



**T.C.
GAZ OSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**ANK LOZAN SPONDİLİT HASTALARINDA MAKROFAJ MİGRASYON
NİBEL TÖR FAKTÖRÜ (MIF) GENİNİN -173 G>C POLİMORFİZMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Çevik GÜREL**

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**Danışman
Serbüent Yılmaz**

TOKAT – 2014

**ANK LOZAN SPOND L T HASTALARINDA MAKROFAJ M GRASYON
NH B TÖR FAKTÖRÜ (MIF) GEN N N -173 G>C POL MORF ZM N N
ARA TIRILMASI**

Tezin Kabul Edili Tarihi: / /

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

mzası

Ba kan : Yrd. Doç. Dr. Serbülent Y T

.....

Üye : Doç. Dr. Nevin Karaku

.....

Üye : Yrd. Doç Dr. Aydın RÜSTEMO LU

.....

Bu tez, Gaziosmanpa a Üniversitesi Sa lık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul
edilmi tir.

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. Ömer ATE

Mühür
mza

T.C.

GAZ OSMANPA A ÜN VERS TES

SA LIK B L MLER ENST TÜSÜ MÜDÜRLÜ Ü'NE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunuldu unu, bu kural ve ilkelerin gere i olarak, çalı mada bana ait olmayan tüm veri, dü ünce ve sonuçlara atıf yaptı ımı ve kayna ını gösterdi imi beyan ederim.

(.../.../...)

Tezi Hazırlayan Ö rencinin

Adı ve Soyadı

Çevik GÜREL

mzası

.....

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana; desteğini esirgemeyen, bilgisi ve deneyimleri ile öğrenim sürecime ışık tutan, Danışman Hocam **Yrd. Doç. Dr. Serbülen Yılmaz**'e,

Bu dönem içerisinde, bilimsel katkılarından dolayı **Doç. Dr. Hacı Ömer ATE** , **Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ** ve **Yrd. Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU**'na,

Çalışmamda hasta ve kontrol gruplarının toplanmasında yardımcı olan **Doç. Dr. Ahmet NANIR**'a,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımları ile destek olan **Arş. Gör. Nihan BOZKURT** ve **Arş. Gör. Saime SEZER'E** ve dönem arkadaşlarıma,

Bu günlere ulaşmamda hiç şüphesiz, en büyük pay sahibi olan ve desteklerini hep hissettiğim **Aileme**,

Teşekkür ederim.

TOKAT -2014

Çevik GÜREL

ÖZET

Ankilozan spondilit (AS), genellikle sakroiliak eklem ve aksiyal iskeleti etkileyen kronik, ilerleyici ve inflamatuvar bir hastalıktır. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktörü (MIF) ilk olarak T-lenfositlerinden salınması ve in vitro ortamda makrofajların rastgele göçünü engellemesi ile tanımlanmış mediatör bir proteindir. İnsan *MIF* geni 21. kromozomun q kolu üzerinde yer alır (21q11.2) ve genin regülasyonu promotör bölgesi içerisindeki 2 polimorfik alan tarafından kontrol edilir. Bu alanlardan ilki -794 pozisyonundaki CATT₅₋₈ tekrarlarıdır ve bu tekrarlar transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesinde yer alır. İkinci alan ise -173 (G C) pozisyonundaki tek nükleotit polimorfizmini içerir. Bu polimorfizm bazı romatizmal hastalıklarda promotör aktivitesinin artmasıyla ilişkilidir ve bu aktivite serum MIF düzeyini arttırmaktadır. Bu çalışmada, *MIF* geninin -173 G C polimorfizminin AS hastalığı ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Polikliniğine başvuran 161 AS hastası çalışmaya grubuna dahil edilmiştir. Kontrol grubu AS tanısı konulmamış 194 sağlıklı birey ile oluşturulmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar, *MIF* geninin -173 G C polimorfizmi için genotip ve allel frekansları açısından AS hastası bireyler ile kontrol grubundaki bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ($p>0,05$). Bunun yanı sıra, çalışmamızın bulgularımıza dayanarak elde ettiğimiz diğer bir sonuçta ise; C alleleline sahip olmayan homozigot GG genotipli hastalar ile C alleleline sahip heterozigot GC ve homozigot CC genotipli hastalarının yaş ortalamaları ve hastalık süresi ortalamaları da bakımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu saptadık ($p<0,05$). Buna göre homozigot GG genotipli hastaların yaş ortalaması 38,83 iken GC ve CC genotipli hastaların yaş ortalamalarının 35,57 olduğu saptanmıştır ($p= 0,034$). Hastalık süresi ortalamaları değerlendirilmesinde ise GG genotipli hastaların hastalık süresi ortalamasının 6,56, GC ve CC genotipli hastalarının hastalık süresi ortalamasının 4,80 olduğu ($p= 0,045$) bulunmuştur. Ayrıca her ne kadar istatistiksel olarak bir fark olmasa da hastaların tanı yaş ortalamasının GC ve CC genotipli hastalarda daha düşük olduğu ortaya konmuştur (GG genotipli hastalarda 32,62, GC ve CC genotipli hastalarda 30,73) ($p= 0,208$). Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, C alleli bulundurma hastalığın onumunu hızlandırdığı, hastalık tablosunun daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına neden olduğu veya hastalığın şiddetini artırarak erken yaşlarda tanı konmasına katkıda bulunduğünü düşünebiliriz.

Anahtar kelimeler: Ankilozan Spondilit, *MIF* geni, Polimorfizm

ABSTRACT

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic, progressive and inflammatory disease, usually affecting the sacroiliac joints and the axial skeleton. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a mediator protein that firstly defined with releasing from T-lymphocytes and inhibiting random migration of macrophages in vitro. The Human *MIF* gene lies on q arm of chromosome 21 (22q11.2) and regulation of the gene is organized by the two polymorphic sites in the promoter region. The first site consists of the CATT₅₋₈ repeats at -794 position and the repeats are located within binding site of transcription factors. The second site includes a single nucleotide polymorphism at -173(G C) position. The polymorphism is associated with enhanced promoter activity in some inflammatory-rheumatismal diseases and this activity is increased MIF levels in serum. In this study, the relationship between *MIF* gene -173 G C polymorphism and AS disease was investigated. In this regard, 161 subjects with AS admitted to Gaziosmanpaşa University School of Medicine, Department of Physical Medicine and Rehabilitation, were included in study group. The control group was formed from 194 healthy subjects who were not diagnosed with AS. The results that we obtained show that there were no statistically significant differences for genotype and allele frequencies of *MIF* gene -173 G C polymorphism between AS group and healthy group ($p > 0,05$). In addition to this, based on the findings of this study, we have achieved a different result; there were statistically significant differences for frequencies of the mean age of patients and the mean duration of disease between patients with homozygous GG genotype who haven't C allele and patients with heterozygous GC and homozygous CC who have C allele ($p < 0,05$). According to this, it was determined that the mean age of patients with homozygous GG genotype was 38,83 and mean age of patients with GC and CC genotypes was 35,57 ($p = 0,034$). When mean duration of disease evaluates the mean duration of disease of patients with GG genotype was found 6,56 and the mean duration of disease of patients with GC and CC genotype was found 4,80 ($p = 0,045$). Furthermore, although it was not presented a statistically significant difference, it had shown that the average age at diagnosis of patients was lower in patients with GC and CC genotypes (in patients with GG genotype 32, 62 and in patients with GC and GG genotypes 30,73) ($p = 0,208$). In view of these results, it can be considered that having the C allele could accelerate the onset of disease, cause the disease presentations to be occurred at an earlier age or increase the severity of the disease that could help to diagnose the disease at an early age.

Key Words: Ankylosing Spondylitis, *MIF* gene, Polymorphism

Ç NDEK LER

	Sayfa
ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
Ç NDEK LER.....	iv
TABLO L STES	vi
EK L L STES	vii
KISALTIMA VE S MGE L STES	viii
1. G R VE AMAÇ	1
2. GENEL B LG LER	3
2.1. Ankilozan Spondilit.....	3
2.1.1. Ankilozan Spondilit'in Tarihçesi	4
2.1.2. Ankilozan Spondilit'in Epidemiyolojisi.....	5
2.1.3. Ankilozan Spondilit'in Etiyolojisi	6
2.1.4. Ankilozan Spondilit'in Semptomları ve Belirtileri	6
2.1.5. Ankilozan Spondilit'in Tanı Kriterleri	8
2.1.6. Ankilozan Spondilit'in Geneti i	9
2.2. Makrofaj Migrasyon nhibitör Faktörü	13
2.2.1. MIF Geni ve Proteini.....	13
2.2.2. MIF Geni Polimorfizmler ve Etkileri	15
2.2.3. MIF'in li kili Oldu u Biyolojik Süreçler	16
2.2.3.1. MIF'in p53'ü nhibisyonu	16
2.2.3.2. MIF'in Glikolizi Regülasyonu	16
2.2.3.3. MIF'in Lökosit Göçünü Düzenlemesi.....	17
2.2.3.4. MIF'in AKT Yola ını Uyarması.....	17
2.2.3.5. MIF Aracılı ERK1/ERK2 Yola ının Aktivasyonu	18
2.2.4. MIF'in li kili Oldu u Hastalıklar	19
2.2.4.1. Romatoid Artrit	19
2.2.4.2. Glomerulonefritis	20
2.2.4.3. Atheroskleroz	20
2.2.4.4. Sistematik Lupus Eritematozus	21
2.2.4.5. Obezite ve Diyabet	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Çalışma Grubu.....	23
3.2. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler	25

3.2.1. Alet ve Cihazlar.....	25
3.2.2. Kimyasal Maddeler	25
3.2.3. Çözeltiler	26
3.3. Yöntem	27
3.3.1. Genomik DNA zolasyonu.....	27
3.3.2. DNA'nın Kalitatif Tayini	27
3.3.3. DNA'nın Kantitatif Tayini	28
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tekni i.....	28
3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi	28
3.6. Elektroforez Tekni i	29
3.7. MIF Gen Polimorfizminin Analizi	30
3.7.1. MIF Geni -173 G C Polimorfizmi.....	30
3.7.2. MIF Geni Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi	33
3.8. istatistiksel Yöntemler.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. Demografik ve Klinik Bulgular.....	35
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi Analizleri	36
4.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri	36
4.2.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi Analizi	36
4.3. istatistiksel Bulgular.....	37
5. TARTI MA ve SONUÇ.....	41
6. KAYNAKÇA	48
7. ÖZGEÇM	58

TABLO L STES

Tablo 1.1.:	Spondiloartropatilerin Kar ıla tırılması.....	4
Tablo 1.2.:	AS için Modifiye New York Kriterleri.....	9
Tablo 3.1.:	Hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin ara tırmaya dahil edilme ve edilmeme kriterleri.....	24
Tablo 3.2.:	<i>MIF</i> geninin -173 G C bölgesindeki polimorfizminin analizinde kullanılan primerler.....	30
Tablo 3.3.:	<i>MIF</i> genine ait baz dizisi.....	31
Tablo 3.3.:	<i>MIF</i> geni -173 G C bölgesindeki polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR karı ımı.....	32
Tablo 3.4.:	<i>MIF</i> geni -173 G C bölgesindeki polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR programı.....	33
Tablo 3.5.:	<i>MIF</i> geni -173 G C bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan enzim kesimi ko ulları.....	34
Tablo 4.1.:	Çalı maya dahil edilen AS hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyet ve ya ortalamalarına ait istatistik bulgular.....	35
Tablo 4.2.:	AS hasta grubu ve kontrol grubunun <i>MIF</i> geni genotip ve allel da ılımı..	38
Tablo 4.3.:	AS hastalarında klinik özellikler bakımından <i>MIF</i> geni -173 G>C polimorfizminin genotip da ılımlarının kar ıla tırılması.....	39
Tablo 4.4.:	Homozigot GG genotipli AS hastaları ile C alleleline sahip GC ve CC genotipli AS hastalarının ya , tanı ya ı ve hastalık süresi ortalamaları ile ESR, Schober ve BASDAI testi sonuçlarına ait istatistik bulguların da ılımı.....	40

EK L L STES

ekil 1.1.:	<i>MIF</i> Geninin Yapısı.....	13
ekil 1.2.:	<i>MIF</i> protein yapısı.....	15
ekil 4.1.:	<i>MIF</i> -173 G C polimorfizmini içeren 365 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	37
ekil 4.2.:	<i>MIF</i> -173 G C polimorfizmini içeren 365 bç'lik PZR ürünlerinin <i>Alu I</i> enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan kesim ürünlerinin % 3'lük olarak hazırlanmış jeldeki görüntüsü.....	38

KISALTMA VE S MGE L STES

A	:	Adenin
Alu	:	<i>Arthrobacter luteus</i>
AP	:	Aktive Edici Protein
AS	:	Ankilozan Spondilit
bç	:	Baz Çifti
C	:	Sitozin
°C	:	Santigrad Derece
CXCR2	:	Kemokin Reseptörü 2
CXCR4	:	Kemokin Reseptörü 4
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	:	Etilendiamintetra Asetik Asit
ER	:	Endoplazmik Retikulum
ERAP	:	Endoplazmik Retikulum Aminopeptidaz
ERK	:	Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz (Extracellular Signal Regulated Kinase)
EtBr	:	Etidyum Bromür
G	:	Guanin
GN	:	Glomerulonefritis
gr	:	Gram
HCl	:	Hidroklorik Asit
HLA	:	nsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
IL	:	nterlökin
kb	:	Kilobaz

kDa	:	Kilodalton
M	:	Molar
MAPK	:	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
MgCl₂	:	Magnezyum Klorür
MHC	:	Major Histokompatibilite Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
MIF	:	Makrofaj Migrasyon inhibitör Faktörü (Macrophage Migration Inhibitory Factor)
ml	:	Mililitre
µl	:	Mikrolitre
MMPs	:	Matriks Metalloproteinazlar (Matrix Metalloproteinases)
n	:	Birey Sayısı
NaOH	:	Sodyum Klorür
NO	:	Nitrik Oksit
NRDS	:	Yenido an Solunum Zorlu u (Neonatal Respiratory Distress Syndrom)
P	:	statistiksel Anlamlılık De eri
p53	:	Tümör protein 53
PLA	:	Fosfolipaz A (Phospholipase A)
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RA	:	Romatooid Artrit
RFLP	:	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
rMIF	:	Rekombinant MIF
RNA	:	Ribonükleik Asit
SLE	:	Sistemik Lupus Eritematozus (Systemic Lupus Erythematosus)

SNP	:	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
SP	:	Spesifikle tirici Protein
SpAs	:	Spondiloartropatiler (Spondyloarthropathies)
TBE	:	Tris Borat Edta
TGF	:	Trasforme Edici Büyüme Faktörü (Trasforming Growth Factor)
TNF	:	Tümör Nekrozis Faktör
U	:	Ünite
UV	:	Ultraviole I ık
V	:	Volt
t²	:	Ki-kare Analizi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ankilozan Spondilit (AS), aksiyel iskelet inflamasyonu ve entezis gibi klinik bulgular ile karakterize edilen kronik inflamatuvar bir hastalıktır [1]. AS; Reither Sendromu (Reaktif Artrit), Psöriatik Artrit ve İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı ile birlikte Spondiloartropatiler (SpAs) olarak bilinen romatizmal hastalıklar grubuna dahildir. Bu hastalık grubu, diğer romatizmal hastalıklardan farklı olarak sadece eklemeleri değil aynı zamanda göz, bağırsak, ürogenital organlar ve kalp gibi organları da tutabilir [2,3].

