

T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



Psöriatik Artrit Hastalarında miRNA 146a ve miRNA 21 Parametrelerinin Apoptozis ile İlişkilerinin Araştırılması

UZMANLIK TEZİ
Dr. Sıddıka KESGİN AYHAN

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Şahabettin SELEK

İSTANBUL – 2016

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bana yol göstermiş ve bilgilerini paylaşmış olan tecrübelerinden faydalandığım Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e,

Tez konusu seçiminde ve oluşturulmasında emeği geçen sayın hocam Doç. Dr. Şahabettin SELEK'e,

Hastanemize ilk başladığım günden bu güne bilgi ve desteklerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ahmet BELCE'ye,

İhtiyaç duyduğum her anımda bana yardımcı olan sayın hocam Öğr. Gör. Dr. Elif KILIÇ'a,

Uzmanlık eğitimime katkılarından dolayı sayın hocam Dr. Güvenç GÜVENEN'e ve Dr. Ömer Faruk ÖZER'e,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve tüm Biyokimya personeline,

Her konuda, her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteklerini hep üzerimde hissettiğim sevgili aileme ve sevgili eşim Selim AYHAN'a

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	V
ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. PSÖRİATİK ARTRİT TANIM VE TARİHÇESİ	5
2.2. EPİDEMİYOLOJİ	6
2.3. PATOGENEZ	6
2.3.1. Genetik faktörler	6
2.3.2. İmmünolojik Faktörler	7
2.3.2.1. Hücresel Mekanizma ve Sitokinler	8
2.3.2.2. Vaskülarizasyonda İmmünoloji	9
2.3.2.3. Disregüle Kemiğin Yeniden Yapılanması	9
2.3.3. Çevresel Faktörler	9
2.4. PSÖRİATİK ARTRİT KLİNİĞİ ve TANISI	10
2.4.1. Laboratuvar Bulguları	11
2.5. PSA'DA Nf-KB YOLAĞI	11
2.5.1. RANK	12
2.5.2. RANK-L	13
2.5.3. Osteoprotegerin	13
2.6. MİKRORNA'LAR	14
2.6.1. miRNA Sentezi	15
2.6.2. miRNA 146a	16
2.6.3. miRNA 21	17
2.7. T HÜCRE CEVABI ve IL-17	18
2.8. APOPTOZ ve NEKROZ	20

2.8.1. Apoptozda Mekanizma	21
2.8.2. Apoptozda İntresik Ve Ekstrinsik Yolak	21
2.8.3. Kaspazlar ve Sitokeratinler	23
2.8.4. Romatolojik Hastalıklarda Apoptoz	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. KONTROL VE HASTA GRUPLARININ ÖZELLİKLERİ	25
3.2. KAN ANALİZİ	26
3.3. GEREÇLER	26
3.4. KİMYASAL MADDELER	27
3.5. YÖNTEMLER	27
3.5.1. Human IL-17A	27
3.5.1.1. Kit Bileşenleri	28
3.5.1.2. Test Prensibi	28
3.5.1.3. Standartların Hazırlanması	28
3.5.1.4. Standart Konsantrasyonları	29
3.5.1.5. Test Protokolü	29
3.5.1.6. Hesaplama	30
3.5.2. M30 ELISA	31
3.5.2.1. Kit Bileşenleri	31
3.5.2.2. Test Prensibi	31
3.5.2.3. Standart Konsantrasyonları	31
3.5.2.4. Test Protokolü	32
3.5.2.5. Hesaplama	32
3.5.3. M65 ELISA	33
3.5.3.1. Kit Bileşenleri	33
3.5.3.2. Test Prensibi	33
3.5.3.3. Standart Konsantrasyonları	33
3.5.3.4. Test Protokolü	33
3.5.3.5. Hesaplama	34
3.5.4. miRNA 146a ve miRNA 21	35
3.5.4.1. Total RNA İzolasyonu	35
3.5.4.2. Poli A Tailing Reaksiyonu	36
3.5.4.3. cDNA Sentezi	36
3.5.4.4. Real Time-PCR Aşaması	37

3.5.5. İstatistiksel Değerlendirme	38
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
EK1	56
EK2	60
KAYNAKLAR	61

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	Apoptozu indükleyen faktör
ANA	Antinükleer antikor
Anti-CCP	Anti sitriline protein
Apaf1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
AS	Ankilozan spondilit
BMI	Beden kütle indeksi
CASPAR	Psöriatik artrit sınıflama kriterleri
CCL 20	Kemokin (C-C motif) ligand 20
cDNA	Komplementer DNA
CK	Sitokeratin
CRP	C-reaktif protein
CSF	Koloni stimüle edici faktör
Ct	Eşik döngü
CTLA-8	Sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen 8
DİF	Distal interfalangeal falanks
dk	Dakika
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESR	Eritrosit sedimentasyon hızı
FADD	Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
G-CSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
GM-CSF	Granülosit monosit koloni stimüle edici faktör
Hgb	Hemoglobin
HIV	İnsan immünyetmezlik virüs
HLA	Human lökosit antijen
HRP	Horse radish peroksidaz

IFN	İnterferon
Ig G	İmmunoglobulin G
IGF	İnsulin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
IL17A	İnterlökin 17A
IRAK-1	İnterlökin-1 reseptor-ilışkili kinaz 1
KIR	Killer hücresi immünoglobulin-benzeri reseptör
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MHC	Major histokompatibilite kompleksi
MICA	MHC sınıf 1 zincir ilişkili A9
miRNA	Mikro RNA
MMP	Matriks metalloproteinaz
MS	Multipl skleroz
NFAT-c1	Aktive T hücrelerinin kalsinörin bağılı nükleer faktörü
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
NK	Natürel killer
OCP	Osteoklast prekürsör
OPG	Osteoprotegerin
PASI	Psoriasis area severity index
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PLT	Platelet
pre-miRNA	Prekürsor miRNA
pri-miRNA	Primer miRNA
PsA	Psöriatik artrit
RA	Romatoid artrit
RANK	Reseptör aktivator nükleer kappa B

RANK-L	Reseptör aktivator nükleer kappa B ligand
RF	Romatoid faktör
RISC	RNA'nın indüklediği sessizleştirme kompleksi
ROR-γt	RAR ile ilişkili orphan reseptor-gamma
SLE	Sistemik lupus eritematosus
sn	Saniye
STAT3	Transkripsiyon sinyal yükselticisi ve aktivatörü- 3
STAT5	Transkripsiyon sinyal yükselticisi ve aktivatörü- 5
Tbet	Tbox transkripsiyon faktörü
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
Th1	Thelper 1 hücresi
Th2	Thelper 2 hücresi
Th17	Thelper 17 hücresi
TIR	TLR/IL-1 reseptör
TLR	Toll like reseptör
TNF-α	Tümör nekroz faktör α
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TPA	Doku polipeptid antijen
TPS	Doku polipeptid spesifik antijen
TRADD	TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi
TRAF	TNRF ilişkili faktör
TRAIL	TNF-iliskili apoptoz indükleyici ligand
Treg	Regülatuar T hücresi
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP işaretleme ve etiketleme
TWEAK	Tümör nekroz faktör benzeri zayıf apoptoz indükleyici faktör
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WBC	Lökosit

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ

Şekil 1	RANK/RANK-L ile osteoklastogenez yolağının gösterimi	12
Şekil 2	Th17'nin uyarımı ve sitokini olan IL-17A'nın etkileri	20
Şekil 3	Apoptozda intrinsik ve ekstrinsik yolağın gösterilmesi	22
Grafik 1	IL-17 Standart absorbas-konsantrasyon grafiği	30
Grafik 2	M30 standart absorbas-konsantrasyon grafiği	32
Grafik 3	M65 standart absorbas- konsantrasyon grafiği	34

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1	CASPAR kriterleri	10
Tablo 2	Hasta ve kontrol grubunun sosyodemografik özellikleri	39
Tablo 3	PsA hastaları ve kontrol grubu arasında IL- 17A, M30, M65 ve miR146a düzeylerinin karşılaştırılması	40
Tablo 4	Hasta ve kontrollerin akut faz reaktanları ve hemogram değerlerinin karşılaştırılması	41
Tablo 5	Hastaların IL-17A, M30, M65, M30/M65, miR146a düzeylerinin arasındaki korelasyonun r ve p değerleri	42
Tablo 6	Hastaların IL-17A, M30, M65, M30/M65 ve miR146a düzeylerinin biyokimyasal parametrelerle ve akut faz reaktanlarıyla korelasyonunun r ve p değerleri	43
Tablo 7	Hastaların IL-17A, M30, M65, M30/M65 ve miR146a parametrelerinin hastalık özellikleri ile korelasyonunun r ve p değerleri	44
Tablo 8	PsA hastalarının genel özellikleri ve hastalık özellikleri arasındaki korelasyon	45
Tablo 9	PsA hastalarının genel özellikleri ve biyokimyasal değerleri arasındaki korelasyon	47

ÖZET

Psöriatik Artrit Hastalarında miRNA 146a ve miRNA 21 Parametrelerinin Apoptozis ile İlişkilerinin Araştırılması

Giriş ve Amaç: Psöriatik artrit (PsA) psöriazise eşlik edebilen eklemde destrüksiyon ve kemik rezorpsiyonu ile karakterize, genellikle romatoid faktörün (RF) negatif olduğu kronik inflamatuvar otoimmün bir hastalıktır. Amacımız bu hastalıkta apoptozun serumdaki bir göstergesi olan M30'un ve total hücre ölümünün bir göstergesi olan M65'in; hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğunu düşündüğümüz mikroRNA 146a (miR146a), mikroRNA 21'in (miR21) ve interlökin 17A (IL-17A)'nın seviyelerini araştırmaktır.

Yöntem: Çalışmaya PsA tanılı 51 hasta ve sağlıklı 36 kontrol dahil edildi. Hastaların sosyodemografik özellikleri ve öyküleri alındı. IL-17A, M30 ve M65 parametrelerinin serum değerleri ELISA yöntemi ile çalışıldı. Serumdaki mikroRNA 146a ve mikroRNA 21 değerlerini belirlemek için de önce serumdan RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra bu RNA'lerden komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilip Real-time PCR'da belirlenen primerler ile istenen mikroRNA'ların çoğaltılması sağlandı.

Sonuçların değerlendirilmesinde parametrik testlerde iki grup arasındaki farkı incelemek için student-t testi, kategorik değişkenlerin analizinde de ki-kare testi kullanıldı.

Bulgular: Çalışmamızda IL-17A seviyesi hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p=0.002$). M30 açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0.424$); fakat M65 seviyesi hasta grubunda anlamlı yüksekti ($p=0.003$). miR146a'nın hasta ve kontrollerde eksprese olduğu gözlemlendi, her iki grup arasında anlamlı fark yoktu ($p=0.590$). miR21'in ise hasta ve kontrol grubunda ekspresyonunun çok düşük olduğu gözlemlendi. Bu yüzden istatistiksel olarak bir değerlendirme yapılamadı.

Sonuçlar: Çalışmanın sonunda IL-17A'nın PsA hastalarında yüksek bulunmasından dolayı etyopatogeneizde otoimmünitenin etkili olduğu, miR146a ve miR21 ekspresyonunda gruplar arasında fark olmadığı için patogeneizde rolü olmadığı düşünüldü. Ayrıca bu hastalarımızda her iki hücre ölümünün de gözlemlendiği, fakat nekrozun apoptoza göre daha fazla görüldüğü düşünülmektedir.

ABSTRACT

Investigation of the Relationships Between miRNA 146, miRNA 21 Parameters and Apoptosis in Psoriatic Arthritis Patients

Objective: Psoriatic arthritis is a chronic inflammatory autoimmune disease in which Rheumatoid factor (RF) is usually negative and the disease is characterized by articular destruction and bone resorption that could accompany psoriasis. Our purpose is to investigate the levels of M30 which is a marker in serum for apoptosis in this disease and M65 which is a marker of total cellular death; and microRNA 146a (miR146a), microRNA 21 (miR21) and interleukin 17A (IL-17A) which are thought to be related to the pathogenesis of the disease.

Patient and Methods: 51 patients with diagnosis of PsA and 36 healthy controls were included in the study. Sociodemographic characteristics and history of the patients were collected. Serum levels of IL-17A, M30 and M65 parameters were measured with ELISA method. RNA isolation was performed first for determination of microRNA 146a and microRNA 21 levels in serum. Afterwards, completer DNA (cDNA) was synthesized from these RNAs and amplification of selected microRNAs was obtained from determined primer by Real-time PCR.

For evaluation of the results, student-t test was used for evaluating differences of parametric tests between the two groups and chi-square test was used for analysis of categorical data.

Results: IL-17A level was found to be significantly higher in patient group compared to the control group ($p=0.002$). No statistically significant difference was present in relation to M30 ($p=0.424$); however, M65 parameter was significantly higher in the patient group ($p=0.003$). miR146a was observed to be expressed in both patient and control groups, no significant difference was present between the groups ($p=0.590$). miR21 expression was observed to be very low in patient and control groups. Therefore, no statistical evaluation was performed.

Conclusions: In conclusion of our study, it had been thought that IL-17A is effective in PsA pathogenesis however, miR146a and miR21 have no roles in pathogenesis. In addition, both types of cellular death were observed in these patients, however, necrosis was more prominent than apoptosis.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Psöriatik artrit (PsA) psöriazise eşlik edebilen, eklemde destrüksiyon ve kemik rezorpsiyonu ile karakterize genellikle romatoid faktörün (RF) negatif olduğu kronik, inflamatuvar ve otoimmün bir hastalıktır. Seronegatif artritler başlığı altında incelenir. PsA hastalarında entezit, artrit, sinovit ve psöriazise ait komponentler bulunmaktadır. Hastalığın etyolojisi tam olarak belirlenememesine rağmen genetik faktörler, çevresel faktörler ve immünolojik faktörler sebep olarak gösterilmektedir [1, 2].

PsA'da osteoklastogenezin (kemik yıkımı) düzenlenmesinde OPG/RANK/RANK-L sistemi görev alır. OPG (osteoprotegerin), RANK-L'a (NF-kB reseptörünün aktivator ligandı) bağlanarak RANK'ın (NF-kB reseptörünün aktivatorü) bağlanmasını önler ve kemiğin fazla rezorbsiyonuna engel olur. RANK-L/RANK sistemi PsA'da osteoklast oluşumu ve aktivasyonunun, kemik rezorpsiyonu ve artan kemik turnoverının düzenlenmesinde etkilidir [3].

İnterlökin (IL) 17A, özellikle T-helper 17 (Th17) hücresinden ve diğer birçok immün sistem hücresinden salınan, inflamasyon ve immün cevapta rolü olan önemli bir sitokindir [4]. IL-17A, inflamatuvar artritlerde kemik ve eklem destrüksiyonunu uyarır. Aynı zamanda, kemik döngüsünde osteoklast aktivasyonunu sağlar. Yapılan çalışmalarda PsA hastalarının sinoviyumlarında IL-17A üreten hücrelerin ve IL-17A reseptörlerinin sayıca arttığı gösterilmiştir [5]. Ayrıca, romatoid artrit (RA) hastalarının serumlarında ve sinoviyal sıvılarında da IL-17A sitokin seviyesinin arttığı tespit edilmiştir [6]. Diğer taraftan, IL-17A'nın tümör nekrosis factor- α (TNF- α) ve IL-1 β ile sinerjistik etki gösterdiği, matriks metalloproteinazları (MMP) indüklediği, RANK-L ekspresyonunu uyarak osteoklastogenezin ana regülatörü olduğu gösterilmiştir [7, 8].

Hedef dokuda destrüksiyon ve inflamasyonla karakterize olan PsA'da doku hasarı gözlenmektedir. İnflamasyon ve doku hasarında bazı hücrelerde nekroz bazı hücrelerde de apoptozun gerçekleştiği bilinmektedir. Her iki tip hücre ölümü ile seruma sitokeratinler salınır. Apoptozun gerçekleşmesinde aspartat spesifik proteazlar olan kaspazlar rol alır. Özellikle kaspaz 3 sitoskeletal proteinlerin yıkımına neden olarak sellüler yapının bir parçası olan sitokeratinlerin seruma geçmesine sebep olur [9].

Apoptozda sitokeratin (CK) 18 non-cleaved ve cleaved olmak üzere ikiye ayrılır. Nekrozda ise sadece intakt formda CK 18 seruma salınır. M30 monoklonal antikoru

serumda kaspazın ayırdığı cleaved CK 18'i tespit ederken; M65 non-cleaved CK 18'i tespit eder. Yani M30 apoptozun, M65 ise total hücre ölümünün bir markerıdır. M30/M65 oranı ise apoptozun total hücre ölümüne oranını verir [10, 11].

MikroRNA'lar (miRNA), yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğunda protein kodlaması yapmayan bir RNA grubudur. Transkripsiyon sonrasında hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3' bölgesine bağlanıp protein sentezini gen ekspresyonu aşamasında etkiler. miRNA'lar proliferasyon, hücresel farklılaşma, apoptoz, eritropoez, fibrosis, angiogenez ve immünite gibi birçok hücresel ve biyolojik olayda rol oynar [12, 13].

MikroRNA 146a (miR146a), akut inflammatuar cevabı regüle ederek doğal immünitede rol oynar. Bazı çalışmalarda PsA'nın da dahil olduğu inflammatuar artritlerde rolü olduğu tespit edilmiştir [12]. Ayrıca kondrositlerde apoptozu indüklediği de belirtilmektedir. miR146a ekspresyonu Th1 hücrelerinden salınan proinflammatuar sitokinler tarafından indüklenir. Bu indüksiyon da nükleer faktör kappa B (NF-kB) yoluyla tarafından regüle edilir [13]. NF-kB yolunun PsA patogenezinde etkili olduğu bilinmektedir.

MikroRNA 21 (miR21) birçok çalışmada anti-apoptotik, anti-proliferatif fonksiyonla ilişkili gösterilmiştir. miR21, T hücre aktivasyonu ve T hücre biyolojisinde etkilidir. IL-17A'nın salındığı ana hücre olan Th17'nin diferansiasyonunda etkili bir transkripsiyon faktörü olan STAT3; miR21'in hedefidir [14]. Ayrıca birçok inflammatuar hastalık gelişiminde de rolü olduğu tespit edilmiştir [15].

Çalışmamızdaki amaç; PsA'lı hastalarda proinflammatuar bir sitokin olan IL-17A; hücre ölümü ile ilişkili olan M30 ve M65 parametreleri; apoptoz ve inflammatuar olaylarla ilişkili olan miR146a ve miR21 serum seviyelerini değerlendirmektir. Ayrıca bu parametrelerin hastalık aktivitesiyle ilişkili olup olmadığını belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PSÖRİATİK ARTRİT TANIM VE TARİHÇESİ

Psöriatik artrit psöriazis ile ilişkili olarak gelişen, romatoid faktörün genellikle negatif olduğu kronik inflamatuvar bir artrittir. Çoğunlukla bozulmuş yaşam kalitesi ve fonksiyonel olarak yetersizliğe sebep olur. Psöriazis hastalarının yaklaşık %20-30'unda psöriazisin cilt semptomları ortaya çıktıktan yaklaşık 10-12 yıl sonra artrit semptomları görülür. Periferik ve/veya aksial eklemlerde ağrıya eşlik eden inflamasyon gözlenir. Radyolojik olarak kemik yapım ve yıkımıyla karakterizedir [1, 2].

Psöriazis ile artrit arasındaki ilişki ilk kez 1818'de Alibert ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Fakat "Psöriatik artrit" terimini ilk kez 1860'da Bazin ve arkadaşları tarafından kullanmıştır. Uzun bir süre psöriazis ve RA'nın rastlantısal olarak birbirine eşlik ettiği düşünülmüştür. 1948'de RF'nin tespit edilmesiyle RA kriterleri belirlenmiş ve psöriatik artrit kavramı yeniden tartışılmaya başlanmıştır. 1959'da distal interfalangeal eklem (DİF) tutulumu, artrit mutilans, sakroileit gibi PsA'nın belirgin klinik özelliklerine dikkat çeken Wright ve arkadaşları psöriatik artrit kavramını kullanmayı önermiştir. Amerikan Romatizma Birliği tarafından 1964'te Psöriatik artrit diğer romatizmal hastalıklardan farklı bir kavram olarak tanımlanmıştır [16]. Moll ve Wright tarafından da daha sonra seronegatif spondiloartropatiler terimi tanımlanmış ve PsA'nın bu grup hastalıklar içinde incelenmesi gerektiği belirtilmiştir [17].

