

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**ROMATOİD ARTRİTTE TOLL-LİKE RESEPTÖR
POLİMORFİZMLERİ VE OTOANTİKOR POZİTİFLİKLERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

EBRU ETEM ÖNALAN

ELAZIĞ – 2009

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Hüseyin YÜCE

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halit ELYAS

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Hüseyin YÜCE

Prof.Dr. Halit ELYAS

Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL

Prof.Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN

Yrd.Doç.Dr. Yasemin BULUT

TEŞEKKÜR

Mesleki gelişimim, tezimin seçim ve hazırlanmasındaki önemli katkılarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Halit ELYAS'a ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YÜCE'ye, hasta takibinde titiz yaklaşımlarından ve eğitimime katkılarından dolayı Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Salih ÖZGÖÇMEN'e ve İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN'na, Uzm. Dr. Arefe YILDIRIM'a, çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Deniz EROL'a, Araş. Gör. Şükriye Derya DEVECİ'ye, sağlık teknikerimiz Mehmet SATILMIŞ'a ve temizlik personelimiz Mehmet GİRİŞ'e, desteklerinden dolayı eşim Fatih ÖNALAN'a ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1 Otoimmün romatoid hastalıklar	5
3.2. Romatoid Artrit	5
3.2.1. Etyoloji	6
3.2.1.1. Genetik faktörler	6
3.2.1.2. Hormonal Faktörler	6
3.2.1.3. Enfeksiyöz Ajanlar	7
3.2.1.4. Diğer risk faktörleri	7
3.2.2. Patogenez	8
3.2.3. Tanı	10
3.2.4. Klinik	10
3.2.4.1. Ekstra artiküler bulgular	11
3.2.5. Mortalite	12
3.2.6. Ayırıcı Tanı	12
3.2.7. Laboratuvar bulgular	12
3.2.7.1. Romatoid faktör	12
3.2.7.2. Hematolojik bulgular	13
3.2.7.3 C-Reaktif Protein	13
3.2.8. Görüntüleme	14
3.2.9. Tedavi	14
3.2.9.1. Birinci basamak tedavi	15
3.2.9.2. İkinci basamak tedavi	15
3.2.9.3. Yeni tedaviler	15
3.2.9.4. Kombinasyon tedavisi	15
3.2.10. Romatoid artritte otoantikorlar	16
3.2.10.1. Spesifik olmayan otoantikorlar	16
3.2.10.2. Spesifik otoantikorlar	17

3.3. Toll like reseptörler	19
3.3.1. TLR ve ligandları	22
3.3.2. TLR3	24
3.3.3. TLR4	24
3.3.4. TLR9	25
3.3.5. TLR10	25
3.4. Polimorfizmler ve hastalıklarla ilişkileri	26
3.4.1. Genetik varyasyon ve polimorfizm	26
3.4.2. TLR polimorfizmlerinin hastalıklarla ilişkileri	27
3.5. TLR ve Otoimmün Hastalıklar	28
3.5.1. TLR ve Romatoid Artrit	30
3.5.2. TLR polimorfizmleri ve Romatoid Artrit	30
3.6. Çalışmanın amacı	32
4. GEREÇ VE YÖNTEM	33
4.1. Çalışma Grubu	33
4.2. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan gereçler	33
4.3. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan kimyasallar	34
4.4. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan çözeltiler	35
4.5. DNA izolasyon işlemi	36
4.5.1. Kullanılan solüsyon ve gereçler	36
4.5.2. İzolasyon aşamaları	36
4.5.3. DNA Konsantrasyonu ve Safılık Derecesinin Ölçülmesi	37
4.6. PZR çalışması	38
4.6.1. PZR materyalleri	38
4.6.2. Restriksiyon enzimleri	38
4.6.3. Polimorfizmlerin belirlenmesi	39
4.6.3.1. TLR3 genindeki rs3775290 (377 C/T) polimorfizminin çalışılması	39
4.6.3.2. TLR4 genindeki rs4986790 (Asp299Gly) ve rs4986791 (Thr399Ile)	39
polimorfizmlerinin çalışılması	
4.6.3.2.1. Asp299Gly polimorfizmi	39
4.6.3.2.2. Thr399Ile Polimorfizmi	40
4.6.3.3. TLR9 genindeki rs187084 (-1237 T/C) polimorfizminin çalışılması	40
4.6.3.4. TLR10 genindeki rs4129009 (2322A/G, Exon 3 (I775V) polimorfizminin	42

çalışılması	
4.6.4. PZR Kurulması İşlemi	44
4.6.5. PZR Koşulları	44
4.7. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	44
4.8. Agaroz Jel Elektroforezi	45
4.9. Romatid Artritli Hastaların Serum Örneklerinde Otoantikörlerin Çalışılması	45
4.9.1. Anti-RNP çalışılması	46
4.9.2. Anti-CCP çalışılması	46
4.9.3. Anti-Kollojen tip II çalışılması	46
4.10. İstatistik analizler	46
5. BULGULAR	47
5.1. Hasta ve Kontrollerde TLR3 rs3775290 (1377 C/T) Polimorfizm Dağılımları	48
5.2. Hasta ve Kontrollerde TLR4 rs4986790 (Asp299Gly) ve rs4986791 (Thr399Ile)	49
Polimorfizm Dağılımları	
5.3. Hasta ve Kontrollerde TLR9 rs187084 (-1237 T/C) Polimorfizm Dağılımları	52
5.4. Hasta ve Kontrollerde TLR10 rs4129009 (2322A/G, Exon 3 (I775V) Polimorfizm	56
Dağılımları	
6. TARTIŞMA	60
6.1. Öneriler	75
7. KAYNAKLAR	78
8. EKLER	90
8.1. Bilgilendirilmiş hasta onay formu	90
9. ÖZGEÇMİŞ	91

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: Toll-like reseptörler ve ligandları	23
Tablo 2: TLR9 genine ait rs187084 (-1237, T/C) polimorfizmi için dizayn edilen primerler ve BspTI(AflII) restriksiyon enzim kesim bölgesi	41
Tablo 3: TLR10 genine ait rs4129009 polimorfizmi için dizayn edilen primerler ve VspI restriksiyon enzim kesim bölgesi	42
Tablo 4: Hastaların demografik ve klinik özellikleri	47
Tablo 5: TLR-3 1377 C/T polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları	48
Tablo 6: TLR-4 Asp299Gly polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları	50
Tablo 7: TLR-4 Thr399Gly polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları	51
Tablo 8: TLR-9 rs187084 (-1237, T/C) polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları	53
Tablo 9: TLR9 genotipleri ve tedavi öncesi CRP ve RF değer dağılımları	53
Tablo 10: TLR9 genotiplerinin aktif ve inaktif gruplardaki dağılımları	54
Tablo 11: TLR-10 +2322 A>G polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları	57
Tablo 12: TLR-10 +2322 A>G polimorfizm genotipleri ve ortalama hastalık süresi dağılımları	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: TLR3 genindeki rs3775296 (1377 C/T) polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü	49
Şekil 2: TLR4 genindeki Asp299Gly polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü	51
Şekil 3: TLR4 genindeki Thr399Gly polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü	52
Şekil 4: TLR9 genindeki rs187084 (-1237, T/C) polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü	54
Şekil 5: TLR9 genindeki rs187084 (-1237, T/C) polimorfizmi için CC genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (gccC↓TTAAGaag).	55
Şekil 6: TLR9 genindeki rs187084 (-1237, T/C) polimorfizmi için TT genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (gccC↓TTAAGaag).	55
Şekil 7: TLR10 genindeki +2322 A>G polimorfizm için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü	58
Şekil 8: TLR10 genindeki +2322 A>G polimorfizm için AA genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (gctAT↓TAATggt).	59
Şekil 9: TLR10 genindeki +2322 A>G polimorfizm için GG genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (gctGT↓TAATggt).	59

KISALTMALAR LİSTESİ

ACR	: American College of Rheumatology
AFA	: Anti-filagrin antikorları
AKA	: Antikeratin antikorları
ANA	: Nükleer antikorlar
ANCA	: Anti nötrofil sitoplazmik antikorlar
Anti-CCP	: Cyclic citrullinated peptides
Anti-hnRNP	: Anti-heteronükleer ribonükleoprotein
APF	: Antiperinükleer faktör
CpG	: Sitozin nükleotidi-fosfat bağı-guanin nükleotidi
CRP	: C reaktif protein
DMARD	: Disease-modifying antirheumatic drugs
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim bağı immunosorban tekniği)
ESH	: Eritrosit sedimentasyon hızı
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPI	: Glukoz – 6 fosfat izomeraz
HAQ	: Health Assessment Questionnaire
HLA	: Human leukocyte antigen
Htc	: Hemotokrit
IFN	: Interferon
IL	: İnterlökin
İF	: İnterfalangeal
MHC	: Major histocompatibility complex
MKDH	: Mikst konnektif doku hastalığı

MKF	: Metakarpofalangeal
MTF	: Metatarsofalangeal
MTF	: Metatarsofalangeal
MTX	: Metotreksat
NF-kB	: Nuklear faktör-kappa beta
NSAİİ	: Nonsteroid anti inflamatuvar ilaçlar
PAD	: Peptidilarginin deiminaz
PAMP	: Patogen associated molecular pattern
PBMC	: Peripheral blood mononuclear cell
PG-PS	: Peptidoglycan-polysaccharide complexes
PIF	: Proksimal interfalangeal
RA	: Romatoid artrit
RAİ	: Ritchie artiküler indeksi
RF	: Romatoid faktör
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SD	: Standart deviasyon
SEMS	: Sharp-eklem mesafesi skoru
SLE	: Sistemik Lupus Eritamatozus
SNP	: Single nucleotid polymorphism
SS	: Sistemik Sklerozis
SS	: Sjögren Senromu
TBE	: Tris-borik asit-EDTA tamponu
TH	: T helper
TLR	: Toll like reseptör
TNF	: Tümör nekrozis faktör

UTR	: Untranslated region
VAS	: Visüel analog skala
WHO	: Dünya sağlık örgütü

1.ÖZET

Primer olarak eklemleri etkileyen kronik, inflamatuvar bir hastalık olan romatoid artrit (RA) altta yatan mekanizmalar tam aydınlatılmamış olmakla birlikte bilişsel fonksiyonları olumsuz yönde etkilemektedir. RA etyolojisinde makrofajlar ve dentritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin büyük önemi vardır. Bu hücreler doğal ve kazanılmış immün cevapta görevli Toll-like Reseptörler (TLR) olarak adlandırılan reseptörlere sahiptirler. Bu çalışma RA'li hastalarda TLR3, TLR4, TLR9 ve TLR10 genlerindeki polimorfizm sıklıklarının belirlenmesi; polimorfizmler ile RF, kollajen tip II, anti-RNP ve anti-CCP gibi otoantikor pozitiflikleri arasındaki ilişkilerin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmaya American College of Rheumatology remission criteria (ACR) karşılayan değişik derecelerde hastalık aktivitesi gösteren RA'li 100 hasta ve eklem rahatsızlığı olmayan yaş ve cinsiyet olarak benzer 100 sağlıklı kontrol dahil edildi. DNA izolasyonu, hasta ve kontrol grubunun periferik kan örneklerinden standart yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada TLR3 rs3775290, TLR4 rs4986790 ve rs4986791, TLR9 rs187084 ve TLR10 rs4129009 polimorfizmleri Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Serum otoantikor düzeyleri kantitatif ELISA kullanılarak ölçüldü.

Hasta ve kontrol grubu arasında TLR4 genindeki Asp299Gly ($p=0.02$) ve Thr399Ile allel ($p=0.05$) sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık vardı. Her iki allel sıklığının da hasta grubunda artmış olduğu belirlendi. Hasta ve kontrol arasında TLR9 genotipleri ve allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p= 0.01$, $p= 0.00$). TLR9 C alleli RA gelişimine karşı koruyucu bir faktör

olarak bulundu. RA ve kontrol grubu arasında TLR3 ve TLR10 genotip ve allel sıklıkları açısından istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

İnflamasyon sonucu oluşan doku hasarı, feed back mekanizmalarla, TLR aracılı proinflamatuvar sitokinlerin sürekli üretimine neden olarak RA'daki kronik inflamasyonun temel nedenlerinden biri olabilir. RA'da artmış TLR4 mutant allellerinin ve azalmış TLR9 C allellerinin, RA için yüksek risk ile beraberlik gösterdiğini düşünmekteyiz. Çalışmada elde edilen verilerin doğrulanabilmesi için farklı toplumlarda RA riski açısından TLR gen polimorfizmlerinin incelenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Romatoid artrit, Toll-like reseptör, polimorfizm

2.ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) which is a chronic, inflammatory disease affecting primarily the joints influences cognitive functions negatively, although the underlying mechanisms have not been clarified yet. There is an important role of antigen-presenting cells (APCs) such as macrophages and dendritic cells (DCs) in RA etiology. These cells have some receptors known as Toll Like receptor (TLR), responsible for innate and adaptive immune response. This study is conducted to investigate TLR3, TLR4, TLR9 and TLR10 polymorphism frequency and to detect between polymorphisms and autoantibody positive as RF, kollajen tip II, anti-RNP ve anti-CCP in patient group.

In this study, 100 RA subjects according to the American College of Rheumatology remission criteria (ACR), ranging with varying degrees of disease activity and a control group of 100 healthy subjects matched by age and sex, without any joint diseases were evaluated. DNA isolation was performed from using conventional methods from peripheral blood samples of RA and control group. The detection of all polymorphisms was used Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method. In this study was evaluated TLR3 rs3775290, TLR4 rs4986790 and rs4986791, TLR9 rs187084 and TLR10 rs4129009 polymorphisms. Serum autoantibody level was measured using quantitative ELISA.

There was statistically significant differences between patients and control groups with regard to TLR4 gene Asp299Gly ($p=0.02$) and Thr399Ile allele frequencies ($p=0.05$). We detected the increased frequency for two allele in patients group. Statistically significant difference for TLR9 genotype between

patients and control group was seen. TLR9 C allele was found to be a protective factor against developing RA. It was found no statistically significant differences in the TLR3 and the TLR10 genotype or allele distribution between RA patients and control individuals.

Tissue damage resulted inflammation may be a cause of chronic inflammation in RA the released proinflammatory cytokine by TLR with feed back mechanism. We consider that the increased TLR4 mutant allele and the decreased TLR9 C allele was associated with a higher risk of RA. Further studies are required to explore the role of TLR gene polymorphisms in the risk of RA, especially in ethnically different populations to confirm our results.

Key Words: Rheumatoid arthritis, Toll-like receptor, polymorphism

3. GİRİŞ

3.1. Otoimmün romatoid hastalıklar

Otoimmun hastalıklar toplumun %3-5'ini etkilemekte yaşlılarda ve kadınlarda daha fazla görülmektedir. Bu hastalık grubunun genel özelliği otoantikorların varlığıdır. Sistemik Lupus Eritematozus (SLE), Romatoid Artrit (RA), Sjögren Sendromu (SS), ve Sistemik Sklerozis (skleroderma, SS) otoimmun romatoid hastalıklardır (52).

3.2. Romatoid artrit

RA nedeni bilinmeyen, primer olarak eklemleri etkileyen, kronik inflamasyon ile karakterize sistemik bir hastalıktır (51). Romatoid artrit terimi ilk defa 1859 yılında Garrot tarafından kullanılmıştır. 1940'lı yıllarda Waaler ve Rose tarafından romatoid faktörün bulunması ve bunu izleyen gelişmeler RA'de otoimmün mekanizmaların rolünü ortaya çıkarmıştır (49).

RA, dünya genelinde bütün ırklarda farklı oranlarda görülmektedir. Çeşitli prevalans çalışmalarında %0.3 ile %1.5 arasında değerler elde edilmiştir. RA'nın prevalansı her iki cinsiyette yaş ile artar. Prevalans 35 ile 45 yaşları arasında pik yapmaktadır. Kadın/Erkek görülme oranı 2/1- 4/1 arasında değişmekte olup ortalama 3/1 oranı kabul edilebilir. Yaş ilerledikçe cinsiyet farkı azalır. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda RA'in yıllık insidansı, kadınlarda erkeklerden daha yüksek (0.2/1000 – 0.4/1000) bulunmuştur (50).

3.2.1 Etioloji

3.2.1.1. Genetik faktörler

Dizigotik ikizlere oranla monozigotik ikizlerde RA birlikte görülme sıklığının daha yüksek olmasına ve aile bireylerinde kümeleşme ve risk artışının daha fazla oranda görülmesine dayanarak RA etiopatogenezinde kalıtsal bir unsurun rol oynadığı düşünülmektedir (21, 51, 98). Değişik topluluklarda RA ile ilişkili birkaç farklı İnsan Lökosit Antijen (Human leukocyte antigen; HLA)-DRB1 allelleri saptanmıştır (21). RA predispozisyonu ve HLA gen kompleksi arasında güçlü bağlantı ve ilişkiler olduğu gösterilmiştir. HLA-Klass II molekülleri çeşitli immün olayları peptit bağlama, CD4+ T hücrelerinin seçimi ve T hücre bağımlı cevapların periferik aktivasyonu gibi mekanizmalarla düzenlenmektedir. RA ile ilişkili DR4 molekülleri hastalık üzerinde etkili her üç basamağı da ilgilendiren mekanizmalara ait karmaşık özellikler sergilemektedir (33). Çok değişkenli analizler sayesinde HLA-DR4 allellerinde paylaşılan epitop varlığı, seropozitivite ve cinsiyetin RA’de eklem erozyonlarını etkileyen nedenler olduğu anlaşılmıştır (21, 51). Son zamanlarda pek çok immün sistem hücresi tarafından sentezlenen Toll like reseptörler (TLR)’in de RA genetiğinde önemli roller oynayabileceği belirtilmektedir (127).

3.2.1.2. Hormonal faktörler

Hastalığın etiopatogenezinde üzerinde durulmakta olan konulardan biri, hormonal faktörlerin rolüdür. RA’ın kadınlarda erkeklerden daha yaygın görülmesi, gebelik sırasında hastalığın düzelmesi, RA’lı erkeklerin düşük serum testosteron düzeylerine sahip olmaları, hormonal faktörlerin RA’ın şiddetini veya

oluşumunu etkilediğini gösteren dolaylı kanıtlardır. RA'li kadınların fertilité oranları daha düşüktür. Gebelikle ilişkili α glikoproteinin RA'in aktivitesi ile ters orantılıdır. Emzirme döneminde prolaktinin yüksek seviyesi proenflamatuar etkiye sahip olabilir. RA'de seks hormonlarının Interlökin-1 (IL-1) gibi stokinlerin yapımı üzerine etkileri önemlidir (43, 51). Doğal immünite mikroorganizmalara karşı ilk immün cevabın oluşmasını sağlamakta ve daha sonra kazanılmış bağışıklık gelişmektedir. Bu bağışıklıkta özellikle TH1 hücre cevabı oluşmaktadır (117). RA'de Faz 2 ve 3 TH1 ile karakterizedir. CD1 hücreler özellikle antimikrobial immünitede önemli olup TH1 cevabını başlatmaktadır (10). Estrojenlerin de hüморal immün cevabı arttırdığı bilinmektedir (87).

3.2.1.3. İnfeksiyöz ajanlar

Hastalığın nedeni olarak infeksiyöz organizmaları tanımlamak için yoğun çabalara rağmen RA'in infeksiyöz etyolojisi için yeterli kanıt mevcut değildir. RA için olası infeksiyöz ajanlardan, Gram (+) koklar, mikobakteriler, Proteus, E. coli, Mikoplazma vb. bakteriler ve Epstein-Barr virüs, Parvo virüs B19, Retro virüs, Cytomegalovirus, Rubella, Hepatit B, Hepatit C vb. virüsler sayılabilir (56, 98). TLR'ler yukarıda adı belirtilen pek çok farklı infeksiyöz ajanın tanınmasından ve bunlara karşı konakçı immün cevabının oluşturulmasından sorumludurlar (35).

3.2.1.4. Diğer risk faktörleri

Romatoid Faktör (RF) pozitif olan bireylerde RA gelişme riski yüksektir ve riskin büyüklüğü RF titresi ile artmaktadır. Bunun dışında paylaşılmış

epitopların taşınımı, ısı şok proteinleri, obezite, sigara içimi, düşük serum antioksidanları, yüksek serum kolesterolü vb. faktörler RA riskini artırmaktadır (51).