AS'nin gelişiminde genetik faktörlerin önemli bir rol oynadığı monozigotik ve dizigotik ikizlerde yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur [4]. İnsan lökosit antijeni (HLA)-B27; 6. kromozom üzerinde kodlanan bir Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) Sınıf I molekülüdür ve AS ile ilişkisi kesin olarak kanıtlanmıştır [5]. Ayrıca son çalışmalarda Endoplazmik Retikulum Aminopeptidaz I (ERAP1) ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α) genlerinin AS ile ilişkisi saptanmıştır [1,6].

Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktörü (MIF) ilk olarak 1966 yılında T lenfositlerinden salınan ve in vitro ortamda makrofajların rastgele göçünü inhibe etmesi ile tanımlanmış, sitokin, hormon ve enzim özelliklerine sahip mediyatör bir proteindir [7,8]. *MIF* geni, insanlarda 22. kromozomun q kolu üzerinde (22q11.2) lokalize olmuş, 94 ve 188 baz çiftlik iki intron ile ayrılmış; 66, 107 ve 172 baz çiftlik 3 eksone sahip 1 kilobazdan küçük bir gendir [9]. *MIF* genindeki iki polimorfizm, inflamatuvar hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan ilki, 5' bölgesine komşu olan -173 pozisyonundaki, guanin (G) bazından sitozin (C) bazına değişimi içeren tek nükleotid polimorfizmi (SNP)'dir. Diğeri ise CATT mikrosatellit bölgesi içerisindeki -794 pozisyonundaki kısa tandem tekrar polimorfizmi (STRP)'dir [10,11,12]. Donn ve arkadaşları [13], 117 beyaz Juvenil İdiopatik Artrit (JIA) hastası ve 172 sağlıklı beyaz bireyi içeren araştırmada -173CC genotipinin hastalarda sağlıklı bireylere oranla daha çok gözlemlendiğini bulmuştur. Bu bulgudan yola çıkarak araştırmacılar bu polimorfizmin, hastalığın oluşum riskini arttırdığını saptamışlardır. Aynı çalışmada araştırmacılar -173 G>C polimorfizminin aktivatör bir transkripsiyon faktörü olan protein 4 (AP-4) için bağlanma bölgesi oluşturduğunu bulmuşlardır. Bu değişiminse *MIF* geni ifadesinin değişimine neden olabileceğini öne sürmüşlerdir [13]. 2012 yılında ise Zheng ve arkadaşları [14], *MIF* geninin -173 G>C (rs755622) ve -794 CATT₅₋₈ (rs2096525) polimorfizmlerinin kronik

inflatuar bir hastalık olan Behçet Hastalığı ile ilişkisini araştıran bir çalışma yapmıştır ve -173 pozisyonunda C alleli (polimorfik allel) bulunduranların sayısında kontrol grubundaki sağlıklı bireylere göre artış olduğunu ortaya koymuşlardır. Yine aynı çalışmada CC genotipli bireylerin GG genotipli bireylerden 1,92 kat, GC genotipli bireylere göre 1,78 kat daha çok *MIF* mRNA'sı eksprese ettikleri ortaya konulmuştur. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar bu polimorfizmin *MIF* geninin mRNA ekspresyonunu etkilemek suretiyle Behçet Hastalığı'nın oluşumunda rol oynadığını öne sürmüşlerdir [14]. Bu çalışmalara ek olarak, yine inflamatuvar hastalıklar olan; Romatoid Artrit, Yetişkin Still Hastalığı ve Multiple Skleroz'da *MIF* geninin -173 G>C ve -794 CATT₅₋₈ polimorfizmleri araştırılmış ve hastalıklar ile polimorfizmler arasındaki ilişki ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, yaptığımız Türk ve Dünya literatürü taramasında, yukarıda bahsedilen hastalıklar gibi inflamatuvar bir hastalık olan AS ile *MIF* geni polimorfizmlerinin ilişkisini açıklamaya yönelik hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada amaç *MIF* geninin -173 G>C polimorfizmi ile inflamatuvar bir hastalık olan AS arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ANKİLOZAN SPONDİLİT

Ankilozan spondilit (AS), genellikle sakroiliak eklem ve aksiyal iskeleti etkileyen, sinovial sıvının inflamasyonu ile karakterize, başlıca belirtileri şiddetli bel ağrısı, bel tutkunluğu ve hareket güçlüğü olan, kronik, ilerleyici ve inflamatuvar bir hastalıktır [2,3].

AS; Spondiloartropatiler (SpAs) olarak bilinen romatizmal hastalıklar grubuna dahildir ve bu hastalıklar grubunun prototipi olarak bilinir. Spondiloartropatiler grubuna AS dışında, Reither Sendromu (Reaktif Artrit), Psöriatik Artrit ve İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı gibi hastalıklarda dahil edilir [2,3] .

Spondiloartropatiler, başlıca: **entezitis** (tendonların, ligamentlerin ve eklem kapsüllerinin kemiğe yapışma yerindeki inflamasyon), **aksiyal iskeletin inflamasyonu** (sakroiliak eklemler ve omurga) ve periferik eklemlerde **oligoartrit** ile karakterizedir. Ayrıca, bu hastalık grubu, diğer romatizmal hastalıklardan farklı olarak sadece eklemleri değil aynı zamanda göz, bağırsak, ürogenital organlar ve kalp gibi organları da tutabilir [2,3].

AS, aort yetmezliği, kardiyak iletim defekti, akciğer üst loblarının fibrozisi ve renal defektler gibi eklem dışı organ tutumları ile seyredebilir [2,3].

Spondiloartropatiler grubundaki hastalıklar, benzer özellikler taşımalarına rağmen, birini diğerinden ayıracak epidemiyolojik ve klinik özelliklere sahiptir. Spondiloartropatilerin ortak ve farklı özellikleri Tablo 1.1.'de verilmiştir [2,3].

Tablo 1.1. Spondiloartropatilerin Karşılaştırılması

Özellik	Ankilozan Spondilit	Reaktif Artrit	Psöriatik Artrit
Cinsiyet	Erkeklerde daha fazla	Erkek=Kadın	Kadında Daha Fazla
Başlangıç Yaşı	20-30 yaş arası	Herhangi Bir Yaş	Herhangi Bir Yaş
Başlangıç	Kronik (Tedrici)	Ani	Değişken
HLA-B27 (%)	> %90	%50-80	%20-50
Sakroileit	Daima	Sıklıkla	Sıklıkla
Periferik Eklem Tutumu	Genellikle Alt Ekstremitelerde	Genellikle Alt Ekstremitelerde	Genellikle Alt Ekstremitelerde
Entezitis	Var	Var	Var
Uveitis	Sık	Nadir	Nadir
Cilt Hastalığı	Görülmez	Nadir	Çok sık

2.1.1 Ankilozan Spondilit'in Tarihçesi

AS ilk kez 1691'de Bernard Connor isimli bir İrlanda'lı tarafından Fransız mezarlığından çıkartılan bir ankiloze iskelet ile tanımlanmıştır. 1850'de Bordie " ara sıra göz akıntısı olan ve ankiloze iskelete sahip 31 yaşında bir erkek hasta" tanımlamıştır. Omurga radyografisi tekniklerinin gelişmesi ile 1930'larda Krebs, Scott ve Forestier tarafından sakroileit tanımlanmıştır [15,16]. 1931'de Buckley 60 serilik olgusu ile AS hastalığını derlemiştir. 1960 ve 1970'li yıllarda epidemiyolojik ve aile çalışmaları ile AS, reaktif artrit, psöriatik artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalığı arasındaki ilişki Moll, Haslock, Macrae ve Wright tarafından gösterilerek "seronegatif spondiloartropatiler" tanımı ortaya atılmıştır. 1961 Roma ve sonrasında 1966'da New York, AS tanı kri-

terleri geliştirilmiştir. 1973 yılında Brewerton ve Schlosstein ise HLA-B27 antijeni ile hastalık arasındaki ilişkiyi göstermiştir [17].

2.1.2. Anklozan Spondilit'in Epidemiyolojisi

Hastalığın prevalansı; İnsan lökosit antijen-B27 (HLA-B27) pozitifliği, coğrafya, ırk/etnisite ve cinsiyete göre değişiklik gösterir.

Populasyondaki HLA-B27 dağılımı ile populasyondaki AS'li hasta sayısı paraleldir ve HLA-B27 pozitif olan kişilerde hastalık daha sık gözlenir. HLA-B27 pozitifliği genel dünya populasyonunda sadece %8 civarındayken AS'li beyaz populasyonda % 80-95 arasındadır [4].

HLA-B27 sıklığı ile bağlantılı olarak AS görülme olasılığı siyah ırka göre beyaz ırkta daha yüksektir. Bununla birlikte HLA-B27 yaygınlığı yüksek olan Kızılderililer de AS sık görülür, oysa HLA-B27 gen sıklığı azaldıkça hastalık, sırasıyla, Amerikalı siyahlarda daha nadir görülmekte ve bu oran Afrikalı siyahlarda daha da düşmektedir [3].

AS'in İngiltere'de görülme sıklığı % 0,2-0,5 arasında değişirken Amerika'da bu oran % 0,1, Almanya'da % 0,55 olarak saptanmıştır [18]. Türkiye'de ise İzmir'in Balçova ve Narlıdere ilçelerinden seçilen 20 yaş ve üzeri 2835 kişide yapılan bir çalışmada AS prevalansı % 0,49 olarak kaydedilmiştir [19].

Hastalığın cinsiyete bağlı prevalansında ise erkek/kadın oranı 3:1 olarak saptanmıştır. Hastalığın başlama yaşı erken adolesan dönemden geç yetişkinlik çağına kadar uzanabilir. Hastaların %80'inde 30 yaşından önce (genellikle 28-30 yaşları arasında) ilk semptomlar gelişir ve %5'ten daha az hastada semptomlar 40 yaşın üzerinde ortaya çıkar. Bununla birlikte 40 yaşın üzerinde semptomların görülmesi nadirdir [2,3].

2.1.3. Ankilozan Spondilit'in Etiyolojisi

AS'in, etiyojisi tam olarak anlaşılamamıştır fakat hastalığın HLA-B27 ile olan güçlü ilişkisi, hastalığın, genetik yatkınlığı olan kişilerde tetikleyici çevresel faktörlere karşı geliştirilen immün yanıtın bir sonucu olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir [20]. HLA-B27 ile spondiloartropatiler arasındaki ilişkiyi açıklamaya çalışan bir hipotez HLA-B27'nin bazı infeksiyöz antijenlere olan benzerliği nedeniyle immün cevabı tetiklediğini öne sürerken bir diğeri ise, HLA-B27 ile bağlanan antijenlerin sinovial sıvılar içerisine taşındığını ve immün cevabı tetiklediğini öne sürer [2].

Hastalığın oluşumunda bakterilerin spesifik bir rol oynadığı düşünölmekle birlikte, insanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *Salmonella* ve *Campylobacter* gibi mikroorganizmaların genetik yatkınlığı olan kişilerde eklem semptomları ve entezitise yol açabildiği gösterilmiştir. AS'li monozigot ikizlerin, sağlıklı ikizler ile karşılaştırılmasında; *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ve *Candida albicans*'a karşı hücrese hiperaktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca hastaların çoğunda bağırsak inflamasyonunun olması ve hastaların sülfosalazinden yarar görmeleri enterik bir patojenin tetikleyici bir unsur olabileceğini düşündürmektedir [16,17]. Ayrıca AS hastalarının sakroiliak eklem biyopsilerinde gözlemlenen; T hücreleri, makrofajlar, transforming growth faktör beta (TGF- β) ve yüksek düzeyde tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), bir mikroorganizmanın hastalığı tetiklediği görüşünü desteklemektedir [17].

2.1.4. Ankilozan Spondilit'in Semptomları ve Belirtileri

AS'nin tipik belirleyici semptomu sakroilitise bağlı sinsi başlangıçlı inflamatuvar bel ağrısıdır. Ağrı künt ve lomber bölgede lokalizedir, ancak bazı hastalarda derin ve değişken kalça ağrısı da görülür. Hareket yeteneğinin kısıtlanması ve omurga boyunca

tutukluk hissi hastalığın diğere önemli belirtilerindendir. Omurga boyunca oluşan tutukluk hissinin temel nedeni spondilitis yani omurga iltihabıdır. Bu yönüyle AS sadece servikal bölgeyi etkileyen romatoid artrit (RA) ayrılır [2,3] .

AS'li hastaların yaklaşık üçte birinde tipik olarak monoartrit veya asimetrik oligoartrit şeklinde periferal artrit gelişir ve sıklıkla alt ekstremitelerin büyük eklemlerini tutar. Pelvis çevresindeki tendon, ligament ve eklem kapsülleri gibi yapışma yerlerinin inflamasyonu (entezitis) siktir ve radyografilerde bu bağlantı yerlerinde “saçaklanma” görünümü vardır. Aşil tendiniti reaktif artritteki kadar sık görülmemekle birlikte çift veya tek taraflı topuk ağrısına neden olur [2] .

AS'nin en çok görülen eklem dışı belirtisi akut anterior uveitistir ve hastaların yaklaşık üçte birinde görülür. Göz ağrısı, fotofobi ve bulanık görme haberci belirtilerdir. Anterior uveitis, AS'in gelişiminden yıllar önce görülebilir ve anterior uveitis inflamatuvar bel ağrısı ve diğere belirtiler ile birlikte AS'li bir hastanın teşhisinde yararlı bir ipucudur. Anterior uveitis HLA-B27 ile kuvvetle ilişkilidir [2,3].

AS'li hastaların çoğunda ince ve kalın bağırsak biyopsi örneklerinde inflamasyonun histolojik kalıntıları vardır. İletim anomalileri ve miyokardiyal hastalıklar şeklinde kardiyak tutulum AS'li hastaların yaklaşık %10'unda görülür ve uveitis gibi HLA-B27 ile kuvvetle ilişkilidir. En çok görülen kardiyak problem olan aortik regürjitasyon prevelansı hastalığın süresi ile birlikte artar, ancak hastalığın başlangıcından sonra bile < % 10'dur [2].

Entezitis veya kemik füzyonu nedeni ile göğüs duvarının hareketinin kısıtlanması sıklıkla pulmoner fonksiyonda hafif bozulmaya neden olur. Diğere bir pulmoner olguda apikal fibrozistir ki bu radyografik olarak tüberküloz reaktivasyonuna benzer ve bak-

terial veya fungal infeksiyonların tuttuğu alanlarda olabilir. AS hastalarında çok nadir olarak renal defektler ve geç sekonder amiloidozis gelişimi vardır [2,3].

Tüm bu semptom ve belirtilerin yanında ilerlemiş AS, hastanın fiziksel görünümünde değişiklikler meydana getirir. İlerleyen hastalıkla birlikte kişide kötü postür oluşumu çok net şekilde görülür [2,3].

