

176470

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA HLA-DRB1 ALLEL DAĞILIMI VE
HLA-DRB1 *04 ALT GRUPLARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EMEL ALEMDAROĞLU

TRABZON-2009

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA HLA-DRB1 ALLEL DAĞILIMI VE
HLA-DRB1 *04 ALT GRUPLARININ BELİRLENMESİ**

Emel ALEMDAROĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde

“Bilim Uzmanı”

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02.06. 2009

Tezin Savunma Tarihi : 17. 06. 2009

Tezin Danışmanı : Doç. Dr. Fahri UÇAR

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Murat KARKUCAK

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Trabzon 2009

Bu alışma 2007.114.001.6 numaralı proje kapsamında
KTÜ BAP tarafından desteklenmiřtir

Ö N S Ö Z

*"Romatoid Arthiritli Hastalarda HLA-DRB1 Allel Dağılımı ve HLA-DRB1 *04 Alt Gruplarının Belirlenmesi"* adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Bölgemiz popülasyonunda ilk kez araştırılan bu konuyu titizlikle seçen, Yüksek Lisans çalışmalarım süresince deneysel aşamalarda ve tezin yazımında sürekli desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım sayın Doç. Dr. Fahri UÇAR'a gönülden teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Yüksek Lisans tez çalışmalarım süresince bilimsel deneyimlerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL'e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Figen CELEP ve Doç. Dr. Ersan KALAY'a teşekkürlerimi sunarım. Romatoid artirit hastalarının klinik örneklerin sağlanmasında her türlü maddi ve teknik destek veren FTR Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Mehmet TOSUN'a, aynı anabilim dalından vakaların klinik tanılarını titizlikle gerçekleştiren ve bizleri teşvik eden sayın Yrd. Doç. Dr. Murat KARKUCAK ve Yrd. Doç. Dr. Erhan ÇAPKIN'a teşekkür ederim. Sonuçların istatistik değerlendirmelerindeki yardım ve katkıları için Biyokimya Anabilim dalından sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, Halk Sağlığı Anabilim dalından Dr. Asuman YAVUZYILMAZ'a teşekkür ederim. Öğrenim hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme hoşgörülerinden dolayı müteşekkirim olduğumu belirtmek isterim.

Bu çalışmayı 2007.114.001.6 numaralı proje kapsamında destekleyen KTÜ BAP birimine teşekkür ederim.

Emel ALEMDAROĞLU

Trabzon, Haziran 2009

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
KISALTMALAR	VI
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Romatoid Artirit	2
2.1.1. RA Etiyopatogenezi	2
2.1.2. RA'e Genetik Yaklaşım	3
2.1.3. RA'de Laboratuvar Bulguları	3
2.1.4. RA Tedavisi	4
2.2. Major Histokompatibilite Gen Kompleksi (MHC)	5
2.2.1. İnsan MHC Genleri ve Kalıtımı	6
2.2.2. Sınıf I ve II MHC Moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonları	8
2.2.3. HLA ve RA İlişkisi	10
2.2.4 HLA Doku Tipleme ve Kullanım Alanları	11
3. MATERYAL ve METOD	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Çalışma Grubu	14
3.1.2. Kimyasallar	15
3.1.3. Gereçler	16
3.1.4. Solüsyonlar	17
3.1.4.1. DNA İzolasyon Solüsyonları	17
3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları	18
3.2. Metodlar	19
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	19
3.2.2. DNA'nın Konsantrasyonunun Ölçümü	20
3.2.3. HLA-DRB1* Allel ve DRB1* 04 Alt Tiplerinin PCR-SSP Yöntemiyle Belirlenmesi	20
3.3. İstatistiksel Analizler	22

4. BULGULAR	23
4.1. RA'li Hastalar ve Kontrol Grubunda HLA-DRB1* Allel Dağılımı Sonuçları	23
4.2. RA'li Hastalar ve Kontrol Grubunda HLA-DRB1* 04Alt Tipleri	27
4.3. HLA-DRB1* 04 Taşıyan RA'li Hastalar ve Kontrol Grubunda HLA-DRB1* Dağılımı	30
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
6.1. Sonuçlar	38
6.2. Öneriler	39
ÖZET	40
SUMMARY	41
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	VII

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1987 yılında ARA tarafından revize edilmiş RA tanı kriterleri	4
Tablo 2. MHC lokuslarındaki klasik HLA allel sayısı	6
Tablo 3. MHC genlerinin hücrelerde ekspresyonu ve görevi	9
Tablo 4. HLA hastalık ilişkilerine ait bazı otoimmün hastalıklar	10
Tablo.5. HLA nomenklatürü	12
Tablo 6. Kullanılan kimyasallar ve ürün kodları	15
Tablo 7. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler	16
Tablo 8. HLA DRB1* ve HLA DRB1* 04 analizi için PCR döngü programı	22
Tablo 9. RA'lı hastalar ve popülasyonda HLA-DRB1* pozitiflik oranı	24
Tablo 10. RA'lı hastalar ve popülasyonda HLA-DRB1* allel frekansı dağılımı	25
Tablo 11. RA'lı hastalar ve kontrollerdeki HLA-DRB1*04 alt tiplerinin sıklığı	27
Tablo 12. HLA-DRB1*04 pozitif RA hastaları ve kontrol grubunda ikinci DRB1* allel dağılımı	30
Tablo 13. Çeşitli ülkelerde RA ile ilişkili HLA-DRB1 allelleri	34
Tablo 14. Çeşitli ülkelerde RA'ten koruyucu HLA-DRB1 allelleri	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil.1. İnsan 6. Kromozomunda MHC Gen Bölgesi	6
Şekil.2. Bir Ailede MHC Katılım Modeli	7
Şekil 3 Şekil.3. MHC Sınıf I ve Sınıf II Moleküllerinin Yapısı	9
Şekil.4. HLA Doku Tiplemesinde uygulanan PCR-SSP Yönteminin Aşamaları	13
Şekil 5. RA Hastalarında ve Populasyonda HLA-DRB1 Allellerinin Pozitiflik Oranı	24
Şekil 6. RA Hastalarında ve Kontrol Grubunda HLA-DRB1 Allel Frekansı Dağılımı	25
Şekil 7. DB-1097 no'lu Hastaya ait HLA-DRB1* Jel Fotoğrafi	26
Şekil 8. DB-1098 ve DB-1102 no'lu Hastalara ait HLA-DRB1* Jel Fotoğrafi	26
Şekil 9. RA Hastaları ve Kontrol Grubunda HLA-DRB1* 04 Alt Tiplerinin Dağılımı	28
Şekil 10. DB-924 numaralı hastaya ait HLA-DRB1*0401 jel fotoğrafı	28
Şekil 11. DB- 6306 numaralı kontrol grubuna ait HLA-DRB1*0402 jel fotoğrafı	28
Şekil 12. DB-1097 no'lu hastaya ait HLA-DRB1*0401 jel görüntüsü	29
Şekil 13. DB-6276 no'lu kontrol grubuna ait HLA-DRB1*0403 jel görüntüsü	29
Şekil 14. HLA-DRB1*04 Pozitif hastalar ve Kontrol Grubunda Diğer allelerin Dağılımı	30

KISALTMALAR

RA :	Romatoid Artrit
MIM :	Mendelian İnheritance in Man
HLA :	İnsan Lökosit Antijeni
DRB1 :	İnsan Lökosit Antijeni DR gen bölgesi
MHC :	Majör Histokompatibilite Kompleksi
EBV :	Ebstein barr virüs
RF :	Romatoid Faktör
ARA :	Amerikan Romatizma Birliği
Ig :	İmmünglobulin
IgA :	İmmünoglobülin A
IgM :	İmmünoglobülin M
COX-2:	Siklo-oksijenaz 2 inhibitörleri
AZA :	Azotioprin
PCR-SSO:	Polimeraz zincir reaksiyonu sekans spesifik oligonükleotid
PCR-SSP :	Polimeraz zincir reaksiyonu sekans spesifik primer
PCR-SBT :	Polimeraz zincir reaksiyonu sekans bazlı tiplendirme
MIF :	Makrofaj İnhibitory faktör

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Romatoid Artrit (RA [MIM 180300]) nedeni bilinmeyen, sinovyal hücrelerde proliferasyon, eklemlerde erozyon ve fonksiyonel kayıplarına neden olabilen kronik ağrılı, sistemik, inflamatuvar, otoimmün bir hastalıktır (1, 2). Tüm dünyada ortalama %1 oranında görülür. Kadın/Erkek oranı 2-3/1 dir. Hastaların %75-80'inde Romatoid faktör pozitifdir. Çoğu hastada klinik seyir ilerleyicidir ve yapısal eklem hasarı ilk iki yıl içinde meydana gelir. Ağrı, deformite ve fiziksel fonksiyon kaybı kalıcı özürlülük ve yaşam kalitesinde bozulmaya yol açar (3, 4).

RA'ya yatkınlık oluşturan genetik risk faktörleri olarak insan lökosit antijen (HLA) lokusuna ait Sınıf II MHC genleri sorumlu tutulmuştur. HLA-DRB1 *04 alleli ile ilişkili (DRB1 *0401 ve *0404) olduğu tespit edilmiştir. Hastalarda HLA DRB1 *04 pozitiflik oranı %60-80 oranında değişmektedir. Bu yapının hem hastalığa yatkınlıkta, hem de hastalık seyrinde önemli rolü olduğu ileri sürülmüştür. Yapılan prospektif çalışmalarda, ortak epitop pozitif DRB1 *04 allelini taşıyan hastalarda eroziv eklem hasarı gelişme riskinin en yüksek, ortak epitop pozitif DRB1 *01 allelini taşıyanlarda ise daha düşük olduğu gösterilmiştir (5).

Son yıllarda moleküler genetik yöntemlerin ilerlemesiyle HLA doku grupları da alt tiplerine ayrılmış hastalığa neden olan alleller daha net tanımlanmaya başlamıştır. Örneğin; daha önce Romatoid Artritli vakalarda HLA DRB1 *04 pozitifliği bilinmektedir. Ancak her HLA DRB1 *04 pozitifliği olan kişi Romatoid Artrit hastası olmamakta, olanlarda ise hastalık aynı şiddette seyretmemektedir (6, 7). Yüksek rezolusyonlu ayırma teknikleri sayesinde HLA DRB1 *04 allelinin yada grubunun bir grup olmadığı bir çok alt grubunun bulunduğu (73 adet) farklı populasyonlar ve çeşitli etnik gruplar arasında değişik dağılım gösterdiği bilinmektedir. Bu alt grupların dağılımı hücre yüzeyindeki reseptör yapısına farklı amino asit olarak yansıyacağından, hastalığın patogeneğinde farklı rol oynayabilmektedir.

Bu çalışmada Farabi Hastanesi kliniklerine başvuran RA tanısı alan hastaların HLA-DRB1 grup tayinleri hedeflenmiş, DRB1 *04 pozitif hastaların alt gruplarının belirlenmesi ve diğer allellerde bir birikme olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızdan elde edilecek sonuçlara göre RA'li hastaların tedavilerinde izlenecek yola farmakogenetik katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit

Romatoid artrit (RA [MIM 180300]), etiyolojisi kesin olarak belli olmayan vücutta eklemleri tutan ve şekil bozukluklarına sebep olan kronik, inflamatuvar, multisistemik bir hastalık olarak bilinmektedir. RA, dünyada tüm ırklarda hiçbir ayırım gözetmeksizin görülebilen bir hastalıktır ve daha çok kadınları etkilemektedir. Genellikle 30-50 yaşları arasında görülen hastalık, kadınlarda 2-3 kat daha sık görülmesine rağmen ilerleyen yaşlarda kadın/erkek oranı eşitlenir. Dünyadaki çeşitli populasyonlarda prevalansı % 0.5-1 dolayında olmakla birlikte prevalans yaş ile birlikte artmaktadır (1, 4).

2.1.1. RA Etiyopatogenezi

Uzun yıllardan bu yana yapılan geniş çalışmaların sonucuna göre RA'in etiyolojisi kesin olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzde kabul edilen yaygın görüşe göre RA hastalığı, genetik olarak predispoze kişilerde, henüz tam bilemediğimiz çevresel etkenlerin antijenik uyarısıyla başlamakta ve immün sistemdeki karmaşık etkileşimler ile kronik hale geldiği kabul edilmektedir. RA etiyolojisinde genetik, immün sistem bozukluğu, enfeksiyöz ajanlar, travma, cinsiyet, stres, endokrin, metabolik, çevresel, psikolojik ve nutrisyonel faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu sayılan faktörler hastalığın gidişatını etkileşeler de hiçbirisi tek başına kesin neden olarak gösterilememiştir (8, 9).

Sosyoekonomik durum, eğitim ve psikolojik durumların da predispozan faktörler olabileceği düşünülmektedir. Ancak ırk, coğrafik yerleşim ve iklimin RA gelişiminde önemli bir risk faktörü olmadığı görüşü hakim ise de tartışmalıdır (9-11). RA'de etkili olduğu kabul edilen çevresel faktörlerden, hepatit B, Rubella, sitomegalovirüs gibi viral ajanlar bazen RA benzeri simetrik, poliartiküler bir artrite yol açmaktaysa da kronikleşme olmamaktadır. RA'lı hastaların Epstein Barr virüsü (EBV) ile enfekte B hücre sayıları ve anti EBV antikör titrelerinin sağlıklı insanlardan yüksek olmasından dolayı EBV'den de şüphelenilmektedir. Yine bazı RA'lı hastalarda Helicobacter pylori gözlenmiş fakat ilginç olarak hiçbir gastrointestinal yakınma izlenmemiştir (11, 12).

2.1.2. RA'e Genetik Yaklaşım

Birçok otoimmün hastalığın karmaşık mekanizmasının aydınlatılmasında genetik yapının rolü açıklanmış olmasına rağmen, RA'te henüz tek başına suçlanan kesin bir genetik etken belirlenememiştir. Ancak bununla birlikte %30-50'sinde HLA gen bölgesinin sorumlu olduğu fakat HLA genleri ile RA arasındaki ilişkinin özellikleri henüz kesin olarak anlaşılabilmiş değildir (13-15). Klasik teoriye göre; antijenlerin bağlanması ve tanınmasında normal mekanizmaların bozulması sonucunda otoimmünite meydana gelmektedir (16). Aynı ailede birden fazla bireyde RA görülmesi ya da dizigot ikizlere göre monozigot ikizlerde daha fazla görülmesi hastalığın genetik olarak araştırılması çalışmalarına yol açmıştır (14, 16). RA hastalarının birinci derece akrabalarında RA görülme riski 16 kat daha artmış olarak bulunmuştur (8, 17). Dünyanın çeşitli ülkelerinde yapılan (Amerika, İngiltere, Kanada, ve İskandinav) çalışmalarda Sınıf II HLA-DRB1*04 ile RA arasında ilişki gözlenmiş ve RA'de genetik çalışmaları hızlandırmıştır. Beyaz ırkta DRB1 *04'ün bazı alt tipleri ile güçlü birliktelik bulunmuştur. DRB1 *04 yüzdesinin düşük olduğu toplumlarda ise (Hindistan ve İsrail) daha çok DRB1 *01 DRB1 *10 ile ilişki kurulmuştur (17). Konu ile ilgili daha detaylı bilgiler diğer bölümlerde verilmiştir.

2.1.3. Romatoid Artrit'de Laboratuvar Bulguları

RA hastalığı vücutta bir çok organ ve sistemleri (vertebral kolon, omuzlar, dirsek, eller ve el bilekleri, kalça, diz, ayak ve ayak bileklerini) olumsuz etkilemektedir. Bunlardan başka kas, kemik, deri, göz, solunum sistemi, sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, karaciğer ve gastrointestinal sistem, renal sistem, hematopoietik sistem tutulumları da sıklıkla gözlenmektedir. Günümüzde RA tanısı, bir çok testin birlikte yorumlanmasıyla yapılmaktadır. C-Reaktif protein ve eritrosit sedimentasyon hızı gibi akut faz reaktantları ile hastalık aktivitesindeki artışlar ve tedaviye cevap araştırılır (18- 23). RA'de serolojik ve immunolojik bulgulardan olan Ig'lerde özellikle IgA ve IgM düzeylerinde artışlar gözlenir. Romatoid faktör (RF) genellikle %70-80 oranında pozitifdir. ANA pozitifliği %15-60 arasında değişirken anti-DNA ya negatifdir yada çok düşük titrede pozitif sonuçlar verir. Hastalara rutin biyokimyasal testler verilen ilaçların bir yan etkisinin olup olmadığının (özellikle karaciğere) araştırılması amacıyla yapılır. Hastaların akut ve kronik dönemlerinde sinovyal sıvı hacminde ve bileşiminde değişiklikler gözlenir (18-26).

RA'de radyolojik bulgular çok önemlidir ve tanıyı kolaylaştırıcıdır. Normal bireylere göre oldukça fazla yıkıcı değişiklikler gözlenir (27, 28). Romatoid artrit tanısı kolaylaştırmak amacıyla günümüzde Tablo 1'de açıklanan 1987'de revize edilmiş Amerikan Romatizma Derneği (ARA) kriterleri kullanılmaktadır.

TABLO-1: 1987 yılında ARA tarafından revize edilmiş RA tanı kriterleri.