3.2.2. Patogenez

RA sistemik bir hastalık olarak kabul edilmekle birlikte hastalığın karakteristik özelliği sinovia ve fonksiyonlarındaki bozulmadır. RA’de sinovyumun histopatolojik yapısı değişir. Patolojik değişiklikler sırasında önce sinovial membran ödematöz bir hal alır ve yeni kan damarları oluşumu (anjioenez) gözlenir (138). RA sinovyumunda bulunan makrofaj, fibroblast ve lenfosit gibi çeşitli hücreler yeni damar oluşumlarını artırır. Sinovit kronik döneme doğru ilerledikçe intimaadaki hücre hiperplazisi belirgin hale gelir. Hem tip A hem de tip B sinovial hücreler artar, destrüktif bir doku oluşur. Bu dokuya pannus denir. Tip B sinoviositler pannusun ana hücre grubudur. Romatoid eklemden tip B sinoviositlerde aşırı miktarda sinovial sıvı üretilmektedir (42). İntima tabakasındaki bu hücre artışının yanında, subintima tabakasında da hücre artışı çok fazladır. Bu tabakada çok belirgin olarak T hücreleri, B hücreleri, makrofaj ve plazmositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu vardır. T hücreleri içerisinde en fazla CD4+ T hücreleri görülür. Romatoid sinovyumda tutulan iki major hücre grubu, T hücreleri ve makrofajlardır. Aktive T hücreleri lenfokinler aracılığıyla monosit/makrofajları uyarırlar ve monokinler, büyüme faktörleri ve diğer inflamatuvar mediyatörler salınırlar. T lenfositler, RA’in inflamatuvar sürecinde kritik rol oynarlar (134). Pannus, sinoviumun kıkırdak ve kemikle birleştiği bölgede bulunan hiperplastik karakterde, damardan zengin bir

doku olup komşu kemiğe ve kartilaja invaze olur (42, 107). Yüzeyinde invaziv hücreler vardır ve bunlar destrüktif metalloproteinaz enzimini kodlayan mRNA içerirler (14). Son zamanlarda, birçok çalışma RA’de eklem dekstruksiyonu ve inflamasyonunda sitokinlerin anahtar rol oynadıklarını göstermektedir. RA sinovyumunda mevcut olan önemli sitokinler; Interferon- γ (IFN- γ), IL-1, 6, 8, IL-1 β , Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) dir. IL-1, IL-6, TNF- α ve TNF- β artiküler kartilaj ve kemik üzerinde direkt olarak tahribata yol açarlar (140).

İnflamasyon ve doku hasarında rol oynayan IL-1 anahtar mediatörlerden biridir. Sinovia hücreleri ve makrofajlar başta olmak üzere mononükleer hücrelerde üretilirler. IL-1 potent bir şekilde kemik rezorpsiyonuna neden olur (78). Kollojen ve prostaglandinlerin sinovial hücrelerden sentezini artırır, B ve T hücre kemotaksisini sağlar.

İmmüitenin ve inflamasyonun en önemli mediatörü TNF- α ’dır. TNF- α monositlerden salınır ve RA’li hastaların sinovial sıvılarında, dokularında ve serumlarında yüksek orandadır (13). B hücrelerinin makrofaj türevli TNF- α salınımı için önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (63). TNF- α RA’de görülen karakteristik kıkırdak ve kemik erozyonlarından sorumludur. TNF- α başta IL-1 olmak üzere diğer sitokinlerin salınımına da yol açmaktadır (78, 98).

TNF- α , ve IL-1 sinovial fibroblastları ve kondrositleri invitro olarak stimüle ederek kemik ve kıkırdak yıkımını katalizleyen matriks metalloproteinazların sentezine neden olurlar (14, 45). IL-6 ve IFN- γ da kollojenaz aktivitesini azaltırlar. Metalloproteinazlar’dan özellikle stromelisin ve kollojenaz konnektif doku hasarına neden olmaktadır (14, 78).

Sitokinlerin lokal olarak sekresyonunu ve mikroçevrede immün yanıt hücrelerinin aktivasyonunu sistemik bir reaksiyon izler. Eklem dışı dokuların tutulumunun sonucu olarak endokrin sistem ve sinir sistemi RA patofizyolojisinde direkt olarak rol oynar. Endokrin sistemin mediatörlerinin (steroid hormonlar) ve periferik sinir sisteminin mediatörlerinin (norepinefrin ve substans-P) sinovial hedef hücrelere ulaşması ile bu iki sistemin RA'ın lokal inflamatuvar işlemleri üzerindeki 'geri-besleme' etkisi başlar (34).

3.2.3. Tanı

Hastalığın tanısında 1987'de revize edilen American Collage of Rheumatology (ACR) kriterleri kullanılmakta olup, %90'ın üzerinde özgüllüğü ve duyarlılığı bulunmaktadır.

1987 ACR Sınıflandırma Kriterleri; Eklemlerde en az bir saat süren sabah tutukluluğu, en az üç ya da daha fazla eklemden doktor tarafından gözlenen yumuşak doku şişliği, proksimal interfalangeal, metakarpofalangeal ve el bilek eklemlerinin şişliği, simetrik artrit, romatoid nodüller, romatoid faktör pozitifliği ve radyolojik erozyonlar ve/veya el veya bilek eklemlerinde periartiküler osteopeni şeklindedir. İlk dört kriter en az altı hafta süresince mevcut olmalıdır. Dört veya daha fazla kriterin varlığında RA tanısı konur (106).

3.2.4. Klinik

RA tipik olarak öncelikle el, el bileği ve ayak eklemlerini daha sonra diz, ayak bileği, kalça, dirsek ve omuz eklemlerini tutabilen kronik, simetrik bir poliartrittir (106). Klinik seyir kendi kendini zaman içinde sınırlayan artrit

tablosundan, hızla ilerleyen sistemik tutulum gösteren ağır ve yaşam süresini kısaltan forma kadar geniş bir varyasyon gösterir (11).

Sabah tutukluluğu inflamatuvar artritlerin belirleyici özelliğidir. Tutukluluk uykudayken interstisyel sıvının birikmesinden dolayı, uykudan sonra çok belirgindir. Ağrı RA'li hastaların çoğunda majör problemdir. Eklem şişliği, el ve ayakların küçük eklemlerinde çok belirgindir. Sinovial proliferasyon genellikle proksimal interfalangeal (PIF), metakarpofalangeal (MKF), dirsek, ayak bileği, metatarsofalangeal (MTF) ve diz eklemlerinde görülür. Kalça ve omuz eklemlerindeki şişliği şiddetli olmadıkça fizik muayene ile ortaya çıkarmak zor olabilir. Efüzyonda eklem fleksiyonuyla basınç arttığından, sinoviyum artiküler yapılar arasında zorlanabilir ve Baker kisti oluşabilir. Baker kisti en sık dizde görülmekle beraber diğer periferik eklemlerde de görülebilir. Eklem kısıtlılığı artiküler yüzey hasarı, eklem ve tendon kılıflarının şişmesi ve eklemi destekleyen yapıların değişikliği sonucu ortaya çıkar. Artiküler ve destekleyici yapıların inflamatuvar süreç sonucunda hasarlanmasıyla zamanla eklemde deformite gelişir. RA'li hastalarının %10'undan büyük bir kısmında, hastalığın ilk iki yılı içinde ellerin küçük eklemlerinde deformite gelişir. Deformiteler geliştikten sonra kalıcı olduklarından, erken tedaviye başlamak önemlidir (106).

3.2.4.1. Ekstra artiküler bulgular

RA primer olarak eklemleri etkileyen, ancak ekstraartiküler tutulum da gösteren sistemik bir hastalıktır. Hematolojik, nörolojik, kaslar, pulmoner, kardiyak, hepatik, göz ve renal tutulum görülebilmektedir. Amiloidoz, romatoid

nodüller ve vaskülit te RA hastalarında karşılaşılan ekstra artiküler bulgular arasındadır (96, 98, 144).

3.2.5. Mortalite

RA'li hastalarda mortaliteye yol açan ana sebep olarak kardiyovasküler ölüm düşünülmektedir. Diğer mortalite nedenleri, poliartiküler eklem tutulumu, eklem erozyonları ve deformiteler, enfeksiyonlar, renal hastalıklar ve tedavi komplikasyonlarıdır (51, 62).

3.2.6. Ayırıcı tanı

Romatoid artrit tanısı konmadan önce, ekarte edilmesi gereken hastalıklar; diffüz konnektif doku hastalıkları, gut, psödogut, infeksiyöz artritler, polimiyaljika romatika, glukokortikoid artrit, artroz, sarkoidoz, akut eklem romatizması, malignite, seronegatif artropatilerdir (49).

3.2.7. Laboratuvar bulguları

RA'e özgü bir laboratuvar bulgusu olmamasına karşılık genel laboratuvar bulguları tanı koyma, prognoz ve uygulanacak tedavide yol göstericidir. Laboratuvar testlerinden bazıları hastalığın inflamatuvar özelliğine bağlı olarak anormal olabilir (65).

3.2.7.1. Romatoid faktör

RA'in tanı kriterleri arasında yer alan tek laboratuvar bulgusu olan RF, kısaca IgG'nin Fc parçası ile reaksiyona giren otoantikorlar olarak tanımlanabilir.

Klinikte rutin olarak bakılan romatoid faktörler IgM yapısındadır. IgG, IgA ve IgE sınıfından romatoid faktörler de tanımlanmıştır.

RA hastalarının 3/4'ünde RF testi pozitifdir. Romatoid faktör RA'e özgün değildir ve birçok hastalıkta pozitif olabilir. Seropozitif olan kişilerde hastalığın seyri daha ağır, erozyon gelişimi daha fazla ve vaskülit, nodül ve nöropati gibi eklem dışı komplikasyonlar daha sıktır (30, 106).

3.2.7.2. Hematolojik bulgular

Anemi, aktif RA'li hastalarda sık rastlanan bir bulgudur. Aktif RA'li hastalarda lökositoz sık ve lökopeni nadir görülen bir durumdur. Lökositoz hastaların %25'inde görülür ve bu lökositlerin işlevleri normaldir (25, 65). Trombosit düzeyleri hastalık aktivitesi ile orantılıdır ve genellikle ekstraartiküler manifestasyonlarla bağlantılı olarak yükselir. Eritrosit Sedimentasyon Hızı (ESH) sıklıkla RA'te hastalık aktivitesi veya inflamasyonun göstergesi olan bir laboratuvar ölçümüdür (25, 106) .

3.2.7.3 C-Reaktif protein (CRP)

Pnömonokların kapsül antijenine bağlanan bu protein akut faz proteinlerinin prototipidir. Normal insan serumunda 0.5 mg/dl gibi düşük değerlerdedir (9). RA'li hastalarda, hastalık aktivitesi ile ilişkilidir ve tedaviye yanıtı değerlendirmede kullanılır. CRP, hastalık progresyonunun radyolojik göstergesi ile paralellik göstermektedir. Artmış CRP eroziv hastalığa işaret eder (25, 106).

3.2.8. Görüntüleme

Radyolojik algoritma; konvansiyonel radyografi, ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans şeklinde sıralanır. RA düşünülen hastada radyolojik incelemede en erken bulgu eklem çevresinde yumuşak doku şişliğidir. Konvansiyonel el ve ayak grafileri tanı ve tedavinin izlenmesi yönünden önemini korumaktadır. Ultrasonografi, konvansiyonel radyografiye tamamlayıcı rol üstlenmektedir. Bilgisayarlı tomografi kullanımı özellikle servikal eklem tutulumlarında ön plana çıkar. Manyetik rezonans, yumuşak dokular üzerindeki yüksek çözünüme gücü ile sinovial dokulardaki değişimler ve pannus oluşumunun erken evrede belirlenmesi ile henüz kesin tanı konulamamış romatoid artrit vakalarında erken tanıya imkan sağlamaktadır (8, 128).

3.2.9. Tedavi

Romatoid artrit prognozu ve klinik seyri açısından hastadan hastaya farklılıklar gösteren bir hastalık olduğu için tedavi programının bireysel düzenlenmesi gerekir. Tedavinin amacı inflamasyonun mümkün olduğunca erken baskılanması ve fonksiyon kaybının minimize edilmesidir (91). Hastaların çok azında, hastalığın ilk iki yılı içinde remisyon olabilir. Yaygın olmayan spontan remisyonu beklerken, hastalığı modifiye edici ilaçlarla (Disease Modifying Antirheumatic Drugs-DMARDs) erken tedaviye başlanılır. Farmakoterapi mutlaka fizik tedavi ve rehabilitasyonla desteklenmelidir (139).

3.2.9.1. Birinci basamak tedavisi

RA'in tedavisinde klasik yaklaşımlar, salisilatlar ve nonsteroid anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)'la inflamasyonun semptomatik tedavisidir. NSAİİ'ların analjezik, antipiretik, antiromatizmal ve antiinflamatuvar etkileri vardır (31, 41, 135, 139).

3.2.9.2. İkinci basamak tedavisi

NSAİİ ve düşük doz steroid tedavisine cevap vermeyen hastalarda kullanılan ilaçlara ikinci basamak ilaçlar adı verilir. Son yıllarda RA tedavisinde uygulanan klasik piramit modeli (DMARDs'lardan önce NSAİD), uzun dönem hasarı azaltmak için daha erken dönemde daha agresif tedavilere yerini bırakmıştır (58, 59, 91, 141). Antimalaryaller, sulfasalazin, metotreksat (MTX), altın tuzları, siklosporin A, D-Penisilamin, azatiopürin, siklofosfamid ve kortikosteroidler ikinci basamak tedavide kullanılabilmektedir (13, 49) .

3.2.9.3. Yeni tedaviler

Günümüzde leflunomid ve anti TNF- α antikorları da tedavi için kullanılabilmektedir (40, 91, 124,139).

3.2.9.4. Kombinasyon tedavisi

Yapılan bazı çalışmalarda, Hidroksiklorokin + Azatiopürin, MTX + Siklosporin A, Leflunomid + MTX, Etanersept + MTX, MTX + Biyolojik Ajanlar kombinasyonları ile olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (139).

3.2.10. Romatoid artritte otoantikörler

Otoimmün romatoid hastalıklarda pek çok yapısal bileşene karşı oluşan otoantikörler tanımlanmıştır. RA hastalarının serumları, hastanın kendi proteinlerine yönelen geniş bir antikör repertuarı içerir. Ancak, bu antikörlerin çoğu başka (otoimmün) hastalıklarda da saptanabilir ve bu nedenle RA'ya spesifik değildir. IgG moleküllerinin Fc (kristalize olabilen) bölgesini hedef alan, ARA kriterlerinden olan RF antikörleri bile RA için orta derecede spesifiktir. Diğer otoimmün hastalıklarda (Örn: Sjögren sendromu), enfeksiyöz hastalıklarda (örn: hepatit, tüberküloz) ve sağlıklı popülasyonun % 3-5'inde (yaşlı bireylerde % 10-30) de tespit edilebilir (12, 93, 97, 109). Bu antikörler arasında RA'da en sık rastlanılanları anti-heteronükleer ribonükleoprotein (anti-hnRNP), cyclic citrullinated peptides (anti-CCP), RF ve anti-kollajenaz II'dir (76). HLA-DR4 ve anti-CCP arasında beraberlikler tanımlanmıştır (53).

3.2.10.1. Spesifik olmayan otoantikörler

Romatoid faktör (RF), Anti – RA33 (anti- hn RNP-A2), Anti – calpastatin, Anti nötrofil sitoplazmik antikörler (ANCA), Anti – nükleer antikörler (ANA), Anti – kollajen tip II, Anti – fibronektin ve Anti – glukoz – 6 fosfat izomeraz (GPI)'dır. Bu antikörlerin çoğu SLE ve mikst konektif doku hastalığı (MKDH) gibi diğer otoimmün hastalıklarda tespit edilebilmektedir ve bir dereceye kadar sağlıklı bireylerde de saptanabilir.

RF ilk kez 1940 yılında Waaler, romatoid artritli hastaların serumlarında IgG antikörleri ile duyarlılaştırılmış kırmızı kan hücrelerini aglutine eden bir faktör gözlemiştir (30). Daha sonra bu faktör RF olarak isimlendirilmiştir.

Romatoid faktör, insan IgG moleküllerinin Fc bölgesine (CH2, CH3 bölümleri) karşı gelişen antikorlardır (38). Bu antikorlar, ekstrasvasküler bir immun kompleks hastalığı olan romatoid artrit belirleyici antikorlarıdır (3, 19, 38).

3.2.10.2. Spesifik otoantikorlar

- Heavy Chain Binding Protein; Anti BİP (p68)

-Anti- sitruline protein antikorları; Antiperinükleer faktör (APF), Antikeratin antikorları (AKA), Antifilagrin ve Anti –Cyclic citrullinated peptide (CCP)’dir.

RA hastalarının çok yüksek bir oranında sitruline peptidlere karşı gelişmiş IgG antikorlarının bulunduğu gözlemine son zamanlarda büyük ilgi gösterilmektedir. Bu anti-sitrulin antikorları RA’da nispeten daha erken ortaya çıkarlar ve hastalık için yüksek oranda özgüdürler (% 98) (84, 119). Birçok farklı laboratuvar tarafından yapılan bir seri çalışmada bu antikorların hedefinin, memeli deri ve özefagus epitel hücrelerinin terminal diferansiyasyonunun ileri safhalarında eksprese edilen bir protein olan filagrin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu antikorların posttranslasyonel olarak değiştirilmiş veya sitruline edilmiş filagrini hedef aldıkları da bulunmuştur (61, 118). Posttranslasyonel sitrulinasyon işlemi belirli polipeptidlerdeki argininlerin deiminasyonunu içerir ve Ca^{++} bağımlı peptidilarginin deiminaz (PAD) enzimi tarafından katalize edilir (137). Bu biyokimyasal işlem sonucu, pozitif yüklü argininler polar ama yüksüz sitrulinlere dönüşür. Sitruline edilmiş peptidlerin yapılarındaki bu değişimler, bu peptidleri RA’daki IgG antikorlarının hedefi haline getirir. Arginin içeren bu peptidler değişen özellikleri sayesinde, paylaşılan epitopu (SE) eksprese eden Major histocompatibility complex (MHC) Klas II moleküllerindeki P4 olarak

bilinen pozitif yüklü peptid-bağlayıcı pakete 100 kat fazla afinite ile bağlanabilirlerler (ör; HLA- DRB1* 0101, 0401 ve 0404) (70). RA için koruyucu olan HLA-DRB1*0402 alleli, arginin ve muhtemelen sitruline bağlanabilen negatif yüklü bir P4 bağlayıcı pakete sahiptir. Bu kompleks için yüksek afinitesi olan T hücreleri bu nedenle periferik lenfoid dokularda eksprese edilmezler. Bu da HLA-DRB1*0402 alleli olan hastaların neden RA kliniği geliştiremeyeceğini açıklayabilir. Birçok deneysel gözlem, sitruline karşı oluşan bağışık yanıtların RA inflamasyonunun patogeneğinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Öncelikle, RA'lı hastaların sinovial dokusunda sitruline edilmiş proteinlerin (fibrinojenin sitruline edilmiş alfa ve beta zincirleri ve sitruline edilmiş vimentin) bulunduğu gösterilmiştir (64, 99, 100). Sitruline edilmiş proteinlerin, RA hastalarının derin sinovial dokularındaki interstisyel birikimlerde ve sinoviadaki monosit/makrofaj benzeri hücrelerin sitoplazmalarında bulunduğu düşünülmektedir (15, 99). Benzer şekilde bazı deneysel artrit modellerinde sitruline edilmiş proteinler sinovial dokuda bulunabilir ki bu durum inflamasyonun, bu işlemi belki de PAD (peptidilarginin deiminaz) aktivitesini artırarak düzenlediğini düşündürmektedir (71).

Enzim bağlı immunosorban tekniği (ELİSA) ile filagrin dizilerinden elde edilen sitrulin içeren bir peptid kullanılarak, RA'lı hasta serumlarının yaklaşık % 48'inde % 98 spesifite ile antikorlar saptanmıştır (118). Anti-filagrin antikorlarının (AFA) bir veya daha fazla sinovial sitruline proteine karşı gelişen bir yanıttan köken aldığı ve sitruline filagrin ile reaksiyonlarının çapraz etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Filagrin, alt üniteleri arasında yoğun dizilim varyasyonu gösteren (~ % 40) oldukça heterojen bir proteindir (60).

Bundan başka, anti-CCP pozitif RA hastalarının sinovyumundaki B hücreleri spontan olarak anti-CCP antikorları üretirken, periferik kan B hücreleri veya anti-CCP negatif RA hastalarının B hücreleri antikor üretmezler (112). Bu durum, RA inflamasyon bölgesinde CCP-spesifik B hücrelerinin antijenle yönetilen bir maturasyona uğradığını düşündürmektedir. Bu muhtemel antijenlerden biri, sitruline edilmiş fibrin yeni tanımlanmıştır (99). Sitruline edilmiş fibrinin ve diğer sitruline edilmiş antijenlerin RA patofizyolojisindeki muhtemel rolü henüz açıklığa kavuşmamıştır (122).