PsA seronegatif spondiloartropatiler grubunda incelenmektedir. Ağrının ve hassasiyetin eşlik edebildiği periferik ve/veya aksial eklem inflamasyonu ile karakterizedir. Seronegatif spondiloartropatilerin genel özellikleri PsA için de geçerlidir. Bunlar: romatoid nodül negatifliği, entezitis, sakroiliak eklem tutulması, alt ekstremitelerde ağırlıklı oligoartritler, eklem dışı bulgular (mukaza, deri, göz tutulumu), RF negatifliği ve çoğunlukla HLA B27 ile beraberliği [17, 18]. PsA'da en yaygın ekstraartiküler tutulum psöriatik deri ve tırnak lezyonlarıdır.

PsA'nın alt grupları monoartrit, oligoartrit, poliartrit, tırnak değişikliklerine eşlik eden DİF artrit, falanks ve metakarpal kemiklerin progresif osteolizisi ile karakterize olan artrit mutilans ve spondilit olarak tanımlanmıştır. Hastaların % 15-40'ında oligoartrit, % 8-16'sında DİF tutulumu, % 20-40'ında spondilit benzeri tablo görülür. Ancak, zamanla bu alt grupların iç içe girdiği, kesin ayrımların olmadığı görülmüştür. Dört veya daha az eklem tutulduğu

oligoartrit, PsA'nın en karakteristik tipidir ve genellikle asimetric seyreder. Eklem dışı tutulumda en sık etkilenen organ gözdür. Konjoktivit (% 19.6), irit (% 71), keratokonjoktivitis sikka (% 2.7) gözde sık görülen bulgulardır [19].

2.2. EPİDEMİYOLOJİ

Amerika Birleşik Devletlerinde PsA prevalansı % 0.04-0.1 iken psöriazisli hastaların yaklaşık % 30'unda PsA bulunduğu gösterilmiştir [20]. Özellikle şiddetli deri tutulumu olan püstüler psöriaziste PsA insidansı % 40'lara kadar yükselmektedir. hastaların % 70'inde psöriazisten sonra; % 10-15 hastada psöriazise eş zamanlı; % 15-20 hastada ise psöriazis öncesi artrit saptanmaktadır [21].

Beyaz ırkta siyahlara göre daha sık görölmektedir. Daha önceden psöriazis hastalığına sahip olmak ve heredite; PsA için predispozan faktörler arasındadır. PsA'lı hastaların birinci dereceden akrabalarında psöriazis görölme oranı % 20 iken, PsA görölme oranı % 5' tir. Hastalık paternine göre cinsiyetler arası prevalans farklılığı görölmektedir. Simetrik poliartriti olan hasta grubunda kadınlar daha sık bulunurken, spinal tutulum olan grupta ise erkek hastalar daha sıktır [22].

PsA ortalama 2. dekattan sonra görölmeye başlar. En sık göröldüğü yaş aralığı 30- 50 arasındır. 3. dekattan 6. dekata doğru prevalansta artma saptanır.

2.3. PATOGENEZ

PsA'nın patogenezi tam olarak bilinmemesine rağmen psöriazisin cilt lezyonlarında ki altta yatan mekanizmanın burada da aynen geçerli olduğu düşünölmektedir. Genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin PsA'nın patogenezinde rol aldığı belirtilmiştir. Bu faktörler aşağıda ayrıntılı olarak tartışılacaktır.

2.3.1. Genetik faktörler

Birçok çalışmada psöriazis ve PsA'nın ailesel yatkınlık oluşturduğu tespit edilmiştir. PsA hastalarının birinci dereceden akrabalarında eklem ya da cilt hastlığı görölme oranı % 40

olarak bulunmuştur [23, 24]. PsA'nın birinci derece akrabalarda görülme olasılığı genel popülasyona göre 49 kat daha fazladır [1]. Monozigotik ikizlerde psöriazis konkordansı % 65; PsA konkordansı % 35'dir [21].

Human lökosit antijenlerinin (HLA) bazı alt gruplarının PsA ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. HLA-Cw*0602 geni psöratik hastalıklarla ilişkilidir. HLA-Cw*0602 geni taşıyan psöriazis hastalarında MHC class 1 zincir ilişkili A9 (MICA) polimorfizminin artrit gelişiminde ilişkili olduğu gösterilmiştir. HLA-B grubunun ise psöriazis üzerine eklenen kemik, iskelet sistemi hastalıklarında etkili olduğu tespit edilmiştir. HLA-B27, HLA-B38, HLA-B39 ve HLA-C12; PsA'da psöriazisten daha fazla overeksprese olan alellerdir [1, 25]. HLA-B27'nin spinal tutulum ve sakroileit ile, HLA-B38 ve HLA-DR4'ün ise poliartritle seyreden PsA formu ile ilişkili olduğu bulunmuştur [19, 26]. HLA-B39, HLA-DR7 varlığında HLA-B27; HLA-DR7 yokluğunda ise HLA-DQ3, hastalığın progresyonu ile ilişkili olan genlerdir. HLA-B22'nin ise PsA için koruyucu olduğu tespit edilmiştir [27].

2.3.2. İmmünolojik Faktörler

Psöriazis ve PsA'de inflamatuvar infiltratların yapısında dair kapsamlı araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Hastalığın gözleendiği sinoviyal doku, entesial bölge ve ciltte yoğun lenfositik infiltrasyonlar gözlenmiştir. PsA'da sinoviyal hücre hiperplazisi, vaskülarite artışı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu hastalığın karakteristik patolojik özelliğidir. Bu belirtiler RA ile benzerlik gösterse de vaskülarite artışı PsA'da, sinoviyal hiperplazi ve makrofaj infiltrasyonu ise RA'da daha belirgindir. Bu hastalarda sitokeratinlere, ısı şok proteinlerine, nükleer antijenlere karşı otoantikorlar bildirilmiştir. Bu da PsA'da humoral bağışıklığın etkili olduğunu düşündürmektedir [28].

Doğal ve kazanılmış immün yanıt PsA'da çok aktiftir. Bu durum mekanik stress, travma, enfeksiyon gibi çevresel tetikleyici faktörler varlığında periferal eklemlerde T hücre aktivasyonu şeklinde kendini gösterir. Doğal immün yanıtta NF-kB yolağı ve IFN sinyalleri rol alırken; adaptif immün yanıtta CD8⁺ T hücreleri ve CD4⁺ Th17 hücreleri rol alır.

TNF- α , PsA patofizyolojisinde ana immünolojik mediatördür. Sinoviyal sıvıda ve perivasküler hücrelerde NF-kB yolağını aktive eder. Bu yüzden tedavide TNF inhibitörleri kullanılarak bu yolak inhibe edilmeye çalışılır [1, 29].

2.3.2.1. Hücresel Mekanizma ve Sitokinler

PsA hastalarının hem cilt hem de eklemlerinde aktive T hücreleri saptanmıştır. Ciltte daha çok CD4⁺ T hücreleri, entezit ve sinoviyal sıvıda ise CD8⁺ T hücreleri görülmektedir. Özellikle CD8⁺ T hücrelerinin önemli patolojik rolü olduğu bilinmektedir. Sinoviyal sıvıda CD4⁺/CD8⁺ T hücre oranı 1/2 dir [1]. Aktive T hücreleri ve diğer mononükleer hücrelerden salınan proinflamatuvar sitokinlerin sinoviyal ve epidermal fibroblast aktivasyonuna ve proliferasyonuna sebep olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [30-32].

Th1 hücre sitokinleri RA'ya göre PsA'da daha belirgindir. Bunlar TNF- α , IL-1 β ve IL-10'dur.

PsA'da sinoviyal sıvıda TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-15 ve IL-18 artmış bulunmaktadır. Bu sitokinler kemokinlerin ve hücre adezyon moleküllerinin inflamasyon alanında artışına yol açar. Özellikle TNF- α temel proinflamatuvar sitokindir. Kemik rezorpsiyonunu uyarır, kemik yapımını ve proteoglikan sentezini baskılar. TNF- α ayrıca vasküler endotelial growth faktör (VEGF) ve vaskülarizasyonu arttırıcı diğer faktörleri stimüle ederek vaskülarizasyonu arttırır [33]. TNF- α ve IL-1 β makrofajlardan MMP üretimini uyarır. Artan MMP'ler de eklem degradasyonunu tetikler.

Dolaşımda Th1 ve Th2 hücrelerinin yanında bir de IL-17A üretimini gerçekleştiren Th17 hücreleri de tanımlanmıştır. Th17 hücreleri ilk olarak hayvanlarda tanımlanmış olup farelerde otoimmün ensefalomyelit ve artritte arttığı gözlenmiştir. Th17 hücreleri osteoartrit hastalarına göre karşılaştırıldığında PsA'da sinoviyal sıvıda artmıştır. IL-17A'nın psöriazis şiddetiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. IL-17A proinflamatuvar bir sitokin olup peptit üretimini, kemokinleri ve anjiojenik faktörleri stimüle eder. Osteoblast ve osteoklast prekürsörlerini aktive ederek ekstrasellüler matriks yıkımı, kemik rezorpsiyonu ve eklem destrüksiyonuna neden olur. IL-17A deride keratinositleri, eklemden fibroblastları stimüle ederek kronik inflamatuvar süreci devam ettirir [29].

IL-23 de psöriazis ve PsA'de hastalığın şiddeti ile ilişkili olan sitokindir. IL-17A üretimini stimüle eder [34].

PsA hastalarında sinoviyumda naturel killer (NK) hücre aktivasyonunun periferik kandan daha düşük olduğu gösterilmiştir [35]. Psöriatik plaklarda NK hücrelerinin eksprese ettiği IL-18'in de arttığı tespit edilmiştir [36].

2.3.2.2. Vaskülarizasyonda İmmünoloji

PsA'da inflamatuvar lezyonlarda endotel hücre aktivasyonu gerçekleşir ve daha sonra hücreyel infiltrasyon gözlenir. Endotelial hücre büyümesi ve anjiogenez kronik inflamasyonun önemli bir belirtisidir ve psöriaziste deride, PsA'da sinoviyal membranda etkili olduğu düşünülmektedir. Fakat bu vaskülarizasyonda damar gelişimi immatür bir gelişme şeklinde olur ve düzensizdir [37].

PsA'da artmış olan TNF- α vasküler endotelial growth faktör (VEGF) ve platelet kaynaklı growth faktör (PDGF) ekspresyonunu artırarak vaskülarizasyonu artırır [33].

2.3.2.3. Disregüle Kemiğin Yeniden Yapılanması

Psöriatik eklemlerde kemik birleşim yerlerinde osteoklast sayısında artma gözlenmiştir. Ayrıca osteoklastogenezde etkili bir molekül olan RANK-L'in sinoviyal membranda artmış olduğu, osteoklastogenezini durduran osteoprotegerinin de azalmış olduğu tespit edilmiştir. PsA hastalarının serumlarında osteoklast prekürsör (OCP) sayısının da sağlıklı kontrollere göre artmış olduğu gösterilmiştir [38]. OCP'ler daha sonra psöriatik ekleme göç ederler ve RANKL'in etkisi ile osteoklastlara diferansiye olurlar. Anormal kemiğin yeniden yapılanmasında eklem aralığında daralma, erozyonlar, artritis mutilans, hokka içinde kalem deformitesi ve distal falanks rezorbsiyonu görülür [39].

2.3.3. Çevresel Faktörler

Çevresel faktörler genetik olarak yatkınlığı olan kişilerde PsA gelişiminde rol oynar. Diğer seronegatif artritlerde olduğu gibi enfeksiyonların PsA patogeneğinde etkili olduğu düşünülmektedir. Kan örneklerinde viral replikasyon markerlarının tespit edilmesi virüslerin psöriatik artrit için risk oluşturabileceği düşüncesini oluşturmuştur [40]. Hepatit C antikörlerinin, psöriazis hastalarının % 6'sında pozitifken, PsA hastalarının % 12'sinde pozitif olduğu görülmüştür [41]. İnsan immune yetmezlik virüsünün (HIV) psöriazis ve PsA'yı

aktive ettiği tespit edilmiş olması; NK hücrelerinde bulunan killer cell immunoglobulin-like reseptörlerin (KIRs) ve HLA class I moleküllerin aktivasyonu virüslerin PsA etyolojisinde rol oynadığı düşüncesini desteklemiştir. Fakat bu konuda yeterli bir etyolojik çalışma yapılmamıştır [42].

Koebner fenomeninde travma sonrası ciltte psöriazis plakları oluşabilmektedir. Travma sonrası osteoliz ve artrit başlaması, travmanın PsA etyolojisinde etkisi olabileceği düşünülmüştür. Bu durum derin Koebner fenomeni yansıtır. Bu durumda travma ile aktive olan inflamasyon hücrelerinin ekleme g     rol oynamaktadır [1].

2.4. PS RIATİK ARTRİT KLİNİĞİ ve TANISI

PsA'nın laboratuvar bulgusu, romatolojik değişiklikleri ve kliniği belirgin değildir. Diğer romatolojik hastalıklarla benzer özellik gösterir. Özellikle sırt ağrısı, oligoartrit, entezit ve sosis parmağın eşlik ettiği durumlarda reaktif artrit ile karışabilir. Fakat karakteristik deri lezyonu ile reaktif artritten ayırt edilebilir. 32 ülkede 588 hasta ve 536 kontrolle yapılan bir çalışma sonrasında PsA tanısı için CASPAR (Classification of criteria for study of psoriatic arthritis) kriterleri tanımlanmıştır. Bu kriterlerin sensitivitesi % 97.8; spesifitesi % 92.4'tür. Hastaya PsA tanısı konulması için inflamatuvar artriti olması, entezit ve sırt ağrısının olmasının yanında aşağıdaki maddelerden en az 3 puan alması gerekir [43].

Tablo 1: CASPAR kriterleri [43]

Aktif psöriazis (2 puan)
Daha önceden psöriazis hikayesi (1 puan)
Ailede psöriazis hikayesi (1 puan)
Psöriatik tırnak değişikliği (onikolikoz, pitting, hiperkeratoz) (1 puan)
Aktif daktilit varlığı ya da daha önceden daktilit saptanması (1 puan)
Jukstaartik�ler yeni kemik oluşumu (1 puan)

2.4.1. Laboratuvar Bulguları

PsA için kesin bir laboratuvar bulgusu yoktur fakat eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve C-reaktif protein (CRP) yüksekliği belirgindir. ESH ve CRP yüksekliği hastalık aktivitesi ile koreledir. RF pozitifliği PsA için dışlama kriteri değildir. PsA hastalarının % 2- 10'unda da pozitif olarak saptanabilir. Hastaların % 10'unda da ANA pozitif tespit edilirken % 8-16'sında ise anti-CCP pozitifdir.

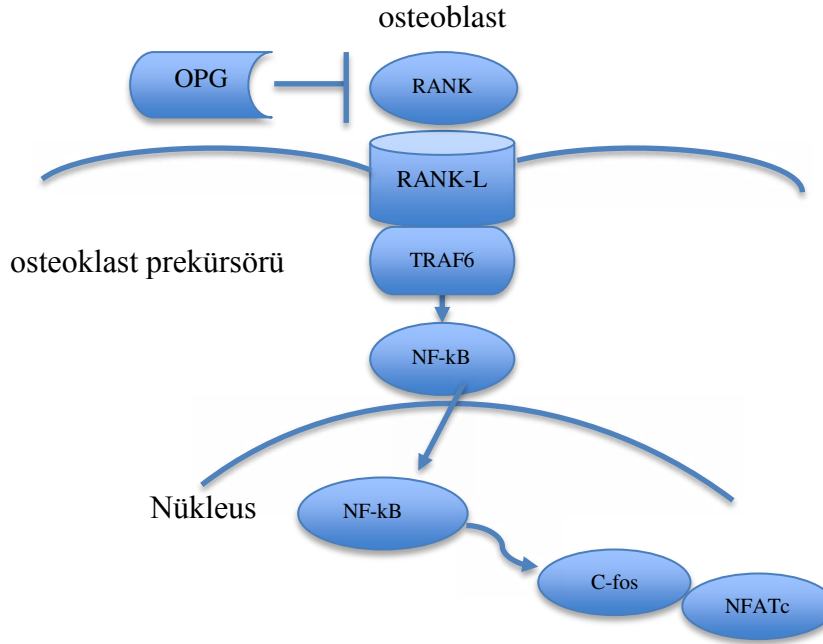
2.5. PSA'DA NF-KB YOLAĞI

Osteoklastlar, mononükleer prekürsörlerinin sitoplazmik füzyonu ile oluşan ve kemik destrüksiyonuna neden olan multinükleer hücrelerdir. Prekürsörlerin osteoklastlara dönüşebilmesi için c-Fos ve RANK-L aktivasyonuna gerek vardır. Osteoblastlar osteoklast oluşumunda ve kemik rezorbsiyonunda önemli rol üstlenir. Osteoblastik stromal hücrelerin makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ve RANK-L ile uyarılmasıyla progenitör hücrelerin osteoklastlara dönüşümü sağlanır. Osteoklastlar aktinden zengin olan özelleşmiş podozomlarıyla kemik yüzeyine sıkıca bağlanırlar [44].

Osteoklastogenezin düzenlenmesinde OPG/RANK/RANK-L sistemi görev alır. Preosteoklastların üzerinde bulunan RANK reseptörüne RANK-L bağlanarak osteoklastlara dönüşümünü sağlar ve kemik yıkımını gerçekleştirir. Osteoprotegerin de RANK-L için tuzak reseptör görevini görür ve kemik yıkımını baskılar. Bu sistem metabolik kemik hastalıklarında, arterial kalsifikasyonda ve immün sistem üzerinde etkilidir. Fizyolojik koşullarda RANK-L osteoblastlar tarafından üretilir ve RANK reseptörüne bağlanmasıyla TNRF ilişkili faktör-6 (TRAF-6) uyarılır. TRAF-6 da NF-kB'yi aktive ederek nukleusta c-Fos sentezini uyarır. Artan c-Fos sentezi aktive T hücrelerinin nükleer faktörü (NFATc1) ile etkileşerek osteoklastogenik genlerin transkripsiyonunu tetikler [3].

Osteoklastlar inflamatuvar kemik hastalıklarında immün yanıt regülasyonunda görev alırlar. Osteoklastlarda eksprese edilen Fc reseptör gama subüniği (FcR γ) DNAX-aktive protein12 adaptör proteini aracılığıyla immün yanıtta rol alır. İnflamatuvar kemik hastalıklarında sistemik olarak artmış olan TNF, kemik iliğinde osteoklast prekürsörlerinin sistemik dolaşıma geçişini tetikler. Bu osteoklast prekürsörleri osteoklastlara dönüşür, TNF ve RANK-L'a yanıt olarak TNF salgılanması artar. Ayrıca otoamplifikasyonla da osteoklast sayısı artırılır. Osteoklast ve onun prekürsörleri sitokin, kemokin ve çeşitli faktörleri salgılar,

immün sistem ve diğer hücrelerle etkileşerek kemik turnoverını artırır ve kemik yoğunluğunun azalmasına neden olur [44].



Şekil 1: RANK/RANK-L ile osteoklastogenez yolağının gösterimi

2.5.1. RANK

RANK, TNF reseptör super ailesine ait 616 aminoasitlik bir transmembran proteindir. Osteoklastların dışında B ve T lenfositler, makrofajlar, fibroblastlar ve dendritik hücrelerin yüzeylerinde de bulunur. Osteoklastogenez ve kalsiyum metabolizmasının düzenler. RANK-L ve osteoprotegerinin reseptörüdür. RANK-L, RANK'a bağlandığında NF-κB, c-jun amino terminal kinaz aktivatör protein-1, c-myc ve NFAT-c1 sinyal yolları uyarılarak osteoklastogenez gerçekleştirilir. TNF reseptörü ilişkili faktörler (TRAF) RANK-L'ın RANK'a bağlanmasıyla sinyalizasyonu iletir. TRAF2, TRAF5, TRAF6 RANK'a bağlanır fakat bunlardan sadece TRAF6 osteoklast fonksiyonu için önemlidir [7].

