geninin 936. pozisyonundaki polimorfizmin RA gelişimi ile ilişkili olduğu ve VEGF geninin hastalığa yatkınlığı artıran haplotipinin taşıyıcılarında RA'nın daha erken yaşlarda başladığı gözlenmiştir. Fakat bu bulgular daha sonra yapılan çalışma da tekrarlanmamıştır^{42,43}.

2.3.2. Enfeksiyon ajanları

RA etkeni olan ajanlar arasında enfeksiyöz sebepler üzerinde çok durulmakla birlikte, bugüne yapılan araştırmalarda RA' lı hastaların sinovyal doku ve eklem sıvısında özgün veya özellikli organizma izole edilememiştir. Mikoplazmaların, Parvovirüs B19, retrovirüsler, Ebstein Barr virüs (EBV), mikobakterilerin ve Rubella virüsünün RA da etyolojik rolleri üzerinde durulmuş ancak yeterli kanıtlar elde edilememiştir^{1,11,44}. Genetik olarak yatkın kişilerde, mikroorganizmaların meydana getirdiği T hücre reaktivitesindeki küçük değişimler veya mikroorganizmaların girişi ile konakta yeni antijenlerin oluşması hastalığı başlatmak için yeterli olabilmektedir⁴⁵. Mikroorganizma antijenleri Toll-like reseptörler aracılığı ile doğal immüneyi tetikleyebilmekte, takiben adaptif immün yanıt gelişebilmektedir^{28,46,47}. Bir diğer olasılık mikroorganizmanın moleküler benzerliğinden dolayı eklem içinde çapraz reaksiyon veren belirteçlerin eksprese edilmesiyle oluşan mekanizmadır. Bu mikroorganizmaların içerisinde ilk

kuşkulanan ve üzerinde çok çalışılan EBV' dir, çünkü RA' lı hastaların bir kısmında EBV antijenine karşı serum antikorları ve periferik kanda EBV ile enfekte B hücreleri saptanmıştır. EBV enfeksiyonu poliklonal B lenfosit aktivasyonu ve RF üretimini tetikleyebilir. RA'li hastaların sinoviyumlarında EBV'ne ait RNA üretimi gösterilmiştir. Ayrıca virüse ait proteinler ortak epitopla benzer aminoasit dizilimine sahiptir ve çapraz reaksiyona yol açabilir ⁴⁴. Üzerinde durulan bir diğer virüs enfeksiyonu da parvovirüs B19' dur. Parvovirüs B19 DNA' sına RA' lı hastaların sinoviyal sıvısında kontrol grubuna göre daha sık rastlanmıştır. Ancak yeni tanı konulan hastaların yalnızca %5' inde yakında geçirilmiş bir parvovirüs B19 enfeksiyonu gösterilebilmektedir ⁴⁸. Dişeti hastalıklarının da RA hastalık şiddetini arttırdığını gösteren çalışmalar vardır. Burada da en önemli etiyolojik ajan Porphyromonas gingivalis ve bunun oluşturduğu periodittir. Buradaki hipotez ortak epitop benzeri aminoasit diziliminin bulunması ve bu moleküler benzerlik yolu ile sitrulinize peptitlere karşı antikor yapımının artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir ⁴⁹.

2.3.3. Cinsiyet, gebelik ve hormonal Faktörler

RA, kadınlarda daha sık görülmekte ve daha şiddetli seyretmektedir. Kadınlarda RA gelişim riski, yaşamları süresince menarşdan menopoza kadar üretkenlik siklusunun farklı dönemlerinde değişkenlik gösterir ¹¹. Doğum yapmamış kadınlarda doğum yapanlara kıyasla RA gelişme riski 2-3 kat daha fazladır. RA' lı hastalar hamilelikte %75' e varan oranda iyileşme ve remisyona göstermesine rağmen, hamilelik sonrası hastaların % 80-90' ında tekrar şiddetlenmektedir. Östrojenler, T hücrelerinin antijen uyarma etkisini baskılar ve T hücre supresör aktivitesini azaltırken; progesteron T hücre supresör aktiviteyi artırır, fakat lenfosit proliferatif etki gösteren antijeni inhibe eder. Testosteron ise T hücre supresör aktiviteyi artırırken, sitotoksik hücre aktivitesini inhibe eder ¹. Östrojenlerin immün sistem üzerine genel olarak uyarıcı etkisi olduğu bilgisi kadınlarda erkeklere oranla hastalığın 3 kat fazla görülmesinin sebebi olabilir ⁴⁶. Hastalığın üretken dönemdeki kadınlarda daha fazla görülmesi, menapoz sonrası dönemde cinsiyet farkının azalması, gebelikte görülen remisyona döneminin postpartum dönemde yeniden aktive olması, hastalığın nulliparlarda çok daha sık görülmesi, erken yaşta gebelik ve oral kontraseptif kullanımı ile riskin azalması gibi özel durumlar RA etyolojisinde hormonal faktörlerin önemli risk teşkil ettiğini göstermektedir ¹⁵.

2.3.4. Çevresel faktörler

RA'nın ailesel tekrarlama riskinin beklenildiği kadar yüksek olmaması, monozigotik ikizlerde konkordansın %100 olmaması ve ikizlerde görülen değişkenliğin ancak %50'sinin genetik faktörlerle açıklanabiliyor olması, RA gelişiminde çevresel faktörlerin de rolü olduğunu düşündürür. Çevresel faktörler genelde saptanabilen genetik faktörlerin dışında hastalığa yatkınlık oluşturabilecek tüm faktörler olarak ifade edilirler. Ancak bu faktörlerin bir kısmı, diyet, sigara, kahve kullanımı, infeksiyonlar gibi gerçekten çevresel faktörler olmasına karşın bir kısmı hormonal değişiklikler, gebelik, laktasyon gibi açıkça genetik temeli olmayan internal faktörler de olabileceğinden "genetik dışı konakçı faktörleri" daha uygun bir tanımlama olabilir². Sigara içmenin RA gelişme riskini arttırdığı ve sigara içenlerde Romatoid faktör (RF) ve anti-CCP antikörlerinin oluşumunu tetiklediği bilinmektedir. Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte sigara dumanının hava yollarında oluşturduğu kronik inflamasyon suçlanmaktadır⁴⁷. Tüm potansiyel çevresel tetikleyiciler arasında, RA gelişimi ile net bir şekilde ilişkili olan tek faktör sigara içilmesidir¹¹.

2.3.5. Otoimmünite

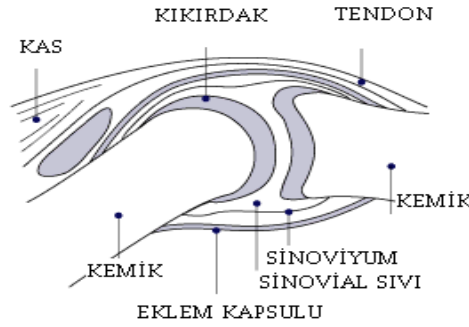
RA'daki self antijenleri değişmiş immün yanıtın yönettiği düşüncesi, RF'nin keşfedilmesi ile ileri sürülmüştür. RF'nin, immünooglobulin G (IgG) molekülünün kristalize parçasındaki (Fc) antijenik belirleyicilere karşı oluşan otoantikör olduğunun anlaşılması, RA'nın otoimmün bir hastalık olduğunu ortaya koymuştur¹¹. RA'da, otoimmüniteyi RF'nin yanı sıra birçok otoantijen de etkilemektedir. Bilinmeyen artritogenik bir antijen ya da antijenler tarafından immün yanıt başlatıldıktan sonra T lenfositler tarafından tanınan bazı otoantijenler immün yanıtın süreklilik kazanmasına katkıda bulunabilirler⁵⁰⁻⁵².

Günümüzde otoimmün hastalıkların etyopatogenezinde posttranslasyonel protein modifikasyonu üzerinde durulmaktadır. Posttranslasyonel modifikasyon sonrası yeni antijenik epitopların ortaya çıktığına inanılmaktadır. Bunlardan en iyi bilineni proteinlerin yapısında bulunan arginin aminoasidinin posttranslasyonel modifikasyonla citrullin aminoasidine çevrilmesi ve bu proteinlere karşı otoantikörlerin gelişimidir⁵³. Bir diğer posttranslasyonel modifikasyon da proteinlerin glikozilasyonudur. HLA-DR4

transgenik farelerde ve RA' lı hastalarda glikozillenmiş epitoplara karşı reaksiyon gösteren T lenfosit klonları gösterilmiştir⁵⁴.

2.4. Patoloji ve Patogenez

İnsan vücudunda iskelet sistemi 206 adet kemikten meydana gelmektedir ve kemiklerin fonksiyonel görevini kemikler arasındaki eklemler sağlar. Eklemlerin yüzleri kıkırdakla kaplanmış ve dıştan fibröz dokudan yapılmış bir kapsülle sarılmıştır (Şekil 2.2). Fibröz doku hücreleri tarafından üretilen sinoviyal sıvı eklem yüzlerinin sürtünme etkilerini, kayganlığı nedeniyle en az düzeye indirir. Eklemler yapı özelliklerine ve hareket yeteneklerine göre üç ana sınıfa ayrılırlar. Eklem çeşitleri; kemiklerin hareket etmesini engelleyen, kemikler arasındaki bağ dokusu ve hyalin kıkırdaktan oluşan Fibröz Eklemler, eklemi yapan kemiklerin bir kıkırdak aracılığıyla birleşmiş olan tipi Yarı Oynar Eklemler, eklemde eklem yüzleri ayrı ayrı hyalin kıkırdak ile kaplanmış olan oynar eklemler de denen Sinoviyal Eklemlerdir.



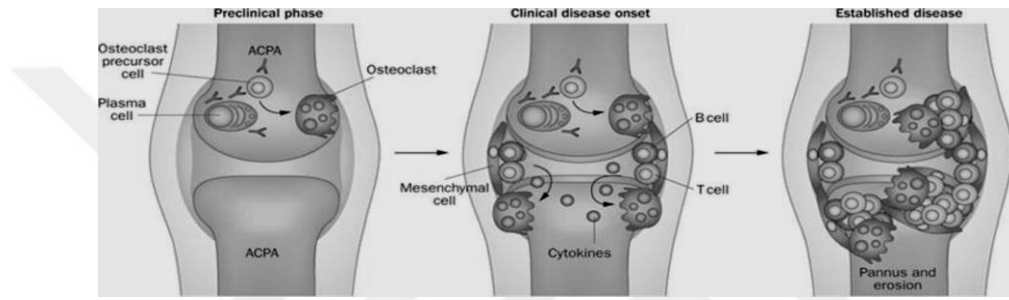
Şekil 2.2. Sağlıklı insana ait eklem (http://tr.wikidoc.org/index.php/Romatoid_artrit)

Romatoid artrit kronik poliartiküler sinovit, kıkırdak ve kemikte ilerleyici erozyon ile karakterizedir. Fibroblast benzeri sinovistler ve sinoviyal makrofajlar kıkırdak ve kemik hasarının çoğundan sorumludur. Sinoviyumun en önemli fonksiyonu, eklem kıkırdağının beslenmesini sağlayan ve eklem sürtünmesiz hareketi için kayganlaştırıcı olan sinovial sıvıyı salgılamaktır. Anatomik olarak, sinovyanın iki hücre katmanı vardır. İç hücre dizisi "intimal lining" olarak adlandırılır, gevşek organize olmuştur ve avaskülerdir. Sinoviyal sıvının üretiminden sorumludur. İç hücre dizisinde iki temel hücre tipi mevcuttur. Tip A hücreler "makrofaj benzeri" hücrelerdir. Fagositoz, antijen sunumu, sitokinler, büyüme faktörleri ve inhibitörlerinin sentezi ve sekresyonu, birçok inflamatuvar mediatörün ve doku yıkımına neden olan enzimlerin üretimi gibi çok

sayıda fonksiyonel karakteristikleri vardır. Makrofaj yapısındaki sinoviyositler, Fc reseptörü içerirler ve fagositoz yapma yeteneğindedirler. Bu hücreler ayrıca, yüzeylerinde HLA sınıf 2 moleküllerini de taşırlar ve kemik iliği kökenlidirler. Romatoid artritte makrofajlar intimal, subintimal tabakalarda ve kıkırdak pannus birleşiminde birikirler⁵⁵. Başlıca IL-1 ve TNF- α salgılayarak, yeni kan damarlarının oluşumunda önemli rol oynarlar. Yeni kan damarları kıkırdak ve kemiğe komşu daha derin alanlara girdikçe, yıkıma neden olan maddeler daha fazla hasar oluştururlar. Diğer hücre tipi Tip B hücreler olup, mezenkimal kökenden gelirler ve “fibroblast benzeri” morfolojileri vardır. Granüllü endoplazmik retikulum ve ribozom dizileri gibi belirgin salgılayıcı elemanları vardır. Hastalık başlangıcında her iki hücrede artış olur ancak kronikleştikçe fibroblast artışı belirginleşir^{11,56}. İkinci hücre katmanı dış hücre tabakası olup eklem aralığına bakan, "sublining" olarak adlandırılır. Az sayıda hücre ve daha çok damarsal yapılar içeren bazal membransız ince intimal tabaka subintimal tabakadır. Subintimal tabakada daha çok kollajen, glikozaminoglikan ve fibronektin bulunur⁵⁶. RA' da primer inflamasyon eklem içinde sinoviyumda olur. Dolayısıyla primer sinovite yol açan bir hastalıktır.

Tutulan eklemlerde histolojik olarak; sinoviyal hücre hiperplazisi ve proliferasyonu, sinoviyumda CD4+ T hücreleri, plazma hücreleri ve makrofajlardan meydana gelen yoğun perivasküler iltihabi hücre infiltrasyonu (sıklıkla lenfoid folliküller), anjiyogenez nedeniyle artmış vaskularite, sinoviyumda ve eklem aralığında nötrofil ve fibrin kümelenmeleri, alttaki kemikte sinoviyuma penetre olan ve kemik erozyonuna yol açan artmış osteoklast aktivitesi ile karakterize kronik sinovitis görülmektedir. Klasik görünüm; iltihabi hücreler, granülasyon dokusu ve bağ dokusuyla karışık, proliferatif dökümlü sinoviyal hücre karışımından oluşan bir pannus görünümüdür. Romatoid sinoviyumda ilk olarak sinoviyal mikrodolaşımda tıkanma, hücre şişmesi ve hücreler arası mesafede artış görülür. Önce T hücrelerinin ağırlıkta olduğu bir hücre artışı olur. Sonraları makrofaj ve dentritik hücre akımı ve bunların salgıladığı sitokinlerde artış olur. Neticede inflamasyon artar, sinoviyum hipertrofik bir hale gelir ve yavaş yavaş kıkırdağı aşındırmaya başlar. Önce sinoviyal membranda, parmak benzeri villoz çıkıntılar oluşur. Olayın ilerlemesiyle periartriküler yumuşak doku ödemi gelişir ve ilk olarak eklemlerin fusiform şişmesine neden olur. Romatoid sinoviyumun kıkırdağı, kemiği ve bağları erozyona uğratan kısmına "pannus" denir. Kıkırdak-pannus bileşkesinde, fibroblast benzeri sinovistler ve makrofajlar kıkırdağı çevreleyen dokuda

kümeleşirler. Sinoviyal doku tarafından salgılanan yıkıcı enzimler ve pannus, kıkırdak hasarına neden olur ⁷³. Burada bulunan makrofaj, fibroblast ve lenfosit gibi çeşitli hücreler anjiogenezde rol oynarlar. Pannustaki sitokinler IL-1, IL-6 ve TNF- α olup, pannositlerin (fibroblast benzeri sinoviyal hücre) çoğalmasına, kondrosit matriks üretiminin azalmasına ve metalloproteinaz (MMP) (kolajenaz -1, kolajenaz-2, stromelysin) üretiminin artmasına neden olur. Polimorfonükleer hücreleri ortama çeken IL-8 veya T-hücre aktivasyonu yapan IL-15 gibi diğer sitokinler, inflamatuvar cevabın oluşmasında etkili olurlar. Romatoid artritte proteinazlar ve inhibitörleri arasındaki denge, eklem yıkımına neden olan proteinazlar lehine bozulmuştur ⁵⁷ (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Pannus gelişimi ⁵⁸

Sinovyumu döşeyen hücrelerin sayısında artış ile birlikte, mononükleer hücrelerin perivasküler infiltrasyonu görülmektedir. İnfiltrasyon yapan esas hücreler T lenfositleridir. CD4+ T hücreleri, CD8+ T hücrelerine göre daha baskındır. Işık mikroskopunda yapılan incelemede; sinoviyumu kaplayan hücrelerin hipertrofi ve hiperplazisini; mikrovasküler hasar, tromboz ve neovaskülarizasyon gibi fokal veya segmental damarsal değişikliklerini; ödemi ve sıklıkla küçük kan damarları etrafında agregatlar halinde toplanmış mononükleer hücre infiltrasyonunu içeren karakteristik bulgular saptanır ⁵⁹. Aktif durumdaki ve bol miktarda HLA DR molekülü içeren bu hücreler sinoviyumda antijen sunan hücrelerle yakın temas halindedir. Antijen sunan hücreler üzerinde bulunan antijenleri tanırlar ve bu tanıma sonucu sitokin salınımı, B hücrelerin uyarılması ve regülatuar fonksiyonlar gibi bir dizi immunolojik olay tetiklenir. T hücrelerin RA' nın ilk aşamasındaki rolü pek tartışma konusu değildir. Ancak kronik RA sinoviyumunda bu hücrelere ait sitokinlerden ziyade makrofaj sitokinlerin bulunması, patogenezde T hücre dışındaki immün effektör hücrelerin ve özellikle de makrofajların itici güç olarak rol alabileceği hipotezini doğrumuştur ²⁴. Aktive T hücreleri IFN- γ gibi sitokinleri üretirler ve bu daha sonra sinovyal iç yüzey

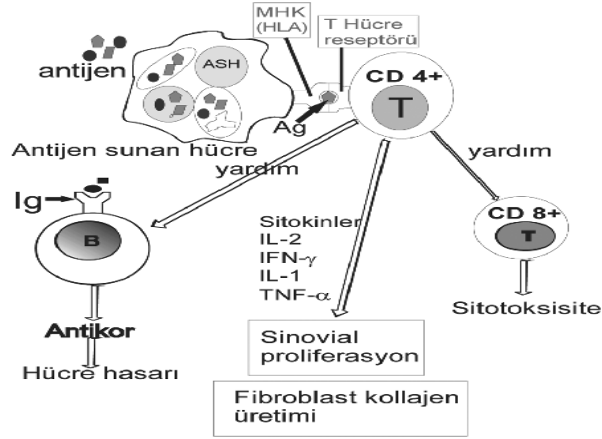
tabakasında monosit/ makrofaj birikimini stimule eder. Bu aktive makrofajlar sinovyumda proinflamatuvar mediatörleri salgılatır. Bu sitokinler (IL-1 ve TNF- α) endotelial hücre proliferasyonunu stimule eder ve endotelial hücreler üzerinde adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu başlatır, böylelikle lenfositlerin ve makrofajların trans-endotelial migrasyonuna katkıda bulunur⁶⁰ (Şekil 2.4).

Bu sürecin gerçekleşmesi için immün efektör hücreleri, öncelikle endotele yapışmaları, endoteli aşmaları ve sinovyuma göç etmeleri gerekir. Bu da adhezyon molekülleri sayesinde gerçekleşir. Bu moleküller lökositler üzerindeki çeşitli integrinler için ligandır. TNF- α , IL-1 ve IFN- γ interferon gamma gibi sitokinler bu adhezyon moleküllerinin sentezini artırır²⁴. Uyarılmış CD4+ T lenfositlerden salınan IL-2 ve diğer sitokinler makrofaj, B-lenfosit ve endotel gibi hücreleri etkiler. Makrofajlardan salınan IL-1 ve TNF- α gibi sitokinler inflamatuvar hücrelerin kemotaksisi, proliferasyonu ve diferansiyasyonu için gereklidir. B lenfositler aktive olarak plazma hücrelerine dönüşürler; RF ve benzeri antikoları salgılayarak doku ve eklem hasarında rolü olan immün komplekslerin oluşmasına neden olurlar⁶¹. Her iki hücre popülasyonu MMP, IL-1, TNF- α ve katapsin gibi romatoid artrit patogeneğinde önemli rol alan doku yıkımına neden olacak enzimleri üretebilirler⁵⁵.

Sitokinler immün hücrelerin haberleşmesini mümkün kılan immün proteinlerdir. Aktive olmuş Th-1 hücreleri, IFN- γ (İnterferon- γ) ve IL-2 gibi sitokinleri salgılayarak diğer T ve B lenfosit hücrelerini, makrofajları ve fibroblastları uyarır. IFN- γ monosit / makrofaj hücrelerinin sentez ve sekresyon fonksiyonlarını aktive eder. Aktive olan makrofajlardan sürekli IL-1 ve TNF- α gibi sitokinler salgılanır. IFN- γ ile inkübasyondan sonra monositler morfolojik, metabolik ve fenotipik değişiklikler gösterirler⁴⁴ (Şekil 2.4).

RA patogeneğinde, başlangıç stimülüs bilinmese de dokudaki inflamatuvar sürecin CD4+ T hücre aktivasyonu ile başladığı bilinmektedir. Antijen sunucu hücre yüzeyindeki HLA molekülüne bağlı bulunan antijenik peptid, T hücre reseptörü tarafından tanınmakta ve oluşan bu kompleks T hücrelerini uyararak sitotoksik yanıt, sitokin salınımı ve otoantikor yapımı gibi çeşitli efektör yanıtların başlamasını sağlamaktadır¹¹. Her iki sitokin de lenfosit kemotaksisini, angiogenezi, damar geçirgenliğini ve metalloproteinaz üretimini artırır. Ayrıca IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, granülosit-monosit

koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF), transforme edici büyüme faktörü (TGF) gibi sitokinlerin de önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Ortamdaki IL-1, IL-6, IL-17, IL-18, PG, TGF-beta sinovyal makrofaj ve fibroblastlardan VEGF salımmını artırır ¹¹.



Şekil 2.4. T hücresi ve RA arasındaki ilişki ⁴⁴

2.5. Tanı ve Klinik

Hastalığın seyri değişkendir; remisyon ve alevlenmelerle giden hafif-orta şiddette bir hastalık seyri yanında şiddetli eklem tutulumu gösteren ve ilerleyici eklem hasarına yol açan bir seyir de görülebilmektedir. Zaman içerisinde progressif eklem hasarının hızında azalma olmasına rağmen, en hızlı fonksiyonel kayıp hastalığın ilk iki yılı içinde ortaya çıkar. Bu nedenle hastaların erken tanısı ve tedavisi oldukça önemli ve yeni tanı alan veya erken dönem RA' lı hastalarda kötü prognostik faktörler araştırılmalıdır. Prognostik faktörlerin tanımlanması RA' lı hastanın kötü prognoz geliştireceğini ve erken agresif tedaviye ihtiyaç olacağını göstererek hastalığın sınırlanmasını sağlayacaktır. Ayrıca daha iyi prognozlu hastaların gereksiz yüksek doz tedavileri önlenerek hem toksisite hem de yüksek maliyet engellenmiş olacaktır ⁶². RA' nın kötü prognostik göstergelerinde;

- * 20' den fazla eklemden enflamasyon
- * Şiş eklem sayısının çokluğu
- * Kontrol edilemeyen inatçı poliartrit
- * Yüksek titrede RF pozitifliği
- * Anti-CCP ve Eritrosit Sedimentasyon Hızı (ESH) yüksekliği

- * İmmün kompleks varlığı
- * Eklem dışı bulguların varlığı
- * HLA- DR4 ve HLA- DRB1
- * Kadın cinsiyet
- * İleri yaş
- * Sinsi başlangıç
- * Fonksiyonel kapasitede ciddi kısıtlanma
- * Komorbid hastalıkların varlığı yer almaktadır. Bu nedenle hastalar tanı anında yukarıda belirtilen parametrelere göre değerlendirilmeli ve tedavi bu bilgiler altında şekillendirilmelidir ⁶³.

RA' lı hastaların ortalama yaşam beklentisi 3-7 yıl kadar azalmıştır. Artmış mortalite oranı, daha şiddetli eklem hastalığı olan hastalarla sınırlı gibi görünmektedir ve büyük oranda enfeksiyon ve gastrointestinal kanamaya bağlıdır. Son bulgular RA' lı hastalarda görülen artmış mortalitede kardiyovasküler hastalığın önemli rol aldığını göstermektedir. Atlantoaksiyal subluksasyon, krikoaritenoid sinovitis, Felty Sendromu, Sjögren Sendromu, pulmoner komplikasyonlar ve diffüz vaskülitisler gibi eklem dışı komplikasyonlar mortaliteyi artıran nedenlerdir ⁶⁴.

Hastaların yaklaşık üçte ikisinde halsizlik, iştahsızlık, yaygın güçsüzlük ve kas-iskelet ağrıları gibi belirtiler sinovit belirgin hale gelene kadar sinsi olarak olabilir. Bu dönem aylarca devam edebilir ve tanıyı güçleştirir ⁴⁰.

Hastaların % 8-15' inde akut başlangıç görülür ve birkaç gün içinde semptomlar tepe noktaya ulaşır ve sinsi başlangıca göre daha az simetrik patern vardır. Hastaların %15-20' sinde semptomların günler veya haftalar içinde ortaya çıktığı subakut başlangıç vardır ⁶⁵.

Palindromik tip başlangıçta ağrı, şişlik ve eritem genellikle bir eklemde veya periartiküler dokularda başlar; semptomlar bir kaç saat veya bir kaç gün içinde kötüleşir. Ataklar arasında asemptomatik dönemler vardır. Palindromik romatizması olan hastaların yaklaşık yarısında, özellikle HLA-DR4 taşıyanlarda daha sonra RA gelişir ⁶⁶.

Romatoid artrit ilk yıllarında klinik tabloya ağrı, şişlik, ısı artışı, hareket kaybı gibi enflamasyon bulguları hâkim iken, özellikle hastalığı kontrol altına alınmamış kişilerde ileri dönemlerde deformiteler, eklem instabilitesi ve fonksiyon kayıpları gelişir⁶⁷.

Progressif, kronik bir hastalık olan RA' da erken tanı ve tedavi ile hastalığın etkilerini azaltılacak ya da başlamadan ortadan kaldırılabilecektir. RA tanısı klinik, laboratuvar ve radyolojik bulguları ile konmaktadır. Tanı amacıyla American College of Rheumatology (Amerikan Romatizma Derneği, ACR) ilk olarak 1958 yılında RA tanı kriterlerini geliştirmiş, 1987 yılında da tekrar revize edilmiştir (Tablo 2.1). Bu kriterlerin duyarlılık ve özgüllüğü % 90' a yakındır.

Tablo 2.1. ACR tarafından 1987 yılında revize edilmiş RA tanı kriterleri⁶⁸

Kriterler	Tanımlamalar
Sabah sertliği	Eklem ve çevresinde en az 1 saat sürmeli.
3 ≥ eklem bölgesinde artrit	Doktor tarafından gözlemlenen yumuşak doku şişliğinin ya da eklem sıvısının eşlik ettiği en az 3 eklem bölgesinde; olası 14 nokta (sağ ya da sol): PIP, MCP, el bileği, dirsek, diz, ayak bileği ve MTP eklemleri
El eklemlerinde artrit	El bileği, MCP veya PIP eklemlerde olmak üzere en az bir alanda 6 hafta şişlik.
Simetrik artrit	Vücudun her iki tarafındaki eklemlerin eş zamanlı tutulumu (PIP, MCP ya da MTP' nin tutulumu tam simetri olmadan kabul edilebilir.) 6 hafta sürmeli.
Romatoid nodüller	Kemiksi çıkıntılarda ya da ekstansör yüzeylerde ya da jukstaartiküler bölgelerde doktor tarafından gözlemlenen subkutan nodüller
Serum RF	Anormal düzeylerde pozitif olması
Radyografik değişiklikler	RA için tipik olan, posteroanterior el ve el-bilek grafilerinde erozyon ve periartiküler dekalsifikasyon (osteoartrit değişiklikleri hariç)

PIP: Proksimal interfalangeal, MCP:metakarpofalangeal, MTP: metatarsofalangeal

ACR 1987 kriterlerine göre; RA tanısı için en az dört kriter varlığı ve ilk dört kriterin de altı haftadan uzun sürmesi gerekmektedir⁶⁸. Ancak RA morbiditesi yüksek, progresif ve eroziv bir hastalık olduğu için yukarıdaki tanı kriterlerinin klinik olarak oturması geri dönüşümsüz hasarlara neden olmaktadır, bu nedenle erken tanı oldukça önemlidir. Prognozu iyileştirmek, hastalığa daha erken tanı koymak, hastalığı daha etkin şekilde

tedavi etmek, tedaviye ait yan etkileri azaltmak amacıyla Avrupa Romatoloji Derneği (EULAR, European League Against Rheumatism) ve ACR 2010 yılında kullanmakta olduğumuz tanı kriterlerinde değişiklikler yapmıştır. Bu yeni tanı kriterleri klinik bulgulara (eklem bulguları ve semptom süresi) ve laboratuvar (akut faz reaktanları ve serolojik testler) sonuçlarına dayanmaktadır⁶⁹ (Tablo 2.2).

Bu dört ayrı kategori (eklem tutulumları, seroloji, akut faz reaktanları ve semptom süresi) kendi içinde skorlanarak puanlandırılır. RA tanısı için skor altı puan ve üzerinde olmalıdır.

Tablo 2.2. Avrupa Romatoloji Derneği (EULAR) ve ACR 2010 yılından bu yana kullanmakta olduğumuz tanı kriterleri⁶⁹

2010 EULAR / ACR Romatoid Artrit Tanı Kriterleri			
A.Eklem tutulumu	1 büyük eklem	0	DIP, 1. CMC ve 1. MCP dâhil edilmemiştir.
	2-10 büyük eklem	1	Küçük eklemler: MCP, PIP, 2-5 MTP, el
	1-3 küçük eklem	2	bileği ve başparmak IP eklemi
	4-10 küçük eklem	3	Büyük eklemler: Kalça, omuz, dirsek, diz,
	>10 eklem (en az 1'i k ekl.)	5	ayak bileği. Büyük eklem tutulumu var/yok.
B. Seroloji:	Negatif RF ve Negatif ACPA(Anti-CCP)	0	Zayıf pozitif: < 3 x lab üst sınırı Kuvvetli pozitif:> 3xlab üst sınırı
	Düşük Titre pozitif RF ve pozitif ACPA(Anti-CCP)	2	
	Yüksek pozitif RF ve Yüksek pozitif ACPA(Anti-CCP)	3	
C.Akut Faz Reaktanları:	Normal CRP ve Normal ESH	0	
	Anormal CRP veya Anormal ESH	1	
D.Semptom süresi:	< 6 hafta	0	
	> 6 hafta	1	
Toplam Skor *	≥ 6 puan		

DIP: Distal interfalangeal, CMC: Carpometacarpal, PIP: Proksimal interfalangeal, MCP: Metakarpofalangeal, MTP: Metatarsofalangeal *A-D kategorileri değerlendirilerek skorlar toplanır ve kesin RA tanısı için skor toplamı ≥6 olmalı.

Bu dört ana kriter dışında tanı koymak için artık sabah tutukluğu, romatoid nodül varlığı ve radyolojik bulgu gerekmemektedir. Semptomların 6 haftadan uzun olması şart

değildir. En az bir eklemden sinoviyal ve skorlamada 6 – 10 arası puan varsa ve sinoviyal açıklayan daha iyi başka bir tanı yoksa hastalık RA' dır diyebiliriz.

2.5.1. Romatoid artrit bulguları

2.5.1.1. Eklem bulguları

RA' da genellikle simetrik eklem tutulumu gözlenmektedir olup hastalığın erken evrelerinde tutulum tek taraflı da olabilmektedir. En sık tutulan eklemler metakarpofalangeal (MCP), proksimal interfalangeal (PİP) eklemler ve el bileği, diz ve metatarsfalangeal (MTP) eklemler, omuz, ayak bileği ve subtalar eklemler, dirsek, servikal omurga, kalça eklemleridir. Büyük eklem tutulumu daha az sıklıkta olup genellikle küçük eklem tutulumu sonrasında ya da hastalığın ileri dönemlerinde gözlenir.

RA, diartrodial eklem tutulumu ile karakterizedir ve patolojisinin ana bölgesi eklemlerin sinoviyumudur⁷⁰. Eklemlerde inflamasyonun üç kardinal bulgusu (ısı artışı, hassasiyet, şişlik) bulunurken kızarıklık görülmez. İnflamasyon eklemden ağrı, tutukluk ve hareket kısıtlılığına neden olur¹. RA tüm sinoviyal eklemleri etkileyebilir ve hastalık çoğunlukla MCP, PİP ve MTP eklemlerde başlar ve ardından el bilekleri, dizler, dirsekler, ayak bilekleri ve kalçalar tutulur. Daha az sıklıkla temporomandibüler, sternoklaviküler ve krikaritenoid eklemler de tutulabilir. Boyun dışında omurga tutulumu olmaz⁷¹. Torakolomber, sakroiliak ve elin distal interfalangeal (DİF) eklemlerinin tutulumu RA' da çok nadirdir¹².

El ve el bileği eklemleri: RA en zengin ve karakteristik özelliğini el ve el bileği eklemlerinde gösterir. Bilek ekleminin sinoviyal RA' nın değişmez bir özelliğidir. Erken dönemlerde tenosinoviteye bağlı olarak MCP ve PIP eklemlerde lokal, simetrik şişlikler ortaya çıkar. El ve el bileğindeki inflamasyona bağlı olarak ısı artışı, ağrı, hassasiyet, tutukluk ve hareket kısıtlılığı görülür. Bu dönemde müdahale edilmezse MCP' de subluksasyon ve ulnar deviasyon, el bileğinde radyal deviasyon olur. Tipik olarak kuğu boynu (swan neck) ve düğme iliği deformiteleri (boutonniere), birinci parmakta Z deformitesi gelişebilir⁶⁵. El bilek ekleminin ekstansiyon, parmakların fleksiyon yönünde kısıtlanması sık görülür. Eklemler dışında fleksör ve ekstansör tendon tutulumları ve interosseal kas atrofisi görülebilir. RA' da parmaklarda fleksör tenosinoviteye bağlı tetik parmak, tendon rüptürleri sık görülür. Karpal tünelin fleksör

tenosinoviti median sinir kompresyonuna neden olarak karpal tünel sendromu gelişebilir ve bunun sonucunda tenar atrofi görülebilir. Erken artrit döneminde bileklerde ekstansiyon kısıtlılığı gelişir. İlerleyen dönemlerde eroziv hasarlar meydana gelebilmektedir ⁷².