3.3. Toll-like reseptörler

Konak immün hücrelerinin patojen ajanları tanıma ve ajana özgü immün yanıtı oluşturma sürecindeki mekanizmalar son yıllarda daha ayrıntılı anlaşılmaya başlanmıştır. İmmün hücreler üzerinde bulunan ve patojeni tanıyan reseptörler ilk kez 1991 yılında *Drosophila melanogaster* türünde bulunarak Toll adı verilmiştir. Toll, Türkçe kelime anlamı olarak yol, köprü gibi yerlerden paralı geçişlerde ödenen ücrettir. Toll ve diğer pattern tanıyıcı reseptörler, patojen için hayati önem taşıyan yapılardan birini tanıma yeteneğindedir. Günümüzde insanlarda IL-1 reseptör I'in homoloğu olan bu moleküllere, Toll-like reseptörler (Toll-like receptor = TLR) denilmektedir. İnsan Toll'u ekstraselüler ve intraselüler özellikleriyle sinek Toll'unun homoloğudur. İnsanlarda 11 tane TLR tanımlanmıştır. TLR patojene spesifik immün yanıt oluşmasını sağlar ve bu özellik genetik olarak belirlenir. TLR'lerin keşfi, konak-patojen etkileşimi, hücresel ve humoral yanıtların uyarılma ve oluşma mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Konağın patojen ajanlara karşı oluşturduğu

immün yanıt, birbiriyle ilişkili olan doğal ve kazanılmış yanıtlardan oluşur. Doğal immün yanıt hücreleri periferde bulunurlar ve hızlı yanıt oluştururlar. Antijene özgü olmayan bu yanıt sitokin salgıları, kompleman aktivasyonu, fagositoz ve yüzey savunma mekanizmalarından ibarettir. Kazanılmış immün yanıt sekonder lenfoid organlardan yönetilir; daha yavaş gelişir, uzun sürelidir ve antijene özgüdür. Doğal immün yanıt oluşumunda esas olarak dendritik hücreler, monositler, doğal öldürücü hücreler, lenfositler ve epitel hücreleri görev alır. Bu hücrelerin değişik oranlarda TLR eksprese ettikleri gösterilmiştir. TLR'ler mikrobiyal ürünlerin primer sensörleri gibi davranır, immün ve inflamatuvar genlerin sentezini başlatacak mekanizmaları devreye sokar ve kazanılmış cevapları etkilerler. TLR, bir transmembran proteinidir. Ekstraselüler kısmı lösenden zengin tekrar yapılarından oluşur, intraselüler kısmı ise IL-1 reseptörünün sitoplazmik kısmına benzer. TLR liganda bağlanınca aktive olur ve intraselüler kısmı aracılığıyla nuklear faktör-kappa beta (NF-kB) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz ailelerini uyarır. NF-kB, TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünlerin genlerini aktive eder. Bu süreç, konağın doğal immün cevabıdır. Pattern tanıyıcı reseptörleriyle, patojendeki patojen ilişkili moleküler patternleri tanıyan dendritik hücreler matüre olurlar; periferden lenf nodlarına taşınarak T hücrelere antijen sunarlar; T ve B hücrelerin aktivasyon sürecinde rol alırlar. TLR, dendrit hücrelerinin T hücrelerini daha etkin bir şekilde uyarmasını sağlayan ko-stimulan moleküllerin de seviyelerini artırır; sitokinlerin üretimini ve salınmasını düzenler. Bu olaylar sırasında T hücrelerin hangi tip yanıt oluşturacağını belirleyen dominant sitokin profili, mikrobiyal enfeksiyonların temizlenmesinde kritik roldedir. TLR'nin dominant T hücre tipini sitokinler

aracılığıyla düzenlediği düşünülmektedir. Sitokinlerle düzenlenen en önemli yol ayrımı T hücrelerinin TH1 ya da TH2 yönünde farklılaşmasıdır. TLR ile uyarılan dendritik hücreler esas olarak IL-12 ve IL-18 salgılar ve bu sitokinler TH1 hücrelerin gelişmesini sağlar. RA’da TH1 profili predominanttır (26). IL-10 ve IL-4 fazla salındığında ise TH2 immün yanıtı gelişir. B hücreleri uyarılır ve antikor sentezi başlar. Bakteriyel lipopolisakkaritlerin (LPS) yüksek dozları TH1 ve düşük dozları TH2 cevabının gelişmesini sağlar. Bu nedenle LPS’i tanıyan TLR4, TH1 ve TH2 dengesinde kritik roledir. TLR’nin liganda bağlanmasıyla başlayan ve NF-kB aktivasyonu ile tamamlanan süreçte, sitokin akışını düzenleyen çeşitli moleküler yapılar bulunur. Bunlardan en önemlisi MyD88’tir. MyD88, myeloid hücre farklılaşması sırasında uyarılan bir moleküldür. MyD88 mutant farelerde TLR2, TLR7 ve TLR9 NF-kB’yi uyaramaz. TLR4 ise NF-kB aktivasyonunu tamamlar. Bu nedenle farklı ligandları tanıyan TLR’ler immün yanıtları da düzenlerler. TLR ilişkili NF-kB’nin aktivasyonu ile salınan enzimler, sitokinler ve mediyatörler konağın antimikrobiyal savunmasını uyarır ve inflamatuvar olayları tetikler. Bu süreç patojenin ortadan kaldırılmasını sağlar. İnflamatuvar reaksiyon sınırlandırılmazsa, konak hücrelerinin harabiyetine neden olabilir (2).

TLR aktivasyonu patojenlerin konak hücrelerinin fagositozu için gereklidir. TLR patojenlerin fagositozunu uyarır, fagozom içeriğine karşı gelişen inflamatuvar yanıtı güçlendirir ve fagozomun matürasyonuna yardımcı olur. Böylelikle fagosit edilmiş bakterinin öldürülmesi kolaylaşır. TLR aktivasyonu çeşitli antibakteriyel moleküllerin salınmasını uyarır. TLR, farede intraselüler patojenlerin öldürülmesini sağlayan reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin

üretimine ve salgılanmasına neden olur. İnsan keratinositleri S. aureus ile uyarıldığında, TLR2, NF-kB aracılığıyla nitrik oksit sentetaz, siklo-oksijenaz-2 ve IL-8 gen aktivasyonlarını sağlayabilmektedir. TLR aktivasyonu apoptoza da neden olabilir. Lipopolisakkaritlerin ya da lipoproteinlerin TLR4 ve TLR2/6 üzerinden apoptoza uyatabildikleri gösterilmiştir. TLR4 enfekte hücrelerin apoptoza uğraması, konağın enfeksiyonu ortadan kaldırmasına yardımcı olabilir. Bellek T hücreleri üzerinde bulunan TLR2, aynı ajana tekrar maruz kalındığında immün sistemin daha erken ve hızlı uyarılmasını sağlar. Otoimmün hastalıklarda mikrobiyal enfeksiyonların ataklara neden olması aynı mekanizmayla olmaktadır (2).

3.3.1. TLR ve ligandları

Bugüne dek 11 çeşit TLR tanımlanmıştır. TLR10 haricindeki tüm TLR'lerin ligandları bilinmektedir. TLR2 ve 4'ün çok sayıda ligandı tanımlanmıştır. TLR'ler amino asit sıralarında benzerlikler ve intrasellüler sinyallerine göre TLR2 ailesi (TLR1, TLR2, TLR6), TLR3 ailesi, TLR4 ailesi, TLR5 ailesi ve TLR 9 ailesi (TLR7, TLR8, TLR9) olarak gruplanırlar. TLR'lerin ligandları Tablo 1'de gösterilmiştir. İnsan keratinositlerinde eksprese edilen TLR'ler içinde, TLR2 ve TLR4'ün ayrı bir yeri vardır. TLR4 Gram (-) bakterilerdeki LPS'lerin sinyal reseptörüdür. TLR4 aynı zamanda Gram (+) bakterilerin lipoteikoik asitlerini de bağlayabilir. TLR2 lipoprotein, lipopeptid, peptidoglikan, lipoteikoik asit, lipoarabinomannan, glikoinositolfosfolipid, glikolipid, ve zimosan gibi farklı hücre yapılarındaki molekülleri tanır. LPS'ler TLR2 için ligand değildirler. TLR2'nin bazı çalışmalarda kullanılan ticari lipopolisakkaritlerle uyarılması, ürün içerisindeki fenole duyarlı bir içeriğe

bağlanmaktadır. En son tanımlanan TLR, TLR11'dir. TLR11 defektli fareler üropatojenik bakterilerin böbrek enfeksiyonlarına yatkındırlar. İnsanlarda TLR11 fonksiyonel değildir. İnsanlarda üropatojenik bakterileri yakalamak için alternatif bir yol olup olmadığı ise bilinmemektedir (2).

Tablo 1. Toll Like Reseptörler ve Ligandları

TRL	Ligandları
TLR1	Tri-açıl lipopeptidler (bakteria, mikobakteri) Solubl faktörler (N. meningitis)
TLR2	Lipoprotein/lipopeptidler Peptidoglikan (Gram (+) bakteri) Lipoteikoik asit (Gram (+) bakteri) Lipoarabinomannan (Mikobakteri) Fenol solubl modulin (S. epidermidis) Glikoinositolfosfolipidler (Trypanosoma cruzi) Glikolipidler (Treponema maltophilum) Porinler (Neisseria) Zimosan (fungi)
TLR3	Çift sarmal RNA (virus)
TLR4	Lipopolisakkaritler (Gram (-) bakteri) Taxol Füzyon ve proteinleri Fibronektin EDA domain Hyaluronik asit oligosakkaritleri Heparan sülfatın polisakkarit fragmanları Fibrinojen
TLR5	Flagellin
TLR6	Di-açıl lipopeptidler (mycoplasma) – Isı-labil solubl faktör (grup B streptokoklar) Fenol-solubl modulin (stafilokoklar)
TLR7	Tek sarmal viral RNA Imidazokinolinler (sentetik bileşikler) Loxoribin (sentetik bileşikler) Bropirimin (sentetik bileşikler)
TLR8	Tek sarmal RNA
TLR9	CpG DNA (bakteri) Kromatin-IgG bileşikleri
TLR10	? bilinmiyor
TLR11	Üropatojenik bakteriye ait faktörler

(Bu tablo Adışen E, Önder M. Dermatolojide Toll Like Reseptörler. Dermatose. 2006;1: 14-21'dan alınmıştır.)

3.3.2. TLR3

Virüslerin hayat siklusları boyunca ürettikleri çift iplikli RNA TLR3 tarafından tanınmaktadır. 2.1 amstrong'luk bir protein olan TLR3, 23 adet lösinden zengin alana sahiptir. TLR3 eksik hücreler sentetik çift iplikli RNA ligandı polyinozin-polysitidilik aside (polyI:C) cevabı azalmıştır. TLR3 sinyalleri NF-kB aktivasyonuna yol açarak tip I IFN'ların sentezini sağlar. IFN'lar RA sinoviumunda bolca sentezlenmektedir. Plasmositoid dentritik hücreler dsRNA'ya cevapta spesifik olarak TLR3 kullanarak IFN üretimini sağlamaktadırlar (35).

3.3.3. TLR4

TLR4 insanda ilk tanımlanan *Drosophila* toll like reseptörüdür. LPS, Gram-negatif bakteri hücre duvarının major bileşenidir (35). Gen 9q35 bölgesinde lokalizedir (80). TLR4, LPS'in tanınmasından sorumludur. Bu tanınmayı bir glikoprotein olan CD14 ile beraber gerçekleştirmektedir. Bu reseptörler aktive olduğu zaman IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi proinflamuar sitokinler salınmaktadır. TLR4 geni eksik farelerde LPS'ye cevabın azalmış olduğu tespit edilmiştir. TLR4 mutasyonlu farelerde ise *Salmonella typhimurium* ve *Neisseria meningitidis* gibi Gram (-) bakteri infeksiyonlarının oldukça sık olduğu tespit edilmiştir (35).

TLR4 geninde şu ana kadar iki farklı polimorfizim tanımlanmıştır. TLR4 genindeki 2 missense polimorfizmden ilki başlangıç kodonundan 896. nükleotitinde adeninin guanine substitüsyonu sonucu 299. amino asid olan aspartik asidin glisinle yer değiştirmesi (Asp299Gly) ve diğeri 399. amino asitte threoninin izolösine yer değiştirmesi (Thr399Ile) şeklindedir (7).

3.3.4. TLR9

TLR9 eksik farelerde yapılan çalışmalar un-metilli CpG'nin TLR9'un doğal ligandı olduğunu göstermiştir. TLR9 eksik fareler CpG'ye cevapta herhangi bir inflamatuvar sitokin üretmezler. Bu farelerde splenositlerin çoğalma yetenekleri yoktur ve dentritik hücrelerin maturasyonu gerçekleşmemektedir. TLR9, TLR7 ve TLR8 gibi endozomal kompartmanlarda lokalizedir. Bu lokalizasyon canlının kendinden olanı ve olmayanı ayırt etmesini sağlamaktadır. Konakçının kendi DNA ve RNA'sı bu endozomal kompartmanlara girme eğiliminde değildir (35).

3.3.5. TLR10

Üç ekzona sahip olan ve 811 aminoasitlik bir protein kodlayan TLR10 geni 3,269bp'dan oluşmakta ve kromozom 4p14 bölgesinde yer almaktadır. Şu ana kadar TLR10 geni için artifisial veya doğal ligand tespit edilmemesine rağmen reseptör TLR1 ve TLR2 geniyle heterodimerler oluşturmaktadır (82). TLR ailesinin diğer tüm üyeleri gibi bir sinyal peptidi, pek çok lösin zengin tekrar (n=12), sistein zengin bir alan, bir transmembran alanı ve bir sitoplazmik Toll interlökin1 reseptör alanı içermektedir. İmmün hücrelerce zengin olan dalak, lenfoid nod ve akciğer gibi dokularda eksprese olmaktadır. Lökositler içerisinde TLR10 mRNA ekspresyonu B lenfositlerle sınırlıdır ve CpG DNA gibi poliklonal B hücre aktivatörleri veya B hücre antijen-reseptör komplekslerinin oluşmasını takiben artmaktadır (89).

3.4. Polimorfizmler ve hastalıklarla ilişkileri

3.4.1. Genetik varyasyon ve polimorfizm

Polimorfizm, bir toplumda sadece tekrarlayan mutasyonlarla sürdürülemeyecek oranlarda var olan, nadir sıklıktaki, devamlılık göstermeyen iki veya daha fazla genetik özelliğin bir arada olması olarak tanımlanabilmektedir (4) DNA dizisinde doğal olarak meydana gelen varyasyonlar birkaç şekilde oluşabilir; Tek nükleotid substitüsyonu, tek ya da birkaç nükleotidin insersiyonu veya delesyonu ve tekrarlayan dizi sayısındaki değişimler ve kromozom yapısındaki büyük değişimler.

İnsan genomunda tek nükleotid değişimleri oldukça yüksek sıklıkta bulunmaktadır. Bu oran her 1000 bazda 1 olarak tahmin edilmektedir. Bunlar sıklıklarına ve hastalık yapma yeteneklerine bağlı olarak polimorfizm ya da mutasyon olarak adlandırılmaktadırlar (17). Normal populasyonda %1'den daha fazla sıklıkta olan değişimler polimorfizm olarak kabul edilmektedir (17, 31) %1'den daha az sıklıkta olanlar ise genellikle hastalıkla sonuçlanmaktadır. Sadece hastalıklarla sonuçlanan mutasyonlar değil aynı zamanda bazı polimorfizmler de fonksiyonel olarak önemli olup hastalık patogenezinde rol oynamaktadır. Tek nükleotidi içeren değişimler tek nükleotid polimorfizmi (SNP; single nucleotide polymorphism) olarak adlandırılır. Bir polimorfizmde yaygın olan dizi wild-tip allel, nadir olan ise varyant alleldir (17).

SNP'ler genetik polimorfizmlerin en yaygın formudur. Pozisyonlarına göre ve genetik kodu değiştirme yollarına göre farklı alt tiplere ayrılmaktadır. Bir genin 5' UTR (untranslated region) veya 3' UTR gibi promotorda lokalize SNP'ler üreten protein miktarını çeşitli yollarla etkileyebilirler. Nükleotid değişiklikleri

spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını değiştirebilir, böylece transkripsiyon oranını etkileyebilir ya da küçük mRNA stabilitesini etkileyebilir ve üretilen protein seviyesini değiştirebilir. Farklı tipteki SNP'ler, bir proteinin fonksiyonu veya regülasyonu ve ekspresyonunu değiştirebilir. En yaygın tipi sinonim olmayan (nonsynonymous) SNP'ler dir. Bu tipteki allelerde protein ürünündeki amino asit farklıdır. Kodlayıcı bölgedeki SNP'ler klinik olarak oldukça önemli potansiyele sahiptirler. Yapısal/fonksiyonel olarak farklı bir amino asit değişimi sadece proteinin yapısı ve /veya stabilitesini etkilemez aynı zamanda protein-protein etkileşim yollarını da bozabilir. Bu tip fonksiyonel etkilere ilave olarak daha kompleks seviyelerde gerçekleşen polimorfizmler de vardır. Özellikle intron-ekzon sınırlarında olmak üzere ekzon veya intronlardaki varyasyonlar alternatif uçbirleştirme (splicing) etkileyebilir ve böylece farklı protein formlarının üretilmesine yol açabilir. Locus kontrol bölgelerindeki polimorfizmler ise potansiyel olarak gen ekspresyonunu etkileyebilir ve hastalıklarla sonuçlanabilir. Böylece SNP'ler çok farklı etkilere sahip olabilirler (17).

3.4.2. TLR polimorfizmlerinin hastalıklarla ilişkileri

TLR sinyalizasyonu mikrobial ajanlara karşı konakçı cevabının oluşmasını sağlamaktadır. Eğer herhangi bir şekilde TLR sinyalizasyonu bozulursa bu durum konakçının enfeksiyonlara karşı yatkınlığına neden olabilmektedir. Eğer TLR sinyalizasyonu herhangi bir şekilde aşırı uyarılırsa bu durum septik şok, otoimmün hastalıklar ve alerjilere sebep olabilir. TLR'lerin çeşitli hastalıklarda rolleri olduğu gösterilmiştir. Belirli TLR genlerinde onların aktivitesini veya

fonksiyonunu etkileyen polimorfizmler tanımlanmış ve bunlardan bazılarının hastalıklarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (35). Şu ana kadar TLR genlerindeki polimorfizmler ve farklı hastalıklar arasındaki ilişkilerin çalışıldığı çok sayıda literatür mevcuttur. TLR Polimorfizmi TLR’de mutasyonlar ya da TLR gen polimorfizmi, konağı çeşitli enfeksiyonlara yatkın hale getirir. Her bir TLR’de amino asit sıralarındaki değişikliklere bağlı olarak iki anlamlı tek nukleotid polimorfizmi bulunur. TLR2 için ilk mutasyon, R753Q, reseptörün intraselüler kısmındadır, bu mutasyon S. aureus enfeksiyonlarıyla ilişkilidir. İkinci mutasyon, R677W, intraselüler mikobakteriyel iletimle ilişkilidir. Bu mutasyon lepramatöz lepra gelişiminde rol oynar. TLR4 için D299G ve T399I mutasyonları tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar ekstrasellüler kısımda olup, Gram (-) ajanlarla septik şok geliştiren hastalarda tespit edilmiştir. TLR4 polimorfizmi, lipopolisakkaritlere karşı oluşturulan immün yanıtın azalmasına neden olmuştur (2). TLR4 polimorfizimleri ile romatoid artrit, ateroskleroz, astım gibi hastalıklar arasında ilişkiler bulunmuştur. TLR6, TLR9, TLR10 gen polimorfizimleri ve astım arasında da ilişkiler tespit edilmiştir (117). TLR5 392 STOP kodon oluşumu Lejyoner hastalığına yatkınlıkla beraberlik göstermektedir (66).

3.5. TLR ve otoimmün hastalıklar

Otoreaktif lenfositlerin aktivasyonu ve klonal yayılımı otoimmün hastalıkların gelişimi için gereklidir. Mikrobial proteinler bireye ait peptidlerle yeterli benzerlik gösteriyorsa bu durum otoreaktif T hücrelerini aktive edebilir. Mekanizma, moleküler taklit olarak bilinmektedir. Bu hipotez, bireye ait peptidlerle yeterli dizi benzerliği gösteren mikrobial proteinlerin T hücrelerini

aktive edebileceğini göstermektedir. Hayvan modellerinde infeksiyonlarla otoreaktif T hücrelerinin aktive olduğu tespit edilmiştir. Özellikle de viral infeksiyonların T hücre aracılı otoimmüniteyi başlatabileceği gösterilmiştir. (142). TLR'ler doğal gelen bağışıklıkta temel rol oynayan hücre yüzey reseptörleridir. Patojenle beraber görülen moleküler yapıları (PAMP; patogen associated molecular pattern) tanımaktadırlar. TLR'ler patojen antijenlerine bağlanmalarına karşın aynı zamanda heat shock proteinler ve fibrinojen gibi bazı otoantijenlere de bağlanabilirler. TLR4'ün kollejen tip II'nin oluşturduğu artiritlerde temel rol oynadığına dair raporlar vardır (90). Pek çok patojene karşı oluşan antikorların üretimi T ve B lenfositler tarafından bu patojenlerin tanınmasına bağlıdır. Bu durum otoantikor üretim riskini azaltmaktadır. Sistemik otoimmün hastalıkların fare modelinde hücre yüzey antijen reseptörlerinin ve diğer TLR'lerin eş zamanlı aktivasyonu B hücreler tarafından tanınan self-immünglobulin sentezine yol açmaktadır. Unmetilli oto-DNA otoimmünitede patojenik bir faktör olabilir. İlaçlar CpG metilasyonunu inhibe ederek SLE'ye yol açabilmektedir (117). CpG DNA, insanda TLR9 yoluyla tanınmaktadır ve TH1 immün cevap yoluyla kollejenin indüklediği artritlerin şiddetini artırmaktadır (10, 68, 114). Son zamanlarda CpG DNA–TLR9 etkileşiminin, SLE ve RA'da anahtar rol oynadıklarına dair bulgular vardır (65). TLR9 MHC-II (+) hücrelerde eksprese olmaktadır (47). U1 RNA'ya karşı SLE ve RA hastalarında otoantikorların varlığı tespit edilmiştir. Bu RNA'lar tarafından TLR3'ün aktivasyonu bazı romatoid hastalıklardaki yüksek otoantikor düzeyini açıklayabilir (72, 76). Makrofajların uzun süre (16 saatten uzun) TLR aracılığıyla patojenlere maruziyeti MHC II ekspresyonu inhibe etmektedir (132).