2.1.5. Ankilozan Spondilit'in Tanı Kriterleri

AS tanısında en önemli ipuçları öyküden elde edilir. Bel ağrısının gece uykusundan hastayı uyandırması, 30 dakikadan fazla süren sabah tutkunluğu, egzersiz ile ağrının azalması, ağrının 35 yaşından önce başlaması ve kronikleşme eğilimi tanıda önemlidir. Klinik belirti ve bulguları patognomik olmayan hastalarda, gecikmeden tanı konulmasının yanı sıra farklı merkezlerde değerlendirilen hastalara standart bir yaklaşımla tanı konulmasını sağlamak amacıyla tanı kriterleri oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla AS için ilk olarak 1961 yılında Roma Tanı Kriterleri ve takiben 1966 yılında New York Tanı Kriterleri geliştirilmiş ve daha sonrasında bu kriterlerin seçiciliğinin artırılması için bazı revizyonlar yapılmıştır [15]. Nihayetinde, 1984'te bugün de sıklıkla kullanılan Modifiye New York Kriterleri geliştirilmiştir. Modifiye New York Kriterleri Tablo 1.2.'de verilmiştir [15,21].

Tablo 1.2. AS için Modifiye New York Kriterleri

MODİFİYE NEW YORK KRİTERLERİ 1984
1. En az 3 aydır var olan, egzersiz ile düzeliyor istirahat ile azalmayan bel ağrısı.
2. Lomber omurganın sagittal ve frontal düzlemlerde hareket kısıtlılığı
3. Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinsiyete göre normal değerinin altında olması
4. a. Evre 3-4 unilateral sakroileit
b. Evre 2-4 bilateral sakroileit

Modifiye New York Kriterleri'ne göre; klinik belirtilerden herhangi birisi ile birlikte unilateral evre 3-4 veya bilateral evre 2-4 sakroileit varlığı ile kesin AS tanısı konulur. Üç klinik kriterin mevcut olması ya da hiçbir kriter var olmaksızın radyolojik kriterlerin (unilateral evre 3-4 veya bilateral evre 2-4) tespit edilmesi ise olası AS tanısına işaret eder [15]. Bu kriterlerin hiçbirisi erken tanıda yol gösterici değildir sadece hastalığın sınıflandırılmasında yardımcıdır. Etiyolojisi tam belli olmayan tüm hastalıklar gibi AS tanısı da klinik özelliklere göre konulur. Eşlik eden hastalık yoksa idiopatik veya primer ya da psöriasis ve kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı ile birlikteyse sekonder olarak tanımlanır [15,17].

2.1.6. Ankilozan Spondilit'in Genetiği

AS'nin yüksek derecede kalıtsal olduğu ve bu hastalığa yakalanma riskinin %90'dan fazla genetik faktörlerce tetiklendiği monozigotik ve dizigotik ikizler ile yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur [4].

AS patogeneğinde çok sayıda HLA ve HLA dışı genler araştırılmıştır ve AS için en önemli predispozan genin HLA-B27 olduğu gösterilmiştir [22]. HLA-B27 6. kromozom üzerinde kodlanan, Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC) Sınıf I antijenidir

[5]. Çekirdekli tüm hücrelerin yüzeyinde bulunan MHC Sınıf I moleküllerinin görevi, sitoplazmik proteoliz ile oluşmuş peptitleri immün sistemde görevli olan T hücrelerine sunmaktır [15].

Günümüze kadar HLA-B27'nin, HLA-B*2701 ile HLA-B*2725 arasında isimlendirilmiş 24 alt tipi belirlenmiştir. Bu alt tiplerde saptanmış polimorfizmlerin çoğunun, B27 peptit bağlanma bölgesinin alfa-1 ve alfa-2 domainlerini kodlayan ekson 2 ve ekson 3 içerisinde meydana geldiği bilinmektedir. Farklı populasyonlardaki AS hastalarında yapılan çalışmalarda, HLA-B*2701, B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2705, B*2706, B*2707, B*2708, B*2709, B*2710, B*2714, B*2715 ve B*2719'un hastalık ile ilişkisi rapor edilmiştir. Hastalık ile ilişkisi en fazla olan alt tip HLA-B*2705'tir. Bununla birlikte HLA-B*2709'un hastalıkla bir ilişkisi bugüne kadar rapor edilmemiştir [6].

HLA-B27'nin AS ile ilişkisini açıklamak için birkaç hipotez ortaya atılmakla birlikte en çok kabul gören görüş “ **artritogenik peptit**” teorisi dir. Bu teoriye göre; bazı patojen peptitler ile vücudun bazı dokularına ait peptitler arasında benzerlikler vardır. Patojen peptitler HLA-B27 tarafından ilgili T hücrelerine sunulduğunda oluşturulan immün yanıt, patojen peptitler ile benzer yapıdaki vücut doku peptitlerini de etkiler [23,24].

AS hastalığının tanısında genetik belirteç olarak kullanılan HLA-B27, genel populasyonda %8 oranında gözlenirken, beyaz AS hastalarında %80-95 oranında gözlenir [4]. Yapılan ikiz çalışmalarında konkordans oranı; monozigotik ikizlerde %50-75 oranında, dizigotik ikizlerde ise % 12,5-15 oranında bulunmuştur [25]. Bunun dışında HLA-B27 pozitif sağlıklı bireylerde hastalığa yakalanma riski %1,3 olarak bildirilmiştir, fakat ek olarak birinci derece akrabalarında AS hastası olanlarda bu oran %15-21

oranına yükselmektedir [26]. Ayrıca MHC genlerinden B27 dışında, B60'nun beyazlarda, B39'un ise Japonlarda AS hastalığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur [27]. İkiz ve aile çalışmalarına dayanılarak oluşturulan bu modellerde, HLA-B27'nin AS gelişimindeki genetik riskin yaklaşık %16'sından sorumlu olduğu saptanmıştır [4]. Bütün bunlar göz önünde bulundurulursa, AS oluşumunda oligogenik bir katkı ve genler arasındaki bir çok aktif etkileşimin olduğu düşünülebilir [25]. Yani başka bir deyişle AS için tanımlanması gereken başka genetik faktörler de olabilir.

Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α), çok güçlü pro-inflamatuar bir moleküldür ve bir inflamasyon ya da doku yaralanması sonucu uyarılan immün sistemin önemli bir sinyal bileşenidir [29]. Bu molekülün AS ve Romatoid Artrit (RA) hastalarında yüksek konsantrasyonda mevcut olduğu bilinmektedir. TNF- α 'nın bu hastalıklardaki rolü özellikler AS hastalarında anti-TNF- α ilaçları ile yapılan tedavinin başarısı ile ortaya konulmuştur [29-35]. Bu nedenle anti-TNF- α ilaç tedavisi, geçen son 10 yılda AS hastalığının tedavisinde standart bir tedavi yöntemi olarak kabul görmeye başlamıştır [35].

TNF- α geni birkaç tek nükleotid polimorfizmi (SNPs) içerir ki bunlardan en fazla çalışılmış olanları promotor bölgesi içerisinde bulunan -308 A/G (rs1800629) ve -238 A/G (rs361525) SNP'leridir. -308 A/G ve -238 A/G değişimlerinin otoimmün hastalıklara yatkınlık ile ilişkili olduğu görülmektedir. TNF- α 'nın promotor bölgesindeki -1031 (rs1799964), -863 (rs1800630), -857 (rs 1799724) ve -238 (rs361525) SNP'leri ise AS ile ilişkilendirilmiştir [36]. Ancak bazı çelişkili sonuçlar da vardır. Çünkü birkaç çalışmada TNF- α 'nın A aleli ve AA genotipi, AS ile ilişkili bulunmuş olmasına rağmen başka birkaç çalışmada TNF- α 'nın -238 ve -308 polimorfizmlerinin AS ile ilişkisi bulunamamıştır [28,29].

TNF- α polimorfizmleri ile anti-TNF- α ilaçları arasındaki ilişkiyi inceleyen İsveçli bir grup AS ve RA'lı hastalardan; G/G genotipine sahip olanların anti-TNF- α tedavisine yüksek derecede duyarlı olduğunu, ancak -308 A/G genotipine sahip olanların orta derecede duyarlı olduğunu ve A/A genotipine sahip olanların ise tedaviye cevap vermediğini bildirmiştir [36]. Bu sonuçlara dayanarak TNF- α polimorfizmlerinin AS tedavisinde kullanılan anti-TNF- α ilaçlarına cevap vermede önemli olduğu iddia edilebilir.

Endoplazmik Retikulum Aminopeptidaz I (ERAPI) MHC Sınıf 1 ligandlarının endoplazmik retikulum (ER) içerisindeki olgunlaştırma işlemi ile MHC Sınıf 1 proteinlerinin stabilite ve immünolojik özelliklerinin üzerine önemli etkiye sahip multifaktöryel bir enzimdir. ERAPI genindeki polimorfizmler HLA-B27 pozitif bireylerde AS ile ilişkilidir [37, 38].

ERAPI geni polimorfizmleri ile AS arasındaki ilişki ilk olarak 2007 yılındaki Wellcome Trust Case-Control Consortium ve Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (WTCCC/TASC) tarafından ortaya konmuştur. ERAPI, AS ile ilişkisi kesin olarak gösterilmiş olan ilk MHC dışı gendir. Bu çalışmada, AS hastalarında ERAPI rs30187 ve rs27044 SNP'lerinin minör alel sıklığının kontrol grubundaki hastalara göre oldukça yüksek olduğu ve bu varyantların hastalığın oluşumuna yol açtığı, nüfus çalışmalarıyla tekrar tekrar ortaya konmuştur. Aynı zamanda bu çalışma ERAP I gen bölgesinin, hastalığın oluşumunda en büyük risk faktörü olarak kabul edilen HLA-B27 gen bölgesinden sonra, hastalıkla ilişkisi en fazla olan ikinci gen bölgesi olduğunu ortaya koymuştur [39]. Hastalığın oluşumunu inceleyen başka bir araştırma, ERAPI polimorfizmlerinin hastalığın oluşumuna katkısının sadece HLA-B27 yönünden pozitif

kişilerde ortaya çıktığını bulmuştur [37]. Bu da hastalığın oligogenik ve genler arası aktif etkileşim ile ortaya çıktığının bir kanıtı olarak kabul edilebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda “İnterlökin 23 Reseptörü geninin de AS’nin patogenezinde rol oynadığı saptanmıştır [1].

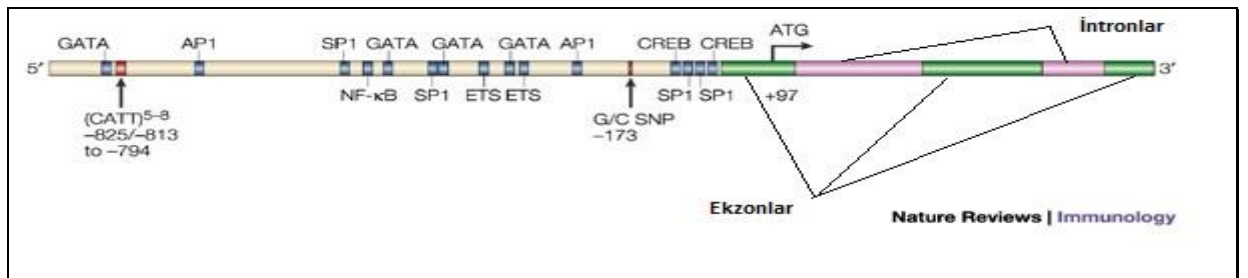
2.2 MAKROFAJ MİGRASYON İNHİBİTÖR FAKTÖRÜ (MIF)

Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktörü (MIF), ilk olarak 1966 yılında T lenfositlerinden salınan ve in vitro ortamda makrofajların rastgele göçünü inhibe etmesi ile tanımlanmış, sitokin, hormon ve enzim özelliklerine sahip moleküler ağırlığı 12,5 kDa olan ve 115 aminoasitten oluşan mediyatör bir proteindir [7,8].

2.2.1 MIF Geni ve Proteini

MIF geni, insanlarda 22. kromozomun q kolu üzerinde (22q11.2) lokalize olmuş, 94 ve 188 baz çiftlik iki intron ile ayrılmış; 66, 107 ve 172 baz çiftlik 3 eksona sahip 1 kilobazdan küçük bir genidir [9].

MIF geninin 5’ promotor bölgesi; aktiveleştirici protein I (AP-I), nükleer faktör κB (NF-κB) ve spesifikleştirici protein I (SP-I) gibi *MIF* geninin regülasyonunda görevli çeşitli transkripsiyon faktörleri için DNA’ya bağlanma bölgeleri içerir [40]. *MIF* geninin yapısı Şekil 1.1.’de verilmiştir.



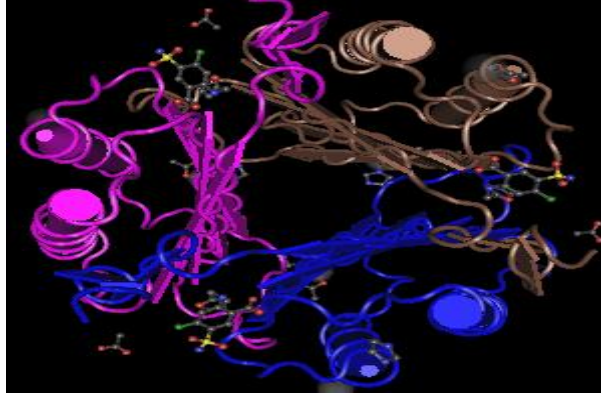
Şekil 1.1. *MIF* Geninin Yapısı

İnsan *MIF* geninin kayda değer özelliklerinden bir tanesi 5' promotor bölgesi içerisinde 4 nükleotidlik CATT mikrosatellit tekrarlarının olmasıdır [41]. Bu tetranükleotidlik tekrar dizileri, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesi üzerinde uzanır. Hem model organizmalar hem de insanlar ile yapılan çalışmalar CATT mikrosatellit tekrarı sayısının *MIF*'in ekspresyon miktarının artışıyla doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [41].

MIF transkripsiyonu, birçok hücre tipinde proinflamasyon, glukokortikoid ve genin 5' promotor bölgesinde bulunan transkripsiyondan sorumlu elementler üzerine etki eden hipoksi sinyaller ile regüle edilir [42].

1996'da yapılan bir çalışma ile *MIF* proteininin kristal yapısı ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmaya göre *MIF* proteini 115 aminoasitten oluşan homotrimer yapısındadır. Homotrimeri oluşturan her bir *MIF* monomeri α -heliks ve β -kırmalı tabakalar halinde düzenlenmiştir [9, 21]. Üç β -kırmalı tabaka ile altı α -heliks tabakası homotrimerin merkezinde çapraz bağlantılı bir kanal ile dairesel bir protein oluşturur. *MIF* proteininin yapısı Şekil 1.2'de verilmiştir.

MIF homotrimeri, hidrojen bağlarının etkileşimi ile stabilize edilir ki bu hidrojen bağları α -helikslerden bir tanesi ile karboksi ucu arasında oluşan hidrojen bağlarının yanı sıra monomerler içerisindeki β -kırmalı tabakalar arasında oluşan hidrojen bağlarıdır. Proteinin lösin rezidülerinin büyük bölümünü içeren hidrofobik çekirdek de stabilizasyona katkı sağlar [9, 21].



Şekil 1.2. MIF protein yapısı (Pubmed 2011)

MIF proteini, T ve B lenfositleri, kan dendritik hücreleri, eozinofiller, nötrofiller ve mast hücreleri gibi immün yanıtta görevli olan hücrelerin yanı sıra bir çok organın epitelyum hücrelerinde, pankreatik β hücreleri, kardiyak miyositler, karaciğer, kalp ve böbrek parankimal hücreleri tarafından üretilir [43-46].