Kriterler	Bulgular*
Sabah sertliği	Eklem çevresinde 1 saatten fazla süren sabah sertliği**
En az 3 eklemden artrit	En az üç eklem bölgesinde doktor tarafından kaydedilen yumuşak doku şişliği veya sinoviyal sıvı artışı ile beraber olan artrit**
El eklemlerinde artrit	Elde en az bir eklem bölgesinde şişlik**
Simetrik artrit	Aynı eklem bölgesinde bilateral olarak artrit**
Romatoid nodüller	Kemik çıkıntıları, eklem ekstansör yüzlerinde subkutan nodüller.
RF pozitifliği	Herhangi bir yöntemle RF pozitifliğinin gösterilmesi.
Radyolojik bulgular	Ön-arka el ve bilek grafilerinde RA'e tipik erozyonların gösterilmesi

*Tabloda verilen bulgulardan en az 4 tanesi olmalı

**En az 6 hafta süre ile devam etmelidir.

2.1.4. RA Tedavisi

Günümüzde RA tedavisinde bir çok değişik türde ilaç kullanılmakla birlikte hastalığın kesin tedavisi yoktur. Ancak bu durum hastalığın kontrol altına alınamayacağı anlamına da gelmemelidir. Günümüzde RA tedavisinde; non-steroid antienflamatuvar ilaçlar, salisilatlar, kortikosteroidler, siklo-oksijenaz 2 inhibitörleri (COX-2), ve hastalık modifiye edici ajanlardan hidroksiklorokin, sulfasalazin, metotreksat (MTX), leflunomid, infliximab ve etanercept gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Bu sayılanlardan daha az olarak minosiklin, altın tuzları, azotioprin (AZA), D-penisilamin (D-Pen), ve siklosporin'de hastalık modifiye edici ajan olarak kullanılmaktadır. Yukarıda sayılan ilaçlardan bir çoğu ağrıyı azaltmak amacıyla, modifiye edici ajanlar ise yıkıcı etkileri azaltmak için kullanılmaktadır (29-36). Özetle; RA tedavisinde amaç ağrıyı azaltmak, eklem hasarını ve fonksiyonel kaybı önlemektir. Hastalığın tedavisinde ilaç uygulamaları ön planda olmakla birlikte erken dönemde yapılan fonksiyonel değerlendirmelerin sonucuna göre seçilen rehabilitasyon yöntemleride tedavinin başarısı açısından büyük önem taşımaktadır (3-5).

2.2. Major Histokompatibilite Gen Kompleksi (MHC)

Landsteiner 1931 yılında eritrositlerde kan grubu antijenlerini keşfetmiş; kan transfüzyonu için grup uyuşumunun gerekliliğini savunmuş ve bu fikirden hareketle doku/organ transplantasyonları için de doku grubu uyumunun gerekliliğini savunmuştur. 1930'lu yıllarda Peter A. Gorer ve George D. Snell farelerde doku antijenlerinin varlığından söz etmiş ve bunların gen bölgesine doku uyuşum kompleksi adını vermişlerdir (37, 38). Farelerde 17. kromozomdaki H-2 gen bölgesinin sentezini sağladığı doku antijenlerine de MHC antijenleri adı verilmiştir. Daha sonraki araştırmalar MHC kompleksinin bütün memeli türlerinde bulunduğunu göstermiştir. 1958'de Daussel tarafından insanlarda doku antijenleri tespit edilmiş, yine aynı yıl Van Rood ve arkadaşları tarafından çok kan transfüzyonu olmuş lösemi hastalarının ve çok doğum yapmış kadınların %20-30'unun serumlarında lökositlere karşı oluşmuş antikorlar tespit edilmiştir. Böylece bu antijenlere Human Leucocyte Antigen (HLA) ismi verilmiştir. İnsanlarda MHC gen ürünleri, daha önce verilen adlandırmaya sadık kalınarak HLA olarak adlandırılmaktadır. Daha sonraki yıllarda bütün vücut hücrelerinde bulundukları anlaşılmış ve doku nakillerinde de çok önemli rollerinin olduğu, transplantasyonun başarısını belirledikleri tespit edilmiştir (37-42).

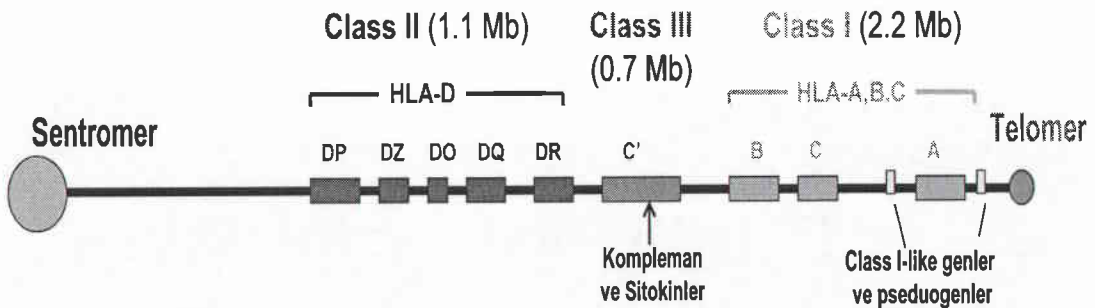
MHC veya HLA molekülleri, tüm çekirdekli hücrelerin plazma membranında yer alan bir reseptör olup transmembran glikoprotein yapısındadır. HLA aynı tür içinde bireysel farklılık gösteren bir allo antijen olarak bilinir. Bu sisteme MHC veya HLA sistemi, sentezini sağlayan DNA'daki gen bölgesine de MHC gen kompleksi denir (37, 38, 40, 41). MHC gen bölgesi bütün omurgalılarda bulunan ağırlıkla immun sistemle ilgili olan ve bazı genleri de immun sistemle ilgili olmayan bir grup genin genel adıdır (43-45). MHC gen bölgesi ürünleri immun sistemi (bağışıklığı) denetlemekte, doku uygunluğunda rol oynamakta ve organizmaya yabancı olan antijenleri tanımaktadır (46). Moleküler genetik yöntemlerdeki hızlı gelişmeler sayesinde MHC genleriyle ilgili olarak 224 gen ve 3000'den fazla allel tanımlanmıştır. Ocak 2008 itibarı ile yayınlanan veriler tablo 2'de verilmiştir (4, 5, 47).

Tablo 2: MHC lokuslarındaki klasik HLA allel sayısı

LOKUS	ALLELLER	SEROLOJİK EŞDEĞERLERİ
HLA-A	649	28
HLA-B	1029	62
HLA-C	350	10
HLA-DRB1	640	25
HLA-DQB1	91	9
HLA-DPB1	128	6

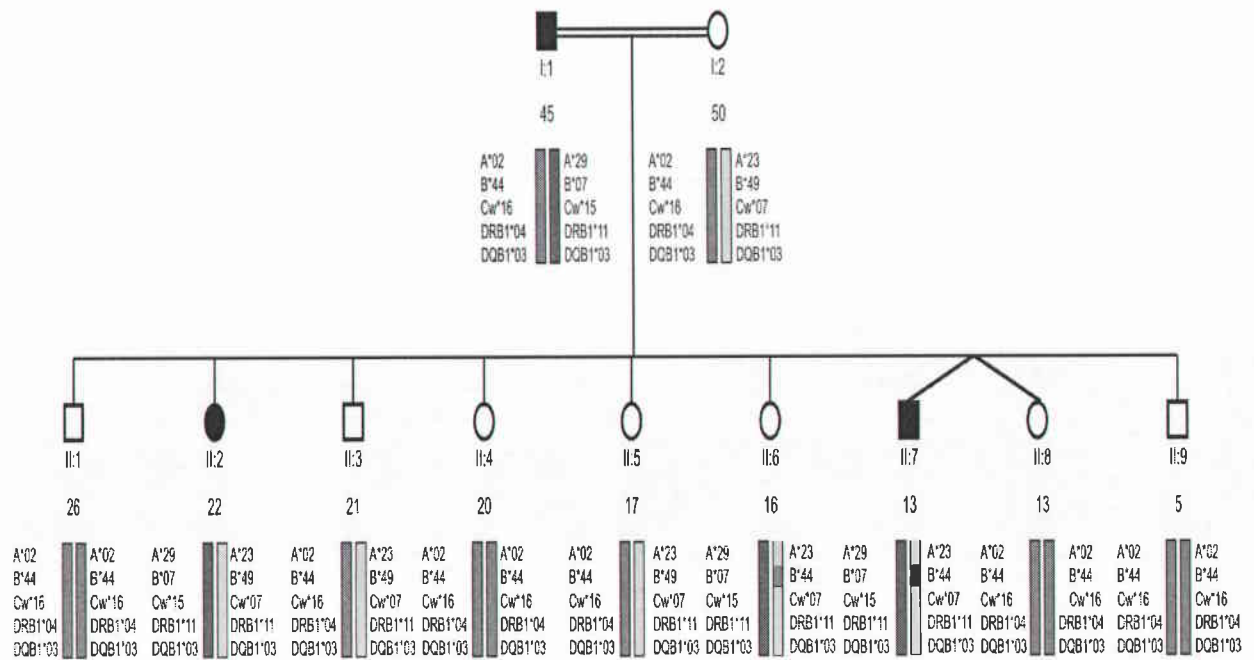
2.2.1. İnsan MHC Genleri ve Kalıtımı

Major Histocompatibility Complex (MHC) insanlarda 6. kromozomun kısa kolunda 6p21,3 bölgesinde yerleşik, yaklaşık 4 milyon DNA baz çiftinden (3.838.986bp=4Mb) oluşan bir grup genin genel adı olup tüm insan genomunun % 0.1 kadarını oluşturur (Şekil 1) (2, 9). *MHC* gen bölgesi yapısal, fonksiyonel ve gen ürünlerinin allo-reaktivitesine bağlı olarak 3 alt bölgeye ayrılır (2). İlk tanımlamayı, Jan Klein 1977 yılında sınıf I, II, III şeklinde yapmıştır. Sınıf I MHC (HLA) genleri telomerik uçta yer alır 2.2 Mb büyüklüğünde olup HLA-A, -B, ve -C, -E, -F, -G, -H, -J, -K, -L genlerini ihtiva eder. HLA sınıf II genleri sentromerik uca yakın olup yaklaşık 1.1 Mb büyüklüğündedir ve HLA-DR, -DQ, ve -DP, -DM, -DN, -DO, TAP1, TAP2, LMP2 ve LMP7 genlerinin kodlama bölgesini oluşturmaktadır. (38, 48, 49).

**Şekil 1.** İnsan 6. Kromozomunda MHC Gen Bölgesi

MHC Sınıf I ve II bölgelerindeki genler, pek çok hücrenin yüzeyinde yer alan, insan lökosit antijenleri (*Human Leukocyte Antigens*, HLA) veya HLA molekülleri olarak adlandırılan proteinleri kodlar (2,38). HLA Sınıf III bölgesi her ikisinin arasında yer alır ve 0.7 Mb büyüklüğündedir. Sınıf III bölgesindeki genler ise immün sistemde görevli HLA dışı bazı soluble ürünleri (Properdin faktör B, C2, C4A, C4B, TNF) ve bağışıklıkla hiç ilgisi olmayan proteinleri de (hemokromatazis, 21 hidroksilaz, RNA helikaz, HSP 70 ve sialidaz) kodlar (2). Günümüzde HLA Sınıf III'e ait olan bölgenin telomerik ucundaki 0.3 Mbp lik kısmın sınıf IV bölgesi olarak isimlendirilmesi önerilse de henüz geçerlilik kazanmamıştır. (38, 45).

MHC genleri Mendeliyen kalıtmı, ko-dominant ekspresyon gösteren poligenik, poliallelik ve polimorfiktirler (50). HLA allel ve haplotipleri blok halinde ebeveynlerden kalıtılırlar. Nadir de olsa mayozdaki krossing-overe bağlı olarak çapraz taşınma da gerçekleşebilir (Şekil 2). Doku dağılımı geniş olan Sınıf I HLA-A, B ve C antijenleri olgun eritrositler ve trofoblastik hücreler haricinde bütün çekirdekli hücrelerin yüzeyinde reseptör olarak bulunur. Sınıf II HLA molekülleri (HLA-DR, HLA-DQ ve HLA-DP) B hücreleri, aktive T hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar ve diğer fagositik hücreler gibi özelleşmiş antijen sunan hücrelerde bulunurlar (2, 50).



Şekil 2. Bir Ailede MHC Kalıtım Modeli

MHC molekülüleri; bir bireyin hücrelerini toplumdaki diğer bireylerden ayırt etmeye yarayan immünojenik belirleyicilerdir. Patojenlere karşı immün korumayı sağlamak için antijenik peptidleri T hücrelerine MHC molekülüleri sunar. T hücreleri aktifleşmek için bu sürece ihtiyaç duyar. T hücreleri ancak antijen ve MHC molekülünü birlikte tanıyabilir. Çünkü, MHC-Antijen kompleksinin moleküler yapısı öyle düzenlenmiştir ki MHC molekülünün polimorfik aminoasitlerinin bazıları TCR ile direk ilişki kurarlar. O nedenle T hücrelerinin antijeni tanınması MHC'ye bağımlıdır. T hücrelerinin yokluğunda etkili bir immün yanıt yoktur (9, 43, 50). MHC genleri; insan, fare ve sıçanlarda eş seçimi, çiftleşme ve üreme süreçlerine etki ettiği de bilinmekte, eş seçiminde tercihin genellikle en uzak doku grubu lehine olduğu kabul edilmektedir (51).

2.2.2. Sınıf I ve II MHC Moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonları

MHC Sınıf I molekülüleri (HLA-A, -B ve -C); tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde bulunurlar (Şekil 3). Oldukça polimorfiktirler. Sıkışık peptidleri yalnız 9 aa tanır. 3 α -zinciri domaininin (43 kDa α -zincirleri; 90, 63 ve 86 aa) β -2 mikroglobulin (12 kDa) ile ilişkisinden meydana gelmiştir. β 2 mikroglobulin 15. kromozomda yer alan non-polimorfik tek bir genin ürünüdür reseptörün α 3 bölgesine nonkovalent olarak bağlanır ve reseptörün aktivitesi için mutlaka gereklidir. Endojen olarak türeyen peptidlere karşı mevcuttur, virüslere karşı etkilidirler. Virüsler veya diğer hücre içi ajanlar ile enfekte edilen hücrelerin CD8+ sitotoksik T hücreleriyle karşılaşabilmesi için gerekli ligandın oluşmasını sağlayarak devreye girerler (2, 38, 40, 48, 52, 53).

MHC Sınıf II molekülüleri (HLA-DR, -DQ, -DP), immün sistemin profesyonel antijen sunan hücrelerinde görülürler. Daha az polimorfiktirler, 15 aa asidden fazla peptidleri kabul eder, polimorfik α ve β zincirlerinin non kovalent olarak bağlanmasından meydana gelmişlerdir, yapılarında β 2 mikroglobulin taşımazlar. Glikoprotein yapıda olan α -zinciri, 34 kDa, β -zinciri ise 29 kDa ağırlığındadır. Bakteriler gibi eksojen ajanların antijenlerine karşı fagositoz için çok önemlidirler. Makrofajlar gibi profesyonel olarak fagositoz yapan hücrelerde oldukça boldurlar. Kısaca; Sınıf II MHC Molekülüleri, antijen sunan hücrelerde (ASH) hücre dışı mikroplardan ve proteinlerden kaynaklanan peptidlerin CD4+ Yardımcı T Hücrelerine sunumlarında rol oynarlar (Tablo 3) (2, 38, 41, 53).

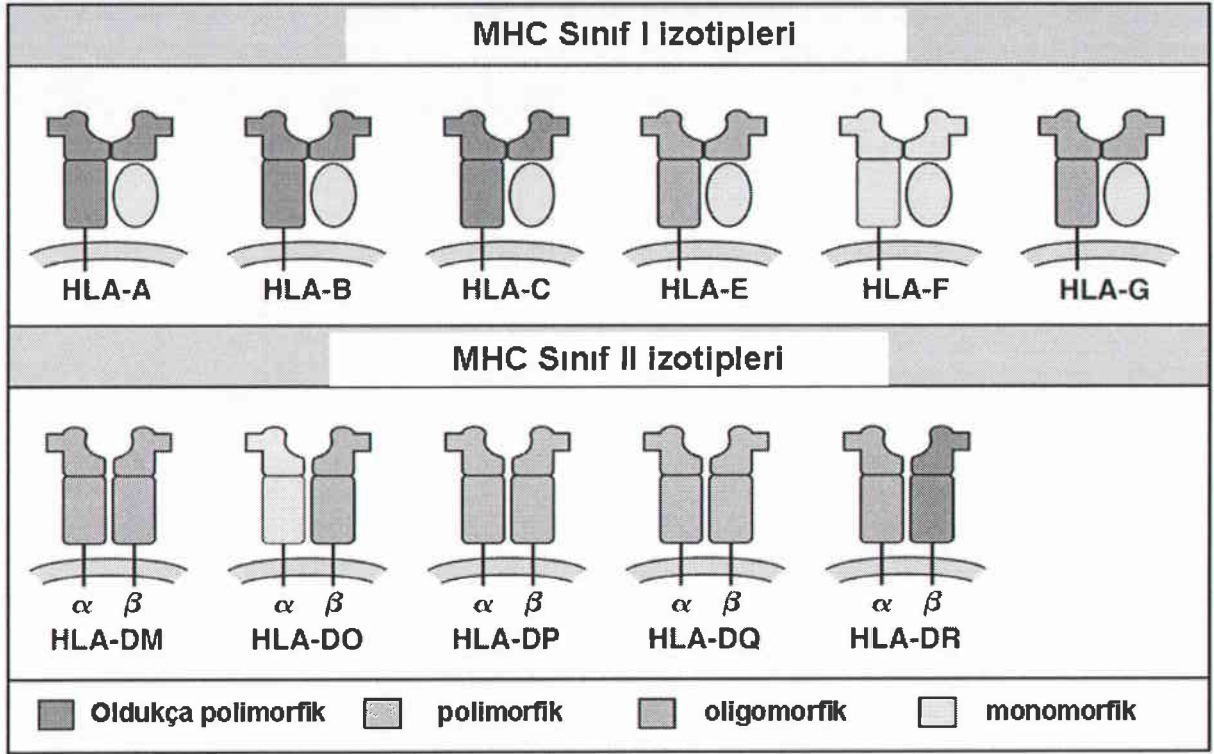


Figure 3-23 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

Şekil 3. MHC Sınıf I ve Sınıf II Moleküllerinin Yapısı (54)

Tablo 3. MHC genlerinin hücrelerde ekspresyonu ve görevi

MHC Bölgesi	Gen ürünleri	Doku Yerleşimi	Görevi-Fonksiyonu
Sınıf I	HLA-A, HLA-B, HLA-C	Tüm çekirdekli hücreler	Tanıma ve anormal veya infekte olmuş hücrelerin sitotoksik T hücreleri tarafından öldürülmesi-uzaklaştırılması
Sınıf II	HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP	B lenfositler, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, aktifleşmiş T hücreleri, aktifleşmiş endotel hücreler, deri (Langerhans hücreleri)	Helper T hücreleri tarafından yabancı antijenlerin tanınması
Sınıf III	Kompleman C2, C4, B	Plazma proteinleri	Ekstraselüler patojenlere karşı savunma
Sitokin Genleri	TNF α ve β	Plazma proteinleri	Hücre büyümesi ve farklılaşması

2.2.3. HLA ve RA İlişkisi

HLA'nın transplantasyonun sonucunu etkilemekten başka, immunolojik tanıma işleminde de çeşitli görevleri olduğu belirlenmiştir. 1973'te, bazı HLA antijenlerinin bazı hastalıklarda artmış oranda olduğu saptanmıştır (2, 38, 45, 51). Daha sonra yapılan çalışmalar neticesine göre bazı lökosit antijenlerinin birçok otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tablo 4). MHC'nin bir hastalıkla ilişkisinin olup olmadığı aile çalışmaları ve populasyon çalışmalarıyla belirlenebilmektedir (55).