Ayak ve ayak bileği eklemleri: RA' lı hastaların % 16-20' sinde ilk semptomlar ayak eklemlerinde görülürken, hastalığın gidişi boyunca ayak tutulumu % 90' na ulaşmaktadır. Ayak bileği tutulumu hem siktir, hem de erken dönemde görülür. Yük taşımaları nedeni ile bu eklemlerin tutulması diğer eklemlere nazaran daha fazla ağrı ve hareket kısıtlılığı yaratır. Ayakta en sık metotarsofalangeal, subtalar ve transverstalar eklemler tutulur ⁴⁷. nayakta özellikle MTP eklemleri daha sık tutulur ve özellikle beşinci MTP eklemi elden daha erken dönemde ve daha sıklıkla aşınmaktadır ⁷³. MTP ekleminin tutulumuna bağlı metatars başlarının aşağı subluksasyonuna neden olur. PIP eklemlerinin dorsal yöne protrüze olmasına bağlı eki parmak deformitesi görülür ⁶⁵. Başparmağın tutulumu sonucunda tipik halluks valgus deformitesi gelişir ¹¹. Orta ve arka ayak eklemlerinin sinoviti daha az sıklıkta görülür ve en sık tutulan bölgeler talonaviküler, kalkaneoküboid ve subtalar eklemlerdir ⁷⁴. Medial malleolun hemen arkasında bulunan ve posterior tibial sinirin geçtiği tarsal tünelin sinovit sonucu sıkışması ile ayak tabanında yanma ve uyuşmalar görülebilir. Arka ayakla ilgili problemler arasında subaşiller bursit ve retrokalkaneal bursit de sayılabilir ¹¹.

Dirsek: Dirsekte ekstansiyon kısıtlaması en erken bulgudur. Dirsekler sık tutulan ve Romatoid nodüllerin en sık görüldüğü eklemlerdir. Dirsekteki lezyonlar tuzak nöropatisine neden olabilirler ⁵⁶.

Omuz: Omuz tutulumu ilerleyici ve hastalığı geç dönemde olan hastalarda daha sık görülür. Omuz ekleminde erozyon geç çıkar ve genellikle, humerus başı ve glenoidal fossada erozyon ve hasara yol açar ⁴⁶.

Diz: Diz eklemi, hastaların % 15 kadarında ilk tutulan eklemdir. Sinovyal sıvının popliteal fossaya doğru ilerlemesi sonucu Baker kisti oluşur.

Vertebral kolon: RA'da servikal vertebrada en sık atlantoaksiyel eklem tutulumu görülür. Burada sinovit nedeni ile odontoid çıkıntı foramen magna doğru hareket ederek servikal kordu sıkıştırabilir bu durum önemli nörolojik sonuçlara yol açabilir ⁷⁵. Vertebra tutulumu servikal bölge ile sınırlıdır ve daha çok hastalığın ileri evrelerinde görülür ⁶⁵.

Kalça: Genellikle hastalığın ileri evrelerinde tutulur. İleri evrelerde rotasyon ve abduksiyon kısıtlılığı oluşur. Femur başı çökebilir ve rezorbe olabilir, asetabulumun şekli değişip, mediale doğru itilerek asetabuler protrüzyona yol açabilir ⁶⁵.

Diğer eklem tutulumları: Romatoid artrit, temporo mandibüler eklemleri tutarak çenede ağrı ve açılma kusuru, krikoaritenoid eklemi kırırdağını tutulumu sonucu ses kısıklığı veya seste kalınlaşma, inspiratuar stridor görülebilir. Ek olarak iç kulaktaki küçük kemikleri tutarak işitmede azalma görülebilir ⁷⁶. Romatoid artritte dorsal ve lomber vertebralar tutulmaz. Yakınması olan hastalarda olası başka nedenler akla gelmelidir.

2.5.1.2. Ekstraartiküler bulgular

RA, özellikle eklemlerin ön plana çıktığı bir hastalık olmakla birlikte her organ sistemini tutabilen sistemik bir hastalıktır. Artrit kliniği başlamadan önce yorgunluk, kilo kaybı gibi sistemik bulgular ortaya çıkar ²⁸. Eklem dışı tutulumun ciddiyeti mortalitenin en önemli belirleyicisidir ⁷⁷. Anemi aktif RA' lı hastalarda sık rastlanan bir bulgudur. En sık normokrom normositer tipte olan kronik hastalık anemisi görülür. Bunun dışında genellikle ilaçlara bağlı gastrointestinal kanamalar sonucu ortaya çıkan demir eksikliği anemisi veya folik asit yetmezliğine ya da kullanılan sitotoksik ilaçların neden olduğu makrositer anemi de görülebilir ²⁸.

Romatoid nodül: Romatoid nodüller, hastalık süresince hastaların % 30-40' ında görülür ⁷⁸. RA' da görülebilen Felty' s sendromunda ise romatoid nodüller % 75 oranında görülebilmektedir ⁷⁹. Nodüller genellikle dirseklerde yer alıp aşil tendon, sakral bölge ve oksipital alanda da görülebilir. Yapıca sert kıvamda olup, sıklıkla periosteuma yapışıktır. Histolojik olarak küçük damar vaskülitine bağlı olduğu düşünülen fibroblastlarla çevrili santral fibrinoid nekroz vardır. RF pozitifliği olan RA' lı hastaların yaklaşık % 20' sinde görülür. RF negatif olanlarda ise daha nadir rastlanan

bir bulgudur. Romatoid nodüller hastalığın aktivitesini ve şiddetini yansıtır⁸⁰. Nodüller hastalığı modifiye edici ajanlarla tedavi edildiğinde gerileyebilir. Ancak tam olarak bilinmeyen bir nedenle Metotreksat (MTX) kullanan hastalarda nodüllerin büyüklüğünde ve sayısında gözle görülür artış meydana gelebilir. Bu nodüler artış zaman zaman azotiyoprin, etanersept ve leflunomid tedavisi sırasında da oluşabilmektedir⁸¹.

Pulmoner tutulum: RA' da akciğer patolojisi hastalığın kendisine veya kullanılan ilaçlara, özellikle de MTX bağlı olarak gelişebilir. Erken hastalık dönemindeki ilk bulgu interstisyel lenfositik infiltrasyondur. Sıklıkla germinal merkezlerinde lenfositik agregatları içeren peribronşiyoler foliküller görülür ve hastalık süresince kistik değişiklikler ve bal peteği görünümü oluşur⁸¹. Ana patoloji alveolo-kapiller gaz değişiminde yetmezlik ve difüzyon kapasitesindeki azalmadır. Bu hastalarda öksürük, dispne, kilo kaybı, ateş görülebilir. RA' da diğer görülen sık tutulumlardan biri de plörezi. Plörezi genellikle asemptomatiktir. RA' da plevra sıvısı örneklendiğinde, hücre sayısının düşük olduğu (<5000/mm³) , sıvının lenfosit hâkimiyeti gösterdiği, düşük glukoz düzeyi olduğu (sıvı glukozu: serum glukoz <0,5) , PH <7,3 ve LDH düzeyi 700 IU / L< olarak saptanır. Plevral efüzyon spontan olarak gerileyebilir veya tedaviyi gerektirebilir. Sürekli efüzyon fibrozise neden olabilir⁸². Pulmoner hipertansiyon, romatoid vaskülit sonucu gelişen nadir bir tablodur ve prognozu kötüdür⁶⁷. RA tedavisinde kullanılan ilaçlardan MTX ve Sülfasalazin (SSZ) akciğere yan etkisi olabilecek ajanlardır⁸³.

Oküler tutulum: RA, hastaların % 1' inden azında gözü tutar. En sık oküler bulgu % 5 oranında görülen Sjögren sendromunun bir komponenti olan keratokonjonktivitis sikka olup hastalığın geç dönemlerinde daha sıktır, ancak hastalık şiddeti ile bir ilişki göstermez. Bunun dışında % 5' den daha az olarak episklerit, sklerit, üveit, episkleral nodülozis ve ülseratif keratit tutulumları olabilir^{65,80}. RA' da kullanılan ilaçlar da gözü etkileyebilir. Steroid kullanımı katarakt ve glokoma, antimalaryal ilaçlar ise keratopatiye ve retinopatiye neden olabilir⁶⁷.

Nörolojik tutulum: RA' da periferik sinirlerin lokal basısına bağlı olarak karpal tünel sendromu, tarsal tünel sendromu gibi tuzak nöropatilerine sık rastlanır. Vaskülitte bağlı olarak sensörial ya da sensörimotor karakterde periferik nöropati gelişebilir. Servikal

vertebra subluksasyonlarına bağlı olarak servikal myelopati görülebilir ⁸⁴. Santral sinir sisteminde ise; serebral vaskülite, amiloidoza ve nodüllere bağlı olarak inme, nöbet, kanama, ensefalopati ve menenjit de görülebilir ¹.

Karaciğer tutulumu: Aktif RA karaciğer enzimlerinin yükselmesine neden olabilir. Tedavide kullanılan MTX, Leflunomid, Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar (NSAİİ) karaciğer toksisitesine neden olabilir ¹.

Vaskülit: Vaskülit, inflamatuvar sürecin vasküler yatağı etkilemesiyle oluşan, nadir görülen, geç dönem komplikasyonudur. RA' da çeşitli sistemleri ilgilendiren bulgular, açıklanamayan sistemik belirtiler ve kilo kaybı ortaya çıktığında romatoid vaskülit akla gelmelidir. Klinik olarak tırnak dibi kapillerinde tromboz ve enfarktlar, parmak uçlarında ve bacaklarda ülserler, piyoderma gangrenosum, palpabl purpura, kalp, akciğer ve diğer sistemleri tutabilen vaskülit görülebilir. Sistemik romatoid vaskülit bu hastalığın en korkulan komplikasyonlarından birisidir. RA' da vaskülit gelişimi için; yüksek titrede RF pozitifliği, nodlozis bulunması veya scleritin olması risk faktörüdür. Eklem harabiyeti olan hastalarda daha sık gelişir fakat eklem bulgularının aktif olmadığı dönemlerde de görülebilir. Vaskülit gelişen RA' lı hastaların % 90' ı cilt tutulumuyla presente olur ⁸⁰. Klasik bulgusu alt ekstremitede yerleşen derin kutanöz lserleridir. Orta çaplı damar tutulumuyla digital iskemi, nekroz, gangren oluşumu görülebilmektedir ⁸⁵.

Felty' s sendromu (FS): Seropozitif ve nodüllü hastalarda görülen bir geç dönem komplikasyonudur. Özellikle ntropeni ve splenomegali klasik klinik bulgularını oluşturur. RA' nın seyri süresince % 1 FS gelişme riski vardır. Bacak ülserleri, pigmentasyon artışı, hepatomegali, lenfadenopati, trombositopeni de görülebilir. Hastaların hemen hepsinde ESH yüksek saptanır ^{1,86}.

Renal tutulum: RA' da oldukça nadir olmakla birlikte düşük dereceli membranöz nefropati, glomerülonefrit, vaskülit ve sekonder amiloidoz görülebilmektedir. Renal tutulumun varlığı mortaliteyi arttıran nedenler arasındadır. Renal değişiklikler genellikle RA' da kullanılan ilaç toksisitesine bağlıdır. Özellikle altın tuzları, D-penisilamin, Siklosporin ve NSAİİ' ler renal tutulumdan sorumlu olabilmektedir ^{65,86}.

Amiloidoz: Uzun süreli aktif hastalığı olan hastalarda sekonder amiloidoz gelişebilir Amiloid AA tipidir ve geç dönem bulgusudur. Kronik inflamasyona yanıt akut faz reaktanı olarak ekstraselüler alanda serum amiloid protein A birikebilir. Proteinüri en belirgin bulgusudur. Kalp, barsak, karaciger ve cilt tutulabilir. Prognozu kötüdür ve kesin tanı için doku biyopsisi önerilir ^{1,87}.

Kardiak tutulum: RA' da kardiyak hastalıklar granümatöz inflamasyon ve vaskülit ile ilişkili olarak birçok şekilde olabilir. Kalp tutulumu en sık perikardit olmakla birlikte miyokardit, endokardit ve koroner vaskülit de görülebilir. Otopsi serilerinde perikardit oranı %50'lerdedir. İnflamatuvar romatoid nodüller miyokarda ve kapaklarda görülebilir kapak disfonksiyonlarına, embolik olaylara ve iletim bozukluklarına neden olabilirler. Bununla beraber koroner arterler de nadiren tutulabilir ⁸⁴. Artmış ateroskleroza bağlı, iskemik kalp hastalığı riski de RA hastalarında artmıştır ⁶⁷.

Kas-iskelet sistemi: Pannus dokusu komşu kemiğe invaze olarak kistik erozyonları oluşturur. RA' da enflamasyona bağlı olarak kemik rezorpsiyonu artmıştır ve buna bağlı olarak erozyonlar, periartiküler osteopeni ve yaygın olarak osteoporoz gelişebilir. RA' da daha çok tutulan eklemlere yakın kaslarda atrofi şeklinde tutulum görülür ve en çok interosseöz kaslarda ve kuadrisepte olur ⁸⁴. D-penisilamin kullanımına bağlı diffüz polimiyozit, Hidroksiklorokin (HCQ) kullanımına bağlı nöromyopati ve kronik kortikosteroid kullanımına bağlı kas atrofisi görülebilir ⁶⁴.

Kanser sıklığı: RA' lı hastalarda Hodgkin hastalığı, Non-Hodgkin lenfoma ve lösemi gibi kanserler immünsüpresif tedaviden bağımsız olarak normal bireylere oranla 2-3 kat artmıştır ⁴⁶.

2.5.1.3. Radyolojik bulgular

RA kronik, eroziv ve progresif bir hastalıktır. Bu nedenle erken tanısı oldukça önemlidir. 1987 ACR tanı kriterlerinde radyolojik bulgular yer alırken, 2010 ACR / EULAR klavuzunda tanı kriterleri arasından çıkartılmıştır. Böylelikle henüz radyolojik bulgular başlamadan, erken evrede RA tanısına ulaşmak hedeflenmiştir. Eklem tutulumu ön planda olan RA' da radyolojik bulgular hastalık tanısında ve takibinde önemli bir yere sahiptir. RA' lı hastalarda kullanılan görüntüleme yöntemleri

konvansiyonel radyografi (X-Ray), ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi, artrografi, kemik sintigrafisi ve magnetik rezonansdır (MR). En sık kullanılan yöntem olan X-Ray yöntemi erken evre hastalık döneminde genellikle normal olarak bulunmaktadır. Bu dönemde daha çok yumuşak dokuya ait değişiklikler ve periartiküler osteopeni saptanabilir⁸⁸. MR ile görüntüleme erken evre değişiklikleri saptamada radyografiye göre daha duyarlıdır. USG ise özellikle inflamasyonun boyutunu ve dokudaki inflamatuvar değişiklikleri gösterir. Eklemler, bursa ve tendon kılıflarındaki sıvı USG ile saptanabilir ve entesopati de değerlendirilebilir.

Radyografi bulgularını erken ve geç dönem olarak ayırabiliriz. Erken evre bulgularında; yumuşak doku şişliği, eklem komşu kemiklerde osteopeni/osteoporoz, eklem aralığının daralması, eklem yüzleri ve çevresinde erozyonlar bulunmaktadır. Bulgular tek taraflı olabilmektedir. Geç evre bulgularında ise; luksasyon ve subluksasyonlar (ulnar deviasyon, atlantoaksiyel subluksasyon vb), deformateler (kuğu boynu, düğme iliği vb.), radyolojik bulgular genelde simetriktirler.

2.5.1.4. Laboratuvar bulguları

RA sistemik inflamatuvar hastalık olduğu için birçok laboratuvar testinde anormallik saptanabilir. Romatoid artritte kesin tanıyı koyduracak özel bir laboratuvar testi yoktur, ancak çeşitli ve özgün olmayan laboratuvar bulguları mevcuttur. Bunlar tanı koyma, prognoz ve uygulanacak tedavide yol göstericidir⁸⁴. RA tanısında laboratuvar testleri, ayrıntılı bir öykü ve fizik bakımın yerini alamaz, ancak klinik değerlendirmeyi tamamlar. Laboratuvar testleri, tanı koymak dışında, RA aktivitesinin izlenmesinde ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de oldukça önemlidir⁸⁹. Tek bir tanısal test ile RA tanısı kesin doğrulanamaz. ACR, Romatoid Artrit Alt Komitesi'nin tavsiye ettiği bazı temel laboratuvar testleri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2' de görülmektedir⁹⁰. Yeni tanı kriterlerinde laboratuvar bulguları önem kazanmıştır. Bu nedenle RF, ESH ve CRP tanı amaçlı yakınması olan her hastada tetkik edilmelidir.

TSH: Tiroid bezi, tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) salgılar, kolloidde depolar, TSH tiroid bezinden plazma membran reseptörleri aracılığıyla T4 ve T3' ün oluşumundaki bütün basamakları uyarır. Tiroid hormonlar basal metabolizma hızını, kardiyak outputu ve ventilasyonu artırır, periferik direnci düşürür, ısı oluşumunda artışa yol açar ve terlemeyi artırır. 1993 yılında Shiroky ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada RA' lı kadın hastalarda

TSH' in üç kat arttığı gözlemlenmiş aynı şekilde 1996 yılında Andonopoulos ve arkadaşlarının ve 2000 yılında Staykova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda RA' lı hasta grubunda TSH' in anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur^{91,92}. Benzer şekilde Şentürk ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada da RA' lı hasta grubunda relatif olarak tiroid hormon seviyeleri yüksek bulunmuş ve daha önceki çalışmalarla desteklendiğini vurgulamıştır⁹³. Ancak 2001 yılında Welby ve arkadaşları RA' lı hasta grup ile sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark bulamamıştır⁹⁴. Bütün çalışmalar değerlendirildiğinde hormon yüksekliği ile ilgili bir klinik bulgu yoktur. Bu yüzden hormon seviyesinin yüksekliği ile otoimmünite açıklanamamıştır. Sebebi ise RA' lı hastaların kullandıkları uzun etkili ilaçların böyle bir sonuç ortaya koyabileceğidir.

Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH): ESH, akut faz proteinlerindeki artışı ve buna bağlı inflamasyonun şiddetini dolaylı olarak gösteren bir testtir. Genellikle hastalık aktivitesi ile bağlantılı olarak artış gösterir ve tedaviye cevabın iyi bir göstergesidir⁸⁴. ESH, plazma fibrinojen düzeyine bağımlı olduğu için, CRP' ye göre daha geç yükselir ve daha geç düzelir⁵⁶. ESH yaşla beraber artmaktadır. 50 yaş altında; erkekte 15 mm/saat, kadında 20 mm/saat, 50 yaş üstünde erkekte; 20 mm/saat, kadında 30mm/saat'in altındaki değerler normal olarak kabul edilmektedir⁹⁵.

Lökositler: Hafif lökositozla beraber normal beyaz küre dağılımı mevcuttur. İnflamatuvar artrit varlığını doğrulamada yararlıdır ancak bulgulardan hiçbiri özgün değildir. Viskozitesi azalmış, protein içeriği artmış ve glukoz konsantrasyonu normal ya da hafifçe azalmıştır. Beyaz küre sayısı 5000-50,000/ μ L arasında olup polimorfonükleer lökositler baskındır⁹⁶.

Trombositoz: Sistemik nekrotizan vaskülitlerin önemli laboratuvar bulgularından birisidir. Bunun yanısıra romatoid artritli hastalarda özellikle pulmoner tutulumu, periferik nötropenisi ve vaskülitli bulunan vakalarda trombositoz sıklıkla rastlanır. Romatoid artritli hastalarda hastalık aktivitesi ile trombosit sayısı arasında belirgin bir ilişki söz konusudur¹. RA' da lökosit sayısı genelde normaldir, ancak aktif hastalarda sıklıkla lökositoz ve trombositoz saptanabilir. Trombosit düzeyleri hastalık aktivitesi ile koreledir. Felty' s sendromu veya ilaçlara bağlı lökopeni ve trombositopeni olabilir⁸⁰.

Akut faz reaktanları: Vücudumuzda sistemik bir inflamasyon geliştiğinde, pro-inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle, karaciğerden, akut faz proteinleri sentezlenerek dolaşıma salınır. Yalnızca RA gibi otoimmün romatolojik hastalıklarda değil, enfeksiyonlar ve malignitelerde de akut faz proteinlerinin serum düzeyleri yükselir. Yani, akut faz proteinleri herhangi bir patoloji için özgün olmayan, ancak inflamasyonun düzeyini yansıtan göstergelerdir. Akut faz yanıtının yüksekliği RA düşünülen hastada tanıyı destekler ve hastalık aktivitesinin ve uygulanan tedaviye alınan yanıtın takibinde önemlidir ²⁸.

C-Reaktif Protein (CRP): Tüm insanlarda CRP plazmada eser miktarlarda (<0,2 mg/dl) bulunur. Karaciğerden salgılanmaktadır ve kompleman aktivasyonunu ve opsonizasyonu uyararak konakçı savunmasına yardımcı olduğu belirlenmiştir. Özgül antikorların geliştirilmesiyle yüksek sensitif CRP (HsCRP) denen bir kavram ortaya çıkmış ve ölçümlerin duyarlılığı artmış ve saptanabilir alt limit düşmüştür. CRP'nin serum konsantrasyonu, inflamatuvar uyarıyı takiben doku hasarının miktarı ile orantılı olarak hızlı bir artış gösterir ⁹⁶. Hastalık aktivitesini belirlemede CRP' nin ESH' den daha duyarlı olduğu kabul edilmiştir ⁹⁷. Yüksek seviyelerde seyretmesi ve düşmemesi eklem yıkımı ve eroziv hastalığın göstergesidir ¹. CRP; önemli bir akut faz reaktanı olup inflamasyon durumunda 6 saat gibi kısa bir sürede serumda yükselmeye başlar. ESH gibi hastalık aktivitesi ile paralel artış gösterir ⁹⁸.

Karaciğer fonksiyon testleri: Alkalen fosfataz seviyeleri normal veya hafif artar ⁹⁰. Sistemik juvenil kronik artritli, romatoid artritli, sistemik lupus eritematozuslu ve sistemik nekrotizan vaskülitli vakalarda karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk görülebilir. Ayrıca hastalığı modifiye eden ilaçların (sülfasalazin, azatioprin, metotreksat vb) karaciğer üzerine olan toksik etkileri nedeniyle de karaciğer fonksiyon testleri bozulabilir.

Romatoid faktör (RF): RF' ler, IgG molekülünün Fc kısmındaki antijenik belirleyicilere karşı gelişen otoantikorlardır ⁹⁹. RF' ler IgM, IgE, IgA ve IgG sınıfından olabilir ancak rutin laboratuvarında en sık görüleni IgM tipindedir. RF, RA tanı kriterlerine alınmış tek serolojik kriterdir ve hastaların %70- 80' ninde bulunur. RF, sağlıklı kişilerin yaklaşık % 5' inde bulunur. Genel populasyonda RF' nin sıklığı yaş ile artar ve 65 yaşın üzerindeki kişilerin %10- 20' sinde test pozitifdir ⁶⁵.

Klinik olarak belirgin RA' sını olan hastaların % 20' sinde RF negatif olabilir. Çünkü RF, RA' ya spesifik değildir ve bazı otoimmün, lenfoprolifatif, romatizmal hastalıklarda ve çeşitli bakteriyel, parazit ve viral enfeksiyonlarda pozitif olabilir¹⁰⁰. RF varlığı daha aktif hastalıkla ve kemik erozyonlarının gelişmesi ile ilişkilidir¹⁰¹. RF normal değerleri laboratuvara bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle < 20 IU/ml' dir¹⁰².

RA tanısında çok sık kullanılan bir test olmasına karşılık, RF varlığının RA tanısını belirlemedeki prediktif değeri düşük olduğu için RF pozitifliği RA tanısını koydurmaz. Bu nedenle bir tarama işlemi olarak kullanışlı değildir. Ancak, klinik olarak Şüphelenilen bireylerde tanıyı doğrulamak için RF bakılabilir. RF varlığı prognostik açıdan önemlidir.

RF' nin patogenezdaki yeri tam bilinmemekle beraber daha ciddi hastalık seyri ve eklem-dışı tutulum ile ilişkilidir. RF, RA için özgül değildir. Akut-kronik inflamasyonlarda (HCV enfeksiyonu, tüberküloz, bakteriyel endokardit vb.), otoimmün hastalıklarda (sistemik lupus eritematoz, sistemik skleroz), kronik karaciğer hastalıkları, sarkoidoz ve bazı malignitelerde de pozitif saptanabilir.

Kreatin kinaz (CK): CK hücrelerde enerji akışının kontrolünde fonksiyon gören bir enzimdir. Klinikte daha çok iskelet ve kalp kası hastalıklarının değerlendirilmesinde kullanılır. Daha önce Giltay ve ark. ankilozan spondilitli hastalarda kas orijinli biyokimyasal değerlerin CRP ile korele olarak arttığını göstermiştir. Ardından Sanmarti ve arkadaşları ise RA hastalarında serum CK aktivitesinin belirgin azaldığını ve bunun da hastalığın inflamatuvar aktivitesine bağlı olduğunu göstermiştir. Son olarak da Özbalkan ve arkadaşının yaptığı çalışmada sonuçlar Sanmarti ve ark ile uyumlu çıkmıştır. Bu bulgular inflamatuvar cevabın kas metabolizması üzerindeki etkilerinin daha ileri araştırılmasını stimule edebilir^{103,104}.

Kreatinin: Kas metabolizmasının önemli bir son ürünüdür ve böbreklerden idrar ile atılır. Böbrek fonksiyonları bozulursa atılım yavaşlar ve kanda kreatinin yükselir. Böbrek yetmezliğinin değerlendirilmesinde en güvenilir test metodu olmakla birlikte, kaslardan kaynaklandığı için vücut kas kitlesi miktarından etkilenebilmektedir. Bu nedenle yaşlı ve zayıf bir kadında böbrek yetmezliği varlığına rağmen kreatinin

düzeyleri normal bulunabilir. Uzun süren açlıkta, romatoid artrit, kas hastalıklarında, hormonal bozukluklarda, enfeksiyon, yanık ve kemik kırılmalarında da kreatinin düzeyleri yükselebilmektedir.

Ürik asit: Ürik asit yüksekliği, gut gelişimi için risk faktörüdür. Normal ürik asit düzeyi, erkekler için 7, kadınlar için 6 mg/dL üzeri kabul edilebilir. Ancak her ürik asit yüksekliği, gut hastalığı geliyeceği anlamına gelmemektedir. Artmış ürik asit miktarları eklem içinde kristallere sebep olur; bu da eklem inflamasyonuna ve gut hastalığının karakteristik ağrısına sebep olur. Aspirin ürik asit seviyesinde değişikliğe yol açabilir. Düşük dozda aspirin alımı (arada sırada aspirin alanlarda) kan ürik asit seviyesini artırabilirken, yüksek dozda alınan aspirin ise (romatoid artrit tedavisinde olduğu gibi) ürik asit seviyesini düşürebilir.

LDH: Plevral tutulum romatoid artrit en sık görülen intratorasik formudur. Otopsi çalışmalarında RA tanısı olan hastalarda plevra tutulumu %35-73 olarak bildirilmiş ve kliniğe yansıyan RA'ye bağlı plevral efüzyon ise %3-5 oranında saptanır¹⁰⁵. Romatoid plörezi plevral sıvı glukoz ve pH düzeyi düşük, LDH düzeyi yüksektir¹⁰⁶.

Tablo 2.3. Romatoid Artrit ile İlişkili Laboratuvar Bulguları

Laboratuvar Testi	İlişkili Bulgu
<i>CRP</i>	Tipik olarak 7 mg/L'yi aşar; hastalığın takibinde kullanılabilir.
<i>ESH</i>	Genellikle 30 mm/saat 'i geçmektedir; hastalığın takibinde kullanılabilir.
<i>Hemoglobin</i>	Düşüş vardır. Yaklaşık 10 g/dL'dir; normokromik anemi, aynı zamanda normositik veya mikrositik olabilir.
<i>Lökosit</i>	Artmış olabilir
<i>Trombositler</i>	Genellikle artmıştır
<i>Karaciğer fonksiyon testleri</i>	Normal veya hafifçe artmış alkalen fosfataz.
<i>RF</i>	Hastalarda hastalık başlangıcından 6-12 ay sonra tekrar edilebilir; pek çok durumda da pozitif olabilir (ör, SLE; skleroderma; Sjögren sendromu; neoplastik disease); hastalık progresyonunun tam bir göstergesi değildir.
<i>Antisiklik sitrulline peptid antikorlar</i>	Progresyon ile iyi koreledir; RF ile kombine kullanıldığında sensitivitesi artar; RF'den daha spesifiktir; pek çok laboratuvar ölçülemez.
<i>Antinükleer antikorlar</i>	Romatoid artrit tanısında sınırlı değeri vardır.
<i>Kompleman düzeyleri</i>	Normal veya artmış olabilir.
<i>İmmünoglobulinler</i>	α -1 ve α -2 globulinler artabilir.
<i>Sinovyal sıvı incelemesi</i>	Genellikle fibrin ağları olan saman rengi sıvı gözlenir; oda ısısında pıhtılaşabilir; 5000-25000/mm ³ beyaz hücre içerir; bunların da %85'i polimorfonükleer lökositler; kültürde üreme olmaz; kristal yoktur; glukoz düzeyi tipik olarak düşüktür.
<i>İdrar incelemesi</i>	Bağ dokusu hastalıklarında mikroskobik hematüri veya proteinüri olabilir.

2.5.2. Hastalık aktivasyonunun / remisyonunun değerlendirilmesi

RA' da hastalık aktivitesinin saptanması, hastanın takip ve ilaçlara cevabının değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir. Romatizmal hastalıklarda hastalık aktivitesi karmaşık ve kompleks bir oluşumdur. Bu nedenle birçok değişken olduğu için RA klinik ve fonksiyonel olarak değerlendirmesi zor olan bir hastalıktır. Hastalık aktivitesi genellikle klinik, laboratuvar ve radyolojiden oluşan kombinasyonlarla değerlendirilir.

Enflamasyon; eklem hassasiyeti, şişliği, ısı artışı, eklem hareket açıklığı, kavrama gücü ve yürüme zamanı gibi parametrelerle objektif olarak değerlendirilebilir ¹⁰⁷. Klinik olarak aktivasyonu saptamak için sabah tutukluğu süresi, ağrı ve yorgunluk gibi parametreler GAS (Görsel Ağrı Skoru) gibi skalalar ve çeşitli eklem indeksleri (Ritchie artiküler indeksi, Lansbury skalası, Thompson skalası gibi) kullanılabilir ¹⁰⁸. DAS 28 (Disease Activity Score; Hastalık Aktivite Skoru) eklem şişliği, eklem hassasiyeti ve ESH, CRP gibi parametrelerin kullanarak hastalık aktivitesini değerlendiren ve sık kullanılan bir skorlama yöntemidir.

Akut faz proteinleri aktivite tayini ve tedaviye cevabı değerlendirmede kullanılmaktadır. İzole değerler aktivite tayininde önemli iken, seri ölçümler hastalık seyrinin monitorizasyonunda önem kazanır ¹⁰⁹.

Radyolojik olarak Kellgreen, Larsen, Sharp tarafından değişik skorlama sistemleri geliştirilmiştir. RA' da hastalığı ortadan kaldıran bir tedavi yönteminin olmadığını ve amacın remisyonu sağlamak olduğu bilinmelidir ¹¹⁰. RA' ya göre hastalığı remisyonunda kabul etmek için aşağıdaki kriterlerden 5' inin en az 2 ay süre ile gerçekleşmesi gerekir;

1. 15 dakikayı aşmayan sabah tutukluğu
2. Yorgunluğun olmaması
3. Ağrılı eklem olmaması
4. Hassas eklem ya da hareket sırasında eklem ağrısı olmaması
5. Eklemlerde veya tendon kılıflarında yumuşak doku şişliği olmaması
6. ESH' nin kadınlarda 30, erkeklerde 20 mm/saati geçmemesi

Ayrıca aktif vaskülit, perikardit, plörit, miyozit veya RA' ya bağlı kilo kaybı veya ateş gibi sistemik bulguların olmaması gerekir ¹. RA' lı hastalarda yaşam kalitesini ve sonuçlarını etkileyen rehabilitasyon programının çizilmesinde fonksiyonel durumun belirlenmesi oldukça önemlidir. Fonksiyonel değerlendirme amacı ile tek başına ya da beraber kullanılabilen yöntemler vardır.

2.5.3. Ayırıcı tanı

RA tüm artrit yapan romatolojik hastalıklarla karıştırılabilir. Hastalığın erken döneminde RA tanısı koymak zordur. Az sayıda eklem tutulumu, asimetrik tutulum, intermittan artralji yakınmaları, sadece konstitüsyonel yakınmaların bulunması ve RF negatifliği gibi RA için tipik olmayan bulgularla başlayabilmesi nedeniyle benzer hastalıklardan ayırıcı tanısının yapılması gerekir. Kliniklere poliartrit semptomları ile gelen hastaların az bir kısmı RA'dır. RA ayırıcı tanısında en sık karşılaşılan hastalıklar;

1. Bağ dokusu hastalıkları (özellikle SLE başta olmak üzere, skleroderma, polimiyozit, vaskülitler, mikst bağ dokusu hastalığı, polimiyaljiya romatika),
2. Seronegatif spondiloartritler (Ankilozan spondilit, reaktif artrit, psöriatik artrit, Reither Sendromu)
3. Erişkin still hastalığı
4. Viral artritler
5. Osteoartrit
6. Kalsiyum pirofosfat birikimi hastalığı (CPPD),
7. Gut
8. Ayrıca fibromyalji, kronik yorgunluk sendromu, miksödem, akut romatizmal ateş, sarkoidoz, FMF (Ailevi Akdeniz Ateşi), multisentrik retikülohistiositoz, hemoglobinopatiler, hemofilik artropati, hemokromatozis, glukokortikoid kesilme sendromu, oral kontraseptif kullanımına bağlı artrit, paraneoplastik sendromlar da göz önüne alınmalıdır ⁹⁶.

2.6. Tedavi

RA' nın erken tanısı ve tedavisi önemlidir ve multidisipliner bir yaklaşım gereklidir. Hastalığın tam kontrol altına alınmaması, fiziksel kısıtlılığın yanı sıra psikososyal sorunlara da yol açabilir. Tedavide bugün amaç; inflamasyonu baskılamak, ağrı ve tutukluğu azaltmak, klinik remisyonu sağlamak, radyolojik progresyonu engellemek, fonksiyonel durumu iyileştirmek, sakatlığı azaltmak, yorgunluğu ve depresyonu

azaltmak, enerji düzeyini arttırmak, bağımsızlığı geliştirmek, yardım gereksinimini azaltmak, işe katkıyı ve üretimi arttırmak, yaşam kalitesini en üst düzeyde tutmaktır ¹¹¹.

Hastaların çoğu fizik tedavi, egzersiz, ilaç tedavisi ve cerrahi tedavi gibi tedavilerin kombinasyonlarından fayda görür. Her hasta ayrı bir tedavi şeması içinde değerlendirilmelidir. Son yıllarda ağırlık kazanan düşünce; hastalık kısa sürede destrüktif hale geldiği için erken dönemde agresif bir tedavi uygulanması yönündedir¹¹.