3.5.1 TLR ve romatoid artrit

Son zamanlarda RA'da otoimmünitinin başlatılmasında TLR'lerin potansiyel rolleri ile ilgili olarak pek çok çalışma yapılmıştır. RA etyolojisinde makrofajlar ve dentritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin büyük önemi vardır. Bu hücreler doğal ve kazanılmış immün cevapta görevli TLR olarak adlandırılan reseptörlere sahiptirler (20, 131). Monosit kökenli dentritik hücreler TLR 3, 4, 7, 8 ve 9 eksprese etmektedirler. Dentritik hücreler tarafından eksprese edilen bu genlerdeki polimorfizmlerin RA gelişimine katkı sağlayabileceği ileri sürülmektedir. (28). TLR'ler patojen antijenlerine bağlanmalarına karşın aynı zamanda self-antijenlere de bağlanabilirler. Örneğin TLR4 RA hastalarının inflamatuvar sinovial eklemlerinde bol olarak bulunan heat shock proteinler, fibrinojen ve diğer bazı proteinlerle etkileşmektedir. Bu proteinler stres, nekrotik ölüm ve hasar gibi durumlara maruz kalan hücreler tarafından bolca salgılanmaktadır. Bu şekilde endojen ligandların sinovium veya sinovial sıvıdaki antijen sunan hücreler tarafından tanınmasıyla RA'nın başlatılabileceğini gösteren çalışmalar vardır. TLR4'ün kollojen tip II'nin oluşturduğu artiritlerde temel rol oynadığına dair raporlar vardır (90). TLR tarafından mikrobial komponentlerin veya endojen ligandların tanınmasıyla aktive olan sinovial fibroblastlar ve makrofajlarda proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve doku yıkıcı enzimlerin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (29).

3.5.2. TLR polimorfizmleri ve romatoid artrit

Mevcut literatür verileri, TLR genlerinde yer alan SNP'lerin bireyler arasında TLR ligandlarına cevabı bozabileceğini göstermektedir. TLR genleri ve

bu genlerde yer alan polimorfizmlerin, inflamatuvar ve infeksiyon temelli hastalıklarda çeşitli roller oynayarak hastalık gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Çeşitli TLR gen polimorfizmleri infeksiyon ve inflamatuvar hastalıklar arasında beraberlikler tespit edilmiştir (120). İnflamasyonun RA gelişimindeki rolü bilindiğinden TLR'lerin RA gelişimine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Literatür taramalarında TLR3, 9 ve 10 gen mutasyon ve polimorfizmleri ve yukarıda adı geçen romatoid hastalıklar arasındaki ilişkiler konusunda çalışmalara rastlanmamıştır; otoantikorlar ve TLR reseptör polimorfizmleri arasındaki beraberlikler konusunda ise çok az sayıda çalışma mevcuttur. Özellikle TLR3, 9 ve 10 polimorfizmleri ve otoantikor pozitiflikleri arasındaki ilişkilerin araştırıldığı veriler oldukça yetersizdir.

3.6. Çalışmanın amacı

1. Romatoid artrit hastalarında Toll-Like Reseptör 3, 4, 9 ve 10 gen polimorfizm genotip ve allel sıklıklarının sağlıklı kontrolle karşılaştırılması,
2. Çalışılan polimorfizmlerin farklı genotip veya allellerinin hastaların demografik özellikleri, hastalık süresi, prognozu, DAS28 ve tedaviye cevap gibi parametrelerle ilişkilerinin değerlendirilmesi,
3. Çalışılan polimorfizmlerin farklı genotip veya allelleri ile anti-hnRNP, anti-CCP, RF ve anti-kollejenaz II' gibi otoantikörler pozitiflikleri arasındaki beraberliklerin araştırılması.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Çalışma grubu

Bu çalışmaya, Eylül 2004 ile Şubat 2006 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Fırat Üniversitesi Hastanesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Romatoloji Polikliniğine tetkik ve tedavi amacıyla başvuran 1987 ACR kriterlerine göre romatoid artrit tanısı almış 100 hasta alındı. Çalışmaya alınacak tüm hastalara, uygulanacak genetik testler ve RA hakkında sözlü olarak bilgi verildi. Katılmayı kabul eden 100 hastaya araştırma detaylarını anlatan hasta bilgilendirilmiş onay formu doldurularak izinleri alındı. Yaş, cinsiyet ve eğitim düzeyi bakımından hasta grubuna denk 100 sağlıklı gönüllüden oluşan kontrol grubu çalışmaya alındı. Hastaların seçimi kesitsel olarak yapıldı ve aktif olan veya olmayan, DMARD kullanan veya kullanmayan hastalar rastgele seçilerek alındı.

Hastaların cinsiyet, yaş, eğitim düzeyleri, hastalık süreleri, özgeçmiş, aldığı medikal tedaviler, tansiyon arteriöl sistolik (mm/hg) (TASİS), tansiyon arteriöl diastolik (TADİA), CRP (ng/dl), Eritrosit Sedimantasyon Hızı (mm/saat), RF (U/ml) düzeyleri kaydedildi. Subjektif ağrı şiddeti ise 0-10 arasında skorlanmış bir visüel analog skala (VAS) ile ölçüldü (0:Ağrı yok, 10:En şiddetli ağrı). Kronik ağrı ve deformitelerle ilişkili olarak disabilite ölçümü olarak genel sağlık durumu soru formu (Health Assessment Questionnaire, HAQ) değerlendirmeleri yapıldı.

4.2. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan gereçler

Agaroz Jel Elektroforez Güç Kaynağı, Agaroz Jel Tankı ve Düzeneği (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium)

Eppendorf Mastercycler Gradient (Netheler Mlnz GmbH, 23331 Hamburg, Germany)

UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France)

Otomomatik Mikropipetler, Eppendorf (France)

Soğutmalı Mikrosantrifüj (Ole Dich Intrumentmakers APS, type 157.MP, Germany)

Elektronik Hassas Terazı (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan)

Etüv, Nüve (NP 400, Türkiye)

Elektro-Mag (Türkiye)

Ph Metre (Hana Intruments HI8521 pH meter, Italy)

Otoklav, Nüve (Türkiye)

Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)

Derin Dondurucu –20 °C, Uğur (Türkiye)

Su Banyosu (Kötterman labortechnic type 3643, Germany)

Vorteks (Labinco L46, The Netherlands)

4.3. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan kimyasallar

Borik asit (Merck, Frankfurt, Germany)

EDTA (Sigma, Germany)

Tris HCL (Sigma, Germany)

Etidium Bromide (Sigma, Germany)

Fikol (Serva, Germany)

Bromofenol Mavisi (Sigma, Germany)

Xylene Cyanol (Sigma, Germany)

Mutlak Etanol (Kimetsan, Türkiye)

100bç'lik DNA boyur Markırı (Fermentas, Litvanya)

Agaroz (Sigma, Germany)

4.4. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan çözeltiler

Agaroz jel yükleme tamponu (6X)

%15 ficol

%0.05 bromofenol mavi

%0.05 ksilen siyanol

Tris-borik asit-EDTA tamponu (TBE) (10 X) (1L)

108 g Tris HCl

55 g Borik asit

20 ml 0.5 M EDTA

1000 ml ddH₂O ile tamamlanır.

EDTA Çözeltisi (0.5 M, 50 ml)

18.6gr EDTA tartılır. pH=8.0'e EDTA çözülünceye kadar NaOH eklenerek ayarlanır.

Etidium bromüd(EtBr) çözeltisi (10mg/ml)

10mg EtBr tartılır, üzerine 1 ml ddH₂O eklenir. Karanlıkta +4°C'de saklanır.

4.5. DNA izolasyon işlemi

4.5.1. Kullanılan solüsyon ve gereçler

DNA purifikasyon kiti (Promega Cat.#1125), 1.5 ml'lik tüpler (Axygen scientific MCT-150-A), 100 ve 1000 µl'lik pipet (Eppendorf research series 2100 pipettes, Germany), pipet uçları (Deltalab 327-17), mikrosantrifüj, vorteks, izopropil alkol, % 70'lik etil alkol

4.5.2. İzolasyon aşamaları

1. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 900 µl cell lizis solüsyonu eklendi.
2. Kan tüpü kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallandı, sonra 300 µl kan cell lysis solusyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.
3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi, bu esnada tüp 2-3 defa alt-üst edildi. 13 000-16 000 rpm'de de 20 saniye santrifüj edildi.
4. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakacak şekilde atıldı.
5. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
6. 300 µl Nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi. Solüsyonun visköz bir hale geldiği gözlemlendi. Karıştırma sonunda hücre çökeltileri görünürse bunlar çözülene kadar solüsyon 37°C de inkübe edildi. Eğer 1 saat sonra hala çökeltiler görülüyorsa ek olarak 100 µl nuclei lysis solüsyonu ilave edilip inkübasyon tekrarlandı.

7. 1.5 µl RNase solüsyonu eklendi ve tüp 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi.10-20 saniye vortekslemedi. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
9. 13 000-16 000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak karıştırıldı.
11. Solüsyon alt-üst edilerek ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar karıştırıldı.
12. 13 000-16 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. DNA küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.
13. Süpernatant atılarak 300 µl %70 lik etanol eklendi ve –20°C’de saklandı.

4.5.3. DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin ölçülmesi

DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin belirlenmesi UV spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml’lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir. UV absorbansı DNA’nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm’de nükleik asitler, 280 nm’de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinin 260 ve 280 nm’deki absorbans oranı (A_{260nm}/A_{280nm}) 1.8’dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini

gösterir. Dolayısıyla bulduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1.8'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir (115). Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri ölçülerek konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi. 1.8'e yakın olmayan değerlere sahip örneklerin DNA'ları tekrar izole edildi.

4.6. PZR çalışması

4.6.1. PZR materyalleri

Taq DNA polimeraz (5U/ μ l)	Fermentas EP0402
10XPZR buffer (10mM)	Fermentas EP0402
MgCl ₂ (25mM)	Fermentas EP0402
100mM dNTP set	Fermentas R0186
Primerler	İontek, İstanbul, Türkiye

4.6.2. Restriksiyon enzimleri

NcoI (10u/ μ l)	Fermentas ER0571
HinfI (10u/ μ l)	Fermentas ER0801
VspI (10u/ μ l)	Fermentas ER0911
BspTI (10u/ μ l)	Fermentas ER0831
TagI (10u/ μ l)	Fermentas ER0273

4.6.3.2.2. Thr399Ile polimorfizmi (rs4986791)

Forward (İleri) primer: 5-'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA-3'

Revers (Geri) primer: 5'-CCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT-3'

Restriksiyon enzimi: HinfI

Hinfi Restriksiyon Enziminin özgün kesim bölgeleri aşağıda yer almaktadır.

Hinf I Enzimi Kesim Bölgesi

5'-G^ANTC-3'
3'-CTNAG-5'

Restriksiyon enzim kesim sonrası wild tip (Thr) allel için 406 bç'lik ve Polimorfik allel (Ile) için 29 bç'lik azalmayla 377 bç'lik ürün elde edildi (95).

4.6.3.3. TLR9 genindeki rs187084 (-1237 T/C) polimorfizminin çalışılması

TLR9 genindeki rs187084 (-1237, T/C) ve TLR10 genindeki rs4129009 (2322A/G, Exon 3 1775V) polimorfizmlerinin değerlendirilmesi için www.ensembl.org web adresi kullanılarak genlerin tam dizilerine ulaşıldı ve primer dizayn edildi. Polimorfizmlerin değerlendirilmesinde RFLP yöntemi kullanılırken özellikle seçilen enzimin star aktiviteye sahip olmaması tercih edildi.

Tablo 2: TLR9 genine ait rs187084 (-1237, T/C) polimorfizimi için dizayn edilen primerler ve BspTI(AfIII) restriksiyon enzim kesim bölgesi.

tgctgctgagccagccagatgcctggc**ACTATGGAGCCTGCCATGATACC**acccagagtg
ggcctgggggggagcaggctggcagatgtgcagcctgcctcctcccagcagcaacaattcattaattcattcattcag
ccttcactcagaaataccctctctgtgcctgcccagagctgactgctgggtgtacataattcagcagatatcaagcactt
actatgtgctgggcactgtactggatcctggggatgcagataaaagatcactgcc**C↓TTAAG**aagctgacattc
cagcaggggaataagacgatatacaataaacatgaaagatcaatgatccggtgtgctagcagttaaaaatgttagg
acaaagagaaacatagaccaggcaaaggagctcaggagtgccagatctg**GGGTGGGAGGTTTGT**
AAGAAGGCTGGATggccctgttgagagggtgac atgggagcag

Primerler http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html programı kullanılarak dizayn edildi.

Forward (İleri) primer: 5'-ACTATGGAGCCTGCCTGCCATGATACC-3'

Revers (Geri) primer: 5' ATCCAGCCTTCTTACAAACCTCCCACCC-3'

Restriksiyon Enzimi: BspTI (AfIII)

BspTI Restriksiyon Enziminin özgün kesim bölgeleri aşağıda yer almaktadır

BspTI enzimi kesim bölgesi	5'-C [^] T T A A G-3'
	3'-G A A T T [^] C-5'

Primerlerle PZR sonrası 423bp'lik amplifikasyon ürünü elde edilmektedir.

RFLP için bspTI restriksiyon enzimi kullanıldı. BspTI restriksiyon enzimi ile

kesim yapıldıktan sonra 172bp ve 251bp'lik RFLP ürünleri elde edildi. RFLP ürünleri %2'lik agoroz jelde görüntülendi.

Wild : 251bp + 172bp (TT)

Heterozigot: 423bp+251bp + 172bp (TC)

Mutant: 423bp (CC)

4.6.3.4. TLR10 genindeki rs4129009 (2322A/G, Exon 3 (I775V)) polimorfizminin çalışılması

TLR10 geni için çalışılacak polimorfizmin seçilmesinde Sun ve arkadaşlarının çalışması kullanıldı (126).

Tablo 3: TLR10 genine ait rs4129009 (2322A/G, Exon 3 (I775V)) polimorfizmi için dizayn edilen primerler ve VspI restriksiyon enzim kesim bölgesi.

atgaattctactttgccaccacaatctcttccatgaaaattctgatcatataattcttat**CTTACTGGAACCC**
ATTCCATTCTATTGCattccaccaggtatcataaactgaaagctctcctggaaaaaaagcatacttg
gaatggcccaaggataggcgtaaatgtgggctttctgggcaaaccttcgagctgct**AT↓TAAT**gttaatgtatt
agccaccagagaaatgtatgaactgcagacattcacagagttaaatgaagagtctcgaggttctacaatctctctgatg
agaacagattgtctataaaatcccacagtccttgggaagttgggga**CCACATACACTGTTGGGAT**
GTACATTGAtacaacctttatgatggcaattgacaatatttattaaaataaaaaatggttattcccttcatatcag
tttctagaaggatttctaagaatgtatcctataga

Primerler http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html programı kullanılarak dizayn edildi.

Forward (İleri) primer: -5'-CTTACTGGAACCCATTCCATTCTATTGC-3'

Revers (Geri) primer: -5'-TCAATGTACATCCCAACAGTGTATGTGG-3'

Restriksiyon Enzimi: VspI

VspI Restriksiyon Enziminin özgün kesim bölgeleri aşağıda yer almaktadır.

VspI enzimi kesim Bölgesi	5'-A T [^] T A A T-3'
	3'-T A A T [^] T A-5'

Primerlerle PZR sonrası 309bp'lık amplifikasyon ürünü elde edilmektedir. RFLP için VspI restriksiyon enzimi kullanıldı. VspI restriksiyon enzimi ile kesim yapıldıktan sonra 168bp ve 141bp'lık RFLP ürünleri elde edildi. RFLP ürünleri %2'lik agoroz jelde görüntülendi.

Wild : 141bp + 168bp (AA)

Heterozigot: 309 bp+141bp + 168bp (AG)

Mutant: 309 bp (GG)

TLR9 ve TLR10 genleri için çalışılan polimorfizmlerin doğrulanması için DNA dizileme yapıldı. Bu amaçla her bir polimorfizm için wild, heterozigot ve mutant olduğu RFLP yöntemi ile tespit edilen örnekler PZR ile çoğaltıldı. Laboratuvarlarımızda DNA dizileme cihazı bulunmadığından örnekler Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez laboratuvarına gönderildi ve tüm DNA dizileme işlemleri bu birim tarafından gerçekleştirildi.

4.6.4. PZR kurulması işlemi

PZR 0.5 ml'lik tüplerde toplam hacim 30µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 6 µl hasta DNA'sı ve üzerine 3 µl MgCl₂, 3 µl 10X buffer, 3 µl dNTP (2.5mM), 1 µl primer 1 (30 pmol), 1 µl primer 2 (30 pmol), 0.1 U Taq DNA polimeraz ve 13 µl ddH₂O konuldu. Hazırlanan tüpler vortekslendi ve PZR cihazına önceden girilmiş olan programda PZR işlemi gerçekleşti. PZR sonrası ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

4.6.5. PZR koşulları

Değerlendirilen tüm polimorfizmler için aynı PZR koşulları kullanıldı.

94 °C de 5 dakika	
55 °C de 1 dakika	1 döngü
72 °C de 1 dakika	
94 °C de 1 dakika	(denatürasyon)
60 °C de 1 dakika	(eşleşme)
72 °C de 1 dakika	(sentez)
	35 döngü
94 °C de 1 dakika	
55 °C de 1 dakika	1 döngü
72 °C de 7 dakika	

4.7. PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi

Kesim 25 µl üzerinden yapılmıştır. 20 µl PZR ürünü, 2,5 µl 10Xbuffer, 0.5 U restriksiyon enzimiyle toplam hacim 25 µl'ye tamamlanmıştır.

Kesim işlemi NcoI, HinfI, VspI ve BspTI için 37° C'de ve TaqI için 65° C'de 16 saat bekletilmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. Tüm enzimler için aynı kesim protokolü uygulandı.

4.8. Agaroz jel elektroforezi

Yapılan bu çalışmada PZR ile çoğaltılmış ürünlerin tanımlanması için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Elde edilen ürünlerin büyüklüklerini tanımlayabilmek için % 4'lük jel kullanıldı. Kullanılan elektroforez düzeneğine uygun hacim; toz halindeki agarozun 0.5X TBE tamponunda manyetik karıştırıcı bir mikrodalga fırında kaynatılarak çözülmesi ile oluşturuldu. Ardından kaynamış çözelti 55–60 °C'ye soğutularak 0.25 µg/ml EtBr ilave edildi. Kuyuları oluşturacak olan tarak, tabağına yerleştirildikten sonra hazırlanan jel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde buraya döküldü. Jelin polimerizasyonu sonrası tarak dikkatlice çıkarılarak jel platformu 0.5XTBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Bu tampondan jelin üzerini 1–2 mm geçecek kadar eklendi. Örnekler ve belirteç DNA, 6X yükleme boyası ile 5:1 oranında karıştırılarak kuyulara 15'er µl yüklendi. Güç kaynağı açılarak 90 V'a ayarlandı. Yaklaşık yarım saat sonra güç kaynağı kapatıldı. Jel görüntüleme sisteminde UV ışını altında incelendi (6, 27).

4.9. Romatid artritli hastaların serum örneklerinde otoantikorların çalışılması

Hastaların kan örnekleri santrifüjde 3000 rpm'de 5 dakika çevrildi. Santrifüj sonrası üstteki serum ayrılarak ependorf tüplere aktarıldı. Serum örnekleri ELİSA çalışmaları yapılana kadar -20°C'te saklandı. Tüm ELİZA çalışmaları, Fırat Üniversitesi Hastanesi İmmünoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapılarak değerlendirildi.

4.9.1. Anti-RNP Çalışılması

Anti RNP otoantikörlerinin tespiti için REAADS anti-RNP (Corgenix, Colorado, USA) kiti kullanıldı. Yöntem kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

4.9.2. Anti-CCP Çalışılması

Anti-CCP otoantikörlerinin tespitinde Aeskuİsa RA/ CP-Detect (Aesku, Wendelsheim, Germany) kiti kullanıldı. Yöntem kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

4.9.3. Anti-Kollojen Tip II Çalışılması

Anti-Kollojen tip II otoantikörlerinin tespiti Collogen Type II, Human IgG, anti-Human BioAssay ELISA (USBiological, Massachusetts, USA) Kiti kullanılarak yapıldı. Yöntem üretici firmanın protokolüne uygun olarak yapıldı.