MHC yada HLA gen bölgesi, gen ürünlerinin immun sistemde önemli roller alması nedeniyle otoimmün, infeksiyöz, neoplastik ve metabolik pek çok klinik hastalığa karşı genetik yatkınlıkta rol almakla suçlanmaktadır (47). Bu bölgede yer alan genlerle ilgili hastalıklar iki ana grupta incelenebilir (39, 47, 52). Birinci grupta MHC bölgesindeki genlerin ürünlerinin oluşumunu engelleyen otozomal resesif geçişli immun bozukluklar bulunur. (16, 56-58). İkinci grupta ise normal populasyonda bulunabilen bazı gen allelleri ve haplotipleriyle ilişkilendirilen hastalıklar yer almaktadır (16). MHC bölgesindeki genlerle ilişkili olarak bazı hastalıklara karşı oluşan yatkınlık, farklı bireylerde farklı alleler tarafından kodlanan gen ürünlerinin antijenlerden elde edilen proteinleri bağlayabilme ve T lenfositlere sunabilme kabiliyetlerinin farklılık göstermesine bağlanmaktadır (9). Bugün genel olarak kabul edilen görüş otoimmün hastalıkların genetik olarak yatkın bir konakta çevresel faktörlerin etkisiyle oluştuğu şeklindedir (16, 48). Tetikleyici çevresel ajanlar olarak besinler, ilaçlar ve mikroorganizmalar ön planda suçlanmaktadır (3).

Tablo 4. HLA Hastalık ilişkilerine ait bazı otoimmün hastalıklar

Hastalık	HLA alleli	Relatif Riski
Ankilozan spondilit	B27	87.4
Romatoid artrit	DR 4	4.2
Behçet hastalığı	B51	3.8
Sistemik lupus eritematoz	DR 3	5.8
IDDM-Tip 1 diyabet	DR3, DR4, DQ2	6.4
Narkolepsi	DR2, DQ6	5.3
Çölyak hastalığı	DQ2, DQ8, DR 3	10.8
Multiple skleroz	DR 2	4.1
Birdshot retinokoroidopati	A29	109.0
Hodgkin's hastalığı	A1	1.4
İdiopatik hemokromatoz	A3, B14	8.2
Konjenital Adrenal hiperplazi	B47	15.4
Subakut tiroiditis	B35	13.7
Myasthenia gravis	DR3	2.5
Graves hastalığı	DR3	3.7
İdiyopatik addison	DR3	6.3
Psoriasis vulgaris	Cw6	13.3
Dermatitis herpetiformis	DR3	15.4
Pernisiyöz anemi	DR5	5.4

HLA Sınıf I, II ve III bölgelerindeki gen alleleri ile ilişkili pek çok hastalığı bildiren çalışmalar olsa da belirli bir allel ile belirli bir hastalık arasında henüz kesin bir sebep sonuç ilişkisi saptanamamıştır (2). Bunun nedeni hastalığın görüldüğü tüm hastalarda aynı allelin bulunmaması ve aynı alleli taşıyan tüm bireylerde hastalığın gelişmemesidir (2). Literatürde HLA allel ve haplotipleri ile hastalıklar arasındaki ilişkiyi inceleyen pek çok çalışma mevcuttur.

RA ile HLA-DRB1 *04 arasındaki ilişki, bu gen bölgesinde tanımlanmış en güçlü ilişkidir. Moleküler genetik yöntemlerle RA ile ilişkili bulunan farklı HLA-DRB1 allellerinin belirlenebilmesi sayesinde farklı HLA-DRB1 *04 allellerinin β zincirinin polimorfik bölgesinde, 70-74. pozisyonlarında ortak bir aminoasit dizisini paylaştığı görülmüştür. Ortak epitop olarak adlandırılan bu bölgenin, RA’te genetik yatkınlığa neden olabileceği düşünülmektedir (1, 3, 6, 59). HLA-DRB1 *04’ün RA’e katkısının hastalığa yatkınlıktan çok, hastalığın kronikleşmesi ve erozyon gelişimi üzerine etkili olduğu iddia edilmiştir. Homozigot olarak DRB1*04 allelerini taşımak ağır hastalık gelişme riskini arttırmaktadır. Özellikle DRB1 *0401/*0404 allellerini heterozigot olarak taşıyanlarda hastalığın ağır seyretme riskinin en yüksek olduğu gösterilmiştir (1, 6, 59).

Günümüzde RA, ankilozan spondilit gibi otoimmün hastalıkların oluşum mekanizmalarının açıklanmasında ortak epitop ve moleküler mimikri (benzerlik) fikri önem kazanmaktadır (6). Moleküler mimikri görüşüne göre; hastalık ajanı ile hastalıkla ilişkili HLA antijeni genetik olarak benzerlik gösterebilir. Etiyolojik ajan yabancı olarak algılanmaz, vücudun kendi molekülü gibi algılanır ve konağın immün sistemini harekete geçirilmez. Hastalık etkeni vücutta oldukça fazla tahribat yapmasına rağmen herhangi bir immün cevap oluşturulamaz. Sonuçta inflamatuvar kronik hastalık meydana gelir (55, 56).

2.2.4. HLA Doku Tiplemesi ve Kullanım Alanları

MHC genleri, yüksek oranda polimorfizm gösterdiğinden HLA doku tipleme testleri, transplantasyonda, hastalıkların ayırıcı tanısında, antropolojik ve filogenetik çalışmalarda, adli tıpta paternite ve kimliklendirme çalışmalarında, çeşitli populasyonların genetik yapılarını saptamaya yönelik olarak populasyon genetiği çalışmalarında ve tekrarlayan düşükler / infertilite çalışmalarında kullanılmaktadır. Son yıllarda moleküler genetikteki gelişmeler sayesinde HLA genleri ve HLA moleküllerinin aminoasit dizilişi incelenebilmektedir (1, 38).

HLA doku grubu tiplemesinde başlangıçta en yaygın olarak serolojik lenfosit mikrositotoksite testi kullanılmaktaydı, ancak sonuçların çok güvenilir olmaması nedeniyle günümüzde moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Gelişen teknolojiye paralel olarak MHC doku tiplemesi, farklı teknikler kullanılarak (PCR-SSO/SSP/ST) DNA düzeyinde yapılabilmektedir. Bu yöntemler hassaslık ve güvenilirlikleri nedeniyle tercih edilen yöntemler haline gelmektedir. Sonuçta bireyin HLA tipi evrensel nomenklatüre uygun olarak fenotip şeklinde rapor edilir (Tablo 5) (2, 38, 39).

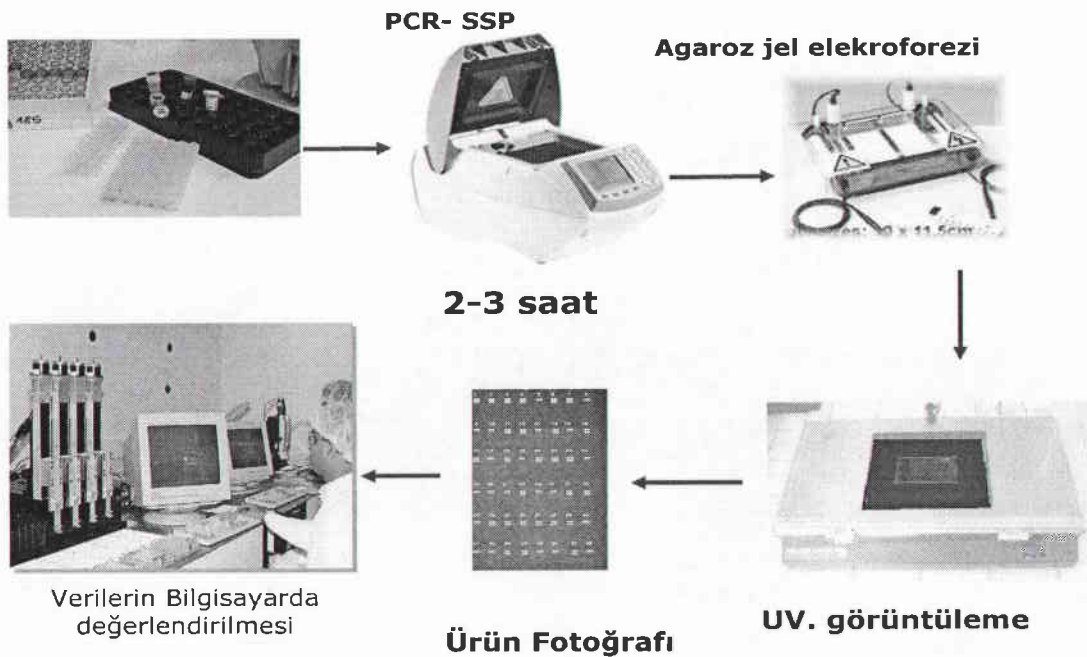
Tablo 5. HLA Nomenklatürü

Terminoloji	İfade ettiği bilgi
HLA	Gen Bölgesi
HLA-DRB1	Gen Lokusu
HLA-DRB1 *04	Belli bir alleli kodlayan bölge
HLA-DRB1 *0401	Spesifik allelin alt tipi

Kary Mullis tarafından 1986'da geliştirilmiş olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bir DNA dizisinin tamamen in vitro koşullarda oluşturulan kimyasal reaksiyonlar ile istenilen miktarlarda çoğaltılmasını sağlar (60). Bu metot ilk önce insan DNA dizileri için kullanılmıştır ve daha sonraları ökaryotik ve prokaryotik genomların analizi için bakteriyel vektörlerin (plazmit vs.) klonlanmasında alternatif bir yöntem olarak geniş uygulama alanı bulmuştur (61,62).

PCR-SSP, tek bir baz çifti dahil olmak üzere genetik değişkenlikleri tesbit edebilecek çok güçlü bir tekniktir. Bu tekniğin temeli PCR reaksiyonunda 3' ucunda birkaç baz uyumsuzluğu olan primerler yerine, tam uyumlu primerlerin kullanılması temeline dayanır. Bir primer çiftinin iki primeri aynı kromozomda lokalize olan uyumlu dizilerin motiflerini bulduğu zaman amplifikasyon gerçekleşeceği için bu tekniğin rezolüsyonu çok yüksektir. Aynı zamanda en hızlı genomik tipleme yöntemlerindendir. Çünkü bu teknikte amplifikasyon sonrası aşamada, amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, agaroz jel elektroforezi ile kolayca saptanabilir. PCR-SSP ile HLA doku tiplendirmeleri ve bazı polimorfik genlerdeki mutasyonlar taranmaktadır (60-62).

Doku Tipleme laboratuvarlarında yaygın olarak tercih edilen PCR-SSP doku tiplemesi yöntemi kısaca açıklamak gerekirse (Şekil 4); HLA-A,B,C ve DR,DP,DQ tiplemesi için kliniklerden gönderilen hastalardan ve vericilerden tercihe göre 3 veya 8 ml kan alınarak EDTA'lı tüplere aktarılır. Mevcut kanlardan standart protokollere göre DNA izolasyonu yapılır (63). Spektrofotometrik olarak 260/280 nm dalga boyunda okunarak DNA'nın saflığı hesap edilir, konsantrasyonu ayarlanır. HLA-A için 24, HLA-B için 48, HLA-C için 20, HLA-DR için 24, HLA-DP için 21, HLA-DQ için 18 farklı primer kullanılır. PCR malzemeleri ayrı ayrı alınıp hazırlanabilir ya da yarı hazır şekilde ticari olarak sağlanabilir. PCR reaksiyonu kurulduktan sonra ısısal döngü cihazına kaldırılır. PCR reaksiyonu 3 farklı aşamadan ibarettir. 1-DNA denatürasyonu, 2-Primerlerin eşleşmesi ve 3-Taq polimeraz ile replikasyon. Bu 3 aşama farklı sıcaklıklardan ibarettir ve 1 döngü sayılır. 25-30 döngü sonra reaksiyon sona erdirilir (61, 62). Elde edilen PCR ürünleri ürününe göre %2'lik agaroz jel elektroforezinde (1XTBE veya 0,5XTBE) yürütülürler. Sonra UV transilluminatörde fotoğrafları çekilerek doku grupları belirlenir. Sonuçlar allelik numaralama sistemine göre gruplandırılarak yazılır. Çalışmalarda internal kontrollerin çalışıp çalışmadığı daima kontrol edilir. Olerup ve ark. (39) yaptıkları çalışmada genomik HLA-A,B,C,DR tiplendirmesinin serolojik yöntemle göre çok daha doğru ve hassas olduğunu (%99.2) belirlemişlerdir.



Şekil 4. HLA Doku Tiplemesinde Uygulanan PCR-SSP Yönteminin Aşamaları

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. MATERİYAL

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma, Şubat 2008-Mayıs 2009 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı polikliniklerine başvuran modifiye ARA kriterlerine göre Romatoid Artrit tanısı almış, 88 hastanın (yaş ort. 52 ± 12 - 18 erkek, 70 kadın) periferik kan örneklerinden izole edilen DNA'larından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Fakültenin Sağlık Bakanlığından Ruhsatlı Doku Tipleme Laboratuvarında doku grupları belirlenen RA öyküsü olmayan kemik iliği ve böbrek transplant hastalarının sağlıklı kemik iliği ve böbrek vericileri kontrol grubu olarak değeriendirildi.

Çalışmada hastaların klinik muayeneleri, KTÜ Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Tosun, Yrd. Doç. Dr. Murat KARKUCAK ve Yrd. Doç. Dr. Erhan ÇAPKIN tarafından yapıldı. RA tanısı, hastaların şikayetlerine göre fizik muayene, radyolojik, merkez laboratuvarı test sonuçları kullanılarak ARA kriterlerine göre belirlendi. RA hastaları için bilgilendirme dosyaları oluşturulup, yaş, cinsiyet, aile ve akrabaları ile ilgili bilgiler dosyalara uzman hekimler tarafından yazıldı. Araştırmalarımızda, hastaların ilk kez mi tedavi aldığı yoksa kronik bir tedavi süreci mi izlendiği dikkate alınmadı.

Çalışmaya dahil edilen 88 hastanın ve RA hastası olmayan yukarıda sözü edilen 197 sağlıklı bireyin her birinden EDTA'lı tüplere 8 ml kan alındı, DNA'ları izole edilip -30 °C'de saklandı.

Bu çalışma, 2007.114.001.6 numaralı proje kapsamında KTÜ BAP tarafından desteklenmiş ve Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından (2008/55) onaylanmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kitler, sarf malzemeleri ve kimyasalları çeşitli firmalardan temin edildi (Tablo 6).