Src, MKK/p38/MITF yolakları ile de osteoklast aktivasyonu ve canlılığının sürdürülmesi sağlanır. Osteopetrozis hastalarında RANK reseptöründe mutasyon ve kemik rezorbsiyonunda hasar tespit edilmiştir [3, 44].

2.5.2. RANK-L

TNF ligand ailesinin bir üyesi olan RANK-L, 317 aminoasitten oluşmuştur. Hem fizyolojik hem patolojik durumlarda kemik rezorbsiyonunda görevli olan önemli bir mediyatördür. Osteoblast lenf nodu, akciğer, timus, dalak ve kemik iliğinde sentezlenir. Osteoblastlarda RANK-L sentezlenmesi, osteoklast oluşumu ve aktivasyonunu sağlar. Osteoblastların dışında T lenfositlerden de RANK-L salınması psöriatik artritte ve diğer inflamatuvar kemik hastalıklarında da bu yolağın etkili olduğunu göstermektedir. T lenfositlerden salınan RANK-L, osteoklastlardan c-fos yoluyla IFN- β üretimini arttırarak etki eder [3, 44].

2.5.3. Osteoprotegerin

Osteoprotegerin 380 aminoasitten oluşan bir glikoproteindir. Tümör nekroz faktör super ailesine dahildir fakat sitoplazmik ve transmembranik kısımlar içermez. Yedi yapısal bölgeden oluşur. N-terminal bölgesinde dört adet sisteinden zengin bölge içerir. Bu glikoproteinin 1. ve 4. bölgeleri osteoklastogenezi inhibe edici özelliğe sahiptir. C-terminalinde ise 5. ve 6. bölgeler bulunmakta olup bunlar ölüm bölgeleri olarak adlandırılmaktadır. OPG'nin 4., 5. ve 6. bölgeleri apoptotik sinyal iletimi ile ilişkilidir ve bu bölgeler OPG'nin TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ile bağlanarak apoptozu inhibe etmesini sağlar. 7. bölgede heparin bağlayan bir kısım bulunur. Bu kısmıyla sindekan-1 adlı transmembran proteinine bağlanarak hücre içine alınır ve lizozomlarda yıkılır. Heparin bağlayan bölge, RANK-L bağlayan bölgeden uzaktır ve kemik yıkımı ile ilişkisi yoktur [3, 45].

OPG ekspresyonu birçok sitokin, peptid ve hormon tarafından düzenlenir. TNF-alfa, TGF- β , IL-1 α , IL-18 ve östradiol, OPG miktarını arttırır. Parathormon, siklosporin A, Prostoglandin E- 2, Prostoglandin F- 2 ise OPG ekspresyonunun inhibe eder. Bunların dışında WNT/ β catenin ve Jagged 1/ Notch 1 yolakları da OPG ekspresyonunu tetikler [3, 44].

OPG'nin etkisi RANK/RANK-L etkisine zıttır. RANK'a bağlanarak kemik yıkımını engeller ve osteoprotektif rol oynar. Hipokalsemiye neden olur. Kemik rezorpsiyonunun arttığı otozomal resesif geçişli Paget hastalığında ve idiyopatik hipofosfatazyada OPG'nin çeşitli bölgelerinde delesyon saptanmıştır. Bu durum OPG'nin kemik koruyucu rolünü göstermektedir [46, 47].

2.6. MiKRORNA'LAR

MikroRNA'ların keşfine kadar gen ekspresyonunun regülasyonunda DNA'nın metilasyonu, histonlar ve transkripsiyon faktörlerinin etkili olduğu bilinmekteydi. Son dönemlerde gen ekspresyon regülasyonunda miRNA'ların etkili olduğu bilinmekte ve bunlar üzerine çalışılmaktadır. miRNA'lar ilk olarak Ambros ve arkadaşları tarafından gen yolakları araştırmaları sırasında *lin-4* geninin ürünü olan 22 nükleotidlik, hiçbir protein kodlamayan, küçük RNA'ları keşfetmeleriyle başlamıştır. Daha sonra Ruvkun ve arkadaşları tarafından *let-7* geninin eksprese ettiği 22 nükleotidlik RNA bulunmuştur. Sonraki yıllarda birçok organizmada *lin-4* ve *let-7*'ye benzer birçok küçük RNA molekülü bulunmuş ve bunlar miRNA olarak isimlendirilmişlerdir [48, 49].

Hücre içinde, serum, plazma, süt, idrar gibi diğer vücut sıvılarında da bulunan miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid içeren endojen non-coding RNA molekülleridir. Bu moleküller tüm genomda dağınık halde bulunan spesifik miRNA genleri tarafından transkripte edilirler. İnsan genomunun yaklaşık olarak % 1'ini miRNA genleri oluşturur.

Genin kodladığı protein sentezi hücrede iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada transkripsiyon gerçekleşir. Transkripsiyon aşamasında DNA'dan haberci RNA (mRNA) sentezlenir. İkinci aşama translasyon aşamasıdır. Translasyon aşamasında mRNA'dan protein sentezi gerçekleştirilir. miRNA, mRNA'ya bağlanarak translasyona etki eder. miRNA mRNA'nın 3' untranslate bölgesine (3'UTR) bağlanarak degradasyon veya translasyon üzerine etki eder. Bu şekilde miRNA post transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonuna etki etmiş olur.

MiRNA'lar hematopoez, proliferasyon, doku diferansiyasyonu, organogenez, apoptoz ve büyümenin kontrolü, immünite, T hücre fonksiyonu ve diferansiyasyonu gibi çeşitli proseslerde görev alırlar. MiRNA'ların keşfinden sonra değişik hasta grupları ile yapılan çalışmalar sonucunda bazı nörolojik hastalıklarda, kardiyak hastalıklarda, bazı kanser

türlerinde, inflamatuvar hastalıklarda ve immünitede rol aldığı çeşitli yayınlarda gösterilmiştir [12, 13].

Lenfogenez sırasında oluşturulan otoreaktif T ve B hücreleri lenfoid organlarda bulunan kontrol noktalarında susturulur. Bu kontrol noktalarından bazı self-reaktif lenfositler kaçır ve otoimmün hastalık gelişimine yol açarlar. MiRNA'ların immün sistem fonksiyonları üzerine düzenleyici etkisi bozulduğunda otoimmün hastalık gelişimine yol açabileceği düşünülebilir [50].

MiRNA'lar T-hücre aracılı immünitenin de içinde olduğu birçok immün fonksiyona aracılık ederler. Birçok önemli immün fonksiyonun spesifik miRNA'lar tarafından regüle edildiği gösterilmiştir.

2.6.1. MiRNA Sentezi

MiRNA sentezi üç aşamada gerçekleşir. İlk olarak nükleusta primer miRNA (pri-miRNA) transkripsiyonu gerçekleşir. Daha sonra pri-miRNA'lar prekürsor miRNA'lara (pre-miRNA) dönüştürülür. Son adımda ise sitoplazmada olgun miRNA'lar oluşur.

Pri-miRNA'lar genomik DNA'dan RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla sentezlenir. 500-3000 nükleotidden oluşan pri-miRNA, cap ve poli-A kuyruğuna sahiptir. Bu pri-miRNA, RNAaz III ailesine ait bir endonükleaz olan drosha ve onun kofaktörü olan pasha tarafından hairpin loop'larıyla katlanarak sekonder yapıyı oluşturur ve 60-70 nükleotidlik pre-miRNA adını alır. Bir nükleaz olan drosha ile bir çift iplikli RNA bağlayıcı protein olan pasha'nın oluşturduğu kompleks mikro işlemci kompleks adını alır [51].

Sitoplazmaya pre-miRNA'nın taşınması exportin 5 ve RAN-GTP proteinleriyle olur. Sitoplazmada bir endonükleaz olan dicer ile kesilerek 20-22 nükleotidlik dupleks RNA haline getirilir. Ayrıca dicer, RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. Pre-miRNA'nın sap ilmiği kesildikten sonra miRNA dupleksinden biri RISC kompleksinde bulunan bir RNAaz olan argonaute tarafından bu dupleks iplikten 5'ucu daha kararlı olan seçilip komplekse dahil edilir. Seçilen iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak isimlendirilir. Diğer iplik de yolcu iplik veya anti-kılavuz iplik olarak isimlendirilir ve RISC kompleksi tarafından sindirilir. RISC kompleksine bağlandıktan

sonra miRNA'lar argonaute proteinleri aracılığıyla ya mRNA yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar [52, 53].

2.6.2. MikroRNA 146a

MikroRNA 146a (miR146a) akut inflammatuar cevabı regüle ederek doğal immünitede rol alan bir miRNA'dır. İnsanda 5. kromozomda LOC285628 geninde lokalizedir [54]. Asıl olarak CD68⁺ makrofajlarda, bunun yanında CD3⁺ T lenfosit ve CD79a⁺ B lenfositlerde de eksprese edildiği bilinmektedir [55]. TNF- α ve IL-1 β gibi proinflammatuar sitokinlerin salınımına etki eder. İnterlökin-1 reseptör ilişkili kinaz-1 (IRAK-1) ve TRAF-6 genleri üzerine etki ederek proinflammatuar sitokinlerin salınımını azaltır. NF-kB sinyal yolağına etki eder, T hücre regülasyonu yapar. miR146a'nın T hücreleri aktivasyonu üzerine etkisi, T hücre ölümünü inhibe etmektir [52, 56]. miR146a, IRAK-1 ve TRAF6 genlerinin ekspresyonuna etki eder; bu şekilde toll-like reseptör (TLR) ve IL-1 sinyal yolağına negatif regülatör etki yapar. IRAK-1, NF-kB aktivasyonunda TLR/IL-1 reseptör (TIR) aracılı etki eder. NF-kB de TNF- α ve IL-8 ekspresyonunu artırarak bunlarla ilişkili birçok immünolojik reaksiyonlar üzerine etki etmiş olur [12]. miR146a'nın IRAK-1 ve TRAF6 üzerine etki ederek bu sitokinlerin salınımını baskılayarak kondrosit hasarında rol aldığı tespit edilmiştir.

Kondrositlerde miR146a'nın apoptozu indüklediği, özellikle mekanik hasara cevap olarak VEGF ekspresyonunu arttırdığı, Smad4 gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Smad4'ün mRNA'sının 3'UTR bölgesinde miR146a'nın da sekansı olduğu keşfedilmiştir. Bu sayede Smad4'ün miR146a'nın direk hedefi olduğu anlaşılmıştır.

miR146a ekspresyonu lipopolisakkarit ve proinflammatuar mediatörlere cevap olarak indüklenir. Bu indüklenme NF-kB yolağı tarafından regüle edilir. Yapılan bir miRNA mikroarray teknolojisi çalışmasında, hasarlı ve normal kondrositler karşılaştırıldığında mekanik hasarlı olan kondrositlerde miR146a'nın upregüle edildiği tespit edilmiştir. Bioinformatik analizler sonucunda da Smad4'ün miR146a'nın hedef geni olduğu ve hasarlı kondrositlerde apoptozu tetiklediği gözlemlenmiştir [13]. Bu mekanizmaya benzer olarak PsA'da da kondrosit hasarından miR146a'nın sorumlu olduğunu düşünmekteyiz.

2.6.3. MikroRNA 21

MikroRNA 21 (miR21)'in birçok kanser tipinde, kardiyovasküler hastalıklarda ve otoimmün hastalıklarda çalışılmasıyla birçok hücre üzerinde antiapoptotik, antiproliferatif olduğu keşfedilmiştir [57]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da miR21'in inflamatuvar hastalık gelişimine ve T hücre diferansiasyonuna katıldığı tespit edilmiştir. Allerjik hastalıklarda Th2 cevabını arttırdığı bulunmuştur. Fakat regülatuar T hücreleri üzerine etkileri belirlenememiştir.

Tümöröenezise katılan ve Th17 diferansiasyonuna direk etkili bir transkripsiyon faktörü olan STAT3, miR21'in hedefidir [58, 59]. STAT3 aynı zamanda miR21 ekspresyonunu regüle edebilir. Ayrıca STAT5 de miR21'e bağlanıp upregüle ederek regülatuar T hücrelerinin diferansiasyonunu sağlayarak immün sistem üzerine aktivatör etki gösterir [14]. Bu yüzden RA'da Th17/Treg hücre dengesinde miR21'in etkisi olduğu düşünülmüştür. Romatoid artritli hastalarda periferel kanda Th17 hücrelerinde artışın, T regülatuar (Treg) hücrelerinde azalmanın proinflamatuvar sitokin artışına eşlik ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca RA hastalarında STAT3'de artma, miR21 ve STAT5'de azalma tespit edilmiştir. Bu yüzden STAT3/STAT5 regülasyonu aracılığıyla Th17/Treg hücre imbalansında miR21'in katkısı olabileceği düşünülmüştür. RA hastalarında periferel kanda Th17/Treg hücre oranı ile miR21'in negatif korele olduğu bulunmuştur [15].

T hücrelerine etkisi ise hücrenin tipine göre değişir. Hafıza T hücreleri üzerine antiapoptotik etkide bulunur. Saf T hücreleri üzerine ise CCR7 üzerinden regülasyon yapar [52]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda miR21'in de inflamatuvar hastalıklar üzerine ve T hücre diferansiasyonu üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Hem CD4⁺ T hücrelerinde, hem de CD8⁺ T hücrelerinde miR21 aktivasyonunun, inflamasyona ve T hücre apoptozunu baskılamaya neden olduğu tespit edilmiştir.

miR21'in sağlıklı bir cilde göre psöriatik cilt lezyonlarında arttığı, bu yüzden psöriazis patogeneğinde etkili olduğu düşünülmüştür. UV terapi uygulanarak tedavi edilen psöriatik cilt lezyonlarında ise miR21 ekspresyonunun baskılandığı gözlenmiştir.

miR21 ayrıca iyi bilinen bir onkojendir. Birçok solid tümörde ve lösemi tiplerinde up-regüle edildiği gösterilmiştir [57].

2.7. T HÜCRE CEVABI ve IL-17

Yaklaşık 25 yıl önce Mossman ve Coffman, T helper hücrelerini Th1 ve Th2 olarak üzere iki gruba ayrıldığını bulmuşlardır [60]. Bunlar farklı sitokinelere ve farklı efektör fonksiyonlara sahiptirler. Th1 hücreleri IFN- γ üretirler. Gecikmiş tipte hipersensitivite reaksiyonları, makrofaj aktivasyonu ve intrasellüler patojenlerin yok edilmesinden sorumludurlar. Th2 hücreleri de IL-4, IL-5, IL-13 ve IL-25 sitokinlerinin salınımını ve IgE üretimi gerçekleştirirler. Eozinofilik inflamasyondan, helmintik parazitik enfeksiyonların yok edilmesinden sorumludurlar. IFN- γ , IL-12 ve Tbox transkripsiyon faktörü (T-bet); Th1 diferansiyasyonunu, IL-4 ve GATA-3 adlı transkripsiyon faktörleri ise Th2 diferansiyasyonunu kontrol ederler.

IL-17 sitokin ailesinin keşfinden sonra bunların üretimini gerçekleştiren ayrı bir T hücresi olduğu tespit edilmiş ve bu hücre Th17 olarak adlandırılmıştır [61]. IL-17 osteoklastogenez ve artrit oluşumunda rol oynayan önemli bir sitokindir [62]. Th17 oluşması için CD4⁺ T hücrelerinin TGF- β ve IL-6 tarafından uyarılması gereklidir. Bu da ROR- γ t transkripsiyon faktörünün ekspresyonu ile sağlanır. Bu sayede IL-17'nin salınımı sağlanmış olur. Th17 hücresinden IL-17 dışında ayrıca önemli miktarda TNF- α ve IFN- γ da üretilir [63].

IL-6'nın Th17 hücre farklılaşmasına etkisi STAT3 transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilir. Bu da ROR- γ t ekspresyonunu gerektirir. IL-1 β ve IL-23 de ROR- γ t indüksiyonunda önemli role sahiptir. IL-23, Th17 hücrelerinin çoğalmasını sağlar, IL-17 üretimini artırır. Otoimmün inflamasyonda önemli role sahiptir.

IL-17, osteoklastogenezde RANK-L aktivasyonu ile rol alır. Daha önceden yapılan çalışmalarda artritle hastaların sinoviyal sıvısında, periferik kan mononükleer hücrelerinde IL-17'nin arttığı gözlenmiştir. Bu IL-17 artışı da Nf-kB aktivasyonunu başlatır. Nf-kB de doğal immünitede görevli birçok genin transkripsiyonunu sağlar. Bunlar CXCL8 (IL-8), CCL-20, IL-6, TNF- α , granulosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), granulosit ve monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), akut faz proteinleri gibi kemokinlerdir. Yani IL-17 antimikrobial savunmada, nötrofil üretiminde de görevlidir. IL-17 eksikliği olan farelerde antikor cevabında defekt olduğu gözlenmiştir [64].

PsA'da CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri ve nötrofiller, cilt ve eklemlerde infiltrat olurlar. CD4⁺ T hücreleri ciltte dermal papillada, eklemlerde de sub-lining stromada bulunur. CD8⁺ T hücreleri de ciltte epidermiste, inflamatuvar eklemlerde entezit bölgelerinde bulunur. Üçüncü bir grup

olarak tanımlanan Th17 hücrelerinden karakteristik olarak IL-17A üretilmektedir. Bu Th17 hücreleri PsA hastalarında dolaşımda ve sinoviyal sıvıda artmıştır. Ayrıca IL-17A sinoviyal sıvıda bulunan nötrofil ve makrofajlardan da salınır. Psöriaziste cilt lezyonlarında bulunan IL-17A düzeyi hastalık aktivitesi ile ilişkilidir. Bu sitokin endotelial hücrelerde, fibroblastlarda, monositlerde, keratinositlerde; proinflamatuvar antimikrobial peptidlerin, kemokinlerin ve anjiyogenik faktörlerin üretimini stimüle eder. IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ve IL-17F sitokinleri de IL-17A'ya yapıcı benzeyen, Th17 hücrelerinden salınan, fakat fonksiyonları tam olarak tanımlanmamış olan sitokinlerdir [1].

IL-17A ilk olarak 1993'de CTLA-8 klonundan elde edilmiştir [65]. IL-17'nin keşfinden sonra psöriazis, PsA, RA ve multipl sklerozun (MS) da dahil olduğu birçok otoimmün hastalıkta rolü olduğu düşünülmüştür. İlk olarak 1998'de inflamatuvar artritlerde sinoviyal sıvıda IL-17 tespit edilmiştir [66]. Yapılan bir çalışmada IL-17'nin PsA'da keratinositlere, sinoviositlere ve osteoklastlara direkt olarak etki ettiği gösterilmiştir. Bu durum keratinosit, sinoviosit ve osteoklastların IL-17 reseptörünü eksprese etmesi ile gerçekleşir. Psöriatik cilt ve eklem dokularında IL-17'nin miktarının arttığı tespit edilmiştir. PsA'da sinoviyal dokuda serumdan daha fazla miktarda Th17 hücresi olduğu tespit edilmiştir [67].

PsA hastalarında kardiyovasküler risk ortaya çıkmaktadır. Kronik inflamasyon aterosklerotik süreci aktive etmektedir. PsA'da IL-23, IL-17, TNF- α , IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin artmış ekspresyonu ateroskleroz patogenezinde etkili olur. Aterojenez; PsA'daki gibi makrofajları, T hücrelerini kapsayan bir süreçtir. Th1 hücreleri aterojenik süreci başlatır, Th17 hücreleri de plak stabilitesine neden olur. Akut koroner sendromlu hastaların periferik dolaşımında da Th1 ve Th17 sitokinlerinin arttığı saptanmıştır [29].



