T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRK ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA IL-6 (İNTERLÖKİN-6) GEN POLİMORFİZMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Özlem SARIÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOLOJİ PROGRAMI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ahmet ARMAN

İSTANBUL 2009

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRK ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA IL-6 (İNTERLÖKİN-6) GEN POLİMORFİZMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Özlem SARIÖZ
(141100620070151)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOLOJİ PROGRAMI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ahmet ARMAN

İSTANBUL 2009

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL VE ONAY BELGESİ

Özlem SARIÖZ'ün **"Türk Romatoid Artrit Hastalarında IL-6 (İnterlökin-6) Gen Polimorfizlerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi** isimli Lisansüstü tez çalışması, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …….. tarih ve ……sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet ARMAN (Marmara Üniversitesi)
1.Üye : Prof.Dr. Ayşe OGAN (Marmara Üniversitesi)
2.Üye : Yar.Doç. Dr. Yıldız AYDIN (Marmara Üniversitesi)

Tezin Savunulduğu Tarih :…06.02.2009…

ONAY

M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …… tarih ve ……. sayılı kararı ile Özlem SARIÖZ 'ün Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans (MSc.) derecesi alması onanmıştır.

Marmara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan kendisiyle çalışmış olmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyacağım değerli danışman hocam Doç. Dr. Ahmet ARMAN'a ve adeta ikinci danışmanım gibi tecrübelerini benden esirgemeyen doktora öğrencisi Ajda ÇOKER'e gönülden teşekkürü bir borç bilirim.

İçimdeki laboratuar sevgisinin fitilini ateşleyen Doğa Bitkileri ve Su Ürünleri Merkezinin kapılarını bana açan başta Prof. Dr. Engin ÖZHATAY hocama ve gerek lisans gerekse yüksek lisansım süresince başarım için benimle birlikte yürek tüketen, kıymetli hocam Uzm. Bio. Med. Dr. Barlas DİNGİLYAN'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesinden hasta ve kontrol gruplarımın oluşturulmasında sağladıkları katkılardan dolayı, Prof. Dr. Haner DİRESKENELİ ve Doç. Dr. Nevsun İNANÇ hocalarıma ve kendimi Romatoloji Bölümünün bir parçası gibi hissettiren tüm Romatoloji Bölümü çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Fen Edebiyat Fakültesindeki eğitimimin her sürecinde desteğini hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Meral ÜNAL'a, Moleküler Biyoloji Laboratuarı ve danışman hocam ile tanışmama vesile olan arkadaşım Araş. Gör. Özgür DOĞAN'a, ve manevi desteklerini benden hiç esirgememiş olan hocalarım Araş. Gör. Işıl İSMAİLOĞLU ve Öğr. Gör. Dr. Cenk SESAL 'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ve fedakarlıklarını sevgileriyle örten, varlıklarıyla hayattaki en büyük zenginliğim olan aileme şükranlarımı sunarım.

Ocak 2009 **Özlem SARIÖZ**

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET.....**V**

ABSTRACT.....**VII**

YENİLİK BEYANI.....**VII**

SEMBOL LİSTESİ.....**IX**

KISALTMALAR.....**X**

ŞEKİL LİSTESİ.....**XI**

TABLO LİSTESİ.....**XII**

BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ.....**1**

I.1. GİRİŞ VE AMAÇ.....**1**

BÖLÜM II. GENEL BÖLÜM.....**3**

II.1. Romatoid Artrit Hastalığı **3**

II.2. Romatoid Artrit Risk Faktörleri **4**

II.2.1. Genetik Faktörler **4**

II.2.2. Enfeksiyon Ajanları **5**

II.2.3. Cinsiyet, Yaş ve Gebelik **5**

II.3. RA Patogenezi.....**5**

II.3.1. Pannus **9**

II.3.2. İmmün Sistem **10**

II.3.3. Kemik Patolojisi **12**

II.4. İnterlökin-6 Gen.....**13**

II.5. IL-6 Geni ile Romatoid Artrit Hastalığı Arasındaki İlişki.....**14**

BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI **17**

III.1. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ **17**

III.1.A.Klinik Çalışmalar **17**

III.1.A.1. Tanı ve Klinik Öykü **17**

III.1.A.2. Fiziki Muayene **19**

III.1.A.3. Laboratuvar **19**

III.1.A.4. Radyoloji **21**

III.1.B. Moleküler Genetik Yöntemler **22**

III.1.B.1. Denek Kanlarından Genomik DNA İzolasyonu **22**

III.1.B.2. Genomik DNA'ların Absorbanslarının Ölçülmesi **22**

III.1.B.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) **23**

III.1.B.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Analizi **24**

III.1.B.5. Biyoistatistik Analiz **24**

III.2. ARAŞTIRMA ARAÇLARI **25**

III.2.A. Kullanılan Cihazlar **25**

III.2.B. Kullanılan Kimyasallar **26**

III.2.B.1.Kullanılan Primerler **26**

III.2.B.2.DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Çözeltiler **26**

III.2.B.3.PCR'da Kullanılan Çözeltiler **27**

III.2.B.4.Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler **27**

III.2.C. Kullanılan Cam ve Diğer Malzemeler **29**

III.3. YAPILAN ÇALIŞMALAR **30**

III.3.A.Klinik Çalışmalar **30**

III.3.B. Moleküler Genetik Yöntemler **30**

III.3.B.1. Denek Kanlarından Genomik DNA İzolasyonu **30**

III.3.B.2. Genomik DNA'ların Absorbanslarının Ölçülmesi **31**

III.3.B.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) **32**

III.3.B.4. PCR Ürünlerinin Kesimi **33**

III.3.B.5. Jel Görüntülerinin Alınması **34**

III.3.B.6. Biyoistatistik Analiz **35**

BÖLÜM IV. SONUÇLAR **36**

IV.A. KLİNİK ÇALIŞMALAR **36**
IV.B. MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLER **36**
IV.B.1. Absorbans ve DNA Miktarları **36**
IV.B.2. Agaroz Jel Elektroforezi ile IL-6 Promotor Bölgesi Gen Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi **36**
IV.B.2.1.- 174.Bölge Genotiplendirmesi **37**
IV.B.2.2.- 572.Bölge Genotiplendirmesi **37**
IV.B.2.3.- 597.Bölge Genotiplendirmesi..... **38**

BÖLÜM V. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRMELER **43**

KAYNAKLAR **47**

EK.1. DENEKLERİN DNA ABSORBANS DEĞERLERİ **59**

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

TÜRK ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA IL-6 (İNTERLÖKİN-6) GEN POLİMORFİZMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Eklemlerde inflamasyon (şişme, hareket zorluğu ve ağrı) ile tanımlanan Romatoid Artrit (RA) hastalığı, sık görülen romatizmal hastalıklardan biridir. Romatoid artrit etyolojisi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen çok nedenli bir hastalık olarak kabul edilir. HLA DR4 ve HLA DR1 genlerindeki varyasyonların romatoid artrite yatkınlığı, hastalığın genetik tabanını ortaya koymuştur. IL-1, TNF-α ve IL-6 gibi proinflamatuar sitokinler Romatoid artrit gibi ağrılı vakalarda yüksek seviyede üretilmektedir. Bu sitokinlerin genlerindeki çeşitli varyasyonlar sitokin üretim miktarını etkilemektedir. IL-6 geninin promoter bölgesinde tespit edilen -174 C alleli IL-6 seviyesini artırmaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada Türkiye'de IL-6'in hangi varyasyonunun RA için risk faktörü oluşturduğunu belirlemek ve ileride genetik test geliştirerek bu hastalık riskinin erken safhada belirlenebilmesi ile gelecekte bu hastalığın gelişiminin önlemesine katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Marmara Üniversitesi Araştırma Hastanesi Romatoloji Bölümü'ne eklem ağrısı şikayeti ile gelen kişilere klinik testler yapılmıştır. Bu testler doğrultusunda RA tanısı konan 178 hastadan ve kontrol grubunu oluşturan 248 sağlıklı kişiden genomik DNA izole edilmiştir. Bu DNA lar kullanılarak her hastanın IL-6 geninin promoter bölgesi PCR ile çoğaltılmış ve PCR ürünleri uygun enzimler ile kesilerek hasta ve kontrollerin IL-6 -174, -572, -597. pozisyonlarındaki varyasyonları belirlenmiştir.

Genetik analizler sonucunda Romatoid Artrit hastalığı ile -174 genotip dağılımı (p = 0,535), -174 allel frekansı arasında herhangi bir istatistiksel ilişki tespit edilmemiştir (p =0,131) . Romatoid Artrit hastalığı ile - 572 genotip dağılımı (p =0,570), -572 allel frekansı arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanılmamıştır (p=0,876). Aynı şekilde -597 genotip dağılımları (p= 0,912) ile -597 allel frekansları arasında da istatistiksel bir anlamlılık gözlenmemiştir (p =0,506).

OCAK 2009 **Özlem SARIÖZ**

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RHEUMATOID ARTHRITIS DISEASE AND IL-6 GENE POLYMORPHISMS IN MOLECULAR LEVEL

Rheumatoid arthritis (RA) that is defined as the inflammation (swelling, moving difficulty and pain) in joints is common seen one of the rheumatological disorders. Although the ethiology of RA is not known completely, RA is accepted as multifactorial disease affected from genetics and environmental factors. The variations in HLA DR4 and HLA DR1 genes make genetic base for RA. The inflammaotory cytokines such as IL-1, TNF- α and IL-6 are produced at high level in painful cases such as RA. The variations in the prompoter of these genes may affect cytokin production. It has been shown that -174 C allele of IL-6 gene increased IL-6 level.

In this study, the purpose of our research was to determine the type of variation of IL-6 for the risk factor in RA and to develop genetic test to detect early risk of RA in order to avoid the development of this disease in future. Our study, clinic tests were performed on people that are coming to RA Clinics of the Rheumatology Division of Marmara University for complaining joint pains. Genomic DNAs were isolated from 178 people diagnosed as RA based on these tests and 248 control. The promoter region of IL-6 gene was amplified using DNAs from patients and controls and their PCR products were digested by suitable enzymes. And then the variations in -174, 527, and -597 region of IL-6 were determined in both patients and control groups. The results of genetic analysis are : Any statistical relationship between RA and -174 geneotype distribution (p= 0,535) and -174 allele frequency (p =0,131) was not determined. Also, neither -572 genotype distrubition (p =0,570), nor -572 allele frequency (p =0, 876) of IL-6 showed any relationship with RA statistically. In addition to these results, there was no significant difference in -597 genotype distribution (p= 0,912) and allele frequency (p=0.506) of IL-6 between RA and control subjects .

January 2009 **Özlem SARIÖZ**

YENİLİK BEYANI

TÜRK ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA IL-6 (İNTERLÖKİN-6) GEN POLİMORFİZMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Romatoid Artrit (RA), etyolojisi belli olmayan, temel olarak büyük ve küçük eklemleri etkilemekle birlikte sistemik etkilere de yol açan, kronik inflamatuar bir hastalıktır. Hastanın yaşam kalitesini düşüren Romatoid artrit hastalığı her yaş grubunda görülebilir. Kişilerin RA'ya yatkınlıklarının erken yaşlarda belirlenmesi ile RA gelişimi kontrol altına alınarak önlenebilir. Bu amaçla yapılan çalışmamızda RA gelişimi üzerinde etkisi olabileceğini düşündüğümüz IL-6 geni promotor bölgesi -174 , -572 ve -597 pozisyonlarındaki polimorfizler incelenmiştir.

Bu çalışma Türkiye'de Romatoid Artrit hastalarında IL-6 gen polimorfizmini inceleyen ilk çalışmadır. Yapılan çalışmalar sonucunda baktığımız -174, -572, -597. bölgelerdeki tek nükleotit polimorfizmleri ile Romatoid Artrit hastalığı arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak Türkiye' de yaşayan kişilerin, IL - 6 polimorfizmi pozitif gösteren ülkelerde yaşayan kişilere göre genotipik olarak farklı olduğunu söyleyebiliriz.

OCAK 2009 **Doç. Dr. Ahmet ARMAN** **Özlem SARIÖZ**

SEMBOL LİSTESİ

bp	**:**	Baz çifti
kb	**:**	Kilo baz
%	**:**	Yüzde
mm	**:**	Milimetre
ml	**:**	Mililitre
µl	**:**	Mikrolitre
µg	**:**	Mikrogram
µmol	**:**	Mikromol
pmol	**:**	Pikomol
rpm	**:**	Dakikada Dönme Sayısı
A_{260}	**:**	260 nm dalga boyundaki Absorbans değeri
A_{280}	**:**	280 nm dalga boyundaki Absorbans değeri
^{o}C	**:**	Santigrat Derece
nm	**:**	Nanometre
g	**:**	Gram
µg	**:**	Mikrogram
cm^3	**:**	Santimetre küp
kDa	**:**	Kilo Dalton
U	**:**	Unite
mM	**:**	Milimolar
M	**:**	Molar
OD	**:**	Optik Densite
dk	**:**	Dakika
sn	**:**	Saniye
n	**:**	Örnek Sayısı
%GC	**:**	Yüzde Guanin Sitozin içeriği

KISALTMALAR

IL-1	**:**	İnterlökin-1
IL-1α	**:**	İnterlökin-1α
IL-1β	**:**	İnterlökin-1 β
IL-1Ra	**:**	İnterlökin-1 Reseptör Antagonist
IL-1R	**:**	İnterlökin-1 Reseptör
IL-1RN	**:**	İnterlökin-1 Reseptör Antagonist Geni
IL-6	**:**	İnterlökin-6
RA	**:**	Romatoid artrit
CRP	**:**	C Reaktif Protein
TNF	**:**	Tümör Nekroz Faktör
VNTR	**:**	Değişken Sayıdaki Ardışık Tekrarlar
SNP	**:**	Single Nucleotid Polymorphism
dNTP	**:**	Deoksiribonükleotit trifosfat
PCR	**:**	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SPSS	**:**	Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi
ESR	**:**	Erythrocyte Sedimentation Rate
ARA	**:**	Amerikan Romatizma Derneği
PİF	**:**	Proksimal İnterfalangial
DİF	**:**	Distal İnterfalangial
MKF	**:**	Metakarpofalangial
MTF	**:**	Metatarsofalangial
ACR	**:**	American College of Rheumatology
CCP	**:**	Siklik sitrülin peptit
KAH	**:**	Koroner Arter Hastalığı
HLA	**:**	Human Leukocyte Antigen

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil II.1 : Sağlıklı İnsana Ait Eklem **6**

Şekil II.2 : Normal Sinovyumun Histolojik Görünümü **8**

Şekil II.3 : Romatoid Sinovyumun Histopatolojik Görünümü ……**8**

Şekil II.4 : El bileği ve El Eklemlerinde Çıplak Alanlar …….**9**

Şekil II.5 : Pannus **9**

Şekil II.6 : IL-1 ve TNF a'nın RA Patogenezindeki Rolü **10**

Şekil II.7 : T Hücresi ile Antijen Sunan Hücre Arasındaki İlişki **11**

Şekil II.8 : T Hücresi ve RA Arasındaki İlişki **12**

Şekil II.9 : RA' da Kemik Kaybı Mekanizması **13**

Şekil II.10 : IL-6 Sinyal Yolağı.....**14**

Şekil III.1. : RA' nın Evreleri **21**

Şekil IV.B.2.1. : - 174 .Bölge Jel Görüntüsü.....**39**

Şekil IV.B.2.2. : - 572 .Bölge Jel Görüntüsü **40**

Şekil IV.B.2.3. : - 597 .Bölge Jel Görüntüsü **41**

Şekil IV.B.2.4. : - 174 .Bölge Genotip ve Allel Frekansları **42**

Şekil IV.B.2.5. : - 572 .Bölge Genotip ve Allel Frekansları **44**

Şekil IV.B.2.6. : - 597 .Bölge Genotip ve Allel Frekansları …… …….. ....**45**

TABLO LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo III.1. **:** ACR Kriterleri **20**

Tablo III.2.A.1 **:** Kullanılan Cihaz Listesi **27**

Tablo III.2.B.1 **:** Kullanılan Primerler ve Özellikleri **28**

Tablo III.2.B.2 **:** Kullanılan Kimyasalların Listesi **30**

Tablo III.2.C.1. **:** Kullanılan Cam ve Diğer Malzemelerin Listesi **31**

Tablo III.3.B.3.1 **:** PCR Reaksiyon İçeriği **34**

Tablo IV.A.1. **:** Çalışmaya Katılan RA ve Kontrol Gruplarının Özellikleri .**38**

Tablo IV.B.2.4 **:** RA Normal Grupları İçinde -174 Genotiplendirmesinin Örnek Sayısı ile % Değerleri **41**

Tablo IV.B.2.5 **:** RA Normal Grupları İçindeki -174 allellerinin örnek Sayısı ile % Değerleri ……...**42**

Tablo IV.B.2.6 **:** RA Normal Grupları İçinde - 572 Genotiplendirmesinin Örnek Sayısı ile % Değerleri ……...**43**

Tablo IV.B.2.7 **:** RA Normal Grupları İçindeki -572 allellerinin örnek Sayısı ile % Değerleri ……...**43**

Tablo IV.B.2.8 **:** RA Normal Grupları İçinde - 597 Genotiplendirmesinin Örnek Sayısı ile % Değerleri **44**

Tablo IV.B.2.9 **:** RA Normal Grupları İçindeki -597 allellerinin örnek Sayısı ile % Değerleri……**45**

BÖLÜM I

I.1. Giriş ve Amaç

Eklemlerde inflamasyon (şişme, hareket zorluğu ve ağrı) ile tanımlanan Romatoid Artrit (RA) hastalığı sık görülen romatizmal hastalıklardan biridir. RA hastalığının görülme sıklığı yaklaşık olarak % 0.3-0.5 olup ülkemizde 200-350.000 arasında RA hastası bulunmaktadır. RA hastalığı genetik ve çevresel faktörlerin etkisi altında eklem bölgelerinde cereyan eden inflamasyon sonrası kıkırdak ve kemik yıkımına bağlı gelişim gösteren sistemik bir hastalıktır. Kronik olarak en sık eklemlerin etkilenmesi sonucu eklemlerde şekil bozukluğuna ve iş kaybına neden olmaktadır.

RA hastalığı erken dönemde gece ve sabahları eklem ağrıları, sabahları 15 dakikayı geçen eklem katılığı, eklemlerde şişme, yorgunluk ve halsizlikle başlar ve hastalık seyri eklemlerde deformasyonla seyreder. RA eklemler dışında solunum yollarını, kardiovasküler ve oküler rahatsızlıkları, cilt ve tükrük/göz yaşı bezlerini etkileyebilir.

Hastalık kadınlarda erkeklere oranla 3 kat, sigara kullanıcılarında sigara kullanmayanlara oranla 4 kat daha sıktır. Birinci dereceden akrabalarda görülen görülme sıklığı % 2-3 iken, tek yumurta ikizlerindeki (monozigotik ikizler) görülme sıklığı yaklaşık % 15-20'dir.

RA hastalığının patogenezinde eklem bölgelerine T ve monosit/makrofaj hücre göçü söz konusudur. Hastalık gelişimi üzerinde etkisi en iyi bilinen iki sitokin, Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF-α) ve İnterlökin-1 (IL-1)'dir. TNF-α inflamasyonun sürekliliğini sağlar, diğer sitokinleri uyarırken, IL-1 kıkırdak ve kemikteki hasardan sorumludur. Bu sitokinlerin aktive olmasında rolü olan bir başka sitokin ise IL-6'dır. IL-6 immün cevap ve inflamasyonu tetikleyen ana aracılardan biridir. Pek çok inflamatuar hastalıkta IL-6 serum seviyesinin yükseldiği gözlenmiştir. Ayrıca IL-6 RA'lı hastalarda serum ve sinoviyal sıvıda artmıştır. IL-6

düzeylerinde inflamasyonla ilişkili değişimlerin bir kısmından IL-6 eksprese eden gende tespit edilen tek nükleotit polimorfizmlerinin (SNP) sorumlu olduğu düşünülmekte ve bu polimorfizmler çeşitli otoimmun hastalıklarda incelenmektedir.

Bu çalışmadaki esas amaç Türk Romatoid Artrit hastalarında IL-6 geni promoter bölgesi -174. , -572. , -597. pozisyonlarındaki SNP lerinin belirlenerek, bu polimorfizmler ile RA hastalığı arasındaki var olabilecek ilişkinin araştırılmasıdır.

BÖLÜM II.