2.6.1. Fizik tedavi ve egzersiz

Hastanın hastalığı hakkında eğitilmesi, koruyucu amaçla lokal ve tedavi amacıyla genel istirahati önemlidir. Eklem hareket açıklığının idamesi, eklem koruması, ve kas atrofilerinin önlenmesine yönelik fizik tedavi ve rehabilitasyon yöntemleri etkin bir şekilde uygulanmalıdır. Sıcak, soğuk, elektroterapi gibi bazı yöntemlerin ağrıyı azaltmada ilaç dışı seçenek veya ilaca ek olarak kullanılabilmesi unutulmamalıdır. Eklemlerin günlük yaşantı içerisinde uygun ve doğru kullanımının öğretilmesi, uygun splint ve ortezlerle desteklenmesi çok önemlidir. Bu arada düzgün postürün korunması gözardı edilmemeli, egzersiz programları buna göre planlanmalıdır ⁹⁶.

2.6.2. Cerrahi tedavi

Eklem ve tendon rekonstrüksiyonu, eklem replasmanı ve yumuşak doku gevşetme operasyonu gibi cerrahi işlemler gerekli durumlarda rehabilitasyonu tamamlarlar. En iyi sonuçlar hastalığın erken evrelerinde alınır. Geç dönem RA' da artrodez, eklem replasmanı ve rezeksiyon artroplastisi gibi uygulanabilecek cerrahi seçenekler vardır. Kalça, diz, omuz gibi büyük eklemlerde daha çok eklem replasmanı tercih edilirken, küçük eklemlerde artrodez operasyonları öncelik almaktadır ²⁸.

2.6.3. Farmakolojik tedavi

RA tedavisinde kullanılan ilaçlar başlıca 4 sınıfta incelenebilir; Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar (NSAİİ), kortikosteroidler, hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar (DMARD) (Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs) ve biyolojik ajanlardan oluşmaktadır. Romatoid artritli hastalarda eklem erozyonu erken dönemde başlamaktadır. Hastalık süresi iki yıldan az olan hastaların %80' inde radyolojik eklem hasarı gözlenmiştir ¹¹². Erozyonlar ve deformiteler büyük oranda geri dönüşümsüzdür. Bu nedenle RA' nın erken tanısı oldukça önemlidir. Erken tanı ve DMARD' la tedaviye

erken başlanması oldukça önemlidir. Bu bilgiler ışığında, DMARD tedavisi RA tanı kriterlerini karşılamış olan veya RA şüphesi olan hastalara olabildiğince erken başlanmalıdır ve hastada ilk 3 ay sıkı takip yapılmalı ve maksimum 6 aya kadar düşük hastalık aktivitesi veya remisyona sokmak amaçlanmalıdır ¹³. Bir hastada DMARD seçimini etkileyen pek çok faktör vardır. Hastanın tercihi, hekimin tecrübesi, hastanın yaşı, komorbidite, hastalık aktivitesi, ilacın göreceli etkinliği, etkinin ortaya çıkma süresi, alım kolaylığı, monitörizasyon sıklığı, maliyeti, yan etkiler gibi faktörler göz önüne alınarak başlangıç tedavisinin hangi ajanla yapılacağı belirlenir. Bunlara ek olarak TNF- α inhibitörlerinin ortaya çıkışı RA' lı hastaların çoğunda sinovitin kontrolünü sağlamayı ve hayat kalitesinde iyileşmeyi mümkün kılmıştır.

2.6.3.1. Non steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)

RA tedavisinde eklem ağrısı ve şişliğini azaltmak, eklem fonksiyonlarını düzeltmek amacıyla kullanılırlar. Salisilatlar, diğer NSAİİ' ler veya selektif siklooksijenaz (COX) inhibitörleri bu grupta yer alır. Temel etki mekanizmaları COX yolunu inhibe ederek araşidonik asitin endoperoksitlere, prostaglandinlere (PG) ve Tromboksan A2' ye dönüşümünü engellemektir. Bu ajanların aneljezik ve antiinflamatuvar özellikleri vardır ancak hastalığın seyrini ve eklem destrüksiyonunu önleyemezler. Böylece inflamasyonu önleyip eklem ağrısını ve tutukluğunu azaltarak rahatlama sağlarlar ancak hastalığın seyrini değiştiremedikleri için tedavide tek başlarına kullanılmaları önerilmez ^{84,90}. Kimyasal olarak uyarılmış siniri baskırlar, bloke etmezler. Aspirin COX' u irreversible olarak asetilleyerek inhibe ederken diğer NSAİİ' ler doza bağımlı olarak reversible inhibe ederler. COX enzimi değişik dokulardan farklı miktarda elde edilebildiğinden her dokunun NSAİİ' lere duyarlılığı farklıdır. Dolayısıyla her hastanın ilaca yanıtı farklı olacağından istenen etki alınıncaya kadar birkaç farklı NSAİİ denenebilir ¹¹³.

2.6.3.2. Kortikosteroidler

Kortikosteroidler 1950 den beri kullanılmakta olup bu ilaçlara çok iyi sonuç veren hastalar vardır. Antiinflamatuvar ve immun süpressif etkileri nedeniyle RA tedavisinde kullanılırlar. Fosfolipaz A2 enzimini inhibe ederek PG ve lökotrien (LT) sentezini inhibe ederler. Ayrıca nötrofillerin kemotaksisini ve endotele yapışmasını azaltır. RA tedavisinde sıklıkla oral, intravenöz ve intraartiküler enjeksiyon şeklinde kullanılırlar. Düşük doz oral (<10mg/gün prednizolon veya eşdeğeri diğer

kortikosteroidler), pulse (100-1000mg/gün intravenöz metil prednizolon) ve yetişkin bir insan için bir seferde 1-2 mg olacak şekilde lokal intraartiküler steroid enjeksiyonları RA' nın aktif dönemlerinde semptomların giderilmesinde çok etkilidirler. Bu nedenle NSAİİ' lerle kontrol edilemeyen hastalarda, yavaş etkili ilaçların etkisi başlayıncaya kadar bir köprü tedavisi olarak kullanılır. RA' lı hastalara Van Everdingen ve arkadaşları 10mg/gün steroid kullanırken, Landewe ve arkadaşları 1 hafta boyunca 60mg/gün steroid kullanmış ve tedavinin ardından 6 ay içinde steroidi azaltarak kesmişlerdir. Sonuçta birlikte verilen anti-romatizmal tedaviden bağımsız olarak kemik koruyucu etkisini 5 yılın sonunda da izlemişlerdir ¹¹⁴. Burada kullanımını kısıtlayan kortikosteroidlerin doza bağımlı yan etkileridir. Bunlar arasında deride incelme, katarakt, osteoporoz, hipertansiyon, kan şekeri regülasyonunda bozulma, hiperlipidemi vb. bulunmaktadır. Genel olarak düşük doz kortikosteroidler (günlük 10 mg prednizolon ve altında dozlar) hastaların % 30-60' ında kullanılmaktadır. Bunun dışında organ tutulumlarında, tutulumun önemine ve şiddetine bağlı olarak daha yüksek dozlarda kortikosteroid kullanımı gerekebilmektedir ¹¹⁵.

2.6.3.3. Hastalık modifiye edici ilaçlar (DMARD)

Bu grup ilaçlar yavaş etkilidirler ve etkileri haftalar, aylar sonra başlar. İnflamasyonu baskıladıklarından akut faz göstergeleri olan CRP ve ESH' de düşüşe neden olurlar. Fonksiyonel kapasitede iyileşme sağlarlar ve radyolojik olarak erozyon gelişimini veya radyolojik kötüleşmeyi engellerler ¹¹⁶. DMARD tedavisine RA' nın seyrinin erken dönemlerinde başlanılmasının, kemik erozyonlarının ve sakatlığa gidişin önlenmesinde önemli derecede etkininin olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Şimdiki yaklaşım RA' nın tanısı konur konmaz, özellikle de kötü prognozlu agresif hastalarda DMARD tedavisine başlanması gerektiği yönündedir.

Metotreksat (MTX): Günümüzde RA tedavisinde tek başına veya diğer DMARD' larla birlikte en yaygın kullanılan ve genellikle ilk başlanan ilaçtır. İlk kez 1972' de romatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmış, rutin tedaviye ancak 1980' lerden sonra girmiştir. RA hastalarının yarısından fazlasının MTX tedavisi görmesi ve yaygın olarak kullanılması, MTX' ı en sık kullanılan DMARD haline getirmektedir ²⁴. MTX ile tedavi edilen RA hasta oranının 1985 yıllarında % 10' dan 2000 yıllarında % 76' lara kadar yükseldiği belirtilmektedir. Bu artışa neden monoterapide hastalık aktivitesini ve eklem erozyonlarının oranını azaltması yanında

uzun dönem mortalitede azalmaya neden olmasdır. Düşük doz haftalık MTX' in güvenli profili diğer seçeneklerle karşılaştırıldığında, 1980 yılından itibaren pratiğe dayanan geniş dağılımlı kullanımı ile tamamen kabul görmektedir ¹¹⁷.

MTX folik asit antagonistidir ve folik asitin dihidrofolat redüktaz ile reaksiyonunu önleyerek, folik asitin DNA ve RNA sentezinde kofaktör olan tetrahidrofolata dönüşümünü engeller. Antienflamatuar etkisini pürin sentezinin inhibisyonu; hücre dışı adenozin artışı; proinflamatuar sitokinlerin üretiminin inhibisyonu; lenfosit proliferasyonu ve nötrofil kemotaksisini baskılama ile serum immünglobinlerini azaltma şeklinde gösterir. MTX' in hastalar tarafından uzun süreli kullanımı, klinik güvenilirliğinin yüksek olması, biyolojik ajanlarla kombine edilebilmesi gibi pek çok özelliğe sahip olması nedeniyle RA tedavisinde öncü ilaç olarak kabul edilmektedir ^{116,118,119}.

Oral, intramüsküler, intravenöz, subkutan kullanım şekilleri mevcuttur. Ülkemizde 2,5 mg' lık tabletleri, 5- 50 mg' lık ampülleri vardır. Romatoid artrit için 7,5- 10 mg/ hafta gibi küçük dozla başlanılır ve düzelme sağlanıncaya kadar veya yan etkiler gelişinceye kadar veya 20- 25 mg/ hafta eşiğe ulaşıncaya kadar 2,5- 5 mg artışlarla doz ayarı yapılır. Etkisi genellikle 3- 6 haftada görülür. MTX' in oral kullanımında yetersiz klinik cevap alınan hastalarda deri altı injeksiyon formunun kullanılması önerilmektedir. MTX ile birlikte folik asit (günde 1-3 mg) kullanıldığında yan etkilerde azalma görülmektedir. Metotreksatin yan etkilerini folat eksikliğine ait olanlar (bulantı, kusma, oral ülserler ve kemik iliği baskılanması), allerjik olanlar (akciğer toksisitesi) olarak özetlemek mümkündür. Tedavi süresince her 4- 6 haftada bir kan sayımı, transaminaz ve kreatinin kontrolü ile yan etki takibi yapılmalıdır ¹²⁰.

MTX RA tedavisinde en etkileyici olan tarafı, eklem hasarının radyografik olarak azaltabileceğinin kanıtlanmış olmasıdır. Erken RA hastalarında 2 yıllık kullanım sonucunda, MTX neredeyse etenercept kadar etkin bulunmuştur ¹²¹. Sonuç olarak, bazı hastalarda MTX kullanımına bağlı olarak yan etki oluşumu gözlenirken, bazı hastalarda gözlenmediği belirtilmektedir ¹²². Yapılan birçok çalışmada, MTX kullanımına bağlı olarak nodül (%8), allerjik pneumonit (%2-5), merkezi sinir sisteminde gözlenen toksisite (%1-35), doz sonrası reaksiyonlar (%10), mide bulantısı, kusma, karın ağrısı ve diyare gibi gastrointestinal komplikasyonlar (%60), transaminazların yükselmesi ile

karaciğer iltihabı (%20-58), hematolojik anomaliler (%1-2), vücutta kızarıklık oluşması (%1-2) ve kellik (%5) gibi birçok toksisitenin ortaya çıktığı rapor edilmektedir ^{123,124}.

Sülfasalazin (SSZ): SSZ, 1930' lu yıllarda romatizma tedavisinde kullanılmak üzere bir antibiyotigin (sulfapiridin) ve bir antiinflamatuvar ilacın (5-aminosalisilik asid) azo bağıyla birleşmesi ile oluşmuştur. SSZ' nin antiinflamatuvar ve immünomodülatuar etkileri; PG ve LT sentez inhibisyonu, oksijen radikallerinin azaltılması, nötrofiller, makrofajlar, T ve B lenfositler, fibroblastlar ve endotel hücrelerinin inhibisyonu olarak özetlenebilir. SSZ kullanımı RA' da klinik, laboratuvar ve radyolojik progresyonu yavaşlatmaktadır. SSZ' nin kombinasyon tedavisinde önemli rolü vardır ve tedavi edici dozu 2-3 gr/ gün' dür. Etkisinin başlaması ortalama 2 aydır. İlaç kesilince düzelen azospermi yapabilir. Gastrointestinal şikâyetleri, deri döküntüsü yapması ve kemik iliğini baskılaması en sık yan etkilerindendir ^{84,125}.

Hidroksiklorokin (HCQ): Etkileri tam olarak bilinmemekle beraber; fosfolipaz A2' yi baskılaması, nötrofil kemotaksisini ve fagositozunu engellemesi, immun kompleks oluşumunu engellemesi gibi etkileri olduğu düşünülmektedir. Günlük doz ortalama 4-6 mg/ kg' dır. İyi tolere edilir, klinik ve laboratuvar olarak etkilidir fakat tek başına kullanıldığında erozyon gelişimi üzerine etkisi gösterilememiştir. En çok MTX ile kombine kullanılmaktadır. En korkulan komplikasyonu olan makula toksisitesi kilogram başına 6,5 mg üstüne çıkılmadıkça görülmez. İlacın bu yan etkisi nedeni ile hastalar yılda bir kez görme alanını da içeren oftalmolojik bir muayeneden geçirilmelidirler. RA' da klinik ve laboratuvar olarak etkili oldukları gösterilmiş, ancak radyolojik olarak erozyonları önleyemedikleri anlaşılmıştır. Organ tutulumuna da fazla etkileri yoktur. Deri döküntüsü, retinopati, başağrısı gibi yan etkileri vardır. Gebelikte kullanılabilir olmaları avantajdır ¹²⁵. RA tedavisinde genellikle günlük dozlar klorokin için 4 mg/kg/gün hidroksiklorokin için ise 6 mg/kg/gündür ¹²⁶.

Leflunamid: Etkisini pirimidin sentezinde rol oynayan dihidrooratat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek gösterir. Bu yolla RA patogeneğinde temel rol oynayan T hücrelerinin proliferasyonunu önler. Leflunamid oral alımından sonra enterohepatik sirkulasyonla aktif metabolite dönüşür. Leflunamid ile hastalık aktivitesinde azalma ve radyolojik progresyonda yavaşlama görülür. Kararlı plazma düzeyine ulaşmak için ilk 3 gün günlük 100 mg yükleme dozunun ardından 20 mg/ gün dozunda devam edilir.

Hepatotoksisite en önemli yan etkisidir ve kullanımı süresince düzenli transaminaz kontrolü yapılmalıdır. Ek olarak potent teratojeniktir, leflunamid kullanan ancak gebe kalmak isteyen hastalar, gebelik öncesi ilacı bırakmalı ve kolestiramin reçenesi ile yıkama protokolü uygulanmalıdır ¹¹⁹.

Azatyoprin: MTX içeren konvansiyonel tedavilere yanıtı olmayan hastalar için rezerve edilen bir antimetabolittir. RA’ da 1,5- 2,5 mg/ kg/gün dozlarında, çoğu kez “steroidden sakınma ajanı” olarak tek başına ve kombinasyon biçiminde kullanılmıştır. En sık görülen komplikasyon nötropenidir ¹¹.

Siklofosfamid: Siklofosfamidin günlük dozu 1,25- 2,5 mg/ kg/ gündür. Son zamanlarda RA tedavisinde ciddi yan etkileri olduğu ortaya çıkması ve başka ilaç seçeneğinin olması nedenlerinden dolayı pek tercih edilmemektedir ⁴⁴.

Siklosporin: Bu ilaç IL-2 ve Th1 sitokin üretimini engeller ve T lenfositlerde CD40 ligand ekspresyonunu baskılar. Yan etkileri fazla olduğundan diğer ilaçlara yanıt vermeyen hastalarda kullanılır ⁴⁴.

2.6.3.4. Biyolojik ajanlar:

Günümüzde TNF- α ’ ya karşı Etanercept, İnfliksımab ve Adalimumab, interlökin 1’ e karşı geliştirilmiş Anakinra, anti-CD20 pozitif B hücrelerini baskılayan Rituximab ve ko-stimülatör molekülleri inhibe ederek T hücre aktivasyonunu baskılayan Abatecept lisans sahibidir.

Hastalığın gelişiminden sorumlu ana mediyatörlerden biri olan TNF- α ’ nın bloke edilmesi RA’ da sıkça kullanılmakta ve olumlu sonuçlarıyla; RA belirti ve bulgularını geriletmekte, erozyon gelişimini durdurarak yapısal hasarın ilerlemesini durdurmada, fiziksel fonksiyonu iyileştirmede etkilidirler. Etkileri hızlı ve dramatiktir. Bu ilaçların dezavantajı da yüksek maliyetleridir ⁶⁵. RA tedavisinde TNF- α inhibitörleri, hastaların çoğunda RA’ nın belirti ve semptomlarını azaltır ve kemik erozyonlarının progresyonunu durdurur. Ancak hiçbir hastalığın tam remisyona neden olmaz ve çoğu bireyde ilaç kesildikten birkaç hafta sonra semptomları tekrarlar ⁸⁴. Anti TNF- α ilaçların yan etkileri arasında en sık enjeksiyon ya da infüzyon yeri reaksiyonları,

enfeksiyonlar (özellikle tüberküloz), malignite, otoimmün fenomen, konjestif kalp yetmezliği, demyelinizan ve nörolojik hastalıklar yer alır.

Biyolojik ajanlara ne zaman başlanmalı sorusuna verilebilecek kesin bir cevap yoktur. Hastaların % 50-60' ında birincil tedavi olarak MTX ve diğer DMARD' lara rağmen yeterli cevap alınamamaktadır. Bu bağlamda DMARD monoterapi ile başlanmış ancak 3-6 ay içerisinde kontrol altına alınamamış ve kötü prognostik faktörleri mevcut RA tanılı hastalar, biyolojik ajan tedavisi için düşünülmelidir.

İnfliksımab: Şimerik anti TNF- α monoklonal antikoru olup RA tedavisinde ilk kullanılan anti-TNF- α ilaçtır. Önerilen doz 3-5 mg/ kg olup; başlangıçta, 2. ve 6. haftada, daha sonra ise 8 haftada bir olarak uygulanmasıdır. Yarı ömrü 8- 9,5 gündür¹²⁷. İnfliksımabın diğer DMARD' lar ile kombinasyonu ilk çalışmaların ardından yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada MTX ile kombine alan grubun radyolojik ilerlemesi 54 ayın sonunda % 0, 5 olurken sadece MTX alan grubun aylık radyolojik ilerlemesi % 10 bulunmuştur⁶³.

Etanersept: İnsan soluble TNF-RII (p75) reseptörlerinin, insan IgG1' in Fc kısmına bağlanmasıyla meydana gelen dimerik füzyon proteinidir. Oluşan molekül, hem TNF- α ' yı hem de TNF- β ' yı yüksek affinite ve spesifitede bağlayan dimerik, solubl TNF-R' dir. Etanerceptin dimerik yapısı TNF- α ' ya yüksek oranda bağlanarak TNF- α ' nın indüklediği proinflamatuvar yanıtı engeller. Yarı ömrü ortalama 4 gündür. Uygulama ya haftada bir kez 50 mg ya da haftada 2 kez 25mg' lık cilt altı enjeksiyonu şeklindedir^{28,96}. Weinblatt ve arkadaşları etanercept metotreksat ile birlikte kullanılmasıyla ACR yanıtlarının dahi iyi olduğunu tesbit etmişlerdir¹²⁸.

Adalimumab: TNF- α ' ya karşı etkili, tamamen insan kaynaklı bir IgG1 monoklonal antikordur. Yarı ömrü ortalama 14 gündür, 40 mg dozunda 15 günde bir deri altına enjeksiyon şeklinde verilir veya yetersiz olan hastalarda haftada bir verilebilir. Yapılan bir çalışmada MTX ile kombinasyonunun daha etkili olduğu bulunmuştur¹²⁹.

Anakinra: Amerika' da FDA tarafından diğer DMARD' lara cevap vermeyen ve ağır bir seyir gösteren hastalar için onaylanmış rekombinant IL-1 reseptör antagonistidir.

Anakinra, IL-1 reseptörüne bağlanan IL-1' in yarışmalı antagonistidir ve IL-1' in etkisini antagonize eder. Anakinra 100 mg/ gün dozda derialtına enjeksiyonla uygulanır ¹³⁰. Yakın zamanda yayınlanan bir sistematik bir derlemede anakinranın RA tedavisinde göreceli olarak güvenli ve ılımlı şekilde etkili bir biyolojik ajan olduğu belirtilmiştir ¹³¹.

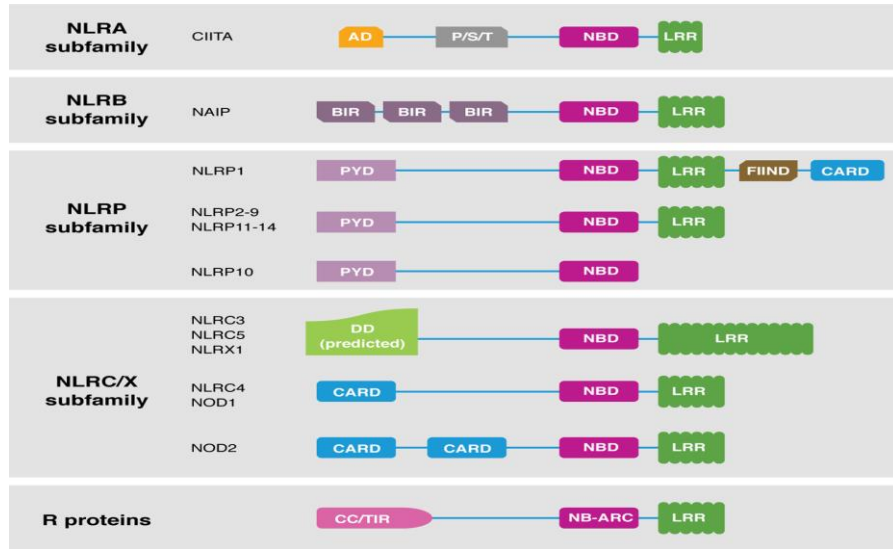
Abatasept: Rekombinant bir füzyon proteindir ve seçimli olarak CD28:CD80/86 yolağını kırması üzerinden kostimülasyonu bloke eder, sonuçta T hücre aktivasyonu ve sonrasındaki çok sayıda efektör mekanizmaları baskılar ¹¹⁹.

Rituksimab: Olgun B hücrelerine özgü gösterge anti-CD20 monoklonal antikordur. Anti TNF- α tedaviye dirençli olan RA' lı hastaların tedavisi için 2006 yılında FDA onayı almıştır ⁶³.

2.7. NLRP12 Geni

2.7.1. NLR gen ailesi

NLR' ler üç parçalı bir yapıya sahiptir. Bunlar; ligant bağlamak için gerekli C-terminal lösün açısından zengin tekrar bölgesi, oligomerizasyondan ve ATP bağlanmasından sorumlu NACHT bölgesi ve NLR' lerin aşağıyönde sinyal kaskatı bağlantısını sağlayan N-terminal efektör bölgeden oluşmaktadır. İnsan genomunda 22 NLR kodlanır, bunlardan sadece yaklaşık yarısının bazı ayrıntıları karakterize edilmiştir ¹³² ve N-terminal efektör bölgelerine göre alt gruplara ayrılırlar. Bunlar; NLRA, NLRB (genellikle NAIP olarak bilinir ya da baculovirus apoptoz tekrarlayan protein inhibitörü), NLRP (genellikle PYDli NLR' ler olarak bilinir) ve NLRC (genellikle NODlar olarak bilinir)'dir ⁷ (Şekil 2.5). Memeli NLR'leri bitkilerdeki hastalık direnç proteinleri olan R proteinleri ile yapısal homoloji göstermektedir ki bunlarda bitkinin enfeksiyon karşısındaki savunmasıyla alakalı proteinlerdir. Bitki R ve hayvansal NLR proteinleri arasındaki benzerlik NLR' lerin bağışıklık genlerinin eski bir aileyi temsil ettiğini gösterebilir ¹³³. NLR'lerin en büyük alt grubu pyrin domaini içeren NLRP (nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domaini, tekrarlayan zengin Lösün ve Pyrin domaini içeren) grubudur ^{133,134}. Diğer isimleri NALP⁷, PAN ¹³⁵, ya da PYPAF ¹³⁶, olarak bilinen NLRP ailesinin, apoptozis ve inflamasyondaki rolleri iyi bilinmektedir.



Şekil 2.5. İnsan NLR ailesinin şematik gösterimi.

(22 insan NLRsi karakterize edilmiştir. NLR ailesi proteinlerinin N-terminal alanına bağlı olarak, dört alt sınıfa ayrılabilir. Bitki hastalık direnci R proteinleri alt kısmında gösterilmektedir. P/S/T, proline/serine/threonine- zengin bölgeler; FIIND, Find bölgesi; DD, ölüm bölgesi; CC, sarmal bobin bölgesi; TIR, TLR/IL-1R homoloji bölgesi; NB-ARC, apoptotik proteaz aktifleştirici faktör 1 tarafından paylaşılan nükleotid bağlayıcı adaptör, belli R genleri ve hücre ölüm proteini 4 (CED4).)

NLRP ailesinin sitoplazmik proteinleri benzer yapıdaki 14 alt üyeyi içerir. Bunlar kromozomda iki küme halinde 11p15 (NLRP6, 10 ve 14) ve 19q 13,4 (NLRP2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12 ve 13) bölgelerinde bulunurlar. Ailenin birçok üyesi çeşitli dokularda oldukça fazla eksprese olurlar ve *C. elegans*, *D. melanogaster*, sıçan ve fareden insana kadar korunmuştur. (Information recruited from Human Genome Browser Gateway: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

NLR' ler hem doğal hem de adaptif immün yanıtları düzenleme yeteneğine sahip hücre içi reseptörlerdendir. İlgili ligandın tanınmasıyla NF- κ B gibi birden çok pro-enflamatuar moleküler yolların tetiklenmesi sonucu NLR' ler aktif hale gelirler¹³⁷. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, çeşitli insan otoimmün ve enflamatuar hastalıkların bir spektrum içinde NLR aracılıklı iltihaplanma için önemli rollerininin olduğunu ortaya koymuştur¹³⁸. Bugüne kadar NLR' lerin büyük çoğunluğu doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde inflammatuar sinyal aktivatörleri olarak tanımlanmıştır¹³⁹. Çoklu NLR' lerin inflamazom kompleksinin koordineli bir montaj halini alabilmesi için IL-1 β ve IL-18 salgılanması ve aktivasyonunun teşvik edilmesi bildirilmiştir¹⁴⁰. Enfeksiyona karşı ilk savunma hattı doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından sürdürülür. Zira bağlı Toll benzeri reseptörler ve sitosolik nükleotid bağlayıcı alan ve lösün açısından zengin tekrar

içeren reseptörler (NLR) birlikte, bakteriyel ve viral istilacıları gibi endojen stres sinyallerini tespit ederek doğal immün yanıt oluşumunda önemli rol oynarlar. İletim yönündeki sinyal olaylarını düzenlemekten sorumlu değişen N-terminal efektör etki alanları ile NLR' ler çok etki alanlı proteinlerdir. Bununla birlikte, iltihap sinyal yollarının sıkı düzenlenmesi homeostatik düzeyde immün yanıtları korumak için önemlidir. Aşırı inflamasyon, kendisi tarafından yıkıcı ve otoimmünite gelişimi sonucunda adaptif bağışıklık sisteminin hücrelerinin aktivasyonu ile sonuçlanabilir ¹⁴¹. NLR' ler sitoplazmada eksprese olan, patojen ile ilişkili moleküller olup, tehlike durumu ile ilişkili moleküller ile örüntü olarak çalışan ve önemleri hızla artan biyomoleküllerdir ¹⁴². Buna ek olarak, çok sayıda insan otoinflamatuvar bozukluklar ile NLR mutasyonlarının bağışıklık ve enflamasyondaki merkezi rolleri ilişkilendirilmiştir ¹³². NLR' lerin konak savunmasında kritik bir rol oynadığı iyi bilinmekle birlikte, bu reseptörlerin NLR ailesi özel ligandları nasıl tanıdığı ve onları nasıl yukarı yönde sinyal için aktive ettikleri belirsizdir. NLR' lerin işlevlerini yürütmek için ek sensörler ile etkileşim içinde olabildiği gerçeği ileri seviye komplikasyonlarda ortaya konmuştur ¹⁴³. NLR' ler fonksiyonlarına göre dört ana gruba ayrılabilir: 1) transkripsiyonel transaktivatör, 2) NF-κB ve MAPK aktivatörleri, 3) inflamazom aktivatörleri, ve 4) inflamatuvar sinyal inhibitörleri ^{132,144}. Bazı NLR'lerin aynı işlevlere sahip olduğu, bazılarının hücre tipine özel rolleri ve/veya aşağı yönde etkili çoklu mekanizma aracılığı ile aktive olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca, preimplantasyon ve doğum öncesi gelişimde birkaç NLR' nin işlevsel olması bu aileye ait reseptörlerin birden fazla rol oynayabileceğini göstermektedir. NLR ailesinin alt ailesi olan NLRP ailesinin iki üyesi, NLRP1 ve NLRP3, adaptör protein ASC ve daha sonra Prokaspaz-1 ile etkileşime girerek doğuştan gelen bağışıklık yanıtı aktive ederler. Bu çok bileşenli kompleks inflamazom olarak adlandırılır ⁷. Bu makromolekül makinesi pro-IL-1β ve pro-IL-18 gibi pro-inflamatuvar sitokinleri, bunların salgılanabileceği olgun formlara dönüşmesi için aktive eder ⁷. Birkaç NLRP' nin üremede bile rolü olduğu ortaya çıkarılmıştır ¹³⁴. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, inflamatuvar sinyalizasyonun olumsuz yönde düzenlenmesinde NLRP6, NLRP12 ve NLRX1'in rolü olduğu bildirilmiştir. NLR proteinleri enflamasyon, apoptoz, embriyo gelişimi ve bağışıklık genlerinin transkripsiyonel yeniden programlamasını düzenler ^{145,146}. Yukarıda bahsedilen bütün NLR proteinlerinin işlevleri Tablo 2.4' te özetlenmiştir.

Tablo 2.4. İnsan ve fare NLR proteinlerinin işlevleri

NLR proteini	İşlevi
CIITA	De novo MHC sınıf II ve MHC sınıf II bağımlı antijen sunan gen transkripsiyon aksesuarı, yapısal MHC sınıf I geni ifadesinin artırılması
NAIP	Patolojik koşullarda nöronal canlılık artması ve inflamazom montaj modülasyonu
NLRP1	İnflamazom bileşeni
NLRP2	Inflamazom aktivasyonu, NF-κB sinyallesinin engellenmesi, embriyonik gelişim
NLRP3	İnflamazom bileşeni
NLRP4	NF-κB sinyallesinin engellenmesi, TLR sinyallesinin negatif düzenlenmesi, otofaji inhibisyonu
NLRP5	Yaralı nöronlarda kaspaz aktivasyonu düzenlenmesi ve apoptoz, embriyonik gelişime katılma
NLRP6	NF-B sinyalizasyon baskılama, inflamazom aktivasyonu
NLRP7	İnflamazom düzenlenmesi, NF-κB aktivasyonunun inhibe edilmesi, mutasyonları yüksek riskli gebelik komplikasyonları ve perinatal mortalite ile ilişkilidir.
NLRP10	Dendritik hücre göçü, NF-κB aktivasyonu ve hücre ölümünün negatif düzenlenmesi, IL-1 sekresyonu inhibisyonu, anti-bakteriyel proenflamatuar tepkisinin artırılması
NLRP12	NF-κB sinyalizasyon, inflamazom aktivasyonu, dendritik hücre göçü düzenlenmesi, MHC sınıf I genlerinin transkripsiyonu
NLRP14	Spermatogenez tutulumu
NLRC3	NF-κB aktivasyonunun inhibisyonu
NLRC4	İnflamazom bileşeni
NLRC5	MHC sınıf I antijen sunumunda rol alan, ilgili genlerin transkripsiyonel aktivasyonu; TLR aracılı NF-κB aktivasyonu ile doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi, tip I IFN üretimi ve inflamazom aktivasyonu
NLRX1	Mitokondriyal lokalizasyon; RLR sinyallesinin negatif düzenlenmesi, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetikleyen bağışıklık sisteminin pozitif bir düzenlemesi, NF-κB aktivasyonunu inhibe edici, otofaji güçlendiricisi
NOD1 ve NOD2	NF-κB ve MAPK sinyal yolları aktivasyonu, kaspaz-1 aktivasyonu için önemli olan diğer NLR'ler ile etkileşimi, otofaji fonksiyonu ve antijen reseptörü ile entegrasyon. T hücresi aktivasyonu. Buna ek olarak, NOD1 B hücresi aktivasyonunu birlikte düzenlediği ve NOD2 viral tanıma, T hücresi aktivasyonunda bir rol oynar, ve düzenleyici T hücrelerinin hayatta kalmasında.
NLRP8, -9, -11, -13	?

İnflamasyon sırasında İnterlökin1β (IL-1β) gibi proinflammatuar sitokinlerin olgunlaşmasını tetikleyerek, doğuştan kazanılmış bağışıklık savunması ve organ homeostasisinde bir gardiyan görevindedir ^{7,133}. İnflamazom mekanizmasının bileşenlerini kodlayan bireysel genler, transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası seviyede düzenlenir. Bu işlemde sonra, bu mikrobiyal patojenlere karşı konakçı savunmasına aracılık etmek ve doku homeostazını garanti etmek için gerekli olan çok çeşitli hücresel yanıtları kontrol eder. Benzer şekilde, hücresel gerginlik viral ya da bakteriyel

enfeksiyon, serbest sitoplazmik DNA veya başka diğler çeşit yaralanmalarda yüksek moleküler ağırlıklı inflamazom platformları oluşumuyla sonuçlanan özel reseptörlerin aktivasyonuna yol açar ^{132,133,147,148}. Bu moleküler platformların düzeneği, çeşitli iç ve dış sinyaller ile tetiklenen benzersiz ve tanımlanmış bir kronolojik sırası aşağıdaki gibidir: patojen kaynaklı moleküllerin tanınması sonrasında, inflamazom hücre içi aktif caspase-1 (CASP-1)' in otokatalitik halini uyarır ki bu da proteolitik bölünmeyi ve IL-1 β - and IL-18 öncüllerininin biyolojik aktivasyonunu uyarır ^{132,133}. Bu aktive edilmiş form, sensör molekülü CASP-1 ile fiziksel bir etkileşim yeteneğine sahiptir ya da bu prosesi leke benzeri apoptoz ile ilişkili molekül olarak adlandırılan bir aracı adaptör molekülle ya da adaptör protein ASC'nin kaspaz takviye domaini ile iyileştirir ⁷. Bu işlemde sonra, hücresel tepkilerin karmaşık bir ağı, yerel ve sistemik iltihabik reaksiyonlara, nötrofil ve trombosit toplanmasına doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonu gibi olaylara öncülük ederek tetikler ¹³³.