Tablo 6. Kullanılan Kimyasallar ve ürün kodları

	Kimyasal Malzeme	Katalog No.
1.	Agaroz	Sigma, A-0169
2.	Ammonyum asetat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)	Sigma, A-1542
3.	Hidroklorik asit (HCl)	Merk, 1.00314.2500
4.	Borik asit (H_3BO_3)	Merk, 1.00160.
5.	Bromfenol mavisi ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$)	Merk, 1.08122.0005
6.	Etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Tekel, Türkiye
7.	Ksilen siyanol ($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$)	Merk, 1.12007.2500
8.	Sodyum hidroksit (NaOH)	Merk, 1.06462
9.	Sodyum klorür (NaCl)	Merk, 1.01540.0500
10.	Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merk,
11.	Tris baz (Tris-base) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Appllichem, A2264.1000
12.	Tris hidroklorit ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	Merk, 1.01547.0100
13.	Gliserol (%99)	Sigma, G-7757
14.	Etidyum bromit ($\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$)	Sigma, E-7637
15.	Etilen diamintetra-asetik asit (EDTA)	Sigma, E-5134
16.	Proteinaz K	Promega, V3021
17.	Taq DNA Polimeraz	Promega, M1661
18.	HLA DRB1 PCR-SSP Kiti	Olerup SSP, 46X
19.	HLA DRB1 *04 PCR-SSP Kiti	Olerup SSP, 57E

3.1.3. Gereçler

Çalışmamızda kullandığımız çeşitli araç ve gereçler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

	Cihazlar	Marka
1.	Epondorf tüpler	Axygene, ABD
2.	Termocycle	Techne Genius, İngiltere
3.	Otomatik pipet seti	Rainin, ABD
4.	Yüksek devirli santrifüj	Hettich, Almanya
5.	Yatay elektroforez düzeneği	EC-250-90
6.	Vorteks	Nüve NM110, Türkiye
7.	Doğru akım güç kaynağı (250 volt)	EC-250-90
8.	Ultraviole transillüminatör	Vilbert Lourmat, Fransa
9.	Polaroid kamera	Gel Cam, İngiltere
10.	Polaroid kamera filmleri	Sigma, ABD
11.	Spektrofotometre	Beckman/Coulter, ABD
12.	Hassas terazi	Sartorius, Almanya
13.	pH metre	Hanna, Portekiz
14.	Manyetik karıştırıcı	IKA, USA
15.	Deiyonize su sağlayıcı	Barnstead, ABD
16.	Buz makinesi	Scotman, İngiltere
17.	Mikrodalga fırın	Beko, Türkiye
18.	Distile su cihazı	Şimşek labor teknik, Türkiye
19.	Etüv	Memmert, Almanya
20.	Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV, İtalya
21.	Derin dondurucu (-35)	Arçelik, Türkiye
22.	Buz dolabı	Arçelik, Türkiye
23.	Laminar air flow	Powtech, Türkiye
24.	HLA analiz programı	Olerup, İsveç
25.	Pastör fırını	Memmert, Almanya

3.1.4. Solüsyonlar

3.1.4.1. DNA izolasyon solüsyonları

1. Nuclei Lizis Tamponu (pH 8.2)

10 mM Tris base, = (1.21 g Tris base)

400 mM NaCl, = (23.4 g NaCl)

2 mM Na₂EDTA = (0.74 g Na₂EDTA)

2. Proteinaz K çözeltisi (10 mg/ml)

100 mg Proteinaz K

10 ml Proteinaz K seyreltme tamponu

3. Proteinaz K seyreltme tamponu (pH 8.0)

0.05 M Tris HCl = (0.788 g Tris HCl)

1 mM CaCl₂ = (0.011 g CaCl₂)

4. Amonyum asetat (9 M, 100 ml)

74 g amonyum asetat

5. %10'luk (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS, 100 ml)

10 g SDS

6. 0.5M Na₂ EDTA (pH 8.0, 500 ml)

93,5 g Na₂ EDTA

7. 1M Tris-HCl (pH 7.4, 1 L)

157. 6 g Tris-HCl

8. TE Tamponu (Tris-EDTA, pH 8.0, 500 ml)

10 mM Tris HCl

1 mM Na₂EDTA

9. 5X Eritrosit Lizis Çözeltisi (1L)

Nacl : 40,1 g
 KCl : 1,8 g
 MgCl₂.6H₂O: 7,15 g
 veya,

10. 10X Eritrosit Lizis Çözeltisi (1L)

NH₄Cl 82.9 g
 KHCO₃ 10 g
 Na₂EDTA(0.5M) 20 ml

3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

1. 10X TBE elektroforez tamponu (Tris-borik asit-EDTA, (pH ~8.0)

108 g Tris baz
 55 g Borik asit
 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

0.5 X çalışma solüsyonu olarak kullanıldı.

2. Etidium bromide solüsyonu (10mg/ml)

3. Non-denatüre yükleme tamponu (Loading Buffer)

% 50 (w/v) Sükroz
 % 0,1 (w/v) Bromfenol mavisi
 % 0,1 (w/v) Xylene cyanole
 50 mM Na₂ EDTA (pH: 8)

3.2. METODLAR

Çalışmamızda öncelikle insan 6. kromozomunun üzerinde bulunan MHC geninin sınıf II bölgesindeki HLA-DRB1* gen polimorfizmlerinin belirlenmesi ve DRB1* 04 pozitifliği olanların alt gruplarını belirlemek amacıyla hastalardan ve kontrol grubundan 8 ml periferik kan örnekleri alınarak salting-out yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı (60).

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu (Salting – Out Yöntemi)

1. Hastalardan ve kontrol grubundan alınan 8 ml EDTA'lı tam kan 50 ml'lik plastik falkon tüplere aktarıldı.
2. Hacim 45 ml olacak şekilde eritrosit lizis çözeltisi ile ayarlandı, 30 dakika soğukta buz içinde bekletildi.
3. 2500 x RPM'de soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilip, eritrositleri patlamış olan materyalin supernatını atıldı.
4. Sonra işlem bir ya da iki kez tekrar edildi (2500 x RPM'de soğutmalı santrifüzde 10 dakika santrifüj edildi supernatan atıldı).
5. Çökeltiye bu kez 4 ml nüklei lizis tamponu eklendi ve vorteks ile karıştırılıp homojen hale getirildi. Ortama 100 µl Proteinaz K ve 425 µl % 10'luk SDS çözeltisi ilave edildi
6. Hafifçe karıştırılıp, su banyosunda +37 °C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün gelindiğinde hala tüpteki materyal homojen değilse karıştırılarak homojen oluncaya dek su banyosunda bekletildi.
7. Homojen tüp materyali 30 dakika oda ısısında bekletildi ve 1.4 ml NaCl eklendi. Tüp kuvvetlice çalkalandı.
8. Sonra 5000 x RPM'de +21 °C'de 20 dakika santrifüj edildi.
9. Üst faz başka bir tüpe alarak bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Tekrar üst faz alındı.
10. Bu aşamada ortama %96'lık etil alkol ilave edilir, tüp hafifçe karıştırılarak DNA'nın bir araya toplanıp yoğunlaşması sağlandı.
11. Pamuk ipliği görünümündeki DNA bir pastör pipeti veya mikropipet ucuyla bir başka eppendorf tüpte hazırlanan 1 ml %70'lik etil alkol içerisine alınır.
12. Mikrosantrifüjde 13.000 RPM'de DNA tüpün dibine çöktürülür.

13. Üst faz dikkatlice dökülür, DNA'dan alkolün uzaklaşması beklendi.
14. Bu şekilde yıkanan, steril DNA, genellikle 500 µl steril TE tamponunda çözüldü.
15. Bu aşamada da elde edilen DNA'nın derişimi hesaplandı. 20 µl DNA, 980 µl'ye bidistile su ile 1 ml seyreltildi ve 260 nm dalga boyunda Shimadzu spektrofotometrede optik yoğunluğu okundu.

3.2.2. DNA Konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen DNA'ların 1/50 oranında dilüsyonları hazırlandı, spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu. 260/280 nm değerlerine göre DNA'nın saflığı herhangi bir protein veya RNA kontaminasyonunun olmaması için çalışmaya ideal oran olan 1.8'e yakın olanlar dahil edildi. 1 OD'nin 50 ng/µl DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerinden, örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılmak üzere HLA doku tipi analizi için DNA'lar steril deiyonize su ile 40 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

3.2.3. HLA DRB1* Allel ve DRB1* 04 Alt Tiplerinin PCR-SSP Yöntemiyle Belirlenmesi

Doku Tipleme laboratuvarlarında yaygın olarak tercih edilen PCR-SSP doku tipleme yöntemi; tek bir baz çiftinin genetik değişkenlikleri tesbit edebilen güçlü bir tekniktir. PCR-SSP ile HLA doku tiplendirmeleri ve bazı polimorfik genlerdeki mutasyonlar taranmaktadır. Bu tekniğin temeli PCR reaksiyonunda 3' ucunda birkaç baz uyumsuzluğu olan primerler yerine, tam uyumlu primerlerin kullanılması temeline dayanır. Bir primer çiftinin iki primeri aynı kromozomda lokalize olan uyumlu dizilerin motiflerini bulduğu zaman amplifikasyon gerçekleşeceği için bu tekniğin rezolüsyonu çok yüksektir. Aynı zamanda en hızlı genomik tipleme yöntemlerindendir. Çünkü bu teknikte amplifikasyon sonrası aşamada, amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, agaroz jel elektroforezi ile kolayca saptanabilmektedir.

HLA-DRB1 doku tiplemesi için FTR kliniklerinden gönderilen RA hasta ve kontrollerinden tercihe göre 3 veya 8 ml kan alınarak EDTA'lı tüplere aktarıldı. Mevcut kanlardan standart protokollere göre salting-out yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı (61). Spektrofotometrik olarak 260/280 nm dalga boyunda okundu, DNA'nın saflığı hesap edildi ve konsantrasyonu ayarlandı. HLA-DRB1 gen bölgesi için 24 farklı low resolution primer, DRB1 *04 gen bölgesi için 40 high resolution primer kullanıldı. PCR malzemeleri ayrı ayrı alınıp hazırlanabildiği gibi yarı hazır şekilde ticari olarak ta sağlanabilmektedir.

Çalışmamızda HLA-DRB1 gen polimorfizmlerinin tespiti için Olerup firmasından temin edilen PCR-SSP HLA-DRB1 ve HLA-DRB1 *04 gen paneli kullanıldı. Olerup HLA DRB1* low resolution ve HLA-DRB1 *04 high resolution gen panelleri 2'şer farklı alt bileşenden [a) oligonükleotid primerleri emdirilmiş 24'lü ve 48'liyeletler, b) Master miks tampionu] meydana gelmektedir. Sistemin kullanımı benzer yöntemlere göre daha avantajlıdır. Kısaca özetlemek gerekirse; PCR reaksiyonu 3 farklı aşamadan ibarettir.

- 1-DNA denatürasyonu,
- 2-Primerlerin eşleşmesi
- 3-Taq polimeraz ile replikasyon.

Bu 3 aşama farklı sıcaklıklardan ibarettir ve 1 döngü sayılır. 25-30 döngü sonra reaksiyon sona erdirilir.

HLA-DRB1 PCR-SSP amplifikasyonunda her bir örnek için toplam 282 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı

Master miks (Olerup)	84 µl
Distile su	150 µl
Taq Polimeraz enzimi	2 µl
DNA (30 ng/µl),	46 µl

HLA-DRB1 *04 PCR-SSP amplifikasyonunda her bir örnek için gerekli toplam 460 µl olacak şekilde aşağıda verildiği gibi hazırlandı

Master miks (Olerup)	138 µl
Distile su	226.3 µl
Taq Polimeraz enzimi	3.7 µl
DNA (30 ng/µl),	92 µl

Hazırlanan master miksler hafifçe vortekste karıştırıldı ve her bir hasta için pleytlerdeki 24 ve 40'lı kuyucuklara 10'ar µl paylaştırıldı. Tablo 8'de verilen PCR döngü programında ısısal döngü cihazında amplifiye edildi.

Tablo 8. HLA DRB1 ve HLA DRB1 *04 Analizi için PCR döngü programı

Başlangıç denatürasyonu	94°C	2 dakika	10 siklus
Denatürasyon	94°C	10 saniye	
Annealing-extansiyon	65°C	1 dakika	
Denatürasyon	94°C	10 saniye	20 siklus
Annealing	61°C	50 saniye	
Extansiyon	72°C	30 saniye	
Hold	4°C	Süresiz	

Amplifiye edilen HLA-DRB1 PCR-SSP ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi için 0.5X veya 1XTBE tamponlu %2'lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler, her bir hasta için 24 kuyucuk, 4 hasta için toplam 96 kuyucuk sistemine sahip jele yüklenerek 1X TBE'li tampon ortamında, 80V, 45A'de 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçların UV transillumunatörde değerlendirilmesinde her bir kuyucukta bulunan pozitif kontrollerin çalışıp çalışmadığı kontrol edilerek çift bant gösteren kuyucuklar pozitif kabul edildi ve jel dökümantasyon -görüntüleme sistemiyle fotoğraflanıp bilgisayara kayıt edildi.

3.3. İstatistiksel Analizler

Hasta ve kontrol gruplarının HLA-DRB1 allellerinin, DRB1 *04 alt gruplarının istatistik analizi Arlequin v311 bilgisayar programıyla yapıldı (64). Kısaca bu program; HLA-A, -B, -Cw, DR, DQ ve DP allel frekanslarını, iki farklı lokustaki iki allellerin linkage disequilibriumu, Ki-kare testi kullanılarak P önemlilik testini (0.005) ve Hardy-Weinberg dengesinden sapmalarını da hesap eder.

4. B U L G U L A R

Bu çalışmaya KTÜ Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı polikliniklerine başvuran ve modifiye ARA kriterlerine göre Romatoid Artrit tanısı almış 88 (18 erkek, 70 kadın) hastadan alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan yapıldı. Kontrol grubu olarak Fakültenin Sağlık Bakanlığından Ruhsatlı Doku Tipleme Laboratuvarında doku grupları belirlenen RA öyküsü olmayan kemik iliği ve böbrek transplant hastalarının sağlıklı verici adaylarından her aileden yalnız bir kişi olmak kaydı ile random teknik ile seçildi.

4.1. RA'li Hastalarda ve Kontrol grubunda HLA-DRB1 Allel Dağılımı Sonuçları

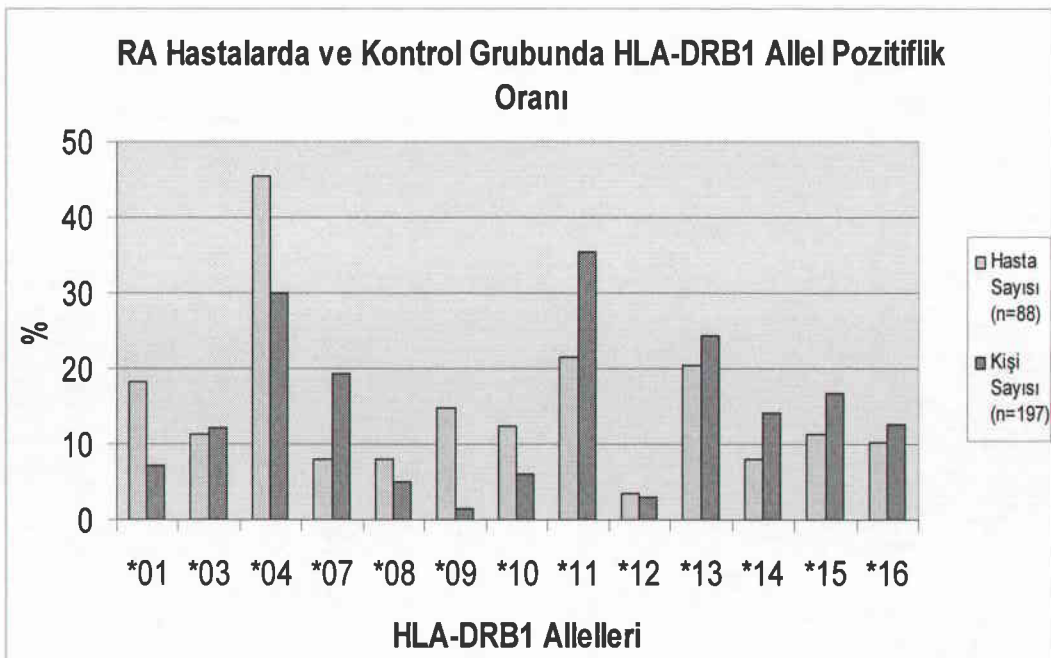
PCR-SSP yöntemi kullanılarak yapılan çalışma kapsamında 88 RA hastası ve 197 sağlıklı kontrol gruplarının DNA örneklerinden HLA-DRB1 lokusuna ait allel taşıyıcılığı ve allel frekansı dağılımından elde edilen sonuçlara göre RA hasta grubunda 13 farklı DRB1 alleli bulunmuş, DRB1 *17 ve DRB1 *18 alleli gözlenmemiştir (Tablo 9-10, Şekil 5-6-7-8). HLA-DRB1 *04 allelinin hastaların % 45'inde taşındığı gözlenmiştir. Daha sonra HLA-DRB1 *11, DRB1 *13, DRB1 *01, DRB1 *09 ve DRB1 *10 (sırasıyla % 21.59, % 20.45, % 18.18, % 14.77 ve % 12.5) taşındığı en sık gözlenen allellerdir. Sağlıklı kontrol grubunda toplumun % 35.53'ünde HLA-DRB1 *11 taşındığı gözlenmiştir. Daha sonra toplumda sık görülen alleler sırasıyla HLA-DRB1 *13, DRB1 *04, DRB1 *07, DRB1 *15, DRB1 *16 ve DRB1 *14 olarak saptanmıştır.

RA'li hastalarda 2n üzerinden yapılan hesaplamalara göre en sık gözlenen HLA-DRB1 *04'ün allel frekansısıdır ki % 25 olarak bulunmuştur. Daha sonra HLA-DRB1 *13, DRB1 *11, DRB1 *01, DRB1 *09 ve DRB1 *10 (sırasıyla % 11.36, % 10.79, % 9.09, % 7.38 ve % 6.25) frekansları en sık gözlenen allellerdir. Sağlıklı kontrol grubunda ise; en sık gözlenen HLA-DRB1 alleli DRB1 *11 (% 18.02) allelidir. Daha sonra HLA-DRB1 *13, DRB1 *04, DRB1 *07, DRB1 *15, DRB1 *16 ve DRB1 *14 (sırasıyla % 17.25, % 15.73, % 9.64, % 8.37, % 6.59 ve % 6.59) frekansları en sık gözlenen allelleridir. Bulguların istatistiksel analizinin ışığında hem taşıyıcılık oranına, hemde allel frekanslarına göre; HLA-DRB1 *01, DRB1 *04 ve DRB1 *09 alleleri RA ile ilişkili bulunmuş, kontrol grubunda DRB1 *07 ve DRB1 *11 yüksekliği koruyucu allel olarak kabul edilmiştir (Tablo 9 ve 10).

RA hasta grubunda (n=88) ve Normal populasyonda (n=197) HLA-DRB1 alleleri arasında gözlenen-beklenen heterozigotluk değerlerinde çok az bir sapma tespit edilmişse de istatistiksel olarak anlamlı değildir. (sırasıyla, $P = 0.30940$ ve $P = 0.93909$) Her iki grupta da allellerin dağılımı Hardy-Weinberg dengesine uygunluk göstermektedir.