4.10. İstatistik Analizler

İstatistiklerin hazırlanmasında SPSS for Windows 12,0 paket istatistik programı (SPSS Inc. Chicago IL USA) kullanıldı. Parametreler arası ilişkiler Pearson korelasyon analizi kullanılarak değerlendirildi. Hasta ve kontroller genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Ki-kare analizi ile yapıldı. Gruplar arası farkların değerlendirilmesinde non-parametrik bir test olan Mann-Whitney-U testi kullanıldı. Değerlendirmelerde $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Çalışma grubunda 94 erkek ve 6 kadın vardı ve hastaların yaş ortalamaları 51.03 (Min:24-Max:75, Std. Dev: 12.48)'di. Kadınların yaş ortalaması 50.73 (Min:24-Max:75, Std. Dev: 12.12), erkeklerin yaş ortalaması 55.66 (Min:30-Max:75, Std. Dev: 17.92)'dir. Hasta grubunun demografik özellikleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4: Hastaların demografik ve klinik özellikleri.

Demografik Özellik	Ortalama $\pm$ SD (N=100)
Yaş (yıl, min-mak)	51.03 $\pm$ 12.4 (24-75)
Cinsiyet (kadın/erkek)	94/6
Hastalık süresi (yıl)	8.96 $\pm$ 7.11
Sabah tutukluğu (dak)	0.98 $\pm$ 1.15
ESR (mm/saat)	29.81 $\pm$ 24.20
CRP (mg/L)	17.55 $\pm$ 24.96
Hemoglobin (g/dl)	12.42 $\pm$ 1.47
Romatoid Faktör (IU/ml)	186.85 $\pm$ 195.37
Ritchie artiküler indeks (RAİ)	16.23 $\pm$ 13.74
DAS28	4.04 $\pm$ 1.41

RF ve DAS28 değerleri arasında pozitif bir korelasyon bulundu ($p=0.01$). Das28 ve anti-CCP arasında anlamlılığa yakın bir ilişki bulunmasına rağmen bu ilişki istatistiki olarak anlamlı değidi ($p=0.07$). Çalışmada anti-CCP 91 hastanın serumunda değerlendirildi. Anti-CCP açısından hastaların 64'ü (%70.3) pozitif ve 27'si (%29.7) negatif olarak değerlendirildi. Anti-CCP ve Ritcthie eklem indeksi arasında pozitif bir ilişki tespit edildi ($p=0.03$). Anti-kollojen tipII antikör düzeyleri ve hasta yaşı arasında pozitif bir ilişki bulundu ($p=0.047$).

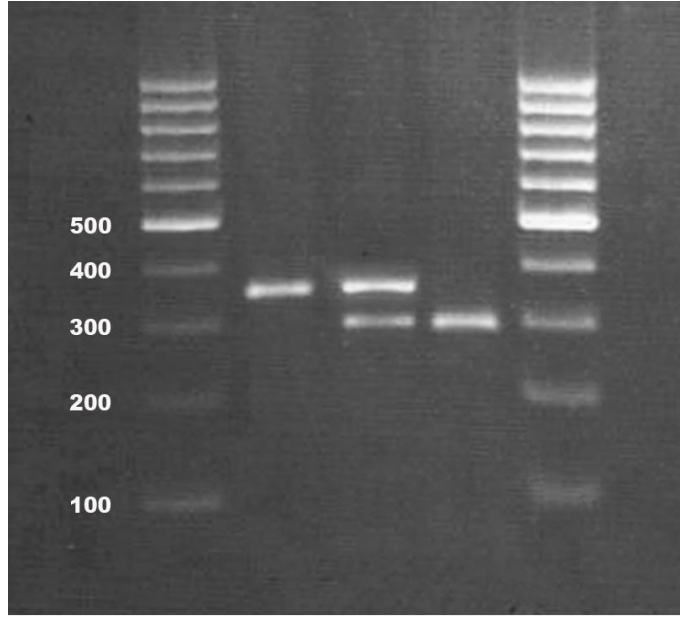
5.1. Hasta ve kontrollerde TLR3 rs3775290 (1377 C/T) polimorfizm dağılımları

Hasta ve kontrol grubu arasında TLR3 genotipleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($X^2=0,56$, $df=2$, $p=0,75$). TLR3 allel sıklıkları kontrol ve hasta grubu arasında karşılaştırıldığında allel sıklıkları açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($X^2=0,42$ $df=1$, $p=0,51$). CC ve CT genotipleri ($p=0.71$, $OR=0.71$, $CI=0.2-1.9$), CC ve TT genotipleri ($p=0.61$, $OR=0.6$, $CI=0.2-1.8$), CT ve TT genotipleri ($p=0.83$, $OR=0.9$, $CI=0.5-1.6$) karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Hastaların demografik özellikleri, DAS28 ile TLR3 genotipleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilmedi. TLR3 genotipleri ile anti-hnRNP, anti-CCP, RF ve anti-kollejenaz II' gibi otoantikörler pozitiflikleri arasında herhangi bir ilişki bulunmadı. Şekil 1'de TLR3 genindeki 1377 C/T polimorfizmine ait agaroz jel resmi gösterilmektedir.

Tablo 5: TLR3 1377 C/T polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları.

Genotipler	TT (%)	TC (%)	CC (%)	p
Hasta (n=100)	% 11	% 43	%46	-
Kontrol (n=100)	% 8	% 43	%49	-
Alleler	T	C		p
Hasta (n=100)	0.325	0.675		-
Kontrol (n=100)	0.295	0.705		-

∴ $p>0.05$



Şekil 1: TLR3 genindeki rs3775290 (1377 C/T) polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bç'lik DNA Boyut Markırı, Sütun 2: 337 bp (TT: mutant örnek), Sütun 3: 337bp+275bp+62bp (CT: heterozigot örnek), Sütun4: 275bp+62bp (CC: wild örnek).

5.2. Hasta ve kontrollerde TLR4 rs4986790 (Asp299Gly) ve rs4986791 (Thr399Ile) polimorfizm dağılımları

Tablo'6 da Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerinin hasta ve sağlıklı kontroldeki genotip dağılımları ve allel sıklıkları verilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında Asp299Gly (odds ratio, OR=3.2, %95 CI 1.2-8.5, p=0.02) ve Thr399Ile allel (OR=2.5, %95 CI 1.04-6.11, p=0.05) sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edildi. Her iki allel sıklığının da hasta grubunda artmış olduğu belirlendi. Buna göre Gly allel sıklığı hasta grubunda %17, kontrol grubunda %6

ve Thr399Ile Ile allel sıklığı hasta grubunda %18, kontrol grubunda %8 olarak belirlendi. RA'lı hastaların %10'nunda Asp299Gly ve Thr399Ile allellerinin beraber segregasyon gösterdiği belirlendi. Şekil 2'de Asp299Gly genotiplerinin ve Şekil 3'de ve Thr399Ile genotiplerinin agaroz jel görüntüleri gösterilmektedir.

Hastaların demografik özellikleri ve DAS28 ile TLR4 genotipleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilemedi. TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile gen polimorfizimleri ile anti-hnRNP, anti-CCP, RF ve anti-kollejenaz II' gibi otoantikorlar pozitiflikleri arasında herhangi bir ilişki bulunamadı. TLR4 299 polimorfizminin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hasta grubunda anlamlı olarak artmış olduğu tespit edilmiştir. Ancak hastalığın demografik ve klinik özellikleri ile D299G polimorfizimi arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki tespit edilemedi.

Tablo 6: TLR4 Asp299Gly polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları.

Genotipler	Asp/Asp(%)	Asp/Gly(%)	Gly/Gly(%)	p
Hasta (n=100)	% 83	% 17	0	*
Kontrol (n=100)	% 94	% 6	0	-
Alleler	Asp	Gly		p
Hasta (n=100)	0.83	0.17		**
Kontrol (n=100)	0.94	0.06		-

*: p<0.05

** : p<0.01

Tablo 7: TLR4 Thr399Gly polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları.

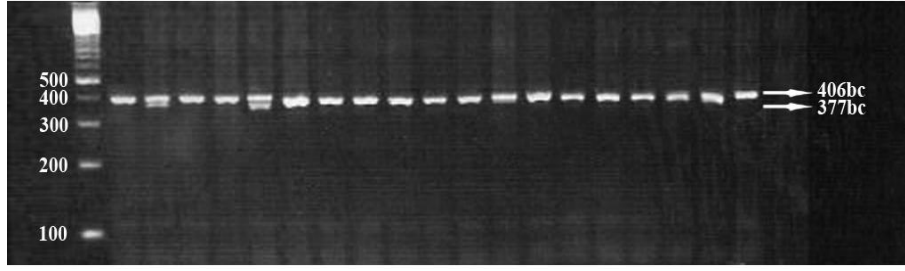
Genotipler	Thr/Thr (%)	Thr/Ile (%)	Ile/Ile (%)	p
Hasta (n=100)	% 82	% 18	0	*
Kontrol (n=100)	% 92	% 8	0	-
Alleler	Thr	Ile		p
Hasta (n=100)	0.82	0.18		*
Kontrol (n=100)	0.92	0.08		-

*: $p < 0.05$

** : $p < 0.01$



Şekil 2: TLR4 genindeki Asp299Gly polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bp'lik DNA Boyut Markırı, Sütun2 ve 3: 249bp (Asp/Asp: wild örnek) , Sütun4: 249bp+196bp (Asp/Gly: heterozigot örnek). D: Aspartik asit, G: Glisin.



Şekil 3: TLR4 genindeki Thr399Gly polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bç'lik DNA Boyut Markırı, Sütun 2: 406 bç (Thr/Thr: wild örnek), Sütun3: 406bç+377bç (Thr/Gly: heterozigot örnek). T: Treonin, G: Glisin.

5.3. Hasta ve kontrollerde TLR9 rs187084 (-1237, T/C) polimorfizm dağılımları

Wild tip bölgeyi kesen BspTI enzimi kullanılarak RFLP yöntemiyle polimorfizm kontrol ve hasta grubunda başarıyla genotiplendirildi. DNA dizilemeyle RFLP sonuçları kontrol edildi ve doğrulandı. Şekil 4'de TLR9 polimorfizmine ait agaroz jel görüntüsü yer almaktadır. Şekil 5 ve Şekil 6'da farklı genotiplerin DNA dizileme sonuçları gösterilmektedir. Hasta kontrol grubundaki genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Tablo 8'de gösterilmiştir. Hasta ve kontrol arasında TLR9 genotipleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edildi ($X^2=8,698$, $df=2$, $p= 0,013$). Hasta ve kontrol grubu arasında TT, TC ve CC genotipleri karşılaştırıldığında sırasıyla TT ve TC arasında $OR=1.58$ ($0.7-3.2$), $p=0.27$, TT ve TC arasında $OR=3.18$ ($1.4-7.0$), $p=0.007$ ve TC ve CC arasında $OR=2.0$ ($1.0-3.9$), $p=0.04$ değerleri bulundu. TLR9 allel sıklıkları kontrol ve hasta grubu arasında karşılaştırıldığında C allelinin hasta grubunda azalmış sıklığa sahip olduğu saptandı ($X^2=9,014$, $df=1$, $p= 0,003$). Hastaların demografik özellikleri, DAS28, anti-hnRNP, anti-CCP, RF ve anti-kollejenaz II' ile TLR9

genotipleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilmedi. TLR9 genotipleri ve tedavi öncesi CRP (p=0.035), RF (p=0.034) değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edildi. Tedavi öncesi CRP değerlerinin C alleleline sahip bireylerde artmış olduğu bulundu (Tablo9). Aktif ve inaktif hasta gruplarında genotip dağılımları karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık gösterildi ($X^2=7,49$, df=2, p= 0,024). İnaktif hasta grubunda C allel sıklığının artmış olduğu bulundu ($X^2=5,11$, df=1, p= 0,024) (Tablo10).

Tablo 8: TLR9 rs187084 (-1237, T/C) polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları.

Genotipler	TT (%)	TC (%)	CC (%)	p
Hasta (n=100)	% 37	% 45	%18	*
Kontrol (n=100)	% 20	% 49	%31	-
Alleler	T	C		p
Hasta (n=100)	0.60	0.40		**
Kontrol (n=100)	0.45	0.55		-

*: p<0.05

**: p<0.01

Tablo 9: TLR9 genotipleri ve tedavi öncesi CRP ve RF değer dağılımları.

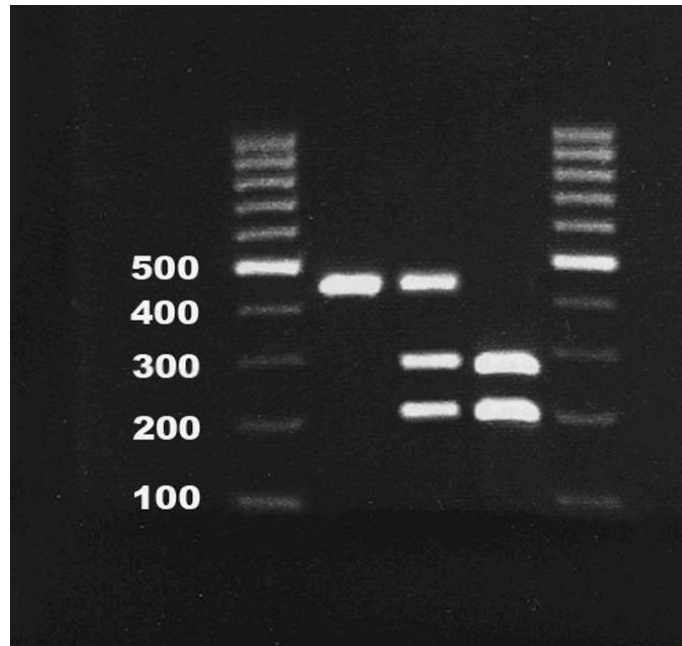
Genotipler	TT	TC	CC	p
CRP	13,19±16,25	17,55±28,25	26,79±29,69	*
RF	201,37±186,05	206,79±211,20	103,66±157,21	*

*: p<0.05

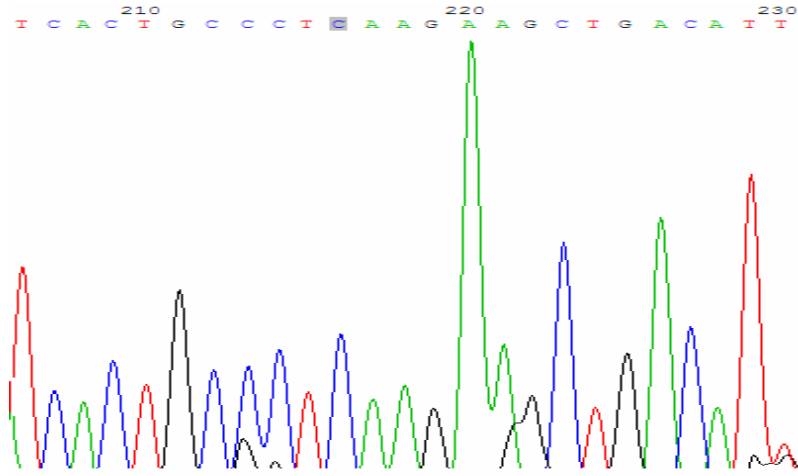
Tablo 10: TLR9 genotiplerinin aktif ve inaktif gruplardaki dağılımları.

Genotipler	TT	TC	CC	p
Aktif hasta grubu (n=34)	11	13	10	*
İnaktif hasta grubu (n=54)	5	27	22	*
Alleler	T	C		p
Aktif hasta grubu	0.51	0.49		*
İnaktif hasta grubu	0.34	0.66		*

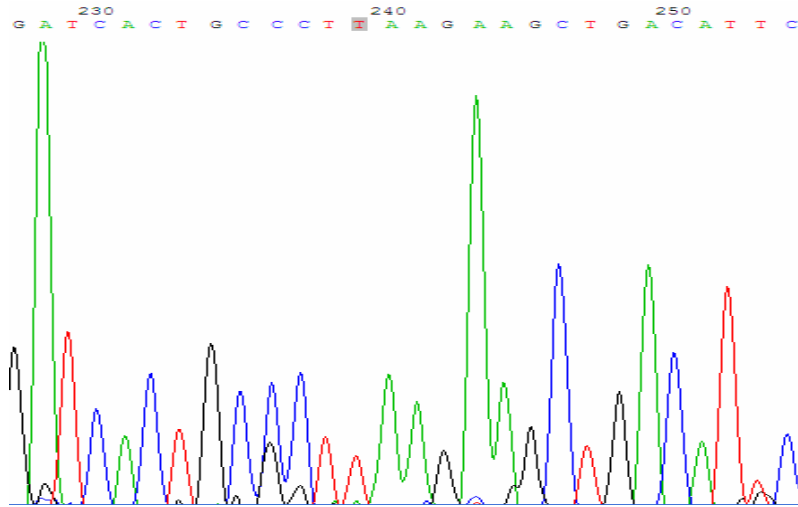
*: $p < 0.05$



Şekil 4: TLR9 genindeki rs187084 (-1237, T/C) polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bç'lik DNA Boyut Markırı, Sütun 2: 423bp (CC: mutant örnek), Sütun 3: 423bp+251bp + 172bp (TC: heterozigot örnek), Sütun4: 251bp + 172bp (TT: wild tip örnek).



Şekil 5: TLR9 genindeki rs187084 (-1237, T/C) polimorfizmi için CC genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (gccC↓TTAAGaag).



Şekil 6: TLR9 genindeki rs187084 (-1237, T/C) polimorfizmi için TT genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (gccC↓TTAAGaag).

5.4. Hasta ve kontrollerde TLR10 rs4129009 (2322A/G, Ekzon 3 (1775V) polimorfizm dağılımları

Wild tip bölgeyi kesen VspI enzimi kullanılarak RFLP yöntemiyle polimorfizm kontrol ve hasta grubunda başarıyla genotiplendirildi. Şekil 7’de TLR10 polimorfizmine ait agoroz jel görüntüsü yer almaktadır. Şekil 8 ve Şekil 9’da farklı genotiplerin DNA dizileme sonuçları gösterilmektedir. Sonuçlar DNA dizilemeyle doğrulandı. Hasta ve kontrol grubu arasında TLR10 genotipleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($X^2=1,33$, $df=2$, $p= 0,51$). TLR10 allel sıklıkları kontrol ve hasta grubu arasında karşılaştırıldığında allel sıklıkları açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($X^2=0,52$ $df=1$, $p= 0,46$). AA ve AG genotipleri ($p=0.26$, $OR=1.4$, $CI=0.7-2.5$), AA ve GG genotipleri ($p=0.97$, $OR=1.0$, $CI=0.3-2.8$), AG ve GG genotipleri ($p=0.74$, $OR=1.3$, $CI=0.4-3.9$) karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Hastaların demografik özellikleri ve DAS28 ile TLR10 genotipleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilmedi. TLR10 genotipleri ile anti-hnRNP, anti-CCP, RF ve anti-kollejenaz II’ gibi otoantikorlar pozitiflikleri arasında herhangi bir ilişki bulunmadı.

Tablo 11: TLR10 +2322 A>G polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları.

Genotipler	AA (%)	AG (%)	GG (%)	p
Hasta (n=100)	% 55	% 36	%9	-
Kontrol (n=100)	% 48	% 44	%8	-
Alleler	A	G		p
Hasta (n=100)	0.73	0.27		-
Kontrol (n=100)	0.70	0.30		-

*: p<0.05

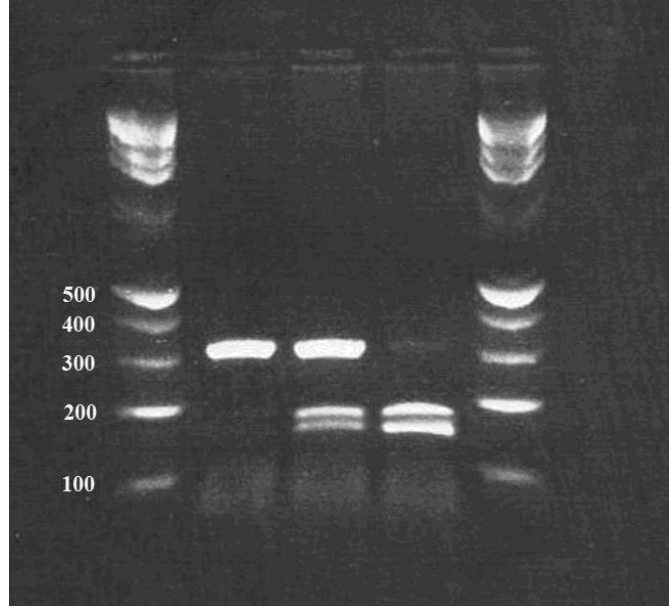
-: p>0.05

TLR10 genotipleri ve hastalık süresi arasında genotipler açısından anlamlı bir farklılık tespit edildi.