2.2.2. *MIF* Geni Polimorfizmleri ve Etkileri

MIF'in, glukokortikoidlerin immün sistemi baskılayıcı etkisine karşı bir regülatör olarak davranması ve immün sistem üzerine aktive edici özellikleri nedeniyle oto-immün-inflamatuar hastalıklara yatkınlıkla ilişkili bir gen olduğu düşünülmüştür [47]. Bunun yanı sıra *MIF* geninin promotor bölgesi içerisinde yer alan, -173 pozisyonundaki tek nükleotid polimorfizminin ve -794 pozisyonundaki CATT tetranükleotid mikrosatellit dizisindeki polimorfizmin bulunması inflamatuvar hastalıklar içerisinde bu polimorfizmlerin araştırılması gerekliliğini doğurmuştur [48]. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, polimorfizmlerin transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgesi oluşturduğu, *MIF* geninin mRNA ekspresyonunu etkileyerek plazma MIF seviyesini etkilediği ve inflamasyon oluşumunu tetikleyerek hastalıkların oluşumunda rol oynadıkları bulunmuştur [13, 14].

2.2.3 MIF'in İlişkili Olduğu Biyolojik Süreçler

2.2.3.1 MIF'in p53'ü İhhibisyonu

p53; hücre çoğalmasının negatif kontrolü, genomik stabilitenin devamlılığı ve tümör oluşumunun baskılanmasında kilit rol oynayan bir proteindir. p53 hücre içerisinde, hücrelerin bölünme sayılarını sınırlamak ve hücre yaşlanma mekanizmasına yardımcı olmak gibi görevler üstlenerek bir anti-tümör mekanizması olarak hareket eder [49].

Hudson ve arkadaşları [49]'nın yaptıkları çalışma ile, hücrede ektopik MIF ekspresyonu ve hücreye dıştan rekombinant MIF (rMIF) eklenmesinin; p53 kaynaklı büyüme durmasını, hücre yaşlanmasını ve p53 bağlantılı transkripsiyonel aktivitenin baskılanmasıyla apoptozisi etkisiz hale getirebileceği ortaya konulmuştur. Böylece MIF'in tümör oluşumunda rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır. Benzer bir çalışmada, Petrenko ve arkadaşları MIF'in normal ve tümörlü hücrelerde devamlılığını sağlamak için E2F-p53 yolağı ile etkileşimde olduğunu ortaya koymuştur [43,49].

2.2.3.2 MIF'in Glikolizi Regülasyonu

Benigni ve arkadaşları [50] yaptıkları çalışmada öngörülmedik şekilde MIF'in glikoliz metabolizmasını regüle ettiğini göstermiştir. Çalışmada, farklılaşmış sıçan miyotübülleri içerisine MIF enjeksiyonu önemli bir glikoliz ara bileşiği olan fruktoz-2,6-bisfosfat bileşiğinin sentezini arttırmıştır. Hücrede fruktoz-2,6-bisfosfat üretimi, 6-fosfofrukto2-kinaz/froktoz-2,6-bisfosfat enziminin artışına neden olmuş ve sonucunda hücrel laktat seviyesi artmıştır [50] .

Aynı çalışmada farelere TNF- α verilmesi serum glikoz seviyesinin düşmesine ve kas fruktoz-2,6-bisfosfat düzeyinin artmasına neden olmuştur. TNF- α 'nın kas hücrelerindeki bu katabolik etkisinin MIF proteini aracılığı ile düzenlendiği ve bu etkinin

fruktoz-2,6-bisfosfat üretimini sağladığı gözlemlenmiştir. Deneyin devamında nötralize edici anti-MIF antikorumun uygulanması bu etkiyi tamamen ortadan kaldırmıştır. Ayrıca MIF'in insülin salınımının otokrin uyarıcısı olduğu bilinmektedir. Bunlara ek olarak MIF'in glikoz ve karbonhidrat metabolizmasında rol oynadığı kanıtlanmıştır [50].

2.2.3.3 MIF'in Lökosit Göçünü Düzenlemesi

Yapılan güncel bir çalışma MIF'in, kemokin reseptörü-2 (CXCR2) ve kemokin reseptörü-4 (CXCR4) için fonksiyonel bir bağlayıcı olduğu, bu nedenle de inflamatuvar ve atherojenik lökosit alımını düzenlediği ortaya çıkartılmıştır. Aynı çalışmada CXCR2 ve CXCR4 aracılı monosit ve T-hücrelerinin kemotaksisine, hızlı integrin aktivasyonuna ve kalsiyum akışına yardımcı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca in vivo çalışmalar MIF eksikliğinin atherosiklorotik farelerde, monositlerin arterial duvara adezyonunu azalttığını göstermiştir. İleri düzeyli aterosiklerozlu farelerde MIF blokajı plak gerilemesine ve plaklarda monositlerin azalmasına neden olmuştur. Bu veriler ışığında MIF'in aterosiklerozda temel bir CXCR2 ligandı olduğu ortaya konmuştur [51,52].

2.2.3.4 MIF'in AKT Yolağını Uyarması

MIF tarafından p53 aracılı apoptozun engellendiği gösterilmiş olsada MIF aracılı AKT (serin/tirionin-spesifik protein kinaz) yolağının da, apoptozu engelleyip fibroblast, HeLa serviks karsinoma hücreleri ve birçok göğüs kanseri hücrelerinde hücrelerin devamlılığını sağladığı gösterilmiştir [53].

Fosfoinositol-3-kinaz (PI3K)/AKT sinyal yolağı, büyüme, metabolizma, hücre göçü, apoptoz ve hücre yaşamı gibi hücresel fonksiyonları kontrol etmede önemli bir rol oynamaktadır. PI3K/AKT aktivasyonu birçok hücresel yolağın çalışmasını başlatmakla

beraber, en önemlisi, hücrenin devamlılığını sağlayarak apoptozu engellemektedir. MIF aracılı AKT yolağı, sinyalini MIF reseptörü CD74 ve Src, PI3K kinazlar yoluyla iletmektedir. Ayrıca, MIF aracılı AKT aktivasyonu, proapoptotik proteinlerden BAD ve Foxo3a'nın inaktivasyonuna neden olmaktadır. Bu sonuçlara ek olarak, MIF tarafından apoptozun baskılanması AKT yolak inhibitörü PTEN (Fosfotaz ve tensin homoloğı olan gen, Phosphatase and tensin homolog gen) tarafından engellenmiştir. Bu sonuç, apoptozun inhibisyonunun p53 yardımıyla olmadığını kanıtlamıştır. Sonuç olarak, MIF'in hücre yaşamı üzerine olan etkisinin birçok hücrede, PI3K/AKT ve onun alt-yolları aracılığıyla olduğu kanıtlanmıştır [52,53].

2.2.3.5 MIF Aracılı ERK1/ERK2 Yolağının Aktivasyonu

MIF'in hücre proliferasyonuna etki ettiği yolaklardan bir tanesinin mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ailesine ait ekstrasellular sinyal-düzenleyici kinaz 1 (ERK1)/ERK2'i aktive etmek olduğu ortaya konmuştur.

MIF indüklü ERK1/ERK2 aktivasyonu protein kinaz A'ya ve aynı zamanda da sitoplazmik fosfolipaz A2 (PLA2) enzim aktivitesindeki artışa bağlıdır. PLA2 proinflatuvar yolların aktivasyonunda önemli bir hücre içi aracı moleküldür ve glukokortikoidlerin anti-inflatuvar etkilerinin gösterilmesinde hedef bir proteindir. ERK1/ERK2 aracılı PLA2'nın aktivasyonu, MIF'in steroidler üzerindeki immun baskılayıcı etkilerini nasıl ortaya çıkardıklarını gösteren bir mekanizma olmuştur [43, 52].

2.2.4. MIF'in İlişkili Olduğu Hastalıklar

2.2.4.1 Romatoid Artrit (RA)

Romatoid Artrit (RA), eklemlerin sinoviyal membranlarında kronik inflamasyon ile karakterize olan, dünya populasyonunun yaklaşık %1'ini etkileyen ve en sık görülen otoimmün hastalıklardan bir tanesidir. Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte genetik faktörler, hormonal ve enfeksiyöz ajanlar hastalığın oluşumunda etkilidir [54, 55, 56].

Kronik inflamasyonda MIF'in rolünü ortaya koyan en iyi kanıt RA hastalarında ortaya konulmuştur [57]. Onodera ve arkadaşları [58]'nin yaptıkları bir çalışma, RA hastalarının tipik inflamatuvar bölgesi olan sinovial sıvı içerisinde MIF proteini konsantrasyonunun, osteoartrit hastaları ve normal bireylere göre 5 ila 10 kat arasında fazla olduğunu ortaya koymuştur [57]. Diğer bir çalışmada Mikulowska ve arkadaşları [59], insan RA çalışmaları için iyi bir hayvan deneği olan sıçanlarda yaptıkları çalışmada, anti-MIF antikorlarının tip II kollojen kaynaklı artrite karşı oluşturulan inflamasyon cevabını baskıladığını ortaya koymuştur [58].

Matriks metalloproteinazlar (MMPs) ile doku hasarı RA'nın tipik patolojik bir özelliğidir. MIF'in sinovial fibroblastlarda MMP-1 ve MMP-3 mRNA seviyesininin artışına katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür ki MMP-1 ve MMP-3 RA hastalarında ekstraselüler komponentlerin parçalanmasından büyük ölçüde sorumlu elementlerdir [60]. Tüm bu çalışmalar göstermiştir ki MIF, RA hastalığının oluşumunda önemli bir yere sahiptir.

2.2.4.2. Glomerulonefritis (GN)

MIF'in RA'daki kritik rolü, diğer immünite aracılı hastalıklar ile de bağlantılı olabileceğini ortaya koymuştur [57]. Lan ve arkadaşları [61], bazal membran glomerulonefritisli sıçan modeli üzerine yaptıkları çalışmada immünite kaynaklı olan bu böbrek hastalığının patogenezinde MIF'in anahtar bir rol oynadığını ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışmada hastalığa sahip sıçanların anti-MIF ajanları ile tedavisi, glomerular makrofajların ve T-hücrelerinin süzülümünü ve aktivasyonunu azaltan şiddetli segmental lezyonların ve glomerular hilal yapısının inhibisyonu ile sonuçlanmıştır [61].

2.2.4.3. Atheroskleroz

Atheroskleroz, oluşumunda; sigara kullanımı, dislipidemi, arterial hipertansiyon, diyabet, obezite, fiziksel aktivite yoksunluğu, kronik böbrek hastalıkları ve genetik yatkınlığın rol oynadığı multifaktöriyel bir hastalıktır. Günümüzde, atherosklerozun oluşumunun başlıca sorumlusu olarak, hem doğuştan gelen hem de sonradan kazanılan bağışıklık mekanizmalarının dahil olduğu kronik inflamasyon gösterilmektedir [62].

Atheroskleroz hastalığının ilerlemesi ve ciddiyeti ile ilgili olan intima-media kalınlığının artması ile MIF ekspresyonu arasındaki korelasyon, sıçan aortasında lipid birikimi, atherojenik bir diyet ile beslenen tavşan ve ilerlemiş kartoid arter plaklarında yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur [63].

Burger-Kentishcer ve arkadaşları [64], apolipoprotein-E (Apo-E) eksikliği olan sıçanlarda anti-MIF ajanları ile tedavinin tipik olarak atheroskleroz ile ilişkili olan MIF, IL-6 ve fibrinojen gibi inflamasyon mediatörlerinin bir çoğunun azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir [64].

Bernhagen ve arkadaşları [51], MIF'in kemokin reseptörleri CXCR2 ve CXCR4 için alışık olunmayan bir ligand olarak davrandığını ve MIF'in blokajının ilerlemiş atherosklerozlu sıçanlarda plak gerilemesine, plaklar içerisindeki T-hücrelerinin ve monositlerin azalmasına yol açtığını ortaya koymuşlardır [51].

2.2.4.4. Sistemik Lupus Eritematozus (SLE)

Sistemik lupus eritematozus (SLE) deri, böbrek ve beyin gibi bir çok organı etkileyen otoimmün bir hastalıktır. SLE'nin patogeneğinde bir çok çevresel faktör rol oynar fakat en önemli hasar otoreaktif lenfositlerin çoğalmasıyla sonuçlanan immün tolerans kaybıdır [65].

Muzie ve arkadaşları [66], güncel bir yöntem olan enzim bağlantılı immüno-sorbent yöntemini kullanarak MIF seviyesinin SLE'li hastalarda önemli derecede yüksek olduğunu ortaya koydu [66]. Foote ve arkadaşları [67] ise MIF üretimi ile SLE hastalığının şiddeti arasındaki ilişkiyi araştırdı ve onlar SLE hastalığının şiddeti ve serum MIF konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğunu gösterdi [67]. T ve B lenfositleri, endotelial ve efektör hücrelerin aktivasyonu üzerine etkisi nedeniyle MIF SLE'de immün aktivitenin devamında önemli bir inflamatuvar mediyatör olarak kabul edilir [55].

2.2.4.5. Obezite ve Diyabet

Son çalışmalarda elde edilen kanıtlar, vücutta artmış yağ kütlelerinin; makrofaj infiltrasyonunun artışıyla ve sitokinlerin, adipokinlerin ve serbest yağ asitlerinin salınımının artışıyla ilişkili olduğunu göstermiştir [68].

Dandona ve arkadaşları [69], serum MIF seviyesi ile vücut kitle endeksi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ve açlık MIF konsantrasyon değerinin, obez örneklerde sağlıklı örneklere göre önemli derecede yüksek olduğunu bulmuştur [69].

Herder ve meslektaşları [70] nın yaptıkları bir çalışmada, normal glisemik değere sahip hastalar ile karşılaştırıldığında, Tip 2 Diyabet (T2D)'li hastaların dolaşımında MIF, C-reaktif protein (CRP) ve interlökin-6 (IL-6) değerlerinde önemli bir artış olduğunu rapor etmişlerdir ki Pradhan ve arkadaşları [71] CRP ve IL-6'nın T2D oluşum riskini arttırdığını ortaya koyan bir makele yayınlamıştır [70,71]. Ayrıca diğer epidemiyolojik ve klinik çalışmalar MIF'in; obezite, insülin direnci ve T2D'nin gelişimi ile olan ilişkisini anlamamıza katkı sağlamıştır [72].

Yukarıda bahsedilen hastalıklara ek olarak MIF, nörojenesis, sepsis, astım, yenidoğan solunum zorluğu sendromu (NRDS), melioidosis, otizm spektrum hastalığı (ASD), inflamatuvar akciğer hastalıkları gibi diğer birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır [9].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 ÇALIŞMA GRUBU

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'nın önceki çalışmalarında Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Polikliniğine başvuran, Ankilozan Spondilit tanısı konulmuş 161 AS hastası ve klinik olarak Ankilozan Spondilit tanısı konulmamış 194 sağlıklı bireyin kanlarından elde edilen DNA'lar çalışmamızda kullanıldı. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden çalışmamıza dahil edildiklerine dair izinleri alındı. Ankilozan Spondilit hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin çalışmaya dahil edilip edilmeme kriterleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Bu çalışma için, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonun'dan 20.08.2013 tarihinde 13-KAEK-178 kayıt numarası ile onay alınmıştır. Çalışmanın tamamı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda yapıldı.