Tablo 9. RA'lı hastalar ve populasyonda HLA-DRB1 pozitiflik oranı

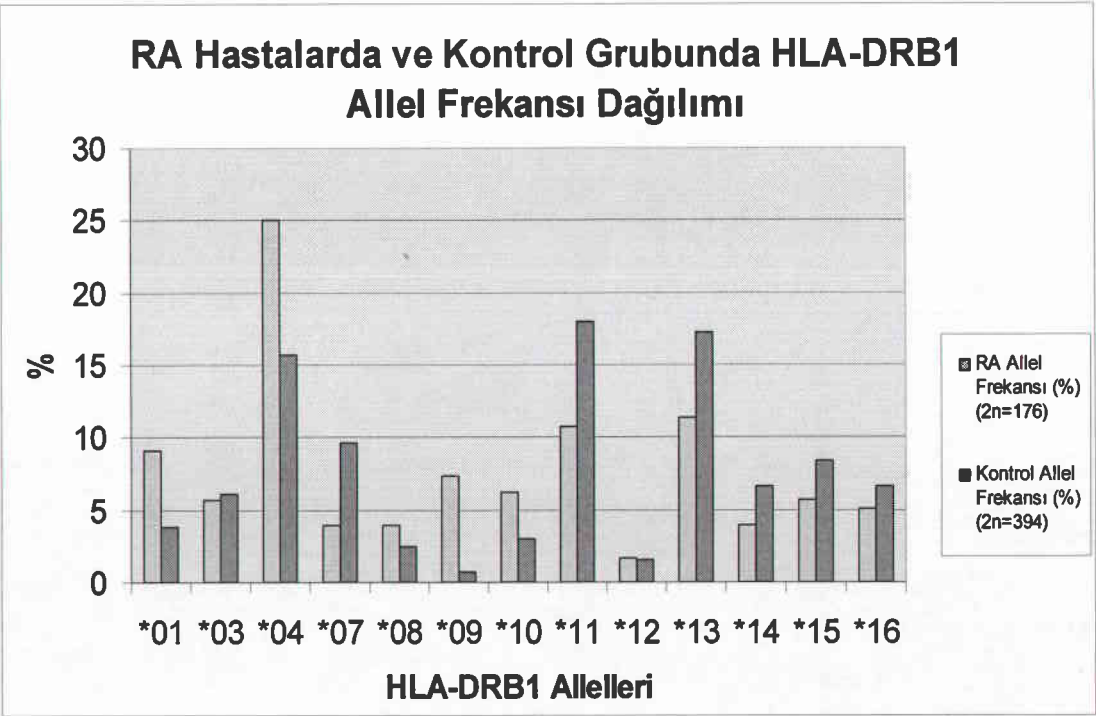
	Hasta grubu (n=88)		Kontrol grubu (n=197)		Ki-Kare
HLA-DRB1 alleleri	Hasta sayısı	Frekans (%)	Kişi sayısı	Frekans (%)	P değeri
DRB1* 01	16	18,18	14	7,1	0.009
DRB1* 03	10	11,36	24	12,18	0.999
DRB1* 04	40	45,45	59	29,94	0.011
DRB1* 07	7	7,95	38	19,28	0.025
DRB1* 08	7	7,95	10	5,07	0.498
DRB1* 09	13	14,77	3	1,52	0.0001
DRB1* 10	11	12,5	12	6,09	0.109
DRB1* 11	19	21,59	70	35,53	0.027
DRB1* 12	3	3,4	6	3,04	1.000
DRB1* 13	18	20,45	48	24,36	0.567
DRB1* 14	7	7,95	25	14,21	0.334
DRB1* 15	10	11,36	33	16,75	0.319
DRB1* 16	9	10,22	25	12,69	0.692



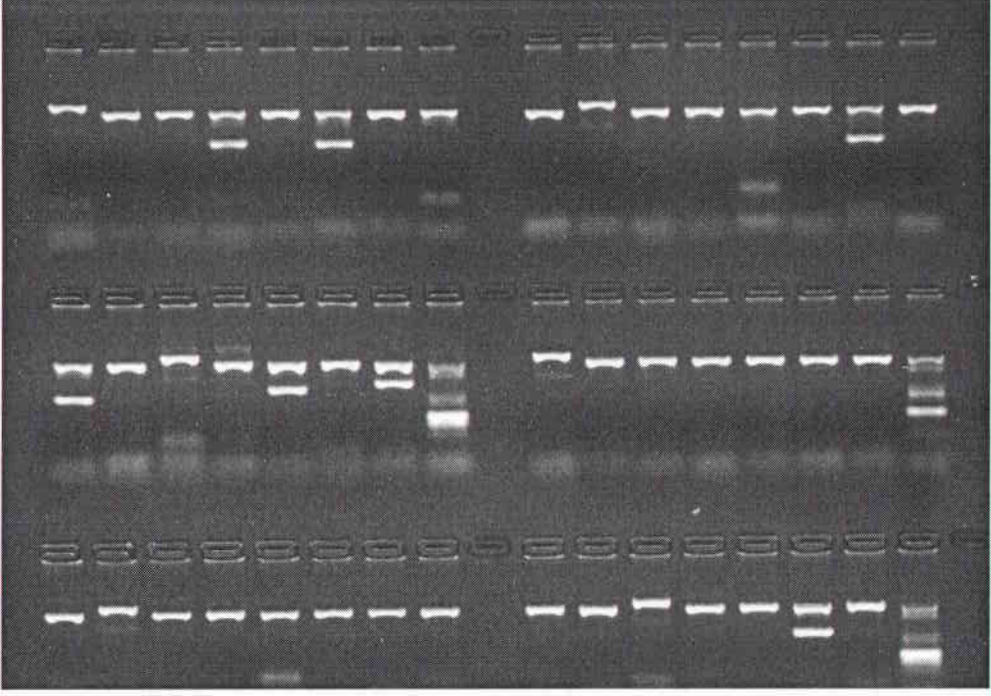
Şekil 5. RA Hastalarında ve Populasyonda HLA-DRB1 Allellerinin Pozitiflik Oranı

Tablo 10. RA’lı hastalar ve populasyonda HLA-DRB1 allel Frekansı dağılımı

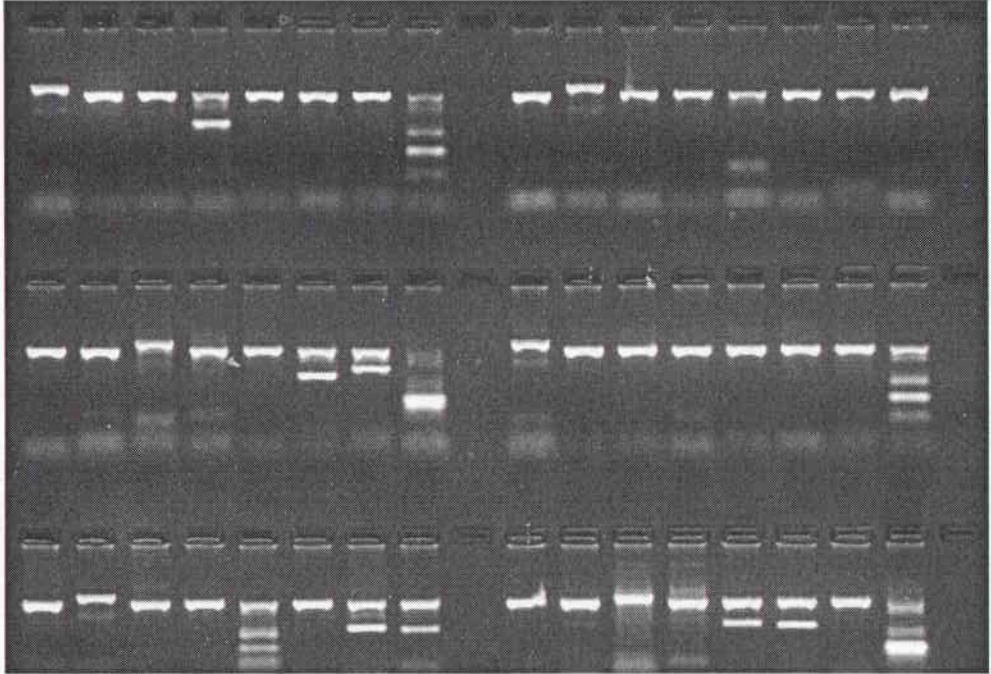
HLA-DRB1 allelleri	Hasta grubu (2n=176)		Kontrol grubu (2n=394)		Ki-Kare
	Allel sayısı	Allel Frekansı (%)	Allel Sayısı	Allel Frekansı (%)	P değeri
DRB1* 01	16	9,09	15	3,80	0.018
DRB1* 03	10	5,68	24	6,09	0.999
DRB1* 04	44	25,00	62	15,73	0.009
DRB1* 07	7	3,97	38	9,64	0.032
DRB1* 08	7	3,97	10	2,53	0.505
DRB1* 09	13	7,38	3	0,76	0.0001
DRB1* 10	11	6,25	12	3,04	0.117
DRB1* 11	19	10,79	71	18,02	0.039
DRB1* 12	3	1,70	6	1,52	1.000
DRB1* 13	20	11,36	68	17,25	0.094
DRB1* 14	7	3,97	26	6,59	0.283
DRB1* 15	10	5,68	33	8,37	0.340
DRB1* 16	9	5,11	26	6,59	0.621



Şekil 6. RA hastalarında ve Kontrol Grubunda HLA-DRB1 Allel Frekansı Dağılımı



Şekil 7. DB-1097 nolu hastaya ait HLA-DRB1 jel fotoğrafı



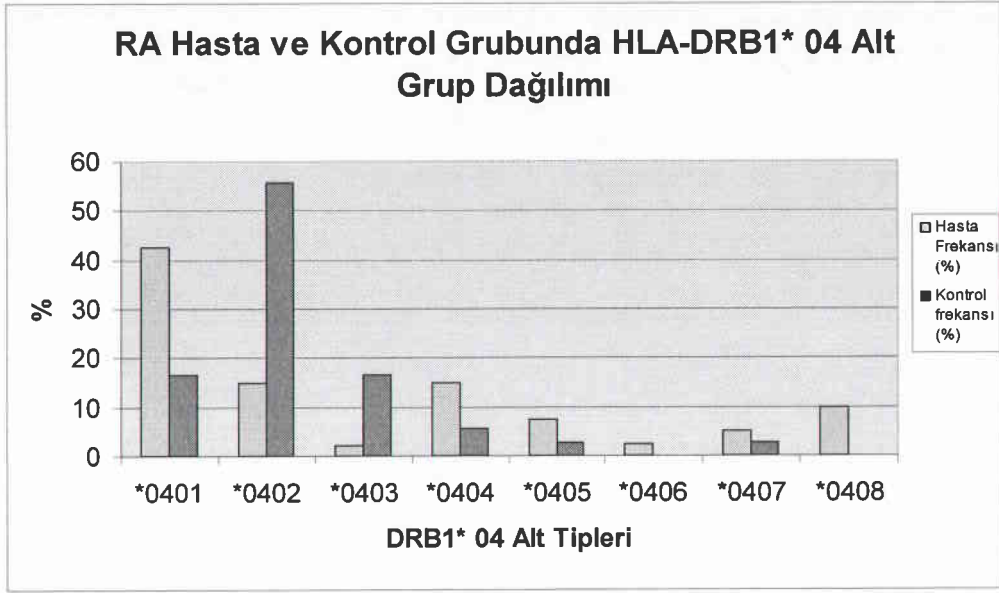
Şekil 8. DB-1098 ve DB-1102 nolu hastalara ait HLA-DRB1 jel fotoğrafı

4.2. RA Hastalarında ve Kontrol grubunda HLA-DRB1 *04 Alt Tipleri

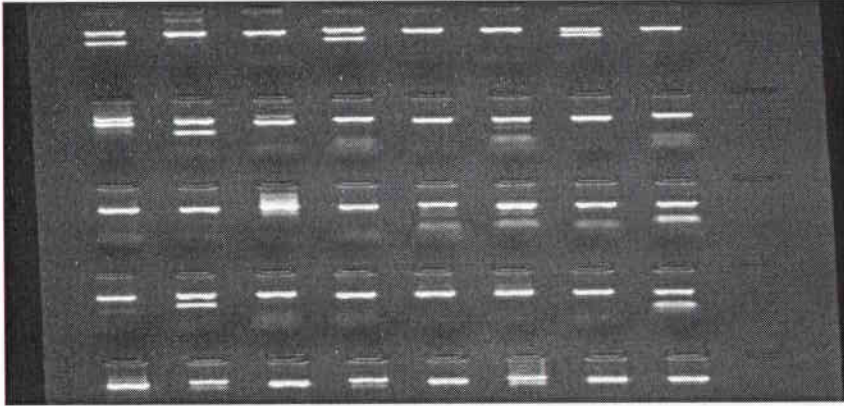
HLA-DRB1 *04 alleli taşıyan RA hastalarının DNA örneklerinden PCR-SSP High resolution yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre; 8 farklı DRB1 *04 alt tipi gözlenmiştir (Tablo 11, Şekil 9-10-11-12-13). RA'de önemli olduğu kabul edilen DRB1* 0401 ve DRB1 *0404 allelleri (17 hasta, % 42.50 ve 6 hasta, %15) en sık gözlenen alt tipler-gruplar olarak bulunmuştur. DRB1 *04 taşıyan sağlıklı kontrol grubunda ise DRB1 *04 allelinin 6 çeşit alt tipi belirlenmiş ve en yaygın alt grup % 55. 55 oranıyla DRB1 *0402 ve % 16.67 oranıyla DRB1 *0403 allelleridir. DRB1 *0406 ve *0408 allellerine kontrol grubunda rastlanmamıştır. Hasta ve kontrol gruplarında DRB1 *04 alt tipleri arasında yapılan karşılaştırmada; hasta grubunda DRB1 *0401 alt tipindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P = 0.028$). Kontrol grubunda ise DRB1 *0402 ve *0403 alt tipi yığılması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($P = 0.001$, $P = 0.048$) ve koruyucu allel olarak kabul edilmiştir.

Tablo 11. RA'li hastalar ve kontrollerdeki HLA-DRB1*04 alt tiplerinin sıklığı

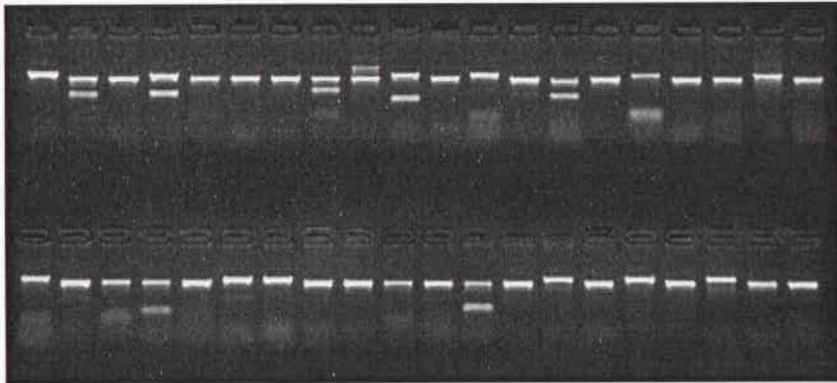
DRB1*04 alt tipi	Hasta grubu (n=40)		Kontrol grubu (n=36)		Ki-Kare
	Alt tip sayısı	Frekans (%)	Alt tip sayısı	Frekans (%)	P Değeri
DRB1* 0401	17	42.50	6	16.67	0.028
DRB1* 0402	6	15.00	20	55.55	0.001
DRB1* 0403	1	2.50	6	16.67	0.048
DRB1* 0404	6	15.00	2	5.55	0.268
DRB1* 0405	3	7.50	1	2.77	0.616
DRB1* 0406	1	2.50	--	--	--
DRB1* 0407	2	5.00	1	2.77	1.00
DRB1* 0408	4	10.00	--	--	0.117



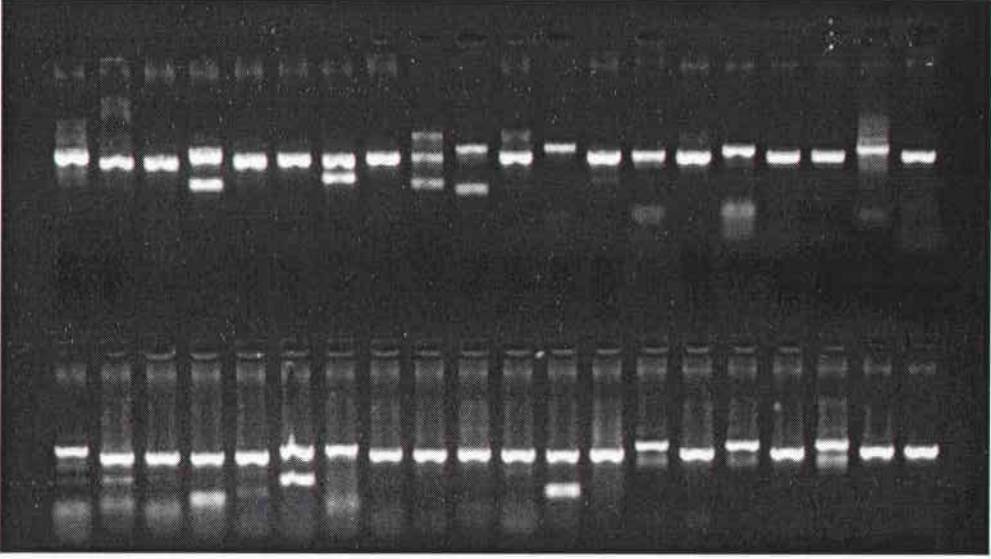
Şekil 9. RA Hastaları ve Kontrol Grubunda HLA-DRB1 * 04 Alt Tiplerinin Dağılımı



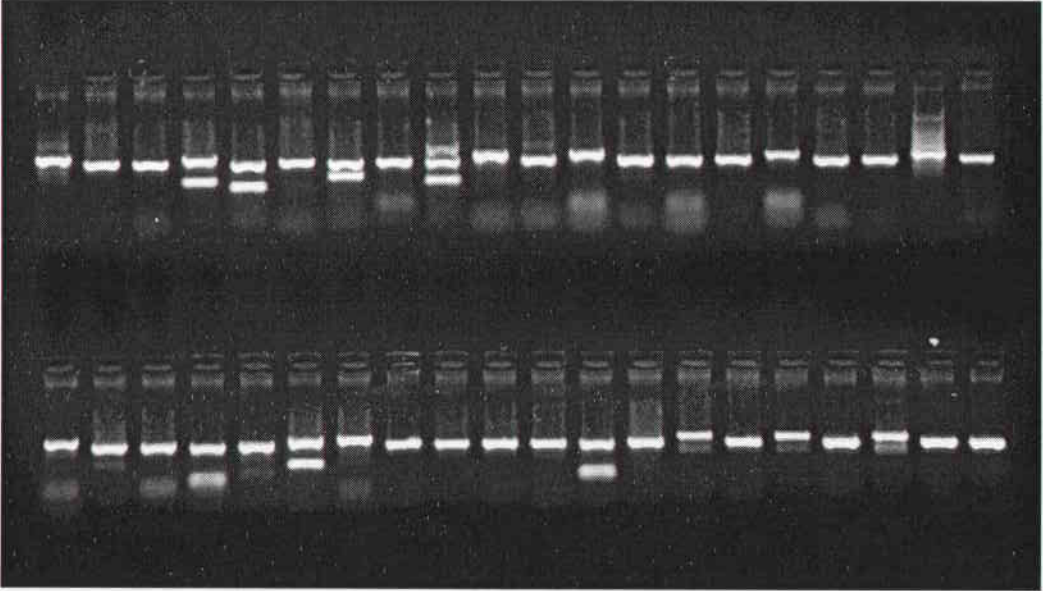
Şekil 10. DB-924 numaralı hastaya ait HLA-DRB1 *0401 jel fotoğrafı