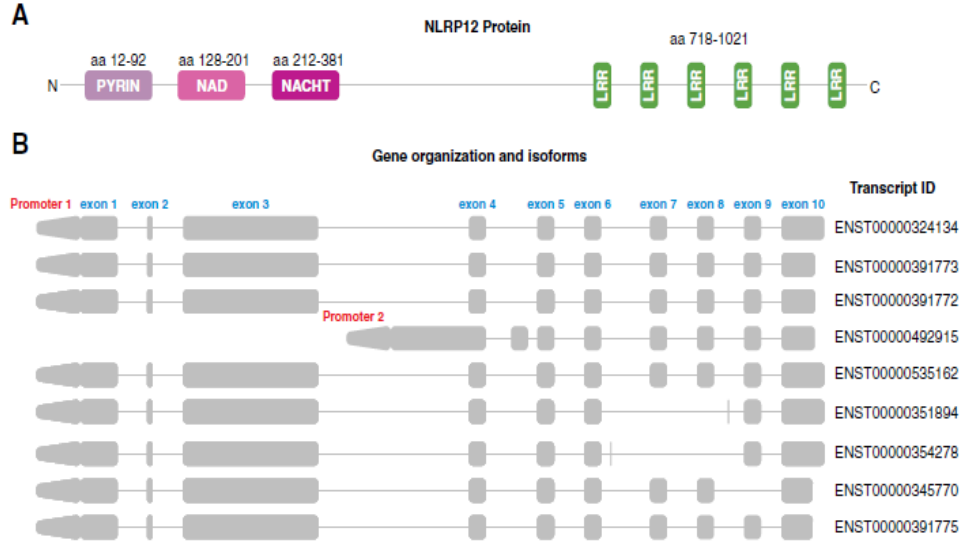
Ayrıca, inflamazomların aktivasyonu, metabolik sendrom ve enflamatuar bağırsak hastalığı gibi birçok yönlü hastalıklarda, mikrobiyal patojenlere karşı, ev sahibinin korunmasına bağlıdır. Buna ek olarak inflamazomlar hücre ölümünün özel bir formu olan proptosis gibi doku onarımını ve iltihaplanmanın çeşitli önemli yönlerinin düzenlenmesiyle ilişkilidir ¹⁴⁰. Bu önemli fonksiyonlara dayanarak bu gen ailesinde olan mutasyonların kanser oluşumuna neden olan ciddi bağışıklı hastalıklarıyla ilişkili olması şaşırtıcı değildir ¹⁴⁵.

Hiç şüphe yok ki inflamazom düzenlenmesi ve işlenmesinin anlaşılması inflamasyon, fibrojen ve tümörjenezin işleyişine müdahale etmek için harika olanaklar sağlayacaktır. Yapılan bir çalışma, bu düzenleyici ağı çok karmaşık olduğunu ve bireysel inflamazom protein komplekslerinin aynı hücre tipinde eş zamanlı olarak eksprese ve aktive olabileceğini doğrulamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile farklı moleküler ajanlar, çok sayıda sensör protein yolları karakterize edilip ve sınıflandırılarak, endojen ve eksojen kökenli sağlıklı ve hastalıklı organlarda inflamazom faaliyetlerini sürdüren enflamatuar ligandlarının çok sayıda olduğu belirlenmiştir ¹⁴⁰.

2.7.2. NLRP12 tanımı ve lokasyonu

NLRP12 en erken tanımlanan NLRP'lerden biridir ve ekspresyonu esas olarak monositler ve granüositler içeren myeloid hücreleriyle sınırlıdır ¹⁴⁹. NLRP12, PYPAF7, RNO ya da Monarch-1 olarak da bilinmektedir. NLRP12 hücre içi NOD-benzeri reseptör (NLR) ailesinin bir üyesidir ve enflamatuar sitokinlerin üretimini aşağı yönde regüle ettiği ileri sürülmüştür ancak inflamasyon regülasyonundaki fizyolojik rolü karakterize edilememiştir. NLRP12 geni ilk kez HL60 insan lösemi hücre hattında tanımlanıp kısmi olarak karakterize edilmiştir ¹⁵⁰. İlk RNO olarak isimlendirilmiştir, HL60 hücrelerinde NO stimülasyonu üzerine yukarı yönde regüle olduğu bulunmuştur. Bunu takiben, tam uzunluktaki bir gen, bağımsız olarak, iki grup ile klonlanarak ve Monarch-1 ve PYPAF7 olarak adlandırılmıştır ^{136,151}. NLRP12 N ucunda PYD, merkezinde NBD ve C ucunda LRR bölgesi içeren hücre içi proteindir. NLRP12 insanda kromozomun 19q13.4 bölgesinde yer almaktadır. 3,8-kilobazlık bir cDNA'ya karşılık gelen 1062 aa'lık ve 120 kDa ağırlığında bir protein kodlar ¹⁵². NLRP12 proteini 10 ekzon kodlar. Protein veri tabanı içinde bir BLAST araması bir N-terminal pirin alanı (13-87 aralığında) Ekzon 1 PYD kodlar. Merkezi (212-528 aralığında) en uzun ekzon, Ekzon 3 NACHT ve NACHT ilişkili (NAD) bölgeleri içeren NBD bölgesini kodlar ve C-terminal alanı (712-1061 aralığında) Ekzon 4–9 arası LRRleri kodlar. Bu şekilde üçlü bir alan yapısı ortaya çıkarılmıştır. Pfam databazı, 27.0 sürümü (<http://pfam.xfam.org/>), bölge sınırlarını belirlemek için kullanılmıştır. PYPAF7 diğer pirin içeren proteinlerle önemli derecede benzerlik göstermektedir (Şekil 2.6.A). Alternatif kırılma sonucunda çeşitli varyantları oluşur. NLRP12 9 transkripte sahiptir. Transkriptler ekzonların ve kesip çıkarma bölgelerinin lineer şekli ayrı ayrı gösterilmiştir. Yoğunlaştırılmış bir görünüm elde edilmek istendiğinden intron bölgeleri orijinal uzunluğunda gösterilmemiştir. Görüntü TViewer, v3.1 sürümünde Tuncer ve arkadaşları tarafından elde edilmiştir ¹⁵³. (Genomatix software, Ann Arbor, MI, USA; <http://www.genomatix.de/>). Kesip çıkarılma sonrasındaki varyantları Ensembl databazdan elde edilmiştir (<http://www.ensembl.org/>) (Şekil 2.6.B, Tablo 2.5). Bu varyantların tam uzunluktaki üründen farklı ekspresyonu ve işlevi olup olmadığı daha tanımlanmamıştır. İnsanda NLRP12 ağırlıklı olarak nötrofiller, eozinofiller, monositler, makrofajlar ve olgunlaşmamış dendritik hücreler gibi miyeloid kökenli hücrelerde eksprese olurlar ve ekspresyonları patojen, patojen ürünü ve enflamatuar sitokinlere verilen cevapta aşağı yönde regüle olur. NLRP12 transkripsiyonun kısmi aşağı yönde

düzenlemesi promotere B lenfosit kaynaklı matürasyon protein-1 bağlanması ile TLR uyarımı ile sağlanır. NLRP12 ile Hsp70 ve Hsp90 şaperonları arasında etkileşim olduğu gösterilmiştir ve bu etkileşimlerin stabilitesi için önemli olduğu gösterilmiştir¹⁵⁴.



Şekil 2.6. İnsan NLRP12 geni ve proteini. (A) NLRP12 protein bölgeleri. (B) İnsan NLRP12 transkripti.

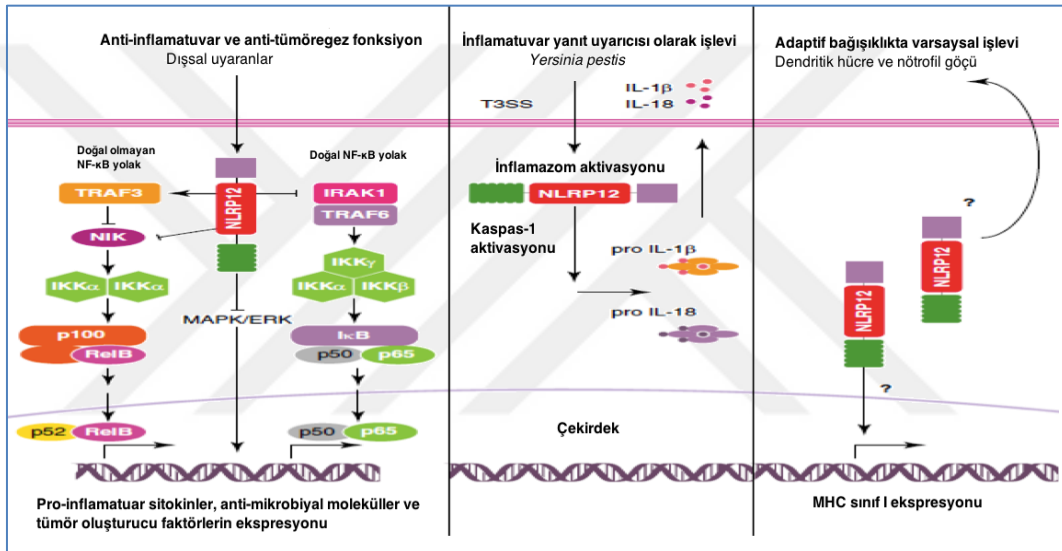
Tablo 2.5. İnsan NLRP12 Geni Kesip Çıkarılma varyantları

İsim	Lokasyon(19q13.4; ters zincir)	Ensembl transkripti ID	Uzunluk (bp)	Ensembl protein ID (aa)	Uzunluk (aa)
NLRP12-001	54,296,857–54,327,597	ENST00000324134	3801	ENSP00000319377	1061
NLRP12-002	54,296,997–54,327,648	ENST00000391773	3715	ENSP00000375653	1062
NLRP12-007	54,296,997–54,327,648	ENST00000391772	3205	ENSP00000375652	892
NLRP12-005	54,296,997–54,311,959	ENST00000492915	2479	No protein product	
NLRP12-203	54,296,857–54,327,648	ENST00000535162	3681	ENSP00000438030	1004
NLRP12-201	54,296,857–54,327,648	ENST00000351894	3516	ENSP00000340473	949
NLRP12-202	54,296,857–54,327,648	ENST00000354278	3345	ENSP00000346231	892
NLRP12-004	54,296,997–54,327,648	ENST00000345770	3547	ENSP00000341428	1006
NLRP12-003	54,296,996–54,327,571	ENST00000391775	3465	ENSP00000375655	1004

Veriler Ensembl database'den alınmıştır (<http://www.ensembl.org/>).

2.7.3. NLRP12 gen ürününün işlevleri

NLRP12 doğal ve doğal olmayan NF- κ B sinyal yolağı ve aktive edilen MAPK / ERK yolağını baskılayarak inflamatuvar sinyal ve kolon tümör oluşumunun negatif bir düzenleyicisi olarak işlev görmektedir. Ancak, NLRP12 *Y. Pestis* enfeksiyonunda kaspaz-1 aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokin salınımına yol açarak inflamazom sinyalizasyonun yolağına da dâhil olabilir. NLRP12' nin ayrıca adaptif bağışıklıkta dentrik hücreler ve nötrofillerin göçünü kontrol ettiği, klasik ve klasik olmayan MHC sınıf I genlerinin ekspresyonunda rol aldığı da belirtilmiştir. NLRP12' nin IKK, IB kinaz; T3SS, tip III salgılama sistemi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.6) ¹⁵³.



Şekil 2.7. NLRP12' nin işlevleri ¹⁵³.

NLRP12, Veba etkeni *Yersinia pestis* gibi bazı enfeksiyonların indükleyici ajanlarına karşı korumada olduğu, gibi kolon kanserinde de ekspresyonu son zamanda araştırılmıştır. NLRP12 çoğunlukla immün hücrelerde eksprese olmasının yanında patojen ürünleri ve inflamatuvar sitokinleri aşağı yönde regüle eder ve inflamatuvar cevapta negatif yönde düzenleme yaptığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmada NLRP12' nin inflamatuvar sinyalleşme, konak savunması ve karsinogenezdeki rolü ve önemi araştırılmıştır.

Şimdiye kadar hiçbir literatürde NLRP12 ve üreme arasında bir ilişkinin olduğu gösterilmemiştir. NLRP9' a benzer şekilde NLRP12 de dölleme ve zigot gelişiminde yer almaktadır. NLRP12 makrofajlarda NF- κ B ve ERK sinyalini negatif düzenler.

Yapılan çalışmalar NLRP12 mikrobiyal bileşenleri, kolit ve kolorektal kanser gelişiminde yanıt olarak NF- κ B ve ERK yollarının aktivasyonunu kontrol ederek proenflamatuar sitokinler ve kemokinlerin bastırılmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Aynı şekilde, NLRP12 eksikliğinin, inflammatuar sinyal yollarını kırmada başarısızlığa neden olarak farelerde kolit ve kolit ile ilişkili tümörigeneze artmış duyarlılığa yol açtığı gösterilmiştir. NMR spektroskopisi kullanarak NLRP12 (NLRP12 PYD) N-ucu pirin alanının yapısı ve dinamiği belirlenmiştir. NLRP12'nin Toll-benzeri reseptör bağımlı NF- κ B aktivasyonunun düzenlenmesinde rol alan inflammasome olmayan NLR olduğu ortaya çıkarılmıştır. Buna ek olarak, ilk kez in vitro olarak pro-apoptotik Fas-bağlantılı faktör 1 (FAF-1) proteini ve NLRP12 PYD arasındaki homotipik olmayan PYD etkileşimi gösterilmiştir ki bu da doğuştan gelen bağışıklık sistemi ve apoptotik sinyaller ile ilişkilidir. İlginç bir şekilde, bu proteine katılan bütün artıklar: protein etkileşimleri α 2- α 3 yüzeyi ile sınırlı olup, NLRP12 PYD bölgesinde şüana kadar rapor edilmiş NLRP PYD yapılarından farklıdır. Deneysel olarak NLRP12 PYD ve FAF-1 UBA etki alanı arasındaki etkileşimde triptofan 45' in önemli bir rol aldığı vurgulanmıştır. Gen susturma kullanımı sayesinde, NLRP12, TLR bağımlı NF- κ B aktivasyonunun aşağı yönde düzenlenmesi yoluyla akış yönündeki ince-ayar sinyallerinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Daha sonra, NLRP12 kuralsız NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek pro-enflamatuar sitokinlerin üretimini bastırır. Bu düzenleme, muhtemelen gerekli kinazların inhibisyonu yoluyla, özellikle standart olmayan MAP3 kinaz NIK (NF- κ B indüklenen kinaz) ile sağlanır¹⁵¹. Buna ek olarak, NLRP12'nin Hsp90 şaperon etkileşimi ve proteazom yolağında rol oynadığı ileri sürülmüştür¹⁵⁴. NLRP12'nin NIK aracılı indüklenen NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu tam olarak bilinmese de, NLRP12 bir proteazom bağımlı yolu ile NIK degradasyonunu teşvik ettiği düşünülmektedir. Bu, FAF-1 gibi adaptör benzeri proteinleri olan efektör bölgelerle etkileşime girebilir¹⁵⁵, ve bu nedenle oluşan sinyal apoptotik doğuştan gelen bağışıklık sistemini etkiler¹³³. Proteini direkt etkileyen yüzey değişimleri ve protein etkileşimleri gibi kritik parametreler bu ve diğer NLRP PYDs yapısı ve dinamiğinin değişebilirliğini göstermiştir. Böylece, özellikle genel PYD'ler ve NLRP12 PYD biyolojik işlevini anlamak için, NLRP12 PYD yapısını ve otokorelasyonu ile ilişkili omurga dinamikleri tespit edilmiştir¹⁵⁶. Ayrıca, NLRP12 proteazom yolağında önemli bir rol oynar^{149,152}. Böylece, doğuştan bağışıklık ve apoptotik sinyal yollarının arasında önemli bir düzenleyici köprü olarak kabul edilir.

NLRP12 hem TLR hem de TNFR yolaklarının negatif düzenleyicisidir. Çünkü Monarch-1TLR2 ve TLR4 aktivasyonuna yol açan ilk NLR proteinidir. NLRP12' in TLR sinyalizasyonunu IRAK-1 ve IRAK-1' in hiperfosforilasyonu ile ilişkili olarak bloke ettiği bulunmuştur ¹⁴⁹. IRAK-1' in hiperfosforilasyonu TLR sinyal iletimi için önemlidir çünkü bu TRAF6 bağlanması ve aşağı akış yönünde sinyal iletimi için gerekli olan TLR reseptör kompleksi için afiniteyi azaltmada rol alır. NLRP12 açıkça IRAK-1' in hiperfosforilasyonuna neden olur. Bu bulgularla uyumlu olarak, IRAK-1 hiperfosforilasyonunun endotoksin dayanıklı hücrelerde azaltılmış olması gözlenmiştir ki burada LPS maruziyeti daha fazla NF-κB aktivasyonunu uyaramaz. Bu nedenle, IRAK-1 fosforilasyonu TLR sinyal kontrolünde önemli bir düzenleyici adım olarak ortaya çıkmaktadır ve NLRP12, bu önemli yolağın bir inhibitörüdür. Sonuç olarak miyeloid/ monositik hücrelerde siRNA kullanılarak NLRP12' in bir anti-inflamatuvar fonksiyonlu bir protein olduğu en ikna edici şekilde gösterilmiştir. NLRP12 N-terminal pirin alanı pro-kaspaz-1 aktivasyonu için gereklidir çünkü bu alanın silinmesi IL-1 sinerjik üretimini ortadan kaldırmıştır. Birlikte ele alındığında bu veriler, NLRP12 ve ASC sinerjistik pro-kaspaz-1' in aktive edildiğini göstermektedir.

2.7.4. NLRP12 geninin ekspresyonu

NLRP12 geninin ekspresyonunun bağışıklık hücrelerinde sınırlı olduğu ve inflamatuvar sinyal yolağını aktive ettiği bildirilmiştir ^{8,136}. NLRP12' nin ekspresyonu oosit, sperm ve ebriyolarda NLRP5 ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. NLRP12' nin ekspresyon modeli normal ve anormal embriyolarda NLRP5 ve NLRP9 ile benzerdir. NLR' ler arasında NLRP12 büyük ölçüde miyeloid kökenli hücrelerde ifade edilir. NLRP12 immün enflamatuvar yanıtta NF-κB yolağının negatif düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Böylece NLRP12' nin ekspresyonunun inflamasyonu düzenlediği ve MS (Multiple Sklerosis) seyrini düzenleyebileceği düşünülmüştür ¹⁵⁷. Omurilikte NLRP12 -/- farelerde, yabanıl tip farelere kıyasla pro-inflamatuvar genlerin CCR5, COX-2, ve IL-1β ekspresyonunda, mikroglia hücrelerinde TNF-α, IL-6 ve NO (nitrik oksit) salınımında önemli bir artış bulunmuştur (P<0.05). NLRP12' nin Encephalomyelitis (EAE) gelişimi sırasında iltihabı bastırmak suretiyle koruyucu bir rol oynadığı ve NLRP12 yokluğunda artmış enflamatuvar tepkinin oluştuğu sonucuna varılmıştır ¹⁵⁷. NLRP12' nin ekspresyonu negatif NF-κB yolağını düzenleyerek immün, enflamatuvar yanıtlarda ve dentrik hücre göçü gibi olaylarda düzenleyici bir rol oynamaktadır ¹⁵³. NF-κB yolağı inflamatuvar cevaptaki en önemli yolaklardan birisidir. Tipik olarak NF-κB

aktivasyonu sonucunda TNF- α , IL-1 β , ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar kemokinlerin, CCL5, CCL22 ve MIP1 α gibi kemokinlerin ve iNOS ve COX2 gibi proteinlerin transkripsiyonu olur ¹⁵⁸. Sonuçlar NLRP12' nin EAE gelişimi sırasında iltihap inhibisyonu üzerine etki ettiğini göstermektedir. NLRP12 T hücre çoğalmasını negatif yönde düzenler. NLRP12 eksikliği, aktive edilmiş T hücreleri tarafından IL-4 üretimini etkilemez. EAE sonrası CNS' de NLRP12 eksikliği pro-enflamatuvar moleküllerin ekspresyonunu artırmaktadır ¹⁵⁷.

Gerçektende *Mycobacterium tuberculosis* ile yapılan çalışmalarda inflamatuvar yanıtın artmasıyla birlikte NLRP12 nin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir ^{149,152}. Ayrıca, NLRP12'nin aşırı sentezlenmesinin, daha önce negatif NF- κ B yolağı üzerine etki ederek oluşacak ateşli tepkiyi hafiflettiği gösterilmiştir ¹⁵². Shami ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, NO' deki artışın NLRP12'nin ekspresyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir ¹⁵⁰. Bugüne kadar NLRP12'nin farklı hücre tiplerindeki aktivitesinin açıklanması için bir mekanizma geliştirilememiştir. NLRP12'nin farklı hücre tiplerinde NF- κ B klasik ve alternatif yollarını farklı uyarımlarla inhibe ettiği gösterilmiştir ¹⁵³.

NLRP12 eksikliği olan farelerde kolon iltihabı ve kolorektal tümörü makrofajlardaki NF- κ B deki bir hatanın engellenmesi ve ERK aktivasyonu sebebiyle gelişir. Bu sonuçlar, intestinal homeostazisin korunması ve kolorektal kanser gelişimine karşı koruma sağlamada NLRP12'nin kritik bir rol üstlendiğini ortaya koymaktadır ¹⁴⁶. Pro-inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretiminin temel aracısı olan NF- κ B' nin aktivasyonu ile epitel ve immün hücrelerin yüzeyindeki TLR gibi doğal immün reseptörlerin inflamasyonu işlemi başlatılır. Bununla birlikte, NF- κ B sinyalinin sıkı bir şekilde düzenlenmesi ve bağırsak mikrobiyotasının homeostatik etkileşimlerinin faydalı bir seviyede muhafaza edilmesi gereklidir. Bu nedenle, regüle edilmemiş NF- κ B sinyal yolu bağırsak iltihabı, kolit ve kolorektal kanser gelişimindeki önemli bir mekanizmayı temsil edebilir ¹⁵⁹. Son zamanlarda yapılan çalışmalar NF- κ B aktivasyonunun negatif düzenlemesindeki moleküllerin bağırsak homeostazisi üzerinde olumsuz bir rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır.

NLRP12 ekspresyonu bağışıklık hücreleriyle ilişkili olduğu için, patojenik ürünlere ve inflamatuvar sitokinlere cevap olarak aşağı yönde regüle edildiğinden, bu proteinin

enflamasyonu ve bağışıklığı düzenlediği tahmin edilmiştir ¹⁵². İmmün olmayan hücrelerde aşırı ekspresyonunun ilk gösterildiği çalışmada NLRP12'nin ASC ile kolokelize olup IL-1 salgılayarak NF-κB ve kaspaz1'i aktive ettiği gösterilmiştir ¹³⁶. Bu bulgular, NF-κB aktivasyonunda NLRP12 bir rolü olduğunu göstermiştir, ancak daha sonraki yayınlar enflamatuar döngünün bir söndürücüsü olarak NLRP12'yi göstermiştir. Bu çalışmaların birinde, NLRP12 TLR TNFR sinyallemesinin bir negatif düzenleyicisi olarak işlev gören, NF-κB sinyal antagonisti olduğu gösterilmiştir ¹⁵¹. İnsan monositik hücre hattı THP-1 'de NLRP12 'nin susturulması TLR agonistleri, TNF-α ve M. *Tuberculosis* 'e cevaben proinflamatuar sitokinleri NF-κB aktivasyonunu arttırmıştır ¹⁵². Biyokimyasal çalışmalar, NLRP12'nin doğal ve doğal olmayan NF-B yolağına müdahale ederek proenflamatuar sitokinler ve kemokinlerin üretimini bastırdığını göstermiştir ^{144,146}. THP-1 hücrelerinde NLRP12' nin aşırı ekspresyonu standart NF-κB alt-birimlerinin rela (p65) ve p50 nükleer translokasyon TLR2 agonisti ile uyarıldıktan sonra, normal olarak ilerlerken, CD40 ligandı uyarımı ile devam eden TLR2 ligand ile ön-muamelede, P52 işlenmesinde ve çekirdek translokasyonunda bir azalmaya neden olmuştur. Bu da NIK proteazom aracılığıyla azalmanın neden olduğu NLRP12' nin LRR ve NOD bölgelerinin NIK ile etkileşiminin sonucudur ¹⁵². Yeni yapılan bir çalışma da NLRP12' nin ne NIK ne de TRAF ile etkileşimde olmadığını ancak direkt olarak NIK degradasyonunda yer aldığını vurgulamıştır ¹⁴⁴. Bu nedenle, NLRP12 TRAF3 bozulmasını önleyerek NF-κB aktivasyonunu devam ettirecek ve bunun sonucu olarak, NIK aktivasyonu gerçekleşecektir (Şekil 2.6). NLRP12'nin ifade bulduğu hücrelerde sırasıyla NIK yükselir, p100 p52' ye işlenir ve TRAF3 seviyesi azalır. Farklı mekanizmalar vasıtasıyla, NLRP12 dâhil olmak üzere birçok NLR'lerin, normal NF-κB aktivasyon yolağını körelttiği gösterilmiştir. Özellikle NLRP12' nin IRAK1 fosforilasyonunu önlemesi ve NLRP12' nin NBD bölgesine ATP bağlanması inhibisyonunun oluşması için kritik öneme sahiptir (Şekil 2.6).

NLRP12 ve ASC' nin birlikte ekspresyonu sonucunda kaspaz-1' in sinerjistik aktivasyonu ve interlökin-1 salgılanmasının artması gerçekleşmektedir. Buna ilaveten, PYPAF1 ASC ile birlikte ifade edilmesi kaspaz-1 bağımlı sitokin işlenmesine neden olur. Bu bulgular PYPAF aile üyelerinin NF-κB ve sitokin işleme aktivasyonunun düzenlenmesi ile inflamatuvar sinyalizasyona katılmakta olduğunu göstermektedir.

2.7.5. NLRP12 genindeki mutasyon

Yukarıda sözü edilen NRLlerin aksine, NLRP12' nin vivo rolü net değildir. Özellikle, NLRP12 kodlayan gendeki polimorfizm periyodik ateş sendromu ve atopik dermatitin artan duyarlılığı ile ilişkili bulunmuştur^{154,160,161}. Dahası, NLRP12 in vitro koşullarda proteozomal bozulması için kinaz IRAK1 ve NIK hedefleyerek standart olan ve olmayan NF-κB sinyalini negatif düzenlediği önerilmiştir^{149,152}. Ancak, son zamanlarda periyodik ateş sendromlu hastalarda NLRP12 missense mutasyonların olması, NF-κB sinyalinin inhibisyonundan daha çok artmış kaspaz-1 aktivasyonu ile bağlantılı olduğu ortaya çıkarılmıştır^{160,161}. Bu nedenle, NF-κB yollarının NLRP12 aracılı düzenlenmesinin fizyolojik uygunluğunun tarif edilmesi gerekmektedir. NLRP12 aracılı sinyal düzenlenmesinin otoimmün bozukluklara nasıl yol açtığı az bilinmesine karşın, NLRP12 missense mutasyonlarının insanlarda periyodik ateş sendromları ve atopik dermatite yol açtığı bildirilmiştir¹⁶⁰. İnsan ve fare makrofajları ile in vitro yapılan çalışmalar, NLRP12 TLR bağımlı sitokin üretiminin olduğunu göstermektedir^{146,162}. Ayrıca, proenflamatuar sinyalleşmesinin NLRP12 aracılığıyla bastırılması farelerde kolon inflamasyon ve kanser oluşumunda önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür¹⁴⁴. Bu çalışmalar, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde inflamatuvar cevapların kritik bir düzenleyicisi olarak NLRP12'yi göstermektedir. Ancak, inflamatuvar hastalığın ilerlemesi sırasında T hücresi tepkilerini düzenleyen NLRP12' nin varsayımsal rolü ve önemi karakterize edilmemiştir. T hücreleri, merkezi oldukları doku harabiyetine, efektör sitokinler ve kemokinlerin salınımlarıyla birçok otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynar¹⁶³. Özet olarak, T hücrel cevaplarının ve T-hücresi-aracılı hastalıkların negatif düzenleyicisi olarak NLRP12 karakterize edilmiştir. NLRP12 içsel T hücrelerinde, T hücresi aktivasyonunu ve düzensiz NLRP12 aracılı sinyal iletimini düzenleyen inflamatuvar hastalık oluşturmak için yeterli olmuştur¹⁶⁴. Bu bulgular NLRP12'nin T hücrel tepkilerinin içsel zayıflatılmasında ve IL-4 ile ilişkili inflamasyonundaki ek rolleri tanımlanmıştır. Ayrıca, NLRP12'yi hedef alan tedavinin T-hücre aracılı hastalık tedavisinde yeni bir strateji olabileceğini düşündürmektedir. Bu NLRP12 mutasyona sahip insan monositik hücrelerin, hiperinflamatuvar olduğu ve inflamatuvar hastalık olan periyodik ateş sendromuyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir¹⁶¹. Sonuç olarak Zaki ve arkadaşları ile Allen ve arkadaşları buldukları NLRP12' nin NF-κB sinyalizasyonunda, bağırsak iltihaplanmasında ve tümörogenezde önemli bir denetim noktasının elemanı olduğunu göstermişlerdir¹⁴⁴. İlk çalışma NLRP12' nin

sadece normal NF- κ B yolağında düzenleyici bir rolü olduğunu ortaya çıkarmasına rağmen ikinci çalışmada normal olmayan yolak üzerinde büyük bir etkisi olduğu onaylanmıştır. Diğer çalışmalarda enfeksiyöz ajanlara konak direncinde NLRP12' nin rolü ele alınmıştır. NLRP12 veba etkeni olan *Yersinia pestis* tanınmasında bir inflammatör bileşeni olarak belirlenmiştir. NLRP12 $-/-$ fareler *Y. pestis* enfeksiyonundan sonra yüksek ölüm ve bakteriyel enfeksiyon, NLRP12' nin inflammatörde IL-18 ve IL-1 β üretiminde merkezi düzenleyici ve kaspaz-1 aktifleşmesinde aracı olarak görev aldığı göstermiştir. Dahası, NLRP12 $-/-$ lerin *Y.pestis* ile enfeksiyonu sonrasında NF- κ B sinyalizasyonuna çok az etkisi olmasına rağmen; NLRP12 IL-18 aracılığıyla IFN- γ üretimini indükler. İnflamasyon sırasında NLRP12' nin düzenleyici rolü ile ilgili olarak, NLRP12 genindeki mutasyonlar, otoinflamatuvar sendromların yeni bir sınıfı olan NLRP12AD ile ilişkili bulunmuştur ki bu sınıf ailesel soğuk otoinflamatuvar sendromunda bazı formları içerir ¹⁶¹. Yapılan çalışmalarda NBD bölgesinde yer alan p.Arg284X anlamsız mutasyonunun yabancı tipte karşılaştırıldığında NF- κ B aktivasyonunda nasıl daha az etkili olduğu araştırılmıştır ¹⁶⁰. İnflamasyona neden olan fonksiyon kayıplarında, kesilip çıkarılmada bir kusur üreten ekleme ayrıca NF- κ B sinyalizasyonu üzerine baskılayıcı özellikteki NLRP12' de belirgin bir azalmaya neden olur. Bu bulguların aksine, missense mutasyon p.Asp294Glu, evrimsel olarak korunmuş NBD bölgesinin araştırılmasıyla NF- κ B inhibisyonundan çok artan kaspaz-1 aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur ¹⁶¹. Ayrıca, CpG bölgesinde yer alan yanlış anlamlı bir mutasyon (p.Arg352Cys) NLRP12' nin proteinin nükleotid bağlama bölgesini kodlayan 3. ekzonunda tanımlanmıştır ve bu yine NF- κ B sinyalizasyonu üzerine direkt etkisi gösterilmemesine rağmen kaspaz-1 sinyalizasyonunun aktifleşmesini artırır ¹⁶¹. Sonuç olarak, periyodik ateş sendromunda NLRP12' nin fizyolojik olarak rol aldığı belli olmasına rağmen, NF- κ B yolunu nasıl bir şekilde düzenlediğinin tarif edilmesi gerekmektedir. Son olarak ve belirtilen rollerinin yanı sıra, NLRP12' nin in vitro koşullarda klasik ve klasik olmayan MHC sınıf I genlerinin ekspresyonlarını kontrol ettiği öne sürülmüştür ¹⁴⁹. Bu bulgular sırasıyla MHC sınıf II ve MHC sınıf I genlerinin transaktivatörü olan CIITA ve NLRC5' i anımsatmıştır.

NLRP12 geninde heterozigot mutasyonlar sistemik otoinflamatuvar hastalıklara sahip hastalarda bulunmuştur. Ancak, NLRP12 ile ilişkili periyodik ateş sendromları klasik tanı semptomu olmayan hastalar da dâhil olmak üzere, geniş bir klinik spektrum

gösterir. NLRP12 gen ürününün interlökin-1 beta (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) de dâhil olmak üzere enflamatuvar sitokinlerin olgunlaşmasını düzenleme ve inflamazom adaptör protein ASC ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir ¹³⁶. Bununla birlikte, hem pro-enflamatuvar hem de baskılayıcı fonksiyonu, inflamazom yolları içinde karmaşık etkileşimleri vurgulayarak Plasmodium ve Salmonella enterica enfeksiyonu NALP12 için tarif edilmiştir ^{162,165}. Benzer şekilde, NLRP12 mutasyonları, kalıtsal periyodik ateş sendromları, asemptomatik taşıyıcılar ve ailesel soğuk oto-inflamatuvar sendromu 2 (FCAS2) arasında değişen farklı klinik fenotiplere neden olabilir ^{160,161}. İlginçtir, heterozigot nonsense ve kesilip çıkarma bölgesindeki mutasyonlar, inflamazom aktivasyonunun artması sonucu NF- κ B sinyal yolağı üzerine NLRP12'nin inhibe edici özelliklerinin azalmasına bağlı IL-1 β serum salınımında yüz katlık bir artışın eşlik ettiği gösterilmiştir. (haploinsufficient allel işlevi kaybı) ¹⁶¹.