Tablo 3.1. Hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin araştırmaya dahil edilme ve edilmeme kriterleri

Dahil Edilme Kriterleri	Araştırmanın Hasta Grubu İçin Dahil Etme Ölçütleri; 1. Ankilozan Spondilit tanısı konulmuş olması 2. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamış olması 3. 18 yaşından büyük olması
	Araştırmanın Kontrol Grubu İçin Dahil Etme Ölçütleri; 1. Ankilozan Spondilit tanısı almamış olması 2. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamış olması 3. 18 yaşından büyük olması
Dahil Edilmeme Kriterleri	Araştırmanın Hasta Grubu İçin Dahil Etmeme Ölçütleri; 1. Ankilozan Spondilit tanısı almamış olması 2. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamamış olması 3. 18 yaşından küçük olması
	Araştırmanın Kontrol Grubu İçin Dahil Etmeme Ölçütleri; 1. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamamış olması 2. 18 yaşından küçük Ankilozan Spondilit tanısı almış olması

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

3.2.1. Aletler ve Cihazlar

1. PZR Cihazı (Termal Cycler) (Techne, TC 4000, TC 412)
2. Elektroforez Tankı (Cleaver Scientific, MSCHOİCE)
3. Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo Scientific, EC 300 x L)
4. Jel Görüntüleme Sistemi (QUANTUM-ST4, 1000/20M- 09200806)
5. Bilgisayar (Exper, İntelcore2)
6. Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica,F20520162)
7. Mikrodalga Fırın (Arçelik İntellowave, MD 554)
8. Hassas Terazı (Kern, ABJ 220-4M)
9. Mikrosantrifüj (Mikro120, Hettich Zentrifugen D- 78 532n)
10. Vorteks (Velp Scientifica; F20220176)
11. Mikropipet Seti (Thermo Scientific)
12. Etüv (Memmert, Beschickung-Loading 100- 800)
13. Otoklav (HMC Hirayama, HV-25L)
14. Buzdolabı (Vestel,BZP-L3302W)
15. pH metre (İHANNA, 507702)

3.2.2. Kimyasal Maddeler

1. Taq DNA polimeraz (Fermentas, Lot:00166526)
2. *Alu I* (Restriksiyon Enzimi) (Lot: 4222)
3. Primerler -173 G>C (40204A832-1)
-173 G>C (40204A832-2)
4. Agaroz (Biomax, Lot: 134527)
5. Nusieve Agaroz (Prona (Gamma Micropor) (Lot: 051366)

6. pUC mix marker (Femantas Lot: 00151816)
7. Loading dye (Vivantis, Lot: 4011)
8. 100 mM dNTP set (Fermentas, Lot: 00070408)
9. Trisma Base (Amresco, Lot: 1621726)
10. Borik Asit (Amresco, Lot: 111110 625)
11. EDTA (Amresco, Lot: 3228B038)
12. Ethidium Bromide (Serva, 090107)
13. NaOH (Sodyum Hidroksit) (Riedel-de Haen, Lot:70440 UN 1823)

3.2.3. Çözeltiler

EDTA Solüsyonu (0,5 M) Hazırlanışı

18,16 Na₂EDTA·2H₂O 80 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözülmenin oluşabilmesi için 2,0 g NaOH karışma eklendi (pH: 8,0 olacak). pH ayarlaması HCl ile yapıldı ve 100ml'ye tamamlandı (distile su ile). Hazırlanan EDTA solüsyonu, otoklavlanıp oda sıcaklığında saklandı.

5XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

54 g Trisma Base, 27,5 g Borik Asit ve 20 ml EDTA 500 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Homojen olunca 1 litreye distile su ile tamamlanarak çözüldü. Çözelti oda ısısında saklandı.

Etidyum Bromid Solüsyonu (10mg/ml)

0,1 g Etidyum Bromid 10ml distile su içerisinde bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Kullanılacak tüpler alüminyum folyo ile kaplandı. Hazırlanan solüsyon +4 °C'de saklandı.

Elektroforez Yürütme Tamponu

5X TBE tamponundan distile su ile seyreltilerek 1X TBE hazırlandı.

%2'lik Agaroz Jel (100ml)

2 g agaroz, 100 ml 1X TBE erlenmayer içerisinde karıştırılıp mikrodalga fırında 1,5 dakika ısıtıldı. Hafif soğuması beklenerek (yaklaşık 60 °C) 3µl Etidyum bromid (10mg/ml) eklenip hızlı bir şekilde iyice karıştırıldı ve yükleme yapılacak tarakları hazırlanmış olan kasete döküldü.

3.3. YÖNTEM

3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Bu çalışmada, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'nın önceki ortak çalışmalarında oluşturulmuş olan DNA'lar kullanıldığından dolayı tekrar DNA izolasyonu yapılmamıştır.

3.3.2. DNA'nın Kalitatif Tayini

1,2 g agaroz, 60ml 1XTBE içerisinde kaynatılarak çözündürüldü, 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra 1,8µl EtBr (10mg/ml) eklendi. Sıvı haldeki jel, tarakları yerleştirilmiş olan agaroz jel elektroforez kabına dökülerek donmaya bırakıldı. 1-2µl DNA, toplam hacim 4µl olacak şekilde 10X yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Örnekler 1XTBE tamponu içerisinde, 120 voltta(V) 15 dakika yürütüldükten sonra jel, UV altında incelendi ve genomik DNA'nın kalitesi analiz edildi.

3.3.3. DNA'nun Kantitatif Tayini

Çift zincirli DNA preparasyonlarının yaklaşık saflığı 260/280 nm'deki absorpsiyon oranıyla (A260/A280) belirlemek mümkündür.

Saf çift zincirli DNA için A260/A280 =1,8'dir. Saf RNA'nınki 2 civarında, proteininki de 1'den küçüktür. DNA'ların derişimleri, 260nm dalga boyunda okunan OD değerinin, sulandırma katsayısı ve DNA katsayısı ile çarpılması sonucu µg/ml cinsinden belirlendi.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{A260} \times \text{Sulandırma oranı} \times 50 \text{ (katsayı)}$$

3.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) TEKNİĞİ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), nükleik asitlerin *in vitro* olarak, uygun koşullar altında istenilen sayıda tekrarlanabilen döngüler ile çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. PZR döngüsü sırasıyla, DNA çift zincirinin ısıyla birbirinden ayrılması (94°C Denatürasyon), oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (Hibridasyon 55-60 °C) ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması (Polimerizasyon 72 °C) aşamalarından meydana gelir [73]. PZR karışımı için kullanılan malzemeler şunlardır; Kalıp DNA, dH₂O, tampon, MgCl₂, dNTP'ler (serbest nükleotidler), primerler ve Taq polimeraz'dır [74]. Kalıp DNA; PZR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir [74]

3.5. RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) ANALİZİ

Bir kromozomun aynı bölgesi, aynı türün farklı bireylerinde veya kromozomlarında polimorf olarak tanımlanan iki farklı DNA dizilişine sahiptir ve genetik polimorfizmi gösterdiği söylenebilir. Genetik polimorfizme mutasyonlar neden olur. Diploid bireyler içerisinde örneğin, belirli tek kopya genin iki alleli sadece bir nükleotit yönünden bile farklılık gösterebilir ve dolayısıyla gen polimorfik olarak tanımlanabilir. Mutasyon olaylarının genetik polimorfizme neden olması tek nükleotit polimorfizmleri (SNP'ler) meydana getirir. SNP'ler, restriksiyon enzimlerince teşhis edilebilen kısa diziler içinde oluşur (Restriksiyon endonükleazlar, DNA'yı tanımlanmış ve üretilebilir fragmentlere kesen bakteriyel enzimlerdir). Böylelikle, bir restriksiyon enzimi tarafından DNA molekülünün kesilmesi ile elde edilen fragmentin uzunluğu her bir allel için farklı olur. Bu durum, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) olarak bilinir. Genetik bir hastalığa neden olan alleli belirleyen özel bir RFLP, klinik teşhiste marker olarak kullanılabilir. Restriksiyon fragmentleri veya PZR ürünleri gibi aynı uzunlukta DNA fragmentlerinde bulunan SNP'lerin belirlenmesinde jel elektroforezini kullanmak mümkündür [75].

3.6. ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ

Sulu bir çözelti içinde, suspansiyeye ya da çözülmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez denir [76]. Agaroz, deniz yosunundan üretilen bir polisakkarittir. % 0,5-2 arasındaki konsantrasyonlarda sulu çözeltilerle çözüldüğünde katı bir jel oluşturur. Elektroforez için kullanılan agaroz, bakteriyel kültür plakları yapmada kullanılan agarın saflaştırılmış formudur [76].

3.7. MIF GEN POLİMORFİZMİNİN ANALİZİ

MIF geninin -173 G>C polimorfizminin belirlenmesi için Dambacher ve arkadaşları [77]'nin yapmış oldukları PZR-RFLP yöntemi aşağıda belirtildiği şekilde modifiye edilerek uygulanmıştır [77].

Bu polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan primerler, PZR karışımları ve amplifikasyon sıcaklıkları aşağıda verilmiştir.

3.7.1 *MIF* geni -173 G>C Polimorfizmi

MIF geninin -173 G>C bölgesindeki polimorfizmi belirlemek için yapılan PZR'lerde, hedef gen bölgelerine özgün olarak kullanılan primerler, PZR karışımları ve çoğalma sıcaklıkları sırasıyla Tablo 3.2., Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.'te gösterilmektedir.

Tablo 3.2. *MIF* geninin -173 G>C bölgesindeki polimorfizminin analizinde kullanılan primerler

Bölge	Primerler
-173 G>C	F: 5'-ACTAAGAAAGACCCGAGGC-3' R: 5'-GGGGCACGTTGGTGTTTAC-3'

MIF genine ait baz dizisi içerisinde bulunan; -173 G>C değişimini içeren polimorfik bölge, primer bağlanma bölgeleri ve ekzonlar Tablo 3.3.'te verilmiştir.

Tablo 3.3. *MIF* Genine ait baz dizisi (Kaynak: NCBI)

1	caccaccca	gccggaattg	gctctggcca	ctctgggagg	gcgggggtggg	ggttgcaagt
61	cccttgttac	gcagggagcc	cctcagttag	ggagaggaga	caggggtctca	ggacaggacc
121	ttgaagaaa	ggaagggcag	tgcagagagg	ggtgagagag	ccagactggg	tttctagggg
181	gtggctcagg	gtgggagctg	acctgcctct	gctgagactg	cgttccagggt	gtgagcattg
241	atgtctagcc	catgtagctg	gagaggagtc	acagccatgc	tccccagctc	cagcccacct
4621	ggaggtacag	gggctcagtg	cgtgcagtg	aatgaactgg	gcttcatctc	tgaagggta
4681	aggggccatc	ttccgggttc	accgccgat	ccccacccc	ggcacagcgc	ctcctggcga
4741	ctaacatcgg	tgacttagtg	aaagg	actaa gaaagaccg aggc	gaggcc	ggaacaggcc
			5'	forward primer		3'
4801	gatttctagc	cgccaagtgg agaacagggt ggagcggtgc			gccgggctta	gcggcggttg
				(Polimorfik bölge)		
4861	ctggaggaac	gggaggagtc	gccagggtc	ctgccctgcg	ggggtcgagc	cgaggcaggc
4921	ggtgacttcc	ccactcgggg	cggagccgca	gcctcgcggg	ggcggggcct	ggcgcggcgc
4981	gtggcgtcac	aaaaggcggg accacagtgg tgtccgagaa gtcaggcacg tagctcagcg				
5041	gcgcccgcg	cgctgctc	tgtgctctg	cgcggtctc	ctggctctc	tgccatcatg
5101	ccgatgttca	tc	gtaaacac caacgtgcc	cgccctccg	tgccggacgg	gttctctcc
		3'	reverse primer			5'
5161	gagctcacc	agcagctggc	gcaggccacc	ggcaag	gcccc	cccaggtttg
						ccgggagggg
				(Ekzon 1)		
5221	acaggaagag	gggggtgcc	accggacgag	gggttccg	ctgggagctg	gggaggcagc
5281	tcctgaacgg	agctgggggg	cggggcgggg	ggaggacggt	ggctcggggc	cgaagtggac
5341	gttcggggcc	cgacgaggtc	gctggggcgg	gctgaccg	ccct	ttcctc gcagtacatc
5401	gcggtgcag	tggtcccga	ccagctcatg	gccttcggcg	gctccagcga	gccgtgcg
5461	ctctgcagcc	tgacagcat	cggcaagatc	ggcggcgcgc	agaaccgctc	ctacagcaag
5521	ctgctgtg	gcctgctggc	cgagcgcctg	cgcatcagcc	cggaca	ggta
						cgcgagctcg
				(Ekzon 2)		
5581	cggagggcg	ggggagggg	ggcggcgcgc	ggccaggccc	gggactgagc	caccgcgtga
5641	gtccggctc	ctccccgc	ag	ggtctaca tcaactatta cgacatgaac gcggccaatg		
5701	tgggctgga	caactccacc	ttcgctaag	agccgcaggg	accacgctg	tctgcgctgg
5761	ctccaccgg	gaaccgcgc	cacgtgtgt	tetaggccc	cccaccccaa	ccttctgggtg
5821	gggagaaata	aacggtttag	agac	tagggag	tgccctcgggg	ttccttggtt
						tgcgggagga
				(Ekzon 3)		
5881	attggtgag	agccgggata	ttggggagcg	aggtcgggaa	cggtgttggg	ggcgggggtc
5941	agggccgggt	tgctctctc	cgaacctgct	gttcgggagc	ccttttgtcc	agcctgtccc
7621	ctgcccagg	tgctcctaag	tcccctggga	ctaataaccg	gcctgcctgc	tggggaggtc
7681	agctgtaca	tcccacctc	aagccacacc	tgccccatt	gacccccatc	ccatggccag
7741	ctccatttc	tccaaagcac	aggtccact	gcccaccagg	tggtgggtct	cttctcaaa
7801	ccctgtttg	actgccccag	gacctgcagg	gtcagccttg	gaaat	

Tablo 3.4. *MIF* geni -173 G>C bölgesindeki polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.

	PZR Bileşeni	µl/Tüp
1	Steril bidistile Su	17 µl
2	PZR buffer	2,5 µl
3	MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
4	dNTP Mix (12,5mM)	0,3 µl
5	Primer -173 G>C (10pmol/ µl)	0,8 µl
6	Primer -173 G>C (10pmol/ µl)	0,8 µl
7	Taq Polimeraz (5 u/µl)	0,1 µl
8	Genomik DNA	2 µl

Tablo 3.5. *MIF* geni -173 G>C bölgesindeki polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR programı

Program Türü	Derece	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C	5dk.	-
Denatürasyon	95 °C	45sn.	35
Bağlanma	60 °C	45sn.	
Uzama	72 °C	45sn.	
Final uzama	72 °C	7dk	-

MIF geni -173 G>C bölgesindeki polimorfizmleri restriksiyon enzim analizi yöntemi ile belirlemek amacıyla Tablo 3.4. 'te verilen -173 G>C bölgesinin çoğaltımında kullanılan, örnek başına olan PZR karışımına göre; her bir PZR tüpünde bulunan 23'er µl 'lik karışımın içerisine 2 µl DNA ilave edilerek toplam hacim 25 µl yapıldı. Tablo 3.5.'teki *MIF* geni -173 G>C bölgesinin polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR programına göre çoğaltılması sağlandı.

