T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA METOTREKSAT ETKİNLİĞİNİN RFC1 (İNDİRGENMİŞ FOLAT TAŞIYICI 1) TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Hazırlayan
Mehmet Akif BÖLÜKBAŞI

Danışman
Prof. Dr. Halit CANATAN

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2013-4509 nolu proje ile desteklenmiştir.

Yüksek Lisans Tezi

Ağustos-2015

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Mehmet Akif BÖLÜKBAŞI

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"**Romatoid Artritli Hastalarda Metotreksat Etkinliğinin RFC 1 (İndirgenmiş Folat Taşıyıcı 1) Tek Nükleotid Polimorfizmi İle İlişkisinin İncelenmesi**" adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan	Danışman
Mehmet Akif BÖLÜKBAŞI	Prof. Dr. Halit CANATAN

Tıbbi Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Halit CANATAN

Prof. Dr. Halit CANATAN danışmanlığında **Mehmet Akif BÖLÜKBAŞI** tarafından hazırlanan **"Romatoid Artritli Hastalarda Metotreksat Etkinliğinin RFC 1 (İndirgenmiş Folat Taşıyıcı 1) Tek Nükleotid Polimorfizmi İle İlişkisinin İncelenmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

…….. /…… / ……...

JÜRİ: **İmza**

Danışman : Prof. Dr. Halit CANATAN
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AB Dalı)

Üye : Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
(Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AB Dalı)

Üye : Yard. Doç. Dr. Serpil TAHERİ
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AB Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……...… tarih ve ……..……
sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……. /……../ ……

……..
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Biyoloji bölümü lisans mezunu olarak geldiğim Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda her şeyden önce Anabilim Dalı'na adaptasyonumda, çalışmalarımı yönlendirmesinde, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar insani ilişkilerde de sonsuz desteğiyle gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Halit CANATAN'a, değerli kişiliği ile gerek tezimin labaratuvar çalışmaları ve gerekse yazımı esnasındaki yardımlarından dolayı sayın Yard. Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye, tez çalışmam için gerekli hasta teminini sağladıklarından dolayı sayın Prof. Dr. Salih ÖZGÖÇMEN'e, tezimin istatistiksel analizleri için yardımlarını esirgemeyen sayın Araş. Gör. Gökmen ZARARSIZ'a, tezimin labaratuvar çalışmalarında emeğini ve bilgisini esirgemeyen değerli ablalarım Fatma DAL ve Müge Gülcihan ÖNAL'a, çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan değerli arkadaşım Hatice KOÇER, abim Araş. Gör. Ekrem BÖLÜKBAŞI ve yengem Araş. Gör. Ayşenur BÖLÜKBAŞI'ya ve de yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

Mehmet Akif BÖLÜKBAŞI

Kayseri, Ağustos 2015

ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA METOTREKSAT ETKİNLİĞİNİN RFC1 (İNDİRGENMİŞ FOLAT TAŞIYICI 1) TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Mehmet Akif BÖLÜKBAŞI
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2015
Danışman: Prof. Dr. Halit CANATAN

KISA ÖZET

Romatoid artrit, populasyonlarda % 0,5-1 sıklıkla görülen, eklemlerde ağrı, depresyon ve hareket kısıtlılığı gibi komplikasyonlarla ortaya çıkan kronik, sistemik, inflamatuar bir hastalıktır. Romatoid artrit, son yıllarda yaygın olarak hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan olan Metotreksat (MTX) ile tedavi edilmeye başlanmıştır. MTX etkinliği bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bu bireysel farklılıkların genetik faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. İnsan RFC1 geninde meydana gelebilecek G80A polimorfizminin MTX'in hücresel düzeyi ve etkinliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

İnsan RFC1 G80A polimorfizminin MTX'in etkinliği ile ilişkili olup olmadığının araştırılması amacıyla MTX ve MTX + bDMARDs grubu olmak üzere toplam 103 Türk romatoid artrit hastası çalışmaya dahil edilmiştir. MTX ve MTX + bDMARDs grupları sırasıyla, RFC1 G80A ((% 23,2 GG - % 57,1 GA - %19,6 AA) ve (% 31,9 GG - %38,3 GA - %29,8 AA)) genotipleri ile analiz edildiğinde $p<0.05$ düzeyine göre istatistiksel bir anlam bulunamamıştır. Çalışma gruplarımızın değişkenlerle yapılan çoklu istatistiksel analizleri de $p<0.05$ düzeyine göre anlamlı bulunamamıştır.

Sonuç olarak, yaptığımız çalışmamızda Türk romatoid artrit hastalarında RFC1 G80A polimorfizmi MTX etkinliği arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda da belirttiğimiz RFC1 G80A polimorfizmi ile MTX etkinliği arasındaki ilişkinin Türk romatoid artritli hastalarda anlamlı sonuç verebilmesi için daha yüksek sayıda romatoid artrit hastasının projeye katılımının sağlanması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat; İndirgenmiş folat taşıyıcı 1; Tek nükleotid polimorfizmi; Romatoit artrit

EVALUATION OF RELATIONSHIP BETWEEN METHOTRAXATE EFFICACY AND RFC1 (REDUCED FOLATE CARRIER 1) SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Mehmet Akif BÖLÜKBAŞI
Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
M.Sc. Thesis, August 2015
Supervisor: Prof. Dr. Halit CANATAN

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis, is a chronic, systemic and inflammatory disease, affects about % 0,5-1 of the general population world wide and develops complications such as pain in joints, depression, and limitations in function. In recent years, Rheumatoid arthritis has been treated with Methotrexate (MTX) which is one of the most widely used disease modifiying antirheumatic drug. MTX efficacy varies among individuals. These individual differences are thought to be resulted from genetic factors. It has been reported that G80A polymorphism of human RFC1 polymorphism is associated with cellular level and effectiveness of MTX.