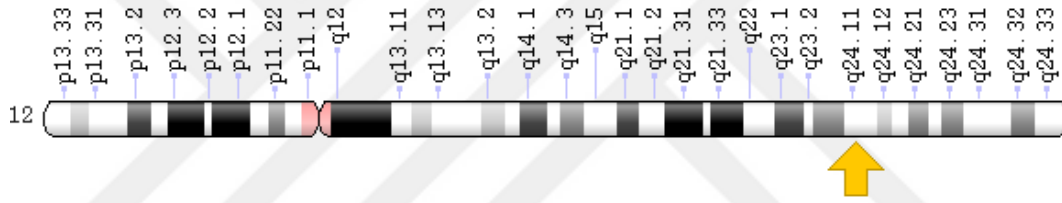
Yapılan diğer bir çalışmada NLRP12 mutasyonları ile, bu mutasyonları taşıyan hastalarda T hücrelerini hedefleyen potansiyel bir tedavi yaklaşımı olabileceğini düşündürmektedir. Araştırmacılar NLRP12' nin EAE' de önemli bir rol oynadığını ve NLRP12 genindeki mutasyonların insan MS hastalarının taranması ile bu zayıflatıcı otoimmün hastalığını anlamak için önemini göstermişlerdir ¹⁵⁷. İşlevsel olmayan NF- κ B sinyalizasyonuna ek olarak, NLRP12 polimorfizmleri, insan popülasyonlarında ki enflamatuvar bozukluk yelpazesi ile ilişkilidir ¹⁶¹.

2.8. MVK Geni

2.8.1. MVK geni tanımı ve lokasyonu

MVK geni tarafından kodlanan Mevalonate kinase, kolesterol biyosentezindeki ilk aşamayı katalizler. Mevalonate kinase (MVK) 5' UTR bölgesi farklı olan ve iki farklı transkripti bulunan bir proteindir. KIME_HUMAN, LH reseptör mRNA-binding protein, LRBP, Mevalonate kinase 1, MK ve MVLK isimleride bilinmektedir ¹⁶⁶. MVK geni kromozomda 12q24.11 lokasyonunda bulunur (Şekil 2.6.) ve 11 kodlama yapan ekzon ile 10 kodlama yapmayan intron içeren 21 kb'lık bir gen bölgesidir ³. 1,188 bp' lik açık okuma çerçevesi 42,450 Da' lık, 396 aa'lik polipeptid kodlar. Tahmin edilen protein sekansının galaktokinaza benzediği gösterilmiştir ¹⁶⁶. Ekzon 1 5'UTR bölgesini, ekzon 2 ATG başlangıç kodunu ve ekzon 11 stop (durdurma) kodunu ve tüm 3'UTR bölgesini içerir. MVK çok sayıda hücrel süreçlerde önemli fonksiyonlara sahiptir ve

Mevalonate yolağı için kritik önem taşır. MVK'ın enzimatik aktivitesi için çok önemli olan dört korunmuş fonksiyonel bölge ve dört aminoasit (K13, E19, E193 ve D204) içerir⁴. MVK 5'-translasyonu yapılmamış bölge (UTR) farklı olan iki MVK transkript tarafından kodlanan bir proteindir (Tablo 2.6.). Zhang ve arkadaşları insan derisindeki epidermal hücrelerde dâhil, bir çok dokuda geniş bir şekilde eksprese olduğunu belirtmiştir. Zhang ve ark. (2012), keratinositler içerisinde MVK geninin aşırı ekspresyonunun, Spinoz tabakanın ve granüler tabaka proteinlerinin involukrini keratinosit ayırt edici markör keratin 1'in artan ekspresyonu ile bağlantılı olduğunu bulmuşlardır. Bazal tabakada keratin 5 ifadesi üzerinde hiçbir etkisi yoktur. MVK geninin sentezlenmesi, UV aracılı apoptosiden keratinositleri korumaktadır⁵. Hamster ve insan somatik hücre melezleri ile yapılan daha önceki çalışmalarda MVK'nın kromozom 12' de bulunduğu ortaya çıkarılmıştır¹⁸⁷.



Şekil 2.8. İnsan MVK genin kromozom üzerindeki yeri (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MVK#location>)

Tablo 2.6. İnsan MVK Gene Kesip Çıkarılma varyantları

İsim	Transkript ID	Uzunluk(bp)	Translasyon ID	Uzunluk (aa)
MVK-201	ENST00000539575	2747	ENSP00000443551	396
MVK-202	ENST00000625889	2591	ENSP00000486846	344
MVK-001	ENST00000228510	1956	ENSP00000228510	396
MVK-003	ENST00000392727	1770	ENSP00000376487	344
MVK-203	ENST00000629016	1591	ENSP00000486804	83
MVK-007	ENST00000546277	886	ENSP00000438153	200
MVK-006	ENST00000539335	834	ENSP00000440379	170
MVK-009	ENST00000539696	608	ENSP00000439134	115
MVK-004	ENST00000447878	1644	ENSP00000415555	83
MVK-002	ENST00000537237	1296	ENSP00000445382	117
MVK-012	ENST00000545774	702	ENSP00000443978	83
MVK-010	ENST00000535044	548	-	Protein yok
MVK-005	ENST00000540353	4109	-	Protein yok
MVK-011	ENST00000545516	522	-	Protein yok

Veriler Ensembl databaseden alınmıştır (<http://www.ensembl.org/>).

2.8.2. MVK geni işlevi

MVK geni mevalonat kinaz enzimini kodlar ki bu enzim steroid sentezinde önemli bir rol oynamaktadır. Mevalonat kinaz enzimi, mevalonat asidin mevalonat-5-fosfata dönüşümünü katalize eder. Bu dönüşüm kolesterol yolağının ikinci adımıdır, bundan sonra kolesterol steroid hormonlar ve safra asitlerine dönüştürülür. Mevalonat kinaz, aynı zamanda, hücre büyümesi, hücre olgunlaşması (farklılaşma), hücrenin yapısal (hücre iskeleti) oluşumu, gen aktivitesi (sentezleme), protein üretimi ve modifikasyonu gibi bazı hücre fonksiyonları için gerekli olan diğer maddelerin üretilmesine için yardımcı olur. Bu gendeki mutasyonlar hem hiper IgD sendromu (HIDS), hem de daha ciddi mevalonik asidüriden (MVA) sorumludur ¹⁶⁷. Genom bağlantı analiziyle (GWAS) MVK (mürin mevalonat kinaz), MMAB [metilmalonik asidüriya (kobalamin eksikliği) cbIB tipi] ve KCTD10 (potasyum kanal tetramerizasyon 10 içeren bölgesi) gibi genleri içeren genler, kromozomun 12q24.11 bölgesi tanımlanmıştır ve bütün bu genler HDL-kolesterol konsantrasyonundan etkilenirler ¹⁶⁸. Lipit konsantrasyonundan etkilenen bölgenin önemi diğer bağlantılı çalışmalarla da rapor edilmiştir ¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Özel olarak, 2 komşu gen olan MVK ve MMAB, HDL metabolizması ile ilişkili metabolik yoluna katılabilir ¹⁷². MVK geni tarafından kodlanan Mevalonat kinaz, kolesterol biosentezinde ilk aşamayı katalizleyen enzimdir. İnsanda immünoglobülinler D ve A konsantrasyonlarının artışı ve ateş ile karakterize olan hiperimmünoglobülinemi sendromu MVK mutasyonlarının homozigotluğuyla oluşur. Yapılan bir çalışmada, KCTD10, MVK ve MMAB genlerinin genetik varyasyonlarının, diyet karbonhidrat bağlı plazma HDL kolesterol konsantrasyonlarını düzenlediğine dair ilk kanıtı öne sürülmüştür ¹⁷³. Otoenflamatuar sendromlar, sistemik inflamasyon yaşam boyu tekrarlayan nöbetleri ile karakterize hastalıklardır. Bunlardan biri otozomal resesif kalıtım gösteren, MVK eksikliğinden kaynaklı fenotiplerin olduğu HIDS hastalığıdır ¹⁷⁴. MVK genindeki mutasyonların neden olduğu MKA kolesterol ve sterol izoprenoidlerin üretildiği isoprenoit yolaktaki MVK aktivitesinin azalması sonucu oluşur ¹⁷⁵. Farnesil, geranil ve ubikinon olarak izoprenoidler, çeşitli hücresel süreçlerde rol alan önemli bileşiklerdendir. Şu anda organizma için tehlikeli boyutta olan ateş oluşumunu engellemek için bilinen bir tatmin edici tedavi yoktur, ancak IL-1 aktivitesinin bloke edilmesi ateş ve enflamasyonu azaltabilir ¹⁷⁶. Yapılan çalışmalar MVK geninin, hastalarda DSAP semptomlarına da yol açan gen olduğunu göstermiştir ^{5,6}. MVK hücresel süreçlerde önemli fonksiyonların çalışması için gerekli olan mevalonat yolu için kritik öneme sahiptir ³.

2.8.3. MVK geni mutasyonu

MVK gen içerisinde en az 80 mutasyonun, mevalonat kinaz eksikliğine neden olduğu tespit edilmiştir. İki tür mevalonat kinaz eksiliği vardır, bunlar belirti ve bulguların şiddetine göre ayırt edilirler. Daha az şiddetli olana hiperimmünglobulin D sendromu (HIDS) ve daha şiddetli olana ise mevalonik asidüri (MVA) denir. Mevalonat kinaz enziminde tek bir aminoasidin değişmesiyle oluşan mevalonat kinaz eksikliği çoğunlukla MVK genindeki mutasyon sebebiyle oluşur. HIDS' li kişilerin %80' ninde bir mutasyon sonucunda enzimin 337. Pozisyonundaki izolösin aminoasidinin yerini valine aminoasidi almıştır (Val337Ile/V337I). V337I mutasyonu MVA'lı kişilerde hiçbir zaman bulunmamıştır. İnsanlarda MVK geninde homozigot mutasyon taşıyan bireylerde ateş ve artan konsantrasyondaki immünoglobülinler D ve A ile karakterize olan HIDS sendromu görülür ¹⁷³. Kalıtsal periyodik ateş (HPF) sendromlarındaki genlerin çalışıldığı bir çalışmada, kromozomun 12q24 üzerinde bulunan MVK geni, HIDS sendromunda da çalışılmıştır ¹⁷⁷. HIDS diğer HPF sendromları gibi periyodik inflamasyon ile karakterizedir fakat diğerlerinden farklı olarak serumda yüksek IgD seviyesi gözlemlenir ve lenfadenopati, döküntü, sindirim sistemi rahatsızlıkları ve artrit gibi bir dizi bulgusu vardır ¹⁷⁸.

HIDS; tekrarlayıcı ateş atakları, karın ağrısı ve artralji ile karakterize otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalık olup mevalonat kinazı kodlayan MVK gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır. HIDS'in A alt grubu ise henüz bilinmeyen bir genden kaynaklanır. HIDS hastalığında gözlenen periodik ateş ve karın ağrısı epizodlarını FMF'deki ataklardan ayırt etmek genellikle mümkün değildir. Bu nedenle, hastaların kolsişine yanıtının izlenmesi ve moleküler genetik tanı yöntemlerinin kullanılması ile doğru tanıya ulaşılabilir ¹⁷⁹.

Dissemine Yüzeysel Aktinik Porokeratoz (DSAP), yaşa bağımlı çeşitli penetrans ile otozomal dominant kalıtılan bir deri hastalığıdır ⁵. Son zamanlarda yapılan çalışmalar MVK geninin, DSAP hastalarının semptomlarına yol açan gen olduğunu göstermiştir ^{5,6,180}. Ancak, nispeten nadir riski nedeniyle, şu anda, DSAP'a neden olan MVK mutasyonu hastalarda çok sınırlıdır. Yapılan bir çalışmada, bir yıllık sürede 4 aile ve 10 DSAP sporadik vakalar alınmıştır. PCR ve direkt DNA sekanslama ile bir Çinli ailenin MVK geninde yeni bir missense mutasyonun DSAP'a neden olduğu rapor edilmiştir ¹⁸¹.

MVK genindeki mutasyonlar ayrıca şiddetli monogenik metabolik bozukluk mevalonik asidüriden sorumludur ¹⁸².

Birçok MVK genin mutasyonu sonucunda mevalonat kinaz enziminin etkinliğinin azalmasına yol açan kararsız ve yanlış 3 boyutlu katlanmalar oluşmaktadır. Enzim eksikliğinin şiddeti durumun ciddiyetini belirler. Normal mevalonat kinaz aktivitesinin yaklaşık %1-20 arasındaki oranına sahip kişilerde HIDS gelişir. Genellikle %1' inden daha azına sahip olanlarda ise MVA gelişir. Mevalonat aktivitesindeki kısıtlanmaya rağmen, mevalonat kinaz eksikliği olan kişilerde kolesterol, steroid hormonlar ve safra asitlerinin üretimi normal seviyededir. Enflamatuar reaksiyonlara neden olun bu tür ateş, deri döküntüleri, yüksek bağışıklık sistemi proteinleri ve mevalonat kinaz eksikliğinin birçok diğer özellikleri gibi tam mekanizması açık değildir ¹⁸³.

2.8.4. MVK geni polimorfizmi

Türkiyede yapılan bir çalışmada MVK polimorfizminin Behçet Hastalığının sebebi olabileceği önerilmiştir ¹⁸⁴. Bununla ilgili ilk yapılan çalışmada ise; hastalıkla MVK geni arasında bir bağlantı bulunamamıştır ¹⁸⁵. Behçet hastalığındaki MVK polimorfizmlerinin etkisinin nörolojik tutulumu olan hastalarda ek bir genetik yatkınlık faktörü ile olabileceği açıklanmıştır ¹⁸⁴. Ancak, bu sonuçların daha fazla sayıda bireylerin yer aldığı, büyük popülasyonlar'da ve farklı etnik gruplarda da onaylanması gerekiyor.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Grupların Çalışmaya Alınma Kriterleri

Çalışmaya Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon (FTR) polikliniğine başvuran, 1987 ACR tanı kriterlerine göre RA tanısı almış ve çalışmaya dâhil olma kriterlerini taşıyan 38 hasta ve FTR polikliniğine başvuran, bilinen tanı RA ve inflamatuvar herhangi bir hastalığı olmayan sağlıklı gönüllülerden oluşan 12 kişilik kontrol grubu alındı. Hasta grubunu oluşturan olgular daha önce tanı alıp tedavisi düzenlenerek takip edilen veya yeni tanı konmuş hastaları içeriyordu. Bilinen inflamatuvar ek hastalığı olanlar, malign hastalığı olanlar çalışmaya alınmamıştır. Çalışmaya alınmadan önce hastalar ve sağlıklı gönüllüler tetkikin içeriği, amacı ve uygulanışı konusunda bilgilendirilip yazılı onayları alındı. Çalışmaya dâhil edilen kişilerde MVK ve NLRP12 gen ekspresyonu ile karşılaştırılmak için cinsiyet, yaş gibi demografik kriterlerle birlikte, RA' lı hastalarda bakılan serolojik laboratuvar tetkikleri (yalnızca hasta grubunda) yapıldı. Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin venöz damarlarından 2 cc kan EDTA' lı tüpe alınmıştır. Bu kan örneklerinden RNA izolasyonu yapılmıştır.

Hasta grubunun demografik, klinik ve laboratuvar parametreleri hasta bilgi formlarına kaydedildi; çalışmaya katılmayı kabul eden hastalara aydınlatılmış onam formu imzalatıldı.

Hasta grubunda;

- ACR tanı kriterlerine göre RA hastası olması
- 20-80 yaşları arasında olması
- Çalışmaya katılmak için onay vermesi

Kontrol grubunda;

- 20-80 yaşları arasında olması
- Çalışmaya katılmak için onay vermesi.
- Kendisinde veya ailesinde herhangi bir inflamatuvar artrit (RA, Ankilozan spondilit, Ülseratif kolit, Crohn hastalığı, Reaktif artrit, Gut, FMF vb.) olmaması
- Kendisinde veya ailesinde kollojen doku hastalığı (SLE, Skleroderma, Sjögren hast vb.) veya vaskülit (Behçet, vs.) olmaması

- Kendisinde veya ailesinde el osteoartriti veya kendisinde osteoartrit olmaması
- Kendisinde bilinen malignite olmaması
- Kendisi veya ailesinde kalıtsal kas iskelet sistem hastalığı (O. İmperfecta, Marfan Sendromu, Ehlers- Danlos Sendromu, Kondrodizplazi vb.) olmaması

Hastaların hastalık süresi, tanı zamanı, hastalığın başlangıç yaşı, şikâyetin başladığı eklemler ve aldıkları tedaviler kaydedildi. Hastalık süresi 1 yıldan kısa olan hastalar erken RA tanılı hastalar olarak değerlendirildi.

3.2. Demografik ve Klinik Değerlendirme

Hastaların demografik ve klinik özelliklerinden yaşı, cinsiyeti, ailede romatizmal hastalık öyküsü, hastalık süresi (ay), sabah tutukluğunun süresi (dakika) ve kullandıkları ilaçlar sorgulandı. Tedavi şeklini sorgularken hastaların ilaç kullanımı sorgulandı ve daha önceden ilaç tedavisine başlayanların ne kadar süredir hangi ilacı kullandıkları ve bu ilaçları başka bir ilaçla birlikte kullanıp kullanmadıkları sorgulandı. Hastaların ağrı, yorgunluk gibi genel durumunun değerlendirilmesi için görsel ağrı skoru (GAS), fonksiyonel-özürlülük durumunu değerlendirmek için HAQ skoru kullanıldı.

3.2.1. Görsel ağrı skoru (GAS)

Hastaların ağrı düzeyleri GAS ile değerlendirildi. 10 cm' lik standart GAS' ta "0" hiç ağrı olmamasına, "10" ise en şiddetli ağrıya karşılık gelmektedir. Hastaların bu skala üzerinde ağrı düzeylerini işaretlemeleri istendi. Ayrıca GAS kullanılarak "hastanın kendini genel olarak değerlendirimi", "genel sağlık değerlendirimi" ve "hastalık/yorgunluk değerlendirimi" yapıldı.

3.2.2. HAQ (Sağlık değerlendirme anketi)

Hastaların fonksiyonel durumları HAQ ile sorgulandı. HAQ, RA' da fonksiyonel engelin değerlendirilmesinde önemli bir ölçüm metodudur. HAQ kişinin kendi kendine uygulayabileceği, klinik gözlemlerle uyumlu, güvenilir ve geçerli bir sorgulamadır¹⁸⁶. HAQ indeksinde günlük yaşam aktiviteleri ile ilgili sekiz alan ve her alan 2-3 soru içermek üzere toplam 20 soru vardır. Bu alanlar; giyinme ve kendine bakım, kalkma, yemek yeme, yürüme, hijyen, erişme, kavrama ve normal günlük aktivitelerdir. Ankette son 1 hafta içindeki günlük yaşam aktivitelerini yaparken zorlanma dereceleri sorgulanır. Zorlanma derecesine göre her kategoriye 0-3 arasında

puan verilir. Zorlanmadan yapabiliyorsa 0, biraz zorlanıyorsa 1, daha fazla zorlanarak veya yardım alarak yapabiliyorsa 2, hiç yapamıyorsa 3 puan verilir. Her alt grubun toplam puanı 8' e bölünerek HAQ skoru elde edilir. HAQ skoru 0-3 arasında bir değer olarak hesaplanır^{186,187}.(Bkz. Ek 1).

3.3. Laboratuvar Değerlendirme

Laboratuvar değerlendirme de hastaların ve kontrollerin yaklaşık 8-12 saatlik açlık sonrası venöz kan örnekleri 2 cc mor kapaklı EDTA' lı tüplere alındı. TSH, Hemogram, ESH, CRP, CK, RF, LDH, üre, ürik asit, kreatinin gibi rutin bakılan testler bakıldı. Olguların MVK ve NLRP12 genlerinin ekspresyon düzeyleri için alınan tam kan örneklerinden aynı gün RNA izolasyon işlemi yapıldı. İzole edilen RNA örneklerinden kit kullanılarak cDNA' lar elde edildi. Kullandığımız primerler MVK ve NLRP12 mRNA' larına spesifiktir ve çoğaltılan bölgeyi görünür hale getirmek için TaqMan probu kullanılmıştır.

3.3.1. Materyal

RNA izolasyonu için gerekli kan örnekleri Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Fizik Tedavi Ve Rehabilitasyon (FTR) Anabilim Dalı polikliniğinden sağlandı. Kandan RNA izolasyonu için PureLink[®] RNA Mini Kit, cDNA sentezi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Real-Time PCR da kullanılmak üzere TaqMan[®] Gene Expression Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., USA firmasından temin edildi. RT-PCR reaksiyonları Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup değişik kaynaklardan sağlanmıştır.

3.3.2. Method

PCR: PCR (Polymerase chain reaction) ya da polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, basitçe in vitro olarak hedef nükleik asit dizisinin uygun koşullarda, özel cihazlarla (thermocycler) çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Bu yöntem; 1980'lerde Kaliforniya da Dr. Kary Banks Mullis tarafından keşfedilmiştir [188]. Bu yöntemde çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA/RNA, replikasyon için gereken maddelerle birlikte bir tüpe konularak, üç değişik ısıda bir döngü (siklus) içerisinde tutulur. Bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Ortama konmuş ve uygun sentez sıcaklığı 72-74 °C olan *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı (ya da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda hedef DNA' ya yapışmış primerlerin 3'

ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini yapar. Tekrarlanışların sonunda milyonlarca kopyalık çok yüksek yoğunluğa ulaşan hedef DNA molekülünün PCR sonrası agaroz jel elektroforezi gibi yöntemle gösterilebilir.

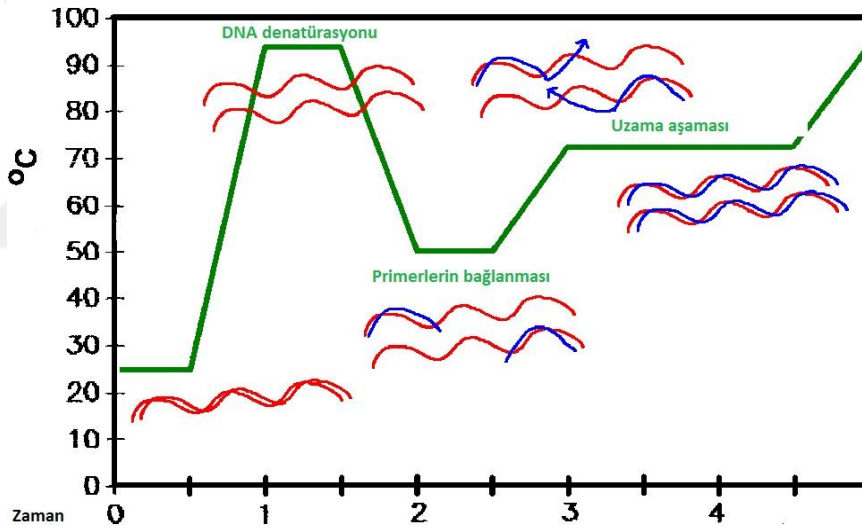
PCR döngüsü;

DNA'nın iki zincirinin yüksek ısıyla (94-95 °C) birbirinden ayrılması (denatürasyon)

Primerlerin hedef DNA'ya bağlanması (50-70 °C) (annealing)

Sentez ya da zincirin uzaması aşaması (72-74 °C) (polimerizasyon) şeklindedir (Şekil 3.1.).

Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her özgül DNA parçası çoğaltılarak iki katına çıkarılmış olur. Yeni sentezlenen DNA da bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve bu DNA parçaları geometrik olarak artar. Teoride özgül DNA parçası; siklus sayısı (n) ve başlangıçtaki hedef sayısına (t) bağlı olarak yaklaşık $tx2^n$ olur.



Şekil 3.1. PCR sıcaklık döngüsü (https://www.mun.ca/biology/scarr/PCR_simplified.html)

Bu üç basamaklı döngünün en verimli şekilde gerçekleşmesi için öncesinde ön denemeler ile optimizasyonu ve standardizasyonu yapılmalıdır. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

PCR için:

1. DNA/RNA örneği,
2. Bir çift sentetik primer,
3. dNTP'ler (A,T,C,G),
4. DNA-Polimeraz enzimi,
5. Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg²⁺) sağlayan tampon karışımı gereklidir.

mRNA kantitasyonun önemi: Hayatta kalma, büyüme ve farklılaşma ile ilgili olan hücrel kararlar, gen ekspresyonu ve transkripsiyon seviyelerindeki (değişik durumları) değişimleri yansıtır ki; gen ekspresyonu ve transkripsiyon seviyesinin belirlenmesi gen fonksiyonu ile ilgili olan çalışmalarda her zaman temel oluştururlar ¹⁸⁹. Son zamanlarda moleküler tıptaki gereksinimler, klinik tanılarda RNA seviyelerinin kantitatif olarak ölçülebildiği tekniklerin kullanımlarını arttırmıştır. Bu tür uygulamaların tümör hücrelerinde ilaç markırlarının ekspresyonu ve regülasyonun belirlenmesi ¹⁹⁰, kemoterapiye olan cevabın izlenmesi ¹⁹¹, teropötikleri şifreleyen genlerin transkripsiyonunun ve biyodağılımının ölçülmesi ¹⁹², tümör aşamasının moleküler olarak değerlendirilmesi ¹⁹³, kanser hastalarında tümör hücrelerinin sirkülasyonunun belirlenmesi ¹⁹⁴, bakteriyel ve viral patojenlerin saptanması gibi oldukça geniş kullanım alanları vardır. Transkripsiyonun kantitikasyonu için 4 temel metod vardır.

1-Northern Blotting

2-İn Situ Hibridizasyon

3-RNAase Protection Assay

4-RT-PCR

5-cDNA array

Northern analizi; sadece mRNA'nın büyüklüğü (boyutu), alternatif splicing ve RNA örneklerinin bütünlüğü hakkında bilgi verebilen yöntemdir. RNAase protection Assay; transkriptin başlama ve sonlanma bölgelerinin ekzon-intron sınırlarının haritalanması, benzer büyüklüğe sahip olan ve bu nedenle northern blot yönteminde aynı bölgelere göç edecek olan mRNA örneklerinin ayrımının yapılması için kullanılan en faydalı yöntemdir. İn Situ Hibridizasyon; bütün yöntemlerin içinde en kompleks olanıdır fakat doku içindeki spesifik hücrelerde transkriptin lokalizasyonunun belirlenmesine olanak sağlayan tek yöntemdir. cDNA array yöntemi pahalı olması nedeniyle kullanımları hala

sınırlıdır. Bu dört yöntemin temel kısıtlaması ise bunların nispeten düşük duyarlılığa sahip olmamalarıdır.

Real-Time PCR (RT-PCR): Belirli bir RNA dizisinin in vitro koşullarda, enzimatik olarak amplifikasyonuna dayanan ve aynı deneyde çok küçük örnek miktarlarıyla bir hücredeki farklı örneklerin analizini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metoddur ¹⁹⁵. Gen anlatımının analizini değiştiren bu metod ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi anılmaktadır ¹⁹³. Bu yöntem düşük duyarlı, oldukça esnek ve en kullanışlı kantifikasyon yöntemidir ve farklı örnek popülasyonlarında mRNA seviyelerinin karşılaştırılması, mRNA ekspresyon örneklerinin karakterize edilmesi, birbirleri ile benzer olan mRNA’ların ayrımlarının yapılması ve RNA yapısının analizinde kullanılabilir.

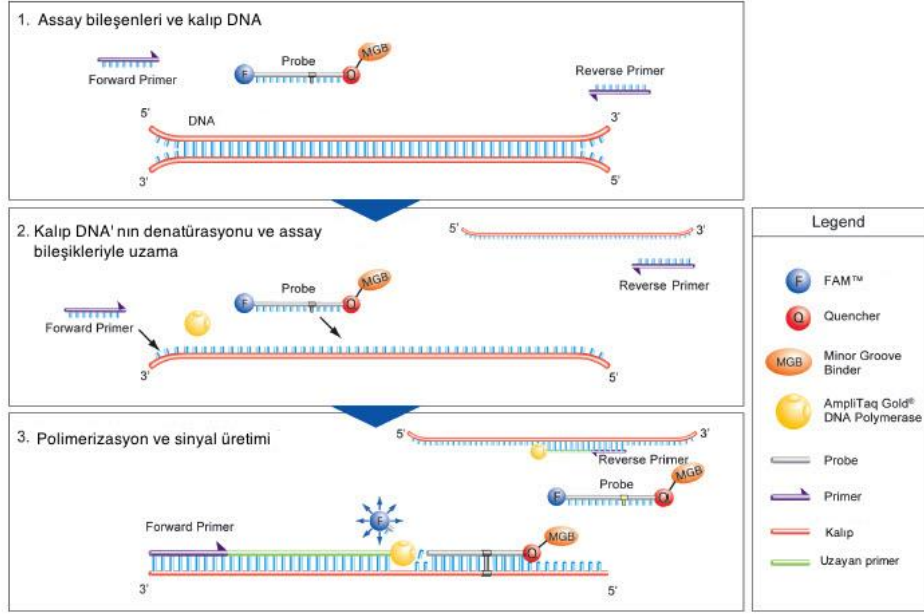
RT-PCR ayrıca, zaman alan, teknik olarak iş gücü gerektiren yöntemlerde maksimum duyarlılık üzerine odaklandırılması daha kompleks prosedürlerin geliştirilmesinde olanak sağlamıştır. Semi nested, nested ve 3 aşamalı nested RT_PCR teknikleri duyarlılığı arttırmışlardır fakat reaksiyonun spesifitesini tehlikeye sokmaktadır. Bu yöntemler, kontaminasyon ve yanlış pozitif sonuçların elde edilmesi olasılığını artırdıkları gibi gerçek, uygun olmayan, düşük seviyedeki transkripsiyonun ayırt edilmesine imkân vermemektedirler ¹⁹⁶.

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA’ nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA’ nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme (Quantitative Gen ekspresyonu çalışmaları (qPCR)) en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur ¹⁹⁷. Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar. Ticari olarak satılanlar; “Stratagene M

x 3000p, M x 3005p ve M x 4000”, “Applied Biosystems 7300,7500 ve 7500 Fast”, “Chromo4”, “Smart Cyclers”, “Rotor- Gene”, “LightCycler” en fazla kullanılanlardır ¹⁹⁷.

RNA, PCR için bir kalıp görevi görmez bu nedenle RT-PCR denemelerinde birinci aşama RNA kalıbının reverse transkripsiyon ile cDNA'ya dönüştürülmesidir. Daha sonra bu cDNA, PCR ile amplifiye edilir. Bu yöntemde genellikle RNA ve DNA bağımlı DNA polimerazlar kullanılır, reaksiyonlar ayrı ayrı (2 enzim/2 tüp) veya tek (2 enzim/1 tüp) olacak şekilde hazırlanabilir. RT ve PCR aşamalarının ayrı olarak yapılması elde edilen kararlı cDNA' nın uzun süre saklanabilmesi bakımından avantaj sağlar. Alternatif olarak, hem RNA hem de DNA bağımlı DNA polimeraz gibi fonksiyon gösterebilen tek bir polimeraz kullanılarak “1 enzim/1 tüp” şeklinde reaksiyon gerçekleştirilebilir ve böylece zaman problemi ve kontaminasyon riski minimize edilebilir ¹⁹⁶.

Tagman prob: TagMan prob yöntemi “Double-Dye Oligonucleotide”, “dual labeled prob” veya “5' nuclease prob” olarak da adlandırılmaktadır. TagMan prob yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA' ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6- karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) yer alır. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında “TaqMan” proplar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya baslar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5' →3' nükleaz aktivitesi ile FAM' ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder ¹⁹⁸ (Şekil 3.2.). TagMan prob yönteminde mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabilirdiğinden araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolü ve kolay bir tasarımı ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır ¹⁹⁹.



Şekil 3.2. Taqman Probu ¹⁹³

Real-Time PCR için gerekli donanım: RT-PCR'ın gerçekleştirilmesi ve sonrasındaki analizler için şu araçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar, veri eldesi ve analizi için yazılım (software), floresans eksitasyon ve emisyon koleksiyonu için optik bir bilgisayar ve termal döngüyü sağlayan bir donanım (Thermal cycler) olarak özetlenebilir. Çeşitli firmalardan temin edilen bu makineler birbirinden farklıdır. Örneğin; bazı firmaların cihazları 96 platelik standart formatında iken, bazılarında daha az örnek içeren platerler bulunur ya da cam kapiller tüplere gereksinim duymaktadırlar. Ayrıca bazıları lazer kullanırken bazılarında ayarlanabilen filtrelili geniş spektrum ışık kaynağı kullanılmaktadır ²⁰⁰.

Şimdilerde real time quantitative polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) gen ekspresyonundaki değişimi değerlendirebilmek için standart bir metod olarak kullanılmaktadır ¹⁹⁵. Bununla birlikte real time qPCR'ın duyarlılığı sebebiyle deney sırasında oluşabilecek küçük hatalardan kolayca etkilenmektedir ¹⁹³. Farklı RNA izolasyon verimlilikleri, farklı reverse transcriptase (RT) ve PCR enzim verimlilikleri ve başlangıç materyalinin miktarı ve kalitesi dolayısıyla deneysel farklılıklar oluşabilir ¹⁹⁶. Bu deneysel farklılıklarda potansiyel olarak doğru olan biyolojik çeşitliliğin tam anlamıyla doğru hesaplanıp hesaplanmadığını maskeler ve bu değişiklikleri ortadan kaldırmak için bir takım stratejiler düşünülmüştür bunların içerisinde toplam RNA'ya

karşılık genomik DNA ile normalizasyon ya da belirli bir RNA molekülü ile birleştirilmesidir ¹⁹⁶. İkinci yöntem özellikle dikkate değer bir yöntem olmasına rağmen genellikle kantitatif RT-CR normalizasyonu için kabul edilmiş olan metod endojen kontrol genlerinin kullanılmasını içerir ¹⁹⁵. Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ekspresyonu değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. Referans genler ya da housekeeping genler olarak da bilinen bu kontrol genleri bütün doku ve hücre tiplerinde sabit bir şekilde eksprese olan ve deneysel prosesler ile de ekspresyonu değişmeyen genler olmalıdır. İlgilenilen genin ekspresyon düzeyi, referans gen olarak kullanılan housekeeping genin ekspresyon düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir. Referans genler hedef genler ile aynı deneye tabi olduklarında deneysel farklılıklardan kaynaklanan hataları sınırlandırabilirler ¹⁹⁷. Hatalı sonuçlar doğurabilir olmasına rağmen iyi bir referans genin seçimi çok önemlidir. Buna rağmen birçok çalışmada hala uygunluğunun belirlenmesi olmadan gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ve actin, beta (ACTB) gibi geleneksel genleri kullanılmaktadır ²⁰¹. Çalışmalarda kullanılacak housekeeping genin ekspresyon düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır. Deney için kullandığımız endojen kontrolümüz housekeeping genlerden Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH)' dir. GAPDH, glikolizin ara basamaklarında gliseraldehit-3-fosfattan iki molekül 1,3-bisfosfogliserat oluşumunu katalizleyen NAD bağımlı bir dehidrojenazdır ²⁰¹.