3.7.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi:

Bu çalışmada, *MIF* geninin polimorfizmi için PZR programı ile çoğaltılmış polimorfik noktasını içeren PZR ürünleri restriksiyon enzim kesimi Tablo 3.6.'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3.6. *MIF* geni -173 G>C bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan enzim kesimi koşulları

Buffer	2 µl
<i>Alu I</i> enzimi (10u/µl) 5'-.....AG↓CT.....-3' 3'-.....TC↑GA.....-5'	1 µl
dH2O	17 µl
PZR ürünü	10 µl
Toplam	30 µl

MIF genin -173 G>C polimorfizmini belirlemek için Tablo 3.6.' de belirtilen oranda restriksiyon enzim karışımı hazırlandı ve *Alu I* restriksiyon enzimi ile 37 °C'de 12 saat kesime bırakıldı.

3.8. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistiksel analizler için SPSS İstatistik Paket Program Versiyon 20.0 ve Openepi 3.01 yazılım programları kullanıldı ve $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tespit edilen genotip sıklıkları için Hardy-Weinberg dengesinden sapma olup olmadığı Ki-kare (χ^2) testi ile araştırıldı.

4.BULGULAR

4.1 DEMOGRAFİK ve KLİNİK BULGULAR

Çalışmaya 195'i kadın (%54,9) ve 160'ı (%45,1) erkek toplam 355 birey katıldı. AS hasta grubunda 161 (84 kadın-77 erkek), kontrol grubunda ise 194 (111 kadın-83 erkek) birey yer aldı. Çalışmaya dahil edilen AS hastalarının yaş ortalaması 37,92, kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalaması ise 39,37 olarak bulunmuştur.

Çalışmaya dahil edilen AS hastaları ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin cinsiyet ve yaş ortalamalarına ait istatistik bulgular Tablo 4.1.'de verilmiştir.

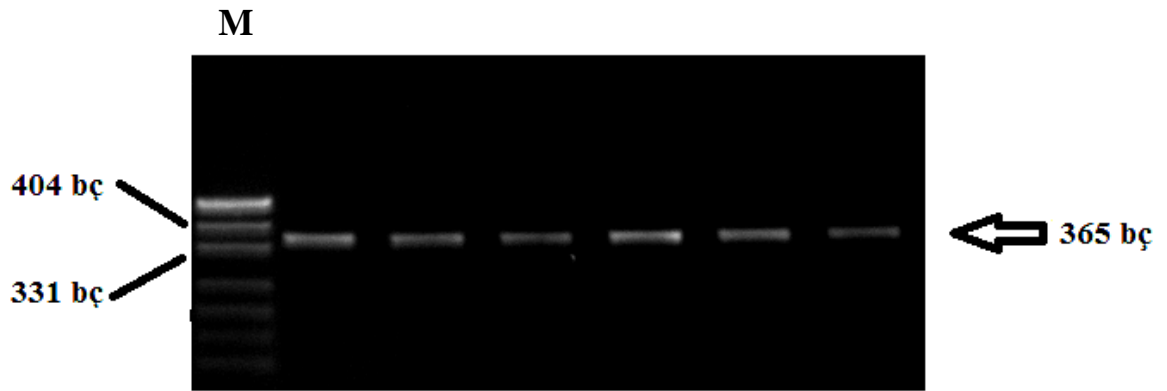
Tablo 4.1. Çalışmaya dâhil edilen AS hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyet ve yaş ortalamalarına ait istatistik bulgular

Özellik	AS Hasta Grubu (n=161)	Kontrol Grubu (n=194)	P
Cinsiyet			
Kadın	84 (%52,2)	111 (%57,2)	0,391
Erkek	77 (%47,8)	83 (% 42,8)	
Yaş Ortalaması	37,92±8,78	39,37±10,37	0,162

4.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) ve RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ ANALİZLERİ

4.2.1 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) ANALİZİ

MIF geninin restriksiyon enzim kesim analizi yapılacak olan -173 G>C polimorfizmini içeren 365 baz çiftlik bölgesi Tablo 3.4.'de verilen PZR karışımına ve Tablo 3.5.'de verilen PZR programına göre çoğaltılarak %2'lik agaroz jel içerisinde 130V'da 15 dk yürütülerek UV ışık ile incelendi. İnceleme sonunda elde edilen görüntü Şekil 4.1.'de verilmiştir.



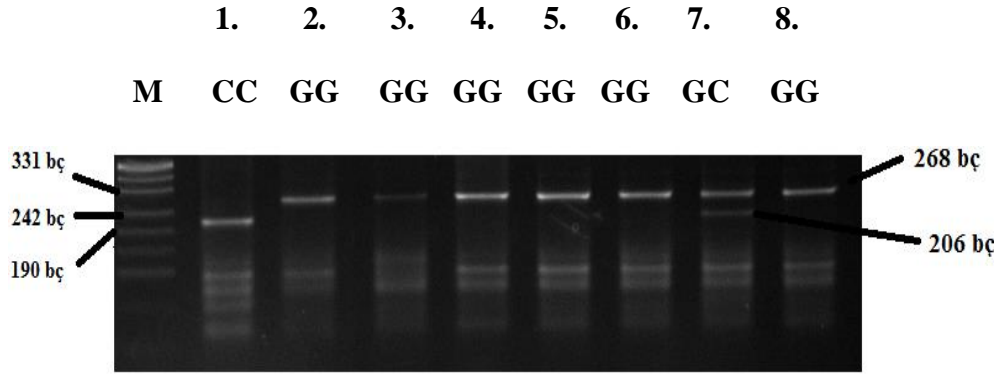
Şekil 4.1.: *MIF* -173 G>C polimorfizmini içeren 365 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. (M: pUC19 marker.)

4.2.2. RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) ANALİZİ

MIF geninin -173 G>C polimorfizmini içeren 365 baz çiftlik bölgesi Tablo 3.4.'de verilen PZR karışımına ve Tablo 3.5.'de verilen PZR programına göre çoğaltıldıktan sonra Tablo 3.6.'de verilen karışıma göre, *Alu I* restriksiyon enzimi ile 37 °C'de 18 saat kesime bırakılmıştır. Kesim ürünleri, *MIF* geni -173 G>C polimorfizmini görüntüleyebilmek için 100ml 1X TBE tamponu içerisinde çözünmüş %3'lük (2 gr agaroz ve

1 gr nusive agaroz) olarak hazırlanmış jel içerisinde 130 V'da 30 dk yürütüldü ve UV ışıkta incelendi.

Kesim sonuçları beklendiği gibi; homozigot GG bireylerde 268 ve 97 baz çiftlik DNA parçaları, heterozigot GC bireylerde 268, 206, 97, 62 baz çiftlik DNA parçaları ve homozigot CC bireylerde ise 206, 97, 62 baz çiftlik DNA parçaları halinde gözlemlendi. İnceleme sonrasında elde edilen görüntü Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. *MIF* -173 G>C polimorfizmini içeren 365 bp'lik PZR ürünlerinin *Alu I* enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan kesim ürünlerinin % 3'lük olarak hazırlanmış jeldeki görüntüsü. (M: pUC19 marker. 2,3,4,5,6,8 numaralı örnekler GG, 7 numaralı örnek GC ve 1 numaralı örnek CC genotipini göstermektedir.)

4.3. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Çalışılan örneklerin PZR ve RFLP analizlerinden elde edilen sonuçlar derlenerek, AS hasta grubu ve kontrol grubu *MIF* -173 G>C polimorfizmi yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptandı ($p>0,05$). AS hasta grubu ve kontrol gruplarının *MIF* geni genotip ve allel dağılım sıklıkları Tablo 4.2.'te verilmiştir. AS hasta grubu ve kontrol gruplarının *MIF* geni genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg dengesinden sapma göstermediği tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.2. AS hasta grubu ve kontrol grubunun *MIF* geni genotip ve allel dağılımı.

Genotip	AS Hasta Grubu	Kontrol Grubu	P
GG	116 (% 72,0)	136 (%70,1)	0,356
GC	42 (%26,1)	49 (%25,3)	
CC	3 (%1,9)	9 (% 4,6)	
Allel			
G	274 (%85,0)	321 (% 82,7)	0,455
C	48 (%15,0)	67 (% 17,3)	

Homozigot GG genotipli AS hastaları ile C alleline sahip GC ve CC genotipli AS hastaların klinik özelliklere ait demografik dağılımı Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. AS hastalarında klinik özellikler bakımından MIF geni -173 G>C polimorfizminin genotip dağılımlarının karşılaştırılması

Özellikler	Özellik Durumu	Toplam n (%)	GG n (%)	GC+CC n (%)	P
Sakroiliak Tutulum	Var	130 (80,7)	94 (72,3)	36 (27,7)	1,000
	Yok	31 (19,3)	22 (71,0)	9 (29,0)	
HLA-B27 Pozitifliği	Var	52 (32,3)	38 (%73,1)	14 (%26,9)	1,000
	Yok	109 (67,7)	78 (%71,6)	31 (%28,4)	
Yeni Kemik Düzlenmesi	Var	40 (24,9)	29 (%72,5)	11 (%27,5)	1,000
	Yok	121 (75,1)	87 (%71,9)	34 (%28,1)	
Oküler (Göz) Tutulum	Var	24 (15)	15 (%62,5)	9 (%37,5)	0,324
	Yok	137 (85)	101(%73,7)	36 (%26,3)	
Kalça Tutulumu	Var	51 (31,7)	38 (%74,5)	13 (%25,5)	0,708
	Yok	110 (68,3)	78 (%70,9)	32 (%29,1)	
Servikal Tutulum	Var	19 (11,8)	13 (% 68,4)	6 (% 31,6)	0,786
	Yok	142 (88,2)	103 (% 72,5)	39 (% 27,5)	
Aft	Var	38 (23,6)	27 (%71,1)	11 (%28,9)	1,000
	Yok	123 (76,4)	89 (%72,4)	34 (%27,6)	
Aile Hikayesi	Var	37 (23)	130 (% 80,7)	29 (78,4)	0,406
	Yok	124 (77)	31 (% 19,3)	87 (70,2)	

Homozigot GG genotipine sahip AS hastası bireyler ile GC ve CC genotipine sahip AS hastalarının; yaş ortalamaları, tanı yaşı ortalamaları, hastalık süresi ortalama-

ları, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ölçüm sonuçları, modifiye Schober testi ölçümü sonuçları ve Bath Ankilozan Spondilit hastalık aktivite indeksi (BASDAI) sonuçları yönünden karşılaştırılmalarında; hastaların yaş ortalamaları ve hastalık süresi ortalaması kriterlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Homozigot GG genotipine sahip AS hastaları ile C alleli taşıyan GC ve CC genotipine sahip hastaların yaş ortalaması, tanı yaşı ve hastalık süresi dağılımları ile eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ölçüm sonuçları, modifiye Schober testi ölçümü sonuçları ve Bath Ankilozan Spondilit hastalık aktivite indeksi (BASDAI) sonuçlarına ait dağılımlar Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Homozigot GG genotipli AS hastaları ile C alleleline sahip GC ve CC genotipli AS hastalarının yaş, tanı yaşı ve hastalık süresi ortalamaları ile ESR, Schober ve BASDAI testi sonuçlarına ait istatistik bulguların dağılımı.

Kriter	GG (n=116)	GC+CC (n=45)	P
Yaş Ort. (Yıl)	38,83±8,87	35,57±8,18	0,034
Tanı Yaşı Ort. (Yıl)	32,62±8,77	30,73±7,73	0,208
Hastalık Süresi Ort. (Yıl)	6,56±5,39	4,80±3,57	0,045
ESR (mm/saat)	16,82±13,64	15,02±13,60	0,443
Schober Testi (cm)	4,07±1,58	4,36±1,34	0,290
BASDAI	2,80±1,34	2,53±0,91	0,212

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

AS, inflamasyon, aksiyel iskelette yeni kemik düzenlenmesi ve enzatis ile karakterize olan, sırt ağrısı ve omurga tutukluğu ile kendini gösteren kronik inflamatuvar bir hastalıktır [78]. AS'nin önemli derecede kalıtsal olduğu ve birinci derece akrabalarında AS görülen bireylerde hastalığın görülme riskinin görülmeyenlere göre 52 kat daha yüksek olduğu uzun zamandır bilinmektedir [47]. Bununla birlikte, monozigotik ve dizigotik ikizler ile yapılan çalışmalar genetik etkinin hastalığa yakalanma riskini büyük oranda arttırdığını ortaya koymuştur [4].

MIF'in, glukokortikoidlerin immün sistemi baskılayıcı etkisine karşı bir regülatör olarak davranması ve immün sistem üzerine aktive edici özellikleri nedeniyle otoimmün-inflamatuvar hastalıklara yatkınlıkla ilişkili bir gen olduğu düşünülmüştür [36,41]. Bunun yanı sıra *MIF* genindeki iki polimorfizm, inflamatuvar hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan ilki, 5' bölgesine komşu olan -173 pozisyonundaki, guanin (G) bazından sitozin (C) bazına değişimi içeren tek nükleotid polimorfizmi (SNP)'dir. Diğeri ise CATT mikrosatellit bölgesi içerisindeki -794 pozisyonundaki kısa tandem tekrar polimorfizmi (STRP)'dir [10,11,12]. Bununla birlikte inflamasyonda MIF'in rolünü ortaya koyan en iyi kanıt RA hastalarıyla yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur [50]. Örneğin; Martinez ve arkadaşları [79], 2007 yılında İspanyol populasyonunda yaptıkları çalışmada *MIF* geninin -173 G>C polimorfizmi ile RA hastalığının erken gelişimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu çalışmada 606 yetişkin RA hastası ve 886 sağlıklı birey, *MIF* geninin bilinen 2 polimorfizmi olan -173 G>C ve -794 CATT₅₋₈ tetranükleotit dizisindeki polimorfizimleri yönünden test edilmiştir. Çalışma sonunda -173 pozisyonunda C allele sahip; hastaların yüzdesi %16, sağlıklı bireylerin yüzdesi ise %13 olarak bulunmuş (p=0,01) ve bu sonuca dayanılarak RA ile *MIF* geni -173 G>C

polimorfizminin hastalığın oluşumuna katkıda bulunduğunu öne sürülmüştür.[79]. Llamas-Covarrubias [54] ve arkadaşları ise 2012 yılında, 158 RA hastası ve 420 sağlıklı birey üzerine yaptıkları çalışmada -794 CATT₅₋₈ tetranükleotit dizisindeki -794 CATT₇ polimorfizminin, RA hastalarında %29,75 oranında gözlemlenirken, sağlıklı bireylerde % 22,14 oranında gözlemlendiğini ve sonuçların anlamlı bir fark gösterdiğini ortaya koymuşlardır (p= 0,034). Aynı çalışmada 86 RA hastası ve 110 sağlıklı birey, serum MIF protein düzeyleri yönünden incelenmiş ve RA hastalarında serum MIF protein miktarının sağlıklı bireylere oranla önemli derecede yüksek olduğu bulunmuş olmasına rağmen, RA'lı hasta grubu kendi içerisinde -173 G>C ve -794 CATT₇ polimorfizmlerine göre alt gruplara ayrılarak değerlendirildiğinde, anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür [54]. Benzer bir çalışmada Liu ve arkadaşları [80], Çin popülasyonu içerisinde *MIF* -173 polimorfizmi ile RA hastalığının ilişkisini incelemiştir. 214 hasta ve 478 sağlıklı bireyin katıldığı çalışmada GG, GC ve CC genotiplerine sahip hasta bireyler ile kontrol grubundaki bireyler arasında genotip dağılımları açısından anlamlı bir fark bulunmamış (p>0,05) olmalarına rağmen homozigot GG genotipine sahip bireyler referans grubu olarak kabul edildiğinde: CC genotipine sahip bireylerde RA hastalığının oluşum riskinin artış gösterdiğini bulmuşlardır (p=0,049). Aynı çalışmada GG ve GC genotipine sahip bireyler referans grubu olarak kabul edildiğinde ise; RA oluşum riskinin 1.56 kat güçlendiğini ortaya koymuşlardır (p=0,044) [80].