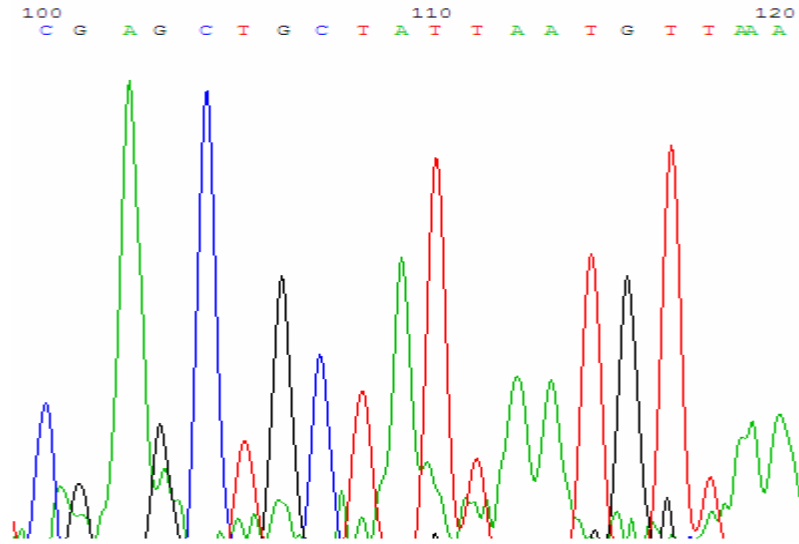
Tablo 12: TLR10 +2322 A>G polimorfizm genotipleri ve ortalama hastalık süresi dağılımları.

Genotipler	AA (%)	AG (%)	GG (%)	p
Hastalık süresi	14,44±11,84	9,90±6,32	7,42±6,15	*

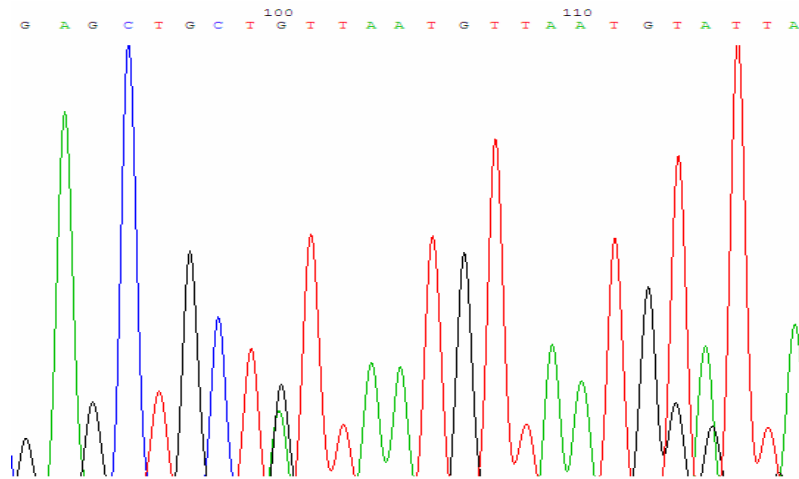
*: p<0.05



Şekil 7: TLR10 genindeki +2322 A>G polimorfizm için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bç'lik DNA Boyut Markırı, Sütun 2: 309 bp (GG: mutant örnek), Sütun 3: 309 bp+141bp + 168bp (AG: heterozigot örnek), Sütun 4: 141bp + 168bp (AA: wild örnek).



Şekil 8: TLR10 genindeki +2322 A>G polimorfizm için AA genopine ait DNA dizileme görüntüsü (gctAT↓TAATgtt).



Şekil 9: TLR10 genindeki +2322 A>G polimorfizm için GG genopine ait DNA dizileme görüntüsü (gctGT↓TAATgtt).

6. TARTIŞMA

İlk keşfedildiği 1991 yılından itibaren TLR ve hastalıklar arasındaki ilişkilerin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda TLR polimorfizmleri ve bazı hastalıklar arasında ilişkilerin olduğu bulunmuştur. Enfeksiyon, otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda TLR rolü olduğu gösterilmiştir. İnate immün sistemin bileşeni olan bu reseptörler farklı molekülleri tanıyarak proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açmaktadırlar. TLR reseptörlerinin aktivasyonu, patojenlere karşı konakçı ve otoimmün yanıtının oluşmasını sağlamaktadır (37).

TLR3 genindeki 1377 C/T polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Bu çalışmada TLR4 genindeki Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir farklılık olduğu ve hasta grubunda varyant genotiplerin kontrole göre anlamlı olarak arttığı bulundu (sırasıyla, $p=0.02$ ve $p=0.05$). TLR9 genindeki -1237 T/C genotip ve allel sıklıkları hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldığında TT genotip ve ($p=0.01$) ve allel ($p=0.003$) sıklıklarının hasta grubunda artmış sıklığa sahip olduğu bulundu. TLR9 genotipleri ve CRP değerleri karşılaştırıldığında CC genotipine sahip hastalarda CRP değerlerinin daha yüksek olduğu bulundu. TLR9 TT genotipine sahip hastalarda 13.19 ± 16.25 mg/l, TC genotipine sahip hastalarda 17.55 ± 28.25 mg/l ve CC genotipine sahip hastalarda 26.79 ± 29.69 mg/l ortalama CRP değerleri bulundu. Hasta grubunda CC allel genotipinin azalmış sıklığa sahip olduğu görüldü. Hasta ve kontrol grubu

arasında TLR10 genotip ve allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

RA patogenezi tam olarak bilinmeyen kompleks bir hastalıktır (83). Patogeneizde doğal ve kazanılmış immün sistemin önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Deneysel RA modelleri de patogeneizde doğal immün sistemin rolü olduğunu desteklemektedir. TLR'ler özellikle monosit, makrofaj ve dentritik hücreler tarafından eksprese edilmektedir. Makrofaj ve dentritik hücreler üzerindeki TLR'ler, doğal immün sistemin aktivasyonunu sağlayarak proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açmaktadırlar. Bu aktivasyon T ve B hücrelerini içeren kazanılmış immün cevabın gelişmesini uyarmaktadır. Kazanılmış immün cevabın gelişimden sonra proinflamatuvar sitokinler RA patogenezine doğrudan katkı sağlayabilmektedir (74). RA'da, romatoid artritlerin oluşmasına, inflamatuvar cevabı uyaran çeşitli potansiyel uyarıcıların neden olduğu ileri sürülmektedir. Mikrobial ürünler immün ve inflamatuvar cevaba yol açan TLR yoluyla inflamatuvar hücreleri aktive edebilirler. Artritlerde özellikle TLR2 ve TLR4 inflamatuvar siklusun başlamasında kritik role sahiptirler (83).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ankilozan spondilitli bireylerin lökositlerinde ve RA hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde TLR2 ve TLR4 ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (16, 75, 143). TLR2 ve TLR4'ün RA sinovial doku makrofajlarında eksprese olduğu tespit edilmiştir (75). Sinovial makrofajlar RA'da proinflamatuvar sitokinlerin ana kaynağıdır. Makrofajlar doğal immün sistemin önemli bir bileşeni olup TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin ana kaynağıdır. Bu sitokinlerden olan IL-8 RA'da inflamasyona ve eklem

destruksiyonuna yol açmaktadır (74). Bu veriler, kronik sinoviositlerde makrofajların önemini göstermektedir. TLR'ler bu prosesin başlamasında ve ilerlemesinde görevli olabilirler. RA hastalarının eklemlerinden elde edilen CD14+ makrofajlarda, kontrol makrofajları ile karşılaştırıldığında TLR2 ve TLR4 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur.

Pek çok farklı çalışmada TLR4 geninde yer alan Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerinin çeşitli hastaların patogenezinde rolü olup olmadığı ve farklı toplumlardaki allel sıklıkları araştırılmıştır. Gendeki polimorfizmlerin bazı inflamatuvar ve infeksiyon hastalıklarına katkı sağlayabileceği ortaya konmuştur ve bu iki polimorfizmin allel sıklıklarının populasyonlar arasında farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Achyut ve arkadaşları gastrit ve prekanseröz lezyonlara sahip 130 hasta ve 200 asemptomatik kontrolde TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerini değerlendirmişlerdir. Thr399Ile genotip sıklıkları hasta grubunda %8 ve kontrol grubunda %3, Asp299Gly sıklıkları hasta grubunda %6.5 ve kontrol grubunda %3 olarak tespit edilmiş ve hasta grubunda her iki polimorfizmin de artmış sıklığa sahip olduğu ortaya konmuştur. Polimorfizmlerin gastrit ve prekanseröz lezyonlar için bir risk faktörü olabileceğini belirtmişlerdir (1). Hernesniemi ve arkadaşları TLR4 Asp299Gly polimorfizm G alleli ve artmış karotid arter elastikliği arasında bir ilişki olduğunu ve bu allelin koruyucu etkisinden dolayı bu bireylerin kardiovasküler hastalık risklerinin azalabileceğini bildirmişlerdir (69). Schürman ve arkadaşları sarkoidozlu bireylerde Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerini değerlendirmişler ve hastalıkla bu polimorfizmler arasında herhangi bir ilişki tespit etmemişlerdir (121). Urcelay ve arkadaşları TLR4 varyant genotip ve multiple skleroz arasında herhangi bir ilişki tespit

edememişlerdir (133). Kolz ve arkadaşları tip II şeker hastalığı ve TLR genindeki Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını belirtmişlerdir (81). Hong ve arkadaşları Kron hastalarında yaptıkları meta analizler sonucunda TLR4 Asp299Gly ve TLR9 1237C polimorfizmlerine ait varyant genotiplerin kron hastalığıyla beraberlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır (73). Hawn ve arkadaşları lejyoner hastağı ve TLR4 genindeki Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri arasında ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Hasta grubunda Asp299Gly varyant sıklığını %2.5 ve kontrol grubunda %6.5 olarak bulmuşlardır. Thr399 Ile'nin Asp299Gly ile beraber segregasyon gösterdiğini ve bu polimorfizm içinde aynı beraberliğin söz konusu olduğunu söylemişlerdir (66). Emonts ve arkadaşları TLR4 genindeki Asp299Gly varyantının da rekürrent otitis media artmış sıklığa sahip olduğu tespit edilmiştir (48). Mockenhaupt ve arkadaşları Malaria'lı çocuklarda TLR4 genindeki Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerini sağlıklı kontrolle karşılaştırarak incelemişlerdir. Malaria'lı çocuklarda Asp299Gly allel sıklığını %24.1, kontrolde %17.6 ve Thr399Ile allel sıklığını hasta grubunda %6.2, kontrolde %2.4 olarak belirlemişlerdir. Bu varyantların malaria enfeksiyonunun ortaya çıkması ile beraberlik gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (102). Aynı araştırmacılar P. falciparum ile infekte gebe kadınlarda yaptıkları çalışmada benzer şekilde TLR4 Asp299Gly varyantı ve TLR9 T-1486C polimorfizmlerinin hastalığın ortaya çıkmasıyla beraberlik gösterdiğini tespit etmişlerdir (103).

Berdeli ve arkadaşları Türk kronik periodontis hastalarında TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerini çalışmışlardır. Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizm sıklıkları sırasıyla hasta grubunda %2,4 ve %1,8, kontrol

grubunda ise %2.8 ve %2.5 olarak tespit etmişlerdir (23). Biz çalışmamızda kontrol grubunda bu allel sıklıklarını sırasıyla %6 ve %8 olarak tespit ettik. Türk toplumunda bu polimorfizmin farklı çalışmalarda farklı sıklıklarda bulunmasının en önemli sebeplerinden birinin bölgesel farklılıklar olabileceğini düşünmekteyiz. Ferwerda ve arkadaşları 15 popülasyondan 2491 bireyde yaptıkları TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizm değerlendirmesinde dünyanın farklı bölgelerindeki toplumlarda Asp299Gly ve Thr399Ile allellerinin farklı prevalansa sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Örneğin Batı Afrika'da sadece Asp299Gly alleli tanımlanırken Beyaz ırkta Asp299Gly alleli ile Thr399Ile allelinin %98 oranında beraber segregasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir (54). Biz çalışmamızda bu oranı %55,5 olarak belirledik. Bu iki polimorfizmin beraber segregasyonları toplumlar arasında farklılıklar göstermektedir. Bunun temel nedeni göçler ve seleksiyonlardır (54). Literatürde Türk popülasyonda bu iki allelin segregasyon oranlarına ait verilere rastlanmamıştır.

Carvalho ve arkadaşları non invaziv pulmoner aspergillozis ve TLR2, TLR4 ve TLR9 polimorfizmlerini incelemişlerdir. Sonuç olarak TLR4 Asp299Gly G varyantının kronik kaviter pulmoner aspergillozisle ve TLR9 1237 T→C polimorfizminin C allelinin allerjik pulmoner aspergillozisle beraberlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır (36).

Çalışmamızda TLR4 genindeki Asp299Gly ve Thr399Ile olmak üzere iki adet önemli fonksiyonel polimorfizmi değerlendirdik ve kontrolle karşılaştırıldığında bu polimorfizmlerin hasta grubunda ki artmış sıklığının istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edildi. RA ve TLR4 genindeki

polimorfizmler arasındaki ilişkilerin çalışıldığı çalışmalarda oldukça farklı veriler elde edilmiştir. Sheedy ve arkadaşları 964 RA hastası ve 965 sağlıklı kontrol bireyinde TLR4 Asp299Gly polimorfizmini çalışmışlardır. Varyant allel sıklığını RA hasta grubunda %12,2 ve kontrol grubunda %12,8 olarak tespit etmişlerdir. RA ve TLR4 polimorfizmi arasında ve TLR4 polimorfizmleri romatoid faktör (RF) veya anti-CCP durumu veya radyolojik hasar arasında herhangi bir ilişki tespit etmemişlerdir. Bu polimorfizmlerin RA hastalığına yatkınlık yada hastalığın ciddiyetine katkı sağlamadığını belirtmişlerdir (123). Kilding ve arkadaşları Asp299Gly polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak anlamlı ilişki tespit etmemişlerdir. Bu polimorfizmin hastalığın etyopatogenezinde veya gidişatında rol oynamadığını belirtmişlerdir (80). Sanchez ve arkadaşları 122 SLE ve 244 RA hastasında TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerini incelemişler ve hastalığın demografik veya klinik parametreleriyle araştırılan polimorfizmler arasında herhangi bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir (116). Radstake ve arkadaşları diğer çalışmaların tersine RA hastalarında yaptıkları çalışmada TLR4 Asp299Gly polimorfizm sıklığının hasta grubunda kontrole karşılaştırıldığında daha az olduğunu tespit etmişleridir. Ancak radyolojik hasar ve diğer klinik parametreler arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (111). Radsake ve arkadaşlarının çalışması diğer çalışmalarla doğrulanmamıştır. Kuuliala ve arkadaşları RA hastalarında TLR4 +896 G allelini taşıyan hastalarda tedavi cevabının bozulabileceğini belirtmişlerdir (85). Kang ve arkadaşları sistemik otoimmün hastalığa sahip bireylerde yaptıkları çalışmada Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerini Kore toplumunda tespit edememişler ve bu polimorfizm açısından etnik farklılıkların önemli olabileceğini ileri

sürmüşlerdir (77). Diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda TLR4 Asp299Gly allelinin kontrolle karşılaştırıldığında hasta grubunun artmış allel sıklığının istatistiki olarak anlamlı olduğu bulundu. Ancak diğer çalışmalarla benzer şekilde hastalığın dermografik ve klinik özellikleri ile bu polimorfizmler arasında herhangi bir ilişki tespit edilmedi.

Varyantların RA etyopatogenezinde nasıl bir rol oynadıkları tam olarak bilinmemektedir. Ancak, bazı muhtemel mekanizmalar vardır. İlk olarak RA'da TLR sinyal mekanizmasının aktivasyonu ile ilgili çeşitli deliller mevcuttur. RA hastalarının eklemlerinden elde edilen makrofajlarda TLR4 ve TNF- α ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. RA'da TNF- α blokajının kültüre alınmış dentritik hücrelerde azalmış TLR4 ekspresyonuna yol açtığı tespit edilmiştir (74). TLR sinyalizasyonu doğal immün sistemin önemli bir bileşenidir. Antijen sunan hücrelerde endojen veya ekzojen uyarıcı moleküllerle artmış TLR sinyalizasyonunun kazanılmış immün sistem aktivasyonunu kolaylaştırabileceği gösterilmiştir. Böylece kazanılmış immün sistem bileşeni olan T hücre aktivasyonu gerçekleşebilmektedir (57). Varyantın ekzojen ve endojen ligandlara cevapta yetersiz sinyalizasyona neden olduğu belirtilmektedir (7). Endojen ligandlar TLR'yi aktive ederek düzenleyici mekanizmaların yokluğunda patolojik immün cevaba neden olabilmektedirler.

TLR4 sinyalizasyonu kazanılmış immün yanıtın oluşmasında ve artritlerin patogenezinde erken dönemde önemli olabilir. Varyantların sitokin ekspresyonları üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklı sonuçların en muhtemel sebebinin çalışmalarda kullanılan farklı yöntemler olduğunu düşünülebilir. Balistreri ve arkadaşları TLR4 Asp299Gly

varyant genotipine sahip olan ve olmayan bireylerin kanlarında yapılan 4, 24 ve 48 saatlik ölçümler sonucunda eikosanoid, lökotrien B4 ve prostoglandin E2 değerlerinin varyant taşıyanlarda daha düşük değerlere sahip olduğunu göstermişlerdir. Varyant genotipe sahip bireylerin azalmış inflamatuvar cevabından dolayı atheroskleroz veya kardiovasküler hastalıklara yakalanma riskinin daha az olduğunu belirtmişlerdir (18). Arbour ve arkadaşları Asp299Gly polimorfizmi açısından heterozigot olan bireylerin epitelial hücrelerinin fonksiyonel olarak azalmış bir immün cevaba sahip olduğunu ortaya koymalarına rağmen varyantın sitokin üretimi üzerine etkisi tespit etmemişlerdir (7). Taudorf ve arkadaşları TLR4 genindeki Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerinin IL-6, TNF- α ve IL-10 sitokin ekspresyonları üzerine etkilerini incelemişlerdir. Ancak polimorfizmler ve sitokin gen ekspresyonları arasında bir ilişki tespit etmemişlerdir (130). Roelofs ve arkadaşları TLR4 Asp299Gly varyantını taşıyan ve taşımayan romatoid artritli hastaların TLR4 eksprese eden CD14+ hücrelerde sitokin gen ekspresyonunu incelemişlerdir. Sonuç olarak varyant taşıyan hastalarda CD14+ hücrelerinin daha yüksek sayıda olduğunu, IL-6, IL-10 ve TNF- α ekspresyonlarının ve inflamatuvar aracılarda ekspresyonunun azaldığını tespit etmişlerdir. RA'lı hastalarda TLR4 varyantı, azalmış TLR4 aracılı cevaba yol açmaktadır ve bu hastalarda CD14+ hücrelerin sayısının TLR4 varyant negatif bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (113). Kowalski ve arkadaşları yeni tanı konmuş RA hastalarının uyarılmamış PBMC hücrelerinde sağlıklı kontrol ve osteoartritlerle karşılaştırıldığında IL-6 ve TNF- α 'nın azalmış bir üretime sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak, LPS ile uyarma sonucunda RA hastalarında daha fazla olmakla beraber üç grupta da TLR4 aracılı IL-6 ve

TNF- α üretiminin arttığını göstermişlerdir. Bu IL-6 ve TNF- α 'nın RA'da eklem inflamasyon patogeneğinde önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan diğer çalışmalarda her iki sitokininde kontrolle karşılaştırıldığında RA hastalarında artmış olduğu tespit edilmiştir. Yeni tanı konmuş hastalarda PBMC'de azalmış bir sitokin üretim profili olmasına rağmen bu hücreler LPS uyarımından sonra yüksek miktarlarda sitokin üretme potansiyeline sahiptirler. TLR2 ve TLR4 ligandlarının sinovial sıvıdaki makrofajlarda sitokin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Tedaviye başlanmamış RA hastalarında dolaşımdaki inflamatuvar hücreler TLR4 uyarılması yoluyla proinflamatuvar sitokinlerin salınımını başlatabilirler. Kontrol ve osteoartritlerinki ile karşılaştırıldığında RA hastalarının monositlerindeki LPS uyarımı sonucu artmış sitokin üretiminin sebebi bu hücrelerin yüzeyindeki TLR4 reseptörlerinin sayısındaki artıştan kaynaklanmaktadır (83).

Bakteriel infeksiyonların RA etyopatogeneğinde rol oynadığı bilinmektedir. RA hastalarında bakteriel antikor düzeyleri artmıştır. RA'lıların sinoviumunda ve dokularında bakteriel ürünler sıklıkla bulunabilmektedir. Bakteriel peptidoglycan-polysaccharide complexes (PG-PS) bakteri hücre duvarında bulunmaktadır. PG-PS'nin farelerde insandaki RA'ya benzer klinik özelliklere sahip hastalığa neden olduğu gösterilmiştir. CD14 + hücrelerinin PG-PS tarafından indüklenen artritlerde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. CD14 eksik farelerde PG-PS indüksiyonu, artrit oluşumuna yol açmamakta ve in vitro inflamatuvar cevabı indükleyememektedir (92).