Şekil 2: Th17'nin uyarımı ve sitokini olan IL-17A'nın etkileri

2.8. APOPTOZ VE NEKROZ

Organizmada hücre ölümü iki şekilde gerçekleşebilir. Programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz ilk olarak 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından ölen hücrelerin çekirdeklerinde kromatin yoğunlaşmasının gösterilmesi ile tanımlanmıştır [68]. Apoptoz; enfeksiyon, kromozomal anomali, hücresel hasar gibi birçok nedenle hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan fizyolojik bir süreçtir. Embriyonik dönemden başlayarak yaşlanma dönemine kadar organizmanın homeostazisinde etkili rol oynar. Embriyonik dönemde ekstremitelerin oluşumunda, dişide wolf kanalı, erkekte müller kanalı körelmesinde, merkezi sinir sisteminde nöron sayısı düzenlenmesinde ve sindirim sistemi organlarının oluşumunda rol oynar. Doğumdan sonra ise immün sistem fonksiyonunda, T ve B lenfosit seçiminde, virüsle enfekte olmuş hücrelerin, DNA hasarı gerçekleşmiş olan hücrelerin ve kimyasalların indüklediği hücre ölümünün sağlanmasında görev alır. Hücre siklusunda yapım-yıkım dengesini sağlar ve sıkıca kontrol edilir. Vücutta hasar görmüş olan veya vücut için zararlı olabilecek hücrelerin ortadan kaldırılmasında apoptoz görevlidir [69, 70].

Klasik hücre ölümü olarak tanımlanan nekroz; akut inflamasyon ve patolojik durumlarla ilişkili olan hücresel cevaptır. Nekrozda bir veya daha fazla sayıda hücrenin geri dönüşemez şekilde hasar görmesi sonucu hücre ölümü gerçekleşir. Bu durum yanık, enfeksiyon, kanser gibi durumlarda görülür. Nekrozda hücrede ATP üretimi azalır, bazı proteazlar aktive olur, hücre içine kalsiyum girişi ve serbest oksijen radikalleri üretimi artar. Hücrede ATP yetersizliğine bağlı olarak sodyum-potasyum kanal dengesi bozulur ve hücre su alarak şişer. Hücrenin şişmesi artan osmotik basınç nedeniyle hücrenin patlamasına neden olur. Hücre içeriği ekstrasellüler matrikse boşalır ve bu durum inflamasyona neden olur[71].

Hücrede çok hızlı bir enerji yetmezliği veya toksik bir etki sonucu zar geçirgenliğinin hızla artmasıyla osmotik dengenin bozulması sonucu hücre patlaması ve hücre içeriğinin dış

ortama dağılmasıyla gerçekleşen nekrozdan; apoptoz birçok özellik açısından farklı olan bir ölüm mekanizmasıdır. Apoptozis nekrozun aksine enerji gerektiren ve ligand-reseptör etkileşimi ile oluşan bir işlemdir. Apoptozda hücre membranı sağlam kalır fakat hücrede blepler oluşarak parçalanma gerçekleşir. Apoptoz fizyolojik durumlarda da gerçekleşebilirken nekroz her zaman patolojik bir etki sonucu gerçekleşir. [69, 70].

2.8.1. Apoptozda Mekanizma

Apoptozda ana mekanizma nükleusun yoğunlaşp sonra hücrenin tomurcuklanmayla parçalara ayrılmasıdır. İmmun elektroforezde laddern pattern görülür. Apoptozun erken evresinde organellerde kayıplar olur. Plazma membranındaki sodyum, potasyum ve klor taşıyıcı sistemlerinin bozulmasına bağlı olarak hücre büzüşür. Hacminde yaklaşık 1/3 oranında bir küçülme gerçekleşir. Hücre yüzeyinde var olan mikrovilluslar kaybolur. Plazma membranında transglutaminaz enziminin etkili olmasıyla zarda tomurcuklanma gerçekleşir. Normal bir hücre membranında iç tabakada bulunan fosfotidilserin ve fosfotidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfotidilkolin, ATP bağlı translokaz sayesinde asimetric pozisyonda tutulmaktadır. Apoptozda ATP bağlı translokazın bozulmasına bağlı olarak bu asimetri bozulur ve fosfotidilserin dış yüzeye yerleşir. Bu da apoptotik cisimciklerin fagositozu için uyarı sağlar [70, 72].

Apoptoz; intrasellüler kalsiyum artması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressor gen olan p53 aktivasyonu veya dışarıdan tümör nekroz faktör, koloni stimüle edici faktör (CSF), insulin benzeri büyüme faktörü (IGF), glukokortikoidler, hipertermi, radyasyon veya çeşitli ilaçlar ile indüklenir. Apoptoz sürecinde üç ana bileşen rol alır. Bunlar Bax/Bcl-2 ailesi, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) proteindir [70].

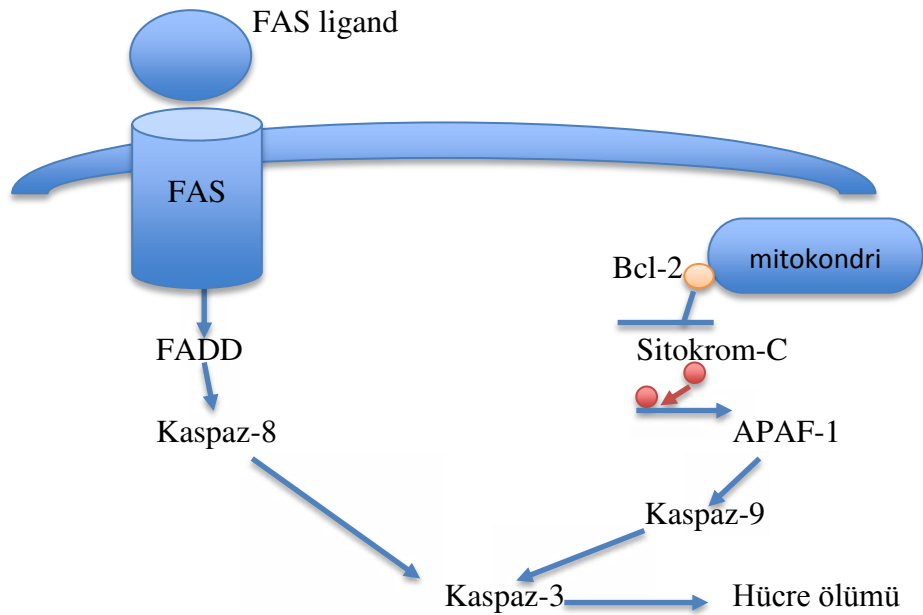
Apoptozun mikroskobik özellikleri; hücrede küçülme, kromatin kondensasyonu, nükleer yapının değişmesi, tomurcuklanmayla apoptotik cisimlerin oluşması ve membran blebbingdir. Ölü hücreler fagositik aktivite ile hızlıca yok edilirler ve inflamasyon oluşması engellenir.

2.8.2. Apotozda İntresik Ve Ekstrinsik Yolak

Apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik yol olmak üzere iki yoldan gerçekleşebilir. Hücre

membranında bulunan ve tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesinin üyeleri olan Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin kendi ligandlarıyla uyarılmasıyla ekstrinsik yol başlar. Bunlar hücre ölüm reseptörleri olarak da adlandırılırlar. Bu reseptörlere bağlı olarak bulunan adaptörler; TNFR-1 ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ile etkileşim sonucu prokaspaz 8'i aktiveleştirip kaspaz 8'e dönüşümünü sağlayarak hücrenin yıkımını iletirler [70]. Hücre içinde reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıkmasıyla, DNA hasarıyla, Bax'ın uyarılması ve mitokondri zarının permeabilitesini azaltmasıyla da intrinsik yol başlar. Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol, aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizma oluşturur.

Bax/Bcl-2 ailesine ait 20 üye tanımlanmıştır. Bunlardan Bax proapoptotiktir. Reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıkmasıyla, DNA hasarıyla, Bax'ın uyarılması mitokondri zarının permeabilitesini azalır. Permeabilitenin azalmasına bağlı olarak sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) sitoplazmaya geçer. AIF kromatin yoğunlaşmasını sağlar. Sitokrom c ise sitoplazmada bulunan Apaf-1 proteinine bağlanarak prokaspaz-9 aktivasyonunu sağlar. Daha sonra kaspaz-9 kaspaz-3 ü aktiveleştirerek etki gösterir. Kaspaz-3 de hücrede apoptozu gerçekleştirir [70].



Şekil 3 : Apoptozda intrinsik ve ekstrinsik yolağın gösterilmesi

2.8.3. Kaspazlar ve Sitokeratinler

İster intrinsik ister ekstrinsik yolla başlamış olsun, apoptotik süreç, kaspazlar adı verilen aspartat spesifik proteazlar tarafından gerçekleştirilir. Bu kaspazlar apoptotik süreçte aktive olurlar. DNA'nın tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler apoptotik süreci devam ettirirler. Hücre iskeleti proteinlerinin kırarak hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar[73].

Kaspazların bir düzine farklı türü tanımlanmıştır. Sitoplazmada inaktif halde bulunurlar ve proteolitik etkileriyle birbirlerini aktifleştirirler. Aktif katalitik bölgelerinde sistein içerirler ve peptid bağlarını C terminal uç aspartat rezidülerinden keserler. Apoptozda kaspazların aktivasyonu ile hücredeki birçok protein yıkılır. İntermediate filamentler de bunlardandır. Kaspaz-2-8-9-10 başlatıcı kaspazlardır. Kaspaz-3-6-7 ise efektör kaspazlardır. Kaspaz-1-4-5-11-12-13-14 ise inflamatuvar kaspazlardır. Kaspaz-3 sitoskeletal proteinlerin yıkımını sağlar, sellüler yapının bir parçası olan sitokeratinlerin salınmasına neden olur [9, 74].

Kaspazlar hücrede yaklaşık 100 kadar proteine etki ederler. Sitokeratinler de apoptozda kaspazın böldüğü protein yapılardan biridir. Sitokeratinler epitelyal hücrelerden eksprese edilen apoptotik ve nekrotik hücre ölümünde kana intakt ya da kaspaz-cleaved formunda salınan intermediate filament ailesine ait olan proteinlerdir. 20 den fazla sitokeratin tanımlanmıştır. Özellikle CK 8-18-19 epitelyal hücrelerde en fazla bulunan sitokeratinlerdir. Daha önceden çalışılmış olan üç sitokeratin belirteci vardır. Bunlar doku polipeptid antijen (TPA), doku polipeptid spesifik antijen (TPS) ve CYFRA 21-1 dir. TPA geniş spektrumludur. Sitokeratin 8, 18 ve 19 u ölçer. TPS ve CYFRA 21-1 daha spesifiktir. Sitokeratin 18 ve 19 u ölçer [75].

Bu sitokeratinlerden biri olan CK 18 apoptozda iki parçaya ayrılır. Bunlardan biri non-cleaved CK 18, diğeri cleaved CK 18'dir. Nekrozda ise yalnızca non-cleaved CK 18 salınır. Akut inflamasyon ve doku hasarı gibi durumlarda total sitokeratin 18, M30 monoklonal IgG antikoruyla tespit edilirken; non-cleaved CK 18, M65 monoklonal IgG antikoruyla tespit edilir. M30/M65 oranı da apoptozun total hücre ölümüne oranını verir. M30; kaspazın ayırdığı CK 18'in 387-396. pozisyonlarını içeren 21 kDa luk epitopu tanıyan monoklonal antikordur. Yani apoptotik hücre ölümünün selektif biomarkerıdır. M65 ise hem kaspaz-cleaved formu hem de full-length formu tanır. Yani yalnızca non-cleaved CK 18'i değil ayrıca nekrozda dolaşıma salınan intakt CK 18'i de ölçer [10, 11].

Hücrede apoptozu indükleyen bir sitokin de TRAIL'dır. Eklemlerde osteoprotegerin de TRAIL'e bağlanarak apoptotik etkisini nötralize eder. TRAIL hücre siklusunu durdurarak sinoviyal hücrelerde de apoptozu tetikler. PsA hastalarında da TRAIL seviyesinin arttığı tespit edilmiştir [72].

Apoptoz birçok immün hastalıkta immün mekanizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynar. Daha önceki çalışmalarda sistemik lupus eritmatous (SLE) gibi otoimmün hastalıklarda; RA, ankilozan spondilit (AS) gibi artritlerde apoptozun indüklendiği tespit edilmiştir [72]. Psöriaziste apoptozun azaldığı, bu yüzden de psöriatik lezyonlarda T lenfosit apoptozunu indükleyen metotreksat ve UV-B radyasyonun tedavi için kullanıldığı bilinmektedir [76].

Bcl-2; hücreleri apoptoza karşı koruyan protoonkogendir. Psöriazisli hastaların serumlarında Bcl-2 çalışıldığında kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir. Jin ve arkadaşlarının osteoartritli hastalarda yaptığı çalışmada miR146a'nın kondrositlerde apoptozu tetiklediğini tespit edilmiştir [13].

2.8.4. Romatolojik Hastalıklarda Apoptoz

Romatolojik hastalıklar hedef dokuda destrüksiyon ve inflamasyonla karakterizedir. Apoptoz doku hasarı ile ilişkilidir. İnflamasyon ve doku hasarında bazı hücrelerde nekroz olabilirken büyük çoğunluğunda da apoptoz gözlenir. CD8⁺ T hücreleri, CD4⁺ T hücreleri, makrofajlar ve NK hücreleri; perforin, granzim enzimleri, Fas-ligand (Fas-L) ve TNF- α salınımı ile apoptozu indükleyebilir. Daha önceden yapılan bir çalışmada RA'da sinoviyositlerde apoptozun artmış olduğu tespit edilmiş, bu durumun artan IL-1 β ve TGF- β sitokinlerinin etkisi ile gerçekleştiği düşünülmüştür [77]. TNF- α RA'da ana mediatördür ve NF-kB yolağının apoptozda etkili olduğu düşünülür. Ayrıca inflamasyonda oksidatif değişikliklerin p53 proteininde up-regülasyona neden olması beklenmektedir. Hem NF-kB yolağı, hem de p53 proteininde gerçekleşen up-regülasyon ile apoptoz indüklenir [78]. PsA'da salınan sitokinler de RA hastalarında salınan sitokinler ile aynı olduğu için PsA'da da apoptozun arttığını düşünmekteyiz.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 KONTROL VE HASTA GRUPLARININ ÖZELLİKLERİ

Çalışmamız Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı ve Dermatoloji Anabilim Dalı'nda Şubat 2015 ve Temmuz 2015 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

Çalışmaya Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı ve Dermatoloji Anabilim Dalı'na başvuran CASPAR çalışma grubunun [43] PsA için tanımlamış olduğu sınıflandırma kriterlerine uyan 51 PsA hastası alındı. Bilinen herhangi bir hastalığı olmayan 36 kişi de kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. 17-70 yaş arası olmak
2. CASPAR kriterlerine göre 3 ve üzeri puan almış olmak

Kontrollerin çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. 17-70 yaş arası olmak
2. Diyabet, hipertansiyon gibi herhangi bir kronik hastalığa ve maligniteye sahip olmamak

Çalışma protokolünün amacı, gereç ve yöntemleri, gönüllü bilgilendirme metninin kontrol edilmesi sonucunda Helsinki Deklarasyonu Kararlarına, etik kurallara ve Hasta Hakları Yönetmeliği'ne uygun olarak tasarlandığına ilişkin Bezmialem Vakıf Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 25.12.2014 tarihinde 22/26 nolu kararla etik kurul onay belgesi alındı. (Ek1). Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından 12.2014/37 nolu araştırma projesi olarak desteklendi. Çalışmaya alınan PsA'lı hastalardan ve kontrol grubundan çalışmaya katıldıklarına dair yazılı onam alındı (Ek 2).

Başvuru sırasında hastaların genel fizik muayene bulguları yapılmış olup eklem ve cilt bulguları değerlendirildi. Psoriasis area severity index (PASI) skorları belirlendi. Bu değerlendirmelerden sonra hastalardan jelli biyokimya tüpüne kan alınıp 3000 rpm'de 10 dakika (dk) santrifüj edildi. Elde edilen serumlardan çalışılmış olan CRP değerleri kaydedildi. Ayrıca hastadan 1 tüp de sedimentasyon tüpüne kan alınıp, sedimentasyon değerleri çalışıldı ve kaydedildi. Hastaların serumlarından gereken parametreler çalışıldıktan sonra serum

örnekleri -80°C de 4 adet ependorf tüpüne yedeklenerek çalışma gününe kadar saklandı.

Çalışma gününde örnekler oda ısısına getirildi. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tekniği kullanılarak IL-17A, M30 ve M65 parametreleri çalışıldı. Farklı bir ependorfa ayrılmış olan serum numunesinden de RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilmiş olan RNA'lerden da apoptoza spesifik olan miR146a ve miR21'in komplementeri olan cDNA'lar elde edildi. Bunlardan da real-time PCR ile miR146a ve miR21 çoğaltılarak miktarı incelendi.

3.2.KAN ANALİZİ:

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubunun antekubital bralkial veninden vacutainer kullanılarak 2 jelli biyokimya tüpüne ve 1 sedimentasyon tüpüne kan alındı. Numunelerin sedimentasyon değerleri hemen çalışılıp kaydedildi. Biyokimya tüpüne alınan materyal 1500 g'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen serumdan CRP çalışılmış olup artan materyal ependorfa alınıp çalışma gününde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

Çalışma gününde ependorflar oda ısısına getirilerek donmuş halde olan serumların erimesi sağlandı. Eritme dondurma işlemi tekrarlanmadan IL-17A, M30, M65 ve miR146a ve miR21 parametreleri çalışıldı.

3.3. GEREÇLER

- Santrifüj (Nüve NF1200, Nüve NF1200R)
- Analitik terazi (Precisa Gravimetrics AG, XB 220A, Switzerland)
- Buz makinesi (BAR LINE Autometric Ice Maker, BF 80 AS, Italia)
- Distile su cihazı (Nüve Water Distiller-ND112)
- Deiyonize su cihazı (Thermo Scientific Smart2Pure 6UV/UF, 2013/01/03, UK)
- Vorteks (BioCote Voortex Mixer SA8, bibby scientific, UK)
- Orbital karıştırıcı (Biosan, OS-20, EU)
- Etüv (Nüve Cooled Incubator, ES120)
- Manyetik karıştırıcı (Stuart heat stir, CB162, bibby scientific, UK)
- Manyetik balık
- Isıtıcı su banyosu (Nüve ST402)

- Balon joje (1000, 500, 250, 100 mL'lik-LamTek)
- Beher (1000,500,100mL'lik-LamTek)
- -80°C derin dondurucu(New Brunswick Scientific. C54285 model)
- -20°C derin dondurucu(Uğur, UCF 310 SSL)
- +4°C buzdolabı
- Ph Metre (HANNA HI2211 Ph/ORP Meter)
- ELISA okuyucusu (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA)
- ELISA yıkayıcısı (Thermo Scientific WellWash microplate washer, 2011-08,USA)
- Termal Cycler Cihazı (T100 Thermal Cycler, 621BR07607, BioRad, 2012-06, USA)
- Real Time PCR Cihazı (CFX Connect Optics Module, 788BR03732, 2014-07, USA)
- Pipet (1000, 500, 200,100,10 uL'lik; Gilson)
- 8'li multipipet
- Pipet uçları (1000, 200,100,10 uL'lik)
- Light Cycler Multiwell plate
- Plate sealer

3.4. KİMYASAL MADDELER

- IL-17A ELISA kiti (eBioscience, lot no: BMS224/2)
- M30 Apoptosense ELISA kiti (PEVIVA, lot no: PE-RS 3594)
- M65 Apoptosense ELISA kiti (PEVIVA, lot no: PE-RS 3566)
- Total RNA izolasyon kiti (miRNeasy mini kit, cat no: 217004)
- cDNA sentez kiti (qscript microRNA cDNA Synthesis Kit, lot no: 21644)
- Syber Green PCR kiti (miScript SYBR Green PCR Kit, cat no: 218073)
- miR146a primeri
- miR21 primeri

3.5. YÖNTEMLER

3.5.1. Human IL-17A

Human IL-17A parametresi, -80°C de saklanan numuneler oda ısısında eritildikten sonra

Affymetrix eBioscience Platinum ELISA (ref no:109369037; lot no: BMS224/2; Vienna, Austria) markası ile sandviç ELISA yöntemi ile çalışıldı.