GENEL BİLGİLER

II.1. ROMATOİD ARTRİT HASTALIĞI

Romatoid artrit (RA) hastalığı ilk kez 1859 yılında Garrod 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 gözlemiştir. Bunu takiben bu faktör romatoid faktör (RF) olarak isimlendirilmiştir [1]. Waaler tarafından RF'nin bulunması ve bunu takiben kaydedilen gelişmeler, RA'da otoimmün mekazimaların rolünü açıklamaya çalışır. En sık görülen inflamatuar eklem hastalığı olan Romatoid artrit, dünya nüfusunun % 1'ini etkilemektedir [2]. Romatoid artrit (RA) dünyanın hemen her bölgesinde görülmekle beraber, görülme sıklığı toplumlar arası farklılıklar göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da kadınlarda romatoid artrit görülme sıklığı % 1 civarında olup, erkeklerden 3-4 kat daha sıktır [3,4,5]. Literatürde Çin'in Kinmen adasında romatoid artrit vakası görülme oranı % 0.3 iken, Arizona'daki Pima yerlilerinde % 5.3 gibi yüksek görülme oranlarında yayınlanmıştır [6]. 847 Aborjin üzerinde yapılan bir çalışmada ise, hiç romatoid artrit vakası görülmemiştir [7]. Merkez ve Güney Avrupa'da görülme sıklığı % 0.5 ile % 1 arasında iken, Kuzey Avrupa'da daha yüksektir [8,9]. İsveç'te Goteborg' da yaş ortalaması 79 olan yaşlı popülasyonda romatoid artrit görülme sıklığı % 10'dur [10]. Hastalık görülme oranları her iki cinste yaşla beraber artış göstermektedir. 35 yaşın altındaki popülasyonda % 0,3 iken, 65 yaş üzerinde % 10 dur. Ancak yeni insidans çalışmaları son yıllarda bir düşüş göstermektedir. İngiltere ve Galler'de yapılan bir nüfus çalışmasında kadınlarda yıllık romatoid artrit görülme oranı 1970 ile 1972 ve 1980 ile 1981 yılları arasında her 1000 kişi/yıla göre yılda 3.3 olgudan 2.6 olguya düşmüştür. Bu bulgular son on yıl içerisinde kadınlarda romatoid artrit görülme oranının azaldığını göstermektedir [11].

II.2.ROMATOİD ARTİRİT RİSK FAKTÖRLERİ

Romatoid artrit etiyolojisi henüz tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir. Tek başına veya birlikte, romatoid artrit etiyolojisinde rol oynayan birçok mekanizma vardır. Romatoid artrit için risk faktörlerini belirlerken çevresel ve genetik faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Romatoid artrit etiyolojisinde rolü kanıtlanabilmiş tek çevresel faktör sigara içimi olarak saptanmıştır [12]. Genetik olmayan faktörler büyük ihtimalle artrit oluşumunu tetikleyen başlangıç uyarısını (artritojenik uyarı) yaparlar. Oysa genetik faktörler hastalığın nihai görünümünü belirler. Hastalık kendiliğinden sınırlı, kronik veya eroziv olabilir. Romatoid artritte genetik faktörlerin % 15 oranında, genetik olmayan faktörlerin ise % 85 oranında etkili olduğu tahmin edilmektedir [13].

II.2.1.Genetik Faktörler

Romatoid artrit hastalığının oluşumunda birçok genetik faktörün riski belirlediği düşünülmektedir. Monozigotik ikizlerde romatoid artrit oluşmasının relatif riski, akrabalık ilişkisi olmayanlara göre 12 ile 65 kat daha fazladır. Oysa genlerinin % 50 kadarını paylaşan dizigotik ikizlerde sadece 2-17 kat bir risk artımı söz konusudur. Bu fark romatoid artrit gelişimindeki genetik temele işaret etmektedir [8,13]. Bugüne kadar risk faktörü olarak en iyi belirlenmiş olan gen HLA'dır. HLA genleri immün sistemde antijenlerin T hücrelerine sunulması ve bu hücrelerin aktivasyonlarında rol oynarlar. Ayrıca olgun olmayan T hücrelerinin Timustaki seleksiyonunu da düzenlerler. 1978 yılında yapılan bir çalışmada, HLA-DR ve romatoid artrit arasında genetik bir bağlantı tespit edilmiştir [14]. Aynı çalışmada HLA-DR4 romatoid artrit hastalarında % 70 oranında pozitif iken kontrol hasta grubunda % 28 oranında pozitif olarak bulunmuş ve sonuç olarak HLADR4 pozitif kişilerde romatoid artrit oluşumu için relatif riskinin 4-5 kat olduğu belirtilmiştir [14]. Ancak yeni çalışmalarda HLA ve romatoid artrit arasındaki ilişkinin hastanın gelişiminden ya da diğer bir deyişle sinovite olan yatkınlığından çok, hastalığın şiddeti ve kronikliğe gidiş eğilimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin HLA DRB1 pozitif hastalarda romatoid artritin daha ciddi bir formu olan Felty's sendromu gelişme riski daha yüksektir [15].

II.2.2. Enfeksiyon Ajanları

RA'ya etken olan ajanlar arasında enfeksiyöz nedenler üzerinde de çok durulmakla birlikte, bugüne kadar herhangi bir mikroorganizma ortaya çıkarılamamıştır. Ancak insanlarda birçok bakteri (*Mycoplasma fermantas*, *Proteus mirabilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*), virüs (Retro Virüs, Ebstein- Barr Virüs, İnsan Herpes Virüs Tip 6, Parvovirüs B-19) ve spiroketler (Lyme artriti) poliartrit oluşturabilirler [16-18]. Genetik olarak yatkın kişilerde, mikroorganizmaların meydana getirdiği T hücre reaktivitesindeki küçük değişimler veya mikroorganizmaların girişi ile konakta yeni antijenlerin oluşması hastalığı başlatmak için yeterli olabilir [19].

II.2.3 Cinsiyet , Yaş ve Gebelik

RA, kadınlarda daha sık görülmekte ve daha şiddetli seyretmektedir. Doğum yapmamışlarda RA gelişme riski 2-3 kat daha fazladır. Hamilelikte RA'lı hastalar % 75'e varan oranda iyileşme ve remisyon gösterir. Ancak, hamilelik sonrası olguların % 80-90'ında olay tekrar alevlenmektedir. Östrojenler, T hücrelerinin antijen stimülasyon etkisini baskılar, T hücre supresör aktiviteyi azaltır. Progesteron ise T hücre supresör aktiviteyi arttırır, fakat lenfosit proliferatif etki gösteren antijeni inhibe eder. Testesteron, T hücre supresör aktiviteyi arttırır, fakat sitotoksik hücre aktivitesini inhibe eder. RA'lı hastalarda hipotalamus-pituiter-adrenal (HPA) aksında bir disfonksiyon söz konusudur [16].

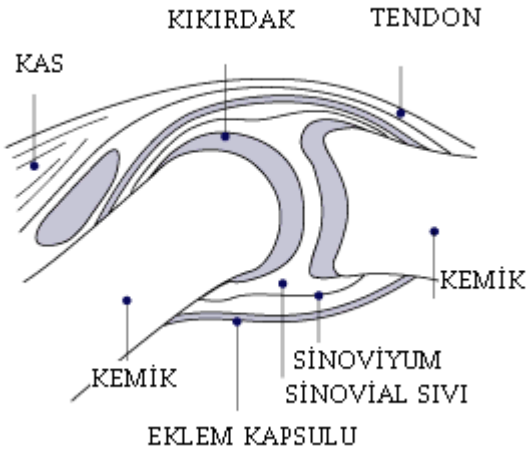
II.3.RA PATOGENEZİ

İnsan vücudunda iskelet sistemi 206 adet kemikten meydana gelmektedir ve kemiklerin fonksiyonel görevini kemikler arasındaki eklemler **(articulatio)** sağlar. Eklemlerin yüzleri genişlemiş ve birbirine kıkırdakla kaplanmış ve dıştan fibröz dokudan yapılmış bir kapsülle sarılmıştır [Şekil II.1]. 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 hiyalin kıkırdaktan oluşan **Fibröz Eklemler,** eklemi yapan kemiklerin bir kıkırdak aracılığıyla birleşmiş olan tipi **Yarı Oynar**

Eklemler, eklemde eklem yüzleri ayrı ayrı hiyalin kıkırdak ile kaplanmış olan oynar eklemler de denen **Sinoviyal Eklemlerdir.**

Eklem kapsülü: Eklemlerin çevresini zarf gibi saran fibröz kapsüldür. Eklem kapsülleri genellikle fibröz bantlarla kuvvetlendirilmiştir. Bunlar ya kapsülün bir parçasıdır **(İnstrik ligamentler)** veya kapsülden ayrı bantlar halindedir **(Ekstrinsik ligamentler).** Bu ligamentler hareketlerin istenmeyen yönlere kaçmasını engellerler. Ligamentler kollajen lif demetlerinden meydana gelmişlerdir.

Eklemlerin Sinir ve Damarları: Sinir uçları eklem kapsülü ve sinovial zarda sonlanır. Sinirler eklemin yüzeyindeki deri ve eklemi hareket ettiren kasların sinirlerinin dallarıdır. Eklem kıkırdaklarının sinirleri ve kan damarları bulunmaz.

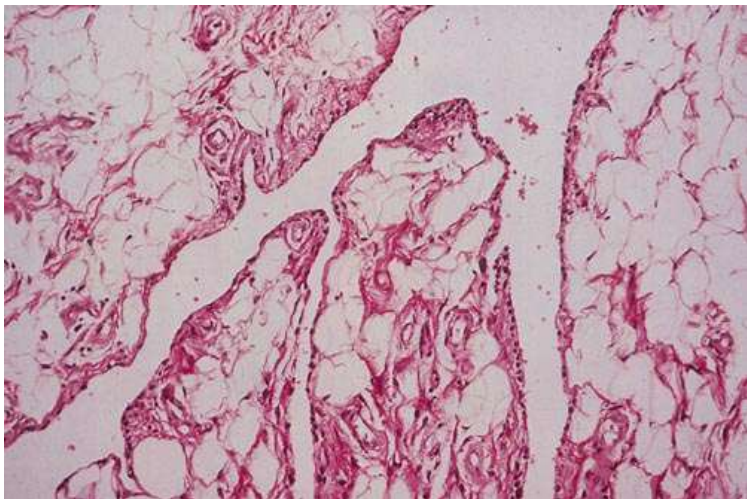


Şekil II .1 : Sağlıklı insana ait eklem
(http://tr.wikidoc.org/index.php/Romatoid_artrit)

Romatoid artrit kronik poliartiküler sinovit, kıkırdak ve kemikte ilerleyici erozyon ile karakterizedir. Fibroblast benzeri sinovistler ve sinoviyal makrofajlar kıkırdak ve kemik hasarının çoğundan sorumludur. Her iki hücre popülasyonu matriks metalloproteinazlar (MMP), IL-1 (İnterlökin-1), TNF-α (Tümör Nekroz Faktörü-α) ve katapsin gibi romatoid artrit patogenezinde önemli rol alan doku yıkımına neden olacak enzimleri üretebilirler [20]. Sinovyumun en önemli fonksiyonu, eklem kıkırdağının beslenmesini sağlayan ve eklemin sürtünmesiz hareketi için kayganlaştırıcı olan sinovial sıvıyı salgılamaktır. 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 ve kemik iliğinden köken alırlar. Fagositoz, antijen sunumu, sitokinler,

büyüme faktörleri ve inhibitörlerinin sentezi ve sekresyonu, birçok inflamatuar mediatörün ve doku yıkımına neden olan enzimlerin üretimi gibi çok sayıda fonksiyonel karakteristikleri vardır. Romatoid artritte makrofajlar intimal, subintimal tabakalarda ve kıkırdak pannus birleşiminde birikirler [20]. Başlıca IL-1 ve TNF-α salgılarlar. Ayrıca yeni kan damarlarının oluşumunda (neoangiogenez) 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. Hyaluronik asit sentezinde rol oynayan Uridin difosfoglukoz dehidrogenaz (UDPGD) üretimini yaparlar. Sitokinler, MMP'ler ve araşidonik asit metabolitleri gibi birçok imflamatuar ve yıkım mediatörlerini sentezleme kapasiteleri vardır. Kıkırdak ve kemik yıkımında birincil etkin rol oynayan hücrelerdir. İkinci hücre katmanı dış hücre tabakası olup, "sublining" olarak adlandırılır göreceli olarak aselülerdir ve kan damarları ve fibroblastlar içeririler [21].

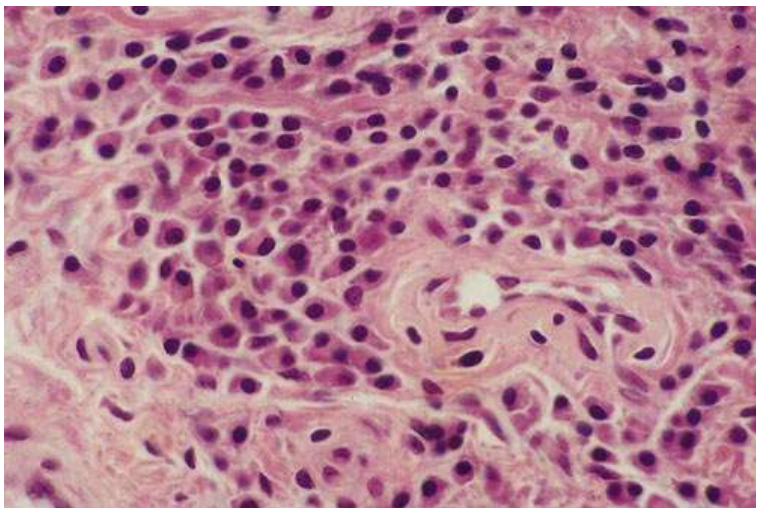
RA'da primer inflamasyon eklem içinde sinovyumda olur. Dolayısıyla primer sinovite yol açan bir hastalıktır. Anotomik olarak, normal sinovya [Şekil II.2] iki kısımdan oluşur. Bunlar eklem aralığına bakan 1-2 hücreden oluşan bazal membransız ince intimal tabaka ve az sayıda hücre ve daha çok damarsal yaplar içeren subintimal tabakadır. Subintimal tabakada daha çok kollojen, glikozaminoglikan ve fibronektin bulunur. İntimal tabakadaki sinovyal hücreler, makrofajlara özgü davranışlara sahiptirler ve T hücrelerinin mediatörleri olarak görev yaparlar. Normal sinovya romatoid sinovyaya döndüğünde hücreler allojenik T hücre aktivasyonunda son derece etkili olurlar [21].



Şekil II. 2: Normal sinovyumun histolojik görünümü

(www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/tez_ichastaliklari.asp - 50k)

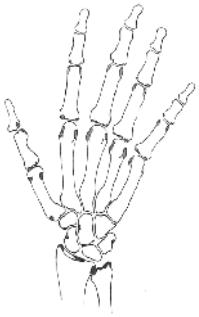
Romatoid sinovyumda [Şekil II.3] ilk olarak sinovyal mikrodolaşımda tıkanma, hücre şişmesi ve hücreler arası mesafede artış görülür. Önce T hücrelerinin ağırlıkta olduğu bir hücre artışı olur. Sonraları makrofaj ve dentritik hücre akını ve bunların salgıladığı sitokinlerde artış olur. Neticede inflamasyon artar, sinovyum hipertrofik bir hale gelir ve yavaş yavaş kıkırdağı aşındırmaya başlar. Sinovyal hücrelerde artmış inflamasyon ve bunlara bağlı olarak prolifere olmuş sinovyal oluşumlara pannus denir. Eklem anatomisinin bozulmasında ve hastalığın yol açtığı deformitelerin oluşmasında pannüsler önemli rol oynar. Romatoid sinovyum ve pannusun önemli bir diğer özelliği de yeni damar oluşumudur. Burada bulunan makrofaj, fibroblast ve lenfosit gibi çeşitli hücreler anjiogenezde rol oynarlar. Tedavide kullanılan non steroid anti inflamatuar ilaçların, steroidlerin ve ikinci basamak ilaçların anjiogenezi inhibe ettikleri anlaşılmıştır [22].



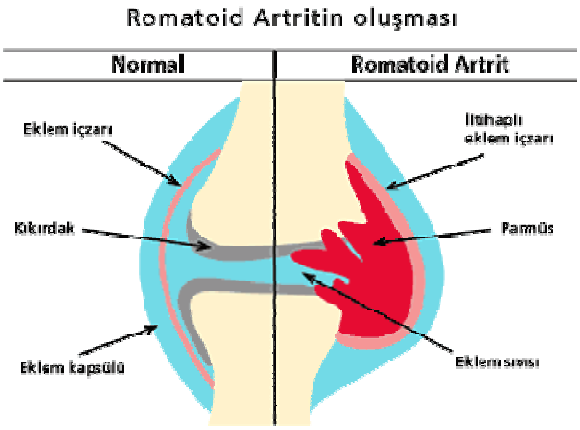
Şekil II. 3 : Romatoid sinovyumun histopatalojik görünümü

II.3.1.Pannus

Eklem kıkırdağı, subkondral kemiği sinoviyal invazyondan ve sinoviya tarafından salgılanan bir takım inflamatuar maddelerin yıkıcı etkilerinden koruyan bir bariyer olarak görev yapar. Eklem kıkırdağı ve sinoviyum arasında yer alan "çıplak alanlar" hipertrofik sinoviyumun yıkıcı etkilerinden korunamaz.



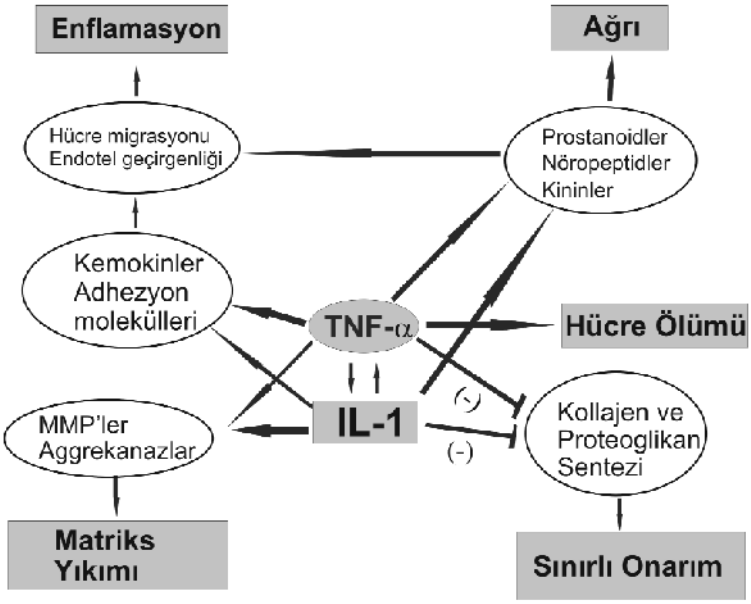
Şekil II. 4: El bileği ve el kemiklerinde "çıplak alanlar" [23].



Şekil II.5 : Pannus

Romatoid sinovyumun 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. Bu enzimler fibroblast benzeri Tip B hücreler tarafından salgılanan metalloproteinazlar (kolajenaz -1, kolajenaz-2, stromelysin) ve makrofaj benzeri (Tip A) ve fibroblast benzeri (Tip B) hücreler tarafından sentezlenen serin, sistin (katepsin-B) proteazlardır [24]. Pannustaki sitokinler IL-1, IL-6, ve TNF-α olup, pannositlerin (fibroblast benzeri sinoviyal hücre) çoğalmasına, kondrosit matriks üretiminin azalmasına ve metalloproteinaz üretiminin artışına neden olur. Polimorfonükleer hücreleri ortama çeken IL-8 veya T-hücre aktivasyonu yapan IL-15 gibi diğer sitokinler, inflamatuar cevabın oluşmasında etkili olurlar. Romatoid artritte proteinazlar ve inhibitörleri arasındaki denge, eklem yıkımına neden olan proteinazlar lehine bozulmuştur [25].