Osteoklastlar RA eklemlerinde kemik yıkımıyla beraberlik göstermektedirler. RA'lı eklemlerdeki osteoklastların orijini tam olarak

bilinmemesine rağmen kemik iliği kökenli CD14+ hücrelerin osteoklastların gelişiminden sorumlu olduğu bilinmektedir. Hem monosit hem de dentritik hücreler osteoklastlara farklılaşabilirler. Osteoklast oluşumu, kemiğin yeniden şekillenmesinde (remodeling) osteoklast prekürsörleri ve osteoblastlar arasında hücre-hücre etkileşimi için gereklidir. RA'lıların sinoviumunda fibroblast benzeri sinoviositler kemik veya kemik iliği kökenli hücrelerin yokluğunda osteoklastlara farklılaşmak için makrofajları uyarma potansiyeline sahiptirler. TLR4 varyant genotipe sahip bireylerde artmış CD14+ hücre sayısı RA'lı eklemlerde osteoklastların gelişimine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Son zamanlarda CD14+ hücrelerin RA'da pannus oluşumunda kritik role sahip olduğu gösterilmiştir (105). IL-10, TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin azalmış ekspresyonları, kronik inflamasyona yol açarak uzun dönemde makrofajların osteoklastlara dönüşümünde rol oynayarak RA'da plak oluşumuna yol açabilirler. Çalışmamızda RA hastalarındaki artmış TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile varyant sıklıklarının kronik inflamasyona ve eklem destüksiyonuna katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

TLR3 viral antijenik cevaptan sorumlu olan bir reseptördür. Çoğu virüsün hayat siklusunun bir bileşeni olan çift iplikli RNA'ya cevaptan sorumludur. Antijen sunan dentritik hücrelerde eksprese olmaktadır. 4q35'de lokalize olan TLR3 geni 15942bp bir genomik bölgede yer almakta ve 5 ekzon içermektedir. Gen 3057bp'lik bir mRNA transkripte etmekte ve 904 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır (5). Gende pek çok polimorfizm tespit edilmiştir. He Jun-Fang ve arkadaşları 434 nazofarenjial kanser ve 512 sağlıklı kontrolde TLR3 genindeki 829 A/C polimorfizmini incelemişlerdir. Bu polimorfizmin nazofarenjial kanser

riski ile beraberlik gösterdiğini belirtmişlerdir (68). Pirie ve arkadaşları pankreas ve antijen sunan dentritik hücrelerde eksprese olan TLR3 geninin Tip I şeker hastalığı için aday bir gen olduğunu söylemişlerdir. Gendeki 2593C/T major alleli, 2690 A/G ve 2642C/A minor allellerinin tip I şeker hastalığının gelişimine katkı sağlayabileceğini ileri sürmüşlerdir (110). Çalışmamızda TLR3 genindeki 1377 C/T polimorfizmi RA hastalarında ve kontrol grubunda benzer sıklıklarda bulunmuş ve hasta ile kontrol grubu arasında genotip veya allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Sonuç olarak gendeki 1377C/T polimorfizminin RA etyopatogeneze katkı sağlamadığını düşünmekteyiz.

Bakteriel DNA'da var olan metillenmemiş CpG motifleri doğal ve kazanılmış immün cevaplar yoluyla konakçı immün sistemini aktive etmektedir. LPS'nin fare makrofaj ve dentritik hücrelerinde TLR9 mRNA düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Böylece bakteriyel bileşenlerin TLR9 ekspresyonunu etkileyerek in vivo IgM üretimine yol açtığı ileri sürülmektedir. Sekretuar IgM eksik fareler mikrobiyal infeksiyonlara daha meyillidirler ve LPS uyarımını takiben anti-ds DNA antikorları üretilmektedir. Bozuk IgM sekresyonu bu hayvan modelinde otoimmüniteye yatkınlık ortaya çıkarabilir. Hipometilli DNA içeren kromatin IgG kompleksleri TLR9 ve BCR yoluyla B hücrelerini aktive edebilirler ve bu da farede romatoid faktör üretimine yol açmaktadır (79).

Bu polimorfizm, genin promoter bölgesinde yer almaktadır ve genin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyebilmektedir. Kikuchi ve arkadaşları primer bilier sirozda TLR9 genindeki -1237 TC polimorfizmini incelemişlerdir. Ancak, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulmamışlardır. 30

hastanın altısında heterozigot (T alleli) genotip tespit etmişlerdir (79). Lazarus ve arkadaşları Afrikalı Amerikalılar, Beyaz ırk ve Hispanik Amerikalılarda DNA dizileme ile TLR9 polimorfizmlerini taramışlardır. Yaptıkları hasta kontrol çalışmasında TLR9 genindeki -1237 polimorfizminin C allelinin Avrupalı Amerikalılarda astım hastalığı için bir risk faktörü olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer TLR polimorfizmleri ve astım arasında herhangi bir ilişki bulmamışlardır. Ayrıca, kalp krizi, derin ven trombozu ve TLR9 polimorfizmleri arasında bir ilişki tespit etmemişlerdir (88). Noguchi ve arkadaşları 32 astım hastasında bu polimorfizme rastlamamışlardır (104). Lammers ve arkadaşları İtalyan pouchitis hastalarında TLR 9 genindeki -1237 T→C polimorfizmini kontrolle karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda kontrol grubunda allel sıklıklarını TT 158, TC 60 ve CC 6 ve hasta grubunda TT 19, TC 14 ve CC 2 olarak tespit etmişlerdir. C allel sıklığının tekrarlayan pouchitiste arttığını bulmuşlardır (86). Yapılan diğer bazı çalışmalarda gendeki -1237 T→C polimorfizminin SLE ve atopi arasında herhangi bir beraberlik bulmamışlardır (24, 44). Bu veriler TLR genlerindeki polimorfizmlerin toplumlar arasında oldukça farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamız Türk popülasyonunda ve RA hastalarında TLR9 genindeki 1237 T→C polimorfizminin değerlendirildiği ilk çalışmadır. 1237 T→C polimorfizm sıklıkları RA hasta grubunda TT %37, TC %45 ve CC %18 ve kontrol grubunda TT % 20, TC % 49 ve CC %31 şeklinde olup C allel sıklığı RA hastalarında azalmış sıklığa sahiptir. C allelinin RA'da koruyucu bir etkisi olduğunu düşünmekteyiz. TLR9 TT genotipine sahip hastalarda 13.19 ± 16.25 , TC genotipine sahip hastalarda 17.55 ± 28.25 ve CC genotipine sahip hastalarda

26.79±29.69 ortalama CRP değerleri bulundu. Bu da hasta grubundaki azalmış CC genotip sıklığıyla tutarlıdır. CC genotipinin artmış CRP değerlerine neden olup olmayacağı bilinmemektedir. Literatür taramalarında bu konuda herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Bu verilerin yapılacak analizlerle doğrulanması gerekmektedir.

RA'nın immunogenetiğinde hastalığın başlamasında ve ilerlemesinde T hücre aktivasyonun bozulmasının anahtar rol oynadığı ileri sürölmektedir (39). CD4+T hücreler TH1 ve TH2 olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. TH1/Th2 hücreleri arasındaki dengesizlik ve T hücrelerinin patojenik aktivasyonu RA'daki kronik inflamasyonun ana nedeni olarak görölmektedir. Düzenleyici T hücreleri (Treg; regulatory T cell) tarafından pek çok TLR eksprese edilmektedir. Özellikle Treg hücrelerinde yüksek miktarda TLR10 eksprese edilmektedir. (22). Bu hücreler otoimmünitenin engellenmesinde ve periferal toleransın korunmasında önemli rol oynamaktadırlar. Otoreaktif T hücreleri tarafından proinflamatuvar sitokin üretimini ve proliferasyonunu baskılayarak otoimmün hastalıkların gelişimini engellemektedirler (55, 94). Treg hücrelerinin RA hastalarının sinovial sıvılarında arttığı gösterilmiştir (134). Düzenleyici T hücrelerin dolaşımda azalması veya kaybolması otoimmün sendromların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu hücreler aynı zamanda enfeksiyonlar boyunca doku hasarının engellenmesi için immün cevabı baskılamaktadır. Treg'lerin TLR2, 4, 5 ve 8 ligandlarına cevap verdiği rapor edilmiştir (127).

Kormann ve arkadaşları TLR10 genindeki rs4129009 polimorfizminin artmış mRNA ve Th1 sitokin ekspresyonuna neden olarak inflamatuvar cevabı arttırdığını, TH2 ilişkili IL-4 üretimini ise azalttığını belirtmişlerdir (82). Lazarus

ve arkadaşları astım hastalarında TLR10 genindeki bazı polimorfizmlerin astıma yatkınlık sağlayabileceğini belirtmişlerdir (89). Sun ve arkadaşları prostat kanserinde TLR10 genindeki polimorfizmlerin hastalıkla arasındaki ilişkileri incelemişlerdir. TLR10 genindeki 2322A/G polimorfizmine ait G allelinin hastalık için bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir (126). Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında genotip veya allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Ancak A alleleline sahip bireylerin daha uzun bir hastalık süresine sahip olduğu bulundu. AA genotipinde 14.44 ± 11.84 , AG genotipinde 9.90 ± 6.32 ve GG genotipinde 7.42 ± 6.15 ortalama hastalık süreleri tespit edildi.

ACR 1987 revize kriterlerine 2008 yılında Lao ve ark. anti-CCP düzeylerini de ekleyerek özellikle erken RA'da duyarlılık ve özgüllüğü test etmeyi amaçlamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda bir modifikasyon ortaya çıkmıştır. Bu modifikasyona CCP 6 kriterleri adı verilmiştir. Bu kriterlere göre ACR 1987 revize kriterinden romatoid nodül ve radyografik değişiklikler çıkarılmış, Anti-CCP antikor varlığı (ikinci kuşak anti-CCP titre >5 U/ml = pozitif) eklenmiş, bu oluşan altı kriterden ≥ 3 kriter RA için yeterli sayılmıştır. Oluşan yeni kriterlerin (CCP 6) kriterlerinin semptom süresi altı ay ve daha az olan RA'lı hastalardaki duyarlılığı %62 (ACR 1987 %34), özgüllüğü ise %72 (ACR 1987 %86) olarak bulunmuştur. Erken ve geç tüm hastalar ele alındığında ise CCP 6 kriterlerinin duyarlılığı %70 (ACR 1987 %50), özgüllüğü ise %81 (ACR 1987 %91) olarak bulunmuştur. Ancak, bu kriterler henüz yeni yayın aşamasındaki kriterler olup ileri ki çalışmalarda tutarlılıkları test edilmelidir (108).

Erre ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada anti-filagrin antikorları içerisinde, Anti-CCP'nin RA teşhisinde en iyi tanı koydurucu antikor olduğunu ve

ayrıca erken artrit hastalığının kalıcılığını ve radyolojik hasar gelişimini tahmin etmede belirleyici olduğunu ifade etmişlerdir (50). Palosuo ve arkadaşları RA tanısında kullanılan antikorlar içerisinde en yüksek özgüllüğe Anti- CCP'nin sahip olduğunu belirtmişlerdir (109). Schellekens ve arkadaşlarının RA'lı hastalarda, başka romatizmal hastalığı olan hastalarda, enfeksiyöz hastalığı olan kişilerde ve sağlıklı bireylerde anti-CCP'yi ölçtükleri çalışmalarında anti-CCP antikorlarının RA için çok özgül (% 98) olduğunu belirtmişlerdir (119). Tampoia ve arkadaşlarının 83 RA'lı hasta ve 140 kontrol grubunda (çeşitli otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve kanserli hastalardan oluşan) yaptığı çalışmada anti-CCP'nin duyarlılığı %67.5 ve özgüllüğü % 99.3 buldular (129). RF için duyarlılığı % 66.3, özgüllüğü % 82.1 idi. Her iki antikor birlikte kullanıldığında özgüllük % 99.1'di (94). Solanki ve arkadaşları, erken RA'lı (hastalık süresi 2 yılın altında olan) ve geç RA'lı (hastalık süresi iki yılın üstünde olan) hastalarda anti-CCP ve RF'nin spesifitesini araştırdıkları çalışmalarında; erken RA'lı hastalarda RF ve anti-CCP'nin duyarlılığı sırasıyla % 57 ve % 79'du. Bu oran geç RA'lı hastalarda ise % 81 ve %84'dü. Erken RA tanısında anti-CCP'nin RF'den % 20 daha duyarlı olduğu bildirmektedirler (125). Dündar ve arkadaşları anti-CCP'yi 24 hastada (%64.9) pozitif, 13 hastada (%35.1) negatif bulmuşlardır. Çalışmamızda örneklerin %70.4'ünde anti-CCP pozitifliği tespit edilirken örneklerin %29.6'sında anti-CCP negatif olarak bulundu (46). Bu sonuç literatür ile uyumludur. Meyer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada RA'lı 191 hastayı beş yıl süre ile takip etmişler anti-CCP pozitif hastalarda radyolojik hasarın, erozyonların ve eklem darlığı gelişiminin üç kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır (101). Çalışmamızda ritche artiküler indeks ve anti-CCP arasında istatistiki olarak

anlamalı bir ilişki bulmamıza rağmen anti-CCP pozitifliği ve DAS28 arasında bir ilişki bulamadık bu ilişkiyi araştırmak için daha geniş hasta grupları içeren yeni çalışmalar yapılmalıdır.

6.1. Öneriler

Son zamanlarda insan genomundaki doğal genetik varyasyonlar ve bunların klinik ve fonksiyonel önemleriyle ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu ilerlemeler bize bazı multifaktoriyel hastalıkların oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayan genetik faktörlerin anlaşılmasında yol gösterici olacaktır. İnsan genomunda polimorfizmlerin çoğu fonksiyonel olarak nötraldir. Yani, genin oluşturduğu protein yapısını ya da fonksiyonunu etkilemezler. Bununla birlikte bazı polimorfizmler gen yapısındaki kodlayıcı alanları ya da düzenleyici bazı dizileri etkileyerek gen transkripsiyonu, mRNA stabilitesi, RNA uç birleştirme, protein yapısı ve fonksiyonunu etkileyebilmektedirler. Böyle değişiklikler hastalık yatkınlığını ve ciddiyetini artırma ya da azaltma, tedaviye cevap ve ilacın yan etkilerine karşı hassasiyet gibi farklı klinik etkiler ortaya çıkarabilirler (6)

Polimorfizmlerin değerlendirilmesinde kullanılan restriksiyon enzim uzunluk polimorfizm yöntemi gerçek zamanlı PZR gibi yöntemlerin gelişmesine rağmen halen spesifik, hızlı ve diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha ekonomik bir şekilde polimorfizm ve mutasyonların tespitini sağlamaktadır. Çalışmamızda seçilen tüm polimorfizmlerin değerlendirilmesinde RFLP yöntemi kullanılmış ve tüm değerlendirilen polimorfizmler başarıyla genotiplendirilmiştir. RA hastalarında daha önce TLR3, TLR9 ve TLR10 genlerindeki polimorfizmler

çalışılmamıştır. Literatür değerlendirmemize göre bu tez, ilgili genlerdeki polimorfizmlerin RA’da çalışıldığı ilk araştırmadır. TLR9 ve TLR10 genlerindeki polimorfizmlerin çalışılmasında gereç ve yöntemde ayrıntılı olarak anlatılan RFLP yöntemin referans oluşturacağını düşünmekteyiz.

Bu çalışmanın sonuçları ışığında sağlıklı kontrolle karşılaştırıldığında RA hastalarında TLR4 varyant genotiplerinin artmış olduğunu tespit edildi. TLR4 genindeki artmış Asp299Gly ve Thr399Ile varyant sıklığı ve TLR9 genindeki azalmış -1237 C varyant sıklığının RA etyopatogenezinde rol oynayan mekanizmalardan biri olabileceğini düşünmekteyiz. TLR3 genindeki 1377C/T ve TLR10 genindeki 2322A/G polimorfizmleri hasta ve grubunda benzer sıklıklarda bulunmuş ve istatistiki olarak hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında her iki polimorfizm için anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Her iki geninde RA immünogenetiğinde önemli rolleri olabileceğini düşünmekteyiz. Bu genlerde yer alan diğer polimorfizmlerin hastalığa katkı sağlayıp sağlamadığının belirlenmesi için gerek Türk popülasyonunda gerekse diğer popülasyonlarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanatındayız. Çalışmada elde edilen verilerin doğrulanabilmesi için aynı polimorfizmlerin farklı toplumlarda RA hastalarında çalışılarak verilerimizin daha fazla araştırılmayla desteklenmesi gerekmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar RA tanısında kullanılabilecek duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek yeni otoantikörlerin araştırılmasına yoğunlaşmıştır. Elde edilen tüm veriler anti-CCP’nin RA için aslında iyi bir serolojik belirteç olduğunu göstermektedir. Anti-CCP RA’da birinci basamak diagnostik test olarak kullanılmaya uygundur. Çünkü hastalığın klinik tablosu oturmadan önce de sıklıkla tespit edilebilir. Anti-CCP prognostik potansiyeli sayesinde agresif tedavi

adaylarını belirlemede de yardımcı olur. Anti-CCP seronegatif RA'lı hastalarda RA teşhisini koymada faydalı olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Achyut BR, Ghoshal UC, Moorchung N, Mittal B. (2007). Association of Toll-like receptor-4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Hum Immunol* 68(11):901-7.
2. Adışen E, Önder M. (2006). Dermatolojide Toll Like Reseptörler. *Dermatose* 1: 14-21.
3. Aho K, Palusuo T, Kurki P. (1994). Marker antibodies of rheumatoid arthritis: diagnostic and pathogenetic implications. *Semin Arthritis Rheum* 23:379-387.
4. Akin H. (2003). Tıbbi Genetik Terimler Sözlüğü. *Sendrom III* 1(1):17.
5. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-8.
6. Andrews AT.: Electrophoresis, 2nd ed. Clarendon press, Oxford, UK, 1986.
7. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25(2):187-91.
8. Ardiçoğlu Ö, Özgöçmen S, Kamanlı A, Pektutucu İ. (2001). Relationship between bone mineral density and radiologic scores of hands in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Densitometry*. 4(3):263-269.
9. Ardiçoğlu Ö. (2002). Romatoid artrit tanısında ve takibinde kullanılan laboratuvar parametreleri. *Romatoid Artrit Tanı ve Tedavisinde Son Gelişmeler Sempozyumu Özet Kitabı*. Sayfa 23-38.
10. Arend WP. (2001). The innate immune system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44:2224-34.
11. Arman M İ. (2002). Romatoid artrit kliniği: erken romatoid artritteki klinik sendromlar, hastalığın seyri, tutulan eklemler ve bulguları. *Romatoid Artrit Tanı ve Tedavisinde Son Gelişmeler Sempozyumu Özet Kitabı*. Sayfa 1-2.
12. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-324.
13. Ataman Ş, Ergin S. (1996). Romatoid artrit etyopatogenezi. *Romatizma* 11(3):191-200.
14. Ataoğlu S. (2002). Romatoid artrit eklemler destruksiyonunun mekanizması. *Romatoid Artrit Tanı ve Tedavisinde Son Gelişmeler Sempozyumu Özet Kitabı*. Sayfa 14-22.
15. Baeten D, Peene I, Union A, Meheus L, Sebbag M, Serre G, Veys EM, De Keyser F. (2001). Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium relevance to anti-flaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum* 44:2255-62.
16. Baeten D. (2005). Tumor necrosis factor - blockade treatment downmodulates the increased systemic and local expression of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 52:2146-58.

17. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. (2004). Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol* 30(6):593-601.
18. Balistreri CR, Candore G, Listi F, Fazio T, Gangi S, Incalcaterra E, Caruso M, Vecchi ML, Lio D, Caruso C. (2007). Role of TLR4 polymorphisms in inflammatory responses: implications for unsuccessful aging. *Ann N Y Acad Sci* 1119:203-7.
19. Barland P, Lipstein E. (1996). Selection and use of laboratory tests in the rheumatic diseases. *Am J Med* 24(3):525-538.
20. Barrera P, Blom A, van Lent PL, van Bloois L, Beijnen JH, van Rooijen N, de Waal Malefijt MC, van de Putte LB, Storm G, van den Berg WB. (2000). Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43:1951-9.
21. Barton A, Ollier W. (2002). Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 14:260-269.
22. Bell MP, Svingen PA, Rahman MK, Xiong Y, Faubion WA Jr. (2007). FOXP3 regulates TLR10 expression in human T regulatory cells. *J Immunol* 1;179(3):1893-900.
23. Berdeli A, Emingil G, Han Saygan B, Gürkan A, Atilla G, Köse T, Baylas H. (2007). TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *J Clin Periodontol* 34(7):551-7
24. Berghofer B, Frommer T, König IR, Ziegler A, Chakraborty T, Bein G, Hackstein H. (2005). Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* 35:1147-54.
25. Blackburn WD, Chatham WW. (2001). Laboratory findings in rheumatoid arthritis. *Arthritis and allied conditions*. Koopman W J. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 1(60):1202-1222.
26. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. (2008). Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 75(4):373-5.
27. Bottema CD., Sommer SS.: PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutation and polymorphisms. *Mutat. Res.* 288:93-102, 1993.
28. Boullart AC, Aarntzen EH, Verdijk P, Jacobs JF, Schuurhuis DH, Benitez-Ribas D, Schreibeit G, van de Rakt MW, Scharenborg NM, de Boer A, Kramer M, Figdor CG, Punt CJ, Adema GJ, de Vries IJ. (2008). Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E(2) results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunol Immunother* 57(11):1589-97.
29. Brentano F, Kyburz D, Schorr O, Renate Gay, Gay S. (2005). The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cellular Immunology* 233: 90-96.