Şekil 11. DB- 6306 numaralı kontrol grubuna ait HLA-DRB1 *0402 jel fotoğrafı



Şekil 12. DB-944 no'lu hastaya ait HLA-DRB1 *0408 jel görüntüsü



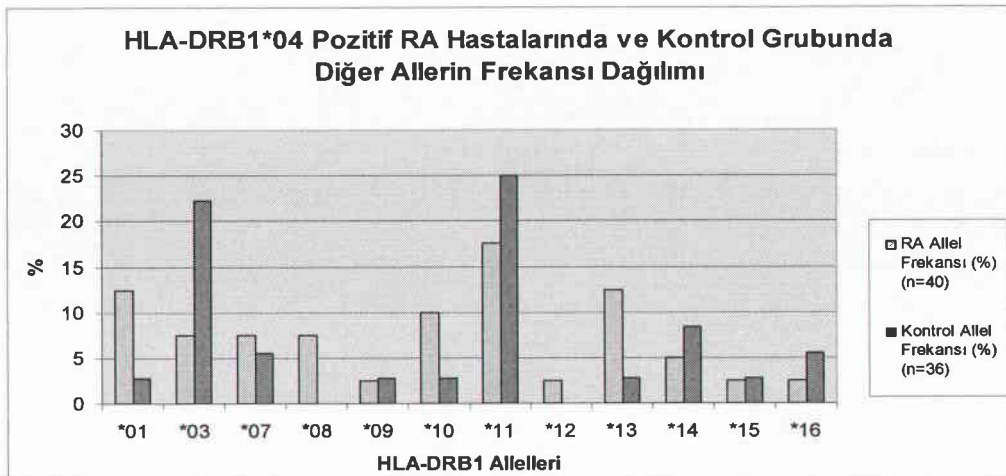
Şekil 13. DB-1003 no'lu kontrol grubuna ait HLA-DRB1 *0405 jel görüntüsü

4.3. HLA-DRB1 *04 Taşıyan RA Hastalarında Diğer HLA-DRB1 Allel Dağılımı

Hastaların tamamı HLA-DRB1 *04 taşımaktadır, yanı sıra en yüksek sıklıkta DRB1 *11, DRB1 *01, DRB1 *13 allelerini taşımaktadırlar. Kontrol grubunda DRB1 *03, DRB1 *11, DRB1 *14 ve DRB1 *16 hasta grubundan daha yüksek sıklıkta bulunmuştur. Her iki grup arasında ikinci DRB1 allelleri dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 12, Şekil 14).

Tablo 12. HLA-DRB1 *04 pozitif RA Hastaları ve Kontrol grubunda ikinci DRB1 allel dağılımı

HLA-DRB1 allelleri	Hasta grubu (n=40)		Kontrol grubu (n=36)		Ki-Kare P Değeri
	Hasta sayısı	Frekans (%)	Kişi Sayısı	Frekans (%)	
DRB1* 01	5	12.50	1	2.77	0.203
DRB1* 03	3	7.50	8	22.22	0.134
DRB1* 04	4	10.00	7	19.44	0.399
DRB1* 07	3	7.50	2	5.55	1.000
DRB1* 08	3	7.50	--	--	0.242
DRB1* 09	1	2.50	1	2.77	1.000
DRB1* 10	4	10.00	1	2.77	0.361
DRB1* 11	7	17.50	9	25.00	0.603
DRB1* 12	1	2.50	--	--	1.000
DRB1* 13	5	12.50	1	2.77	0.203
DRB1* 14	2	5.00	3	8.33	0.663
DRB1* 15	1	2.50	1	2.77	1.000
DRB1* 16	1	2.50	2	5.55	0.601



Şekil 14. HLA-DRB1 *04 Pozitif hasta ve Kontrol Grubunda Diğer allelerin Dağılımı

5. TARTIŞMA

Romatoid artrit (RA [MIM 180300]), etiolojisinde genetik ve çevresel faktörlerin birlikte yer aldığı poligenik kompleks otoimmün bir hastalıktır. Kronik inflamasyon ile seyreden RA, periferik eklemlerde ve eklem çevresinde simetrik inflamasyonla birlikte ilerleyici harabiyete sebep olur (65). RA’te erken yaşlarda kadın/erkek oranı 2-3/1 olmasına rağmen ilerleyen yaşlarda eşitlenmektedir. Dünyadaki tüm topluluklarda görülebilen hastalığın prevalansı (%1-3) değişken, biyocoğrafik dağılımıda homojen değildir. Afrika’da (Nijerya ve Güney Afrika’nın bazı kısımları hariç) nadir görülürken, Güney Doğu Asya, Çin ve Japonya’da da düşük prevalanstadır. Bunların tam aksine Amerika’daki Pima ve Chippewa yerlilerinde (%5 ve %7) daha yaygın olduğu rapor edilmiştir (66, 67). Orta ve Güney Avrupa da RA prevalansı %0.5 ile %1 arasında değişirken, Kuzey Avrupa’da daha yüksek olduğu bildirilmiştir (68). Ülkemizde İzmir ve Antalya’da yapılan iki farklı araştırma sonucuna göre RA prevalansı %0.5 dolayında seyretmektedir (69, 70). Bölgemizde ise henüz yayınlanmış bir çalışma yoktur.

RA hastalığının kadınlarda sıklıkla menarştan sonra menapozdan önce ortaya çıkması, hamilelikte artması hormonal faktörlerin önemini işaret etmektedir (71). RA’in etiolojisinde çevresel faktörlerden en iyi bilineni sigaranın olumsuz etkileridir (72, 73). İnfeksiyöz ajanlardan *Herpes simplex virus 4*, *Human foamy virus* ve *Transfusion transmitted (TT) virusun* RA’e sebep olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (74). RA’li hastaların sinovial sıvısında herhangi bir infeksiyöz ajan veya partikülü tesbit edilememişse de *Proteus vulgaris*’in yüzey antijeni ile HLA-DRB1 *04 alt tipleri arasında çapraz reaksiyon geliştiği günümüzde bilinmektedir (71). Hastaların sinoviyal eklem sıvısındaki B lenfositleri tarafından salgılanan anormal IgG’ye karşı oluşan IgM (romatoid faktörler) ile birleşerek immün kompleksler oluşturmaktadır. Bu immün kompleksler ise kompleman sistemini klasik ve alternatif yoldan aktive ederek inflamasyonu başlatmaktadır (71, 74, 75).

Aile ve ikiz çalışmalarından elde edilmiş verilere göre; RA konkordansı monozigotik ikizlerde %12-30, aynı eşeyli dizigotik ikizlerde %4 ve birinci derece akrabalarda %2-12 olduğu belirtilmektedir (65). RA oluşumunda genetik faktörlerin katkısı % 60 dolaylarında olduğu bildirilmektedir (65, 66). RA'de etkisi ilk açıklanan genetik faktörlerden olan HLA genleri insan kromozomlarında 6p21.3'te lokalizedir. Aile çalışmalarında HLA bölgesinin RA'ye katkısı %30 olarak açıklanmıştır (76). Romatoid faktör pozitif olan hastalarda yüksek oranda (% 60-70) HLA-DRB1 *04 alleli bulunmuştur (71). Yine HLA-DRB1 *01, DRB1 *09 ve DRB1 *10 çeşitli toplumlarda RA ile ilişkili bulunmuştur (65-67, 74, 77-79).

Diğer genetik faktörlerden non-HLA genlerinin RA'ye katkısı henüz tam olarak açıklanamamış olsa da yoğun araştırmalar devam etmektedir. Hastalığın ortaya çıkışı ve ilerlemesinde; antijenik peptidlerin oluşumu ve immün sistem tarafından tanınmasını sağlayan genlerin, anjiogenez, hücre-hücre haberleşmesinde rol alan sitokinler, sitokin reseptörleri, hücre içi sinyal sistemi, inflamasyon, apoptozis, doku tamir mekanizmaları ile ilgili genlerin katkısı olduğu düşünülmektedir (76). Non-HLA genlerinden 1p13'den kodlanan Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22), çeşitli otoimmün hastalıklar (RA ve T1D, MS, Hashimoto ve Graves hastalığı) ile ilişkili olan T hücre reseptörlerini inhibe eden lymphoid-spesifik fosfatazı kodlar. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA4)'de PTPN22 gibi çeşitli otoimmün hastalıklar ile ilişkilidir (65-67, 77, 78). Peptidyl arginine deiminase, type IV (PADI4) genleri proteinlerdeki arginin rezidülerini posttranslasyonel olarak sitrulline dönüştüren enzimleri kodlarlar. RA'li hastalarda son zamanlarda anti-CCP otoantikörleri belirlenmiş olması PADI4 ile ilişkisini göstermektedir ki bu sitrullinasyon yolu RA patogeneğinde önemlidir. Makrofaj migration inhibitory factor (MIF) immunregulatuvar bir sitokin olup RA hastalarında düzeyi yükselir. (65-67, 72, 74, 77-79, 85). Yine FCN1, RANK ve TNFR2 gibi HLA dışı bazı genlerde çeşitli toplumlarda RA ile ilişkili bulunmuştur (86-88).

HLA dışı genetik faktörlerden olan PTPN22 ve sigaranın etkileri Kalberg ve ark. (72) tarafından birlikte araştırılmış; RA ile ilişkili olduğu belirlenmiş ancak Şahin ve ark. (85) Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada RA ile PTPN22'nin ilişkili olmadığı rapor edilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklardan muzdarip RA hastalarında HLA-DRB1 ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda; DRB1 *04 alt tiplerinden *0401/*0401 homozigotluğu, *0401/*0404 heterozigotluğu ve tek başına *0404 veya *07 taşıyıcılığının oldukça riskli bulunmuştur (88-91). Çalışmamızda non-HLA genetik faktörler ve kardiyolojik hastalıklar irdelenmemiştir.

RA hastalığının oluşumunda HLA-DRB1 *04 alt tipleri eşit katılım göstermezler. DRB1 allellerinin bazılarında 70-74. amino asit rezidülerinde korunmuş kısa amino asit (QKRAA, GRRAA ve RRRAA) dizileri bulunur. DRB1 molekülünün 3. hipervariable bölgesinde yer alan bu kısım “shared epitop = ortak epitop” (SE) olarak adlandırılır ve RA’e sebep olur (66). Çeşitli popülasyonlarda RA’e sebep olan farklı DRB1 allellerinin (*0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *0409, *0410, *0413, *0419, *0421, *09, *1001, *1401, *1402, *1406 ve *1409) ortak epitop taşıdığı belirlenmiştir (65-67, 77, 79). Bu durum RA ile HLA-DRB1 ilişkisinin, DRB1 molekülünün diğer özelliklerinden çok “ortak epitop”la ilgili olduğunu göstermektedir. Ortak epitop içindeki, amino asit zinciri 70 ve 71 dizilerinin, peptid ile MHC bağlanmasını doğrudan etkilediği gösterilmiştir (65, 76).

HLA-DRB1’in hastalıkla ilişkili allelleri, hastalıkla ilişkili olmayan (koruyucu) allellerinden, sınıf II molekülünün 3.“hipervariable” bölgesinde, 70-74. amino asitler arasında kısıtlı bir segmentde farklılık göstermeleri ile ayrılmaktadır. RA’dan koruyucu olarak bilinen allellerin bazılarının (*0103, *0402, *07, *1102, *1103, *1201, *1301, *1302, *1304 ve *1501) ortak noktası ise; 70 ve 71. pozisyonda negatif yüklü bir amino asit taşımalarıdır. Aspartik asit (D), glutamik asit (E), Arginin (R), Alanin (A), Alanin (A) rezidülerine sahip kısa peptidlerde negatif yüklü amino asitler yer alır, ve bu koruyucu reseptörlerin 70-74 aa. sırası DERAA’dır. (74, 76, 80, 88, 92)

Genetik faktörü HLA’ya bağlı olan RA’lerde allellerin etkisi ve tipi evrensel değil heterojendir. Bir toplumda koruyucu kabul edilen allel başka toplumlarda hastalık sebebi olarak gösterilmektedir (Tablo13, 14). Çeşitli çalışmaların sonuçlarına göre; Kuzey Avrupa orijinlilerde HLA-DRB1 *04’ün hastalığa sebep olduğu, (*0402 ve *0403 hariç), İngilterede *0401, *0404, *0405 ve *0408 RA ile ilişkili olduğu bulunmuş, *0402, *0403 ve *0407 alt tiplerinin RA ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir. İsrailli Yahudilerde RA ile ilişkisi olmayan *0402 alt tipinin yaygın olduğu rapor edilmiştir. Dünyadaki toplumların aksine DRB1 *0402 Yakıma Amerikan yerlilerinde RA ile ilişkili bulunmuştur. Kafkas kökenlilerde HLA-DRB1 *0401 ve *0404, Asyalılarda *0405 RA ile ilişkilidir. DRB1 allelinin her ikisinde *04 olan bireylerde alt tipleri *0401/*0404 compound heterozigotlar homozigotlara göre hastalığın erken yaşta ortaya çıkmasına ve ağır seyretmesine sebep olmaktadır (5, 78, 93). Hintlilerde, Avrupa ve İsrailli Yahudilerinde DRB1 *01 (*0101) ve DRB1 *10 RA ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (67). Şilililerde, Japonlarda ve İngilteredeki Kafkas kökenlilerde DRB1 *09 RA ile ilişkili, *0103, *0402*, 0802 ve *1302 RA’ten koruyucu olarak bulunmuştur (79).

Tablo 13. Çeşitli Ülkelerde RA ile ilişkili HLA-DRB1 allelleri (5, 67, 77-79, 91, 94-103)

Ülke	İlişkili HLA-DRB1						
Kolombiya		*0404	*0405				
Peru		*0404					*1402
Brezilya					*0101/2		
Arjantin	*0401	*0404					
Meksika	*0401	*0404	*0405	*1001	*0101		
Şili		*0404	*0405/*0901			*0408	*09
Asya: Kore Çin, Japonya, Tayvan, Malezya	*0401		*0405, *0405/*0901	*1001	*0101		*09, *0410
Kafkas kökenliler	*0401	*0404				*0408	*1402
İsrail,Avrupa Yahudi				*10	*0101/2		
Afrikalı-Amerikan	*0401	*0404	*0405	*1001			
Pima-Yakima Yerlisi							*0402 *1402
Amerika Hintli				*10	*01		
Kuzey Avrupa							*04
İngiltere	*0401	*0404	*0405			*0408	
Güney Fransa	*0401	*0404	*0405				
Yunanlılar	*0401			*10, *1001			
İspanya	*0401			*10			
Macaristan			*0405			*0408	
Türkiye /Ankara-İstanbul	*0401	*0404	*0405	*10	*01	*0408	
Türkiye/Trabzon	*0401				*01		*09

Tablo 14. Çeşitli Ülkelerde RA'ten koruyucu HLA-DRB1 allelleri (5, 67, 77-79, 91, 94-103)

Ülke	Koruyucu HLA-DRB1							
Şili	*0402		*1302	*0103		*0802		
Asya: Kore Çin, Japonya, Tayvan, Malezya	*0402	*0403	*1301 *1302	*0103	*0701	*0802		*0301 *0406 *1405
Kafkas kökenliler	*0402		*1301	*0103	*07	*0802	*1201	*1501
İsrail,Avrupa Yahudileri	*0402							
Afrikalı-Amerikan			*1302				*1101	
Kuzey Avrupa	*0402	*0403						
İngiltere	*0402	*0403						*0407
Macaristan							*12	
Türkiye/ Ankara-İstanbul			*13					
Türkiye/Trabzon	*0402	*0403			*07		*11	

Uzak doğuda (Kore, Çin, Tayvan, Japonya ve Malezya,) yapılan çalışmaların meta analiz sonuçlarına göre (Tablo 13 ve Tablo 14); HLA-DRB1 *0401, *0405, *0410, *0101 ve *1001 allelleri RA ile ilişkili iken, DRB1 *0301, *0403, *0406, *0701, *1301, *1405 allelleri koruyucu olarak belirlenmiştir. Özellikle HLA-DRB1 *0405 ve *0901 Uzak Doğu Asya'da RA ile ilişkili predominant allel olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca Korelilerde *0405/*0901 heterozigotlar RA ile ilişkili bulunmuştur (94-99.) Latin Amerika ülkelerinde (Kolombiya Peru, Brezilya Arjantin ve Meksika) yapılan çalışmaların meta-analiz sonuçlarına göre; DRB1 *0404, *0405, *0401, *0408, *1402, *0101/2 ve *1001 allelleri RA ile ilişkili bulunmuştur (100).