3.5.1.1. Kit Bileşenleri:

1. Monoklonal IL-17A ile kaplı olan 96 kuyucuklu mikro kuyucuklu plate
2. Biotinle konjuge edilmiş olan anti-human IL-17A antikoru
3. Streptavidin Horse radish peroksidaz
4. IL-17A standartı
5. High kontrol
6. Low kontrol
7. Numune dilüsyon tampon
8. Çalışma tampon
9. Yıkama tampon konsantre çözeltisi
10. Substrat solüsyonu (tetrametil benzidin)
11. Stop solüsyonu (1M fosforik asit)

3.5.1.2. Test Prensibi

Anti-human IL-17A antikoru kaplı olan kuyucuklara örnekler ve standartlar pipetlenir. Birinci inkübasyon sırasında standartlar ve örnekler, kuyularda kaplı bulunan monoklonal antikorlar ve biotinle konjuge antikorlar ile bağlanır. Yıkama işlemi ile bağlanmayan moleküller ortamdan uzaklaştırılır. IL-17A'ya spesifik streptavidin HRP ile işaretlenen monoklonal antikorlar eklenir. Eklenen bu antikorlar ikinci inkübasyon süresinde kuyucuklara sabitlenen antikorlar tarafından bağlanan IL-17A moleküllerine bağlanarak sandviç modeli oluştururlar. Yıkama işleminden sonra substrat çözeltisi eklenir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için plate üçüncü inkübasyona alınır. Bu inkübasyon sonrası reaksiyon, fosforik asit eklenerek durdurulur. Oluşan rengin absorbansı 450 nm'de ölçülerek numunelerdeki IL-17A konsantrasyonları standart eğrisi yardımıyla hesaplanır.

3.5.1.3. Standartların Hazırlanması

- Liyofilize halde bulunan stok standart çözeltisine 1 mL çalışma tampon eklenerek nazikçe karıştırıldı. 15 dk boyunca iyice çözünmesi beklendi. 8 adet ependorf tüp hazırlandı.
- Birinci ependorf tüpüne 200 pg/mL'lik stok standarttan 225 µL alınarak vortekslendi, iyice karışması sağlandı. 100 pg/mL konsantrasyonda standart hazırlanmış oldu.

- İkinci tüpten yedinci tüpe kadar her tüpe 225 µL seyreltme tamponu ve bir önceki tüpten 225 µL alınarak eklenerek vortekslendi. Her seferinde konsantrasyonu yarıya inen standart çözeltiler hazırlandı. Tüpler vorteksle karıştırılarak çalışmaya hazır hale getirildi.
- Sekizinci tüpe sadece seyreltme tampon konularak bu tüp blank olarak kullanıldı.

3.5.1.4. Standart Konsantrasyonları

Standart no	1	2	3	4	5	6	7	8
Standart Konsantrasyon (pg/ml)	100	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0

3.5.1.5. Test Protokolü

- Çalışmaya başlamadan önce tüm reaktifler oda ısısına getirildi.
- 96 kuyucuklu mikro kuyucuklu plate yaklaşık 400 µL yıkama tamponu ile 2 kere 10-15 saniye (sn) bekletilerek Thermo Scientific WellWash mikropate yıkayıcı ile yıkandı.
- Ependorflarda 200 pg/mL'lik stok standarttan ½ seri dilüsyonla hazırlanmış olan 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL 12,5 pg/mL, 6,3 pg/mL, 3,1 pg/mL ve 1,6 pg/mL konsantrasyonlarındaki standartlardan 100 µL miktarında eklendi. Bir kuyucuğa da sadece seyreltme çözeltisi eklendi. Bu kuyucuk blank olarak kabul edildi.
- Numuneler ve kontrollerden de kuyucuklara 100 µL eklenerek numune, standart ve kontrollerde bulunan IL-17A antijenlerinin kuyucuklarda kaplı olan antikora bağlanması sağlandı.
- Daha sonra tüm kuyucuklara 50 µL biotinle konjuge edilmiş olan anti human IL-17A antikoru eklendi ve plate oda ısısında 2 saat inkübasyona alındı.
- Bu inkübasyon sırasında anti human IL-17A antikorusunun ilk antikoru hapseden IL-17A antijenine bağlanması sağlandı.
- Inkübasyondan sonra bağlanmayan biotinle konjuge edilmiş anti-human IL-17A antikoru seyreltilmiş yıkama tamponu ile 4 kere yıkanarak uzaklaştırıldı.
- Daha sonra 100 µL Streptavidin-HRP eklendi ve tekrar 1 saatlik inkübasyona alındı. Bu inkübasyonda Streptavidin-HRP, biotinle konjuge edilmiş anti human

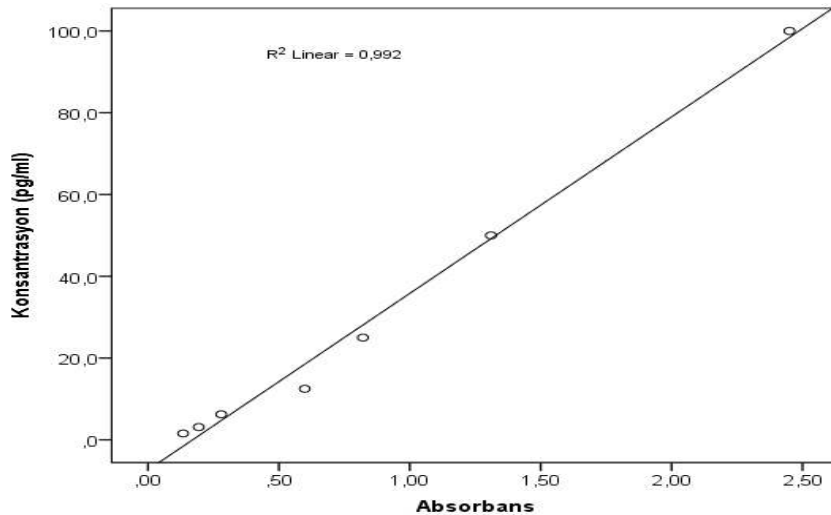
IL-17A antikora bağlandı.

- İnkübasyonun ardından bağlanmamış Streptavidin-HRP'nin uzaklaştırılması için tekrar yıkama yapıldı ve enzimin etki ettiği tetrametil benzidin substrat solüsyonu eklendi.
- 10 dk'lık kısa bir inkübasyonun ardından numune, standart ve kontrollerde bulunan IL-17A miktarıyla orantılı olarak renkli bir reaksiyon ürünü elde edildi. Gerçekleşen reaksiyonun durdurulması için 100 µL stop solüsyonu eklendi.
- Ardından Thermo Scientific Multiskan FC ELISA okuyucusunda hızlıca 450 nm de absorbans alındı.

3.5.1.6. Hesaplama

Standartların absorbansı belirlenerek x ekseninde absorbans, y ekseninde konsantrasyon değerleri olacak şekilde cihaza doğrusal standart eğri çizdirildi. Bu eğrinin R^2 değerinin 0,992 olduğu görüldü. Sonuçlar bu standart eğriye göre pg/mL cinsinden ifade edildi.

Grafik 1: IL-17A Standart absorbans-konsantrasyon grafiği. $R^2 = 0,992$



3.5.2. M30 ELISA

M30 ELISA parametresi -80 °C’de saklanan numuneler oda ısısında eritildikten sonra PEVIVA M30 Apoptosense ELISA (ref no: 10011; lot no: PE-RS 3594; Nacka, Sweden) markası ile sandviç ELISA yöntemi ile çalışıldı.

3.5.2.1. Kit Bileşenleri

1. Monoklonal antikor ile kaplı olan 96 kuyucuklu mikro kuyucuklu plate
2. Streptavidin horse radish peroksidaz ile konjuge edilmiş olan M30 antikor
3. M30 standartları (0, 75, 150, 250, 500, 750 ve 1000 U/L konsantrasyonlarında kullanıma hazır)
4. High kontrol
5. Low kontrol
6. Yıkama tableti
7. Tetrametil benzidin substratı
8. Stop solüsyonu (1M sülfirik asit)

3.5.2.2. Test Prensibi

M30 Apoptosense ELISA bir katı faz sandviç enzim immunoassay yöntemidir. CK 18’e karşı M30 antikor ile bağlı olan kuyucuklara standartlar, kontroller ve örnekler bağlanır. Daha sonra HRP ile konjuge olan M30 antikor eklenir. Bağlanmayan konjugat yıkama ile ortamdan uzaklaştırılır. TMB substart eklenerek renk değişimi gerçekleşir. Son olarak reaksiyon durdurularak absorbans alınır. Absorbans, numunenin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

3.5.2.3. Standart Konsantrasyonları

Standart No	1	2	3	4	5	6	7
Standart Konsantrasyon (U/L)	0	75	150	250	500	750	1000

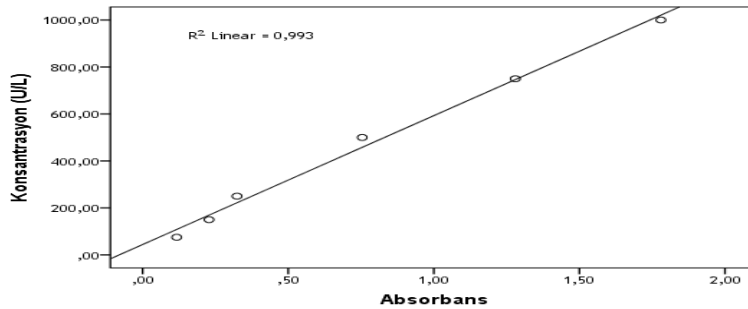
3.5.2.4. Test Protokolü

- Antikor ile kaplanmış olan kuyucuklara kit içinde kullanıma hazır halde gelen standartlardan, kontrollerden ve numunelerden 25 µL konuldu.
- Daha sonra tüm kuyucuklara streptavidin-HRP ile konjuge edilmiş olan M30 antikorundan 75 µL eklenerek 4 saat süren inkübasyona alındı. Bu inkübasyon sırasında antikor-antijen-streptavidin işaretli antikor bağı kurulmuş oldu.
- Bu arada yıkama tableti de 500 mL deiyonize suda çözülüp, manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklar elde edilen bu yıkama tamponuyla 5 kere, 350 µL ile yıkandı. Bu yıkama sayesinde antikor-antijen-streptavidin işaretli antikor bağı dışındaki maddeler kuyucuklardan uzaklaştırılmış oldu.
- Daha sonra tüm kuyucuklara 200 µL tetrametil benzidin substrat solüsyonu eklendi ve renkli reaksiyonun gerçekleşmesi için 20 dk beklendi.
- Reaksiyonun durdurulması için 20 dk sonunda 1M sülfirik asit çözeltisinden 50 µL kuyucuklara eklenerek Thermo Scientific Multiskan FC ELISA okuyucusunda 450 nm de absorbansları okundu.

3.5.2.5. Hesaplama

Standartların absorbansı belirlenerek x ekseninde absorbans, y ekseninde konsantrasyon olacak şekilde lineer grafik elde edilip sonuçlar bu eğriye U/L şeklinde ifade edildi.

Grafik 2: M30 standart absorbans-konsantrasyon grafiği. $R^2=0,993$



3.5.3. M65 ELISA

M65 ELISA parametresi -80°C’de saklanan numuneler oda ısısında eritildikten sonra PEVIVA M65 ELISA (ref no: 10020; lot no: PE-RS 3566; Nacka, Sweden) markası ile sandviç ELISA yöntemi ile çalışıldı.

3.5.3.1. Kit Bileşenleri

1. Monoklonal antikor ile kaplı olan 96 kuyucuklu mikro kuyucuklu plate
2. Horse radish peroksidaz ile konjuge edilmiş olan M30 antikor
3. M65 standartları (0, 125, 250, 500, 750, 1200 ve 2000 U/L konsantrasyonlarında kullanıma hazır)
4. High kontrol
5. Low kontrol
6. Yıkama tableti
7. Tetrametil benzidin substratı
8. Stop solüsyonu (1 M sülfirik asit)

3.5.3.2. Test Prensibi

M65 Apoptosense ELISA bir katı faz sandviç enzim immunoassay yöntemidir. CK 18’e karşı M65 antikor ile bağlı olan kuyucuklara standartlar, kontroller ve örnekler bağlanır. Daha sonra HRP ile konjuge olan M65 antikor eklenir. Bağlanmayan konjugat yıkama ile ortamdan uzaklaştırılır. TMB substart eklenerek renk değişimi gerçekleşir. Son olarak reaksiyon durdurularak absorbans alınır. Absorbans, numunenin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

3.5.3.3. Standart Konsantrasyonları

Standart No	1	2	3	4	5	6	7
Standart Konsantrasyon(U/L)	0	125	250	500	750	1200	2000

3.5.3.4. Test Protokolü

- Antikor ile kaplanmış olan kuyucuklara kit içinde kullanıma hazır halde gelen

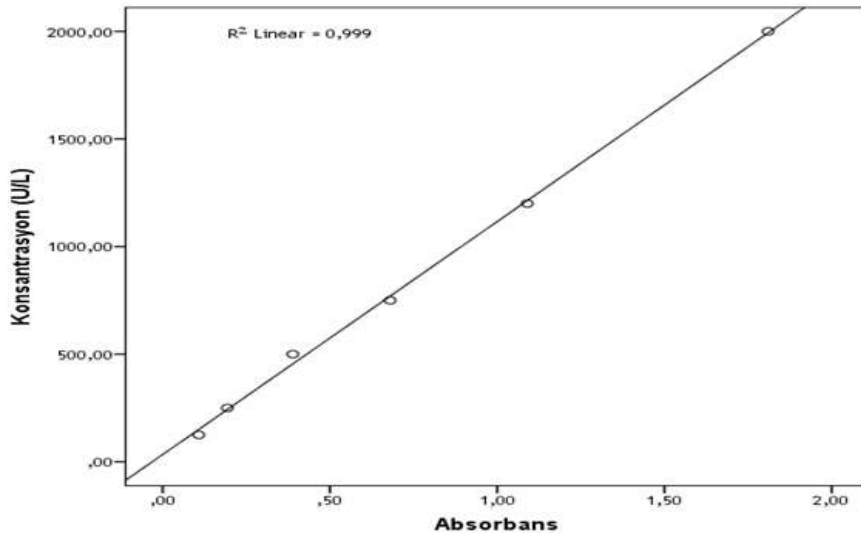
standartlardan, kontrollerden ve numunelerden 25 µL konuldu.

- Daha sonra tüm kuyucuklara streptavidin-HRP ile konjuge edilmiş olan M65 antikorundan 75 µL eklenerek 4 saat süren inkübasyona alındı. Bu inkübasyon sırasında antikor-antijen-streptavidin işaretli antikor bağı kurulmuş oldu.
- Bu arada yıkama tableti de 500 mL deiyonize suda çözöldü, manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklar elde edilen bu yıkama tamponuyla 5 kere 350 µL ile tekrarlanarak yıkandı. Bu yıkama sayesinde antikor-antijen-streptavidin işaretli antikor bağı dışındaki maddeler kuyucuklardan uzaklaştırılmış oldu.
- Daha sonra tüm kuyucuklara 200 µL tetrametil benzidin substrat solüsyonu eklendi ve renkli reaksiyonun gerçekleşmesi için 20 dk beklendi.
- Reaksiyonun durdurulması için 20 dk sonunda 1M sülfirik asit çözeltisi kuyucuklara eklenerek Thermo Scientific Multiskan FC ELISA okuyucusunda 450 nm’de absorpsanları okundu.

3.5.3.5. Hesaplama

X ekseninde absorpsan, y ekseninde konsantrasyon olacak şekilde lineer grafik elde edilip sonuçlar bu eğriye U/L şeklinde ifade edildi.

Grafik 3: M65 standart absorpsan- konsantrasyon grafiğı. $R^2=0,999$



3.5.4. miR146a ve miR21

3.5.4.1. Total RNA İzolasyonu

-80°C’de depolanan serum örnekleri çalışma günü oda ısısına getirilerek erimesi beklendi. Hasta ve kontrol örneklerinden RNA izolasyonu için Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit (Cat No:217004, QIAGEN, gMBh, D-40724 Hilden, Germany) kiti kullanıldı.

Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit ile RNA İzolasyon Basamakları:

- Numuneler oda ısısında çözündükten sonra 400 µL miktarında ayrı bir ependorf tüpüne alındı ve üzerine 700 µL Qiazol Lysis Reagent eklendi.
- Vortekslenip oda ısısında (15-25°C) 5 dk inkübe edildi.
- Her bir tüpe 140 µL kloroform eklenip 15 sn boyunca vortekslendi.
- Oda ısısında 2-3 dk inkübe edildi.
- 12000 g’de 15 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst faz alınıp yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. Bu tüplerin üzerine alınan üst faz miktarının 1,5 katı kadar % 100’lük ethanol eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı.
- 700 µL örnekten alındı ve 2 mL’lik kolleksiyon tüplerindeki RNeasy Mini column içine aktarıldı. Oda ısısında 8000 g de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolleksiyon tüplerinde biriken sıvı atıldı. Bu işlem kalan örnekler için de tekrarlandı.
- 700 µL RWT solüsyonu eklendi ve 8000 g de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolleksiyon tüplerinde biriken sıvı atıldı.
- 500 µL RPE solüsyonu eklendi ve 8000 g de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolleksiyon tüplerinde biriken sıvı atıldı.
- Tekrar 500 µL RPE solüsyonu eklendi ve 8000 g de 2 dk santrifüj edildi.
- Daha sonra mini kolon 2 mL lik yeni kolleksiyon tüpüne alındı ve 2 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Kolleksiyon tüpleri atıldı ve mini kolon 1,5 mL lik ependorf içine alındı. RNase-free sudan 50 µL eklenerek maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.
- İçinde RNA olan ependorflar -80 C’de muhafaza edildi.

3.5.4.2. Poli A Tailing Reaksiyonu

miRNA'lar oldukça küçük RNA molekülleri oldukları için RT-PCR ile çoğaltılabilmeleri mümkün olmamaktadır. Çoğaltılmanın gerçekleşebilmesi için boylarının uzatılması gereklidir. Bu da miRNA moleküllerinin sonuna Poli A kuyruğu eklenmesiyle gerçekleşir. Aşağıda gösterildiği şekilde ucuna Poli A kuyruğu eklenmiş olan miRNA'lardan, ucuna evrensel dizi eklenmiş oligo-dT primerler aracılığıyla komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmektedir. PCR aşamasında tamamlayıcı primerlerin bu evrensel dizilere bağlanması hedef miRNA çoğaltılmasını sağlamaktadır.

Bu amaçla bu aşamada Poli A tailing reaksiyonu ile miRNA uzatıldı. Bunun için qScript microRNA cDNA Synthesis Kit'inin (Quanta Biosciences, cat no:95107-025; lot no:21644) Poli A tailing reaksiyon protokolü uygulandı. İzole edilmiş RNA örnekleri -80 °C' den çıkarıldı ve erimeye bırakıldı. Bu RNA örneklerinden 5 µL kullanıldı.

Komponent	Volüm
Poli A tailing buffer	2 µL
RNA	5 µL
Nükleaz-free su	2 µL
Poli A polimeraz	1 µL
TOTAL VOLÜM	10 µL

1. Enzim hariç tüm komponentler 0,2 mL'lik PCR tüpüne konulup karıştırmak için kısaca santrifüj edildi. Örnekler sürekli buz üstünde bekletildi.
2. Son olarak Poli A polimeraz enzimi de eklenip tüm komponentler PCR tüpüne eklendi. Nazikçe karıştırılarak kısaca santrifüj edildi.
3. Karışımın içinde bulunduğu ependorflar 70 °C'de 5 dk bekletildikten sonra 37 °C'ye alındı, 60 dk bekletildi.