3.3.2.1. Kandan mRNA izolasyonu

Toplam RNA PureLink RNA Mini Kit (Life Technology, California, USA) ile izole edilmiştir. PureLink® RNA Mini Kit izolasyon kitinde önerilen işlem adımları aşağıdaki sıraya göre uygulandı.

1. Buz üzerine konulan 1,5 ml' lik santrifüj tübüne alınan 0,2 ml tam kan örneği üzerine 0,2 ml 2-Mercaptoethanol ile hazırlanan Lysis Buffer Tamponu eklendi. (1ml'sine 10µl 2-Mercaptoethanol eklenerek hazırlanan)

2. Kan hücrelerini parçalayıp lizize uğratmak için vortexlendi ve sonrasında +4°C sıcaklığa ayarlanmış olan soğutmalı santrifüj ile 12000x g de 2 dakika (dk) santrifüjlendi ve eritrosit lizizi sağlandı.
3. Supernatant kısım temiz 1,5 ml' lik RNase/DNase içermeyen santrifüj tüplerine alındı.
4. Supernatantın üzerine 0,2 ml %100 etanol eklenip pipetaj, alt-üst ve vortex yapılarak çökeltileri görünmez hale gelene kadar karışması sağlandı.
5. Oluşan çözelti, içerisinde herhangi bir çökelti kalmadığında altında toplama tüpü bulunan Spin Cartridge tüplerine aktarıldı.
6. +4°C sıcaklığa ayarlanmış olan soğutmalı santrifüj ile 12000x g de 15 saniye (sn) santrifüjlendi ve alta akmış olan sıvı kısım uzaklaştırıldı.
7. Spin Cartridge üzerine 0,7 ml Wash Buffer I eklendi.
8. +4°C sıcaklığa ayarlanmış olan soğutmalı santrifüj ile 12000x g de 15 sn santrifüjlendi ve toplama tüpüyle beraber alttaki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
9. Spin Cartridge'ların altına yeni toplama tüplerinden konulup üzerlerine 0,5 ml etanol ile kullanıma hazır hale gelmiş Wash Buffer II eklendi.
10. +4°C sıcaklığa ayarlanmış olan soğutmalı santrifüj ile 12000x g de 15 sn santrifüjlendi ve alta akmış olan sıvı kısım uzaklaştırılıp Spin cartridge aynı toplama tüpünün üzerine konuldu.
11. 9. ve 10. adımlar birer kere daha tekrar edildi.
12. +4°C sıcaklığa ayarlanmış olan soğutmalı santrifüj ile 12000x g de 1 dk santrifüjlenerek RNA bağlanmış olan membran yüzeyi kurutulmuş oldu.
13. Toplama tüpü alınarak yerine son olarak içerisinde RNAların bulunacağı yeni steril 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüpleri yerleştirerek üzerlerine 0,1 ml RNase içermeyen su Spin Cartridge' in tam merkezine gelecek şekilde konuldu.
14. Buz üzerinde 1 dk inkübe edildikten sonra altına yeni tüp yerleştirilmiş olan Spin Cartridge' leri +4°C sıcaklığa ayarlanmış olan soğutmalı santrifüj ile 12000x g de 2 dk santrifüjlendi.
15. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometre cihazı kullanılarak belirlendi ve izolasyonun hemen ardından cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA'nın geriye kalan kısmı -80°C' de saklandı.

3.3.2.2. cDNA sentezi

High Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon kiti, izole edilen RNA'dan cDNA sentezinde kullanıldı. 2 µg RNA High-Capacity cDNA Reverse Transkriptaz kiti ile, BioRad Thermal Cycle cihazıyla cDNA'ya çevrildi. High Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon kitinde belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 6). Bütün çalışmalar buz üzerinde yapıldı.

Tablo 3.1. cDNA Reaksiyonunun ilk basamağı için master mix bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix	0,8 µl
10X RT Random Primerler	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1 µl
Nuclease içermeyen H ₂ O	4,2 µl
Toplam	10 µl

Tablo 3.1' e göre hazırlanan karışımda her 10 µl' lik RNA örneği için 10 µl RT master mix gerekmektedir. Toplamda bir reaksiyon için gerekli hacim 20 µl' dir. Gerekli olan PCR aşamaları Tablo 3.2' de verilmiştir.

Reaksiyon aşamaları;

1. 0,2 ml' lik RNase-DNase içermeyen steril pcr tüplerinin her birine 10 µl RT master mix eklendi.
2. 10 µl RT master mix üzerine 10 µl RNA örneği eklenip homojen karışması için pipetaj yapıldı.
3. Baloncuk ve tüplerin iç duvarlarında damlacık şeklinde kalan karışımları önlemek için tüpler vortexte hafifçe çalkalandı ve spin santrifüj edildi.
4. PCR cihazının içerisine yerleştirildi.

Tablo 3.2. High Capacity cDNA Reverse Transcription reaksiyonu için gerekli termal siklus aşamaları.

	1.Aşama	2.Aşama	3.Aşama	4.Aşama
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞
Döngü Sayısı	1	1	1	1

3.3.2.3. Real-Time PCR ile genlerin ekspresyonlarının saptanması

Real-Time PCR, RA' lı hasta grubu ve sağlıklı kontrol olarak ifade edilen gruplar arasındaki hedef genlerin (MVK, NLRP12) mRNA miktarındaki değişimi gözlemek için gerçekleştirildi. Real-Time PCR reaksiyonu için Thermo Fisher Scientific Inc., USA firmasından temin edilen TaqMan® Gene Expression Kit kullanıldı ve reaksiyonlar Applied Biosystems 7500 Fast sequence detector (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi. cDNA' lar 100 ng ölçüye gelecek şekilde seyreltilme yapıldıktan sonra cihaza reaksiyon karışımı hazırlanıp yerleştirildi. PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon işlemi gerçekleştikçe TaqMan probdan salınarak serbest kalan TAMRA-FAM boyasının verdiği floresans Real-Time PCR cihazı tarafından kaydedilerek her örneğin başlangıç konsantrasyonuna göre vermiş olduğu Ct değerleri yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Amplifikasyon Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System cihazının bilgisayarından çevrimiçi olarak da izlendi.

Bütün primerler Applied Biosystem' in primer ve prob dizaynı için olan Primer Press 3.0 yazılımında dizayn edilmiştir. Tüm primer çiftleri intron-ekson sınırlarını kapsar. Real-time pcr da kullanılan MVK, NLRP12 ve GAPDH primer ve prob dizini Tablo 3.3' te verilmiştir. Her seferinde şablon dışında negatif kontroller eklendi. GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı. PCR bitiş adımı PCR ürünlerinin özgülüğünü doğrulayarak, ayrışma eğrisi elde etmek için yapılır. Karşılaştırmalı yöntem kat-değişimi hesaplamak için kullanıldı.

Tablo 3.3. MVK, NLRP12 ve GAPDH primer ve prob dizini

Primer\Prob	Dizi
MVK-Forward	5' TGCTCTTCTCATTGGCTTTCGCT 3'
MVK-Reverse	5' TTCTCCAGGTGGACCCCAGA 3'
NLRP12-Forward	5'CCAGAAACTGTGGCTGGATAGC 3'
NLRP12-Reverse	5' GCGTTGTTGGTCAGGTAAAGG 3'
GAPDH-Forward	5' ATTTGGCTACAGCAACAGGG 3'
GAPDH-Reverse	5' TCAAGGGGTCTACATGGCA 3'

Reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında Tablo 3.4' ten yararlanıldı. Aynı cDNA örneği için Tablo 3.4' e göre üç farklı reaksiyon karışımı hazırlandı. Birincisi ekspresyon düzeyi incelenecek olan MVK geninin; ikincisi ekspresyon düzeyi incelenecek olan NLRP12 geninin ve üçüncüsü ise reaksiyonda kontrol amaçlı olarak kullanılacak GAPDH geninin Real-time PCR'da çoğaltılmasına ilişkin reaksiyon karışımlarını belirtmektedir. I.reaksiyon karışımı için NLRP12 geni ekspresyon seti, II. reaksiyon karışımı için MVK geni ekspresyon seti, III. Reaksiyon karışımı içinse, GAPDH geni ekspresyon seti kullanıldı. Her üç karışımda hazır olduğunda her karışım ayrı ayrı 10 µl plate pipetlendi. Triplet şeklinde çalışıldı. Applied Biosystems 7500 Fast sequence detector cihazına yerleştirildi. Aşağıdaki programa göre Real-Time PCR işlemi gerçekleştirildi (Tablo 3.5).

Tablo 3.4. Real-Time PCR Reaksiyon Protokolü

Bileşenler	Miktar		
	I.Karışım	II. Karışım	III.Karışım
20× TaqMan® NLRP12 Gene Expression Assay	1 µl	-	-
20× TaqMan® MVK Gene Expression Assay	-	1 µl	-
20× TaqMan® GAPDH Gene Expression Assay	-	-	1 µl
2× TaqMan® Gene Expression Master Mix	10 µl	10 µl	10 µl
cDNA (1 to 100 ng)§	4 µl	4 µl	4 µl
DNase/RNase içermeyen water	5 µl	5 µl	5 µl
Toplam	20 µl	20 µl	20 µl

Tablo 3.5. Real-Time PCR koşulları

<i>Döngü Sayısı</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Süre</i>	<i>Aşama</i>
1X	50 °C	2 dk	Ön İnkübasyon
	95 °C	10 dk	Denatürasyon
40X	95 °C	15 sn	Denatürasyon
	60 °C	1 dk	Bağlanma
	4 °C	∞	

PCR reaksiyon mix ve örneklerin yüklenmesi

1. Her 0,2 ml' lik PCR tüpüne 20 µL reaksiyon mix'inden transfer edildi.
2. PCR tüpleri kısa süre için spin down edildi.
3. Cihazın içerisine yerleştirildi.

10 µg RNA örneği High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak cDNA'ya transkripsiyon yapıldı. Daha önce tanımlandığı gibi NLRP12 ve MVK genlerinin ekspresyon seviyeleri quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) metodu ile ölçüldü. NLRP12 ve MVK genlerinin ekspresyon seviyeleri GAPDH geninin ekspresyonu ile standart hale getirildi.

3.3.2.4. Real Time PCR analizi işlemi ve ekspresyon analizi

Sonuçlar Comperative Ct yöntemi ile hesaplandı ²⁰². Bu yöntemde önce hasta ve kontrol grubu örneklerinin ortalama Ct (threshold cycle) değerleri GAPDH, MVK ve NLRP12 için ayrı ayrı hesaplandı. Daha sonra NLRP12 ve MVK ortalama değerlerinden GAPDH ortalama değeri çıkarılarak ayrı ayrı hasta ve kontrol gruplarının ΔCt (Delta Ct) değerleri hesaplandı. Daha sonra kontrol grubu ΔCt değeri hasta grubu ΔCt değerinden çıkarılarak ΔCt değeri bulundu. Bu değer $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne uygulanarak hasta grubunun MVK ve NLRP12 ekspresyonunun kontrol grubuna göre kaç kez artmış ya da azalmış olduğunu tespit etmek için GAPDH gen ekspresyonu internal kontrol olarak kullanıldı ²⁰². Sonuçta $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeriyle RQ (rölatif ölçüm) değeri hesaplanmış oldu. mRNA düzeyleri endojen kontrollere göre normalize edilerek relatif ekspresyon düzeyleri cihazın software'den de elde edildi.

3.3.2.5. İstatistiksel analiz

Belli bir genin mRNA ekspresyon düzeylerinin belli bir hastalık üzerindeki değişiminin incelendiği epidemolojik çalışmalarda hasta ve kontrollerin mRNA ekspresyon analizlerinden elde edilen Real-Time pcr sonuçları hesaplanıp, hastalık için risk faktörü olarak değerlendirilen etkenler ile ilişkisi biyoistatistik analizler ile incelenir. Günümüzde biyoistatistik analizler için Windows tabanlı programlardan Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi (SPSS) kullanılır.

Bütün veriler bilgisayar ortamında SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA) istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Araştırmanın tüm verileri için öncelikle tanımlayıcı istatistikler uygulanmıştır. Ölçümle belirlenen değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; ortalama ve standart sapma şeklinde verilmiştir. Kullanılan verilerin öncelikle normal dağılıma uygunluk testleri (Shapiro-Wilk testi) yapılmıştır. Yapılan testler sonucu verilerin normal dağılım göstermediği ($p < 0,05$) saptanmıştır.

Veriler normal dağılım göstermediğinden dolayı istatistiksel analizde non-parametrik testler yapılmasının uygun olacağı belirlenmiştir. Bunun için ikili kıyaslamalarda Mann-Whitney U Testi, ikiden fazla kıyaslamalarda Kruskal–Wallis Testi kullanılmıştır. İki grup arasındaki ilişkinin araştırılması için korelasyon testi yapılmıştır. İki kategorik (isimsel veya dereceli) değişken arasındaki ilişkiyi incelemek için Çapraz tablo (Cross Tab) analizi yapılmıştır. Elde edilen 0.05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark tespit edilen değişkenler için lojistik regresyon analizi yapılarak risk oranları (Odds Ratio-OR) ve bu değerlerin % 95 güven aralıkları (% 95 Confidence interval-CI) hesaplandı. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi (p değeri) 0,05 olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Yaş ve cinsiyet açısından RA' lı hastalarla sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla, $p = 0,505$ ve $p = 0,728$). Ortalama hastalık süresi $8,58 \pm 8,56$ (1-33) yıl ve ortalama HAQ skoru $0,81 \pm 0,73$ (0,1-2,4) olarak bulundu. CK açısından hasta ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0,05$). CK hariç diğer laboratuvar bulguları açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark bulunamadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.1.).

Hastalardan 13'ünde (%34,2) RF pozitif bulundu. Hastaların 6' sında (%15,7) teşhis son 1 yıl içerisinde, 19' unda (%50) teşhis 2-10 yıl içerisinde ve 13 (%34,3) hasta da ise 10-30 yıl içerisinde teşhis konulmuştur. Ortalama hastalık süresi $8,58 \pm 8,56$ olarak bulunmuştur. Kan değerleri bakımından 19 hastada ESH, 13 hastada RF, 14 hastada CRP normal değerlerinden yüksek bulunurken, 17 hastada kreatinin, 11 hastada ürik asit, 28 hastada LDH normal değerlerinden daha düşük bulunmuştur. Lökosit, trombosit, AST ve ALT değerleri hem hastalar hem de kontroller için normal aralıklarında bulunmuştur.

Tablo 4.1. Romatoid artritli hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri

		RA Grubu (N=38)	Kontrol Grubu (N=12)	P
Cinsiyet	Kadın	25 (% 65,78)	9 (% 75)	0,728
	Erkek	13 (% 34,22)	3 (% 25)	
Yaş (Yıl)		$53,97 \pm 16,70$ (7-89)	$50,33 \pm 15,18$ (26-66)	0,505
Hastalık Süresi (Yıl)		$8,58 \pm 8,56$ (1-33)	-	-
Sabah Tutukluğu (dk)		$55,65 \pm 76,04$ (10-360)	-	-
GAS skoru (1-100mm)		$45,60 \pm 30,31$ (10-100)	-	-
Şiş Eklem Sayısı (0-28)		$4,78 \pm 6,63$ (0-28)	-	-
HAQ skoru (0-3)		$0,81 \pm 0,73$ (0,1-2,4)	-	-

Tablo 4.1. devamı			
TSH (uIU/mL) (0,27-4,2)	1,88 ±1,48 (0,1- 6,1)	1,47 ±1,22 (0,6-4,0)	0,136
Sedimentasyon (mm/saat) (0-20)	23 ±16,18 (5-58)	12,14 ±5,78 (5-23)	0,070
Lökosit Sayısı (WBC) (10 ³ /uL) (3-15)	6,61 ±1,68 (3,7-10,8)	50,33 ±2,05 (3,9-9,5)	0,192
Trombosit (PLT) (10 ³ /uL) (50-400)	240,18 ±98,43 (159-729)	248,10 ±46,62 (160-308)	0,472
CK (mg/dL) (0-190)	105,86 ±167,88 (38-1018)	140,71 ±64,37 (66-247)	0,050
CRP (mg/dL) (0-0,5)	0,72 ±1,19 (0,1-3,4)	0,32 ±0,33 (0,1-1,03)	0,135
AST (U/mL) (0-40)	19,83 ±7,17 (6,8-39,9)	24,32 ±6,46 (16,2-35,2)	0,129
ALT (U/mL)(0-41)	15,49 ±7,61 (3,2-35)	17,98 ±6,68 (11,2-29,5)	0,371
ALP (U/L) (40-130)	77,36 ±43,80 (34-287)	74,29 ±31 (17,3-128)	0,631
ÜRE (mg/dL) (13-43)	11,93 ±13,42 (15-64)	32,20 ±13,75 (16,8-61,9)	0,788
KREATİNİN (mg/dL) (0,7-1,2)	0,71 ±0,21 (0,3-1,4)	0,78 ±0,20 (0,49-1,17)	0,681
RF (IU/mL) (0-30)	40,97 ±62,42 (2,3-214)	7,81 ±2,15 (5,2-11)	0,198
LDH (U/L) (240-480)	186,44 ±43,89 (154-382)	-	-
ÜRİK ASİT (mg/dL) (3,4-7)	4,32 ±1,64 (2,5-8,8)	4,73 ±1,42 (2,3-6,7)	0,853
NLRP12 RQ	8,151±8,923 (0,80-32,58)	1,34 ±0,64 (0,36-2,47)	0,000
MVK RQ	±3,39 (0,33-50,32)	1,85 ±0,91 (0,59-2,95)	0,001

*P <0.05 (istatistiksel olarak anlamlı sonuç) Tablodaki değerler sayı (%), ortalama±standart sapma (minimum-maksimum) olarak ifade edilmiştir. RA = Romatoid artrit, GAS= Görsel analog skala, , CRP = C-reaktif protein, RF = Romatoid faktör, HAQ = Sağlık değerlendirme anketi, RQ: relatif ölçüm

NLRP12 ve MVK genlerinin ekspresyon düzeyleri ise kantitatif Real Time PCR yönteminde RQ (rölatif ölçüm) değerleri göz önünde bulundurularak hesaplandı. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında RA' lı hastalarda NLRP12 ve MVK ekspresyon düzeyleri için anlamlı derecede bir fark bulundu (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,001$) ancak hastalık remisyon değerleri ve rutin laboratuvar değerleri açısından korelasyon yoktu (Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.). Hastalarda MVK ekspresyon seviyesi 4,39 kat ve NLRP12 ekspresyon seviyesi 5,72 kat kontrollerden fazla bulunmuştur.

Tablo 4.2. MVK ekspresyon düzeyi için hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması

Gruplar	N	Ortalama	Standart Sapma	Z	P
Kontrol	12	-0,717	0,402	-3,476	0,001
Hasta	38	3,308	3,39		

N:Bireyler, P <0.05 (istatistiksel olarak anlamlı sonuç), Non-Parametrik Mann Whitney-U Testi Sonuçları

Tablo 4.3. NLRP12 ekspresyon düzeyi için hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması

Gruplar	N	Ortalama	Standart Sapma	Z	P
Kontrol	12	1,424	0,707	-4,043	0,000
Hasta	38	8,151	8,923		

N:Bireyler, P <0.05 (istatistiksel olarak anlamlı sonuç), Non-Parametrik Mann Whitney-U Testi Sonuçları

Hastalarda diğer hastalık parametreleri ile hem NLRP12 hemde MVK ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu. NLRP12 ve MVK gen ekspresyon düzeyleri arasında hasta grubu için güçlü bir anlamlı ilişki varken ($p=0,000$), kontrol grubunda anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,491$). Ayrıca MVK ve NLRP12 ekspresyon seviyeleri ile hastaların hastalık süreleri, HAQ skoru arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0,903$, $p=0,271$). Kontrol grubunda NLRP12 ekspresyonu ile sedimentasyon değeri arasında bir ilişki bulunmuştur ancak bu değer bizim için anlamsızdır ($p=0,023$) (Tablo 4.4.).

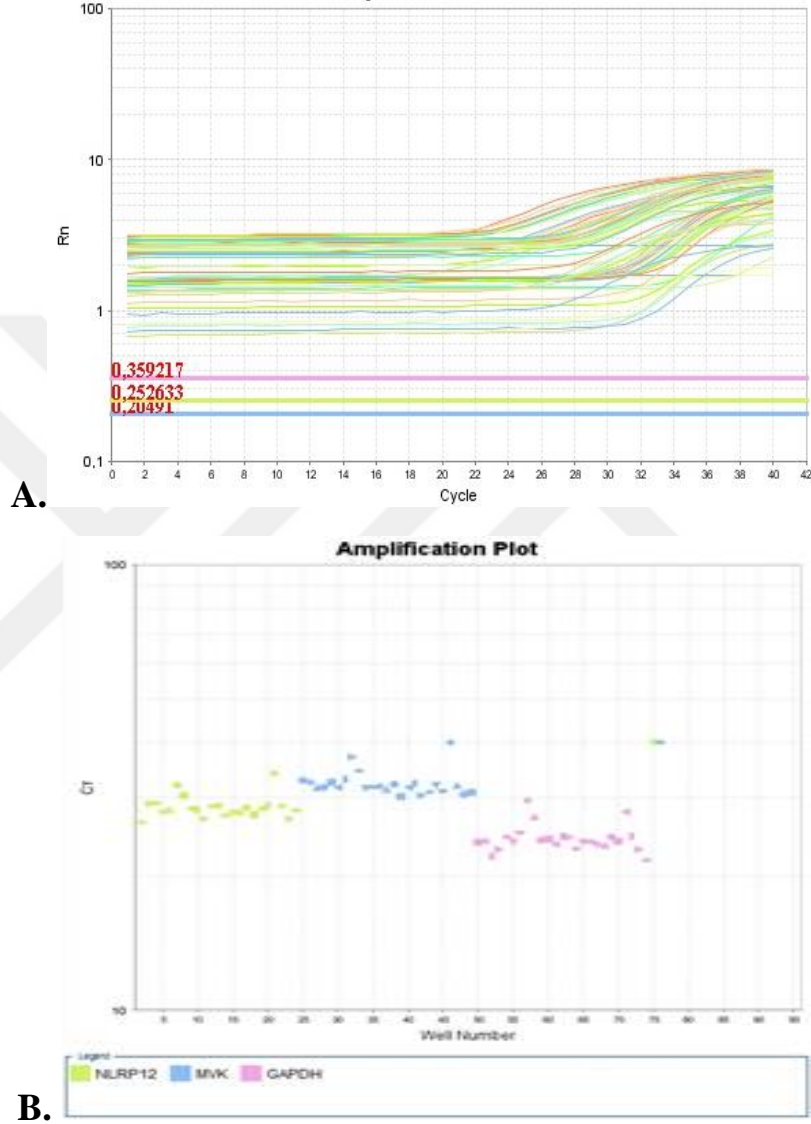
Tablo 4.4. Hasta ve kontrol gruplarında NLRP12 ve MVK ekspresyonlarının diğer değerlerle ilişkisi

Değişken	Hasta (N=38)				Kontrol (N=12)			
	NLRP12		MVK		NLRP12		MVK	
	p	R	p	R	p	R	p	R
Yaş (Yıl)	0,953	-0,010	0,960	-0,008	0,556	-0,189	0,644	-0,149
Hastalık Süresi (Yıl)	0,604	0,088	0,508	0,112	-	-	-	-
Sabah Tutukluğu (dk)	0,947	0,011	0,956	-0,009	-	-	-	-
Görsel Ağrı Şiddeti (GAS skoru)(1-100)	0,138	0,249	0,680	0,070	-	-	-	-
Şiş Eklem Sayısı	0,364	0,151	0,412	0,137	-	-	-	-
HAQ skoru	0,271	0,183	0,903	0,021	-	-	-	-
İlaç kullanım süresi (ay)	0,832	0,038	0,688	0,073	-	-	-	-
TSH (uIU/mL) (0,27-4,2)	0,925	-0,017	0,878	-0,027	0,760	0,143	0,175	0,577
SEDİMENTASYON (mm/saat)(0-20)	0,560	0,100	0,450	-0,130	0,023	0,821	0,129	0,631
LÖKOSİT SAYISI (10 ³ /uL) (3-15)	0,147	0,247	0,809	-0,042	0,687	0,146	0,576	-0,202
TROMBOSİT(PLT) (10 ³ /uL) (50-400)	0,250	0,197	0,645	0,080	0,187	0,455	0,894	0,049
CK (mg/dL) (0-190)	0,757	0,055	0,429	0,140	0,535	0,286	0,878	-0,072
CRP (mg/dL) (0-0,5)	0,127	0,259	0,928	0,016	0,497	-0,262	0,711	0,144
AST (U/mL) (0-40)	0,941	0,013	0,604	0,090	0,308	0,383	0,232	0,444
ALT (U/mL)(0-41)	0,886	0,025	0,503	0,115	0,309	0,382	0,010	0,795
ALP (U/L) (40-130)	0,960	0,009	0,292	-0,186	0,531	0,262	0,548	-0,252
ÜRE (mg/dL) (13-43)	0,742	0,093	0,648	0,129	0,433	-0,300	0,814	-0,092
KREATİNİN (mg/dL) (0,7-1,2)	0,486	-0,120	0,943	-0,012	0,213	-0,460	0,339	0,361
RF (IU/mL) (0-30)	0,672	-0,075	0,769	-0,050	0,125	0,696	0,381	0,441
LDH (U/L) (240-480)	0,600	0,093	0,873	0,029	-	-	-	-
ÜRİK ASİT (mg/dL) (3,4-7)	0,177	-0,234	0,248	-0,201	0,499	-0,348	0,125	0,696
NLRP12 RQ	-	-	0,000	0,763	-	-	0,491	0,221
MVK RQ	0,000	0,763	-	-	0,491	0,221	-	-

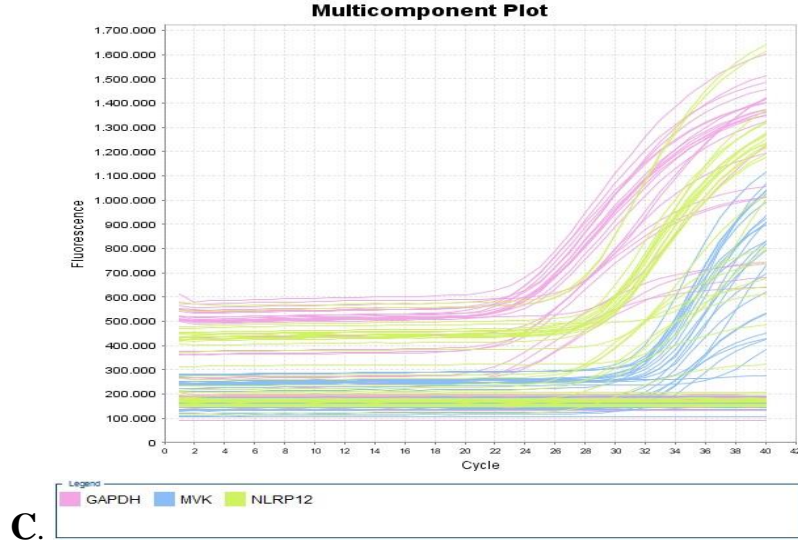
*Spearman Korelasyon Testi, P <0.05 (istatistiksel olarak anlamlı sonuç), R: Spearman Korelasyon Katsayısı

Real-time PCR reaksiyonlarının doğruluk değeri (R²) yaklaşık olarak %99 civarındadır. MVK, NLRP12 ve GAPDH için oluşturulan multicomponent plot, application plot ve ΔRn ile siklus sayısını gösteren grafikler şekil 4.1.' de gösterilmiştir. mRNA düzeyleri

endojen kontrollere göre normalize edilerek relatif ekspresyon düzeyleri elde edildi. Eşik değerleri (Theshold value); NLRP12 için 0,125564, MVK için 0,016371 ve GAPDH için 0,481718 olarak bulundu. Elde edilen verilerde en düşük CT değerinin GAPDH' in ve en yüksek ise MVK' nın olduğu gözlemlendi.



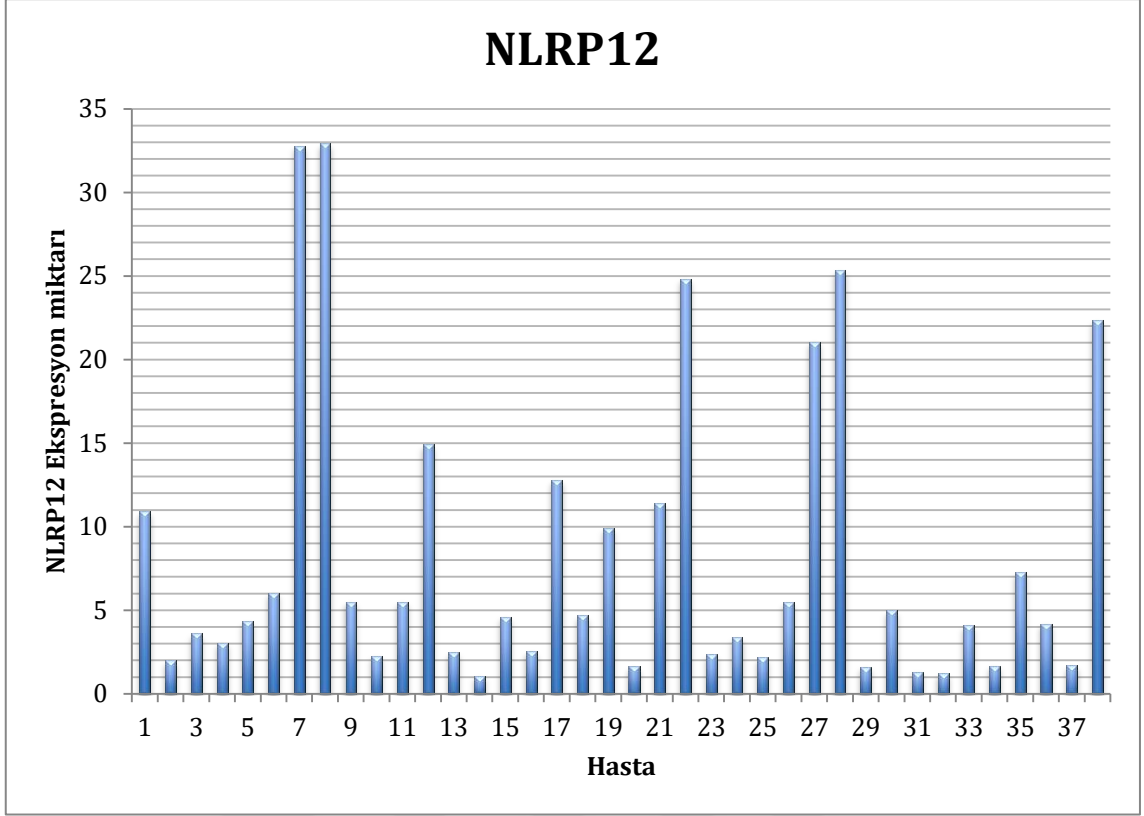
Şekil 4.1. Real Time PCR cihazından alınan sonuçlar



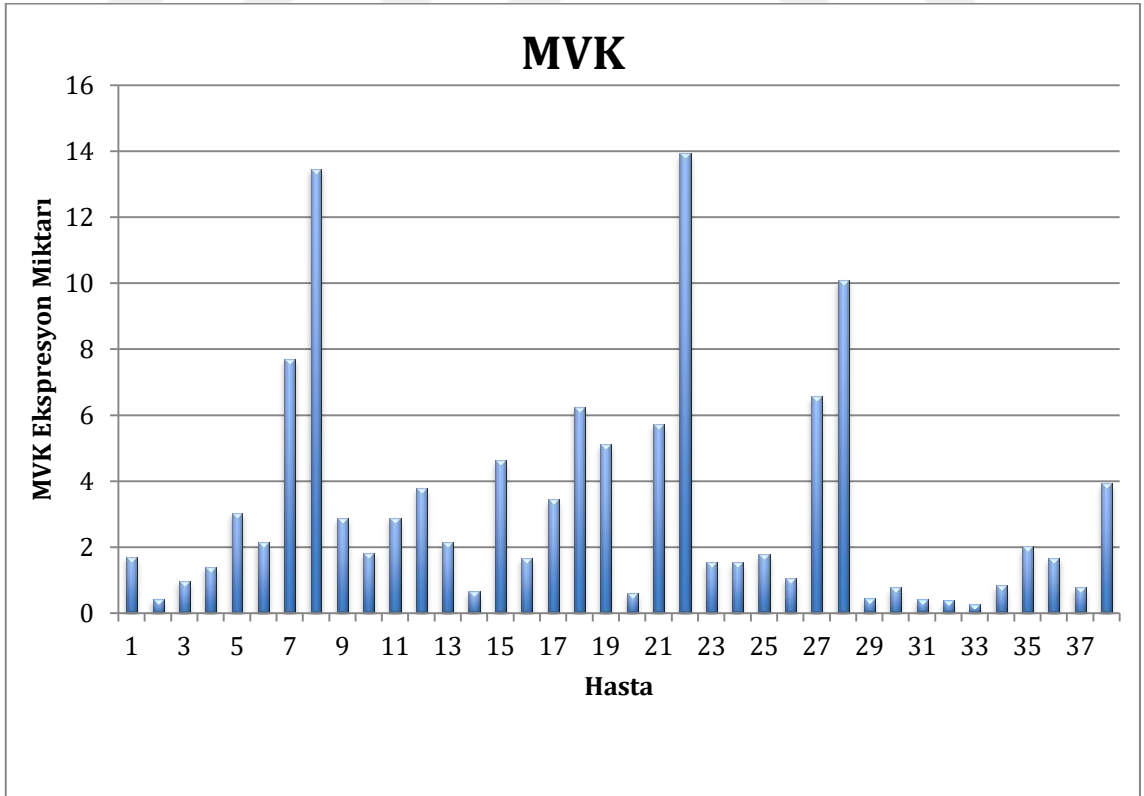
Şekil 4.1. Real Time PCR cihazından alınan sonuçlar (devamı)

Mavi renkli MVK, yeşil renk NLRP12 ve pembe renk GAPDH olarak gösterilmiştir.(A) Floresans boyanın hangi sıklusta ayrılıp ışımaya yaptığını log Rn değerinden gösteriyor. Ayrıca kırmızı renkli yazılmış olan rakamlar hangi renk çizginin üzerindeyse onun eşik değerini gösteriyor. Biz FAM boyasını kullandık. (B) Her kuyudaki örneğin Ct değerini gösteriyor. (C) Bütün örneklerin üç gen için hangi sıklusta floresans yaydığını ve yayılan floresans miktarını gösteriyor.