Ülkemizde İstanbul merkezli bir çalışmada, RA hastalarında DRB1 *0404 ve *0401 alt tipleri yüksek bulunmuş fakat DRB1 *13 alleli çok az bulunmuş, koruyucu olarak kabul edilmiştir (101) Bu çalışmada Türkiye'de en sık görülen tıpkı İspanya, Yunanistan ve Güney Fransa'da olduğu gibi *0401'dir, *0404 Türkiye'de sık gözlenir ama diğerlerinde gözlenmez. DRB1 *0101/2 yüksektir. DRB1 *1001 İspanya ve Yunanistan da olduğu gibi İstanbulda da yüksek bulunmuştur. Türkiyede DRB1 *04 (*0408 > *0401 > *0405) *10 ve *01 sık görüldü (101). Ankarada yapılan başka bir çalışmada DRB1 *04 alleli %46.2 kontrol grubunda %20.9 olarak bulunmuştur. RA ile DRB1 *04 alt tipleri (*0401, *0405, *0404) ve DRB1 *01 (*0101) ilişkili bulunmuştur (102). Kuzeydoğu Macaristan'da HLA-DRB1 *0405 ve *0408 RA ile ilişkili bulunmuş, DRB1 *01 ilişkisiz bulunmuş, DRB1 *12 koruyucu kabul edilmiştir (103). İtalyanlarda PMR ile HLA arasında ilişki bulunamamış (104), Güney Fransa da ise PMR ve RA hastalarında HLA ilişkisi araştırılmış ve HLA-DRB1 *01 hem PMR hem de RA ile ilişkili bulunmuş, DRB1*04 (*0401, *0404 ve *0405) yalnız RA ile ilişkili bulunmuştur (105).

Çalışmamızda HLA-DRB1 taşıyıcılığı ve *allel frekanslarına* göre; *01, *04 ve *09 allelleri RA hasta grubuyla ilişkili ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $P = 0.009$, $P = 0.011$ ve $P = 0.0001$, *sırasıyla* $P = 0.018$, $P = 0.009$ ve $P = 0.0001$). Kontrol grubunda ise DRB1 *07 ve *11 (sırasıyla $P = 0.025$ ve $P = 0.027$, *sırasıyla* $P = 0.032$ ve $P = 0.039$) allelleri istatistiksel olarak anlamlı olup, "koruyucu" olarak belirlenmiştir. Hasta grubunda hem taşıyıcılık hem de *allel frekansına* göre DRB1 *10 ($P = 0.109$ ve $P = 0.117$, kontrol grubunda DRB1 *13 ($P = 0.567$ ve $P = 0.094$) yüksek frekansta seyretse de istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Hasta ve kontrol grubu allel frekansları yönünden incelendiğinde oranlarda farklılıklar görülmektedir. Bu farkın sebebi ise MHC-HLA moleküllerinin kalıtım kalıbından kaynaklanmaktadır. Bilindiği gibi HLA kompleksi ebeveynlerden Mendeliyen olarak kalıtılır ve kodominant olarak eksprese (ifade) edilir. Haplotipler daha çok blok halinde gelecek kuşaklara taşınırlar. Bu sebepten dolayı allel frekansları “2n” üzerinden hesaplanır. Halbuki herhangi bir alleli bir kişinin taşıyıp taşımadığı “n” üzerinden hesaplanır.

HLA- DRB1 *04 alt tiplerinin high resolution analiz sonuçlarına göre bölgemizde *0401 alleli RA ile ilişkili bulunmuştur ($P = 0.028$). DRB1 *0404 alt tipi hastalarda kontrol grubuna göre biraz daha yüksek bulunsu da anlamlı bulunmamıştır ($P = 0.268$). DRB1 *0406 ve *0408 alt tipleri kontrol grubunda gözlenmemiştir. Kontrol grubunda ise DRB1 *0402 ve *0403 alt tipleri yüksek oranda bulunmuş istatistiksel olarak anlamlı ($P = 0.001$ ve $P = 0.048$) ve koruyucu kabul edilmiştir. Ancak yinede *0403 alt tipi için kesin olarak “koruyucu”dur diyebilmek için daha fazla örnekte çalışmak gereklidir. HLA-DRB1 *04 pozitif hastalarda ikinci alleller incelendiğinde; istatistiksel olarak anlamlı derecede hastalığa katkısı olabilecek ikinci bir allel birlikteliği saptanamamıştır. Literatürde bir çalışmada DRB1 *13 RA gelişiminde ikili rol aldığı ifade edilmiş, ACPA-pozitif hastalarda koruyucu olduğu fakat ikinci allel DRB1*03 ile birlikte ACPA-negatiflerde hastalığa sebep olduğu bildirilmiştir (106).

Sonuçlarımız yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında; Türkiye’de yapılan önceki çalışmalar ile bazı alanlarda örtüşmekte bazılarında ayrışmaktadır. Örneğin Ankara ve İstanbul merkezli çalışmalarda bizim bulgularımız gibi DRB1 *0401 alt tipi ön plana çıkmış ancak bizim çalışmamızda *0404 alt tipi hastalıkla kesin ilişkili değildir. Tıpkı Ankarada yapılan bir araştırmadaki gibi *01 bizim çalışmamızda da RA ile ilişkili bulunmuştur. Yine DRB1 *09 alleli bölgemizdeki hastalarda RA ile ilişkili bulunmuş, ancak Türkiye’de diğer merkezlerde yapılan araştırmalarda ilişkili değildir (101, 102) . Çalışmamızda DRB1 *10 alleli kontrol grubuna göre daha yüksek çıksa da diğer bölgelerimiz gibi RA ile direk ilişkili değildir. Türkiye’deki diğer çalışmalarda koruyucu allel olarak DRB1 *13 bildirilmiş, bizim çalışmamızda ise *0402, *0403, *11 ve *07 bulunmuştur. Bu bağlamda sonuçlarımız, Ankara ve İstanbul merkezli çalışmalardan ayrılmaktadır. Bu durum popülasyon genetiği temelinde gayet normaldir. Çünkü bölgemiz sosyo-ekonomik olarak göç alan değil, göç veren bir bölge konumundadır. Ankara ve İstanbul ülkemizin iki büyük kenti olması sebebiyle sürekli göç almaktadır. Sonuçta

bölgemiz daha homojen ve daha izole bir bölge konumundadır. DRB1 *0401 alleli tüm dünyada görüldüğü gibi özellikle bölgemizde de ön plana çıkmaktadır. Hastalığa sebep olan DRB1 *09 alleli bölgemizde yaşayan insanların Orta Asya kökenlerini işaret etmektedir. DRB1 *01 alleli yüksekliği dünyanın çeşitli coğrafyalarında da görülmekte ve bir bölgeye endemiklik göstermemektedir. Koruyucu allellerden DRB1 *0402 evrensellik arz etmekte fakat DRB1 *0403 ve DRB1 *07 bölgede yaşayan insanların Kafkasya ve Asya'tik geçmişini ön plana çıkarmakta, DRB1 *11 alleli ise Afrika kökenli Amerikalılar ile paralellik arz etmektedir (Tablo13, 14). Bulgularımızda hastalığa sebep olan alleller ve alt tipler “ortak epitop” hipotezine uygundur. Aynı şekilde koruyucu allellerde negatif yüklü amino asitlerin yer aldığı ortak bir epitop taşımaktadır.

Populasyon genetiği açısından kalıtsal veya genetik etiyolojili hastalıklara yaklaşımda; coğrafya birliği, akrabalık bağları, dil, göç, mutasyon, evlilikler ve doğal felaketler toplumların gen havuzunu etkiler veya değiştirir. Hastalarda ve sağlıklı kontrol grubundaki allel dağılımı bulgularımız yaşadığımız coğrafya ve tarihsel geçmişimiz ile uyushmaktadır. Diğer HLA gruplarının da belirlenerek haplotiplerinin çıkarılması daha fazla anlam ifade edecektir. Bölgemizde yaşayan RA hastaları ve kontrol grubundan elde edilen sonuçlar, beklenen ve gözlenen heterozigotluğa göre Hardy-Weinberg kuramına uyum göstermekte, bölgemizdeki evlilik tercihlerinin seçimli değil daha çok random olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak bölgemizde yaşayan RA hastalarında yaptığımız araştırmada; HLA-DRB1 *01, *04 (*0401), *09 allelleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kontrol grubunda ise HLA-DRB1 *0402, *0403, *07 ve *11 allelleri yüksek frekansta bulunmuş “koruyucu allel” olarak belirlenmiştir. Bölgemizdeki RA'li hastaların DRB1 *04 alt tipleri gibi, hastalıkla ilişkili olan DRB1 *01, *09 ve koruyucu olan DRB1 *07, *11 allellerinin de alt tiplerinin çalışılıp belirlenmesi faydalı olacaktır. Bunlara ilave olarak sitokin gen polimorfizminin ve non-HLA genetik faktörlerinin araştırılıp irdelenmesinin bilimsel olarak daha fazla katkı sağlayacağı kanaatindeyiz. HLA Doku tipi test sonuçlarının RA hastalarına farmakogenetik tedavi seçimi şansı vereceğine de inanmaktayız.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Romatoid artritli hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda;

1. HLA-DRB1* 01, *04, *09 allelleri hem taşıyıcılığa hem de allel frekansına göre kontrol grubundan yüksek ve anlamlı bulundu (sırasıyla $P = 0.009$, $P = 0.011$ ve $P = 0.0001$, allel frekansına göre sırasıyla $P = 0.018$, $P = 0.009$ ve $P = 0.0001$).
2. Kontrol grubunda DRB1 *07 ve *11 frekansı yüksek bulunmuş istatistiksel olarak anlamlı ve koruyucu allel olarak belirlenmiştir (sırasıyla $P = 0.025$ ve $P = 0.027$, allel frekansına göre $P = 0.032$ ve $P = 0.039$).
3. HLA-DRB1 *04 alt tiplerinden *0401 alt tipi RA hastalarında yüksek oranda bulunmuş (% 42.50) ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($P = 0.028$).
4. Kontrol grubunda DRB1 *04 alt tiplerinden *0402 ve *0403 yüksek oranda bulunmuş (sırasıyla %55.55 ve %16.67) istatistiksel olarak anlamlı olup ($P = 0.001$ ve $P = 0.048$), koruyucu alt tip olarak belirlenmiştir.
5. HLA-DRB1 *04 taşıyan hasta ve kontrol grubunda ikinci allel yönünden istatistiksel bir fark gözlenmemiştir.
6. RA hasta grubunda hastalıkla ilişkili alleller ve kontrol grubunda koruyucu alleller ortak epitop hipotezine uygun bulunmuştur.
7. Hasta ve kontrol grubunda gözlenen ve beklenen allel frekansları Hardy-Weinberg kuralına uygun bulunmuştur.

6.2. Öneriler

1. RA hastalarının HLA-DRB1 *01 ve DRB1 *09 alt tiplerinin çalışılması,
2. Kontrol grubunda koruyucu allelelerden DRB1 *07 ve DRB1 *11 alt tiplerinin belirlenmesi,
3. HLA gen bölgesinde diğer allelerin ve haplotiplerin çalışılarak hastalıkla herhangi bir ilişkisinin olup olmadığının araştırılması
4. Non-HLA genetik faktörlerin ve sitokinlerin hasta ve kontrol grubunda çalışılması
5. RA hastalarının hastalık şiddeti ve tedavi sürecine göre sınıflandırılarak diğer parametrelerin araştırılması.
6. Çevresel faktörlerin ve yukarıdaki önerilerin irdelenmesi hastalığın etiyolojisinin daha iyi aydınlatılmasına katkı vereceğine inanmaktayız.

Ö Z E T

Romatoid artirit (RA [MIM 180300]), genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan kompleks, poligenik otoimmün bir hastalıktır. Kronik inflamasyon ile seyreden RA, periferik eklemlerde ve çevresinde ilerleyici harabiyete sebep olur. Tüm toplumlarda görülebilen hastalığın prevalansı (%1-3) değişken, biyocoğrafik dağılımı heterojen ve HLA DRB1 alleleriyle olan ilişkisi de evrensel değildir. Bu çalışma 88 RA hastasının (18 E, 70 K, yaş ort. 52 ± 12) ve kontrol grubu olarak 197 sağlıklı bireyin DNA örneklerinden PCR-SSP yöntemiyle HLA-DRB1 allel frekansı ve DRB1*04 alt tiplerinin dağılımının belirlenmesi amacıyla yapıldı.

Bölgemizdeki RA hastalarında ve kontrol grubunda 13 farklı çeşit HLA-DRB1 alleli belirlenmiş, DRB1 *17 ve *18 allelleri her iki grupta da saptanamamıştır. Allel frekansları yönünden HLA-DRB1 *04 allelinin hastaların % 45'inde taşındığı gözlenmiş, daha sonra HLA-DRB1 *11, DRB1 *13, DRB1 *01, DRB1 *09 ve DRB1 *10 (sırasıyla %21.59, %20.45, %18.18, %14.77 ve %12.5) en sık gözlenen alleller olduğu belirlenmiştir. Sağlıklı kontrol grubunun % 35.53'ünün HLA-DRB1 *11 alleli taşıdığı gözlenmiş, en sık görülen diğer alleller sırasıyla HLA-DRB1 *13, DRB1 *04, DRB1 * 07, DRB1 *15, DRB1 *16 ve DRB1 *14 (sırasıyla %24.36, %29.94, %19.28, %16.75, %14.21 ve %12.69) olarak saptanmıştır. HLA-DRB1 *04 alleli taşıyanların DNA örneklerinden PCR-SSP High resolution yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre; RA hastalarında 8, kontrol grubunda 6 farklı DRB1 *04 alt tipi gözlenmiştir. Hasta grubunda *0401 (%42.50), kontrol grubunda ise, DRB1 *0402 (%55.55) ve *0403 (%16.67) en sık gözlenen predominant alt tipler olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak bölgemizdeki RA hastalarında yaptığımız araştırmanın bulgularının istatistiksel analizinin ışığında; hem taşıyıcılık oranına, hem de allel frekanslarına göre, HLA-DRB1 *01 ($P = 0.009$), DRB1 *04 ($P = 0.011$), *0401 ($P = 0.028$) ve DRB1 *09 ($P = 0.0001$) alleleri RA ile ilişkili bulunmuştur. Kontrol grubunda ise DRB1 *07 ($P = 0.025$), DRB1 *11 ($P = 0.027$), DRB1*0402 ($P = 0.001$) ve *0403 ($P = 0.048$) yüksek bulunmuş “koruyucu allel” olarak kabul edilmiştir. RA hasta ve kontrol grubumuzda allel frekansları Hardy-Weinberg kuralına uyum göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Romatoid arthrit, HLA-DRB1, allel dağılımı, PCR-SSP

SUMMARY

Determining the distribution of HLA-DRB1 allele frequencies and HLA-DRB1 *04 subgroups in RA patients

Rheumatoid arthritis (RA: MIM:180300), created by the interrelationships between the genetic and environmental factors, is a complex and polygenic autoimmune disease. It develops with chronic inflammation and thus causes to peripheral joints and advanced erosive in its surroundings. Appeared in all population around the world, the prevalence of RA varies around 1%-3%, its biogeographic distribution is heterogen and its relations to HLA-DRB1 alleles is not universal. This study is conducted using PCR-SSP methods with DNA samples of 88 RA patients and 197 healthy controls to determine HLA-DRB1 allele frequencies and distribution DRB1 *04 subgroups.

Except HLA-DRB1 *17 and DRB1 *18 alleles in each group, 13 different HLA-DRB1 alleles were determined in all RA patients and control groups. It was observed that 45% of the RA patients has HLA-DRB1 *04 allele frequencies. Other alleles frequently observed in RA patients are DRB1 *11, DRB1 *13, DRB1 *01, DRB1 *09 and DRB1 *10 with the frequencies of 21.59%, 20.45%, 18.18%, 14.77%, and 12.5% respectively. It was also observed that 35.53% of the control groups are HLA-DRB1 *11 allele frequencies. Other alleles frequently observed in control groups with HLA-DRB1 *13, DRB1 *04, DRB1 *07, DRB1 *15, and DRB1 *16 with the frequencies of 24.36%, 29.94%, 19.28%, 16.75%, and 14.21% respectively. We have also investigated RA patients and control groups with HLA-DRB1 *04 subgroups using high resolution PCR-SSP method. Eight different DRB1 *04 subgroups in RA patients and 6 different DRB1 *04 subgroups in control groups were determined. DRB1 *0401 (42.50%) in RA patients, and DRB1 *0402 (55.55%) and DRB1 *0403 (16.67%) in control groups were determined as predominant subgroups.

In conclusion, the statistical analysis conducted in RA patients of our region indicated that HLA-DRB1 *01 ($P=0.009$), DRB1 *04 ($P=0.011$), DRB1 *0401 ($P=0.028$) and DRB1 *09 ($P=0.0001$) alleles are associated with RA in terms of both transmission rate and allele frequencies. In control groups, however, HLA-DRB1 *07 ($P=0.025$), DRB1 *11 ($P=0.027$), DRB1 *0402 ($P=0.028$), and DRB1 *0403 ($P=0.048$) alleles were found to be higher and accepted as protective alleles. Alleles frequencies in RA patients and control groups correspond to the Hardy-Weinberg rule.

Key Words: Rheumatoid arthritis, HLA-DRB1, Allele distribution, PCR-SSP

KAYNAKLAR

1. Nepom GT, HLA and Rheumatoid Arthritis. In HLA in Health and Disease, Eds. Lecher R, Warrens A, Academic Press, London, 2000
2. Schwartz BD: The major histocompatibility complex. Rich RR (ed): Clinical Immunology Principle and Practice. St Louis Missouri Lange Medical, 1996. 95-113.
3. Ali AA, Moatter T, Baig JA, Iqbal A, Hussain A, and Iqbal MP: Polymorphism of HLA-DR and HLA-DQ in rheumatoid arthritis patients and clinical response to methotrexate-a hospital-based study. J Pak Med Assoc. 56(10); 452-6:2006.
4. Ruddy S, Harris ED, Sledge CB. Kelly's Textbook of Rheumatology. 6 th ed London: Saunders WB Company , 2001
5. Gonzalez-Gaz MA, Garcia-Porrúa C, Hajeer AH. Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum 2002 31(6) 355-60
6. Liu SC, Chang Ty, Lee YJ, and et al. Influence of HLA-DRB1 Genes and the Shared Epitope on genetic Susceptibility to Rheumatoid arthritis in Taiwanese. J Rheumatol 2007 Feb 15
7. Auger I, Roudier C, Guis S and et al: HLA-DRB1* 0404 is strongly associated with anti-calpastin antibodies in rheumatoid arthritis Ann Rheum. Dis. 2007 Feb 26.
8. Wilder RL. Rheumatoid Arthritis, Epidemiology, Pathology and Pathogenesis. In: Schumacher RH, eds. Primer on the Rheumatic Diseases. Arthritis Foundation, Atlanta, 1993: 86-89.
9. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M : Immunobiology: The Immune System in Health and Disease Sixth Edition, Pub. Garland Science, New York, 2004
10. Zvaifler NJ: Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Arthritis and Allied Conditions. Onikinci baskı. McCarty DJ, Koopman WJ (eds). Lea and Febiger, Pennsylvania 1993, S: 723-736.