Böylece Poli A kuyruğu eklenmiş oldu. Poli A kuyruğu eklenmiş olan bu RNA'lar cDNA sentezinde kullanıldı.

3.5.4.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için qScript microRNA cDNA Synthesis Kit (Quanta Biosciences, cat no:95107-025; lot no:21644) kullanıldı. 30 sn santrifüj edilerek cDNA protokolü hazırlanana kadar soğuk blok üzerinde bekletildi.

Daha sonra aşağıda belirtilen komponentler karıştırılarak cDNA protokolü uygulandı.

Komponent	Volüm
Poli A tailing reaksiyonu ürünleri	10 µL
MicroRNA cDNA reaksiyon karışımı	9 µL
Revers transkriptaz	1 µL
TOTAL VOLÜM	20 µL

Karışım nazikçe vortekslendi, kısaca santrifüj edildi. Daha sonra Thermal Cycler’da 42°C de 20 dk, 85°C’de 5 dk bekletildi. Bu şekilde cDNA eldesi gerçekleştirilmiş oldu.

3.5.4.4. Real Time-PCR Aşaması

Tez çalışmasında incelenen miR146a ve miR21 genlerinin anlatım düzeyleri miScript Primer Assay (Qiagen) ve miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) kullanılarak CFX Connect Optics Module (Biorad, seri no: 788BR03732) cihazında analiz edildi. miRNA’ların çoğaltılması için cDNA sentezi sırasında Poli A kuyruğunun ucuna eklenen evrensel diziden yararlanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) yapışma aşamasında ‘universal’ primerin, cDNA’nın ucundaki kendisine tamamlayıcı olan evrensel diziye yapışması sağlandı. Farklı miRNA genleri için aynı ‘universal’ primer kullanıldı. İkinci primer ise, çoğaltılmak istenen hedef miRNA’ya özgül idi. Reaksiyon sırasında çoğalan gen ürünlerinin saptanabilmesi için SYBR Green floresan molekülü kullanıldı. Göreceli gen ifadesi analizi için gereken normalizasyon işlemi U6 housekeeping geni kullanılarak gerçekleştirildi. Gen ifadelerinin hesaplanması ve değerlendirilmesinde hedef genin cycle threshold değeri (Ct) ile referans genin Ct’sinin farkı kullanıldı. Böylece örnekler arasındaki değişimlerin normalize edilmesi sağlandı. Bu şekilde, gen ifade düzeyinden kaynaklanmayan olası Ct farklılıkları elimine edilmiş oldu.

PCR’ı takiben primer dimerlerinin oluşmadığından ve hedeflenen genler dışında bir ürünün çoğalmadığından emin olmak için ‘erime eğrisi analizi’ (melting curve analysis) yapıldı. Bunun için örnekler, 55°C’den 95°C’ye kadar saniyede 0.2°C artan bir ısı yükselmesine tabi tutuldu. Bu süreçte, PCR ürününün bileşenine bağlı olarak, yaklaşık 75-80 °C aralığında erime eğrileri ortaya çıktığı gözlemlendi.

Reaksiyon koşulları kitin protokolüne göre belirlendi. Kitin çalışma protokolüne göre aşağıdaki şema izlendi.

Komponent	Volüm
PerfeCta SYBR Green SuperMix	10,6 µL
PerfeCta microRNA Assay primeri	0,6 µL
PerfeCta universal PCR primeri	0,6 µL
MicroRNA cDNA	1 µL
Nükleaz-free su	7,8 µL
TOTAL VOLÜM	20 µL

Real Time-PCR (RT-PCR) için CFX Connect Real-Time System PCR cihazı kullanıldı. Kullanılan enzim sıcaklık ile aktifleştikten (hot start), PCR ilk aşamada 95°C’de 10 dk inkübasyon içermekteydi. Aktifleşme basamağını takiben 40 döngü gerçekleştirildi. Denatürasyon basamağı 95 °C’de 5 sn’de, yapışma (annealing) basamağı 60 °C’de 15 sn’de, uzama basamağı ise 70°C’de 15 sn’de gerçekleştirildi.

Basamak	Süre	Sıcaklık
Aktivasyon	10 dk	95 °C
Denatürasyon	5 sn	95 °C
Yapışma(Annealing)	15 sn	60 °C
Uzama	15 sn	70 °C

3.5.5. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler “Statistical Package for the Social Sciences” yazılımının 20. versiyonu kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede tanımlayıcı istatistik, student-t testi ve ki-kare testi kullanıldı. Parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenlerin analizinde iki grup arasındaki farkları incelemek için bağımsız örneklemeler için student- t testi kullanıldı. Grupların kendi içerisindeki dağılımını ve kategorik değişkenlerin analizinde ki-kare testi kullanıldı. Sonuçlar ort±standart sapma olarak belirtildi. Parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile belirlenmiştir.

Tüm testlerde istatistiksel olarak $p < 0.05$ düzeyi anlamlı, $p < 0.01$ düzeyi çok anlamlı, $p < 0.001$ düzeyi ise ileri derecede anlamlı sınırı kabul edildi.

M65 parametresi ileri derecede anlamlı bulunduğu için ROC analizi yapıldı. Fakat spesifitesi ve sensitivitesi düşük bulundu (%60-70).

4. BULGULAR

Çalışmaya Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon ve Dermatoloji Anabilim Dalı'nda Şubat 2015 ve Temmuz 2015 tarihleri arasında PsA tanısıyla takip edilen 31 kadın, 20 erkek toplam 51 hasta alındı. Kontrol grubunu ise sağlıklı olan 22 kadın, 14 erkek toplam 36 kişi oluşturuyordu.

Çalışmaya alınan grupların cinsiyetleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0.975$).

Çalışmaya alınan PsA hastalarının yaş ortalaması (49.76 ± 12.56) sağlıklı kontrol grubunun (48.58 ± 9.46) yaş ortalaması ile benzerdi ($p=0.643$).

Beden kitle indeksleri karşılaştırılmasında hasta (31.35 ± 6.64) ve kontrol (29.83 ± 5.28) grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmadı ($p=0.256$).

Hasta ve kontrol grubunun sosyodemografik özellikleri tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Hasta ve kontrol grubunun sosyodemografik özellikleri

	Psöriatik Artrit(n=51)	Kontrol(n=36)	p
Yaş (ort±SS)	49.76±12.56	48.58±9.46	0.643
Cinsiyet (kadın/erkek) %	31/20 (61%/39%)	22/14 (61%/39%)	0.975
BMI (ort±SS)	31.35±6.64	29.83±5.28	0.256

ort±SS:Ortalama±standart sapma BMI: Beden kitle indeksi

Psöriatik Artrit Hastalarında ve Kontrol Grubu Arasında IL-17A, M30, M65 ve miR146a, miR21 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Çalışmaya alınan olguların IL-17A düzeyleri karşılaştırıldığında hasta grubunda (7.10 ± 1.08) kontrol grubuna göre (6.29 ± 1.28) çok anlamlı yüksek bulundu ($p=0.002$).

PsA grubunda M30 düzeylerinin (96.16 ± 27.09) sağlıklı kontrol grubuna (90.99 ± 24.29) göre yüksek olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0.424$).

M65 düzeyleri karşılaştırıldığında hasta grubunda (236.15 ± 140.65) kontrol grubuna göre (155.51 ± 49.44) çok anlamlı yüksek bulundu ($p=0.003$).

M30/M65 düzeyleri karşılaştırıldığında hasta grubunda (0.62 ± 0.29) kontrol grubuna

göre (0.594 ± 0.21) yüksek bulundu. Fakat istatistiksel olarak bir anlam tespit edilemedi ($p=0.590$).

MiR146a ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında PsA grubunda (6.43 ± 4.6) kontrol grubuna göre (7.1 ± 5.2) düşük bulundu, fakat istatistiksel olarak bir anlam tespit edilmedi ($p=0.592$).

MiR21 ekspresyonunun ise her iki grupta çok az miktarda olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında bir fark saptanmadı.

Çalışma kapsamındaki olguların IL-17A, M30, M65, M30/M65 miR146a düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3: PsA Hastaları ve Kontrol Grubu Arasında IL-17A, M30, M65 ve miR146a Düzeylerinin Karşılaştırılması

	Psöriatik Artrit(n=51)	Kontrol(n=36)	p
IL-17A (ort±SS) pg/ml	7.10±1.08	6.29±1.28	0.002
M30 (ort±SS) U/L	96.16±27.09	90.99 ±24.29	0.424
M65 (ort±SS) U/L	236.15±140.65	155.51 ±49.44	0.003
M30/M65 (ort±SS)	0.62±0.29	0.594±0.21	0.590
miR146a (ort±SS)	6.43±4.6	7.1±5.2	0.592

ort±SS:Ortalama±standart sapma IL-17A: İnterlökin 17A, miR146a: MikroRNA 146a

Psöriatik Artrit Hastalarında ve Kontrol Grubu Arasında Kan Sayımı Parametreleri ve Akut Faz Reaktanlarının Karşılaştırılması

PsA hastaları (7.53 ± 1.92) ile kontrol (6.76 ± 1.43) grubunun lökositleri karşılaştırıldığında her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p=0.04$).

Hasta (21.80 ± 18.8) ve kontrollerin (9.80 ± 6.11) sedimentasyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0.001$).

Hasta (0.54 ± 0.56) ve kontrollerin (0.15 ± 0.14) CRP değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0.001$).

Hemoglobin (p=0.36) ve platelet (p=0.27) değerleri her iki grup arasında karşılaştırıldığında arada istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü.

PsA hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında kan sayım parametreleri ve akut faz reaktanlarının karşılaştırılması tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4: Hasta ve kontrollerin akut faz reaktanları ve hemogram değerlerinin karşılaştırılması

	Psöriatik Artrit(n=51)	Kontrol(n=36)	p
HGB (ort±SS) g/dL	13.66±1.50	13.33±1.74	0.36
WBC (ort±SS) 10³/µL	7.53±1.92	6.76±1.43	0.04
PLT (ort±SS) 10³/µL	261.12±79.07	245.08±41.87	0.27
ESH (ort±SS) mm/saat	21.80±18.8	9.80±6.11	<0.001
CRP (ort±SS) mg/dL	0.54±0.56	0.15±0.14	<0.001

ort±SS:Ortalama±standart sapma Hgb: Hemoglobin, WBC: Lökosit, PLT:Platelet, ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı, CRP:C-reaktif protein

Hastaların IL-17A, M30, M65, M30/M65 ve MiR146a Düzeylerinin Kendi Aralarındaki Korelasyonunun İncelenmesi

M30 parametresinin, M65 ile ileri derecede anlamlı (r=0.730; p<0.001); M30/M65 ile de anlamlı bir korelasyon gösterdiği (r=0.308; p=0.035) gözlemlendi.

M65 parametresinin M30/M65 ile (r=-0.309; p=0.034) negatif düzeyde anlamlı korelasyon gösterdiği tespit edildi.

IL-17A, M30, M65, M30/M65, miR146a düzeylerinin arasındaki korelasyonun r ve p değerleri Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5: Hastaların IL-17A, M30, M65, M30/M65, miR146a düzeylerinin arasındaki korelasyonun r ve p değerleri

		IL-17A (pg/mL)	M30 (U/L)	M65 (U/L)	M30/M65	miR146a
IL-17A (pg/mL)	<i>r</i>	1	0.221	0.096	0.234	0.059
	<i>p</i>		0.141	0.524	0.122	0.764
M30 (U/L)	<i>r</i>	0.221	1	0.730	0.308	0.174
	<i>p</i>	0.141		<0.001	0.035	0.359
M65 (U/L)	<i>r</i>	0.096	0.730	1	-0.309	-0.008
	<i>p</i>	0.524	<0.001		0.034	0.965
M30/M65	<i>r</i>	0.234	0.308	-0.309	1	0.323
	<i>p</i>	0.122	0.035	0.034		0.087
miR146a	<i>r</i>	0.059	0.174	-0.008	0.323	1
	<i>p</i>	0.764	0.359	0.965	0.087	

IL 17A: İnterlökin 17A, miR146a: MikroRNA 146a

Hastaların IL-17A, M30, M65, M30/M65 ve miR146a Düzeylerinin Biyokimyasal Parametrelerle ve Akut Faz Reaktanlarıyla Korelasyonunun İncelenmesi

M30'un akut faz reaktanlarından ESH ile ($r=0.272$; $p=0.017$) ve CRP ile ($r=0.257$; $p=0.023$) anlamlı düzeyde korelasyon gösterdiği tespit edildi. M65'in akut faz reaktanlarından ESH ile ($r=0.411$; $p<0.001$) ve CRP ile ($r=0.378$; $p=0.001$) ileri derecede anlamlı korelasyon gösterdiği gözlemlendi.

IL-17A, M30, M65, M30/M65 ve miR146a Düzeylerinin Biyokimyasal Parametrelerle ve akut faz reaktanlarıyla korelasyonu tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Hastaların IL-17A, M30, M65, M30/M65 ve miR146a Düzeylerinin Biyokimyasal Parametrelerle ve Akut Faz Reaktanlarıyla Korelasyonunun r ve p değerleri

		WBC($10^3/\mu\text{L}$)	Hgb(g/dL)	PLT($10^3/\mu\text{L}$)	ESH(mm/saat)	CRP(mg/dL)
IL-17A (pg/mL)	<i>r</i>	0.128	0.090	-0.003	-0.024	0.137
	<i>p</i>	0.246	0.415	0.979	0.828	0.218
M30 (U/L)	<i>r</i>	-0.022	-0.195	-0.082	0.272	0.257
	<i>p</i>	0.844	0.085	0.473	0.017	0.023
M65 (U/L)	<i>r</i>	0.123	-0.202	-0.002	0.411	0.378
	<i>p</i>	0.278	0.073	0.984	<0.001	0.001
M30/M65	<i>r</i>	-0.113	-0.010	-0.187	-0.038	-0.005
	<i>p</i>	0.330	0.932	0.106	0.747	0.966
miR146a	<i>r</i>	-0.219	-0.082	-0.037	-0.045	-0.026
	<i>p</i>	0.127	0.571	0.801	0.757	0.856

IL-17A:İnterlökin 17A, miR146a:MikroRNA 146a, WBC:Lökosit, Hgb:Hemoglobin,PLT:Platelet,ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı, CRP: C-reaktif protein

Hastaların IL-17A, M30, M65, M30/M65 ve miR146a Düzeylerinin Hastalık Özellikleri ile Korelasyonunun İncelenmesi

miR146a parametresinin psöriazis süresi ile ($r=0.486$; $p=0.007$) çok anlamlı seviyede korelasyon gösterdiği bulundu.

IL-17A, M30, M65, M30/M65 ve miR146a parametrelerinin hastalık özellikleri ile korelasyonu tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7: Hastaların IL-17A, M30, M65, M30/M65 ve miR146a parametrelerinin hastalık özellikleri ile korelasyonunun r ve p değerleri

		Psöriazis Süresi (yıl)	PsA süresi (yıl)	PASİ skoru
IL-17A (pg/mL)	<i>r</i>	0.008	-0.069	0.040
	<i>p</i>	0.959	0.640	0.789
M30 (U/L)	<i>r</i>	-0.074	0.005	-0.157
	<i>p</i>	0.619	0.974	0.287
M65 (U/L)	<i>r</i>	0.206	0.032	-0.045
	<i>p</i>	0.165	0.830	0.760
M30/M65	<i>r</i>	0.206	-0.032	-0.247
	<i>P</i>	0.165	0.830	0.095
miR146a	<i>r</i>	0.486	-0.129	-0.202
	<i>p</i>	0.007	0.489	0.277

IL-17A:İnterlökin 17A, miR146a:MikroRNA146a, PsA:Psöriatik Artrit,

PASİ:Psöriazis area severity indeks

PsA Hastalarının Genel Özellikleri ve Hastalık Özelliklerinin Korelasyonunun İncelenmesi

Hastaların psöriazis süresi ve PsA süreleri incelendiğinde arada anlamlı korelasyon saptanmıştır ($r=0.355$; $p=0.011$). Psöriazis süresi yaş ile de koreledir ($r=0.311$; $p=0.026$). Ayrıca hastaların yaş ve PASİ skorları arasında da negatif düzeyde anlamlı korelasyon tespit edilmiştir ($r=-0.353$; $p=0.011$). Olguların yaş ve BMI'leri arasında da çok anlamlı korelasyon saptanmıştır ($r=0.413$; $p=0.003$).

Psöriatik artrit hastalarının genel özellikleri ve hastalık özelliklerinin korelasyonunun r ve p değerleri tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8: PsA hastalarının genel özellikleri ve hastalık özellikleri arasındaki korelasyon

		Psöriazis Süresi(yıl)	PsA Süresi(yıl)	BMI	Yaş	PASİ Skor
Psöriazis Süresi(yıl)	<i>r</i>	1	0.355	0.143	0.311	-0.245
	<i>p</i>		0.011	0.318	0.026	0.083
PsA Süresi(yıl)	<i>r</i>	0.355	1	0.077	-0.045	-0.080
	<i>p</i>	0.011		0.591	0.754	0.576
BMI	<i>r</i>	0.143	0.077	1	0.413	-0.029
	<i>p</i>	0.318	0.591		0.003	0.840
Yaş	<i>r</i>	0.311	-0.045	0.413	1	-0.353
	<i>p</i>	0.026	0.754	0.003		0.011
PASİ Skor	<i>r</i>	-0.245	-0.080	-0.029	-0.353	1
	<i>p</i>	0.083	0.576	0.840	0.011	

PsA: Psöriatik artrit, PASİ:Psöriazis area severity indeks, BMI: Beden kütle indeksi

Psöriatik Artrit Hasta Grubunun Genel Özellikleri ve Biyokimyasal Değerleri Arasındaki Korelasyon

Hastaların BMI'leri ile yaşları arasında çok anlamlı korelasyon bulunmuştur ($r=0.413$; $p=0.003$).

PsA grubunda BMI ve ESH değerleri arasında çok anlamlı korelasyon tespit edilmiştir ($r=0.463$; $p=0.001$).

Hastaların yaşları ile CRP değerleri arasında da çok anlamlı korelasyon bulunmuştur ($r=0.418$; $p=0.003$).

Kan sayım parametrelerinden WBC ile plateletler arasında ileri derecede anlamlı korelasyon tespit edilmiştir ($r=0.493$; $p<0.001$).

Akut faz reaktanlarından ESH ile WBC arasında anlamlı pozitif ($r=0.300$; $p=0.035$); ESH ile hemoglobin arasında ileri derecede anlamlı negatif ($r=-0.555$; $p<0.001$); ESH ile platelet arasında çok anlamlı pozitif ($r=0.360$; $p=0.010$) korelasyon tespit edilmiştir.

İki akut faz reaktanı olan ESH ve CRP arasında ise ileri derecede anlamlı pozitif ($r=0.624$; $p<0.001$) korelasyon tespit edilmiştir.