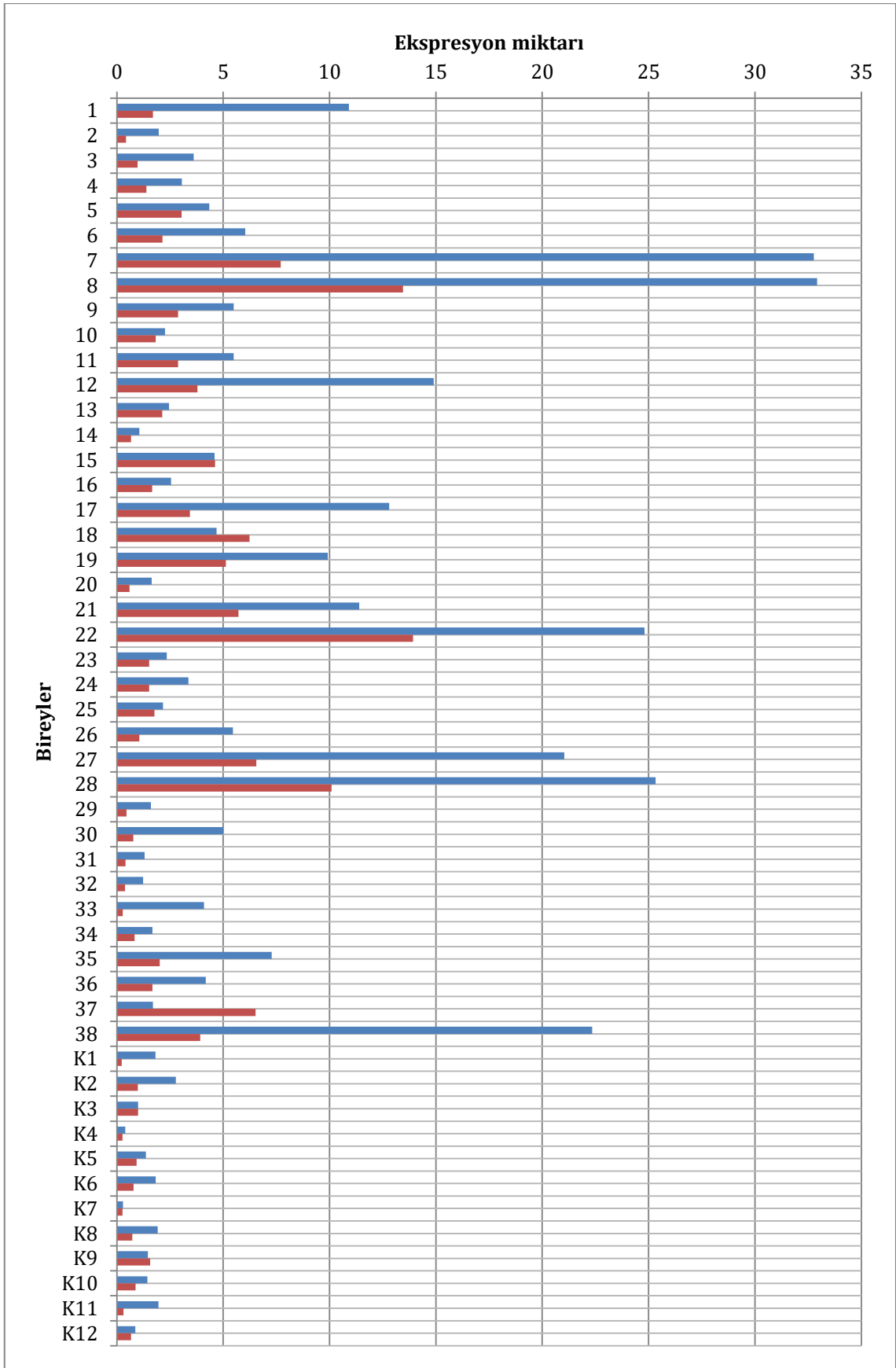
Bireyler bazında bakıldığında MVK için en yüksek gen ekspresyon seviyesi 22. hastada 13,92 şeklinde, en düşük olarak 0,23 şeklinde 1.kontrolde gözlemlenmiştir. En yüksek NLRP12 mRNA düzeyi 8. Hastada 32,92 şeklinde, en düşük ise 0,29 ile 7. Kontrolde gözlemlendi. Diğer bir ifadeyle hasta bireylerde iki genin ekspresyon seviyeleri kontrole göre çok daha fazla olduğu bulundu. Belirtilen gruplar arasındaki NLRP12 mRNA'nın relatif ekspresyon düzeyini gösteren grafik şekil 4.2' de, MVK mRNA'nın relatif ekspresyon düzeyini gösteren grafik şekil 4.3' te verilmiştir. Tüm bireyler bu iki genin karşılaştırılabilmesi için relatif ekspresyon düzeyini gösteren grafik şekil 4.4' te verilmiştir.



Şekil 4.2. NLRP12 geninin her hasta için ekspresyonlarının gösterilmesi

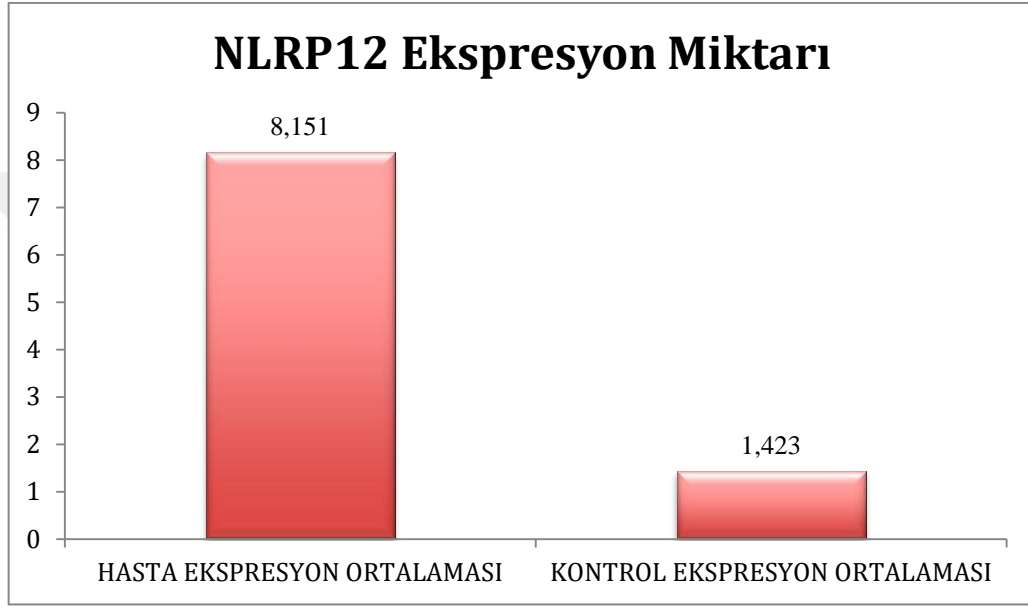


Şekil 4.3. MVK geninin her hasta için ekspresyonlarının gösterilmesi

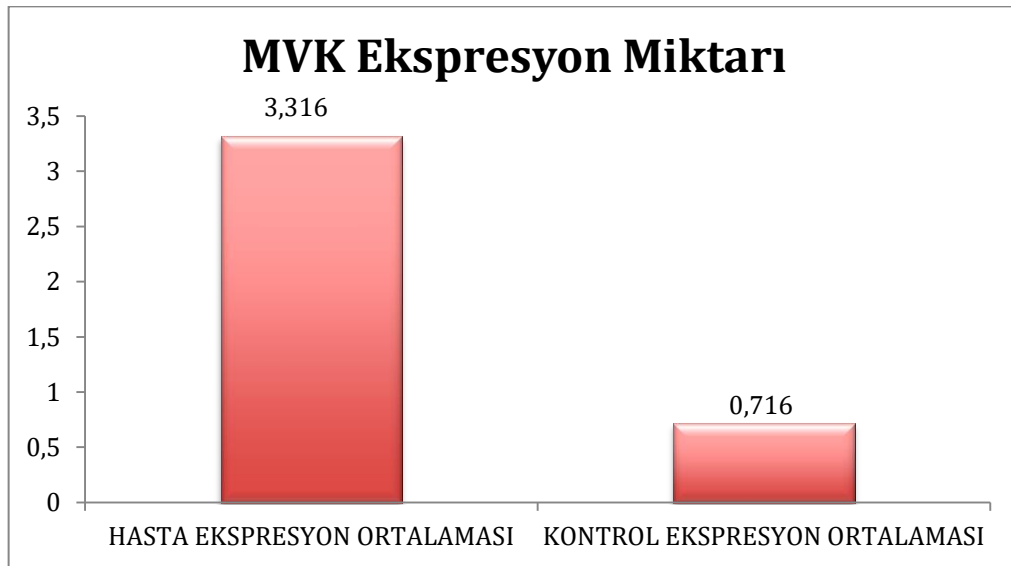


Şekil 4.4. Tüm bireyler için iki genin ekspresyonunu gösteren grafik.

NLRP12 geni için ekspresyon miktarı hasta grubunda $8,151 \pm 8,92$ olarak, kontrol grubunda $1,423 \pm 0,706$ olarak bulunurken; MVK geni için ekspresyon miktarları hasta grubunda $3,316 \pm 3,40$; kontrol grubunda $0,716 \pm 0,40$ olarak bulunmuştur. MVK' nın relatif ekspresyonu sağlıklı kontrollerle RA'lı hastalar arasında birbirleriyle kıyaslandı ve hastalarında sağlıklı kişilere kıyasla 4,39 kat, NLRP12' nin mRNA ekspresyon düzeyinin ise RA'lı hastalarda sağlıklı kontroller göre 5,72 kat artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. Hasta ve kontrol grubunda NLRP12 ekspresyonunun karşılaştırılması

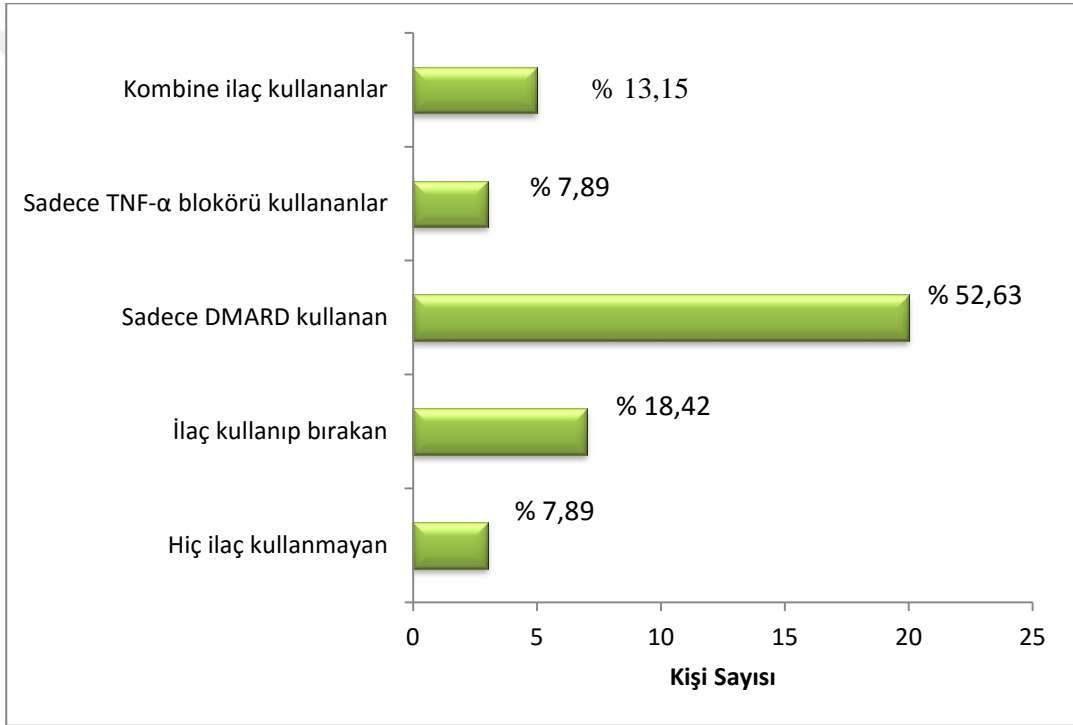


Şekil 4.6. Hasta ve kontrol grubunda MVK ekspresyonunun karşılaştırılması

Hastalarda biyolojik parametrelerden bazı verilerde anlamlı sonuç çıkmıştır bunlar;

- Yaş; üre ($r=0,585$, $p=0,022$), kreatinin ($p=0,000$, $r=0,606$) ve ürik asit ($r=0,619$, $p=0,000$) ile pozitif yönde koreledir.
- Hastalık süresi (yıl) ile ilaç kullanım süresi (ay) ($r=0,799$, $p=0,000$) ve üre ($r=0,696$, $p=0,004$) arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki vardır. Hastalık süresi (yıl) arttıkça, ALT' nin azaldığı ($r=-0,338$, $p=0,047$), LDH' in arttığı ($r=0,384$, $p=0,025$) bulunmuştur.
- GAS skoru artarken, sabah tutukluğu (dk) ($r=0,606$, $p=0,000$) ve HAQ skorunun ($r=0,344$, $p=0,037$) da arttığı, ALT ($r=-0,0338$, $p=0,047$) 'nin ise azaldığı bulundu.
- Ayrıca sabah tutkunluğu (dk) artarken; şiş eklem sayısı ($r=0,461$, $p=0,004$) ve HAQ skorunun ($r=0,391$, $p=0,015$) da arttığı gözlenmiştir.
- Şiş eklem sayısının HAQ skoru ($r=0,404$, $P=0,012$) ile pozitif, TSH ($r=-0,342$, $p=0,048$) ile de negatif yönde korelasyon gösterdiği bulundu.
- HAQ skoru ile kreatin ($r=-0,386$ $p=0,020$) arasında negatif yönde bir ilişki vardır.
- TSH ile lökosit sayısı ($r=0,463$, $p=0,006$) ve üre ($r =-0,725$, $p=0,005$) arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.
- Sedimentasyon ile CRP ($r=0,476$, $p=0,003$) pozitif yönde korelasyon göstermektedir.
- Lökosit sayısı artarken RF ($r=0,374$, $p=0,030$) değerinin de arttığı görülmüştür.
- Trombosit azalırken kreatinin ($r=-0,381$, $p=0,022$) artar.
- CK ile AST ($r=0,781$, $p=0,000$), ALT ($r=0,540$, $p=0,001$), kreatinin ($r=0,511$, $p=0,002$), ve LDH ($r=0,629$, $p=0,000$) arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.
- CRP ile ALP ($r=0,553$, $p=0,001$), kreatinin ($r=-0,381$, $p=0,022$), RF ($r=0,349$, $p=0,043$) arasında anlamlı ilişkiler vardı.
- Benzer ilişkiler AST ile ALT ($r=0,673$, $p=0,000$) ve LDH ($r=0,717$, $p=0,000$) arasında da vardı.
- Son olarak üre ile kreatinin ($r=0,656$, $p=0,008$) ve ürik asit ($r=0,660$, $p=0,000$) arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Ayrıca hastalardan ilaç kullanım bilgileri sorgulandı ve sonuç olarak 3 hastanın henüz ilaca başlamadığı öğrenildi, 7 hastanın eskiden kullandığı ilaçlar sayesinde hastalık aktivasyonu önlebildiği için ilaç kullanmayı bıraktığı, 20 hastanın güncel DMARD tedavisi gördüğü, 3 hastanın biyolojik ajanlardan TNF- α blokörü kullandıkları ve 5 hastanın da hem DMARD hem de TNF- α blokörü kullandıkları gözlemlendi (Şekil 4.7.). Bunun sonucunda yapılan istatistiksel analizde herhangi bir şekilde ilaç kullanıp kullanmamayla ya da DMARD ve TNF- α blokörü kullanamayla MVK ve NLRP12 genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.5.).



Şekil 4.7. Hastaların almış oldukları tedavi içeriklerine göre dağılımı

Tablo 4.5. Hastaların almış oldukları tedavi içerikleriyle genlerin ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki

Gen	İlaç Kullanımı	N	χ^2	P
NLRP12	Hiç ilaç kullanmayan	3		
	İlaç kullanıp bırakan	7		
	Sadece DMARD kullanan	20	2,877	0,579
	Sadece TNF- α blokörü kullananlar	3		
	Kombine ilaç kullananlar	5		
MVK	Hiç ilaç kullanmayan	3		
	İlaç kullanıp bırakan	7		
	Sadece DMARD kullanan	20	2,930	0,570
	Sadece TNF- α blokörü kullananlar	3		
	Kombine ilaç kullananlar	5		

N: kişi sayısı (Toplam hasta sayısı = 38)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

RA, esas olarak eklem tutulum bulguları ile ortaya çıkmasına karşın, sistemik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastaların çoğunda halsizlik, yorgunluk, düşük derecede ateş ve depresyon gibi bünyevi sistemik semptomlar bulunur. Bu semptomlar Artrit gelişmeden haftalar öncesinden başlayabilir. Özellikle hastalığın başlangıcında semptomlar karakteristik olarak, dalgalanma gösterdiği için doğru tanı konulmasının aylarca gecikmesi nadir değildir.

NLR'lerin en büyük alt grubu pyrin domaini içeren NLRP (nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domaini, tekrarlayan zengin Lösin ve Pyrin domaini içeren) grubudur^{133,134}. Diğer isimleri NALP⁷, PAN¹³⁵, ya da PYPAF¹³⁶, olarak bilinen NLRP ailesinin, apoptozis ve inflamasyondaki rolleri iyi bilinmektedir. Ancak şimdiye kadar RA hastalığıyla ilişkili bir çalışma yapılmamıştır. Kolesterol biyosentezinde oldukça önemli bir role sahip Mevalonate kinazı sentezleyen MVK geni kromozomda 12q24 bölgesinde lokalize olan ve 10 kodlama yapan ekzon ile 1 kodlama yapmayan intron içeren 21 kb'lık bir gen bölgesidir³. MVK çok sayıda hücresel süreçte önemli fonksiyonlara sahiptir ve Mevalonate yolağı için kritik önem taşır⁴.

Bildiğimiz kadarıyla MVK ve NLRP12' nin ekspresyon düzeyiyle ilgili RA' lı hastalarda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Biz bu çalışmada Düzce Üniversitesi Hastanesine RA tanısıyla başvuran hastalardaki MVK ve NLRP12' nin ekspresyon düzeylerini tespit edip, bunların ekspresyon düzeyleri ile hastaların demografik özellikleri ve hemogram, sedimentasyon, CRP, RF, karaciğer fonksiyon testi vb. sonuçları arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık. Böylece RA hastalığında MVK ve NLRP12' nin ekspresyon düzeylerinin hastalığın tanısı ve tedavi stratejisinin geliştirilmesinde bir rolü olup olmadığı ve bu ekspresyon düzeylerinin hastaların demografik özellikleri, kullanılan ilaçlar ve tahlil sonuçları arasındaki ilişkisi tespit edip, literatürdeki bu eksikliği gidermeye çalıştık.

Kronik bir hastalığın tanısı (RA gibi) ile kendi kendine sınırlı veya farklı sonlanım noktalarına sahip diğer durumların ayırt edilmesi güç olabilir. Erken dönemde hastalığa

özgü özellikler yoktur ve hastalığın karakteristik özellikleri zaman içerisinde gelişir. RA tanısını kesin olarak koyduracak tek bir tanısal test yoktur. Bunların yerine hastalığın tanısının konulması genellikle bir araya getirilen karakteristik semptomlar, laboratuvar verileri ve radyolojik bulgulara dayanmaktadır.

Bu nedenle özellikle erken dönemlerde RA hastalığında klinik tanının doğrulanmasına yardım edebilecek yeni markırların ve testlerin geliştirilmesi oldukça önem arz etmektedir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, 38 RA' lı hasta ve 12 sağlıklı kontrolde eş zamanlı olarak MVK ve NLRP12 gen ekspresyon düzeyleri çalışıldı. RA tespit edilmiş hastaların sağlıklı kontrollere nazaran daha yüksek MVK ve NLRP12 mRNA ekspresyon düzeyine sahip olduğu görüldü. Sağlıklı kontroller ile hastalar arasındaki herhangi bir hastalık süresini gösteren belirtecin farkının olmaması, NLRP12/MVK ekspresyonundaki artmanın semptomlardan bağımsız moleküler bir belirteç olabileceğini göstermektedir.

NLRP12 ve MVK gen ekspresyon düzeyleri arasında hasta grubu için güçlü bir anlamlı ilişki varken ($p=0,000$), kontrol grubunda anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,491$). Sonuç olarak MVK ve NLRP12 genlerinin ifade düzeylerinin RA' lı hastalarda arttığı, bu iki genin ifade düzeyinin birbiri ile hastalığın patogeneğinde ilişkili olduğu ve hastalığın erken tanısında bu genlerin bir belirteç olarak kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Ayrıca sağlıklı olduğu bilinen kişilerde, özellikle de 50 yaşın üzerinde ve sigara içenlerde RF serumda tesbit edilebilir. Bir hastada RF titresi hastalık aktivitesi ile ilişkili değildir ancak çok şiddetli eroziv artrit bulunanlarda ve eklem dışı tutulumlu hastalarda nisbeten daha yüksek titrelerde RF saptanması daha olasıdır. Serumda RF varlığı RA tanısı koydurmaz ancak klinik birkaç özellikle birlikte olduğunda klinik tanının doğrulanmasına yardım eder⁷⁹. RF, RA tanı kriterlerine alınmış tek serolojik kriterdir ve hastaların %70- 80' ninde bulunur. RF, sağlıklı kişilerin yaklaşık % 5' inde bulunur. RF varlığı daha aktif hastalıkla ve kemik erozyonlarının gelişmesi ile ilişkilidir¹⁰¹.

Anti CCP antikorları RA için yüksek özgüllüğe sahip olduklarından RA' yı RF' nin pozitif bulunduğu diğer hastalıklardan (Sjörgeren, infeksiyon, hepatit gibi) ayırmada yardımcı olabilir. Eritrosit sedimentasyon hızı ve C reaktif protein gibi akut faz

yanıtçıları aktif inflamasyon varlığında genellikle yüksektir ancak bunlar RA tanısı için özgül değildir. Bu parametreler RA' yı osteoartrit veya fibromiyalji gibi iltihabi olmayan nedenlerden ayırt etmede yararlıdır. Ancak önemli sayıda RA'lı hastada klinik olarak eklemlerde iltihap bulguları olmasına rağmen bu testler normaldir.

TSH hormonuyla yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde hormon yüksekliği ile ilgili bir klinik bulgu yoktur. Bu yüzden hormon seviyesinin yüksekliği ile otoimmünite açıklanamamıştır ve sebebinin de RA' lı hastaların kullandıkları uzun etkili ilaçlar olabileceği düşünülmüştür⁹¹⁻⁹⁴. ESH' in hastalık aktivitesi ve yaş ile bağlantılı olarak artış gösterdiği, plazma fibrinojen düzeyine bağımlı olduğu için, CRP' ye göre daha geç yükseldiği ve tedaviye cevabın iyi bir göstergesi olduğu gösterilmiştir^{56,84,95}. Lökositlerin inflamatuvar artrit varlığını doğrulamada yararlı olabileceği düşünülmüştür ancak bulgulardan hiçbiri özgün değildir⁹⁶. RA' lı hastalarda hastalık aktivitesi ile trombosit sayısı arasında belirgin bir ilişki bulunmuştur¹. RA' da lökosit sayısı genelde normaldir, ancak aktif hastalarda sıklıkla lökositoz ve trombositoz saptanabilir⁸⁰.

Hastalık aktivitesini belirlemede CRP' nin ESH' den daha duyarlı olduğu kabul edilmiştir⁹⁷. Yüksek seviyelerde seyretmesi ve düşmemesi eklem yıkımı ve eroziv hastalığın göstergesidir¹. CRP; önemli bir akut faz reaktanı olup inflamasyon durumunda 6 saat gibi kısa bir sürede serumda yükselmeye başlar. ESH gibi hastalık aktivitesi ile paralel artış gösterir⁹⁸.

Alkalen fosfataz seviyeleri normal veya hafif artar⁹⁰. Ayrıca hastalığı modifiye eden ilaçların (sülfasalazin, azatioprin, metotreksat vb) karaciğer üzerine olan toksik etkileri nedeniyle de karaciğer fonksiyon testleri bozulabilir. RA hastalarında serum CK aktivitesinin belirgin azaldığını ve bunun da hastalığın inflamatuvar aktivitesine bağlı olduğunu göstermiştir^{103,104}. Uzun süren açlıkta, romatoid artrit, kas hastalıklarında, hormonal bozukluklarda, enfeksiyon, yanık ve kemik kırılmalarında da kreatinin düzeyleri yükselebilmektedir.

Bizim yaptığımız çalışmada, hastalarda diğer hastalık parametreleri ile hem NLRP12 hemde MVK ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu. Bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışma olmasından dolayı daha fazla bilgi elde edebilmek için daha fazla

katılımcının olduğu longitudinal çalışmalar gereklidir.

Proteazom yolağında önemli bir rol oynayan NLRP12'nin ^{149,152}, doğuştan bağışıklık ve apoptotik sinyal iletim yollarının arasında önemli bir düzenleyici köprü olduğu kabul edilir. NLRP12 çoğunlukla immün hücrelerde eksprese olduğu ve inflamatuvar cevapta negatif yönde düzenleme yaptığı düşünülmektedir ¹⁵⁴. MVK genindeki mutasyonların HPF, HIDS ve DSAP gibi sendromlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir ¹⁷⁷.

Yaptığımız çalışma sonrası hastalık süresiyle hem NLRP12 hem de MVK geninin mRNA ekspresyon düzeyi ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0,05$). Bu ise bize bu genlerin ekspresyonunun hastalığın süresinden bağımsız olduğunu, hastalığın semptomları ve bulguları oluşmadan erken başlangıç evresinde bu genlerin ekspresyon düzeylerinin artmaya başladığını, dolayısıyla bu genlerin ifadelerindeki değişikliğin hastalığın başlangıcı ile ilişkili olabileceğini, bu nedenle hastalık bulgu vermeden direkt olarak NLRP12 ve MVK genlerinin mRNA ekspresyon değişimlerine bakarak hastalığın daha bulgu vermeden ilk başlangıç aşamasında tespit edilebileceğini göstermektedir. Bu nedenle bu konu ile ilişkili yakın gelecekte yapılacak olan çalışmalarda bu genler göz önünde bulundurulmalıdır.

Hiç şüphe yokki inflammatom düzenlenmesi ve işlenmesinin anlaşılması inflamasyon, fibrojeniz ve tümörjeniz işleyişine müdahale etmek için harika olanaklar sağlayacaktır. Genin susturulmasıyla ilacın düzeltilmesine ihtiyaç olmadan biyometrik parametreler düzeltilebilir.

Eklem tutulumlarıyla başlayan, uzun süren ve tedavisine erken başlanması gereken bir immün hastalık olan RA, son yıllarda yaygın olarak hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar ve biyolojik ajanlar ile tedavi edilmeye başlanmıştır ²⁰³. İlaç kullanımıyla genin ekspresyon seviyesindeki değişimler gözlenmek istenip, hastaların ilaç kullanıp kullanmaması sorgulandı. Diğer değerlerin istatistiksel anlamlı çıkmasının sebebi hastaların % 73,67' sinin halen ilaç kullanıyor, %18,42' sinin de ilaç kullanıp bırakmış olmasından dolayıdır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada, ilaç kullanımına göre oluşturulan gruplar ile NLRP12 ve MVK gen ekspresyonu arasındaki istatistiksel ilişki bakıldı. Sonuç olarak, bu gruplar ile NLRP12 ve MVK düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı (sırasıyla $p = 0,579$ ve $p = 0,570$). Bu da kullanılan ilaçların NLRP12

ve MVK gen ekspresyon düzeylerine bir etkisinin olmadığını, hastalardaki biyokimyasal parametreleri değiştirdiğine işaret etmektedir. Yapılan bu çalışma RA' lı hastalarda MVK ve NLRP12 düzeylerinin yüksek olduğunu göstermesinin yanı sıra, bu genlerin ifade düzeylerinin hastalık aktivitesiyle korele olduğunu gösterebilirdi ancak hastaların çoğunun ilaç kullanması ve ilaçlar ile biyometrik parametreler değiştiği için, bu konuda tam anlamıyla net bir bilgi söylemek mümkün değildir. Bu nedenle eğer hastalar hiç ilaç kullanmamış olsalardı iki gen ekspresyon düzeyleri bakımından da hastalık aktivitesini değerlendirmek için yeni bir parametre olabilirdi. Bu genlerin siRNA' lar ile susturulmasıyla elde edilecek sonucun şuan düzenli ilaç kullanan hastanın parametreleri ile aynı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu sayede hem hastaların ilacın yan etkilerine maruziyeti önlenmiş olabilir hem de ilaç için ödenen paralara gerek kalmazdı. Ancak bu bulguları doğrulamak için daha fazla katılımcının olduğu longitudinal çalışmalar gereklidir.

Hastalarda diğer hastalık parametreleri ile hem NLRP12 hemde MVK ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu. NLRP12 ve MVK gen ekspresyon düzeyleri arasında hasta grubu için güçlü bir anlamlı ilişki varken ($p=0,000$), kontrol grubunda anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,491$). Sonuç olarak MVK ve NLRP12 genlerinin ifade düzeylerinin RA' lı hastalarda arttığı, bu iki genin ifade düzeyinin birbiri ile hastalığın patogenezinde ilişkili olduğu ve hastalığın erken tanısında bu genlerin bir belirteç olarak kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Bununla beraber inflamatuvar sinyal yolağı, konak savunması ve karsinogenez, patojen ve patojen ürünlere karşı cevap ile bunların sonucu oluşabilecek organizma için tehlikeli boyutta olan ateş oluşumunu engellemek için şuan bilinen bir tatmin edici tedavi yaklaşımı yoktur. Biz yapmış olduğumuz bu çalışmanın sonucunda NLRP12 ve MVK genlerinin böyle bir tedavinin geliştirilebilmesi için önemli bir hedef olabileceğini düşünüyoruz.

Bu gün RA hastalığının yaşam kalitesini ciddi şekilde bozduğu, normal popülasyona göre mortalite riskini arttırdığı, artmış tedavi gideri ve iş gücü kaybına bağlı olarak topluma büyük bir mali yük getirdiği bilinmektedir. Bu ciddi hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi ve daha etkili tedavisi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasına gerek duyulmaktadır.

Böylece klinik açıdan henüz bulgu vermemiş olan bireylerin erken aşamada tanı alması sağlanabilecek ve klinisyenin gerek görmesi durumunda erken tedaviye başlanabilecektir. Bununla beraber hastalıktan musdarip olan kişilerin yaşam standartları arttırılabileceği gibi, bu kişilerin fiziksel ve psikolojik durumları olumlu yönde etkilenmiş olacak, aynı zamanda gereksiz zaman kaybı, harcanan tedavi masrafları ve hastane giderleri erken tanı sayesinde önlenebilecektir. Bunlara ek olarak bu çalışmayla birlikte bu konu ile ilgili literatürde eksik olan bu bilgiler giderilmiş olacaktır. Yapmış olduğumuz bu çalışma, konu ile ilgili yapılan ilk çalışma olmasından dolayı söz konusu durum ile ilgili daha fazla ve net bilgi elde edebilmek için daha fazla hasta gruplarının yer aldığı ve uzun süreli takipli çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Ergin, S., Romatoid artrit ve Sjögren sendromu. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon, Güneş Kitapevi, 2000: p. 1549-1576.
2. Servet, A. and N. Akkoç., Romatoid artrit epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences, 2006. 2(25): p. 1-6.
3. Potter, D. and H.M. Mizioro, Identification of catalytic residues in human mevalonate kinase. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(41): p. 25449-25454.
4. Potter, D., Wojnar, J. M., Narasimhan, C., & Mizioro, H. M., Identification and functional characterization of an active-site lysine in mevalonate kinase. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(9): p. 5741-5746.
5. Zhang, S.-Q., Jiang, T., Li, M., Zhang, X., Ren, Y.-Q., Wei, S.-C., Exome sequencing identifies MVK mutations in disseminated superficial actinic porokeratosis. Nature genetics, 2012. 44(10): p. 1156-1160.
6. Zhou, Y., Liu, J., Fu, X., Yu, Y., Shi, B., Yu, G., Identification of three novel frameshift mutations of the MVK gene in four Chinese families with disseminated superficial actinic porokeratosis. British Journal of Dermatology, 2013. 169(1): p. 193-195.
7. Tschopp, J., F. Martinon, and K. Burns, NALPs: a novel protein family involved in inflammation. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. 4(2): p. 95-104.
8. Murali Krishna Rao, K. and T. Meighan, Exposure in vivo to silica or lipopolysaccharide produces transient or sustained upregulation, respectively, of PYPAF7 and MEFV genes in bronchoalveolar lavage cells in rats. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2006. 69(6): p. 481-490.
9. Wang, L., Manji, G. A., Grenier, J. M., Al-Garawi, A., Merriam, S., Lora, J. M., PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF- κ B and caspase-1-dependent cytokine processing. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(33): p. 29874-29880.
10. Waaler, E., On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 1940. 17(2): p. 172-188.

11. Firestein, G. S., Echeverri, F., Yeo, M., Zvaifler, N. J., & Green, D. R., *Kelley's textbook of rheumatology*. 2012: Elsevier Health Sciences.
12. O'dell, J., *Rheumatoid arthritis: the clinical picture. Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2005: p. 1165-1194.
13. Saag, K. G., Teng, G. G., Patkar, N. M., Anuntiyo, J., Finney, C., Curtis, J. R., *American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Care & Research*, 2008. 59(6): p. 762-784.
14. Gabriel, S.E., *The epidemiology of rheumatoid arthritis*. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 2001. 27(2): p. 269-281.
15. MacGregor, A. J., Snieder, H., Rigby, A. S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K., & Silman, A. J., *Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins*. *Arthritis & Rheumatism*, 2000. 43(1): p. 30.
16. Beasley, R.P., P. Bennett, and C.C. Lin, *Low prevalence of rheumatoid arthritis in Chinese. Prevalence survey in a rural community*. *The Journal of rheumatology*. Supplement, 1983. 10: p. 11-15.
17. Minaur, N., Sawyers, S., Parker, J., & Darmawan, J., *Rheumatic disease in an Australian Aboriginal community in North Queensland, Australia. A who-ilar copcord survey*. *The Journal of rheumatology*, 2004. 31(5): p. 965-972.
18. Hochberg, M.C. *Changes in the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in England and Wales, 1970–1982*. in *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1990. Elsevier.
19. Wasserman, A.M., *Diagnosis and management of rheumatoid arthritis*. *American family physician*, 2011. 84(11).
20. Bergström, G., Bjelle, A., Sorensen, L., Sundh, V., & Svanborg, A., *Prevalence of rheumatoid arthritis, osteoarthritis, chondrocalcinosis and gouty arthritis at age 79*. *The Journal of rheumatology*, 1986. 13(3): p. 527-534.
21. Ahmed, S.A., M. Dauphinee, and N. Talal, *Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice*. *The Journal of Immunology*, 1985. 134(1): p. 204-210.