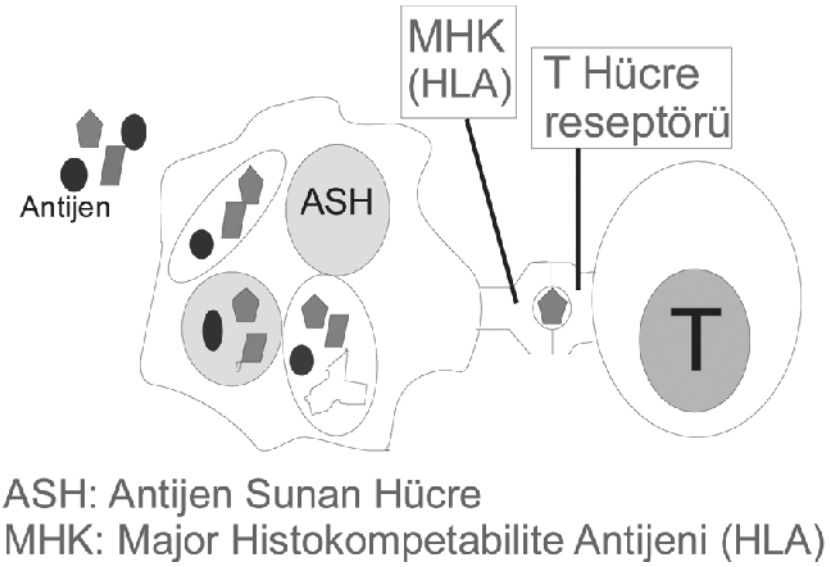
MMP'lerin kıkırdak ve kemiğin matriks yapısını yıkma özellikleri vardır. Inflamatuar pannus kapsüler sınıra dayandığında komşu kıkırdak ve kemikte harabiyet meydana gelir. Bu durum radyolojik incelemede, romatoid artrit için tipik olan marjinal erozyon şeklinde görülür. Sitokinler, nitrik oksit ve prostaglandinler gibi inflamatuar maddelerin etkileri sonucu eklem kıkırdağında incelme görülür.



Şekil II. 6 : IL-1 ve TNF-α' nın romatoid artrit patogenezindeki rolünün şematik olarak gösterimi [26].

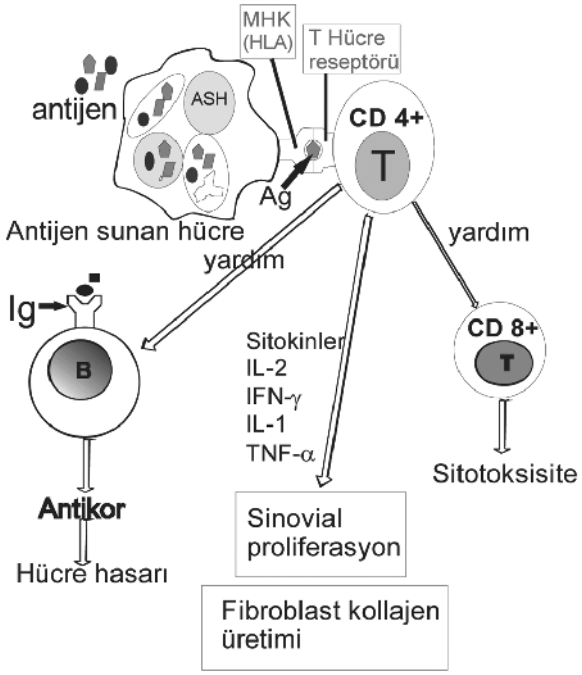
II.3.2. İmmün Sistem (Bağışıklık Sistemi)

Sinoviumun lenfositik infiltrasyonu, dolaşımdaki immün kompleksler (klasik romatoid faktör antikorları gibi) ve lenfositlerin poliklonal aktivasyonları immün sistemdeki anormal bir aktiviteye işaret ederler. T hücreleri, B hücreleri, makrofaj benzeri hücreler, mast hücreleri ve endotelyal hücreler, romatoid artritli hastanın inflamatuar sinoviasında bulunur. T hücreleri, makrofaj ve makrofaj benzeri hücreler olan antijen-sunan-hücrelerin yüzeylerinde bulunan antijeni tanırlar.



Şekil II.7 : T Hücre ile antijen sunan hücre arasındaki ilişkinin şematik olarak gösterimi

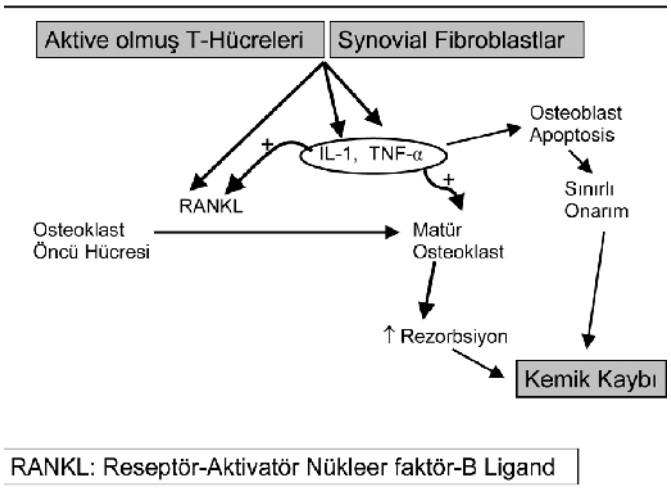
T hücrelerinin romatoid artrit patogenezinde kritik önemi vardır. Romatoid artrit patogenezini açıklayan bir hipotezde; romatoid artritin antijenler tarafından yürütülen ve T hücre bağımlı bir hastalık olduğu ve inflamatuar olayların CD4+ T hücrelerinin sinoviyal dokudaki antijenleri tanımaları sonucu başlatlatıldığı öne sürülmüştür. Ancak farklı romatoid artrit hastalarının sinoviyalarında özel ve ortak bir antijene rastlanmamıştır [27]. Başka bir hipotezde ise bir lenfoproliferasyonun anomalisi ile periferik tolerans mekanizmasının bozulması ve sonuçta T hücre homeostazındaki bozulmanın hastalığı tetiklediği öne sürülmüştür [28]. Buna göre romatoid artrit hastalarında immün sistem, kendi kendine aktivite kazanan fazla sayıda fonksiyone T hücresi içermektedir [Şekil II.8] .



Şekil II.8 : T hücresi ve RA arasındaki ilişki.

II.3.3.Kemik Patolojisi :

Kemik döngüsü, kemik yapan (osteoblastlar) ve yıkan (osteoklastlar) hücreler arasındaki dengeye bağlıdır. Romatoid artritte enflamasyon, inflamatuar sitokinler aracılığıyla osteoklastik kemik yıkımını arttırır. Enflamasyon osteoklastların periferik kandan gelmelerini, maturasyon hızlarını ve aktivite seviyelerini arttırır. Osteoklastik farklılaşma için etkili olan faktörlerden, Reseptör-Aktivatör Nükleer faktör- B Ligand (RANKL), IL-1, ve TNF-α romatoid sinoviyumda bulunmuştur [29]. RANKL osteoklastik farklılaşmada önemli role sahiptir. IL-1 ve TNF-α, RANKL üretimini artırırlar. Romatoid sinovyumda fibroblastlar ve aktif T hücreleri, RANKL sentezlerler ve bu şekilde osteoklast migrasyonu ve aktivitesini arttırırlar. IL-1 osteoklastların aktivasyonunu ve TNF-α erken osteoklast öncüllerinin farklılaşmasını uyarır. IL-1 ve TNF- α osteoklast çoğalması ve farklılaşmasında önemlidir ve her iki faktör de osteoblast apopitozunu artırarak yeni kemik yapımını engellerler [30].



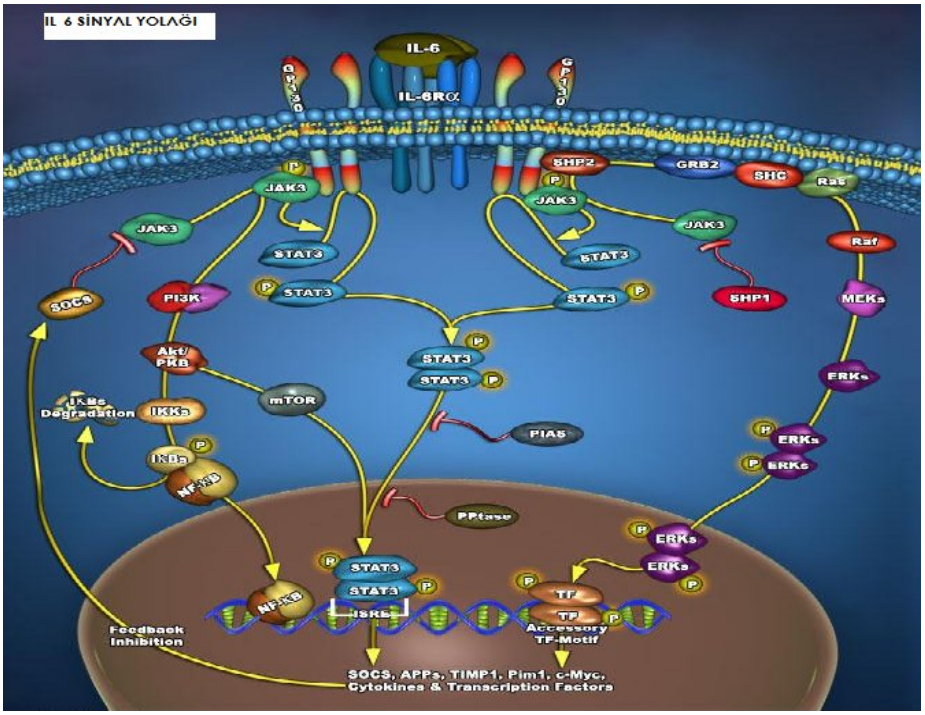
Şekil II.9 :RA da kemik kaybı mekanizması

II.4. İnterlökin-6 (IL-6) Geni

Sitokinler, doğal ve spesifik immunütenin bir protein aracı grubudur. Genelde sitokinler bir inflamatuar veya antijenik etkileşime yanıt olarak sentezlenir. Sitokinler lenfositlerin olgunlaşıp diferansiye olmalarını sağlarlar. Dokuya zarar verebilirler, hatta ölüme kadar (dokunun ölümü) götürebilirler. Kökenlerine göre sitokinler üç gruba ayrılabilir. Bunlardan birincisi, mononüklear fagositlerden köken alan **monokinler**, ikinci bir grup ise lenfositlerden köken alan **lenfokinler**, üçüncü grup ise lökositlerden köken alan **interlökin** grubu sitokinlerdir. Fonksiyonel olarak sitokinler sınıflandırıldığında infeksiyoz ajanlara karşı genelde mononükleer hücreler tarafından sentezlenen **doğal immünite sitokinleri** (TNF, IL-1, IL-12, IFN, IL-10, IL-6, IL-15, IL-8) ve yabancı antijenlerin spesifik tanımlanması sonrası cevapta genelde T lenfositleri tarafından sentezlenen **adaptif immünite sitokinleri** olarak sınıflandırılabilirler. Travma veya enflamasyonlu bölgede makrofaj ve monositlerden salınan bir sitokin olan interlökin-1 (IL-1) isimli polipeptid cerrahiden sonra gelişen bir çok değişiklikten sorumlu bulunmuştur. Bu maddenin başta immun yanıt ve doku tamiri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir [31]. IL-1 ve TNF-α, akut ve kronik inflamasyonun birçok lokal ve sistemik özelliklerinin oluşumunda rol oynamaktadır. Düşük dozlarda lokal inflamasyonun mediatörleri iken, yüksek miktarlarda salgılandıklarında dolaşıma geçerek endokrin etkiler oluştururlar [32,33]. İnflamatuvar, infeksiyöz ve otoimmün bir hastalıkta serum IL-6 yükselmesi, TNF-α veya IL-1β yükselmesinden daha tutarlıdır. Serum IL-6 seviyesi, yaralanmanın

şiddetini yansıtır, bütün sitokinler arasında ve kısmen sepsiste en güvenilir prognostik göstergedir [34].

İnterlökin-6 (IL-6) 7p21 yerleşimli IL-6 geni tarafından eksprese edilen proinflamatuar bir sitokindir. Doğal ve adaptif immünitede yer alır. İnflamasyon, vücut savunması, doku onarımı, glukoz ve yağ metabolizmasında yer alır. Mononükleer fagositler, adipositler, immün hücreler, miyositler ve fibroblastlardan salgılanır. IL- 6 tipi sitokinler sinyallerini gp130 (Glikoprotein), JAK /STAT yolağını kullanarak iletirler [35,36].



Şekil II.10 : IL-6 Sinyal Yolağı

http://www.ambion.com/tools/pathway/protein_list IL-6 pathway

II.5 . IL-6 ve ROMATOİD ARTRİT HASTALIĞI İLİŞKİSİ

RA hastalığı kemik erozyonu, kıkırdak degredasyonu ve ekleme yakın bölgedeki tendonda inflamasyon şeklinde cereyan eder [37]. RA hastalarının eklemlerinde pro/anti inflammatuar sitokinlerin (IL-1, IL-17, TNF, IL-6) arttığı belirlenmiştir [38,39]. Osteoklastlar insan yaşamı boyunca kemik modellenmesinde önem taşıyan hücreler olup proton/protein salımı etkileri ile kemik matriksindeki Ca çözünürlüğüne ve matriks metalloproteinaz ile matriksi ve Katapsin K'nin kollajen

tip I'i degrede etmesi ile de kemikleri şekillendirmektedirler [40]. RA hasta sinoviyal sıvılarında monosit ve makrofaj hücrelerinin uygun sinyal ile osteoklastlara dönüşebildikleri belirlenmiştir [41]. Bu uyarıcılar arasında T lenfositlerinden salınan RANKL ve IL-17 bulunmaktadır [42]. Ayrıca RA hasta sinoviyal dokularında IL-1, IL-6, IL-17 ve TNF- α'nın RANKL ekspresyonuna neden olduğu da saptanmıştır [43].

Kemik ve eklemlerde yıkıma neden olan matriks metalloproteinazların üretiminin IL-6 ile IL-1'in beraber etkileşimi sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir [44]. Ayrıca RA hastalarında hem IL-6, hem de IL-6 reseptör düzeylerinin sinoviyal sıvıda ve eklem bölgelerinde yüksek olduğu saptanmıştır [45]. IL-6 geni olmayan (knock-out) fareler üzerinde yapılan deneylerde eklemlerde şişme ve histolojik lezyon oluşumunun engellendiği ve IL-6'nın farelere enjekte edilmesi sonucu bu knock-out farelerde artrit geliştiği tespit edilmiştir [46]. Bir başka hayvan modeli olan kollajene dayalı artriti olan IL-6 geni yok edilmiş farelerde de doku hasarı ve inflamasyon hücrelerinin eklemlere göç etmesinin engellendiği belirlenmiştir [47].

IL-6'nın RA gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi sonucu IL-6'nın eklem bölgelerindeki etkisini azaltmak üzere IL-6R bloklanması yöntemine gidilmiştir [48]. Tocilizumab humanize edilmiş murin bir anti-insan IL-6R antikoru olup bu yönde geliştirilen ilk ilaçtır. Hem IL-6R'ne, hem de sIL-6R'a bağlanarak IL-6'nın kendi reseptörüne bağlanmasını engellemektedir. Tocilizumab'ın CRP ve fibrinojenin serum seviyelerini azaltması ve eklem inflamasyonunu önlemesi ilacın RA tedavisinde kullanımına yol açmıştır [49]. Tocilizumab RA hastalarına farklı dozlarda verildiğinde (4-8 mg/kg/ay) hastalık aktivitesi baskılanmış ve serum inflamasyon göstergeleri düşmüştür [50].

Konak savunmasında inflamasyon, hematopoez ve onkogenezi düzenleyen pleiotropik bir sitokin olan IL-6, periferal mononüklear hücrelerin mitojen veya antijen ile uyarılması sonucu kültür ortamında saptanan bir B hücre farklılaşma faktörü olarak bilinmektedir [51,52]. T, B hücreleri, monosit ve fibroblast hücrelerde eksprese olan IL-6 [53] biyolojik fonksiyonlarını hepatosit, monosit, makrofaj ve lenfosit hücre yüzeyindeki IL-6 Reseptörüne bağlanarak gerçekleştirir [54]. IL-6'nın biyolojik faaliyetleri arasında akut faz proteinleri olan C-Reaktif Protein (CRP) ve Serum Amiloid A'nın (SAA) karaciğerden salınımını uyarma [55], T hücre aktivasyonu ve farklılaşması ile makrofaj [56] ve osteoklast farklılaşmasını düzenleme bulunmaktadır [40]. Ayrıca osteoklastlar IL-6 kemik absorpsiyonunu *in*

vitro olarak arttırmaktadır [57]. Çok çeşitli biyolojik fonksiyonları olan IL-6'nın immün, inflamasyon, hemopoez, aterogenez ve çeşitli endokrin ve metabolik hastalık bozukluklarında rol oynadığı tespit edilmiştir [58]. Otoimmün hastalık gelişiminde de IL-6 üretiminin düzenlenmesi önemlidir [59], Crohn hastalığı [60], Castleman hastalığı [61], SJİA [62], miyeloma [63], RA [64], AIDS [65], Osteoporoz [66], Sepsis [67], gibi inflamatuar ve otoimmün hastalıklarda IL-6 seviyesi yüksek olarak tespit edilmiştir. Yüksek IL-6 kollajene bağlı Artrit [68], SLE [69], inflamatuar barsak hastalığında da [70] belirlenmiştir. IL-6 seviyesinin düzenlenmesi üzerinde IL-6 eksprese eden gende belirlenmiş olan polimorfizmlerin etkili olduğu düşünülmektedir. IL-6 geninin promotör bölgelerindeki -174 [71], -572. ve -597, [72], nükleotidlerde tek nükleotit polimorfizmlerin varlığı tespit edilmiştir. Ancak bir çalışmada juvenil idiopatik artrit ile IL-6 -174 ilişkili bulunmamıştır [73], *İn vitro* IL-6 -174 CC genotipi IL-6 promotör aktivitesini ve *in vivo* IL-6 seviyesini düşürmektedir [74]. IL-6 -174 RA'ya eğilim artırmamaktadır, ama erken yaşta başlayan RA ile ilişki gözlenmiştir [75].

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

III.1. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

III.1.A. Klinik Çalışmalar

Marmara Üniversitesi Araştırma Hastanesi'nin Romatoloji Bölümü'ne başvuran ve aşağıda belirtilen testler doğrultusunda tespit edilen 178 kişi Romatoid Artrit hasta grubunu ve Romatoid Artrit hastalığı tespit edilmeyen 248 kişi de kontrol grubunu oluşturmuştur. 426 kişinin venöz damarlarından alınan 2 cc kan EDTA' lı tüpe alınmıştır. Bu kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır.

III.1. A.1. Tanı ve Klinik Öykü

Kronik bir hastalığın tanısı (RA gibi) ve kendi sınırlı veya farklı sonlanım noktalarına sahip diğer durumlardan 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 semptom, bulgu, laboratuar verileri ve radyolojik bulgulara dayanmaktadır.

RA'nın klinik belirtileri oldukça değişkendir. Tipik olarak hastalık sinsice başlar, semptomların haftalar ile aylar içinde yavaşça ilerlemesi ile karakterizedir. Daha az olarak akut başlangıçlıdır ve genellikle poliartikülerdir. İki elin metakarpofalengeal (MCP) ve proksimal interfalengeal (PIP) eklemlerinin etkilendiği simetrik poliartrit, en karakteristik erken dönem klinik özelliktir. Eklemlerde şişlikle birlikte katılık, sıcaklık, duyarlılık ve ağrı vardır ve karakteristik olarak sabah semptomları artma gösterir. Ödem ve sinoviyum proliferasyonu mekanik olarak eklem hareketlerini bozmaları nedeniyle katılığa katkıda bulunurlar.

Tutulan eklem sayısı oldukça değişkendir, fakat süreç çoğunlukla sonunda poliartiküler şekle dönüşür. Hemen hemen her eklem etkilenebilir, ama çevresel eklemlerin tutulması, servikal vertebra hariç aksiyel iskeletin ise etkilenmemesi beklenir. En sık tutulan eklemler olarak ellerde PIP, MCP eklemleri, el bilekleri,

dirsekler, ayak bilekleri, metalsofalengeal (eklemler ve temporomandibular eklemler) sayılabilir. Omuz, kalça, sternoklavikular ve krikoaritenoid eklem tutulumuna daha az rastlanır [99].

RA, esas olarak eklem tutulum bulguları ile ortaya çıkmasına karşın, sistemik inflamatuar 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.

RA için sınıflama kriterleri, epidemiyolojik çalışmalar ve klinik araştırmalar için kılavuz olmak üzere ilk 1956 yılında American College of Rheumatology (ACR) tarafından tasarlanmış ve 1987 yılında revize edilmiştir. Kriterlerin esas oluşturulma amacı hastalığın klinik tanısı değildir. Başlangıçta RA için tanısal kriterleri dolduran hastalık özellikleri zaman içerisinde diğer bağ dokusu hastalıkları veya diğer inflamatuar artrit şekillerine dönüşebilir veya farklılaşabilir.