PsA hastalarının genel özellikleri ve biyokimyasal değerleri arasındaki korelasyon tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9: PsA hastalarının genel özellikleri ve biyokimyasal değerleri arasındaki korelasyon

		BMI	Yaş	WBC (10 ³ /µL)	Hgb (g/dL)	PLT (10 ³ /µL)	ESH (mm/saat)	CRP (mg/dL)
BMI	<i>r</i>	1	0.413	0.108	-0.234	0.130	0.463	0.259
	<i>p</i>		0.003	0.449	0.098	0.363	0.001	0.069
Yaş	<i>r</i>	0.413	1	-0.019	-0.304	-0.135	0.264	0.418
	<i>p</i>	0.003		0.911	0.030	0.346	0.064	0.003
WBC (10 ³ /µL)	<i>r</i>	0.108	-0.019	1	-0.080	0.493	0.300	0.155
	<i>p</i>	0.449	0.911		0.578	<0.001	0.035	0.284
Hgb (g/dL)	<i>r</i>	-0.234	-0.304	-0.080	1	-0.060	-0.555	-0.211
	<i>p</i>	0.098	0.030	0.578		0.676	<0.001	0.142
PLT (10 ³ /µL)	<i>r</i>	0.130	-0.135	0.493	-0.060	1	0.360	0.124
	<i>p</i>	0.363	0.346	<0.001	0.676		0.010	0.391
ESH (mm/saat)	<i>r</i>	0.463	0.264	0.300	-0.555	0.360	1	0.624
	<i>p</i>	0.001	0.064	0.035	<0.001	0.010		<0.001
CRP (mg/dL)	<i>r</i>	0.259	0.418	0.155	-0.211	0.124	0.624	1
	<i>p</i>	0.069	0.003	0.284	0.142	0.391	<0.001	

BMI:Beden kütle indeksi, WBC:Lökosit, Hgb:Hemoglobin, PLT:Platelet ESH:Eritrosit sedimentasyon hızı, CRP:C-reaktif protein

5. TARTIŞMA

PsA; seronegatif artritler grubu altında incelenen genellikle psöriazise eşlik eden otoimmün, inflamatuvar bir hastalıktır. Otoimmün hastalıklarda programlı hücre ölümü olan apoptozun, salınan sitokinlerden TNF- α etkisi ve oksidatif stres ile artmış olması beklenmektedir. Apoptozda kaspazlar aktive haldedir ve hücrenin bir parçası olan sitokeratinlerin hücreden ayrılmasından sorumludur. Bu sitokeratinlerden biri olan CK 18'in kaspazın böldüğü 387-396. pozisyonlarındaki 21 kDa'luk kısmını, IgG yapısındaki bir monoklonal antikor olan M30 tanır. Hem apoptozda kaspazın böldüğü, hem de nekrozda hiç bölünmemiş olarak ölen hücrelerden salınan bütün haldeki CK 18'i ise IgG yapısındaki bir monoklonal antikor olan M65 tanır [75]. Bu sayede M30/M65 oranı ile apoptozun toplam hücre ölümüne oranı serum örneklerinde tespit edilmiş olur.

MiRNA'lar apoptoz, antiviral savunma, immün sistem hücrelerinin farklılaşması, hücre proliferasyonu, inflamatuvar mediatör salınımı gibi immün sistem olaylarında rol alan genetik materyallerdir. miRNA'ların ekspresyonlarındaki azalma veya artmanın kanser, kalp damar hastalıkları, gelişim bozuklukları, otoimmün hastalıklar ve romatolojik hastalıklara sebep olabileceği düşünülmektedir [79].

miR146a akut inflamatuvar olaylarda ve doğal immünitede etkilidir. Proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β 'nın miR146a ekspresyonunu tetiklediği bulunmuştur [80].

miR21 de iyi bilinen bir onkojen gendir. Fakat son yıllarda inflamasyonda da etkin olduğu, antiproliferatif ve antiapoptotik olduğu keşfedilmiştir [57].

IL-17A; Th17 hücrelerinden salınan, osteoklastogenez ve eklem inflamasyonunda rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir [62]. Yapılan çalışmalarda inflamatuvar artritlerde IL-17A'nın sinoviyal sıvı ve serumda artmış olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle IL-17A'nın inflamatuvar artritlerin patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir [29, 62, 67].

Çalışmamızda PsA olgularının serumlarındaki M30, M65 ve M30/M65 seviyelerini belirleyerek apoptoz ve total hücre ölüm oranını, bunun yanında apoptoza etkisi olan miRNA'lardan miR146a ve miR21'in ekspresyon düzeyini belirlemeyi amaçladık. Ayrıca otoimmünite ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkili bir sitokin olan IL-

17A'nın bu miRNA'larla ve belirteçlerle olan ilişkisini incelemeyi hedefledik. Çalışmaya 51 PsA hastasını ve sağlıklı olan 36 kontrolü dahil ettik.

Çalışmaya alınan PsA hastalarının BMI ortalama değeri $31,35 \pm 6,64 \text{ kg/m}^2$ bulunmuş olup bu değer normalin üzerinde, obez sınırları içerisindedir. Kronik bir inflamasyon durumu olan obezitenin PsA gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür [81]. Ayrıca obezite PsA hastalarında bir komorbidite olarak görülmekte ve psöriazisli hastalarda PsA gelişimi için bir risk faktörü olarak belirtilmektedir [81, 82]. Obezite leptin, adiponektin gibi inflamasyonla ilişkili olan peptit yapılı moleküllerin ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin artmasına neden olur. Bu yüzden inflamatuvar durumun sürdürülmesine neden olmaktadır [81].

Çalışmamızda Th17 hücresinin temel sitokini olan IL-17A düzeyinin PsA grubunda çok anlamlı yüksek olduğu tespit ettik. Bu bulgu başlangıçtaki beklentimize uygun olarak IL-17A'nın PsA patogeneğinde rol oynadığını gösteren bir bulgudur. IL-17A'nın inflamatuvar artritlerde rolü olduğu ilk olarak 1998 yılında RA hastalarının sinoviyal sıvısında artmış olan IL-17A'nın gösterilmesi ile ortaya çıkmıştır [66]. Th17 ve IL-17'nin otoimmün inflamatuvar hastalıkların gelişiminin yanında osteoklast aktivasyonu ile kemik rezorbsiyonunda güçlü bir uyaran olduğu ve RA'lı hastaların serum ve sinoviyal sıvılarında artmış olduğu gösterilmiştir [6]. Psöriazis ve onunla ilişkili olan artritte IFN- γ ve IL-12 sitokinlerini salgılayan Th1 cevabının etkili olduğu düşünülürken zamanla Th17 hücresi tanımlanmış ve bu hücreden salınan IL-17A, IL-17F, IL-22 ve IL-26'nın da hastalık gelişiminde önemli rolleri olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu hastaların serum ve cilt lezyonlarında IL-17A'nın artmış olduğu belirtilmiştir. Bizim bulgumuzla bu sonuç uygunluk göstermektedir. IL-17A'nın otoimmün artritlerde rolü olduğu çalışılan hayvan modellerinde de bulunmuştur [83].

Leipe ve arkadaşlarının [84] PsA ve RA hastaları ile yaptıkları bir çalışmada Th17 hücrelerinin ve bununla birlikte IL-17A'nın arttığı gözlenmiştir. Ayrıca hastalık aktivitesi ile IL-17A seviyesi arasında korelasyon tespit edilmiştir [84]. Bizim çalışmamızda ise psöriazis hastalık düzeyini belirten PASİ skoru ile IL-17A arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Jandus ve arkadaşlarının [85] içinde PsA hasta grubunun da olduğu seronegatif spondiloartropatili ve RA'lı hastalara yaptıkları çalışmada, RA'lı hastalarda kontrol grubuna göre belirgin bir artış saptanmamasına rağmen PsA ve AS hasta grubunda Th1 ve Th17 hücrelerinde artış gözlenmiştir. Bu da

bizim çalışmamızda Th17 hücrelerinden salınan IL-17A artışı ile uygunluk göstermektedir. Bu yüzden bu çalışmalar doğrultusunda PsA patofizyolojisinde IL-17A'nın etkili olduğu düşünülüp hastalara IL-17A hedefli tedavi olan monoklonal antikorlardan secukinumab kullanılmaya başlanmış, IL-17A'nın indüklediği proinflamatuvar sitokinleri ve MMP üretimini azaltarak tedaviye yanıt alındığı gözlenmiştir [86, 87].

IL-17A'nın psöriatik hastalıklardaki rolünü aydınlatabilmek için in-vivo ve in-vitro çalışmalar yapılmıştır. Farelerde yapılan bir çalışmada hastalığın erken dönemlerinden itibaren psöriatik lezyonların gelişiminde Th17 hücrelerinin keratinositlerin bulunduğu alana göç ettiği tespit edilmiştir [88]. Benzer şekilde PsA hastalarının sinoviyal doku, sinoviyal sıvı ve ciltlerinin Th17 hücrelerinden zengin olduğu bulunmuştur [5]. Bu çalışmalar ve bizim çalışmamızın bulguları doğrultusunda IL-17A'nın PsA patofizyolojisinde etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda M30, M65 ve M30/M65 düzeyini PsA grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulduk; fakat bunlardan sadece M65 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Bu sonuçlar PsA'da total hücre ölümünün arttığını fakat nekrozun apoptoza göre daha ön planda olduğunu göstermektedir. Daha önceden yapılan çalışmalarda akciğer [89], kolorektal [90], mide [91], testis [92], meme [75] kanserleri ve baş boyun tümörlerinde M30 ve M65 parametreleri çalışılmış ve M30/M65 oranının prognozla ilişkili olduğu da gösterilmiştir.

Otoimmün hastalıklarda ise M30, M65 parametrelerinin çalışıldığı çalışma sayısı çok azdır. Sekiguchi ve arkadaşlarının kronik otoimmün bir karaciğer hastalığı olan, inflamasyon ve fibrozisin görüldüğü primer bilier sirozda yaptıkları bir çalışmada kontrollere göre hasta grubunda bu belirteçler anlamlı yüksek bulunmuş; ayrıca hastalığın fibrozis evrelemesi ile de korele olduğu gösterilmiştir [93].

Daha önceden farklı yöntemlerle PsA'da apoptoz incelenmiştir. Bunlardan biri Fraser ve arkadaşlarının RA ve PsA hastalarında floresan bir yöntem olan terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP işaretleme ve etiketleme (TUNEL) yöntemi ile tayin ettikleri çalışmadır. Bu çalışmada hastalardan sinoviyal membran örnekleri alınmış ve TUNEL kiti ile sinoviyal membranda endotelial hücre apoptozunun artmış olduğu gösterilmiştir [33]. Hofbauer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada apoptozu indükleyen bir ligand olan TRAIL ve bunun antagonisti olan OPG çalışılmış ve sonuç

olarak TRAIL'in kontrol grubuna göre artmış olduğu, fakat kontrol grubu ile hasta grubu arasında OPG'nin seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir [72].

İnflamatuvar sitokinleri indükleyen, apoptozu stimüle eden bir faktör olan tümör nekroz faktör benzeri zayıf apoptoz indükleyici factor (TWEAK); PsA hastalarının serumlarında incelendiğinde PsA hastalarında sağlıklı kontrol grubuna ve osteoartrit grubuna kıyasla anlamlı yüksek bulunmuştur [94]. Benzer şekilde yine PsA hastalarının sinoviyal sıvılarında da TWEAK incelenmiş ve kontrollere göre anlamlı yüksek bulunmuştur [95].

Bu çalışmalar apoptozun PsA patogeneğinde etkili olduğunu göstermektedir. Fakat daha önceden bizim çalışmamızla benzer şekilde M30 ve M65 parametrelerinin serum düzeylerine PsA hastalarında çalışılmamıştır.

Çalışmamızda M65'in akut faz reaktanlarından ESH ve CRP ile ileri derecede anlamlı pozitif korelasyon göstermesi kabul edilmiş genel bir bilgi olan nekrozda inflamatuvar parametrelerin arttığı bilgisi ile uyumludur [69, 70].

Düzeyini ölçtüğümüz miRNA parametrelerinden miR146a'nın PsA hastalarında kontrol grubuna göre daha az eksprese edildiği, fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını gösterdik. miRNA'lar posttranslasyonel düzeyde gen regülasyonu yaparak etkili olurlar. Ekspresyonlarının artması veya azalması hastalıkların patogeneğinde etkilidir. Bizim bulgumuz da başlangıçtaki beklentimize ters olarak miR146a'nın azalmasının PsA patogeneğinde etkili olabileceğini düşündürdü.

Yapılan çalışmalarda miRNA'ların romatizmal hastalıklarla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalarda genellikle RA [15, 55], osteoartrit [96] ve sjögren sendromu ile miRNA'ların ilişkisi gösterilmiştir. Fakat PsA'da miRNA çalışmaları literatürde oldukça azdır. Bizim bulgularımızdan farklı olarak Chatzikyriakidou ve arkadaşlarının [12] PsA hastalarında miR146a ve onunla ilişkili bir gen olan IRAK1 düzeylerini değerlendirdikleri bir çalışmada miR146a'nın hedefi olan IRAK1 genindeki polimorfizm, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Taganov ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada miR146a'nın monositik hücrelerde lipopolisakkarit stimülasyonu ile up-regüle edildiğini, ayrıca TRAF6 ve IRAK1'i

hedef olarak PsA patogenezinde etkisi olan NF-kB yolağı üzerine negatif regülatör etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca miR146a'nın immün dokularda ekspresyonunun arttığını ve artan ekspresyonun da immün hücrelerin matürasyonunu ve aktivasyonunu sağladığını bulmuşlardır [97]. Bu ise bizim bulgumuza ters düşen bir bulgudur.

miR146a inflammatuar sitokinlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde etkilidir. Xu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada miR146a'nın otoimmün hastalıklarla ilişkisi olduğu tespit edilmiştir [54]. Niimoto ve arkadaşları IL-17 üreten hücrelerde miR146a'nın up-regüle olduğunu bulmuşlardır [98]. Ayrıca özellikle RA'nın erken dönemlerinde periferik kan mononükleer hücrelerinde miR146a ve IL-17'nin up-regüle olduğu ve birbirleriyle korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir [98]. Xia ve arkadaşlarını yaptıkları bir çalışmada psöriazis hastalarında miR146a ile IL-17 arasında pozitif korelasyon bulunmuştur [99]. Bizim çalışmamızda ise miR146a ile IL-17A arasında herhangi bir korelasyon olduğu tespit edilmemiştir.

İnflammatuar artritlerle miR146a arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılan bir metaanalizde, ikisi arasında bir ilişki olmadığı belirtilmiştir [56]. Bu sonuç inflammatuar bir artrit olan PsA'da, bizim bulgularımızla uygunluk göstermektedir. PsA hasta grubunda bu miRNA'nın ekspresyonunun etkili olup olmadığını kesin olarak söylemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

miR146a'nın hastalık özellikleri ile korelasyonunu değerlendirdiğimiz zaman psöriazis süresi ile çok anlamlı korele olduğunu tespit ettik. Sonkoly ve arkadaşlarının [100] yaptıkları mikroarray çalışmasında miR146a'nın psöriazis hastalarında ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuca göre psöriazis hastalığında zamanla daha fazla miR146a eksprese edildiğini, ayrıca miR146a'nın doğal immün sisteme katıldığını ve TNF- α cevabını tetiklediğini düşünebiliriz.

Çalışmamızda miR21'in ekspresyon düzeyini incelediğimizde hem hasta hem de kontrol grubunda miR21'in yalnızca bazı hasta ve kontrol numunelerinde çok düşük miktarda eksprese edildiğini bulduk. Bu yüzden hasta ve kontrol gruplarının miR21 düzeylerinin arasında bir anlam bulamadık. Herhangi bir yorum yapabilmek için daha fazla hasta ve kontrol grubu olarak incelemek gerektiğini düşünmekteyiz.

İnflammatuar artritlerden RA hasta grubunda Dong ve arkadaşlarının yaptığı bir

çalışmada periferik kan mononükleer hücrelerinde miR21 düzeyi belirgin düşük bulunmuştur [15]. Ayrıca miR21'deki düşüş; Th17 hücrelerinde artma ve STAT3 ekspresyonunda up-regülasyonunun eşlik ettiği görülmüştür. STAT3, Th17 diferansiasyonu için esansiyel bir transkripsiyon faktörü ve miR21'in de hedef genidir. Bu yüzden miR21'in Th17/T reg hücre imbalansında etkili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca IL-17 ile miR21 arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur. Fakat biz çalışmamızda IL-17 ile miR-21 arasında herhangi bir korelasyon olmadığını tespit ettik.

Li ve arkadaşlarının bir çalışmasında da RA hasta grubunda sinoviyal sıvıdaki CD4⁺ T hücrelerinde miR21 seviyesinin kontrollere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir [101]. Yapılan çalışmalarda genellikle hücrelerde ve psöriazis cilt lezyonlu dokuda miR21 düzeyleri çalışılmıştır. Hücre içinde ve dokuda miRNA miktarının daha fazla olduğu düşünülmektedir. Dokudan veya hücre içinden seruma sızan miRNA miktarının çok az olmasından dolayı çalışmamızda eksprese olan miR21 düzeyinin düşük olduğunu düşünmekteyiz.

Hasta ve kontrollerin biyokimyasal parametrelerini değerlendirdiğimizde ESH ve CRP değerlerinin hasta grubunda ileri derecede anlamlı yüksek olduğunu bulduk. Ayrıca bu iki akut faz reaktanının birbirleriyle ileri derecede korelasyon gösterdiklerini tespit ettik. Lökosit değerlerini karşılaştırdığımızda ise kontrollere göre hastalarda anlamlı yüksek olduğunu tespit ettik. Bu bulgular da PsA hastalarında inflamasyona bağlı beklenen sonuçlardır.

Hasta ve kontrollerin hastalık özellikleri ve genel özellikleri arasındaki korelasyonu değerlendirdiğimizde BMI'nın yaşla ileri derecede anlamlı korele olduğunu tespit ettik. Ayrıca hastalığın şiddetini gösteren bir indeks olan PASİ skorunun da yaşla çok anlamlı korele olduğunu bulduk. Bu sonuçlar ilerleyen yaşla birlikte hastalarda genellikle kilo alımı olduğu ve hastalığın şiddetinin arttığını göstermektedir.

Hastaların genel özellikleri ve biyokimyasal değerleri arasındaki korelasyonu incelediğimizde BMI'nın ESH ile ileri derecede anlamlı pozitif korelasyon gösterdiğini tespit ettik. Bu veri obezite ile inflamasyon arasındaki ilişkiyi desteklemektedir [81, 82].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmaya Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya, Dermatoloji, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dallarında PsA tanısı ile takip edilmekte olan 51 hasta ve kontrol grubu olarak da 36 sağlıklı birey alınmıştır. Çalışmada PsA hastalarının serumlarında IL-17A, M30, M65, M30/M65 değeri, miR146a ve miR21 parametreleri değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. IL-17A düzeyleri PsA grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti ($p=0.002$). Bu bulgu beklentimize uygun olarak Th17'nin önemli bir sitokini olan IL-17A'nın PsA patogenezinde önemli rol oynadığını düşündürdü.
2. M30 düzeyleri değerlendirildiğinde her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen M65 düzeyleri PsA grubunda, sağlıklı kontrol grubundan anlamlı yüksekti ($p=0.003$). Bu bulgu da nekrozun PsA patolojisinde apoptozdan daha etkili olduğunu gösterdi.
3. M30'un M65 ($r=0.730$; $p<0.001$) ve M30/M65 ($r=0.308$; $p=0.035$) parametreleri ile anlamlı korele olduğu görüldü. Bu veri PsA hastalarında apoptozun nekrozla korele olduğunu bize düşündürdü.
4. M30 (sırasıyla $r=0.272$ $p=0.017$; $r=0.257$ $p=0.023$) ve M65'in (sırasıyla $r=0.411$ $p<0.001$; $r=0.378$ $p=0.001$) sedimentasyon ve CRP ile anlamlı korele olduğu tespit edildi. Bu bulgular her iki hücre ölümünde de akut faz reaktanlarının seviyesinin arttığını gösterdi.
5. miR146a'nın ekspresyonunda hasta ve kontrol grubu arasında bir farklılık görülmedi. miR21'in ise her iki grupta da çok düşük miktarda eksprese edildiği görüldü. Bu bulgu bize başlangıçtaki beklentimize ters olarak miR21 ve miR146a'nın PsA patogenezinde etkili olmadığını düşündürdü. Bu yüzden miR146a ve miR21'in PsA hastalığında bir belirteç olarak kullanılamayacağı düşünüldü.
6. miR146a, psöriazis süresi ile anlamlı pozitif koreleydi ($r=0.486$; $p=0.007$). Bu veri psöriazisin süresi arttıkça miR146a ekspresyonunun da arttığını gösterdi. Fakat benzer korelasyon PsA ile miR146a arasında görülmedi. Bu bulgular psöriazis ve PsA hastalarında daha fazla ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşündürdü.