30. Bridges SL. (2001). Rheumatoid factor. Arthritis and allied conditions. Koopman W J. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 1(61):1223-1244.
31. Brooks AJ. (1999). The esence of SNPs. Gene 234 (2): 177-186.
32. Brooks P, Emery P, Evans JF, Fenner H, Hawkey CJ, Patrono C, Smolen J, Breedveld F, Day R, Dougados M, Ehrich EW, Gijon-Baños J, Kvien TK, Van Rijswijk MH, Warner T, Zeidler H. (1999). Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. Rheumatology 38:779-788.
33. Buckner JH, Nepom GT. (2002) Genetics of rheumatoid arthritis: is there a scientific explanation for the human leukocyte antijen association. Current Opinion in Rheumatology. 14:254-259.
34. Cantürk F. (2002). Romatoid artrit patogenezinde enfeksiyonlar ve nöroendokrin aks. Romatoid Artrit Tanı ve Tedavisinde Son Gelişmeler Sempozyumu Özet Kitabı. Sayfa: 5-13.
35. Carpenter S, O'Neill LA. (2007). How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? Cell Microbiol. 9(8):1891-901.
36. Carvalho A, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Romani L, Denning DW, Rodrigues F. (2008). Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. J Infect Dis 15;197(4):618-21.
37. Castiblanco J, Varela DC, Castaño-Rodríguez N, Rojas-Villarraga A, Hincapié ME, Anaya JM. (2008). TIRAP (MAL) S180L polymorphism is a common protective factor against developing tuberculosis and systemic lupus erythematosus. Infect Genet Evol
38. Chen PP, Fong S, Carson DA. (1987). Rheumatoid factor. Rheum Dis Clin N Am 13:545-568.
39. Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. (2007). The central role of T cells in rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 25:4-11.
40. Criscione L G, Clair W S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha antagonists for the treatment of rheumatic diseases. Current Opinion in Rheumatology 14:204-211.
41. Crofford LJ. (2002). Specific cyclooxygenase-2 inhibitors: what have we learned since they came in to widespread clinical use? Current Opinion in Rheumatology 14:225-230.
42. Cush JJ. (1999). Rheumatoid arthritis. Clinical Symposia. 51(1):2-9.
43. Çevik R, Em S, Nas K, Gür A, Denli A, Çolpan L. (2002). Premenapozal romatoid artritli hastalarda seks hormon düzeyleri. T Klin FTR 2:99-103.
44. De Jager P, Richardson A, Vyse T, Rioux J. (2006). Genetic variation in Toll-like receptor 9 and susceptibility to systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 54:1279-82.
45. Direskeneli H. (1996). Anti-nükleer antikörler. Romotoloji Gündemi. 1:104-109.

46. Dündar Ü, Evcik D, Çakır T, Aktepe O, Altındış M, Kavuncu V. Romatoid Artritli Hastalarda Anti-Ccp Antikorlarının Hastalık Aktivitesi Ve Radyolojik Hasar İle İlişkisi *Romatizma, Cilt: 20, Sayı: 2, 2005 9-14*
47. Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Ryczyn MA, Mills J, Sarisky RT, Mbow ML. (2004). Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 72: 7202-11.
48. Emonts M, Veenhoven RH, Wiertsema SP, Houwing-Duistermaat JJ, Walraven V, de Groot R, Hermans PWM, Sanders EAM. (2007). Genetic Polymorphisms in Immunoresponse Genes TNFA, IL6, IL10, and TLR4 Are Associated With Recurrent Acute Otitis Media *Pediatrics* 120: 814-823.
49. Ergin S. (2000). Romatoid artrit ve sjögren sendromu. Beyazova M, Gökçe-Kutsal Y. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. 1. Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara. Sayfa 1549-1576.
50. Erre GL, Tocco A, Faedda R, et al. Diagnostic and prognostic value of antibodies to cyclic citrullinated peptide (Anti-CCP) in rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 2004; 56 (2): 118-123.
51. Felson D. (2001). Epidemiology of the rheumatic diseases. Arthritis and allied conditions. Koopman W J. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 1(1):3-38.
52. Feng Y, Ke X, Ma R, Chen Y, Hu, G, Liu F. (2004). Parallel Detection of Autoantibodies with Microarrays in Rheumatoid Diseases. *Clinical Chemistry* 50: 416–422.
53. Ferucci ED, Majka DS, Parrish LA, Moroldo MB, Ryan M, Passo M, Thompson SD, Deane KD, Rewers M, Arend WP, Glass DN, Norris JM, Holers VM. (2005). Antibodies against cyclic citrullinated peptide are associated with HLA-DR4 in simplex and multiplex polyarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52: 239-46.
54. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermesen CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rúa C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW, Netea MG. (2007). TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16;104(42):16645-50.
55. Flores-Borja F, Mauri C, Ehrenstein MR. (2008). Restoring the balance: harnessing regulatory T cells for therapy in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 38(4):934-7.
56. Fox DA. (2001). Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis and allied conditions. Koopman W J. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 1(55):1085-1102.

57. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P, Wciet De. (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53 987-992.
58. Fries JF. (2000). Current treatment paradigms in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 39(1):30-35.
59. Gaffney K, Scott DGI. (1998). Azathioprine and cyclophosphamide in the treatment of rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology* 37:824-836.
60. Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Nedialka M, Steinert PM. (1990). Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* 29:9423-9440.
61. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Mason-Bessiere C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G. (1999). The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated anti-flaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 162:585-594.
62. Goodson N. (2002). Coronary artery disease and rheumatoid arthritis. *Current Opinion Rheumatology*. 14:115-120.
63. Gracie JA, Leung BP, McInnes IB. (2002). Novel pathways that regulate tumor necrosis faktor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 14:270-275.
64. Hammer J, Gallazi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F. (1995). Peptide binding specificity of HLADR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp Med* 181:1847-55.
65. Hamuryudan V. (1996). Romotoid artritite laboratuvar. *Romotoloji Gündemi* 1:7-9.
66. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*. 2003 Nov 17;198(10):1563-72.
67. He B, Qiao X, Cerutti A. (2004). CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol* 173: 4479-91.
68. He JF, Jia WH, Fan Q, Zhou XX, Qin HD, Shugart YY, Zeng YX. (2007). Genetic polymorphisms of TLR3 are associated with Nasopharyngeal carcinoma risk in Cantonese population. *BMC Cancer* 17;7:194.
69. Hernesniemi JA, Raitakari OT, Kähönen M, Juonala M, Hutri-Kähönen N, Marniemi J, Viikari J, Lehtimäki T. (2008). Toll-like receptor 4 gene (Asp299Gly) polymorphism

- associates with carotid artery elasticity. The cardiovascular risk in young Finns study. *Atherosclerosis*. 198(1):152-9.
70. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. (2003). Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLADRB1* 0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 171:538-41.
 71. Hill JA, Wehrli B, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. (2003). Citrullinated fibrinogen induces arthritis in HLA-DRB1*0401 transgenic mice. *Arthritis Rheum* 5(1):40-8.
 72. Hoffman RW, Gazitt T, Foercking MF, Ortmann RA, Misfeldt M, Jorgenson R, Young SL, Greidinger EL. (2004). U1 RNA induces innate immunity signaling. *Arthritis Rheum* 50: 2891-6.
 73. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. (2007). TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol* 22(11):1760-6.
 74. Huang Q, Ma Y, Adebayo A, Pope RM. (2007). Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56(7):2192-201.
 75. Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Makino H. (2004). Expression of Toll-like receptor 2 on CD16-blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:1457-67.
 76. Jury EC, D'Cruz D, Morrow WJW. (2001). Autoantibodies and overlap syndromes in autoimmune rheumatic disease. *J Clin Pathol* 54: 340-347.
 77. Kang ES, Lee J. (2007). Genotypic analysis of Asp299Gly and Thr399Ile polymorphism of Toll-like receptor 4 in systemic autoimmune diseases of Korean population. *Rheumatol Int* 27(9):887-9.
 78. Kavuncu V. (1998). Romotoid artrit etyopatogenezi. *Türkiye Fiziksel Tıp ve Romotoloji Dergisi*. Özel Sayı: 66-69.
 79. Kikuchi K, Lian ZX, Kimura Y, Selmi C, Yang GX, Gordon SC, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, Ansari AA, Ikehara S, Miyakawa H, Gershwin ME. (2005). Genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 influence the immune response to CpG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 24(4):347-52.
 80. Kilding R, Akil M, Till S, Amos R, Winfield J, Iles MM, Wilson AG. (2003). A biologically important single nucleotide polymorphism within the toll-like receptor-4 gene is not associated with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 21(3):340-2.
 81. Kolz M, Baumert J, Müller M, Khuseynova N, Klopp N, Thorand B, Meisinger C, Herder C, Koenig W, Illig T. (2008). Association between variations in the TLR4 gene and incident type 2 diabetes is modified by the ratio of total cholesterol to HDL-cholesterol. *BMC Med Genet* 25;9:9.

82. Kormann MS, Depner M, Hartl D, Klopp N, Illig T, Adamski J, Vogelberg C, Weiland SK, von Mutius E, Kabesch M. (2008). Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 122(1):86-92.
83. Kowalski ML, Wolska A, Grzegorzczak J, Hilt J, Jarzebska M, Drobniewski M, Synder M, Kurowski M. (2008). Increased responsiveness to toll-like receptor 4 stimulation in peripheral blood mononuclear cells from patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2008:1327-32.
84. Kroon EJA, de Jong BAW, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FHJ, van't Hof M, van de Putte LBA, van Rijswijk MH, van Venrooij WJ, van Riel PLCM. (2000). The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43:1831-1835.
85. Kuuliala K, Orpana A, Leirisalo-Repo M, Kautiainen H, Hurme M, Hannonen P, Korpela M, Möttönen T, Paimela L, Puolakka K, Karjalainen A, Repo H. (2006). Polymorphism at position +896 of the toll-like receptor 4 gene interferes with rapid response to treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65(9):1241-3.
86. Lammers KM, Ouburg S, Morre SA, Crusius JBA, Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, Caramelli E, Conte R, Poggioli G, Campieri M, Pena AS. (2005). Combined carriage of TLR9 -1237C and CD14 -260T alleles enhances the risk of developing chronic relapsing pouchitis. *World J Gastroenterol* 11(46):7323-7329.
87. Lang TJ. (2004). Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol* 113: 224-30.
88. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez F, Weiss ST. (2003). Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 81:85-91.
89. Lazarus R, Raby BA, Lange C, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Vercelli D, Klimecki WJ, Martinez FD, Weiss ST. (2004). Toll-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am J Respir Crit Care Med* 15;170(6):594-600.
90. Lee EK, Kang SM, Paik DJ, Kim JM, Youn J. (2005). Essential roles of Toll-like receptor-4 signaling in arthritis induced by type II collagen antibody and LPS. *Int Immunol* 17:325-33.
91. Levent Ö, Ataman Ş. (2002). Romatoid artrit tedavisinde yeni yaklaşımlar. *T Klin Ftr* 2:124-142.
92. Li X, Bradford BU, Dalldorf F, Goyert SM, Stimpson SA, Thurman RG, Makarov SS. (2004). CD14 mediates the innate immune responses to arthritogenic peptidoglycan-polysaccharide complexes of Gram-positive bacterial cell walls. *Arthritis Res Ther* 6(3):273-81.
93. Lisse JR (1993). Does rheumatoid factor always mean arthritis?. *Postgrad Med* 94:133-134 139.

94. Liu H, Leung BP. (2006). CD4+CD25+ regulatory T cells in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 33(5-6):519-24.
95. Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. (2002). Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 52(3):373-6.
96. Luthra HS. (2001). Extraarticular rheumatoid arthritis. Arthritis and allied conditions. Koopman W J. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 1(59):1187-1201.
97. Mageed RA. (1996). The RF antigen. In:W.J. van R.N. Maini, Editors, *Manuel of biological markers of disease*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands Sayfa1-27.
98. Maini RN, Feldmann M. (1998). Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. Maddison PJ, Isenberg DA, Woo P, Glass DN (editors). *Oxford Textbook of Rheumatology*. Oxford Press, Atlanta. Sayfa 983-1004.
99. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhausser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. (2001). The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the α and β -chains of fibrin. *J Immunol* 166:4177-4184.
100. Menard HA, Lapointe E, Rochdi MD, Zhou ZJ. (2000). Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system. *Arthritis Res* 2:429-32.
101. Meyer O, Labarre C, Dougados M, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 120-126.
102. Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schröder NW, Bienzle U, Schumann RR. (2006). Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *J Commun Dis* 38(3):230-45.
103. Mockenhaupt FP, Hamann L, von Gaertner C, Bedu-Addo G, von Kleinsorgen C, Schumann RR, Bienzle U. (2006). Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *J Infect Dis* 15;194(2):184-8.
104. Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, Shibasaki M, Arinami T. (2004). An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 34:177–183
105. Nozaki T, Takahashi K, Ishii O, Endo S, Hioki K, Mori T, Kikukawa T, Boumpas DT, Ozaki S, Yamada H. (2007). Development of an ex vivo cellular model of rheumatoid arthritis: critical role of CD14-positive monocyte/macrophages in the development of pannus tissue. *Arthritis Rheum* 56(9):2875-85.

- 106.O'dell JR. (2001). Rheumatoid arthritis: the clinical picture. Arthritis and allied conditions. Koopman W J. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 1(58):1153-1186.
- 107.Oliver SJ, Cheng TP, Banquerigo ML, Brahn E. (1995). Suppression of collagen-induced arthritis by an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, in Combination with cyclosporin: reduction of vascular endothelial growth factor (VEGF). Cellular Immunology 166:196-206.
- 108.Özgöçmen S, Romatolojide Sınıflama Kriterleri ve Kısa Klinik Metroloji. Veri Medikal Yayıncılık. 2008 S:16
- 109.Palosuo T, Tilvis R, Strandberg T and Aho K. (2003). Filaggrin related antibodies among the aged. Ann Rheum Dis 62:261-263.
- 110.Pirie FJ, Pegoraro R, Motala AA, Rauff S, Rom L, Govender T, Esterhuizen TM. (2005). Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in South African Blacks with type 1 diabetes. Tissue Antigens 66(2):125-30.
- 111.Radstake TR, Franke B, Hanssen S, Netea MG, Welsing P, Barrera P, Joosten LA, van Riel PL, van den Berg WB. (2004). The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. Arthritis Rheum 50(3):999-1001.
- 112.Reparon-Schuijt CC, van Esch WJE, van Kooten C, Schellekens GA, de Jong BAW, van Venrooij WJ, Breedveld FC, Verweij CL. (2001). Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 44:41-47.
- 113.Roelofs MF, Wenink MH, Toonen EJ, Coenen MJ, Joosten LA, van den Berg WB, van Riel PL, Radstake TR. (2008). The functional variant (Asp299gly) of toll-like receptor 4 (TLR4) influences TLR4-mediated cytokine production in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 35(4):558-61.
- 114.Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. Eur J Immunol 34: 2541-50.
- 115.Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- 116.Sánchez E, Orozco G, López-Nevot MA, Jiménez-Alonso J, Martín J. (2004). Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens 63(1):54-7
- 117.Sanchez E, Orozco G, Martin J. (2004). Toll-Like receptor and human pathology. Immunologia 23: 328-338

118. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. (1998). Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101:273-281.
119. Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing anti-cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 43:155-163.
120. Schroder NW, Schumann RR. (2005). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 5:156-164.
121. Schürmann M, Kwiatkowski R, Albrecht M, Fischer A, Hampe J, Müller-Quernheim J, Schwinger E, Schreiber S. (2008). Study of Toll-like receptor gene loci in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 152(3):423-31.
122. Serre G. (2001). Autoantibodies to filaggrin/deiminated fibrin (AFA) are useful for the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis, and are probably involved in the pathophysiology of the disease. *Joint Bone Spine* 68:103–105.
123. Sheedy FJ, Marinou I, O'Neill LA, Wilson AG. (2008). The Mal/TIRAP S180L and TLR4 G299D polymorphisms are not associated with susceptibility to or severity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67(9): 1328-31.
124. Simon LS, Yocum D. (2000). New and future drug therapies for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 39(1):36-42.
125. Solanki K, Spellerberg M, Chapman P, Moller P, O'Donnell J. Anti-cyclic citrullinated antibodies: complementary to IgM rheumatoid factor in the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *NZ Med J*. 2004 Oct 8;117(1203): U1097.
126. Sun J, Wiklund F, Zheng SL, Chang B, Bälter K, Li L, Johansson JE, Li G, Adami HO, Liu W, Tolin A, Turner AR, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J, Grönberg H. (2005). Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 6;97(7):525-32.
127. Suttmüller R, Garritsen A, Adema GJ. (2007). Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators. *Ann Rheum Dis* 66:91-5.
128. Şafak A. (2002). Romatoid artritte görüntüleme yöntemleri. Romatoid Artrit Tanı ve Tedavisinde Son Gelişmeler Sempozyumu Özet Kitabı. Sayfa 39-44.
129. Tampoia M, Brescia V, Fontana A, Maggiolini P, Lapadula G, Pansini N. Anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies measured by an automated enzyme immunoassay: Analytical performance and clinical correlations. *Clin Chim Acta*. 2005 May;355(1-2):137-44.

130. Taudorf S, Krabbe KS, Berg RM, Møller K, Pedersen BK, Bruunsgaard H. (2008). Common studied polymorphisms do not affect plasma cytokine levels upon endotoxin exposure in humans. *Clin Exp Immunol* 152(1):147-52.
131. Thomas R. Hawn, Annelies Verbon, Marta Janer, Lue Ping Zhao, Bruce Beutler, and Alan Aderem. (2005). Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *PNAS* 102 (7): 2487–2489.
132. Tobian AA, Potter NS, Ramachandra L, Pai RK, Convery M, Boom WH, Harding CV. (2003). Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *J Immunol* 171: 1413-22.
133. Urcelay E, Blanco-Kelly F, de Las Heras V, de la Concha EG, Arroyo R, Martínez A. (2007). TLR4 haplotypes in multiple sclerosis: a case-control study in the Spanish population. *J Neuroimmunol* 192(1-2):215-8.
134. van Amelsfort JM, van Roon JA, Noordegraaf M, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. (2007). Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4⁺,CD25⁺ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56(3):732-42.
135. Vane JR, Botting RM. (1998). Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Research* 47(2):78-87.
136. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB, van Venrooij WJ, Joosten LA. (2003). Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:2489-500.
137. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. (2003). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25:1106-18.
138. Walsh DA. (1999). Angiogenesis and arthritis. *Rheumatology* 38:103-112.
139. Weinblatt ME. (2001). Treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis and allied conditions*. Koopman W J. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 1(62):1245-1258.
140. Weyand CM. (2000). New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 39(1):3-8.
141. Witter J. (2002). Drug development in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 14:276-280.
142. Wucherpfennig KW. (2001). Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 108:1097–1104.
143. Yang ZX, Liang Y, Zhu Y, Li C, Zhang LZ, Zeng XM, Zhong RQ. (2007). Increased expression of Toll-like receptor 4 in peripheral blood leucocytes and serum levels of some cytokines in patients with ankylosing spondylitis. *Clinical & Experimental Immunology* 149(1) : 48–55.

144. Yurtkuran M. (2002). Romatoid artrit'in ekstraartiküler tutulumları. Romatoid Artrit Tanı ve Tedavisinde Son Gelişmeler Sempozyumu Özet Kitabı. Sayfa 3-4.

8.EKLER

8.1. Bilgilendirilmiş hasta onay formu

Toll Like Reseptörler immün sistemde görevli olan proteinlerdendir. Son zamanlarda bu proteinlerin Romatoid Artritte rol oynadıklarına dair çalışmalar yapılmıştır. “Otoimmün Romatoid Hastalıklarda Toll-Like Reseptör 3, 4, 9 ve 10 Polimorfizimleri ve Otoantikor Pozitiflikleri Arasındaki İlişkilerin Araştırılması” adlı çalışmada kullanılmak üzere 4 ml kan alınmasını gönüllü olarak kabul ettiğimi, çalışmanın konusu, çalışmaya katıldığım takdirde herhangi bir ücret talep edilmeyeceği ve çalışma sonuçlarının tedavi sürecimi etkilemeyeceği konularında bilgilendirildiğimi beyan ederim. Araştırmacıların, çalışma sonucunda elde edilen verilerin yayınlanmasında serbest olduklarına dair kanuni iznimi veriyorum.

Bu formu yakınlarınızla görüşmek için evinize götürebilir ve onlarla görüşerek, çalışmaya katılıp katılmama kararını daha sonra verebilirsiniz. Çalışma sonuçları ve hastalığın gidişatı göz önünde bulundurularak hasta doktorundan çalışma sonuçları hakkında bilgi alabilir. Hasta çalışmadan ayrılmak istediğinde formunu geri alabilir. Formunu geri çeken hastanın örneklerine hiçbir işlem yapılmayacaktır.

Formda yer alan kişisel bilgileriniz saklı kalacaktır.

HASTA ADI ve SOYADI:

TARİH:

İMZA:

9. ÖZGEÇMİŞ

31.08.1979 tarihinde İzmit'te doğdum. 1996-2000 yılları arasında Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünü bitirdim. 2000-2002 yılları arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yaptım, 2002 yılından itibaren Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında doktora eğitime başladım. Aynı Anabilimde araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.