Yine inflamatuvar hastalıklara örnek olarak verilebilecek olan, Juvenil İdiopatik Artrit (JIA); çocukluk döneminin en sık görülen ve gelişiminde immünolojik faktörlerin rol oynadığı düşünülen romatizmal bir hastalıktır [13]. Hastalık ve gen ilişkisi üzerine yapılan bir çalışmada Donn ve arkadaşları, 117 beyaz JIA hastası ve 172 sağlıklı beyaz bireyi içeren araştırmada *MIF* geninin -173 bölgesindeki Guanin (G) bazından sitozin

(C) bazına değişiminin hasta ve sağlıklı bireyler arasında anlamlı bir fark oluşturacak biçimde dağıldığını gözlemlemişlerdir. Çalışmada 117 hastadan 5'inde (%4,3) -173CC polimorfizmine rastlanırken, 172 sağlıklı bireyde ise -173CC genotipine rastlanmamıştır (p= 0,001). Bu bulgudan yola çıkarak araştırmacılar bu polimorfizmin, hastalığın oluşum riskini %20,3 ile %36,8 oranında arttırdığını saptamışlardır. Aynı çalışmada araştırmacılar -173 pozisyonundaki G bazından C bazına değişimin, aktivatör bir transkripsiyon faktörü olan protein 4 (AP-4) için bağlanma bölgesi oluşturduğunu bulmuşlardır. Bu değişiminse *MIF* geni ifadesinin değişimine neden olabileceğini öne sürmüşlerdir [13].

Psöriasis batı populasyonunun yaklaşık %2'sini etkileyen kronik ve şuan tedavisi olmayan inflamatuvar bir hastalıktır. Psöriasis herhangi bir cilt yüzeyini etkileyebilir olmasına rağmen psöriasisin yaygın formunda; dirsekler, dizler, bel ve kafa derisi üzerinde ağır ölçekli deri lezyonları görülür [81]. 2004 yılında Donn ve arkadaşları [81] 228 psöriasisli hasta ve 401 sağlıklı birey üzerine yaptıkları çalışmada *MIF* geninin -173 G>C ve -794 CATT₇ polimorfizimlerinin psöriasisli hastalarda pozitif bir korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır (p=0,024 ve p=0,013) ve bu polimorfizimlerin *MIF* geni ekspresyonunu arttırarak deri inflamasyonunun artışına neden olduğunu ortaya koymuşlardır ve bu sonuçları; psöriasisle duyarlılıkla *MIF* geni polimorfizimlerinin ilişkisinin kanıtı olduğunu öne sürmüşlerdir [81]. Ayrıca Wu ve arkadaşları Kuzeydoğu Çin'deki Han populasyonu üzerine yaptıkları çalışmada 240 psöriasisli hasta ve 266 sağlıklı bireyi incelemişlerdir [82]. Çalışma sonunda genotip, allel ve haplotip dağılımlarında istatistiksel bir fark bulamamış olmalarına rağmen, hastaları: Yaş, cinsiyet, aile geçmişi gibi kriterler ile alt gruplara ayırdıklarında, *MIF* geninin -173 bölgesinde C alleli bulundurma yönünden kadınlar ve erkekler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu-

nu ve erkeklerde daha fazla gözlemlendiğini ortaya koymuşlardır ($p=0,04$). Aynı çalışmada hastalığın görülme yaşı kriterine göre değerlendirme yapıldığında ise; hastalığın ileri yaşlarda ortaya çıktığı kişiler ile hastalığın genç yaşta ortaya çıktığı kişiler arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,04$) [82].

Diğer bir inflamatuvar hastalık olan, Yetişkin Stil Hastalığı (AOSD) yaygın ve yüksek ateş, still döküntüsü, artrit, lökositoz ve çoklu organ tutumu ile karakterize olan ve nadir görülen bir hastalıktır. 2013 yılında Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *MIF* geninin fonksiyonel promotor polimorfizmlerinin (-173 G>C ve -794 CATT₅₋₈) plazma MIF seviyesini etkilediğini ve buna bağlı olarak bu polimorfizmlerin hastalığın oluşumuna ya da klinik tablonun ortaya çıkmasına katkı sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada 100 AOSD'li hasta ve 200 sağlıklı bireyin DNA'ları polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemine göre çalışılmış ve sonucunda -794 CATT₅ sıklığının hastalarda daha yoğun olduğunu ve sonuçların istatistiksel bir anlam oluşturduğunu bulunmuştur ($p=0,001$). Aynı çalışmada -173 CC alleleline sahip hastaların plazma MIF seviyelerinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [83].

Behçet Hastalığı (BD), tekrarlayan ağız aftı, üveit, deri lezyonları ve genital ülser gibi çeşitli klinik belirtiler ile karakterize edilen, kronik sistemik inflamatuvar bir hastalıktır [14]. 2012 yılında Zheng ve arkadaşları [14], *MIF* geninin -173 G>C (rs755622) ve -794 CATT₅₋₈ (rs2096525) polimorfizmlerinin BD ile ilişkisini araştıran bir çalışma yapmıştır. 600 hasta ve 600 sağlıklı bireyin dâhil edildiği bu çalışmada hasta bireylerde -173 pozisyonunda C alleli (polimorfik allel) bulunduranların sayısında kontrol grubundaki sağlıklı bireylere göre artış gösterdiği ortaya konulmuştur. Yine aynı çalışmada CC genotipli bireylerin GG genotipli bireylerden 1,92 kat, GC genotipli bi-

reylere göreyse 1,78 kat daha çok *MIF* mRNA'sı eksprese ettikleri ortaya konulmuştur. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar bu polimorfizmin *MIF* geninin mRNA ekspresyonunu etkilemek suretiyle Behçet hastalığına katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir [14].

Multiple Skleroz (MS), merkezi sinir sistemindeki nöronların dejenerasyonu, demiyelinizasyon ve fokal inflamatuvar filtre ürünleri ile karakterize edilen, kronik otoimmün-inflamatuvar bir hastalıktır [84]. 2010 yılında Akçalı ve arkadaşları [85] 120 MS hastası ve 120 sağlıklı bireyin dahil edildiği bir çalışma ile Türk hastalarda *MIF* geni polimorfizmi ile MS hastalığı arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmada *MIF* geni -173 G>C ve -794 mikrosatellit bölgesi polimorfizmleri araştırılmış olup özellikle -173 G>C polimorfizmi ile hastalık arasında önemli bir bağlantı olduğu ortaya konmuştur. Buna göre, -173 GG genotipi ile MS arasında önemli bir negatif kolerasyon tespit edilmesine rağmen ($p=0,004$), -173 CC genotipi ile MS arasında önemli pozitif bir kolerasyon tespit edilmiştir ($p<0,001$). Yine aynı çalışmada -173 CC genotipi ile hastalığın oluşum yaşı arasında güçlü bir ilişki olduğu ($p=0,012$) ve -173 CC genotipine sahip hastaların GC ve GG genotipine sahip olanlara nazaran daha genç olduğu ortaya konulmuştur ($p=0,009$) [85].

Bu çalışmada RA, psöriasis, JIA, AOSD, BD ve MS gibi, inflamatuvar bir hastalık olan AS ile *MIF* geni -173 G>C polimorfizmi arasındaki ilişki araştırıldı. Araştırmaya 84'ü kadın 77'si erkek 161 hasta ve 111'i kadın 83'ü erkek 194 sağlıklı birey katıldı ve herhangi bir alt sınıflama yapılmadı.

Çalışma sonuçlarımız, *MIF* -173 G>C polimorfizmi ve AS arasında allel ve genotip sıklık dağılımı bakımından anlamlı bir bağlantı olmadığını göstermiştir. *MIF* -173 G>C polimorfizmi ile ilgili GG, GC ve CC genotipi sıklıkları sırasıyla, hasta grubunda; % 72,0, % 26,1, % 1,9 olarak, kontrol grubunda ise; % 70,1, % 25,3, % 4,6 olarak

bulunmuştur. Allel sıklıkları ise hasta grubunda; G alleli için %85, C alleli için % 15 olarak, kontrol grubunda ise G alleli için %82,7, C alleli için %17,3 olarak bulunmuştur. Literatürde AS hastalığı ve *MIF* -173 G>C polimorfizmi arasındaki ilişkiyi açıklamak için yapılmış herhangi bir çalışma olmadığından sonuçlarımızı karşılaştırmak için bir veri elde edilememiştir. Bununla birlikte Kozacı ve arkadaşları, 25 AS hastası ve 18 sağlıklı bireyle yaptığı çalışmada serum *MIF* düzeylerini incelemiştir. Çalışma sonucunda AS hastalarının serum *MIF* düzeylerinin kontrol grubundaki bireylerin serum *MIF* düzeylerinden daha yüksek olduğunu ve istatistiksel açıdan iki grup arasında arasında anlamlı bir fark olduğunu gözlemlemiştir ($p<0,001$) [86].

Çalışma bulgularımıza dayanarak elde ettiğimiz diğer bir sonuçta ise; C alleleline sahip olmayan homozigot GG genotipli hastalar ile C alleleline sahip heterozigot GC ve homozigot CC genotipli hastalarının yaş ortalamaları ve hastalığın teşhisinden itibaren olan hastalık süresi ortalamaları dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu saptadık ($p<0,05$). Buna göre homoozigot GG genotipli hastaların yaş ortalaması 38,83 iken GC ve CC genotipli hastaların yaş ortalamalarının 35,57 ($p= 0,034$) ve GG genotipli hastaların hastalık süresi ortalaması 6,56 iken GC ve CC genotipli hastalarının hastalık sürelerinin ortalamasının 4.80 olduğu ($p= 0,045$) saptanmıştır. Ayrıca her ne kadar istatistiksel olarak bir fark oluşturmasa da hastaların tanı yaşı ortalamasının GC ve CC genotipli hastalarda daha düşük olduğu ortaya konmuştur (GG genotipli hastalarda 32,62, GC ve CC genotipli hastalarda 30,73)($p= 0,208$). Bizim bulduğumuz sonuçlara benzer olarak; hem Wu ve arkadaşlarının [82], psöriasisli hastalar ile yaptığı çalışmada, hem de Akçalı ve arkadaşlarının [85] MS hastaları ile yaptığı çalışmada; -173 CC genotipine sahip hastaların GG ve GC genotipli hastalardan daha genç olmaları da göz önünde bulundurulduğunda, C alleli taşımanın bireylerde inflamatuvar hastalıkla-

rın daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına neden olduğu savunulabilir. Başka bir deyiş ile C alleli bulundurmanın hastalığın oluşumunu hızlandırdığı ve ya hastalığın şiddetini arttırarak, hastalık tablosunun daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak, *MIF* -173 G>C polimorfizmi ile AS hastalığı arasında herhangi anlamlı bir bağlantı tespit edememiş olmakla birlikte, yaş ve cinsiyet dengesi gözetilerek daha geniş hasta ve kontrol örneklemeleri üzerinde yapılacak çalışmalar sonuçları değiştirebilir. Bunun yanı sıra C alleli bulunduran ve bulundurmeyen hastaların yaş ortalamaları ve hastalık süresi ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmiş olmamız, C alleli bulundurmanın hastalık tablosunun daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Türk ve Dünya literatüründe, *MIF* -173 G>C polimorfizmi ile AS hastalığı arasındaki ilişkiyi inceleyen herhangi bir çalışmanın olmaması sonuçlarımızın önemini arttırmakla birlikte bu konu üzerine farklı örneklemeler üzerinde polimorfizm çalışmaları yapılması ihtiyacını doğurmuştur. Bu tür çalışmalar AS hastalığının patogeneğinde *MIF* geninin rolünü ortaya çıkararak yeni farmakolojik hedeflerin ortaya konmasına ve etkinliği daha yüksek ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilir.

6.KAYNAKLAR

1. Davison, I.S., Wu, X., Liu, Y., Wei, M., Danoy, P.A., Thomas, G., Cai, Q., Sun, L., Duncan, E., Wang, N., Yu, Q., Xu, A., Fu, Y., Brown, M.A. and Xu, H. 2009. Association of ERAP1, but not IL23R, with Ankylosing Spondylitis in a Han Chinese Population. *Arthritis & Rheumatism*, 60: 3263-3268.
2. Imboden, J., Hellman D.B., Stone, H.J., 2006. *Current Romatoloji*. Editör: Arasıl, T., Güneş Tıp Kitapevi, 504, Ankara.
3. Hakim, A., Clunie, G., Haq, I., 2009. *Romatoloji El Kitabı*. Çeviri Editörleri: Ozer, H.T.E., Güzel, R., Nobel Tıp Kitapevleri, 609, İstanbul.
4. Brown, M.A., Kennedy L.G., MacGregor, A.J., Darke, C., Duncan, E., Shatford, J.L., Taylor, A., Calin, A., Wordsworth, P. 1997. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum.* 40(10): 1823.
5. Sims, A.M., Barnardo, M., Herzberg, I., Bradbury, L., Calin, A., Wordsworth, B.P., Darke, C., Brown, M.A. 2007. Non-B27 MHC associations of ankylosing spondylitis. *Genes Immun.* 8(2):115-23.
6. Sims, A.M., Wordsworth, B.P., Brown, M.A. 2004. Genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Curr Mol Med.* 4(1): 13-20.
7. Bloom, B.R, Bennett B. 1966. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 1966; 153: 80–82.
8. Mitchell, R., Bacher, M., Bernhagen, J., Pushkarskaya, T., Seldin, M.F. ve Bucala, R. 1995. Cloning and characterization of the gene for mouse macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J Immunol.*, 154(8):3863-70.
9. Xu, L., Li, Y., Sun, H., Zhen, X., Qiao, C., Tian, S., ve Hou, T. 2013. Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors. *Drug Discov. Today*, 18(11-12: 592-600.
10. Gregersen, P.K., Bucala, R., 2003. Macrophage migration inhibitory factor, MIF alleles, and the genetics of inflammatory disorders: incorporating disease outcome into the definition of phenotype. *Arthritis Rheum.*, 48(5):1171-6.