1. Sabah sertliği (en az 1 saat)
2.Üç veya daha fazla eklemde yumuşak doku şişliği ve sıvı ile karakterize artrit
3.El eklem Artriti (el bileği, MCP veya PIP eklemlerinden en az birinde tutulum)
4.Simetrik artrit (Vücudun her iki tarafında ve eklemlerde görülen şişlik)
5.Romatoid subkutan nodüller
6.Pozitif serum romatoid faktör
7.Romatoid Artrit için tipik radyolojik değişiklikler

Tablo III.1: ACR Kriterleri

Kriterlerden en az 4 tanesinin bulunması ve hastanın yakınmalarının 6 haftadır devam ediyor olması tanı koydurucudur [100].

III.1. A.2. Fiziki Muayene

Ağrı ve şişlik, RA lı eklemlerdeki anahtar özelliklerdir. Şişkinlik, sinoviyal hipertrofi (şişkin olan eklemde hamur kıvamı alınması) veya sinoviyal hücre birikimine bağlı olabilir. Bu bulgu el ve ayakların küçük eklemlerinde en belirgindir ve proksimal falanksların proksimal uç anahatlarını seçilmez hale getirebilir. Efüzyon şişliğe katkıda bulunduğunda ve eklem basıncı fleksiyonda arttığında sinovyumun bir kısmı hapsedilerek eklemin geri kısmından ayrılarak bir kist oluşturur. Birçok periferal eklemde kist görülebilir, ama en sık bilineni dizdedir (Baker kisti). Pasif harekette ağrı ve duyarlılık, inflamasyonu gösteren hassas bulgulardır. Gözle görülebilen değişiklikler arasında, parmak eklemlerinde hiperflaksiyon, hiperekstansiyon, volar subluksasyon, unlar, deviasyon, halluks valgus ve çekiç parmak sayılabilir. Bu değişiklikler hastalığı 10 yıldan fazla süren hastaların çoğunda oluşur [101]. Karakteristik eklem deformiteleri hastalığın geç dönem belirtileridir [Şekil.III.1] ve fiziksel zorlanma ve tutulan eklemin yerel anatomisinden kayanaklanır. RA'lı hastaların %10 undan fazlasında hastalığın ilk iki yılı içerisinde el küçük eklemlerinde deformite gelişmektedir ve zaman içerisinde bu deformiteler en az üçte birine ulaşır [102]. RA'lı hastaların yaklaşık %30 unda, genellikle hastalık yerleştikten sonra cilt altı nodülleri oluşur.



Şekil .III.1. RA Evreleri

http://bsknees.blogspot.com/2008/02/difference-between-rheumatoid arthritis.html

III.1.A.3. Laboratuar Testleri

RA tanısı koymak için hiçbir test gerekli değildir ve belli hastalarda bütün labortuar testleri normal olabilir. Rutin testlar sıklıkla RA için karakteristik değildir ve özgüllükleri yoktur, ancak, bir bireyde belirli laboratuar verileri RA tanısı koymaya ve hastalık şiddetini değerlendirmeye katkıda bulunabilir.

Romatoid faktör (RF)'ün IgG'nin Fc fragmanına bağlanan bir antikor olduğu tesbit edilmiştir. RA'lı hastaların serumlarında %70-80 oranında saptanabilir, ama erken evre hastalıkta olmayabilir. RF yapımının RA ile patolojik ilgisinin olup olmadığı açık değildir, çünkü sistemik lupus eritematozus, Sjögren sendromu, endokardit, sarkoidoz, hepatit B ve C'yi içeren karaciğer hastalıkları bulunan bireylerde ve diğer durumlarda görülebilmektedir [103].

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 eder.

Siklik sitrülin peptitlere karşı antikorlar (anti CCP) RA için daha özgül belirteç olarak tanımlanmıştır. Anti-CCP antikorları enzime bağlı immonusorbent yöntemiyle saptanmaktadır ve RF den daha yüksek özgüllüğe (>%95) ancak benzer duyarlılığa (%68-80) sahiptir [104]. Klinik RA gelişiminden birkaç yıl öncesinde (ve de romatoid faktör gelişiminden önce) saptanabilen bu antikorlar RF negatif Artritli (seronegatif) hastalarda RA tanısı konulmasında yararlı olabilirler. Bu antikorlar radyografik eklem hasarı ve kötü prognoz gibi daha ciddi sonlanma noktalarına da işaret edebilirler [105,106].

Anti CCP antikorları RA için yüksek özgüllüğe sahip olduklarından RA'yı RF'nin pozitif bulunduğu diğer hastalıklardan (Sjörgen, infeksiyon, hepatit gibi) ayırmada yardımcı olabilir. Eritrosit sedimantasyon 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 osteoartritveya fibromiyalji gibi iltihabi olmayan nedenlerden ayırt etmede yararlıdır. Ancak önemli sayıda RA'lı hastada klinik olarak eklemlerde iltihap bulguları olmasına rağmen bu testler normaldir. Anti- nükleer antikorlar (ANA), RA'lı hastaların %20-40'ında saptanabilir, bunlar genellikle eklem dışı bulguları olan ve yüksek titrede RF'si olan hastalardır.

III.1.A.4. Radyoloji

Romatoid Artrit apendiküler iskeletin simetrik poliartiküler hastalığıdır. Romatoid Artritli hastaların radyolojik incelemesi hastalığın tanısı takibi tedaviye cevabı ve cerrahinin gerekliliğinin değerlendirilmesinde önemlidir [107,108]. Direkt grafilerdeki yumuşak doku anormallikleri, inflamasyon, şişlik, yumuşak doku planlarının kaybı ve eklem efüzyonu şeklindedir. Genel veya periartiküler osteopeni görülebilir [109]. Eklem yıkımının bulguları, osseoz erozyonlar, eklem aralığının daralması, ankiloz ve dizilim bozukluğudur. Erozyon kortikal kemik kaybına işaret eder ve sinovyumun kemiğe yaklaştığı ve de kıkırdağın olmadığı çıplak alanlardan başlar [110]. Bu marjinal erozyonlar zamanla subkondral kemiğin altına ilerler. Erozyonların radyolojik bulguları hemen hemen 5 yıldan uzun süreli takibi olan her hastada görülür ve erozyondaki ilerlemede 20 yıla kadar sürer [111,112]. Başlangıçtaki yıkım değişiklikleri temel olarak elin küçük eklemlerinde görülür, bunu dizler, kalçalar, servikal omurga, omuzlar ve dirsekler azalan bir sırayla takip eder [113]. Dizler Romatoid artritli hastaların % 90' ında tutulmuştur [114]. Dizlerin bileteral ve simetrik tutulumu sıklıkla her üç kompartmanın yıkımı ile beraber görülür. OsteoArtritte görülen yeni kemik oluşumları, değişimler sero pozitif RA hastalarında ciddi kıkırdak kaybına rağmen görülmez. Bu bulgu romatoid Artritin osteoArtritten ayrılmasına yardımcı olur. Marjinal kemik erozyonları ve kemik içi kistler Romatoid artrittte sıklıkla görülür [115].

III.1.B. Moleküler Genetik Yöntemler

III.1.B. 1. Denek Kanlarından Genomik DNA İzolasyonu

İnsan genomik DNA'sı 3 x 10^9 nukleotid uzunluğundadır. Genomik DNA nükleusu bulunan bütün hücrelerde bulunur ve bu hücreler genomik DNA analizleri için kullanılabilir. Örneğin; prenatal tanı için amniyotik sıvıdaki fetal hücrelerden veya koryonik hücrelerde genomik DNA elde edilebilir. Erişkinlerde periferal kandaki lökositler en kolay ulaşılabilen DNA kaynağıdır. EDTA'lı tüplere alınan 10 ml kan yaklaşık olarak 10^8 beyaz kan hücresi içerir ve bu miktar hücreden elde edilecek genomik DNA pek çok genetik test için yeterlidir. DNA izolasyonu için pek çok metod vardır. Geleneksel izolasyon yöntemlerinin yanında pek çok firma tarafından üretilen DNA izolasyon kitleri DNA izolasyonunda kullanılmaktadır. Kandan genomik DNA izolasyonu fiziksel ve kimyasal yöntemlerden oluşur.

Genomik DNA izolasyonu lökositlerin diğer kan hücrelerinden uzaklaştırılması ile başlar. Lökositlere ulaşıldıktan sonra kimyasal yöntemler ile lökosit hücrelerinin hücre zarlarının patlatılması, ardından da hücre artıkları ve proteinlerin çökertilmesi işlemleri gerçekleştirilir. Genomik DNA'nın saflaştırılması ve Tris-EDTA (TE) içinde saklanması ile tamamlanır.

III.1.B.2. Genomik DNA'ların Absorbanslarının Ölçülmesi

Genomik DNA'ların moleküler incelemelerde kullanılabilmesi öncesi varlık, miktar ve kalitesinin belirlenmesi için UV spektrofotometresinde ölçüm yapılır. UV spektrofotometresinde ölçüm yapılırken DNA'daki heterosiklik halkalar 260 nm dalga boyunda en fazla ışın emdiğinden bu dalga boyunda ölçüm yapılarak genomik DNA'nın miktarı belirlenir.

İzole edilen genomik DNA miktar tayininin ardından DNA'nın proteinlerden ne derece izole edildiğini belirlemek için de UV spektrofotometresi kullanılır. Proteinler yapısındaki trozin, triptofan ve fenilalanin gibi aminoasitlerin yapısından dolayı 280 nm dalga boyunda maximum absorbsiyon göstermektedir. DNA'nın kalitesinin tespiti için hem 280 hem 260 nm dalga boyunda ölçülüp A_{260}/A_{280} absorbans değeri belirlenir. Protein kontaminasyonu düşük olan DNA'lar için bu değer 1.5-2.0 civarında olması gerekmektedir. Bu orantıda elde edilen rakamsal ifadenin altındaki durumlarda protein kontaminasyonunun yüksekliği söz konusudur.

III.1.B.3 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR (Polymerase chain reaction) ya da polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. PCR, bir çeşit "in vitro çoğaltma"dır. PCR, reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısıyla birbirinden ayrılması (denatürasyon) daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing); sonra zincirin uzamasını (polimerizasyon) (çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. (sırasıyla 94°C; 37°C-65°C; 72°C). PCR tekniği tek veya çift iplikçikli DNA'yı ; RNA'ya hedef olarak kullanabilir. Bu teknikle; bir DNA hedefini 10^6-10^{12} arasında çoğaltmak mümkündür.

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 genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR Teknolojisi için:

1) DNA örneği, genelde genomik DNA,
2) Çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer,
3) dNTP'ler (A,T,C,G),
4) Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi (sıcak sularda yaşayan bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilir)
5) Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı gereklidir.

III.1.B.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Analizi

Agaroz jel elektroforezi, PCR ürünlerinin uzunluklarına göre jel içinde yaratılan elektrik alanında – elektrottan + elektroda doğru hareket ederek ayrılmasıdır. Jel, agaroz adı verilen kırmızı alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal polisakkaritin iyonik bir tampon içinde yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi ile hazırlanır.

Jelde uzunluklarına göre ayrılan PCR ürünleri jeldeki Etidium Bromür sayesinde UV ışığı altında görüntülenir. Uzunluk ve aralığı bilinen DNA parçaları (Markır) ile kıyaslanarak PCR ürünlerinin uzunlukları tespit edilir.

III.1.B.5. Biyoistatistik Analiz

Belli bir gen polimorfizminin belli bir hastalık üzerindeki etkisinin incelendiği epidemolojik çalışmalarda hasta ve kontrollerin genetik analizlerinden elde edilen allel ve genotiplerin frekansları hesaplanıp, hastalık için risk faktörü olarak değerlendirilen etkenler ile ilişkisi biyoistatistik analizler ile incelenir. popülasyon içindeki genetik çalışmalarda Hardy-Weinberg Yasası ile sonuçlara ulaşılır. Hardy-Weinberg Yasasına göre dengeli populasyonlarda görülen allellerin frekansları [baskın (+) alleller p ile sembolize edilirken çekinik (-) alleller q ile sembolize edilir] toplamı bire eşittir. Bu populasyonda +/+ genotipinin frekansı (p^2), +/- genotipinin frekansı (2pq) ile -/- genotipinin frekansı (q^2) toplamı bire eşittir. Günümüzde biyoistatistik analizler için Windows tabanlı programlardan Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi (SPSS) kullanılır.

III.2. ARAŞTIRMA ARAÇLARI

III.2.A. Kullanılan Cihazlar

Aşağıdaki tabloda tez çalışmasında kullanılan cihazlar ile ilgili bilgi verilmiştir .

Tablo III.2.A.1: Kullanılan Cihazların Listesi

ADI	FİRMA ADI	KATALOG NUMARASI
PCR aleti	Techne	TC-312
Santrifüj	ThermoIEC	OM3580
Mini agaroz jel elektroforezi sistemi	Thermo	EC320
Midi agaroz jel elektroforezi sistemi	ThermoEC	EC330
Güç Kaynağı	Thermo	EC250-90
Jel Görüntüleme Sistemi	Vılber Lourmat	0516413
Buzdolabı	Arçelik	5005NF
UV Spektrofotometresi	Perkin Elmer	L6020064
Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel	FT280
Etüv	Binder	14D-78532
Otoklav	Systec	2540EL
pH Metre	Hana Instruments	pH211
Hassas tartı	Ohaus	E12140
Manyetik karıştırıcı	Nüve	MK 418
Mikropipet (100-1000µl)	Microlit	03104588
Mikropipet (2-20µl)	Medispec-plus	00020885
Mikropipet (10-100µl)	Medispec-plus	00110422
Mikropipet (100-1000µl)	Finnpipette	4501110
Mikropipet (10-100µl)	Finnpipette	4500110
Mikropipet (0.5-10µl)	Finnpipette	4500010
Vortex	Yellowline	TTS2

III.2.B. Kullanılan Kimyasallar

III.2.B.1.Kullanılan Primerler

Kullanılan Forward ve Revers Primer'ların uzunlukları, Erime sıcaklıkları (Tm), Yüzde Guanin Sitozin (% GC) içerikleri, Moleküler Ağırlıkları ile Optik Densite (OD)'leri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo III.2.B.1.).

IL-6 -174 Reverse Primer: İontek

IL-6 -174 Forward Primer: İontek

Primer Dizileri:

Forward Primer : 5′ AAG GAG TCA CAC ACT CCA CCT G 3′

Reverse Primer : 5′ AGA TTG TGC AAT GTG ACG TCC 3′

Tablo III.2.B.1.: Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Primerler	Uzunluk (baz)	Tm (1M Na^+)	% GC	Moleküler Ağırlık (µg/ µmol)	OD (pmol)
Forward Primer	22	58.7	54.5	6,673.4	3,0
Revers Primer	21	55.7	47.6	6,461.2	3,0

III.2.B.2.DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

Lizis Tamponu: (pH: 7.4)

NH_4Cl: 8.29g

$KHCO_3$: 1g

0.5 M EDTA: 200 µl

Distile su

Beyaz Kan Hücresi Tamponu

SE (Sodyum EDTA) Tampon (pH: 8)

NaCl.: 4.39g

0.5M EDTA: 50ml

Distile su

0.5 M EDTA (Etilen Diamino Tetraasetik Asit) (1L) (pH:8)

EDTA: 186.1g

Distile su

%10 SDS (Sodyumdodosilsülfat) (1000ml)

SDS:100 g

Distile su

7.5 M NH4Ac (Amonyum Asetat) (1000ml)

NH_4Ac: 577.5

Distile su

% 70 Etanol (1L)

700 ml saf etanol

Distile su

TE (Trizma Base EDTA) Tamponu

10mM Trizma base (pH:8)

1mM EDTA (pH: 8)

III.2.B.III. PCR Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

10X Reaksiyon Tamponu 10 mM Tris-HCl (pH: 8.0) **;**50 mM KCl;1 mM EDTA % 0.1 Triton X-100**,**% 50 gliserol

25 mM dNTPs: 100mM dATP / dCTP/ dTTP/ dGTP

III.2.B.IV. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

50X TAE:

242 g Tris-Baz

57.1 ml glasiyel asetik asit

100 ml 0.5 M EDTA

Etidyum Bromür:

0.1 g Etidyum Bromür

10 ml distile su

6X Yükleme tamponu:

%15 Ficoll 400

% 0.25 Xylen Cyanoll

% 0.25 Bromofenol Mavisi

Aşağıdaki tabloda kullanılan kimyasallar ile ilgili bilgi verilmiştir (Tablo III.2.B.2.).

Tablo III.2.B.2.: Kullanılan Kimyasalların Listesi

ADI	**FİRMA ADI**	**KATALOG NUMARASI**
NH_4Cl	Riedel-de Haen	11209
$KHCO_3$	Riedel-de Haen	12602
EDTA	Sigma	E-5134
NaOH	Riedel-de Haen	06203
HCl	Riedel-de Haen	07102
NaCl	Merck	1.06404.1000
Trizma Baz	Sigma	T-6066
NH_4Ac	Fluka	09688
Glasiyel Asetik Asit	Carlo Erba Reagenti	302011
dNTP (deoksi Nükleotit Trifosfat) Mix	Fermentas	#R0192
100bp DNA Markır (0.1µg/µl)	Fermentas	#SM0243
50bp DNA Markır (0.5µg/µl)	Fermentas	#SM0371
Yükleme tamponu (6X)	Fermentas	#R0611
Taq DNA polymerase (5U/µl)	Fermentas	#EP0609
NcoI (10U/µl)	Fermentas	#ER0572
Eco881 (Ava I) (10U/µl)	Fermentas	#ER0381
Taq I (10U/µl)	Fermentas	#ER0671

Etidyum Bromür	Sigma	E7637-1G
Sodyum Dodosil Sülfat	Fluka	71725
Agaroz	Sigma	A5093-500G
Agaroz Low Melting	American Bioanalytical	AB00981-00100

III.2.C. Kullanılan Cam ve Diğer Malzemeler

Kullanılan malzemelerin adları, ait oldukları firma ve katalog numaraları ile üretildikleri ülkeler listelenmiştir (Tablo III.2.C.1.).

Tablo III.2.C.1.: Kullanılan Malzemelerin Listesi

Erlenmayer (100ml)	Isolab	031.01.100
Erlenmayer (250ml)	Isolab	031.01.250
Beher (50ml)	Isolab	033.01.050
Beher (100ml)	Isolab	033.01.100
Beher (600ml)	Isolab	033.01.600
Mezür (50ml)	Isolab	015.02.050
Mezür (100ml)	Isolab	015.02.100
Mezür (500ml)	Isolab	015.02.500
Mezür (1000ml)	Isolab	015.02.910
Kapaklı cam şişe (100ml)	Isolab	063.05.100
Kapaklı cam şişe (250ml)	Isolab	063.05.250
Kapaklı cam şişe (1000ml)	Isolab	063.05.910
Eppendorf (2ml)	Axygen	311-10-051
Mikrotüp (1.5ml)	Axygen	311-08-051
PCR tüpü (0.5ml)	Axygen	321-05-051

PCR tüpü (0.2ml)	Axygen	311-10-051
Portüp (1,5ml epp. İçin)	Thermo	02-2380-1008
Portüp (0.2ml epp. için)	Thermo	RTP/02200
Mikropipet ucu (1-1000µl)	Axygen	301-01-051
Mikropipet ucu (1-200µl)	Axygen	301-02-301
Mikropipet ucu (1-10µl)	Thermo	9400310
Mikropipet ucu kutusu (100-1000µl)	Thermo	9401113
Mikropipet ucu kutusu (10-100µl)	Thermo	9400260
Mikropipet ucu kutusu (1-10µl)	Thermo	9400300
Enjektör (5ml)	Set inject	TS EN ISO 7886-1
Selüloz asetat membran filtre (0.2 µm por çapı)	Orange Scientific	1520012
Selüloz asetat membran filtre (0.45 µm por çapı)	Orange Scientific	1520014
Falkon tüpü (14 ml)	Orange Scientific	2040300
Falkon tüpü (50ml)	Orange Scientific	5540100
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging	PM-996

III.3. YAPILAN ÇALIŞMALAR

III.3.A. Klinik Çalışmalar

III.3.B. Moleküler Genetik Yöntemler

III.3.B.1. Denek Kanlarından Genomik DNA İzolasyonu

Klinik testler sonucu RA olmayan kişilerden ve klinik test sonuçları doğrultusunda RA hastası olduğu tespit edilen hastalardan EDTA'lı tüpe 2-5 ml kan alınmıştır. Venöz kandan genomik DNA izolasyonu aşağıdaki prosedüre tabi tutularak gerçekleştirilmiştir.

1- Steril 2 ml eppendorf içine 1500 µl lizis tamponu ve 500 µl EDTA'lı tüplerdeki kandan alınmış ve 10 dakika tüp alt üst edilerek oda ısısında beklenmiştir.

2- Tüp 10 dakika sonra 13.000 rpm' de 20 saniye santrifüj edilmiştir.