7. Hastalığın şiddetini gösteren PASİ skoru ile araştırdığımız parametrelerden herhangi birisi arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemesi dikkat çekici bir bulguydu. Bu bulgu serumdaki hücre ölümünün ve salınan önemli bir sitokin olan IL-17A'nın hastalık şiddetinden etkilenmediğini bize düşündürdü.
8. PsA hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında WBC değerlerinde ($p=0.04$), ESH değerlerinde ($p<0.001$) ve CRP değerlerinde ($p<0.001$) anlamlı farklılık tespit edildi. Bu veriler hastalıktaki inflamasyona bağlı olarak WBC, ESH ve CRP değerlerinin etkilenmiş olabileceğini bize düşündürdü.

EK-1

Evrak Tarih ve Sayısı: 25/12/2014-1558



T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 71306642-050.01.04-
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Doç.Dr. Şahbette SELEK
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

17.12.2014 tarihinde yapılan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında "Psöriatik Artrit Hastalarında miRNA Araştırılması; miRNA 146a, miRNA 21 'in ve IL-17A' nın Apoptozla İlişkisinin İncelenmesi" başlıklı başvurunuz değerlendirilmiş olup karar yazısı ektedir.

Bilgilerinize.

Prof.Dr. Reha ERKOÇ
Başkan

EK :
Karar yazısı(3 sayfa)

25/12/2014 Mem. : A.KUTLU

Mevcut Elektronik İmzalar

REHA ERKOÇ (Klinik Araştırmalar Etik Kurulu - Başkan) 25/12/2014 19:16

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan
Caddesi) Fatih / İstanbul
Tel: 0 (212) 523 22 88
E-Posta: info@bezmialem.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için irtibat: Ayşe KUTLU
Faks: 0 (212) 533 23 26
Elektronik ağı: www.bezmialem.edu.tr

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Psöriatik Artrit Hastalarında miRNA Araştırılması; miRNA 146a, miRNA 21 'in ve IL-17A' nın Apoptozla ilişkisinin incelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

17.12.2014

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Adnan Menderes Bulvarı Vatan caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	(0212) 523 22 88 - 1028
	FAKS	(0212) 533 23 26
	E-POSTA	etikkurulu@bezmialem.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Şahabettin SELEK			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi			
VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
DESTEKLEYİCİ	Bezmialem Vakıf Üniversitesi BAP Birimi' ne başvuru yapılacaktır.			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
	Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
	İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
	İlaç dışı klinik araştırma (akademik amaçlı / uzmanlık tezi)	☒		
	Diğer ise belirtiniz			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	12.12.2014	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (Hasta ve kontrol grubuna yönelik)	-	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

Sayfa 1 / 3

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. B. ERKOÇ

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Psöriatik Artrit Hastalarında miRNA Araştırılması; miRNA 146a, miRNA 21 'in ve IL-17A' nın Apoptozla ilişkisinin İncelenmesi	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU			
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	SIGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☒	- Sorumlu araştırmacı ve yardımcı araştırmacılara ait özgeçmiş formları - Çalışmanın Helsinki Bildirgesi, İKU/İLU'ya uygun yürütüleceğine dair taahhütname - Araştırma ile ilgili yayınlar
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 22 / 26	Tarih: 17.12.2014	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacının/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Psöriatik Artrit Hastalarında miRNA Araştırılması; miRNA 146a, miRNA 21 'in ve IL-17A' nın Apoptozla ilişkisinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Reha ERKOÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Reha ERKOÇ	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Orhan ÖZTURAN	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Faruk ÖKTEM	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Özcan KARAMAN	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Adem KIRIŞ	Radyoloji	Mehmet Akif Ersoy G.K.D.C Eğitim Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Ahmet MIHMANLI	Ağız-Diş ve Çene Cerrahisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Hayrullah KÖSE	Biyofizik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Ertuğrul KAYA	Tıbbi Farmakoloji	Düzce Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL	Bioistatistik ve Tıp Bilişimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Mahmut GÜRGAN	Deontoloji ve Tıp Tarihi	Herhangi bir kurumda çalışmıyor	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. İbrahim TOPÇU	Deontoloji ve Tıp Tarihi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Mehmet AKHOROZ	Emekli	Kurum Dışı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Avukat Şevkiye KARAHAHAN	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Toplantıda Bulunma

Karar: ☒ Onaylandı ☐ Reddedildi

Sayfa 3 / 3

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Reha ERKOÇ



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

Bu araştırmanın adı “Psöriatik artrit hastalarında miRNA araştırılması; miRNA 146a, miRNA 21’in ve IL-17A’nın apoptozla ilişkisinin incelenmesi” dir.

Araştırmanın konusu ve amacı, sedef romatizması hastalarının serumlarında programlı hücre ölümünün total hücre ölümüne oranını bulmak ve bu hastalarda bulunan bağışıklıkta görevli olan mikroRNA’lardan miR146a ve miR21’i tespit edip bunların hücre ölümüyle ilişkilerini ortaya koymaktır. Ayrıca bir sitokin olan IL-17A nın sedef romatizmasındaki miktarını ölçüp bu maddenin de hücre ölümüyle ilişkisini araştırmayı planlamaktayız.

Araştırmaya 18 yaş üstü Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fiziksel Tıp- Rehabilitasyon ve Dermatoloji polikliniklerine başvuran psöriatik artrit (sedef romatizması) hastalarının dahil edilmesi planlanmıştır.

Bu çalışmada doktorunuzun sizden her takipte rutin olarak istediği kanlar istenecek. Ek olarak kan alınmayacaktır. Doktorunuzun sizden istediği parametreler çalışıldıktan sonra artan kanlardan çalışmada planladığımız parametreler çalışılacaktır.

Araştırmaya katılım isteğe bağlı olup istediğiniz zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırmaya katıldığınız takdirde kimliğinizi ortaya çıkaracak kayıtlarınız gizli tutularak, kamuoyuna açıklanmayacağını; araştırma sonuçlarının yayınlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.

Bu çalışmada size uygulanacak herhangi bir alternatif tedavi veya girişim bulunmamaktadır.

Araştırma süresince 24 saat ulaşılabilir kişi adı-soyadı-telefonu:

Dr. Sıddıka KESGİN- 05058110944

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı/ Soyadı/ İmzası/ Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı/ Soyadı/ İmzası/ Tarih

KAYNAKLAR

Uncategorized References

1. de Vlam, K., A.B. Gottlieb, and P.J. Mease, *Current concepts in psoriatic arthritis: pathogenesis and management*. Acta Derm Venereol, 2014. **94**(6): p. 627-34.
2. Chandran, V. and J.U. Scher, *Biomarkers in psoriatic arthritis: recent progress*. Curr Rheumatol Rep, 2014. **16**(11): p. 453.
3. Kurban S, M.İ., *Osteoprotegerin, Rank ve Rank Ligandı*. Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry), 2007. **32**(4): p. 178-184.
4. Xu, S. and X. Cao, *Interleukin-17 and its expanding biological functions*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(3): p. 164-74.
5. Raychaudhuri, S.P., *Role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2013. **44**(2): p. 183-93.
6. Kim, H.R., S.H. Lee, and H.Y. Kim, *Elevated serum levels of soluble receptor activator of nuclear factors-kappaB ligand (sRANKL) and reduced bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis (AS)*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(10): p. 1197-200.
7. Boyce, B.F. and L. Xing, *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008. **473**(2): p. 139-146.
8. Kotake, S., et al., *IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1345-52.
9. Barak, V., et al., *Clinical utility of cytokeratins as tumor markers*. Clin Biochem, 2004. **37**(7): p. 529-40.
10. Vlachos, S., et al., *Serum profiles of M30, M65 and interleukin-17 compared with C-reactive protein in patients with mild and severe acute pancreatitis*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2014. **21**(12): p. 911-8.
11. Denk, G., et al., *Soluble intracellular adhesion molecule, M30 and M65 as serum markers of disease activity and prognosis in cholestatic liver diseases*. Hepatol Res, 2014. **44**(13): p. 1286-98.
12. Chatzikyriakidou, A., et al., *The role of microRNA-146a (miR-146a) and its target IL-1R-associated kinase (IRAK1) in psoriatic arthritis susceptibility*. Scand J Immunol, 2010. **71**(5): p. 382-5.
13. Jin, L., et al., *Role of miR-146a in human chondrocyte apoptosis in response to mechanical pressure injury in vitro*. Int J Mol Med, 2014. **34**(2): p. 451-63.
14. Iliopoulos, D., et al., *The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21*. Eur J Immunol, 2011. **41**(6): p. 1754-63.
15. Dong, L., et al., *Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(11): p. 2213-24.
16. Bruce, I.N. and D.D. Gladman, *Psoriatic arthritis: recognition and management*. BioDrugs, 1998. **9**(4): p. 271-8.
17. Moll, J.M. and V. Wright, *Familial occurrence of psoriatic arthritis*. Ann Rheum Dis, 1973. **32**(3): p. 181-201.
18. K., T., *Spondiloartropatilerin sınıflandırılması ve tanı kriterleri*. Turkish Journal Rheumatology, 2000. **15**(1):1-8.
19. Kasapoğlu E, İ.M., *Psöriatik Artrit*. İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası, 2004. **67**(3): p. 188-193.

20. Gladman, D.D., et al., *Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome*. Ann Rheum Dis, 2005. **64 Suppl 2**: p. ii14-7.
21. Köseoğlu HK, Y.E., *Psöriatik artrit*. Türk Klinik İmmunoloji Romatoloji, 2004. **4(1):44-53**.
22. HR, E., *Psöriatik artritinin klinik özellikleri*. Turkish Journal of Rheumatology, 2000. **15(1):31-8**.
23. Duffin, K.C., et al., *Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis: update and future direction*. J Rheumatol, 2008. **35(7)**: p. 1449-53.
24. Nograles, K.E., R.D. Brasington, and A.M. Bowcock, *New insights into the pathogenesis and genetics of psoriatic arthritis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2009. **5(2)**: p. 83-91.
25. Ho, P., A. Barton, and J. Worthington, *Genetic epidemiology of psoriatic arthritis*. Mod Rheumatol, 2004. **14(2)**: p. 91-100.
26. Gonzalez, S., et al., *The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis*. Arthritis Rheum, 1999. **42(5)**: p. 1010-6.
27. Cargill, M., et al., *A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes*. Am J Hum Genet, 2007. **80(2)**: p. 273-90.
28. Cassell, S. and A. Kavanaugh, *Psoriatic arthritis: pathogenesis and novel immunomodulatory approaches to treatment*. J Immune Based Ther Vaccines, 2005. **3**: p. 6.
29. Chiricozzi, A., *Pathogenic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis*. Actas Dermosifiliogr, 2014. **105 Suppl 1**: p. 9-20.
30. Panayi, G.S., *Immunology of psoriasis and psoriatic arthritis*. Baillieres Clin Rheumatol, 1994. **8(2)**: p. 419-27.
31. Costello, P., et al., *Predominance of CD8+ T lymphocytes in psoriatic arthritis*. J Rheumatol, 1999. **26(5)**: p. 1117-24.
32. Tassioulas, I., et al., *Clonal characteristics of T cell infiltrates in skin and synovium of patients with psoriatic arthritis*. Hum Immunol, 1999. **60(6)**: p. 479-91.
33. Fraser, A., et al., *Matrix metalloproteinase 9, apoptosis, and vascular morphology in early arthritis*. Arthritis Rheum, 2001. **44(9)**: p. 2024-8.
34. van Kuijk, A.W., et al., *Detailed analysis of the cell infiltrate and the expression of mediators of synovial inflammation and joint destruction in the synovium of patients with psoriatic arthritis: implications for treatment*. Ann Rheum Dis, 2006. **65(12)**: p. 1551-7.
35. McQueen, F.M., et al., *Natural killer cell function and expression of beta 7 integrin in psoriatic arthritis*. J Rheumatol, 1994. **21(12)**: p. 2266-73.
36. Companjen, A., et al., *Elevated interleukin-18 protein expression in early active and progressive plaque-type psoriatic lesions*. Eur Cytokine Netw, 2004. **15(3)**: p. 210-6.
37. Veale, D. and O. FitzGerald, *Psoriatic arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2002. **16(4)**: p. 523-35.
38. Mease, P.J., et al., *Adalimumab for the treatment of patients with moderately to severely active psoriatic arthritis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial*. Arthritis Rheum, 2005. **52(10)**: p. 3279-89.

39. Ritchlin, C.T., et al., *Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis*. J Clin Invest, 2003. **111**(6): p. 821-31.
40. Luxembourg, A., et al., *Do viruses play an etiologic role in ankylosing spondylitis or psoriatic arthritis?* Clin Immunol Immunopathol, 1987. **45**(2): p. 292-5.
41. Taglione, E., et al., *Hepatitis C virus infection: prevalence in psoriasis and psoriatic arthritis*. J Rheumatol, 1999. **26**(2): p. 370-2.
42. Nelson, G.W., et al., *Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis*. J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4273-6.
43. Taylor, W., et al., *Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(8): p. 2665-73.
44. Boyce, B.F. and L. Xing, *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 1**: p. S1.
45. Baud'huin, M., et al., *RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(18): p. 2334-50.
46. Whyte, M.P., et al., *Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(3): p. 175-84.
47. Chong, B., et al., *Idiopathic hyperphosphatasia and TNFRSF11B mutations: relationships between phenotype and genotype*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(12): p. 2095-104.
48. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
49. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
50. Dai, R. and S.A. Ahmed, *MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases*. Transl Res, 2011. **157**(4): p. 163-79.
51. Saydam F, D.İ., Güneş HV, *MikroRNA'lar ve kanser*. Dicle Tıp Dergisi / Dicle Medical Journal, 2011. **38**(1): p. 113-120.
52. Kroesen, B.J., et al., *Immuno-miRs: critical regulators of T-cell development, function and ageing*. Immunology, 2015. **144**(1): p. 1-10.
53. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
54. Xu, W.D., et al., *Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases*. Inflammation, 2012. **35**(4): p. 1525-9.
55. Nakasa T, M.S., H.M. Okubo A, Nishida K., and O.M.a.A. H, *Expression of MicroRNA-146 in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue*. American College of Rheumatology, 2008. **58**: p. 1284-1292.
56. Song, G.G., et al., *The association between susceptibility to inflammatory arthritis and miR-146a, miR-499 and IRAK1 polymorphisms : A meta-analysis*. Z Rheumatol, 2014.
57. Meisgen, F., et al., *MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis*. Exp Dermatol, 2012. **21**(4): p. 312-4.
58. Kim, Y.J., et al., *MicroRNA 21 regulates the proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and high-fat diet-induced obesity alters microRNA 21 expression in white adipose tissues*. J Cell Physiol, 2012. **227**(1): p. 183-93.

59. Gabriely, G., et al., *MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(17): p. 5369-80.
60. T. R. Mosmann, R.L.C., *TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties*. Annual Review of Immunology, 1989. **7**: p. 145-173.
61. Zhengbin Yao; William C. Fanslow, et al., *Herpesvirus Saimiri Encodes a New Cytokine, IL-17, Which Binds to a Novel Cytokine Receptor*. Immunity, 1995. **3**: p. 811-821.
62. Sarkar, S., L.A. Cooney, and D.A. Fox, *The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis*. Clin Exp Immunol, 2010. **159**(3): p. 225-37.
63. Hirota, K., et al., *Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 255-63.
64. Ochs, H.D., M. Oukka, and T.R. Torgerson, *TH17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 977-83; quiz 984-5.
65. Rouvier, E., et al., *CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5445-56.
66. Chabaud, M., et al., *Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 409-14.
67. Durham, L.E., B.W. Kirkham, and L.S. Taams, *Contribution of the IL-17 Pathway to Psoriasis and Psoriatic Arthritis*. Curr Rheumatol Rep, 2015. **17**(8): p. 55.
68. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
69. Z., S., *Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni*.
70. Akşit H, B.A., *Apoptoztozis*. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008. **19**(1): p. 55-63.
71. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(1): p. 37-43.
72. Hofbauer, L.C., et al., *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and osteoprotegerin serum levels in psoriatic arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(10): p. 1218-22.
73. Adrain, C. and S.J. Martin, *The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(6): p. 390-7.
74. Spierings, D.C., et al., *Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(6): p. 821-31.
75. Tas, F., et al., *Clinical significance of serum M30 and M65 levels in patients with breast cancer*. Biomed Pharmacother, 2014. **68**(8): p. 1135-40.
76. Mysliwiec, H., et al., *Evaluation of CD40, its ligand CD40L and Bcl-2 in psoriatic patients*. Folia Histochem Cytobiol, 2012. **50**(1): p. 75-9.
77. Kawakami, A., et al., *Inhibition of Fas antigen-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells in vitro by transforming growth factor beta 1*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(8): p. 1267-76.
78. Sugiyama, M., et al., *Localisation of apoptosis and expression of apoptosis related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1996. **55**(7): p. 442-9.

79. Tomankova, T., et al., *MicroRNAs: Emerging Regulators of Immune-Mediated Diseases*. Scand J Immunol, 2012. **75**(2): p. 129-41.
80. Takuya Niimoto, T.N., Masakazu Ishikawa, Atsushi Okuhara, Bunichiro Izumi, Masataka Deie, and N.A. Osami Suzuki, Mitsuo Ochi, *MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients*. BMC Musculoskeletal Disorders, 2010. **11**(209).
81. Canete, J.D. and P. Mease, *The link between obesity and psoriatic arthritis*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(8): p. 1265-6.
82. Zhang, C., et al., *The effect of overweight and obesity on psoriasis patients in Chinese Han population: a hospital-based study*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011. **25**(1): p. 87-91.
83. Nakae, S., et al., *Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6173-7.
84. Leipe, J., et al., *Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(10): p. 2876-85.
85. Jandus, C., et al., *Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(8): p. 2307-17.
86. Genovese, M.C., et al., *Efficacy and safety of secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, dose-finding, double-blind, randomised, placebo controlled study*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(6): p. 863-9.
87. Yao, Z., et al., *Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor*. Cytokine, 1997. **9**(11): p. 794-800.
88. Raychaudhuri, S.K. and S.P. Raychaudhuri, *Scid mouse model of psoriasis: a unique tool for drug development of autoreactive T-cell and th-17 cell-mediated autoimmune diseases*. Indian J Dermatol, 2010. **55**(2): p. 157-60.
89. Ulukaya, E., et al., *The levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 are elevated in serum from patients with lung cancer and helpful to predict the survival*. Lung Cancer, 2007. **56**(3): p. 399-404.
90. Ausch, C., et al., *Circulating cytokeratin 18 fragment m65-a potential marker of malignancy in colorectal cancer patients*. J Gastrointest Surg, 2009. **13**(11): p. 2020-6.
91. Bilici, A., et al., *The prognostic significance of the increase in the serum M30 and M65 values after chemotherapy and relationship between these values and clinicopathological factors in patients with advanced gastric cancer*. Tumour Biol, 2012. **33**(6): p. 2201-8.
92. de Haas, E.C., et al., *Clinical evaluation of M30 and M65 ELISA cell death assays as circulating biomarkers in a drug-sensitive tumor, testicular cancer*. Neoplasia, 2008. **10**(10): p. 1041-8.
93. Sekiguchi, T., et al., *Serum cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and poor prognosis in primary biliary cirrhosis*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0131658.
94. Xia, L., et al., *Increased serum TWEAK levels in Psoriatic arthritis: relationship with disease activity and matrix metalloproteinase-3 serum levels*. Cytokine, 2011. **53**(3): p. 289-91.
95. van Kuijk, A.W., et al., *TWEAK and its receptor Fn14 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared to psoriatic arthritis and its response to tumour necrosis factor blockade*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(1): p. 301-4.

96. Yu, C., W.P. Chen, and X.H. Wang, *MicroRNA in osteoarthritis*. J Int Med Res, 2011. **39**(1): p. 1-9.
97. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
98. Niimoto, T., et al., *MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients*. BMC Musculoskelet Disord, 2010. **11**: p. 209.
99. Xia, P., et al., *Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions*. Immunol Lett, 2012. **148**(2): p. 151-62.
100. Sonkoly, E., et al., *MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?* PLoS One, 2007. **2**(7): p. e610.
101. Li, J., et al., *Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. R81.