22. Takagi, H., Ishiguro, N., Iwata, H., & Kanamono, T., Genetic association between rheumatoid arthritis and estrogen receptor microsatellite polymorphism. *The Journal of rheumatology*, 2000. 27(7): p. 1638-1642.
23. Huizinga, T.W., Genetics in rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2003. 17(5): p. 703-716.
24. Fresko, İ., Romatoid Artrit Etiyolojisi ve Patogenezi. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 2006. 2(25): p. 7-11.
25. Molokhia, M. and P. McKeigue, Risk for rheumatic disease in relation to ethnicity and admixture. *Arthritis research*, 2000. 2(2): p. 115-125.
26. Imboden, J.B., The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*, 2009. 4: p. 417-434.
27. Stastny, P., Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *New England journal of medicine*, 1978. 298(16): p. 869-871.
28. Silman, A.J. and J.E. Pearson, Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2002. 4(Suppl 3): p. S265-S272.
29. Shiina, T., H. Inoko, and J. Kulski, An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue antigens*, 2004. 64(6): p. 631-649.
30. O'Rourke, A.M., J. Rogers, and M.F. Mescher, Activated CD8 binding to class I protein mediated by the T-cell receptor results in signalling. *Nature*, 1990. 346(6280): p. 187-189.
31. Wordsworth, B.P. and M. Salmon, The HLA class II component of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Baillière's clinical rheumatology*, 1992. 6(2): p. 325-336.
32. Van Zeben, D., Hazes, J. M., Zwinderman, A. H., Cats, A., Schreuder, G. M., D'Amato, J., & Breedveld, F., Association of HLA-DR4 with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis. Results of a followup study. *Arthritis & Rheumatism*, 1991. 34(7): p. 822-830.
33. Klein, J. and A. Sato, The HLA system: first of two parts. *The New England journal of medicine*, 2000. 343(10): p. 702-709.
34. de Vries, N., Tijssen, H., van Riel, P. L., & van de Putte, L., Reshaping the shared epitope hypothesis: HLA-associated risk for rheumatoid arthritis is encoded by amino acid substitutions at positions 67-74 of the HLA-DRB1 molecule. *Arthritis & Rheumatism*, 2002. 46(4): p. 921-928.

35. Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester, The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 1987. 30(11): p. 1205-1213.
36. Huizinga, T. W., Amos, C. I., van der Helm-van Mil, A., Chen, W., van Gaalen, F. A., Jawaheer, D., Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis & Rheumatism*, 2005. 52(11): p. 3433-3438.
37. Schönland, S. O., Lopez, C., Widmann, T., Zimmer, J., Bryl, E., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M., Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. 100(23): p. 13471-13476.
38. Firestein, G. S., Budd, R., Gabriel, S. E., O'Dell, J. R., & McInnes, I. B., Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. 94(20): p. 10895-10900.
39. Maas, K., Westfall, M., Pietenpol, J., Olsen, N. J., & Aune, T., Reduced p53 in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis is associated with loss of radiation-induced apoptosis. *Arthritis & Rheumatism*, 2005. 52(4): p. 1047-1057.
40. Coenen, M. and P. Gregersen, Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape. *Genes and immunity*, 2009. 10(2): p. 101-111.
41. Clarke, A. and T.J. Vyse, Genetics of rheumatic disease. *Arthritis research & therapy*, 2009. 11(5): p. 1-9.
42. Clavel, G. and M.-C. Boissier, Angiogenesis markers in rheumatoid arthritis. 2008.
43. Han, S. W., Kim, G. W., Seo, J. S., Kim, S. J., Sa, K. H., Park, J. Y., VEGF gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2004. 43(9): p. 1173-1177.
44. Oncel, S., O. Peker, and F. Goğuş, Romatoid Artritte Etiyopatogenez, Klinik ve Laboratuar Bulgular. *Romatizmal Hastalıkların Tanı ve Tedavisi Yuce reklam/yayım/dağıtım a. ş. İstanbul*, 2002. 422: p. 431,436-449.
45. Oğuz, H., Romatizmal ağrılar. 1992: Atlas Tıp Kitabevi.
46. Harris, E., Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Textbook of rheumatology*, 1993. 1: p. 833-73.

47. Maddison, P. J., Isenberg, D. A., Woo, P., Glass, D. N., & Breedveld, F., Oxford textbook of rheumatology. 1993: Oxford university press.
48. Kamanlı, A., Çalaşyer, İ., Kaya, A., Romatoid artritli hastalarda Human Parvovirüs B19 IgG ve IgM antikor düzeyleri. Romatizma, 2001. 16(3): p. 138-42.
49. Mercado, F., Marshall, R., Klestov, A., & Bartold, P., Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. Journal of periodontology, 2001. 72(6): p. 779-787.
50. Nissim, A., Winyard, P. G., Corrigan, V., Fatah, R., Perrett, D., Panayi, G., & Chernajovsky, Y., Generation of neoantigenic epitopes after posttranslational modification of type II collagen by factors present within the inflamed joint. Arthritis & Rheumatism, 2005. 52(12): p. 3829-3838.
51. Baeten, D., Detection of major histocompatibility complex/human cartilage gp-39 complexes in rheumatoid arthritis synovitis as a specific and independent histologic marker. Arthritis & Rheumatism, 2004. 50(2): p. 444-451.
52. Van Eden, W., Wick, G., Albani, S., & Cohen, I., Stress, heat shock proteins, and autoimmunity. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007. 1113(1): p. 217-237.
53. Doyle, H.A. and M.J. Mamula, Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. Trends in immunology, 2001. 22(8): p. 443-449.
54. Bäcklund, J., Carlsen, S., Höger, T., Holm, B., Fugger, L., Kihlberg, J., Predominant selection of T cells specific for the glycosylated collagen type II epitope (263–270) in humanized transgenic mice and in rheumatoid arthritis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. 99(15): p. 9960-9965.
55. Bresnihan, B., Preventing joint damage as the best measure of biologic drug therapy. The Journal of Rheumatology, 2002. 65: p. 39-43.
56. Gümüşdiş, G., Bağ Dokusu Hastalıkları: Romatoid Artrit. Klinik Romatoloji El Kitabı, Güven Matbaası, 2003.
57. Dayer, J.-M., The process of identifying and understanding cytokines: from basic studies to treating rheumatic diseases. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2004. 18(1): p. 31-45.
58. Strand, V. and A. Kavanaugh, The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis. Rheumatology-Oxford, 2004. 43(3): p. iii10.

59. Hauser, S. and Jamerson, J., Principles of internal medicine. 2005: New York: McGraw-Hill.
60. VanderBorgh, A., The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. in Seminars in arthritis and rheumatism. 2001. Elsevier.
61. Kumar, V., A.K. Abbas, and J.C. Aster, Robbins basic pathology. 2012: Elsevier Health Sciences.
62. Lindqvist, E., Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 2005. 64(2): p. 196-201.
63. Ertenli, İ., Romatoid Artritte Yeni Tedaviler. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 2006. 2(25): p. 60-64.
64. Kelly, C., Baird, G., Foster, H., Hosker, H., & Griffiths, I., Prognostic significance of paraproteinaemia in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 1991. 50(5): p. 290-294.
65. Harris, E., Clinical features of rheumatoid arthritis. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 7th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier, 2005.
66. Guerne, P.-A. and M.H. Weisman, Palindromic rheumatism: part of or apart from the spectrum of rheumatoid arthritis. *The American journal of medicine*, 1992. 93(4): p. 451-460.
67. Hatemi, G. and H. Yazıcı, Romatoid Artrit Kliniği. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 2006. 2(25): p. 12-17.
68. Arnett, F.C., et al., The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 1988. 31(3): p. 315-324.
69. Initiative, C., 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Arthritis & Rheumatism*, 2010. 62(9): p. 2569-2581.
70. O'Dell, J. R., Haire, C. E., Erikson, N., Drymalski, W., Palmer, W., Eckhoff, P. J., Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate alone, sulfasalazine and hydroxychloroquine, or a combination of all three medications. *New England Journal of Medicine*, 1996. 334(20): p. 1287-1291.
71. Direskeneli, H., Romatoid Artrit Etiyopatogenezi. Hamuryudan 5th edition. Romatoid artrit, MD yayıncılık, 2002: p. 8-15.
72. Hastings, D.E. and J.A. Evans, Rheumatoid wrist deformities and their relation to ulnar drift. *J Bone Joint Surg Am*, 1975. 57(7): p. 930-934.

73. Hulsmans, H. M., Jacobs, J. W., Van Der Heijde, D. M., Albada-Kuipers, V., Grietje, A., Schenk, Y., & Bijlsma, J. W., The course of radiologic damage during the first six years of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2000. 43(9): p. 1927-1940.
74. Symmons, D.P., Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best practice & research Clinical rheumatology*, 2002. 16(5): p. 707-722.
75. Davidson, R. C., Horn, J. R., Herndon, J. H., & Grin, O. D., Brain-stem compression in rheumatoid arthritis. *JAMA*, 1977. 238(24): p. 2633-2634.
76. Rigual, N., Otolaryngologic manifestations of rheumatoid arthritis. *Ear, nose, & throat journal*, 1987. 66(11): p. 436-439.
77. Turesson, C., Schaid, D. J., Weyand, C. M., Jacobsson, L. T., Goronzy, J. J., Petersson, I. F., Association of HLA-C3 and smoking with vasculitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2006. 54(9): p. 2776-2783.
78. Turesson, C. and L. Jacobsson, Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*, 2004. 33(2): p. 65-73.
79. García-Patos, V. Rheumatoid nodule. in *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2007. WB Saunders.
80. Turesson, C. and E.L. Matteson. Extraarticular features of rheumatoid arthritis and systemic involvement. in Elsevier Inc. 2014.
81. DeHoratius, R.J., J.L. Abruzzo, and R.C. Williams Jr, Immunofluorescent and immunologic studies of rheumatoid lung. *Archives of internal medicine*, 1972. 129(3): p. 441.
82. Sahn, S., Pathogenesis of pleural effusions and pleural lesions. *Lung biology in health and disease*, 1990. 45: p. 27-45.
83. GÜldoğan, Z., Ekşioğlu, E., Fırat, H., & Çakıcı, A., Romatoid Artritli Hastalarda Akciğer Tutulumu. *Romatizma/Rheumatism*, 2007. 22(3).
84. Koopman, W. J., Moreland, L. W., Somers, D., Lazar, N., & Gast, P., *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*. 2001: Lippincott Williams & Wilkins.
85. Puéchal, X., Said, G., Hilliquin, P., Coste, J., Job-Deslandre, C., Lacroix, C., & Menkès, C. J., Peripheral neuropathy with necrotizing vasculitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 1995. 38(11): p. 1618-1629.

86. Sibley, J., Haga, M., Visram, D., & Mitchell, D., The clinical course of Felty's syndrome compared to matched controls. *The Journal of rheumatology*, 1991. 18(8): p. 1163-1167.
87. Lachmann, H. J., Goodman, H. J., Gilbertson, J. A., Gallimore, J. R., Sabin, C. A., Gillmore, J. D., & Hawkins, P. N., Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, 2007. 356(23): p. 2361-2371.
88. Emin, Ü.E., İskelet Sistemi Radyolojisi. Güven kitabevi, 2003: p. 150-75.
89. Keser, G., Romatoid Artritte Laboratuvar Testleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 2006. 2(25): p. 31-34.
90. Rındfleisch, I.A. and M. Muller, Diagnosis and Management. *American family physician*, 2005. 72: p. 6.
91. Shiroky, J. B., Cohen, M., Ballachey, M.-L., & Neville, C., Thyroid dysfunction in rheumatoid arthritis: a controlled prospective survey. *Annals of the rheumatic diseases*, 1993. 52(6): p. 454-456.
92. Andonopoulos, A., Siambi, V., Makri, M., Christofidou, M., Markou, C., & Vagenakis, A., Thyroid function and immune profile in rheumatoid arthritis. A controlled study. *Clinical rheumatology*, 1996. 15(6): p. 599-603.
93. Şentürk, T., Yavaşoğlu, İ., Coşkun, A., & Bolaman, Z., Romatoid Artritli hastalarda tiroid otoantikör prevalansı. 2005.
94. Wellby, M., Kennedy, J., Pile, K., True, B., & Barreau, P., Serum interleukin-6 and thyroid hormones in rheumatoid arthritis. *Metabolism*, 2001. 50(4): p. 463-467.
95. Schur, P. and R. Shmerling, Laboratory tests in rheumatic disorders. *Rheumatology*, 3rd edn. Mosby Press, New York, 2003: p. 199-213.
96. Harris, E., Romatoid Artritin klinik özellikleri. *Kelley Romatoloji*. 7.
97. Halla, J.T., R.E. Schrohenloher, and W.J. Koopman, Local immune responses in certain extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 1992. 51(5): p. 698-701.
98. Hobbs, K., Laboratory evaluation. *Rheumatology Secrets*. Ed by Starling G West. 2003, Hanley–Belfus Inc., Philadelphia.
99. Westedt, M., Herbrink, P., Molenaar, J., De Vries, E., Verlaan, P., Stijnen, T., . . . Lindeman, J., Rheumatoid factors in rheumatoid arthritis and vasculitis. *Rheumatology international*, 1985. 5(5): p. 209-214.

100. Aho, K., T. Palosuo, and P. Kurki. Marker antibodies of rheumatoid arthritis: diagnostic and pathogenetic implications. in *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1994. Elsevier.
101. Barland, P. and E. Lipstein, Selection and use of laboratory tests in the rheumatic diseases. *The American journal of medicine*, 1996. 100(2): p. 16S-23S.
102. Vossenaar, E. R., Zendman, A. J., van Venrooij, W. J., & Pruijn, G. J., PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*, 2003. 25(11): p. 1106-1118.
103. Gratacos, J., Collado, A., Filella, X., Sanmarti, R., Canete, J., Llena, J., . . . Muñoz-Gómez, J., Serum cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β and IFN- γ) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Rheumatology*, 1994. 33(10): p. 927-931.
104. Giltay, E. J., Schaardenburg, D., Gooren, L. J., POPP-SNIJDERS, C., & Dijkmans, B. A., Androgens and ankylosing spondylitis: a role in the pathogenesis? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999. 876(1): p. 340-365.
105. Tanoue, L.T., Pulmonary manifestations of rheumatoid arthritis. *Clinics in chest medicine*, 1998. 19(4): p. 667-685.
106. Wrightson, J. M., Stanton, A. E., Maskell, N. A., Davies, R. J., & Lee, Y. G. (, Pseudochylothorax without pleural thickening: time to reconsider pathogenesis? *CHEST Journal*, 2009. 136(4): p. 1144-1147.
107. Suldur, N., Evaluation of patients with rheumatoid arthritis and follow up parameters (Outcome parameters). *ROMATOLOJİ VE TIBBİ REHABILITASYON DERGISİ*, 2001. 12(2): p. 72-79.
108. Fuchs, H. A., Brooks, R. H., Callahan, L. F., & Pincus, T., A simplified twenty-eight-joint quantitative articular index in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 1989. 32(5): p. 531-537.
109. Richardson, C. and P. Emery, Laboratory markers of disease activity. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 1996. 44: p. 23-30.
110. Gordon, D.A. and D.E. Hastings, Clinical features of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2003. 1: p. 765-70.
111. Kremer, J.M., Rational use of new and existing disease-modifying agents in rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine*, 2001. 134(8): p. 695-706.

112. Machold, K. P., Stamm, T. A., Eberl, G. J., Nell, V. K., Dunky, A., Uffmann, M., & Smolen, J. S., Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease. *The Journal of rheumatology*, 2002. 29(11): p. 2278-2287.
113. Furst, D. and J. Hilson, Aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs, Koopman WJ (ed): *Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams and Williams.
114. Kirwan, J.R., Combination therapy including glucocorticoids: the new gold standard for early treatment in rheumatoid arthritis? *Annals of internal medicine*, 2012. 156(5): p. 390-391.
115. Yood, R.A. and A.C.o.R.S.o.R.A. Guidelines, Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update. 2002.
116. Yurdakul, S., Uzun etkili ilaçlar. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 2006. 2(25): p. 52-59.
117. Roberts, L. J., Cleland, L. G., Ranjeny, T., & Proudman, S. M., Early combination disease modifying antirheumatic drug treatment for rheumatoid arthritis. *Medical journal of Australia*, 2006. 184(3): p. 122.
118. Pincus, T., Yazici, Y., Sokka, T., Aletaha, D., & Smolen, J., Methotrexate as the " anchor drug" for the treatment of early rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*, 2003. 21(5; SUPP 31): p. S179-S185.
119. Demirel, A., M. Kınap, Romatoid artrit tedavisinde geleneksel ve güncel yaklaşımlar *Traditional and Up-to-date Treatment in Rheumatoid Arthritis*.
120. Visser, K., D. van der Heijde, Optimal dosage and route of administration of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. *Annals of the rheumatic diseases*, 2008.
121. Bathon, J. M., Martin, R. W., Fleischmann, R. M., Tesser, J. R., Schiff, M. H., Keystone, E. C., A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, 2000. 343(22): p. 1586-1593.
122. Urano, W., Taniguchi, A., Yamanaka, H., Tanaka, E., Nakajima, H., Matsuda, Y., Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2002. 12(3): p. 183-190.

123. Ranganathan, P. and H.L. McLeod, Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2006. 54(5): p. 1366-1377.
124. Yazici, Y., Sokka, T., Kautiainen, H., Swearingen, C., Kulman, I., & Pincus, T., Long term safety of methotrexate in routine clinical care: discontinuation is unusual and rarely the result of laboratory abnormalities. *Annals of the rheumatic diseases*, 2005. 64(2): p. 207-211.
125. Edworthy, S.M., Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus.). *Kelleys Textbook of Rheumatology*, 2001. 7: p. 1201-47.
126. Karadağ, Ö. and S. Kiraz, Romatoid Artrit Tedavisi: Kısa Etkili İlaçlar (Nonsteroidal Antiinflamatuvar [NSAİ] İlaçlar ve Steroidler). *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 2006. 2(25): p. 46-51.
127. Johnsen, A. K., Schiff, M. H., Mease, P. J., Moreland, L. W., Maier, A. L., Coblyn, J. S., Comparison of 2 doses of etanercept (50 vs 100 mg) in active rheumatoid arthritis: a randomized double blind study. *The Journal of rheumatology*, 2006. 33(4): p. 659-664.
128. Weinblatt, M. E., Kremer, J. M., Bankhurst, A. D., Bulpitt, K. J., Fleischmann, R. M., Fox, R. I., A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *New England Journal of Medicine*, 1999. 340(4): p. 253-259.
129. Breedveld, F. C., Weisman, M. H., Kavanaugh, A. F., Cohen, S. B., Pavelka, K., Vollenhoven, R. v., Spencer-Green, G. T. The PREMIER study: a multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis & Rheumatism*, 2006. 54(1): p. 26-37.
130. Chatham, W., Traditional disease-modifying antirheumatic drugs: gold compounds, D-penicillamine, sulfasalazine and antimalarials. *Arthritis and allied conditions*. 15th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: p. 915-44.
131. Mertens, M. and J.A. Singh, Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *The Journal of rheumatology*, 2009: p. jrheum. 090074.
132. Kanneganti, T.-D., Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nature Reviews Immunology*, 2010. 10(10): p. 688-698.

133. Ting, J.P., J.A. Duncan, and Y. Lei, How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science*, 2010. 327(5963): p. 286-290.
134. Kanneganti, T.-D., M. Lamkanfi, and G. Núñez, Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, 2007. 27(4): p. 549-559.
135. Pawlowski, K., Pio, F., Chu, Z.-L., Reed, J. C., & Godzik, A., PAAD—a new protein domain associated with apoptosis, cancer and autoimmune diseases. *Trends in biochemical sciences*, 2001. 26(2): p. 85-87.
136. Manji, G. A., Wang, L., Geddes, B. J., Brown, M., Merriam, S., Al-Garawi, A., Jurman, M. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(13): p. 11570-11575.
137. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 2011. 30(1): p. 16-34.
138. Lukens, J.R., J.M. Gross, and T.-D. Kanneganti, IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front Immunol*, 2012. 3(315.10): p. 3389.
139. Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A., & Watanabe, T., Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature reviews immunology*, 2006. 6(1): p. 9-20.
140. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., & Flavell, R., Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 2012. 481(7381): p. 278-286.
141. Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., & O'Neill, L. A., Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 2005. 5(6): p. 446-458.
142. Inohara, N., Chamaillard, M., McDonald, C., & Nunez, G., NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 2005. 74: p. 355-383.
143. Zhong, Y., A. Kinio, and M. Saleh, Functions of NOD-like receptors in human diseases. *NLR-protein functions in immunity*, 2015: p. 75.
144. Allen, I. C., Wilson, J. E., Schneider, M., Lich, J. D., Roberts, R. A., Arthur, J. C., NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF- κ B signaling. *Immunity*, 2012. 36(5): p. 742-754.
145. Chen, G.Y. and G. Núñez, Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*, 2011. 141(6): p. 1986-1999.

146. Zaki, M. H., Vogel, P., Malireddi, R. S., Body-Malapel, M., Anand, P. K., Bertin, J., The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis. *Cancer cell*, 2011. 20(5): p. 649-660.
147. Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J., & Alnemri, E. S., AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, 2009. 458(7237): p. 509-513.
148. Hsu, L.-C., Ali, S. R., McGillivray, S., Tseng, P.-H., Mariathasan, S., Humke, E. W., A NOD2–NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(22): p. 7803-7808.
149. Williams, K. L., Lich, J. D., Duncan, J. A., Reed, W., Rallabhandi, P., Moore, C., The CATERPILLER protein Monarch-1 is an antagonist of Toll-like receptor-, tumor necrosis factor α -, and *Mycobacterium tuberculosis*-induced pro-inflammatory signals. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(48): p. 39914-39924.
150. Shami, P. J., Kanai, N., Wang, L. Y., Vreeke, T. M., & Parker, C. J., Identification and characterization of a novel gene that is upregulated in leukaemia cells by nitric oxide. *British journal of haematology*, 2001. 112(1): p. 138-147.
151. Williams, J., Cutting edge: A novel lab-on-a-tube for multimodality neuromonitoring of patients with traumatic brain injury (TBI). *Lab on a Chip*, 2009. 9(14): p. 1987-1987.
152. Lich, J.D. and J.P.-Y. Ting, Monarch-1/PYPAF7 and other CATERPILLER (CLR, NOD, NLR) proteins with negative regulatory functions. *Microbes and infection*, 2007. 9(5): p. 672-676.
153. Tuncer, S., M.T. Fiorillo, and R. Sorrentino, The multifaceted nature of NLRP12. *Journal of leukocyte biology*, 2014. 96(6): p. 991-1000.
154. Arthur, J. C., Lich, J. D., Ye, Z., Allen, I. C., Gris, D., Wilson, J. E., Cutting edge: NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity. *The Journal of Immunology*, 2010. 185(8): p. 4515-4519.
155. Kinoshita, T., Kondoh, C., Hasegawa, M., Imamura, R., & Suda, T., Fas-associated factor 1 is a negative regulator of PYRIN-containing Apaf-1-like protein 1. *International immunology*, 2006. 18(12): p. 1701-1706.

156. Pinheiro, A. S., Eibl, C., Ekman-Vural, Z., Schwarzenbacher, R., & Peti, W., The NLRP12 pyrin domain: structure, dynamics, and functional insights. *Journal of molecular biology*, 2011. 413(4): p. 790-803.
157. Gharagozloo, M., Mahvelati, T. M., Imbeault, E., Gris, P., Zerif, E., Bobbala, D., The nod-like receptor, Nlrp12, plays an anti-inflammatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroinflammation*, 2015. 12(1): p. 198.
158. Lawrence, T., The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a001651. External Resources CrossRef (DOI) ISI Web of Science.
159. Leu, C.-M., Wong, F.-H., Chang, C., Huang, S.-F., & Hu, C., Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene*, 2003. 22(49): p. 7809-7818.
160. Borghini, S., Tassi, S., Chiesa, S., Caroli, F., Carta, S., Caorsi, R., Clinical presentation and pathogenesis of cold-induced autoinflammatory disease in a family with recurrence of an NLRP12 mutation. *Arthritis & Rheumatism*, 2011. 63(3): p. 830-839.
161. Jeru, I., Duquesnoy, P., Fernandes-Alnemri, T., Cochet, E., Yu, J., Lackmy-Port-Lis, M., Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(5): p. 1614-1619.
162. Zaki, M. H., Man, S. M., Vogel, P., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T., Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. 111(1): p. 385-390.
163. Goverman, J., Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, 2009. 9(6): p. 393-407.
164. Lukens, J. R., Gurung, P., Shaw, P. J., Barr, M. J., Zaki, M. H., Brown, S. A., The NLRP12 sensor negatively regulates autoinflammatory disease by modulating interleukin-4 production in T Cells. *Immunity*, 2015. 42(4): p. 654-664.
165. Ataide, M. A., Andrade, W. A., Zamboni, D. S., Wang, D., do Carmo Souza, M., Franklin, B. S., Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1

- activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLoS Pathog*, 2014. 10(1): p. e1003885.
166. Schafer, B., Bishop, R., Kratunis, V., Kalinowski, S., Mosley, S., Gibson, K., & Tanaka, R., Molecular cloning of human mevalonate kinase and identification of a missense mutation in the genetic disease mevalonic aciduria. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. 267(19): p. 13229-13238.
167. Stojanov, S. and D.L. Kastner, Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Current opinion in rheumatology*, 2005. 17(5): p. 586-599.
168. Willer, C. J., Sanna, S., Jackson, A. U., Scuteri, A., Bonnycastle, L. L., Clarke, R., Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nature genetics*, 2008. 40(2): p. 161-169.
169. Feitosa, M. F., Rice, T., Borecki, I. B., Rankinen, T., Leon, A. S., Skinner, J. S., Pleiotropic QTL on chromosome 12q23-q24 influences triglyceride and high-density lipoprotein cholesterol levels: the HERITAGE family study. *Human biology*, 2006. 78(3): p. 317-327.
170. Bossé, Y., Chagnon, Y. C., Després, J.-P., Rice, T., Rao, D., Bouchard, C., Genome-wide linkage scan reveals multiple susceptibility loci influencing lipid and lipoprotein levels in the Quebec Family Study. *Journal of lipid research*, 2004. 45(3): p. 419-426.
171. Welch, C., Xia, Y.-R., Shechter, I., Farese, R., Mehrabian, M., Mehdizadeh, S., Genetic regulation of cholesterol homeostasis: chromosomal organization of candidate genes. *Journal of lipid research*, 1996. 37(7): p. 1406-1421.
172. Holleboom, A. G., Vergeer, M., Hovingh, G. K., Kastelein, J. J., & Kuivenhoven, J. A., The value of HDL genetics. *Current opinion in lipidology*, 2008. 19(4): p. 385-394.
173. Junyent, M., Parnell, L. D., Lai, C.-Q., Lee, Y.-C., Smith, C. E., Arnett, D. K., Novel variants at KCTD10, MVK, and MMAB genes interact with dietary carbohydrates to modulate HDL-cholesterol concentrations in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network Study. *The American journal of clinical nutrition*, 2009. 90(3): p. 686-694.
174. Dinarello, C.A., A. Simon, and J.W. van der Meer, Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 2012. 11(8): p. 633-652.

175. Stoffels, M., Jongekrijg, J., Remijn, T., Kok, N., van der Meer, J. W., & Simon, A., TLR2/TLR4-dependent exaggerated cytokine production in hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Rheumatology*, 2014: p. keu341.
176. Bodar, E., Kuijk, L., Drenth, J., Van Der Meer, J., Simon, A., & Frenkel, J., On-demand anakinra treatment is effective in mevalonate kinase deficiency. *Annals of the rheumatic diseases*, 2011: p. annrheumdis149922.
177. Hinks, A., Martin, P., Thompson, S. D., Sudman, M., Stock, C. J., Thomson, W., Autoinflammatory gene polymorphisms and susceptibility to UK juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2013. 11(1): p. 14.
178. van der Hilst, J.C. and J. Frenkel, Hyperimmunoglobulin D syndrome in childhood. *Current rheumatology reports*, 2010. 12(2): p. 101-107.
179. Stoffels, M. and A. Simon, Hyper-IgD syndrome or mevalonate kinase deficiency. *Current opinion in rheumatology*, 2011. 23(5): p. 419-423.
180. Dai, J., Chen, M., Fu, X. a., Yu, Y., Shi, Z., Yu, C., Mutation analysis of the MVK gene in Chinese patients with disseminated superficial actinic porokeratosis. *Journal of dermatological science*, 2013. 72(3): p. 320.
181. Lu, W.-S., Zheng, X.-D., Yao, X.-H., Zhang, L.-F., Hu, B., & Lu, Y.-J., Detection of a novel missense mutation in the mevalonate kinase gene in one Chinese family with DSAP. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2014. 7(2): p. 728.
182. Schoindre, Y., Feydy, A., Giraudet-Lequintrec, J.-S., Kahan, A., & Allanore, Y., TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): A new cause of joint destruction? *Joint Bone Spine*, 2009. 76(5): p. 567-569.
183. Buhaescu, I. and H. Izzedine, Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clinical biochemistry*, 2007. 40(9): p. 575-584.
184. Arslan Taş, D., Erken, E., Yildiz, F., Dinkçi, S., & Sakalli, H., Mevalonate kinase gene mutations and their clinical correlations in Behçet's disease. *International journal of rheumatic diseases*, 2014. 17(4): p. 435-443.
185. Kone-Paut, I., Sanchez, E., Le Quellec, A., Manna, R., & Touitou, I., Autoinflammatory gene mutations in Behçet's disease. *Annals of the rheumatic diseases*, 2007. 66(6): p. 832-834.
186. Wolfe, F., A reappraisal of HAQ disability in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2000. 43(12): p. 2751-2761.

187. Başaran, S., R. Güzel, and T. Sarpel, Yaşam kalitesi ve sağlık sonuçlarını değerlendirme ölçütleri. *Romatizma*, 2005. 20(1): p. 55-63.
188. McPherson, M. and S. Møller, *Pcr*. 2007: Garland Science.
189. Zamorano, P.L., V.B. Mahesh, and D.W. Brann, Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. *Neuroendocrinology*, 1996. 63(5): p. 397-407.
190. Ramachandran, C. and S.J. Melnick, Multidrug resistance in human tumors—molecular diagnosis and clinical significance. *Molecular Diagnosis*, 1999. 4(2): p. 81-94.
191. DesJardin, L. E., Perkins, M. D., Wolski, K., Haun, S., Teixeira, L., Chen, Y., Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1999. 160(1): p. 203-210.
192. Fairman, J., Roche, L., Pieslak, I., Lay, M., Corson, S., Fox, E., Quantitative RT-PCR to evaluate in vivo expression of multiple transgenes using a common intron. *Biotechniques*, 1999. 27: p. 566-575.
193. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A., Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*, 2005. 6(4): p. 279-284.
194. Ghossein, R.A. and J. Rosai, Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer*, 1996. 78(1): p. 10-16.
195. Gibson, U., C.A. Heid, and P.M. Williams, A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research*, 1996. 6(10): p. 995-1001.
196. Bustin, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 2000. 25(2): p. 169-193.
197. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 2006. 27(2): p. 95-125.
198. Meuer, S., C. Wittwer, and K.-I. Nakagawara, *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. 2012: Springer Science & Business Media.
199. Gut, M., Leutenegger, C. M., Huder, J. B., Pedersen, N. C., & Lutz, H., One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *Journal of virological methods*, 1999. 77(1): p. 37-46.

200. Valasek, M.A. and J.J. Repa, The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 2005. 29(3): p. 151-159.
201. Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J., GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*, 2005. 21(3): p. 389-395.
202. Yalcin, A., Quantification of thioredoxin mRNA expression in the rat hippocampus by real-time PCR following oxidative stress. *Acta Biochim Pol*, 2004. 51(4): p. 1059-1065.



EKLER

EK 1: STANFORD SAĞLIK DEĞERLENDİRME ANKETİ (HAQ)				
Hastalığınızın günlük yaşam işlevlerini başarma yeteneğinizi nasıl etkilediğini öğrenmekle ilgileniyoruz. Lütfen bu sayfanın arkasına herhangi bir yorum ekleme konusunda kendinizi özgür hissedin.				
GEÇEN HAFTAKİ AKTİVİTELERİNİZİ EN İYİ TANIMLAYAN SEÇENEĞİ İŞARETLEYİNİZ.				
	Hiç zorlanmadan	Biraz zorlanarak	Çok zorlanarak	Yapamıyorum
1. Giyinme ve kuşanma: Giyinebiliyor musunuz (düğme ilikleme ve ayakkabı bağlamak dâhil)? Saçınızı yıkayabiliyor musunuz?	() ()	() ()	() ()	() ()
2. Ayağa kalkma: Kolsuz bir sandalyeden kalkabiliyor musunuz? Yatağa yatıp kalkabiliyor musunuz?	() ()	() ()	() ()	() ()
3. Yemek yeme: Etinizi kesebiliyor musunuz? Dolu bir bardağı veya fincanı ağzınıza götürebiliyor musunuz? Süt kutusu açabiliyor musunuz?	() () ()	() () ()	() () ()	() () ()
4. Yürüme: Evin dışında düz alanda yürüyebiliyor musunuz? Basamak çıkabiliyor musunuz?	() ()	() ()	() ()	() ()
5. Hijyen: Tüm vücudunuzu yıkayıp kurulayabiliyor musunuz? Tuvalete girip çıkabiliyor musunuz?	() ()	() ()	() ()	() ()
6. Uzanma: Başınız hizasındaki 2 kiloluk bir nesneyi (örn. Bir torba patates) alabiliyor musunuz? Eğilip yerden elbise veya eşya alabiliyor musunuz?	() ()	() ()	() ()	() ()
7. Kavrama: Araba kapısını açabiliyor musunuz? Daha önce açılmış kavanozları açabiliyor musunuz? Muslukları açıp kapatabiliyor musunuz?	() () ()	() () ()	() () ()	() () ()
8. Aktiviteler: Gezmeye veya alışverişe gidebiliyor musunuz? Arabaya binip inebiliyor musunuz? Evi süpürmek gibi ev işleri yapabiliyor musunuz?	() () ()	() () ()	() () ()	() () ()

ÖZGEÇMİŞ

08.07.1990 tarihinde Konya' nın Ilgın ilçesinde dünyaya geldim. İlk, orta ve lise öğrenimimi Bursa' da tamamladıktan sonra 2009 yılında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı' nda lisans öğrenimime başladım. Eğitimim sırasında hem yurtiçi hem de yurtdışı çok sayıda merkezde staj yapma imkânım oldu. Lisansımın son döneminde ERASMUS öğrencisi olarak Macaristan' da bulunarak 2013 yılında mezun oldum. 2014 yılında ÖYP kapsamında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' na araştırma görevlisi olarak atandım ve aynı dönem içerisinde Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimime başladım. Halen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nda araştırma görevlisi olarak çalışmalarımı sürdürmekteyim.