3- Üst sıvı altta 40 µl kalana kadar atılmış ve alt sıvı 2500 devirde vortekslenmiştir.

4- Karışım üzerine 650 µl %10 SES eklenip pipetaj yapılmış, 200µl NH_4Ac eklendikten sonra 2500 devirde vortekslenmiştir.

5- Vorteks edilen örnekler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

6- Steril 2 ml eppendorf içine 850 µl %100 isopropanol konulmuş ve santrifüj sonucu çıkan tüpün üst sıvısı bu eppendorfa aktarılmış ve DNA gözlemlenene kadar tüp alt üst edilmiştir.

7-Tüp 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atıldıktan sonra pellete 300 µl %70'lik etanol eklenmiş ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

8- Üst sıvı döküldükten sonra tüp baş aşağı çevrilerek içindeki etanol kuruyana kadar bekletilmiştir.

9- Etanol kuruyunca pellet üzerine 150 µl TE solusyonu eklenmiş ve tüp 1 gece oda ısısında bekletilmiştir.

10- 1 gece oda ısısında TE solüsyon içinde bekletilen DNA örnekleri ileri safhalarda deneylerde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

III.3.B.2. Genomik DNA'ların Absorbanslarının Ölçülmesi

Absorbansı ölçülecek DNA'lardan 10'ar µl 1.5 ml steril eppendorflar içine konup üzerine 90 µl steril distile su eklenmiş ve vortekslenmiştir. Hazırlanmış olan DNA'ların önce 260 nm dalga boyunda sonra 280 nm dalga boyuna ayarlanan UV spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülmüştür. DNA'ların miktarları aşağıdaki formüle başvurularak ölçülürken, DNA'nın kalitesi A_{260}/ A_{280} bölünmesi ile belirlenmiştir.

DNA miktarı $= A_{260}$ x 50 µg/ ml x Dilüsyon Katsayısı

III.3.B.3. PCR ile Deneklerin IL-6 Promotor Bölgelerinin Çoğaltılması

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin IL-6 promotör bölgesi 174 F ve 174 R primeler ile aşağıda verilmiş olan PCR karışımında aşağıdaki programa göre PCR da çoğaltılmıştır. IL-6 polimorfizmine göre sahip oldukları allelleri belirlemek için yapılan PCR çalışmasında PCR karışımının içeriğini oluşturan steril distile su, 10X Buffer, dNTP, Forward Primer, Revers Primer, Taq Polimeraz, çalışılacak kişinin genomik DNA'sından PCR karışımına eklenen miktarları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo III.3.B.3.1.)

Tablo III.3.B.3.1.: PCR Karışımının İçeriği

	Kokteyl	Tek Kişi İçin PCR Karışımı
Steril distile su	693,9 µl	25,7 µl
10X Buffer	135 µl	5 µl
$MgCl_2$	135 µl	5 µl
dNTP	199,8 µl	7,4 µl
Forward Primer	37,8 µl	1,4 µl
Revers Primer	37,8 µl	1,4 µl
Taq polimeraz	2,7 µl	0,1 µl
DNA	108 µl	4 µl
Toplam hacim	50x27=1350 µl	50 µl

Her denek için yukarda tabloda gösterilen miktarlarda hazırlanan PCR tüpleri aşağıdaki programda PCR aleti içinde yürütülmüş ve program sonunda her kişinin IL-6 Polimorfizmini gösteren gen bölgesi çoğaltılmıştır.

PCR'da yürütülen program

Prelidheat	105 C ^{O}	4 dk	
Predenaturasyon	94 C ^{O}	3 dk	
Denaturasyon	94 C ^{O}	30 sn	35 Döngü
Bağlanma	60 C ^{O}	30 sn	
Uzama	72 C ^{O}	45 sn	
Final Uzaması	72 C ^{O}	10 dk	

Yukarıda belirtilen kondüsyon ile PCR da hasta ve kontrol grunbundan 426 kişinin IL-6 promotör bölgesi çoğaltılmış ve PCR ürünleri % 1 lik 80 ml agaroz jelde yürütülmüştür. Böylece PCR işlemi ile istenilen bölgenin çoğaltılıp, çoğaltılmadığı kontrol edilir .

1.6 gram agaroz 80 ml 1 x TAE içinde kaynatılmış ve 7 µl etidyum bromür eklenmiştir. Jel kasetine tarak geçirilip hazırlanan jel kasete dökülmüştür. Tank 1 x TAE ile doldurulmuş tank içine donan jel konup tarak çıkartılmıştır. İlk kuyucuğa 3 µl DNA markır, diğer kuyucuklara sırası ile 2 µl 6 X yükleme tamponu ile karıştırılan PCR ürünleri yüklenmiş 100 Volta 40 dakika elektroferez yapılmıştır.

III.3.B.4. PCR Ürünlerinin Kesimi

PCR da hasta ve kontrol grunbundan 426 kişinin IL-6 promotör bölgesi çoğaltılmış ve PCR ürünleri % 1 lik 80 ml agaroz jelde yürütülmütür. Çalıştığı kontrol edilen PCR örnekleri aşağıdaki 3 farklı polimorfizm için restriksiyon enzim kesimine tabi tutulmuştur.

III.3.B.4.1: -174 Pozisyonu : Nla III enzmi ile aşağıdaki prosedürü çerçevesinde 37 ° C' de bir gece kesim yapılmıştır.

	Tek Kişilk
Distile Su	16,7 µl
Tampon G	3 µl
NlaIII Enzimi	0,3 µl
PCR Ürünü	10 µl

III.3.B.4.2: -572 Pozisyonu : BsrBI enzmi ile aşağıdaki prosedürü çerçevesinde 37 ° C' bir gece kesim yapılmıştır.

	Tek Kişilk
Distile Su	16,7 µl
Tango Tamponu	3 µl
BsrBI Enzimi	0,3 µl
PCR Ürünü	10 µl

III.3.B.4.1: - 597 Pozisyonu : BseGI enzimi ile aşağıdaki prosedürü çerçevesinde 55 °C' de 5 saat kesim yapılmıştır.

	Tek Kişilk
Distile Su	16,7 µl
Tango Tamponu	3 µl
NlaIII Enzimi	0,3 µl
PCR Ürünü	10 µl

III.3.B.5. Jel Görüntülerinin Alınması

Kesim sonuçları için kesilen PCR ürünleri % 2,5 lik 80 ml agaroz jelde 100 bp markır ile birlikte yüklenmiş 100 V jelde yürütülmüştür. Hem hastaların hemde kontrollerin genotipleri tespit edilmiştir. Elektroforez 40 dakika sonra durdurulup, kaset tanktan çıkartılıp jel görüntüleme cihazının içine yerleştirilmiş ve jel görüntüleri kaydedilmiştir. Elde edilen görüntülerdeki bantların uzunlukları markır ile kıyaslanıp deneklerin IL-6 promotor polimorfizmlerine ait alleleri belirlenmiştir.

III.3.B.6. Biyoistatistik Analiz

Hasta ve sağlıklı kontrollerin IL-6 (- 174 , -572 , - 597) genotipleri jeldeki kesim ürünlerine göre belirlenmiştir. Elde edilen jel görüntülerindeki genotipler SPSS 13.0 programına girilmiştir. Hasta grubunun genotip ve allel frekansları kontrol grubu ile ki kare testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR

IV. A. Klinik Çalışmalar

Çalışmamızda gönüllü olarak katılan RA hastalarının oluşturduğu hasta grubu (n=178) ve sağlıklı kişilerden (n=248) oluşan kontrol grubu bireylerin venöz damarlarından alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Bu kişilerden alınan kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir

Tablo.IV.A.1: Çalışmaya katılan RA ve Kontrol Grubunun Özellikleri

		RA (178)	**Sağlıklı (248)**
Yaş (Ortalama)		49	47
Cinsiyet	**Kadın**	130	160
	Erkek	48	188

IV.B. Moleküler Genetik Yöntemler

IV.B.1 Absorbans ve DNA Miktarları

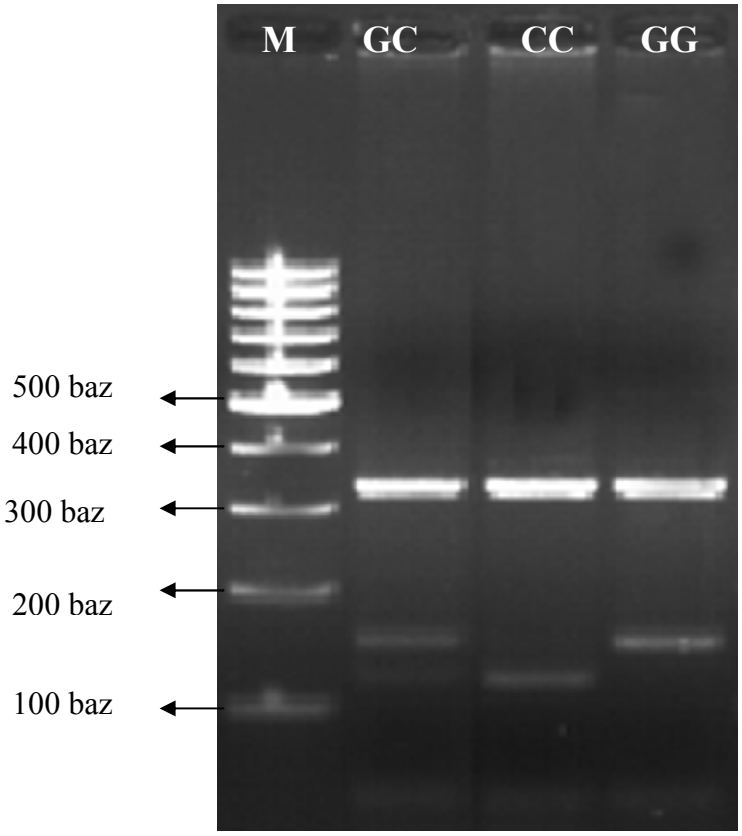
Kandan izole edilen DNA'nın miktarının ve kalitesinin belirlenmesi örnek DNA'ların 260 nm (A260) ve 280 nm (A280) dalga boylarındaki absorbans değerleri spektrofotometrik ölçüm ile değerlendirilmiştir (EK 1).

IV.B.2. IL-6 Promotor Bölgesi Gen Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi

Absorbansları ölçülen 426 kişinin genomik DNA'sı kullanılarak kişilere ait IL-6 geni -174, -572, -597. bölgeleri PCR'da çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünlerinden beklenen polimorfizme ait allellerin çeşitleri, jelde görülen uzunlukları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

IV.B.2.1. – 174 .Bölgenin Genotiplendirilmesi

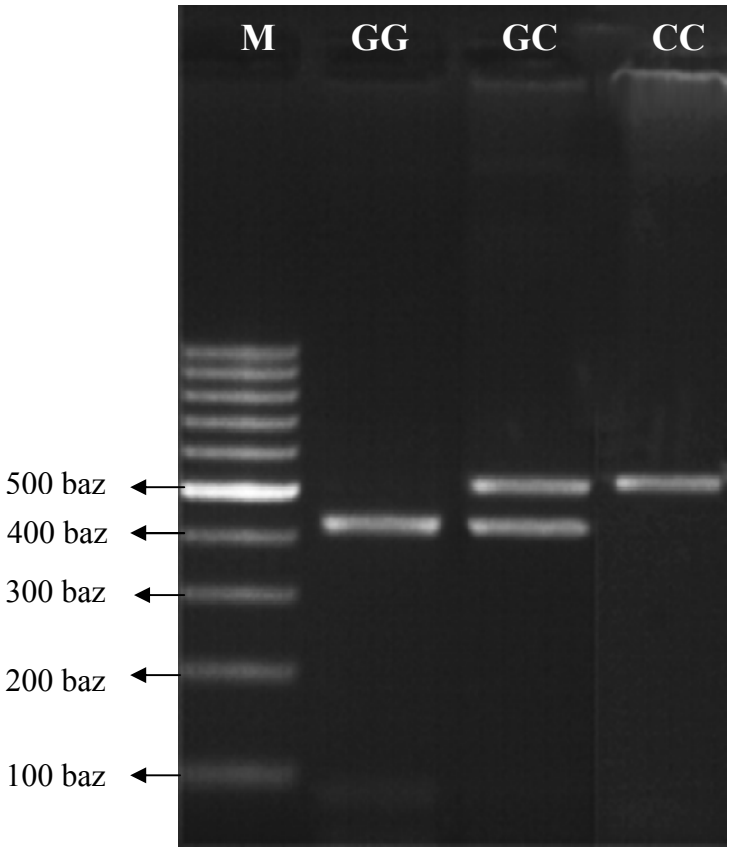
Türk RA hastaları ve normal bireylerde elde edilen -174. bölgedeki polimorfizme ait genotipler GG, GC ve CC olup bu allellerin jeldeki görünümleri aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil.IV.B.2.1).



Şekil IV.B.2.1.: -174. bölgede belirlenen genotiplerin jeldeki görüntüleri
(**M**: 100 bp Marker)

IV.B.2.2. – 572 .Bölgenin Genotiplendirilmesi

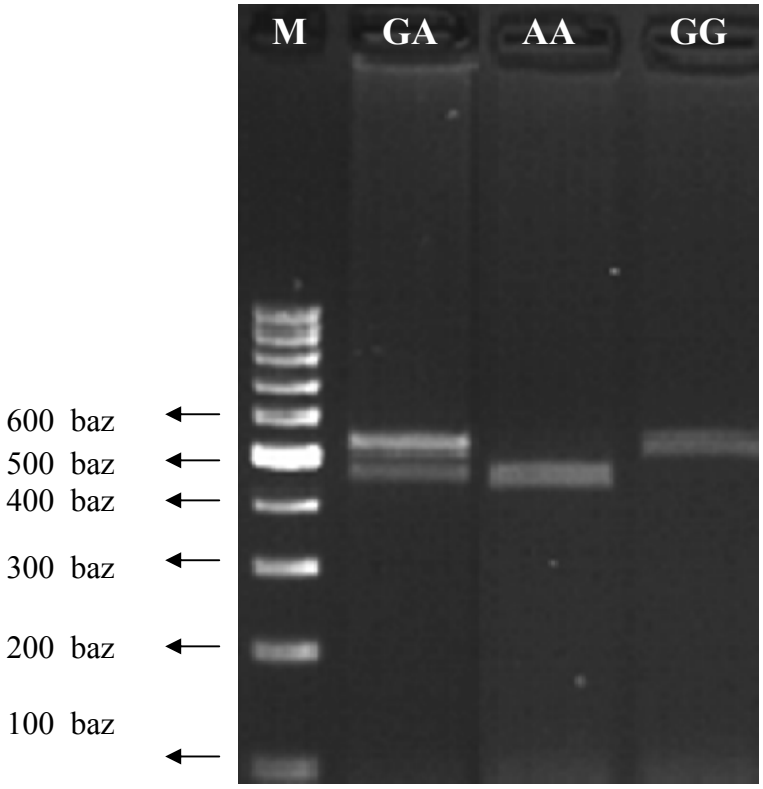
Türk RA hastaları ve normal bireylerde elde edilen -572. bölgedeki polimorfizme ait genotipler GG, GC ve CC olup bu allellerin jeldeki görünümleri aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil.IV.B.2.2.).



Şekil IV.B.2.2:: - 572 . bölgede belirlenen genotiplerin jeldeki görüntüleri (**M**: 100 bp Marker)

IV.B.2.3. – 597 .Bölgenin Genotiplendirilmesi

Türk RA hastaları ve normal bireylerde elde edilen -597. bölgedeki polimorfizme ait genotipler GG, GA ve AA olup bu allellerin jeldeki görünümleri aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil.IV.B.2.3.).



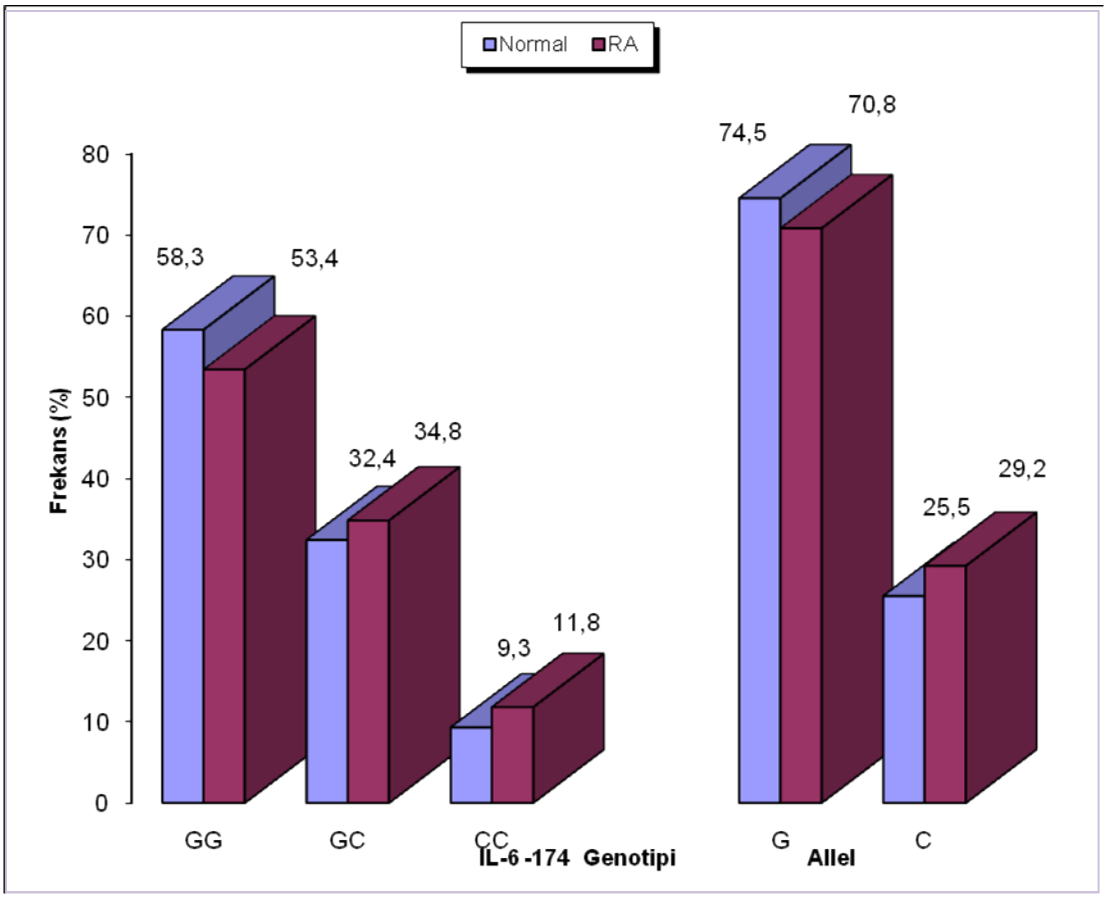
Şekil IV.B.2.3 : -597 bölgesi için belirlenen genotiplerin jeldeki görüntüleri. (**M**: 100 bp Marker)

Tablo IV. B.2.4.: RA Normal Grupları İçindeki -174 Genotiplendirmesinin Örnek Sayısı ile % Oranları

	Genotipler			
IL 6 (-174)	**G/G**	**G/C**	**C/C**	**Total**
Kontrol	144 (% 58,3)	80(% 32,4)	23 (% 9,3)	247 (% 100)
RA	95 (% 53,4)	62 (%34,8)	21 (%11,8)	178 (% 100)

Tablo IV. B.2.5.: RA Normal Grupları İçindeki -174 Allellerinin Örnek Sayısı ile % Değerleri

Allel	**RA**		**Normal**	
	n	**%**	**n**	**%**
G	252	70,8	368	74,5
C	104	29,2	126	25,5



Şekil .4.B.2.4.: RA Normal Grupları İçindeki -174 Genotip Dağılımı ve Allellerinin Örnek Sayısı ile % Değerleri