11. Nishihira, J., 2012. Molecular function of macrophage migration factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease. *Ann NY Acad Sci.*, 1271:53-7.
12. Awandare, G.A., Martinson, J.J., Were, T., Ouma, C., Davenport, G.C., Ong'echa, J.M., Wang, W., Leng, L., Ferrell, R.E., Bucala, R. ve Perkins D.J., 2009. MIF (macrophage migration inhibitory factor) promoter polymorphisms and susceptibility to severe malarial anemia. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(4): 629-37.
13. Donn, R.P., Shelley, E., Ollier, W.E., Thomson, W., 2001. A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 44(8):1782-5.
14. Zheng, X., Wang, D., Hou, S., Zhang, C., Lei, B., Xiao, X., Kijlstra, A. ve Yang, P. 2012. Association of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with Behçet's disease in a Han Chinese population. *Ophthalmology.*, 119(12):2514-8.
15. Van der Linden, S., Valkenburg, H.A, Cats, A. 1984. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 27:361-8.
16. Maksymowych, W.P., 2008.. Ankilozan spondilit ve spondiloartropatiler. Editör: Özgöçmen, S. Veri medikal yayıncılık, 230, İstanbul.
17. Arasıl, T. 2000. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. Editörler: Beyazova. M., Gökçe-Kutsal, Y. Güneş Tıp Kitapevi, Ankara.
18. Davis, J.C. Ankylosing Spondylitis. 2005. Edt: Koopman WJ, Moreland LW *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology* Lippincott Williams and Wilkins P. pp.1319-33.
19. Onen, F., Akar, S., Birlik, M., Sari, I., Khan, M.A., Gurler, O., Ergor, A., Manisali, M., and Akkoc, N. 2008. Prevalence of ankylosing spondylitis and related spondyloarthritis in an urban area of İzmir, Turkey. *J Rheumatol.* 35: 305-9.
20. Lipsky, P.E. and El-Gabalawy, H.S. 2003. Reactive arthritis: etiology and pathogenesis. Edt: Hochberg, M.C., Silman, A.J., Smolen, J.S., Weinblatt, M.E., Weisman, M.H. . Third edition *Rheumatology* vol. 2, Edinburg: Mosby, Elsevier Limited, p.1225-32.

21. Bucala, R. 1996. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J.*, 10(14): 1607-13.
22. Maksymowych, W.P. .2003. Spondyloarthropathies: Etiology and pathogenesis of ankylosing spondylitis. Edt: Hochberg, M., Silman, A.J., Smolen, J.S., Weinblatt, M.E., Weisman, M.H. *Rheumatology*. Elsevier Limited p. 1183-92. Philadelphia.
23. Hermann, E., Yu, D.T., Meyer zum Büschenfelde, K.H. ve Fischer B. 1993. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet*. 342:646-650.
24. Atagunduz, P., Appel, H., Kuon, W., Wu, P., Thiel, A., Kloetzel, P.M. ve Sieper, J. 2005. HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 52(3): 892-901.
25. Brown, M.A., Laval, S.H. Brophy, S. ve Calin, A. 2000. Recurrence risk modeling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 59(11): 883.
26. Breban, M. 2006. Genetics of spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20:593-9.
27. Brown, M.A., Pile, K.D., Kennedy, L.G., Calin, A., Darke, C., Bell, J., Wordsworth, B.P. ve Cornélis, F. 1996. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann RheumDis*. 55(4):268-70.
28. Nicknam, M. H., Mahmoudi M., Amirzargar, A. A., Jamshidi, A. R. Rezaei, N. ve Nikbin, B. 2009 HLA-B27 subtypes and tumor necrosis factor α promoter region polymorphism in Iranian patients with ankylosing spondylitis, *European Cytokine Network*, 20(1): 17–20.
29. Shiau, M. Y., Lo, M. K., Chang, C. P., Yang, T. P., Ho, K. T., ve Chang, Y. H. 2007. Association of tumour necrosis factor α promoter polymorphisms with ankylosing spondylitis in Taiwan. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 66(4): 562–563.
30. van Hauwermeiren, F., Vandenbroucke, R. E. and Libert, C. 2011. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 22(5-6): 311–319.

31. Chou, C. T., Huo, A. P., Chang, H. N., Tsai, C. Y., Chen, W. S. ve Wang, H. P. 2007. Cytokine production from peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis and their first-degree relatives. *Archives of Medical Research*, 38(2): 190–195.
32. Wendling, D. and Prati C. 2011 Biologic agents for treating ankylosing spondylitis: beyond TNF α antagonists *Joint Bone Spine* 78(6): 542–544.
33. Tak, P. P. ve Kalden, J. R. 2011. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Research and Therapy*. 13(1): article S5.
34. Kothari, N., Bogra, J., Abbas, H., Kohli, M., Malik, A., Kothari, D., Srivastava, S., ve Singh, H. 2013 Tumor Necrosis Factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. *Cytokine*, 61(2): 676–681.
35. Wilson, A. G., Symons, J. A., Mcdowell, T. L., Mcdevitt, H. O. ve Duff, G. W. 1997 Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation, "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(7): 3195–3199.
36. Zambrano-Zaragoza, J.F., Agraz-Cibrian, J.M., González-Reyes, C., Durán-Avelar Mde, J. ve Vibanco-Pérez, N. 2013. Ankylosing Spondylitis: From Cells to Genes. *Int J Inflamm.*, 2013:501653.
37. Alvarez-Navarro, C. ve Lopez de Castro, J.A. 2014. ERAP1 structure, function and pathogenetic role in ankylosing spondylitis and other MHC-associated diseases. *Mol Immunol.*, 57(1):12-21.
38. Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC). ve Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC). 2007. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature Genetic*, 39(11):1329-37.
39. Keidel, S., Chen, L., Pointon, J. ve Wordsworth, P. 2013. ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Current Opinion Immunology*, 25(1): 97-102.

40. Esumi, N., Budarf, M., Ciccarelli, L., Sellinger, B., Kozak, C.A. ve Wistow, G. 1998. Conserved gene structure and genomic linkage for D-dopachrome tautomerase (DDT) and MIF. *Mamm Genome*, 9: 753-757
41. Bucala, R. 2013. MIF, MIF alleles, and prospects for therapeutic intervention in autoimmunity. *J Clin Immunol.*, 33(1):72-8.
42. Flaster, H., Bernhagen, J., Calandra, T. ve Bucala R. 2007. The macrophage migration inhibitory factor glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol.*, 21(6):1267–80.
43. Calandra, T. ve Roger T. 2003 Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.*, 3: 791–800.
44. Imamura, K., Nishihira, J. ve Suzuki M. 1996. Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human kidney. *Biochem Mol Biol Int.*, 40: 1233–1242
45. Shimizu, T., Ohkawara, A., Nishihira, J. ve Sakamoto, W. 1996. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immunohistochemical localization. *FEBS Lett.*, 381(3):199-202.
46. Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H.Y., Dhabhar, F.S., Mu, W., Metz, C.N., Chesney, J.A., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R.C. ve Bucala R. 1998. MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol Med.* 4: 217–230.
47. Robinson, P.C. ve Brown, M.A., 2014. Genetic of ankylosing spondylitis. *Mol. Immunol.*, 57(1): 2-11.
48. Kasama, T., Ohtsuka, K., Sato, M., Takahashi, R., Wakabayashi, K. ve Kobayashi, K., 2010. Macrophage migration inhibitory factor: a multifunctional cytokine in rheumatic diseases. *Arthritis*. doi: 10.1155/2010/106202. Epub 2010 Dec 26.
49. Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J. ve Beach, D.H. 1999. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.*, 190(10):1375-82.
50. Benigni, F., Atsumi, T., Calandra, T., Metz, C., Echtenacher, B., Peng, T. ve Bucala R. 2000. The proinflammatory mediator macrophage migration factor induces glucose catabolism in muscle. *J. Clin. Invest.*, 106(10): 1291-1300.

51. Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zerneck, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J. ve Weber C. 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.*, 13(5):587-96.
52. Cayli, S., 2008. A Macrophage Migration Inhibitory Factor interactome screen identifies a complex of Jab1/CSN5 and Valosin-containing protein as an important mediator in the ubiquitin proteasome system. Doktora tezi, Department of Anatomy and Cell Biology. Faculty of Medicine of the Justus Liebig University Giessen, Giessen.
53. Lue, H., Thiele, M., Franz, J., Dahl, E., Speckgens, S., Leng, L., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Luscher, B., and Bernhagen, J. (2007). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene*, 26(35):5046-59.
54. Llamas-Covarrubias, M.A., Valle, Y., Bucala, R., Navarro-Hernández, R.E., Palafox-Sánchez, C.A., Padilla-Gutiérrez, J.R., Parra-Rojas, I., Bernard-Medina, A.G., Reyes-Castillo, Z. ve Muñoz-Valle, J.F., 2013. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): genetic evidence for participation in early onset and early stage rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 61(3):759-65.
55. Worthington, J., 2005. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 25:16-20
56. Santos, L.L. ve Morand E.F., 2009. Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.*, 399 (1-2):1-7.
57. Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. ve Bernhagen, J., 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in diseases. *Microbes Infection*, 4(4):449-60.
58. Onodera, S., Tanji, H., Suzuki K., Kaneda K., Mizue Y., Sagawa, A. Ve Nishihiro, J., 1999. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine*, 11(2):163-67.
59. Mikulowska, A., Metz, C.N., Bucala, R. ve Holmdahl, R., 1997. Macrophage

- migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice, *J. Immunol.* 158: 5514–5517.
60. Onodera, S., Kaneda, K., Mizue, Y., Koyama, Y., Fuyinaga, M. ve Nishihira, J., 2000. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis, *J. Biol. Chem.* 275: 444–450.
 61. Lan, H.Y., Bacher, M., Yang, N., Mu, W., Nicolic-Paterson, D.J., Metz, C., Meinhart A., Bucala, R. ve Atkins, R.C., 1997. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat, *J. Exp. Med.* 185:1455–1465.
 62. Barton, M. 2013. Prevention and endothelial therapy of coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol.*, 13:226-241.
 63. Korshunov, V.A., Nikonenko, T.A., Tkachuk, V.A., Brooks, A. ve Berk, B.C., 2006. Interleukin-18 and macrophage migration inhibitory factor are associated with increased carotid intima-media thickening. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26: 295-300.
 64. Burger-Kentischer, A., Göbel, H., Kleemann, R., Zerneck, A., Bucala, R., Leng, L., Finkelmeier, D., Geiger, G., Schaefer, H.E., Schober, A., Weber, C., Brunner, H., Rütten, H., Ihling, C. ve Bernhagen, J., 2006. Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis*, 184:28–38.
 65. Hoi, A.Y., Morand, E.F. ve Leech M., 2003. Is macrophage migration inhibitory factor a therapeutic target in systemic lupus erythematosus? *Immunol. Cell Biol.*, 81: 367–373.
 66. Mizue, Y., Nishihira, J., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Chida, M., Nakamura, K., Kikuchi, K. ve Mukai, M., 2000. Quantitation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) using the one-step sandwich enzyme immunosorbent assay: elevated serum MIF concentrations in patients with autoimmune diseases and identification of MIF in erythrocytes. *Int. J. Mol. Med.*, 5:397–403.
 67. Foote, A., Briganti, E.M., Kipen, Y., Santos, L., Leech, M., ve Morand, E.F., 2004. Macrophage migration inhibitory factor in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 31: 268–273.

68. Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A. ve Chen, H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 112:1821–1830.
69. Dandona, P., Aljada, A., Ghanim, H., Mohanty, P., Tripathy, C., Hofmeyer, D. ve Chaudhuri, A., 2004. Increased plasma concentration of macrophage migrationinhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89:5043–5047.
70. Herder, C., Klopp, N., Baumert, J., Müller, M., Khuseyinova, N., Meisinger, C., Martin, S., Illig, T., Koenig, W. ve Thorand, B., 2008. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene variants and MIF serum concentrations on the risk of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Case-Cohort Study, 1984–2002. *Diabetologia* 51:276–284.
71. Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E. ve Ridker, P.M., 2001. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 286(3): 327-34.
72. Sanchez-Niño, M.D., Sanz, A.B., Ihalmo, P., Lassila, M., Holthofer, H., Mezzano, S., Aros, C., Groop, P.H., Saleem, M.A., Mathieson, P.W., Langham, R., Kretzler, M., Nair, V., Lemley, K.V., Nelson, R.G., Mervaala, E., Mattinzoli, D., Rastaldi, M.P., Ruiz-Ortega, M., Martin-Ventura, J.L., Egido, J. ve Ortiz, A., 2009. The MIF receptor CD74 in diabetic podocyte injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20:353–362.
73. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn G.T., Mullis K.B. ve Erlich H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487-91.
74. Ergin, M., 2004. Moleküler Patoloji. Aegean Patology Jurnal, 1:103-107.
Temizkan, G. ve Arda N., 2004. İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler Kitabı. Genişletilmiş 2. Baskı. Nobel Kitap Evi. İstanbul.

75. Turner, PC, MacLennan, A.G., Bates A.D. ve White, M.R.H., 2004. Moleküler Biyoloji Önemli Notlar. Editör : Konuk, M. Nobel Yayın Dağıtım, 64-65. Ankara.
76. Kaya, A., 2002. Elektroforez Yöntemleri. Dicle Tıp Dergisi (Journal of Medical School), C:29, S:3
77. Dambacher, J., Staudinger, T., Seiderer, J., Sisic, Z., Schnitzler, F., Pfennig, S., Hofbauer, K., Konrad, A., Tillack, C., Otte, J.M., Diebold, J., Göke, B., Ochsenkühn, T., Lohse P. ve Brand, S., 2007. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(1): 71-82.
78. Hajjalilo, M., Ghorbanihaghjo, A., Khabbazi, A., Kolahi, S. ve Rashtchizadeh, N., 2014. Ankylosing spondylitis in Iran; late diagnosis and its causes. *Iran Red Crescent Med. Journal*, 16(4): e11798
79. Martínez, A., Orozco, G., Varadé, J., Sánchez López, M., Pascual, D., Balsa A., García, A., de la Concha, E.G., Fernández-Gutiérrez, B., Martín, J. ve Urcelay, E., 2007. Macrophage migration inhibitory factor gene: influence on rheumatoid arthritis susceptibility. *Hum. Immunol.*, 68:744-747.
80. Liu, R., Xu, N., Wang, X., Shen, L., Zhao, G., Zhang, H. ve Fan, W. 2012. Influence of MIF, CD40, and CD226 polymorphisms on risk of rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep.* 39:6915-22.
81. Donn, R.P., Plant, D., Jury, F., Richards, H.L., Worthington, J., Ray, D.W., Griffiths, C.E., 2004. Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 123(3): 484-7.
82. Wu, J., Chen, F., Zhang, X., Li, Y., Ma, H., Zhou, Y., Jin, Y., Wang, H., Bai, J. Zhang, G., ve Fu, S. 2009. Association of MIF promoter polymorphisms with psoriasis in a Han population in northeastern China. *J Dermatol. Sci.*, 53(3): 212-5.
83. Wang, F.F., Huang, X.F., Shen, N., Leng, L., Bucala, R., Chen, S.L., Lu, L.J., 2013. A genetic role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in adult-onset Still's disease. *Arthritis Res Ther.*, 15(3):R65.

84. Kieseier, B.C. 2014. Defining a role for laquinimod in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.*, 7(4): 195-205.
85. Akcali, A., Pehlivan, S., Pehlivan, M., Sever, T. ve Neyal, M. 2010. Association of macrophage migration inhibitory factor gene promoter polymorphisms with multiple sclerosis in Turkish patients. *Journal of International Medical Research*, 38(1):69-77.
86. Kozaci, L.D., Sari, I., Alacacioglu, A., Akar, S. ve Akkoc, N., 2010. Evaluation of inflammation and oxidative stress in ankylosing spondylitis: a role for macrophage migration inhibitory factor. *Mod. Rheumatol.*, 20(1): 34-9.

7.ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Çevik GÜREL

Doğum Tarihi/Yeri: 28.12.1988/Bakırköy

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Eğitim Kurumu	Yıl
Lise	Fen Bilimleri	Esenler Atışalanı Lisesi	2003-2006
Lisans	Biyoloji	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi	2008-2012
Y.Lisans	Tıbbi Biyoloji	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi	2012-