11. Maini RN, Feldmann M: Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. In Maddison P, Isenberg D, Woo P, Glass D (eds). Oxford Textbook of Rheumatology, Oxford University Press p: 983-1004, 1998.
12. Ollier W: Rheumatoid Arthritis and Epstein-Barr virus: a case of living with the enemy? *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 497-499
13. MacGregor AJ, Silman AJ. Classification and epidemiology. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, (eds). *Rheumatology*. Third ed, Spain, Mosby, 757-763, 2003.
14. Cutolo M, Seriolo B, Sulli A, Accardo S: Androgens in rheumatoid arthritis. In: Bjlesma JWJ, Lindan S, Van Der Barnes CG, (eds). *Rheumatology highlights 1995*. *Rheumatol Eur* 1995; 24(s-2): 211-214
15. Toivanen P. Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62: 807-811, 2003.
16. Nepom GT, Nepom B. Genetics of the major histocompatibility complex in rheumatoid arthritis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, (eds). *Rheumatology*. Thirh ed, Spain, Mosby, 811-823, 2003.
17. Mc Grego AJ, Silman AJ: Classification and epidemiology. İkinci baski. Klippel JH, Dieppe PS (eds). Mosby, London 1998, S: 5.2.1-6.
18. Mc Carty DJ. Clinical Picture of Rheumatoid Arthritis. In: Mc carty DJ, Kopman WJ, eds. *Arthritis and Allied Conditions*. Lea and Febiger, Philladelphia, 1993: 781-809.
19. Blackburn WD, Chatham WW Jr. Laboratory findins in rheumatoid arthritis. In: Kopman WJ (ed). *Arthritis and Allied Conditions*. 13th ed, Pennsylvania, Williams and Wilkins, 1089-1102, 1997.
20. Harris ED Jr. Clinical features of rheumatoid arthritis. In: Ruddy S, Harris ED Jr, Sledge JS, (eds). *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Sixth ed, Pennsylvania, W.B.Saunders, 967-1000, 2001.
21. Matteson EL, Extra-articular features of rheumatoid arthritis and systemic involvement. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, eds. *Rheumatology*. Third ed, Spain, Mosby, 781-792, 2003.

22. Bacon PA, Moots RJ. Extra-articular rheumatoid arthritis. In: Kopman WJ (ed). *Arthritis and Allied Conditions*. 13th ed, Pennsylvania, Williams and Wilkins, 1071-1088, 1997.
23. Lundström E, Källberg H, Alfredsson L, et al. Gene-environment interaction between the DRB1 shared epitope and smoking in the risk of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: All alleles are important. *Arthritis Rheum*. 60(6):1597-603. 2009
24. Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. In: *Harrison's principles of internal medicine*. Fauci AS, Braunwald E, (eds). 14th ed, USA, Mc Graw-Hill Companies, 1880-1888, 1998.
25. Schrohenloher RE, Bridges SL, Koopman WJ Jr. Rheumatoid Factor. In: Kopman WJ (ed). *Arthritis and Allied Conditions*. 13th ed, Pennsylvania, Williams and Wilkins, 1109-1130, 1997.
26. Steiner Günter. Autoantibodies in rheumatoid arthritis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, (eds). *Rheumatology*. Third ed, Spain, Mosby, 833-841, 2003.
27. Theodorou DJ, Theodorou SJ, Resnick D. Imaging of rheumatoid arthritis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, (eds). *Rheumatology*. Third ed, Spain, Mosby, 765-780, 2003.
28. Van der Heijde DM, Van Riel PL, Van Leuven MA, et al. Prognostic factors for radiographic damage and Physical disability in early rheumatoid arthritis: a prospective study of 147 patients. *Br J Rheumatol* 31: 519-525, 1992.
29. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis 2002 Update. *Arthritis Rheum* 46: 328-346, 2002.
30. Furst DE, Hilson J. Aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs. In: Koopman WJ (ed). *Arthritis and Allied Conditions*. Philadelphia, Lippincott Williams and Williams, 665-716, 2001.
31. Singh G, Ramey DR, Morfeld D, Shi H, Hatoum HT, Fries JF. Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis: a prospective observational cohort study. *Arch Intern Med* 156: 1530-1536, 1996.

32. Quinn MA, Conaghan PG, Emery P. The therapeutic approach of early intervention for rheumatoid arthritis: what is the evidence?. *Rheumatology* 40:1211-1220, 2001
33. Minaur NJ, Jefferiss C, Bhalla AK, Beresford JN. Methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. I. In vitro effects on cells of the osteoblast lineage. *Rheumatology* 41:735-740, 2002.
34. Bresnihan B. Management of rheumatoid arthritis: synovitis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, (eds). *Rheumatology*. Third ed, Spain, Mosby, 907-913, 2003.
35. Ersoy Y. Metotreksat ve Diğer Sitotoksik İlaçlar. Göksoy T, (ed). *Romatizmal Hastalıkların Tanı ve Tedavisi*, I. Baskı. İstanbul: Yüce yayım, 2002; 907-926.
36. A E van Ede, R F J M Laan, R A De Abreu, A B J Stegeman, L B A van de Putte. Purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 1060-1064.
37. Oguz FS, Kalayoglu S, Diler AS, Tozkir H, Sargin D, Carin M, Dorak MT. HLA system affects the age-at-onset in chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2003 Aug;73(4):256-62.
38. Uçar F., Ovalı E., Değer O., Önder E., Kartı S.S.. MHC gen kompleksi ve HLA doku tiplemesi testlerinin önemi. *İbn-i Sina Tıp Dergisi* 6. 117-124. 2001
39. Qlerup O; Zetterguist H: HLA-DR Typing by PCR amplification with Sequence-Specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: *Tissue Antigens*, 39: 225-235.1992
40. Çarın M: Transplantasyon İmmunolojisi (HLA sistemi) *Klinik gelişim Dergisi* 10 (1-2): 7-11, 1997
41. Sebik F: HLA sistemi. *Aktüel Tıp Dergisi* 3 (2): 86-89, 1998
42. Gürtekin M, Aydın F, Oğuz FS, ; Kemik iliği nakli yapılacak hastaya verici seçilmesinde Karışık lenfosit kültür testi ve genotiplemenin uyumu. *Klinik Gelişim Dergisi*; 10 (1-2): 12-16, 1997
43. Dorak M.T: Major Histocompatibility Complex. HLA review. 10: 1-3. 2002.

44. Trowsdale J. “ Both man & bird & beast” : comparative organization of MHC genes. Immunogenetics review. 41: 1-17, 1995.
45. GruenJ.R, Weissman S.M. Evolving views of the major histocompatibility complex. Blood. 90: 4252-4265, 1997.
46. Snell G.D. Studies in histocompatibility. Science. 213: 172-178, 1981.
47. HLA genleri. 2009 www.anthonylonan.com/hig/list/specs.html
48. Charron D: The HLA Complex in 1998: A challenge in Haematopoietic Transplantation. ISH-EHA(4) Educational Program Book. 17-19 1998.
49. Acar M. Ankilozan Spondilit’li Hastalarda HLA-B27 Antijeninin Alt Tiplerinin Sıklığının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi SÜ SABE Konya, 2005.
50. Marsh SGE, Parham P, Barber LD : The HLA FactsBook, Pub. Academic Press, London, 2000.
51. Satar, G: Psoriasis de HLA. Ç.Ü. Uzmanlık Tezi. 55: 13-21. Adana. 1992.
52. Goulmy E: Minor Histocompatibility Antigens: New concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. Imm Rev 157: 125; 1997.
53. Thompson&Thompson: Tıbbigenetik(çev.kurul) 6.baskı.Güneş Kitabevi, Ankara, 2005, s.176-177.
54. Parham P: The immune system 2e. Garland Science Publishing 2005.
55. Dalva K: Her yerde karşımda: Nedir bu HLA tiplendirimi? XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi özet kitabı, 42-52, Antalya, 2004.
56. Akçam FZ: HLA Sistemi. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 25:829-834. 2005.
57. Hui KM, Bidwell JL: Hand book of HLA typing techniques. London: CRC Press. 1993: 117-148.

58. Bodmer JG, Bodmer WF, Marsh SGE : HLA Nomenclature: The Name of the Rose. In HLA in Health and Disease, Eds. Lecher R, Warrens A, Academic Press, London, 2000.
59. Holber P: Rheumatoid arthritis: history. Rheumatology. İkinci baskı. Klippel JH, Dieppe PS (eds). Mosby, London 1998, S: 5.1.1-4.
60. Mullis, K., Falaona, F.ve Scharf, S: Specific enzymatic amplication of DNA in vitro the polymerase chain reaction, Cold Spring Harbour Symposium of Quantitative Bilology., 51, 263-273, 1986.
61. Rapley, R. ve Walker, J.M. , 1998. Molecular Biomethods Handbook Humana Press, Totowa, New Jersey, U.S.A.
62. Rapley, R. ve Walker, J.M., 2000. The Nucleic Acid Protocol Handbook Humana Press, Totowa, New Jersey, U.S.A
63. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure of extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16:1215, 1988
64. Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.
65. Orozco G, Rueda B, and Martin J: Dossier: Rheumatoid arthritis: Genetic basis of rheumatoid arthritis. Biomedicine & Pharmacotherapy 60: 656–662, 2006
66. Dieude P, Cornelis F: Genetic basis of rheumatoid arthritis Joint Bone Spine 72: 520–526, 2005
67. Harney S, Wordsworth BP: Genetic epidemiology of rheumatoid arthrits. Tissue Antigens 60: 465–473, 2002.
68. Özsoy MH, Altinel L, Başarır K ve ark.:Romatoid Artritte Eklem Hastalığının Patogenezi. TOTBİD: 5 (3-4) ; 101-110, 2006.
69. Kaçar C, Gilgil E, Tuncer T, ve ark: Prevalence of rheumatoid arthritis in Antalya, Turkey. Clin Rheumatol.;24(3):212-4, 2005.

70. Akar S, Birlik M, Gurler O, ve ark: The prevalence of rheumatoid arthritis in an urban population of Izmir-Turkey. Clin Exp Rheumatol.;22(4):416-20, 2004.
71. Akyüz A: Romatoid Artritli Hastalarda Karbonik Anhidraz Otoantikorları ve Antioksidan Enzimler Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi KTÜ SABE Trabzon, 2008.
72. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, and et al: Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Involving HLA-DRB1, PTPN22, and Smoking in Two Subsets of Rheumatoid Arthritis Am. J. Hum. Genet. 80:867–875, 2007.
73. Vittecog O, Lequerre T, Goeb V, and et al: Smoking and inflammatory diseases. Best Practice & Research Clinical Rheumatology : 22,(5): 923–935, 2008.
74. Gough SCL ve Simmonds MJ: The HLA Region and Autoimmun Disease: Associations and Mechanism of Action. Current Genomics, 8: 453-465, 2007.
75. Andersson AK, Li C, ve Brennan FM: Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis.
76. Çalgüneri M: www.medinfo.hacettepe.edu.tr/ders/TR/D3/9/3178.pdf. Romatoid Artitit 21. 05. 2009.
77. Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, et al: Genetics of rheumatoid arthritis: Underlying evidence of ethnic differences. Journal of Autoimmunity 32: 158–162, 2009.
78. Bowes J, Barton A: Recent advances in the genetics of RA susceptibility Rheumatology 47:399–402, 2008.
79. Newton JL, Harney SMJ, Wordsworth BP and et al: A review of MHC genetics of rheumatoid arthritis. Genes and Immunity, 5: 151-157, 2004.
80. Kilding R, Wilson AG: Mapping of a novel susceptibility gene for rheumatoid arthritis in telomeric MHC region. Cytokine, 32: 71-75, 2005.
81. Prat AG, Isaacs JD ve Matthey DL: Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. Best Practice & Research Clinical Rheumatology 23: 37–48, 2009.

82. Weyand CM ve Goronzy JJ: Association of MHC and rheumatoid arthritis HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2: 212–216, 2000.
83. Goeb V, Dieude P, Daveau P, and et al: Contribution of PTPN22 1858T, TNFR2 196R and HLA-shared epitope alleles with rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies to very early rheumatoid arthritis diagnosis. *Rheumatology* , 47:1208–1212, 2008
84. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF and et al: Replication of Putative Candidate-Gene Associations with Rheumatoid Arthritis in 14,000 Samples from North America and Sweden: Association of Susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4, *Am. J. Hum. Genet.* 77:1044–1060, 2005
85. Şahin N, Gündüz F, İnanç N: No association of *PTPN22* gene polymorphism with rheumatoid arthritis in Turkey *Rheumatol Int.* DOI 10.1007/s00296-009-0919-2, 2009.
86. Cruyssen BV, Nuytinck L, Boullart L, and et al: Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*; 46:1792–1795, 2007.
87. Orozco G, Pascual-Salcedo D, Lopez-Nevot MA, and et al: Auto-antibodies, HLA and PTPN22: susceptibility markers for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* ; 1- 4, 2007.
88. Crannay A, Goldstein R, Pham B ve ark: A measure of limited joint motion and deformity correlates with HLA-DRB1 and DQB1 alleles in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58: 703-708, 1999.
89. Farragher TM, Goodson NJ, Naseem H, ve ark: Association of the *HLA-DRB1* Gene With Premature Death, Particularly From Cardiovascular Disease, in Patients With Rheumatoid Arthritis and Inflammatory Polyarthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* : 58(2), 359–369, 2008.
90. Gonzales-Gay MA, Gonzales-Juanatey C, Lopez-Diaz MJ ve ark. HLA-DRB1 and Persistent Chronic Inflammation Contribute to Cardiovascular Events and Cardiovascular Mortality in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* ,57(1), 125–132, 2007.

91. Haydardedeoğlu FE, Tutkak H, Köse K ve ark: Genetic susceptibility to rheumatic heart disease and streptococcal pharyngitis: association with HLA-DR alleles, *Tissue Antigens* 68; 293–296, 2006.
92. Alvarez I, Collado J, Daura X ve ark. The Rheumatoid Arthritis–Associated Allele HLA–DR10 (DRB1*1001) Shares Part of Its Repertoire With HLA–DR1 (DRB1*0101) and HLA–DR4 (DRB*0401) *ARTHRITIS & RHEUMATISM*: 58(6); 1630–1639, 2008.
93. Crilly A, Maiden N, Capel HA ve ark. Genotyping for disease associated HLA DRB1 alleles and the need for early joint surgery in rheumatoid arthritis: a quantitative evaluation. *Ann Rheum Dis* ;58:114–117, 1999.
94. Jun KR, Choi SE, Cha CH ve ark: Meta-analysis of the Association between HLA-DRB1 Allele and Rheumatoid Arthritis Susceptibility in Asian Populations. *J Korean Med Sci*; 22: 973-80, 2007.
95. Hughes LB, Morrison D, Kelly JM ve ark. The HLA-DRB1 Shared Epitope Is Associated With Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in African Americans Through European Genetic Admixture. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*. 58(2); 349–358, 2008.
96. Kim TG, Choi HB, Park SH ve ark: DQCAR 113 and DQCAR 115 in combination with HLA-DRB1 alleles are significant markers of susceptibility to rheumatoid arthritis in the Korean population. *Tissue Antigens* : 54: 552–559, 1999.
97. Lee HS, Lee KW, Song GG ve ark: Increased Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in Koreans Heterozygous for HLA–DRB1*0405 and *0901. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*; 50(11) 3468–3475 , 2004.
98. Yeap SS, Mohd A, Kumar G ve ark: The association between HLA genes and radiological erosions in Malaysian patients with rheumatoid arthritis Autoimmunity; 40(3): 187–190, 2007.
99. Xue Y, Zhang J, Chen YM ve ark: The HLA-DRB1 shared epitope is not associated with antibodies against cyclic citrullinated peptide in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*;37:183–187, 2008.

100. Delgado-Vega AM ve Anaya JM: Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews* 6 , 402–408, 2007.
101. IRSG ve Saruhan-Direskeneli G: Shared Epitope “Homozigosity” is Strongly Associated with RA Patients in Turkey. *British Journal of Rheumatology*; 37; 1126–1128, 1998.
102. Kinikli G, Ateş A, Turgay M ve ark. HLA-DRB1 genes and disease severity in rheumatoid arthritis in Turkey. *Scand J Rheumatol.* 32(5):277-80, 2003.
103. Kapitany A, Zilahi E, Szanto S ve ark: Association of Rheumatoid Arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1051: 263–270, 2005.
104. Salvarani C, Boiardi L, Mantovani V ve ark: HLA-DRB1 alleles associated with polymyalgia rheumatica in northern Italy: correlation with disease severity. *Ann Rheum Dis*; 58:303–308, 1999.
105. Reviron D, Foutrier C, Guist S, ve ark: DRB1 alleles in polymyalgia rheumatica and rheumatoid arthritis in southern France. *European Journal of Immunogenetics* 28, 83–87 2001.
106. Lundström E, Kallberg H, Smolnikova M ve ark: Opposing Effects of HLA-DRB1*13 Alleles on the Risk of Developing Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive and Anti-Citrullinated Protein Antibody-Negative Rheumatoid Arthritis. *Arthritis& Rheumatism* 60(4); 924–930, 2009.

Ö ZGEÇMİŞ

Emel ALEMDAROĞLU, 01.10.1981'de Trabzon'da doğdu. 1998 yılında Affan Kitapçıoğlu lisesinden mezun oldu. 2001-2005 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. 2007 KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.