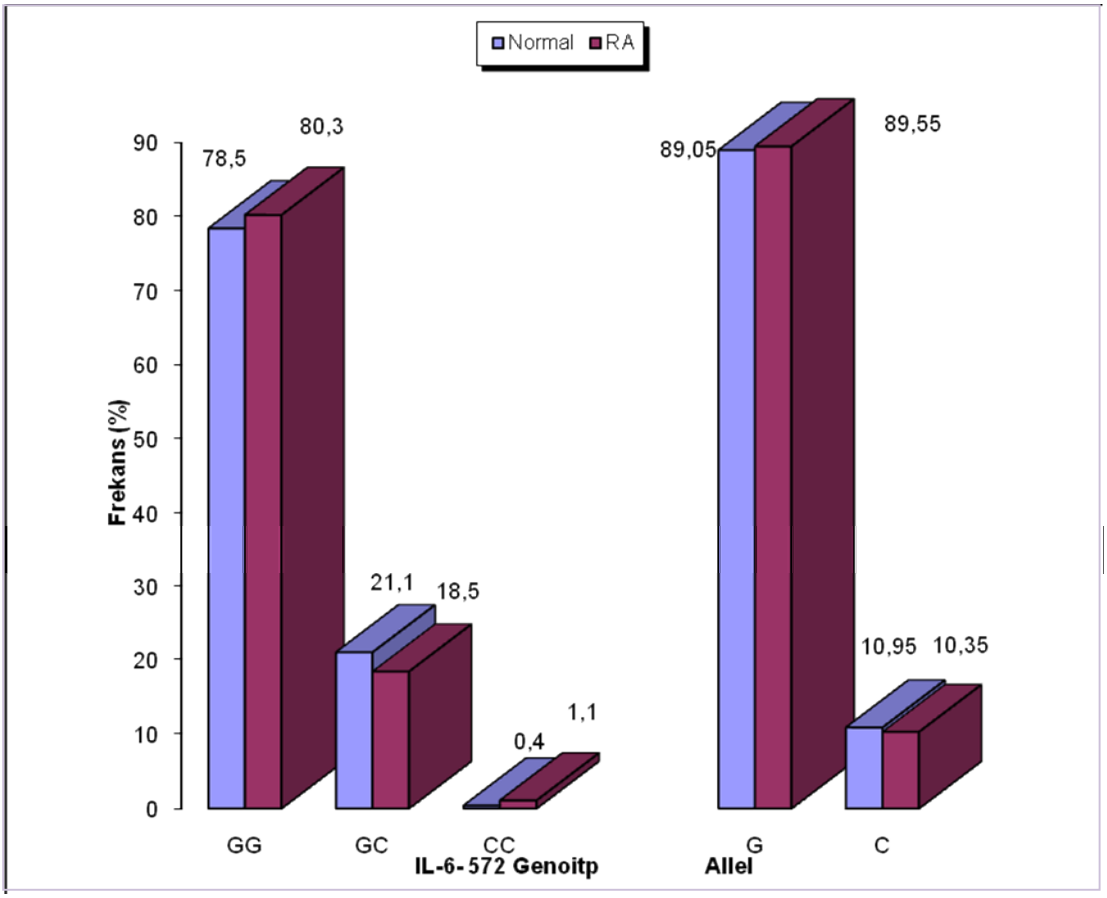
- 174 Bölgesinde hasta ve kontrol grupları, genotip dağılımı (p = 0,535) ve allel frekansları (p = 0,131) açısından karşılaştırıldığı zaman bu polimorfizmler ile Romatoid Artrit hastalığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Tablo IV. B.2.6.: RA Normal Grupları İçindeki -572 Genotiplendirmesinin Örnek Sayısı ile % Değerleri

	Genotipler			
IL 6 (-572)	**G/G**	**G/C**	**C/C**	**Total**
Kontrol	194 (% 78,5)	52 (%21,1)	1 (%0,4)	247 (%100)
RA	143 (%80,3)	33 (%18,5)	2 (%1,1)	178 (%100)

Tablo IV. B.2.7.: RA Normal Grupları İçindeki -572 Allellerinin Örnek Sayısı ile % Değerleri

Allel	RA		Normal	
	n	%	n	%
G	319	76,7	440	89,1
C	37	8,8	54	10,9



Şekil .4.B.2.5.: RA Normal Grupları İçindeki -572 Genotip Dağılımıve Allellerinin Örnek Sayısı ile ile % Değerleri

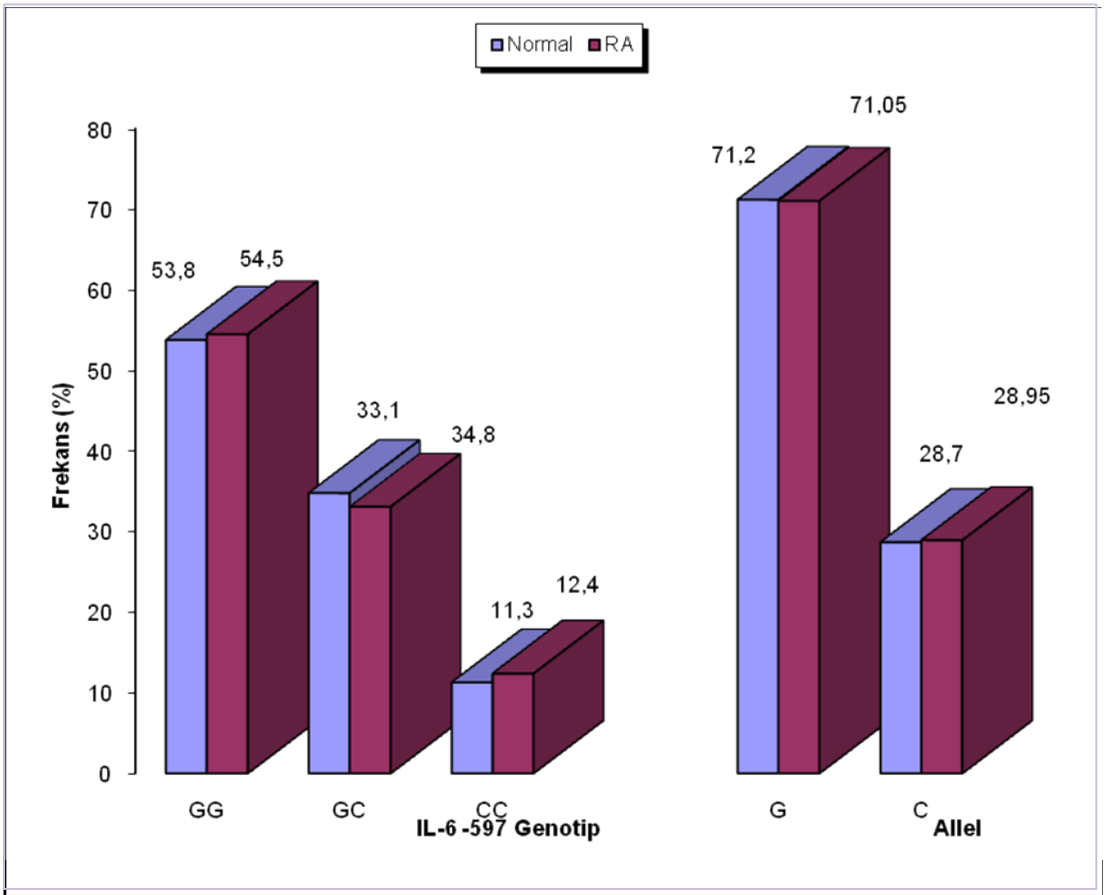
- 572 Bölgesinde hasta ve kontrol grupları, genotip dağılımı($p = 0,570$) ve allel frekansı ($p= 0,876$) açısından karşılaştırıldığı zaman bu polimorfizmler ile Romatoid Artrit hastalığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Tablo IV. B.2.8.: RA Normal Grupları İçindeki -597 Genotiplendirmesinin Örnek Sayısı ile % Değerleri

	Genotipler			
IL 6 (-597)	**G/G**	**G/A**	**A/A**	**Total**
Kontrol	**133** (%53,8)	**86** (%34,8)	**28** (%11,3)	247 (%100)
RA	**97** (%54,5)	**59** (%33,1)	**22** (%12,4)	178 (%100)

Tablo IV. B.2.9.: RA Normal Grupları İçindeki -597 Allellerinin Örnek Sayısı ile % Değerleri

Allel	**RA**		**Normal**	
	n	**%**	**n**	**%**
G	253	71,1	352	71,3
A	103	28,9	142	28,7



Şekil .4.B.2.6.: RA Normal Grupları İçindeki -597 Genotip Dağılımı ve Allellerinin Örnek Sayısı ile % Değerleri

- 597 Bölgesinde hasta ve kontrol grupları, genotip dağılımı (p = 0,912) ve allel frekansı (p= 0,506) açısından karşılaştırıldığı zaman bu polimorfizmler ile Romatoid Artrit hastalığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME

Romatoid artrit nedeni tam olarak bilinmeyen, inflamasyon ve sinoviyal hücre proliferasyonu ve eklemde destrüksüyon yapması ile karakterize kronik, otoimmün, sistemik, inflamatuar bir hastalıktır. Kronik progresif hastalık, fonksiyonel kayba neden olarak sakatlıkla sonlanır ve yasam süresini 5-7 yıl kısaltır. Tüm dünyada, ortalama %1 ile en sık görülen inflamatuar artrittir. Kadınlarda 2-3 katı daha fazla görülür. Romatoid artrit patogenezinde sitokinlerin rolü iyi bilinmektedir. Ancak hastalık karakteristik patolojik özelliklerini asıl etkileyen pro- ve anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dengedir. TNF- α, IL-1, IL-6, IL-15, GMCSF gibi bir çok inflamatuar mediatörün, makrofajlar, B lenfositler, fibroblast benzeri hücreler ve endotelial hücrelerden salınmasından, otoreaktif T hücrelerinin "bazı inflamatuar yolları başlatarak" primer sorumlu olduğu düşünülmektedir. Eklem destrüktif olayında bir çok sitokinin bir arada rolü olmasına rağmen, IL-1'in kartilaj destrüksiyonundan esas sorumlu sitokin olduğu bildirilmiştir [120]. Türk Romatoid Artrit hastalarında IL-1 RN ve IL-1β gen polimorzimleri incelenmiş ve IL- β +3953 bölgesindeki T/T genotipinin RA patogenezinde risk faktörü olduğu tesbit edilmiştir [116]. İnflamasyon, norodejeneratif hastalıkların nedenleri arasındadır. İnflamasyon, ilerleyen yaş ile birlikte görülen ölüm oranı en yüksek hastalıklar olan Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı gibi norodejeneratif hastalıkların etiyolojisinde bulunmaktadır. Çalışılan inflamasyon, sistemik enfeksiyon hastalıkları sırasında görülen yaygın inflamasyondur. Bu çalışmada hücresel düzeyde inflamasyondan bahsedilmektedir. Yaşlanma ve norodejeneratif hastalıklarda doğal immunitede koruyuculuğunun azaldığını, TNF-α, IL-6 ve NF-kβ arttığı bilinmektedir.

Kalp kapak hastalarında, romatizmaya bağlı suregelen kronik inflamatuar işlemler ile ilgili olan IL-6, inflamatuar yanıtta yer alan önemli bir anahtar sitokindir ve mekanik kalp kapağı disfonksiyonunda etkili bir rolü olabilir. IL-6 -174 G/C polimorfizmi mekanik kalp kapağı protez disfonksiyonu ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur [76]. IL-6 C/G-174 polimorfizminin varlığı ve artmış IL-6 ve fibrinojen düzeyleri ile inflamatuar sistem ve hemodinamik olarak KAH'nin yaygınlığı arasında güçlü bir ilişki olduğu tesbit edilmiştir. Yüksek interlökin -6 plazma seviyelerinin; insülin rezistansı, bozulmuş glikoz intoleransı, tip II diyabet ve kroner kalp

hastalıkları için risk faktörü olabileceği belirtilmiştir. IL-6 -174 G>C gen varyantının obezite, bozulmuş glukoz toleransı, metabolik sendrom parametreleri ve diyabet ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. IL-6 knock out farelerde yapılan çalışmalarda obezite gelişimi belirlenmiştir. Ayrıca IL-6 -174 C allel taşıyıcılığının erkeklerde santral obeziteye neden olması sebebiyle kroner kalp hastalığına yatkınlık oluşturabileceği sonucuna varılmıştır [77].

Romatoid artritli aynı zamanda yüksek tansiyonlu hastalarda -174 G/C polimorfizmi etkisi incelenmiş ancak anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır [78]. Karaciğer hastalığına sahip alkolik kişilerde yapılan çalışmada IL-6 -174 G/C polimorfiziminin şüpheli olabileceği sonucuna ulaşılmıştır [79]. Londra Üniversitesi periodontoloji ünitesinin çalışması -174 G/G alelinin periodontitis ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [80]. Kore' de yapılan ve *Helicobacter pylori* tetiklediği gastroduedonal hastalıkların inflamasyonunda etkili üç sitokinden biri olan IL-6' in -572 polimorfizminin etkili olduğu ve G/G alelinin bu hastalık için düşük risk taşıdığı belirtilmiştir [81]. Yaygın immün sistem bozukluğu olan hastalıklarda -174 G aleli sıklığı diğer allellere göre düşük bulunmuştur [82]. Prostat kanseri ile ilgili yapılan çalışmada G/G ve G/C allellerinin C/C allel grubuna göre daha fazla sıklıkta gözlendiği ve IL-6 seviyesini arttırdıkları savunulmuştur [83]. Miyokardial infarktüslü hastalarda IL-6 ait dört polimorfizmin IL- 6 seviyesini arttırdığı bulunmuştur [84]. IL-6 -174, -572, -597 polimorfizmlerinin gut hastalığı ile ilişkisi incelenmiş, anlamlı bir ilişki görülmemiştir [85].

Türk ve Alman Behçet hastalarından oluşan bir grup üzerinde yapılan çalışmada IL-6 R polimorfizmlerinin hastalıkla ilişkisi olmadığı gözlenmiştir [86]. Yunanlı kroner arter hastalarında inflamatuar sitokin genlerde bakılan polimorfizmlerde -174 G/C polimorfizminin kroner arter hastalığı patogenezinde şüpheli bir rol oynayabileceği sonucuna ulaşılmıştır [87]. CRP ve IL-6 seviyeleri üzerine yapılan bir başka çalışmada IL-6 R varyantlarının kadınlarda CRP ve IL-6 seviyelerini artırdığı ve diyabet için risk oluşturabileceğini öne sürmüşlerdir [88]. Mısırlı astımlı çocuklar üzerine yapılan çalışmada IL-6 -174 G/G genotip frekansının yüksek olduğu gözlenmiş ve ileride genetik markır olarak kullanabileceği ifade edilmiştir [89]. Taiwanlı Romatoid artritli hastalarda -572 G/C polimorfizmi çalışmaları RA gelişiminde etkili olabilecek bir anlamlılığa ulaşmamıştır [90]. Polikistik over sendromlu hastalarda yapılan çalışmada -174 G/C polymorfizminin risk faktörü olabileceği ve oksidatif stres markırı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [91]. IL-

6R'e ait polimorfizmlerinin melonoma risk artışıyla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır [92].

IL-6 -174 G/G polimorfizminin Makedonyalı astım hastalarında şüpheli sitokin polimorfizm olduğu düşünülmektedir [93]. İspanya'da yapılan çalışmada kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KAOH) -572 G/C polimorfizmi ile ilişkili bulunurken -572 ve -597 polimorfizmleri ile anlamlandırılamamıştır. -572 C allelli KAOH riskini düşürmektedir [94]. Kore popülasyonunda intestinal metaplaziye karşı - 572 G allelinin C allelline göre koruyucu olduğu sonucuna ulaşılmıştır [95]. Menopoz öncesi dönemde -572 pozisyonunda C aleline sahip kadınların kemik mineral yoğunluklarında artış gözlenmiştir [96]. Androjen hormonunun fazla salgılanmasına bağlı bozuklukları inceleyen çalışmalardan birinde - 174 ve -597 polimorfizlerinin bu hastalıkların patogenezinde rol oynayabileceği önerilmiştir [97]. Multiple Sclerosis patogenezinde şüphelenilen -597 polimorfizminin hastalıkla ilişkisi bulunamamıştır [98]. Japon araştırmacıların çalışmaları kemik mineral dansite ile interlökin 6 polimorfizmleri ile kemik yoğunluğu arasındaki ilişkinin varlığını göstermiştir. IL- 6, kemik rezorpsiyonu uyaran önemli bir sitokindir

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda eklem bölgelerindeki inflamasyonda IL-6 adlı sitokinin rolü üzerinde durulmaktadır. IL-6'nın artrit gelişimi üzerindeki etkisi artritli hayvan modellerinde yapılan araştırmalar ile kanıtlanmıştır. Ayrıca artritli farelere IL-6 etkisini engellemek amacı ile IL-6 bağlanma özelliğine sahip olan antikor verilmesi ile hastalığın tedavisi söz konusu olmuştur. RA'lı hastaların serumlarında da sağlıklı kontrollere kıyasla IL-6 miktarı yüksektir. RA seyrinde yükseldiği bilinen IL-6'yı sentez eden gende belirlenen çeşitli SNP'lerin varlığı, bu polimorfizmler ile otoimmün bir hastalık olan RA arasındaki ilişkinin incelenmesini anlamlı kılmaktadır. IL-6 seviyesinin düzenlenmesi üzerinde IL-6 eksprese eden gende belirlenmiş olan polimorfizmlerin etkili olduğu düşünülmektedir [72]. Bu amaçla IL-6 geni promotor bölgesindeki -174.,-572. ve -597. bölgelerdeki tek nükleotit polimorfizmlerini inceledik. Türk romatoid artrit hastaları üzerinde daha önce böyle bir çalışma yapılmamış olduğu için diğer ülkelerdeki RA hastaları üzerine yapılan IL-6 polimorfizmleri ile çalışma sonuçlarımzı karşılaştırdık.

Çalıştığımız IL-6 promotor bölgesi polimorfizmlerinden biri - 174. bölgesidir. *İn vitro* IL-6 -174 CC genotipi IL-6 promotör aktivitesini ve *in vivo* IL-6 seviyesini düşürmektedir [74,119]. Juvenil idiopatik artrit ile yapılan bir çalışmada IL-6 -174 ilişkili bulunmamıştır [73], ancak Juvenil romatoid artrit hastalarında yapılan başka bir

çalışmada IL-6 -174 G/G genotipinin ağrı hissi üzerine etkili olduğu görülmüştür [118]. IL-6 -174 RA'ya eğilim artırmamaktadır, ama erken yaşta başlayan RA ile ilişki gözlenmiştir [75]. Romatoid artritli aynı zamanda yüksek tansiyonlu hastalarda -174 G/C polimorfizmi etkisi incelenmiş ancak anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır [78]. Çalışmamızda -174. pozisyondaki polimorfizm gerek genotip dağılımı gerekse allel frekansı açısından anlamlı bulunmamıştır.

Çalıştığımız IL-6 promotor bölgesi polimorfizmlerinden bir diğeri ise - 572. Bölgededir. Taiwanlı Romatoid artritli hastalarda -572 G/C polimorfizmi çalışmaları RA gelişiminde etkili olabilecek bir anlamlılığa ulaşmamıştır [90]. Buna karşın Çin Guangdong Han populasyonunda IL-6 -572. pozisyonundaki polimorfizmlerin RA gelişiminde etkili olduğu bulunmuştur [117]. Çalışmamızda -572. pozisyondaki polimorfizm gerek genotip dağılımı gerekse allel frekansı açısından istatiksel bir anlam taşımamaktadır.

IL-6 promotor bölgesinde üçünü olarak baktığımız polimorfizm -597 bölgesindedir. IL-6 -597 polimorfizmi ile Romatoid artrit hastalığı arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. İnflamatuar hastalıklarla olan ilişkisine bakıldığında ise diş eti iltihabındaki inflamasyon [121] ve gastroduedenal hastalıklarda gastrik inflamasyon [122] ile ilişkisine bakılmış, fakat sonuçlarda anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamız sonucunda -597. bölgedeki polimorfizme ait genotip dağılımları ile allel frekansı açısından değerlendirildiğinde istatiksel bir anlam taşımamaktadır.

Benzer polimorfizmlerin tanımlanması ve kolayca taranabilir hale gelmesi ile risk altındaki bireyler daha iyi tanımlanabilecek, belki yakın gelecekte gen tedavisi bu yüksek riskli bireylerde romatoid artrit hastalığı meydana gelmeden koruma altına alınmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Waaler E.; "On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of a sheep blood corpuscles", *Acta Pathol Microbial Scand* **(1940)** 17:122-188.

[2] Symmons DP.; " Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome", *Best Pract Res Clin Rheumatol* **2002** 16(5):707-22

[3] Boyer GS.; Lanier AP.; Templin DW.: "Prevalence rates of rheumatoid arthritis Spondyloarthropathies , and other rheumatic disorders in an Alaskan Inupiat Eskimo population", *J Rheumatol* **1988** 15(4):678-83

[4] Hochberg MC.: " Adult and juvenile rheumatoid arthritis",*Current epidemiologic concepts. Epidemiol Rev* **1981** 3:27- 44.

[5] Spector TD.: " Rheumatoid arthritis", *Rheum Dis Clin North Am* **1990** 16(3):513-37.

[6] Beasley RP.; Bennett PH.; Lin CC.: "Low prevalence of rheumatoid arthritis in Chinese Prevalence survey in a rural community", *J Rheumatol* **1983** (10 Suppl):115

[7] Minaur N.; Sawyers S.; Parker J.; Darmawan J.: " Rheumatic disease in an Australian 7-6-Aboriginal comminuty in North Queensland, Australia. A WHO- ILAR COPCORD study", *J. Rheumatol* **2004** 31(5):965-72.

[8] MacGregor AJ.; Snieder H.; Rigby AS.; et al.: "Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins", *ArthritisRheum* **2000** 43(1):30-7.

[9] Steinbrocker O.:Traeger CH.; Batterman RC.; "Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis", *JAMA* **1949**140;659-62.

[10] Bergstrom G.; Bjelle A.;Sorensen LB.; Sundh V.; Svanborg A.: Prevalence of rheumatoid arthritis, osteoarthritis, chondrocalcinosis and gouty arthritis at age 79. J Rheumatol 1986, 13(3):527-34.

[11] Hochberg MC.: " Changes in the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in England and Wales 1970-1982" , *Semin Arthritis Rheum* **1990** 19(5):294-302.

[12] Criswell LA.; Merlino LA.; Cerhan JR.; et al.: " Cigarette smoking and the risk of rheumatoid arthritis among postmenopausal women: results from the Iowa Women's Health Study", *Am J Medicine* **2002** 112:465-71.

[13] Huizinga TW.: "Genetics in rheumatoid arthritis", *Best Pract Res Clin Rheumatol* **2003** 17(5):703-16.

[14] Stastny P.: "Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis", *N Engl J Med* **1978** 298(16):869-71

[15] Siman AJ.; Pearson JE.: " Epidemiology and genetics in rheumatoid arthritis" *Arthritis Res* **2002** 4(suppl 3):265-72.

[16] Ergin S.; Beyazova M.;Gökçe Kutsal Y.: " Romatoid Artrit ve Sjögren Sendromu", *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Cilt 2. Güneş Kitabevi Ltd. Şti, Ankara*, **2000** 1549-1576.

[17] Ertenli İ.: "Prospect Tıp Dergisi", *Güneş Kitabevi Ltd. Şti* **2003** 5:3.

[18] Öncel S.; Peker Ö.; Göğüş F.: " Romatoid Artritte Etiyopatogenez, Klinik ve Laboratuar Bulgular",Göksoy T (ed), *Romatizmal Hastalıkların Tanı ve Tedavisi Yüce reklam/yayım/dağıtım a.ş. İstanbul*, **2002** 422-431,436-449.

[19] Oğuz H.: *Romatizmal Ağrılar Atlas Tıp Kitabevi. Konya*, **1992** 368-421.

[20] Bresnihan B. : "Preventing joint damage as the best measure of biologic drug therapy", *J Rheumatol* **2002** 29 Suppl 65:39-43.

[21] Gümüşdiş G.: "Bağ Dokusu Hastalıkları, Romatoid Artrit", *Klinik Romatoloji El Kitabı, Güven Matbaası, sf:* 209-227, .

[22] Direskeneli H.: "Romatoid Artrit Etyopatogenezi", Hamuryudan V. (ed). Romatoid Artrit, *MD Yayıncılık*, sf: 8-15, **Ankara 2002.**

[23] Martel W.; Hayes JT.; Duff IF.: " The pattern of bone erosion in the hand and wrist in rheumatoid arthritis", *Radiology* **1965** 84:204-14.

[24] Strand V.;Kavanaugh AF.: "The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis", *Rheumatology (Oxford),* **2004** 43(Suppl-3):III10-III16

[25] Dayer JM.: "The process of identifying and understanding cytokines: from basic studies to treating rheumatic diseases", *Best Pract Res Clin Rheum,* **2004** 18(1):31-45.

[26] Bresnihan B. : "Preventing joint damage as the best measure of biologic drug therapy", *J Rheumatol* **2002** 29 Suppl 65:39-43.

[27] Weyand CM. : "New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis", *Rheumatology* **2000** 39(suppl 1):3-8

[28] Goronzy JJ.; Zettl A.:Weyand CM.: " T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis", *Int Rev Immunol* **1998** 17:339-63.

[29] Goldring SR.: " Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening? ", *J Rheumatol* **2002** 29 Suppl 65:44-8.

[30] Lohmander LS.; Hoerrner LA.;Lark MW.: " Metalloproteinases, tissue inhibitors and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis", *Arthritis Rheum* **1993**, 36:181-89.

[31] Hall GM.: " Effects of anesthesia on the endocrine and metabolic stress response to surgery", *General Anesthesia 5th Ed*. **1989** 252- 259

[32] Desborough JP.: " The stress response to trauma and surgery", **2000** 85: 109

[33] Fell D.; Derbyshire DR.;Maile CJD.; et all.: "Measurement of plazma catecholamine concentrations", *British Journal of Anesthesia* **1985** 57: 770.

[34] Gümüşdiş G.; Doğanavşargil F.: "Klinik Romatoloji", *Deniz Matbası* **İstanbul 1999**

[35] Heinrich PC.;Behrmann I.; Haan S.; Hermanns HM.; Müller-Newen G.;Schaper F.: " Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation" *Biochem J.* ,**2003** Aug 15;374(Pt 1):1-20.

[36] Heinrich PC.; Behrmann I.; Müller-Newen G.; Schaper F.; Graeve L.: "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway" *Biochem J.* ,**1998** Sep 1;334 (Pt 2):297-314.

[37] Pap T.; Aupperle KR.;Gay S.; Firestein GS.;Gay RE.: "Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion",*Arthritis Rheum*, **2001** Mar;44(3):676-81.

[38] Arend WP.;Dayer JM.: "Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum*, **1990** Mar;33(3):305-15.

[39] Feldmann M.: "The cytokine network in rheumatoid arthritis: definition of TNF alpha as a therapeutic target", *J R Coll Physicians Lond*. Nov-Dec;30(6):560-70.

[40] Teitelbaum SL.: "Osteoclasts, integrins, and osteoporosis", *J Bone Miner Metab*. **2000** 18(6):344-9

[41] Schett G.: "Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts." *Arthritis Res Ther*. **2007**;9(1):203.

[42] Sato K.; Suematsu A.; Okamoto K.;Yamaguchi A.; Morishita Y., Kadono Y,;Tanaka S.; Kodama T.; Akira S.; Iwakura Y.; Cua DJ.; Takayanagi H.: "Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction" *J Exp Med* **2006** Nov 27;203(12):2673-82.

[43] Gravallese EM.; Manning C.;Tsay A.; Naito A.; Pan C.; Amento E.; Goldring SR.: "Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor", *Arthritis Rheum* **2000** Feb;43(2):250-8.

[44] Wong PK, Campbell IK, Egan PJ, Ernst M, Wicks IP.The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover.Arthritis Rheum. 2003 May;48(5):1177-89.

[45] Holt I.; Cooper RG.;Hopkins SJ.: "Relationships between local inflammation, interleukin-6 concentration and the acute phase protein response in arthritis patients", *Eur J Clin Invest* **1991** Oct;21(5):479-84.

[46] Boe A.; Baiocchi M.; Carbonatto M.; Papoian R.; Serlupi-Crescenzi O.: "Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis", *Cytokine.* **1999** Dec;11(12):1057-64.

[47] Alonzi T.; Fattori E.; Lazzaro D.; Costa P.; Probert L.;Kollias G.; De Benedetti F.; Poli V.: Ciliberto G.: "Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis", *J Exp Med*. **1998** Feb 16;187(4):461-8.

[48] Takagi N, Mihara M, Moriya Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Takeda Y, Ohsugi Y.: "Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis", *Arthritis Rheum*, **1998** Dec;41(12):2117-21.

[49] Mihara M.; Kotoh M.;Nishimoto N.; Oda Y.; Kumagai E.; Takagi N.; Tsunemi K.; Ohsugi Y.; Kishimoto T.; Yoshizaki K.; Takeda Y.: "Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in cynomolgus monkeys" *Clin Immunol* **2001** Mar;98(3):319-26

[50] Nishimoto N.; Yoshizaki K.; Maeda K.; Kuritani T.;Deguchi H.; Sato B.; Imai N., Suemura M.; Kakehi T.; Takagi N., Kishimoto T.: "Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis", *Phase I/II clinical study.J Rheumatol* **2003** Jul;30(7):1426-35.

[51] Kishimoto T.: "The biology of interleukin-6", *Blood.* **1989** Jul;74(1):1-10.

[52] Muraguchi A.; Kishimoto T.; Miki Y.; Kuritani T.; Kaieda T.; Yoshizaki K.; Yamamura Y.: "T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF" *„J Immunol* **1981** Aug;127(2):412-6.

[53] Nishimoto N.: "IL-6 targetting therapy for inflammatory immune diseases", *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. **2006** Sep 10;95(9):1795-800.

[54] Rose-John S.: "Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors", *Acta Biochim Pol*. **2003** 50(3):603-11.

[55] Gauldie J,;Richards C,; Harnish D,; Lansdorp P,; Baumann H.: "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1987** Oct;84(20):7251-5.

[56] Kishimoto T,; Akira S,; Narazaki M,; Taga T.: "Interleukin-6 family of cytokines and gp130" , *Blood*. **1995** Aug 15;86(4):1243-54.

[57] Tamura T,; Udagawa N,; Takahashi N,; Miyaura C,; Tanaka S,; Yamada Y,; Koishihara Y,; Ohsugi Y,; Kumaki K,; Taga T,; et al.: "Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6", *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993** Dec 15;90(24):11924-8.

[58] Hirano T.: "Interleukin 6 and its receptor: ten years later", *Int Rev Immunol*. **1998**;16(3-4):249-84.

[59] Ishihara K.; Hirano T.: "IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease", *Cytokine Growth Factor Rev* **2002** Aug-Oct;13(4-5):357-68.

[60] Ito H.: "Novel therapy for Crohn's disease targeting IL-6 signalling", *Expert Opin Ther Targets* , **2004** Aug;8(4):287-94.

[61] Nishimoto N.; Kanakura Y.; Aozasa K.; Johkoh T.; Nakamura M.; NakanoS.; Nakano N.; Ikeda Y.; Sasaki T.; Nishioka K.; Hara M.; Taguchi H.; Kimura Y.; Kato Y.; Asaoku H.; Kumagai S.; Kodama F.; Nakahara H.; Hagihara K.; Yoshizaki K, Kishimoto T.: "Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease" *Blood,* **2005** Oct 15;106(8):2627-32.

[62] Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T. "Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis" ,*Arthritis Rheum*, **2005** Mar;52(3):818-25.

[63] Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, et al.: "Autocrine generation and requirement of

BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas",*Nature*, **1988** Mar 3;332(6159):83-5

[64] Hirano T.; Matsuda T.; Turner M.; Miyasaka N.; Buchan G.; Tang B.; Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldmann M, et al.: "Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis",*Eur J Immunol*, **1988** Nov;18(11):1797-801.

[65] Nakajima K, Martínez-Maza O, Hirano T, Breen EC, Nishanian PG, Salazar-Gonzalez JF, Fahey JL, Kishimoto T. "Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN-beta 2) production by HIV" , *J Immunol* **1989** Jan 15;142(2):531-6.

[66] Jilka RL.; Hangoc G.; Girasole G.; Passeri G.; Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC.: "Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6" , *Science* **1992** Jul 3;257(5066):88-91.

[67] Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T.: "The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome", *J Exp Med*. **1989** Jan 1;169(1):333-8.

[68] Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, De Benedetti F, Poli V, Ciliberto G.: "Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis", *J Exp Med*, **1998** Feb 16;187(4):461-8.

[69] Richards HB, Satoh M, Shaw M, Libert C, Poli V, Reeves WH.: "Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus",*J Exp Med*,1998 Sep 7;188(5):985-90.

[70] Atreya R.;Neurath MF.;"Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer", *Clin Rev Allergy Immunol*. **2005** Jun;28(3):187-96.

[71] Ferrari SL.; Ahn-Luong L.; Garnero P.; Humphries SE.;Greenspan SL.: "Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women" , *J Clin Endocrinol Metab* **2003** Jan;88(1):255-9.

[72] Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, Lowe GD, Humphries SE.: "Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2001** Sep;21(9):1458-63.

[73] Donn RP.; Barrett JH.; Farhan A.;Stopford A.; Pepper L.; Shelley E.; Davies N.; Ollier WE.; Thomson W.: "Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis" ,*British Paediatric Rheumatology Study Group.Arthritis Rheum*, **2001** Apr;44(4):802-10.

[74] Cooper GS.; " Umbach DM.Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density?", *A meta-analysis.J Bone Miner Res.* **1996** Dec;11(12):1841-9.

[75] Pascual M.: Nieto A, Matarán L, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Martín J.: "IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis",*Genes Immun* **2000** Jun;1(5):338-40.

[76] Parlar ,A,İ,; "Mekanik Kalp Kapağı Obtrüksiyonlarında Protrombin, TNF-Alfa, FV Leiden ve IL-6 Polimorfizmleri" ,*Kalp Damar Cerrahisi Uzmanlık Tezi ,* T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi,Ankara, Türkiye , Kasım **(2007)**

[77] Çevik ,G,F,: **"**Tek Harf Çalışması ile IL-6 Promoter Gen Varyantlarının İlişkileri" ,*24.Ulusal Kardiyoloji Kongresi,* İstanbul ,Türkiye ,Ekim **(2008)**

[78] Panoulas VF, Douglas KM, Smith JP, Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Nightingale P, Kitas GD.: "Transforming growth factor-{beta}1 869T/C, but not interleukin-6 -174G/C, polymorphism associates with hypertension in rheumatoid arthritis" *Rheumatology (Oxford)* **2008** Dec 23.

[79] Gleeson D.; Bradley MP.; Jones J.; Peck RJ.; Bond SK.; Teare MD.; Duff GW. "Cytokine gene polymorphisms in heavy drinkers with and withoutdecompensated liver disease: a case-control study", *Am J Gastroenterol.* **2008** Dec;103(12):3039-46.

[80] Nibali L, D'Aiuto F, Donos N, Griffiths GS, Parkar M, Tonetti MS, Humphries SE, Brett PM.: "Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene", *Cytokine.* **2009** Jan;45(1):50-4.

[81] Kang JM, Kim N, Lee DH, Park JH, Lee MK, Kim JS, Jung HC, Song IS. "The Effects of Genetic Polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on Helicobacter pylori- induced Gastroduodenal Diseases in Kore", *J Clin Gastroenterol*, **2008** Dec 10.

[82] Rezaei N.;Amirzargar AA.; Shakiba Y.; Mahmoudi M.; Moradi B.; Aghamohammad.: "A Proinflammatory cytokine gene single nucleotide polymorphisms in common variable immunodeficiency", *Clin Exp Immunol* **2009** Jan;155(1):21-7.

[83] Bao S, Yang W, Zhou S, Ye Z .: "Relationship between single nucleotide polymorphisms in -174G/C and -634C/G promoter region of interleukin-6 and prostate cancer", *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, **2008** Dec;28(6):693-6.

[84] Ljungman P, Bellander T, Nyberg F, Lampa E, Jacquemin B, Kolz M, Lanki T, Mitropoulos J, Müller M, Picciotto S, Pistelli R, Rückerl R, Koenig W, Peters A .: "DNA variants, plasma levels and variability of Interleukin-6 in myocardial infarction survivors: Results from the AIRGENE study.; for the AIRGENE Study Group", *Thromb Res*. **2008** Dec 3.

[85] Tsai PC, Chen CJ, Lai HM, Chang SJ .: "Analysis of polymorphisms in the promoter region and protein levels of interleukin-6 gene among gout patients", *Clin Exp Rheumatol*. **2008** Sep-Oct;26(5):841-7.

[86] Storz K, Löffler J, Koch S, Vonthein R, Zouboulis CC, Fresko I, Yazici H, Kötter I .: "IL-6 receptor, IL-8 receptor and TNF-alpha238 (G/A) polymorphisms are not associated with Behçet's disease in patients of German or Turkish origin", *Clin Exp Rheumatol* **2008** Jul-Aug;26(4 Suppl 50):S103-6.

[87] Manginas A, Tsiavou A, Chaidaroglou A, Giamouzis G, Degiannis D, Panagiotakos D, Cokkinos DV .: "Inflammatory cytokine gene variants in coronary artery disease patients in Greece", *Coron Artery Dis*. **2008** Dec;19(8):575-82

[88] Qi L, Rifai N, Hu FB .: "Interleukin-6 receptor gene, plasma C-reactive protein, and diabetes risk in women", *Diabetes*, **2009** Jan;58(1):275-8. Epub 2008 Oct 13.

[89] Settin A, Zedan M, Farag M, Ezz El Regal M, Osman E.: "Gene polymorphisms of IL-6(-174) G/C and IL-1Ra VNTR in asthmatic children", *Indian J Pediatr* **2008** Oct;75(10):1019-23. Epub 2008 Sep 22

[90] Lo SF, Huang CM, Lin HC, Chen WC, Tsai CH, Tsai FJ.: " Cytokine (IL-6) and chemokine (IL-8) gene polymorphisms among rheumatoid arthritis patients in Taiwan", *Clin Exp Rheumatol*, **2008** Jul-Aug;26(4):632-7.

[91] Erdoğan M, Karadeniz M, Berdeli A, Alper G, Caglayan O, Yilmaz C .: "The relationship of the interleukin-6 -174 G>C gene polymorphism with oxidative stress markers in Turkish polycystic ovary syndrome patients", *J Endocrinol Invest*, **2008** Jul;31(7):624-9.

[92] Gu F, Qureshi AA, Niu T, Kraft P, Guo Q, Hunter DJ, Han J .: "Interleukin and interleukin receptor gene polymorphisms and susceptibility to melanoma" *Melanoma Res*, **2008** Oct;18(5):330-5.

[93] Trajkov D, Mirkovska-Stojkovikj J, Arsov T, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Sandevska E, Gogusev J, Spiroski M. Iran J .: "Association of cytokine gene polymorphisms with bronchial asthma in Macedonians", *Allergy Asthma Immunol,* **2008** Sep;7(3):143-56.

[94] Córdoba-Lanús E, de-Torres JP, López-Aguilar C, Rodríguez-Pérez MC Maca-Meyer N, Montejo-de-Garcini A, Aguirre-Jaime A, Pérez-Méndez L, Association of IL-6 gene polymorphisms and COPD in a Spanish population. *Respir Med*, **2008** Dec;102(12):1805-11.

[95] Kim N, Park YS, Cho SI, Lee HS, Choe G, Kim IW, Won YD, Park JH, Kim JS, Jung HC, Song IS. : "Prevalence and risk factors of atrophic gastritis and intestinal metaplasia in a Korean population without significant gastroduodenal disease", *Helicobacter* , **2008** Aug;13(4):245-55

[96] Chung HW, Seo JS, Hur SE, Kim HL, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD.: "Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women", *J Hum Genet* , **2003**;48(5):243-8. Epub 2003 Apr 18.

[97] Villuendas G, San Millán JL, Sancho J, Escobar-Morreale HF .: "The -597 G>A and -174 G-->C polymorphisms in the promoter of the IL-6 gene are associated with hyperandrogenism", *J Clin Endocrinol Metab* **, 2002** Mar;87(3):1134-41.

[98] Fedetz M, Matesanz F, Pascual M, Martín J, Fernández O, Guerrero M, Alcina A .: "The -174/-597 promoter polymorphisms in the interleukin-6 gene are not associated with susceptibility to multiple sclerosis", *J Neurol Sci* , **2001** Sep 15;190(12):69-72.

[99] Fleming A,Benn RT,Corbett M,Wood PH.: "Early rheumatoid disease. II.Patterns of joint involment" , *Ann Rheum Dis* 1976;35;361-4.

[100] Akıncı A.: "Aktivite ve Fonksiyonel Değerlendirme" *Romatoid Artrit*, MD Yayıncılık, sf: 65-71, **Ankara 2002**

[101] Kamusi T,Munro T, Harth M .: "The rheumatoid servical spine", *Semin Arthritis Rheum* , **1985**;14:187-95

[102] Fuchs HA,Sergent JS.: "Rheumatoid Arthritis :The clinical picture.In :Koopman WJ ,editor.Arthritis and allied conditions. Baltimore:Williams&Wilkins: **1997.**

[103] Koopman WJ.Schrohenberg RE.Rheumatoid Factor.In:Utsinger PD,Zaifler NJ,Ehrlich GE,editors.: "Rheumatoid Arthritis :etiology,diagnosis and therapy", *Philidelphia:JB Lippincott*:**1985**.

[104] Jansen LM,van Schaardenburg D. ,van der Horst –Bruinsma I.,van der Stadt RJ.,de Koning MH,Dijkmans BA.: "The predictive value of anti –cyclic citrulinated peptid antibodies in early arthritis" *, J Rheumatol* **2003**;30:1691-5

[105] Jansen TL,Bruyn GA.: "Diagnostic value of anticyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis", *J Rheumatol* **2004**;31;1012-3

[106] Van Gaalen FA,Linn-Rasker SP,van Venrooji WJ, de Jong BA,Breedveld ,Verveij CL,et al.: "Autoantibodies to cyclic citrulinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis:a prospective cohort study" , *Arthritis Rheum* **2004**:50:709-15.

[107] Arnett FC, Edworth SM, Bloch DA, et al.: " The ARA 1987revised criteria for classification of rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum* **1988**, 31:315-24.

[108] Hochberg MC, Chane RW, Dwosh I, et al.: "The ACR 1991 revised criteria for the classification of the global functional status in rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum,* **1992**, 25,498-502

[109] Deodhar AA, Woolf AD. : "Bone mass measurement and bone metabolism in rheumatoid arthritis: A review", *Br J Rheumatol* **1996**, 35:309-22.

[110] Martel W, Hayes JT, Duff IF. : "The pattern of bone erosion in the hand and wrist in rheumatoid arthritis", *Radiology* **1965**, 84:204-14.

[111] Graudal N. : "The natural history and prognosis of rheumatoid arthritis:association of radiographic outcome with process variables, joint motion and immune proteins" , *Scand J Rheumatol Suppl* **2004**,(118):1-38.

[112] Kaarela K, Kautiainen H.: " Continuous progression of radiological destruction in seropositive rheumatoid arthritis", *J Rheumatol* **1997**, 24(7):1285-7.

[113] De Carvalho A, Graudal H, Jorgensen B.: " Radiologic evaluation of the progression of rheumatoid arthritis", *Acta Radiol Diagn* **1980**,21(1):115-21.

[114] Sculco TP.: " The knee joint in rheumatoid arthritis", *Rheum Dis Clin North Am* **1998**, 24(1):143-56.

[115] Magyar E, Talerman A, Feher M, Wouters HW.: " The pathogenesis of the subchondral pseudocyst in rheumatoid arthritis", *Clin Orthop,* **1974**,100:341-8.

[116] Arman A, Yilmaz B, Coker A, Inanc N, Direskeneli H.: " Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) and interleukin-1B gene polymorphisms in Turkish patients with rheumatoid arthritis",*Clin Exp Rheumatol* , **2006** Nov-Dec;24(6):643-8.

[117] Huang XZ, Zhuang JH, Ren YG, Zhou LJ, Zhou Q. : "Association of interleukin-6 and interleukin-18 gene polymorphism with rheumatoid arthritis in Guangdong Han population", *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, **2007** Nov;27(11):1661-4.

[118] Oen K, Malleson PN, Cabral DA, Rosenberg AM, Petty RE, Nickerson P, Reed M.: " C ytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis", *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Sep;44(9):1115-21. Epub 2005 May 18.

[119] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P.: " The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis", *J Clin Invest*, **1998** Oct 1;102(7):1369-76.

[120] Çalgüneri M.: "Romatoid artrit", Hacettepe Universitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Romatoloji Bilim Dalı Ders Notları.

[121] Hwang IR, Hsu PI, Peterson LE, Gutierrez O, Kim JG, Graham DY, Yamaoka Y. : "Interleukin-6 genetic polymorphisms are not related to Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases", *Helicobacter* , **2003** Apr;8(2):142-8.

[122] Scapoli C, Mamolini E, Trombelli L.: " Role of IL-6, TNF-A and LT-A variants in the modulation of the clinical expression of plaque-induced gingivitis" , *J Clin Periodontol,* **2007** Dec;34(12):1031-8. Epub 2007 Oct 22.

Elektronik Kaynaklar

1. **http://tr.wikidoc.org/index.php/Romatoid_artrit**
2. **http://www.encyclopaedia.es/tr/wiki/Romatoid_artrit.html**
3. **www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/tez_ichastaliklari.asp - 50k**
4. **http://www.ambion.com/tools/pathway/protein_list_grp.php?pathway=IL-6%20Pathway&pname=SOCS1,SOCS2,SOCS3,SOCS4,SOCS5**
5. **http://bsknees.blogspot.com/2008/02/difference-between-rheumatoid-arthritis.html**
6. **http://tip.cumhuriyet.edu.tr/cutbat/kongre1sunumlar/cumartesi/cumhuriyet/cumhuriyetsunum5_dosyalar/slide0001.htm**
7. **http://video.about.com/arthritis/Chronic-Rheumatism-Knee.htm**
8. **www.arthritis.org/conditions/DiseaseCenter/ra.asp**

EKLER

Tablo IV.B.1.1.: Bazı Bireylerin Absorbans ve DNA Değerleri Sonuçları

RA HASTA LİSTESİ					RA HASTA LİSTESİ				
No	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260} / A_{280}**	**DNA Miktarı (µg/ml)**	**No**	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260} / A_{280}**	**DNA Miktarı (µg/ml)**
1	0.1807	0.1204	1,5	1807	45	0.1667	0.0980	1,7	1667
2	0.1426	0.0891	1,6	1426	46	0.1420	0.0946	1,5	1420
3	0.1278	0.0710	1,8	1278	47	0.1274	0.0796	1,6	1274
4	0.1271	0.0847	1,5	1271	48	0.1263	0.0842	1,5	1263
5	0.1100	0.0687	1,6	1100	49	0.1552	0.0862	1,8	1552
6	0.1448	0.1113	1,3	1448	50	0.1670	0.0878	1,9	1670
7	0.1203	0.0802	1,5	1203	51	0.2145	0.1261	1,7	2145
8	0.1378	0.0984	1,4	1378	52	0.1502	0.0834	1,8	1502
9	0.1253	0.0783	1,6	1253	53	0.1330	0.0738	1,8	1330
10	0.1759	0.1034	1,7	1759	54	0.1520	0.0894	1,7	1520
11	0.1411	0.0830	1,7	1411	55	0.1750	0.1166	1,5	1750
12	0.1239	0.0826	1,5	1239	56	0.2110	0.1406	1,5	2110
13	0.1323	0.0826	1,6	1323	57	0.1575	0.0984	1,6	1575
14	0.1603	0.0942	1,7	1603	58	0.1325	0.0946	1,4	1325
15	0.1567	0.0870	1,8	1567	59	0.1361	0.0907	1,5	1361
16	0.1288	0.0715	1,8	1288	60	0.1462	0.0913	1,6	1462
17	0.1330	0.0886	1,5	1330	61	0.1366	0.0910	1,5	1366
18	0.1301	0.0813	1,6	1301	62	0.1705	0.1065	1,6	1705
19	0.1360	0.0800	1,7	1360	63	0.1511	0.0889	1,7	1511
20	0.1361	0.0850	1,6	1361	64	0.1510	0.0833	1,8	1510
21	0.1462	0.0812	1,8	1462	65	0.1411	0.0736	1,9	1411
22	0.1366	0.0803	1,7	1366	66	0.1617	0.0888	1,8	1617
23	0.1705	0.0897	1,9	1705	67	0.1878	0.1174	1,7	1878
24	0.1578	0.0876	1,8	1578	68	0.1587	0.1000	1,6	1587
25	0.1697	0.1131	1,5	1697	69	0.1280	0.0812	1,6	1280
26	0.1498	0.0936	1,6	1498	70	0.1667	0.1133	1,5	1667
27	0.1680	0.1120	1,5	1680	71	0.1420	0.1000	1,4	1420
28	0.2032	0.1128	1,8	2032	72	0.1274	0.0684	1,9	1274
29	0.1664	0.0978	1,7	1664	73	01263	0.0722	1,8	1263
30	0.1426	0.0750	1,9	1426	74	0.1552	0.1142	1,4	1552

RA HASTA LİSTESİ					RA HASTA LİSTESİ				
No	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260} / A_{280}**	**DNA Miktarı (µg/ml)**	**No**	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260} / A_{280}**	**DNA Miktarı (µg/ml)**
75	0.1487	0.0929	1,6	1487	110	0.1411	0.0823	1,7	1411
76	0.1354	0.0904	1,5	1354	111	0.1239	0.0631	1,9	1239
77	0.2546	0.1591	1,6	2546	112	0.1271	0.0866	1,5	1271
78	0.2356	0.1385	1,7	2356	113	0.1234	0.0750	1,6	1234
79	0.1807	0.1204	1,5	1807	114	0.1498	0.0832	1,8	1498
80	0.1426	0.1018	1,4	1426	115	0.1680	0.0988	1,7	1680
81	0.1278	0.0798	1,6	1278	116	0.2032	0.1069	1,9	2032
82	0.1271	0.0706	1,8	1271	117	0.1664	0.1109	1,5	1664
83	0.1100	0.0647	1,7	1100	118	0.1426	0.0891	1,6	1426
84	0.1448	0.0905	1,6	1448	119	0.1616	0.1077	1,5	1616
85	0.1203	0.0802	1,5	1203	120	0.1799	0.1124	1,6	1799
86	0.1378	0.0810	1,7	1378	121	0.1163	0.0646	1,8	1163
87	0.1253	0.0737	1,7	1253	122	0.1283	0.0754	1,7	1283
88	0.1759	0.0972	1,8	1759	123	0.1480	0.0822	1,8	1480
89	0.1411	0.0783	1,8	1411	124	0.1244	0.0654	1,9	1244
90	0.1239	0.0774	1,6	1239	125	0.1625	0.1015	1,6	1625
91	0.1323	0.0778	1,7	1323	126	0.1388	0.0771	1,8	1388
92	0.1603	0.1001	1,6	1603	127	0.1285	0.0713	1,8	1285
93	0.1567	0.0870	1,8	1567	128	0.1280	0.0673	1,9	1280
94	0.1288	0.0757	1,7	1288	129	0.1667	0.0980	1,7	1667
95	0.1330	0.0738	1,8	1330	130	0.1420	0.0946	1,5	1420
96	0.1301	0.0765	1,7	1301	131	0.1274	0.0796	1,6	1274
97	0.1360	0.0850	1,6	1360	132	0.1263	0.0842	1,5	1263
98	0.1361	0.0850	1,6	1361	133	0.1552	0.0862	1,8	1552
99	0.1462	0.0812	1,8	1462	134	0.1670	0.0878	1,9	1670
100	0.1366	0.0805	1,7	1366	135	0.2145	0.1261	1,7	2145
101	0.1705	0.0947	1,8	1705	136	0.1502	0.0834	1,8	1502
102	0.1511	0.0795	1,9	1511	137	0.1330	0.0738	1,8	1330
103	0.1510	0.0755	2	1510	138	0.1520	0.0894	1,7	1520
104	0.1411	0.0742	1,9	1411	139	0.1750	0.1166	1,5	1750
105	0.1617	0.0951	1,7	1617	140	0.2110	0.1406	1,5	2110
106	0.1878	0.1043	1,8	1878	141	0.1575	0.0984	1,6	1575
107	0.1587	0.1133	1,4	1587	142	0.1325	0.0946	1,4	1325
108	0.1288	0.0805	1,6	1288	143	0.1361	0.0907	1,5	1361
109	0.1330	0.0886	1,5	1330	144	0.1462	0.0913	1,6	1462

RA HASTA LİSTESİ				
No	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260} / A_{280}**	**DNA Miktarı (µg/ml)**
145	0.1301	0.0929	1,4	1301
146	0.1360	0.0906	1,5	1360
147	0.1807	0.1129	1,6	1807
148	0.1426	0.0891	1,6	1426
149	0.1278	0.0852	1,5	1278
150	0.1271	0.0747	1,7	1271
151	0.1100	0.0785	1,4	1100
152	0.1448	0.0905	1,6	1448
153	0.1203	0.0802	1,5	1203
154	0.1378	0.0810	1,7	1378
155	0.1253	0.0783	1,6	1253
156	0.1759	0.1099	1,6	1759
157	0.1411	0.0940	1,5	1411
158	0.1462	0.0860	1,7	1462
159	0.1366	0.0803	1,7	1366
160	0.1705	0.0947	1,8	1705
161	0.1511	0.0944	1,6	1511
162	0.1510	0.1078	1,4	1510
163	0.1411	0.0881	1,6	1411
164	0.2110	0.1172	1,8	2110
165	0.1575	0.0984	1,6	1575
166	0.1325	0.0883	1,5	1325
167	0.1366	0.0910	1,5	1366
168	0.1705	0.1065	1,6	1705
169	0.1511	0.0889	1,7	1511
170	0.1510	0.0833	1,8	1510
171	0.1411	0.0736	1,9	1411
172	0.1617	0.0888	1,8	1617
173	0.1878	0.1174	1,7	1878
174	0.1587	0.1000	1,6	1587
175	0.1280	0.0812	1,6	1280
176	0.1667	0.1133	1,5	1667
177	0.1420	0.1000	1,4	1420
178	0.1587	0.0880	1,8	1587

SAĞLIKLI KONTROL LİSTESİ					SAĞLIKLI KONTROL LİSTESİ				
No	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260} / A_{280}**	**DNA Miktarı (µg/ml)**	**No**	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260} / A_{280}**	**DNA Miktarı (µg/ml)**
1	0.1301	0.0929	1,4	1301	33	0.1511	0.0944	1,6	1511
2	0.1360	0.0906	1,5	1360	34	0.1510	0.1078	1,4	1510
3	0.1807	0.1129	1,6	1807	35	0.1411	0.0881	1,6	1411
4	0.1426	0.0891	1,6	1426	36	0.2110	0.1172	1,8	2110
5	0.1278	0.0852	1,5	1278	37	0.1575	0.0984	1,6	1575
6	0.1271	0.0747	1,7	1271	38	0.1325	0.0883	1,5	1325
7	0.1100	0.0785	1,4	1100	39	0.1366	0.0910	1,5	1366
8	0.1448	0.0905	1,6	1448	40	0.1705	0.1065	1,6	1705
9	0.1203	0.0802	1,5	1203	41	0.1511	0.0889	1,7	1511
10	0.1378	0.0810	1,7	1378	42	0.1510	0.0833	1,8	1510
11	0.1253	0.0783	1,6	1253	43	0.1411	0.0736	1,9	1411
12	0.1759	0.1099	1,6	1759	44	0.1617	0.0888	1,8	1617
13	0.1411	0.0940	1,5	1411	45	0.1878	0.1174	1,7	1878
14	0.1462	0.0860	1,7	1462	46	0.1587	0.1000	1,6	1587
15	0.1366	0.0803	1,7	1366	47	0.1280	0.0812	1,6	1280
16	0.1705	0.0947	1,8	1705	48	0.1667	0.1133	1,5	1667
17	0.1511	0.0944	1,6	1511	49	0.1420	0.1000	1,4	1420
18	0.1510	0.1078	1,4	1510	50	0.1587	0.0880	1,8	1587
19	0.1411	0.0881	1,6	1411	51	0.1278	0.0852	1,5	1278
20	0.2110	0.1172	1,8	2110	52	0.1271	0.0747	1,7	1271
21	0.1575	0.0984	1,6	1575	53	0.1100	0.0785	1,4	1100
22	0.1325	0.0883	1,5	1325	54	0.1448	0.0905	1,6	1448
23	0.1420	0.1000	1,4	1420	55	0.1203	0.0802	1,5	1203
24	0.1274	0.0684	1,9	1274	56	0.1378	0.0810	1,7	1378
25	01263	0.0722	1,8	1263	57	0.1253	0.0783	1,6	1253
26	0.1552	0.1142	1,4	1552	58	0.1759	0.1099	1,6	1759
27	0.1670	0.1062	1,6	1670	59	0.1411	0.0940	1,5	1411
28	0.2145	0.1400	1,5	2145	60	0.1462	0.0860	1,7	1462
29	0.1502	0.0789	1,9	1502	61	0.1366	0.0803	1,7	1366
30	0.1330	0.0722	1,8	1330	62	0.1705	0.0947	1,8	1705
31	0.1520	0.0937	1,6	1520	63	0.1511	0.0944	1,6	1511
32	0.1750	0.1285	1,4	1750	64	0.1510	0.1078	1,4	1510
33	0.1878	0.1117	1,7	1878	65	0.1411	0.0881	1,6	1411
34	0.1587	0.0880	1,8	1587	66	0.2110	0.1172	1,8	2110
35	0.1378	0.0810	1,7	1378	67	0.1575	0.0984	1,6	1575
36	0.1253	0.0783	1,6	1253	68	0.1325	0.0883	1,5	1325

SAĞLIKLI KONTROL LİSTESİ					SAĞLIKLI KONTROL LİSTESİ				
No	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260} / A_{280}**	**DNA Miktarı (µg/ml)**	**No**	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260} / A_{280}**	**DNA Miktarı (µg/ml)**
69	0.1759	0.1099	1,6	1759	100	0.1301	0.0929	1,4	1301
70	0.1411	0.0940	1,5	1411	101	0.1360	0.0906	1,5	1360
71	0.1462	0.0860	1,7	1462	102	0.1807	0.1129	1,6	1807
72	0.1366	0.0803	1,7	1366	103	0.1426	0.0891	1,6	1426
73	0.1705	0.0947	1,8	1705	104	0.1278	0.0852	1,5	1278
74	0.1511	0.0944	1,6	1511	105	0.1271	0.0747	1,7	1271
75	0.1510	0.1078	1,4	1510	106	0.1100	0.0785	1,4	1100
76	0.1411	0.0881	1,6	1411	107	0.1448	0.0905	1,6	1448
77	0.2110	0.1172	1,8	2110	109	0.1203	0.0802	1,5	1203
78	0.1575	0.0984	1,6	1575	110	0.1271	0.0747	1,7	1271
79	0.1325	0.0883	1,5	1325	111	0.1100	0.0785	1,4	1100
80	0.1366	0.0910	1,5	1366	112	0.1448	0.0905	1,6	1448
81	0.1705	0.1065	1,6	1705	113	0.1203	0.0802	1,5	1203
82	0.1511	0.0889	1,7	1511	114	0.1378	0.0810	1,7	1378
83	0.1510	0.0833	1,8	1510	115	0.1253	0.0783	1,6	1253
84	0.1411	0.0736	1,9	1411	116	0.1759	0.1099	1,6	1759
85	0.1617	0.0888	1,8	1617	117	0.1411	0.0940	1,5	1411
86	0.1878	0.1174	1,7	1878	118	0.1462	0.0860	1,7	1462
87	0.1587	0.1000	1,6	1587	119	0.1366	0.0803	1,7	1366
88	0.1280	0.0812	1,6	1280	120	0.1705	0.0947	1,8	1705
89	0.1587	0.0880	1,8	1587	121	0.1511	0.0944	1,6	1511
90	0.1278	0.0852	1,5	1278	122	0.1510	0.1078	1,4	1510
91	0.1271	0.0747	1,7	1271	123	0.1411	0.0881	1,6	1411
92	0.1100	0.0785	1,4	1100	124	0.2110	0.1172	1,8	2110
93	0.1448	0.0905	1,6	1448	125	0.1575	0.0984	1,6	1575
94	0.1203	0.0802	1,5	1203	126	0.1325	0.0883	1,5	1325
95	0.1378	0.0810	1,7	1378	127	0.1274	0.0684	1,9	1274
96	0.1253	0.0783	1,6	1253	128	01263	0.0722	1,8	1263
97	0.1759	0.1099	1,6	1759	129	0.1552	0.1142	1,4	1552
98	0.1411	0.0940	1,5	1411	130	0.1670	0.1062	1,6	1670
99	0.1462	0.0860	1,7	1462	131	0.2145	0.1400	1,5	2145

ÖZGEÇMİŞ

10 Nisan 1983 yılında Gölcük'te dünyaya geldim. 1989 yılında Gölcük Piri Reis ilkokulunda başladığım ilköğretimimi 1994 yılında Çanakkale 18 Mart İlköğretim okulunda tamamladım. Aynı yıl Çanakkale Merkez Ortaokulunda Ortaöğrenimime başladım ve 1997 yılında mezun oldum. 1997 yılının Eylül ayında Kdz.Ereğli Yabancı Dil Ağırlıklı L isesine kayıt olarak öğrenimimi 2001 senesinde tamamladım. 2002 yılının Ekim ayında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümüne kayıt oldum ve 2007 yılının Haziran ayında biyoloji öğretmeni olarak mezun oldum. 1997 yılının Ekim ayında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Programına kaydoldum. Üniversite eğitimim sırasında Çamlıca Kız Lisesi ve Özel dersanelerde stajyer öğretmenlik yaptım Aynı zamanda 2004-2007 yılları arasında Marmara Üniversitesi Doğa Bitkileri ve Su Ürünleri Araştırma Merkezinde ve 2007-2009 Moleküler Biyoloji ve Hücre Kültürü Laboratuarında kismi zamanlı olarak çalıştım.