In order to investigate whether the human RFC1 G80A polymorphism is associated with efficacy of MTX, 103 Turkish rheumatoid arthritis patients, MTX group and MTX+ bDMARDs group, were included in the study. When groups of MTX and MTX+ bDMARDs, analyzed with RFC1 G80A genotype ((23,2% GG; 57,1% GA; 19,6% AA) and (% 31,9 GG – (% 38,3 GA - % 29,8 AA, respectively)), there was no statistically significant differences betwween two groups ($p<0.05$). Multiple statistical analysis of the variables between two study groups was not found to be statistically significant ($p<0.05$).

As a result in our study, there was no statisticaly significant relationships between RFC1 G80A polymorphism and the efficacy of MTX in Turkish rheumatoid arthritis patients. As stated in the current study, a higher number of patients needed to be to be recruited for further studies to obtain statistically important results regarding a possible relationships between RFC1 G80A polymorphism and MTX efficacy in Turkish rheumatoid arthritis patients.

Key Words: Methotrexate; Reduced folate carrier 1; Single nucleotide polymorphism; Rheumatoid arthritis

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
KABUL VE ONAY SAYFASI iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR ve SİMGELER x
TABLOLAR LİSTESİ xii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. ROMATOİD ARTRİT 4
2.1.1. Romatoid Artritin Etiyolojisi 4
2.1.2. Romatoid Artritin Patolojisi 5
2.1.3. Romatoid Artritin Klinik Bulguları 5
2.1.4. Romatoid Artritin Radyolojik Bulguları 6
2.1.5. Romatoid Artritin Laboratuar Bulguları 7
2.1.6. Romatoid Artritin Tedavisi 8
2.1.6.1. Metotreksat 8
2.1.6.2. Hastalığı Biyolojik Modifiye Edici Anti - Romatizmal İlaçlar 9
2.1.6.2.1. Etanersept 11
2.1.6.2.2. İnfliksimab 11
2.1.6.2.3. Adalimumab 13
2.1.6.2.4. Anakinra 13
2.1.7. Romatoid Artritin Prognozu 13
2.2. ROMATOİD ARTRİT ve GENETİK 14
2.3. RFC1 GENİ ve YAPISI 15
2.4. RFC1 VE ROMATOİD ARTRİT 18
3. GEREÇ VE YÖNTEM 19
3.1. ÇALIŞMA GRUBU 19
3.2. GEREÇLER 19
3.3. MATERYAL VE METOD 20
3.3.1. Genomik Dna İzolasyonu 20
3.3.2. Genomik DNA'ların Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 21
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 22
3.3.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi 26

4. BULGULAR 27
4.1. MTX KULLANAN ve MTX + bDMARDs KULLANAN ÇALIŞMA GRUPLARININ GENEL ÖZELLİKLERİ VE İSTATİSTİK ANALİZLERİ 27
4.1.1. MTX Kullanan Çalışma Grubu 27
4.1.2. MTX + bDMARDs Kullanan Çalışma Grubu 28
4.2. RFC 1 POLİMORFİZM BULGULARI 28
4.2.1. MTX Kullanan Çalışma Grubu 28
4.2.2. MTX + bDMARDs Kullanan Çalışma Grubu 28
4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 29
4.3.1. MTX ve MTX + bDMARDs Grupları ile Değişkenlerin İstatistiksel Analizi 29
4.3.2. RFC1 G80A Polimorfizmi ile Değişkenlerin İstatistiksel Analizi 33
4.3.3. MTX Grubu ve Polimorfizmler İle Değişkenlerin İstatistiksel Analizi 33
4.3.4. MTX + bDAMARDs Grubu ve Polimorfizmler İle Değişkenlerin İstatistiksel Analizi 33
5. TARTIŞMA 37
6. KAYNAKLAR 41
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

RA	Romatoid Artrit
MTX	Metotreksat
MTX-PG	Metotreksat-Poliglutamat
DMARDs	Hastalık Modifiye edici Anti-Romatizmal İlaçlar (Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs; DMARDs)
bDMARDs	Hastalık Biyolojik Modifiye edici Anti-Romatizmal İlaçlar (Biologic Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs; bDMARDs)
SLC19A1	Çözünen madde taşıyıcı ailesi 19, üye 1 (Solute carrier family19, member 1)
RFC 1	İndirgenmiş Folat Taşıyıcı 1 (Reduced Folate Carrier 1)
MHC	Major Histokompatibilite Kompleksi **(**Major Histocompatibility Complex, MHC**)**
HLA	İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen, HLA)
ACR	Amerikan Romatoloji Koleji Kriterleri (American College Rheumatology Criteria, ACR)
ACRSRA	Amerika Romatoloji Koleji Romatizma Alt Komitesi (American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis, ACRSRA)
CRP	C- Reaktif Protein
ESH	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
Ig	İmmünoglobilin
RF	Romatoid Faktör
Anti-CCP	Anti Siklik Sitrülinlenmiş Peptit (Anti- Cyclic Citrullinated Peptide, Anti-CCP)
NSAİİ	Non-Steroid Anti İnfulamatuvar İlaç (Non Steroid Anti Inflammatory Drugs, NSAID)
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA)
TNF	Tümör Nekroz Faktör
IL	İnterlökin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

TBE	Tris Borik asit Etilendiamin tetraasetik asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
Bç	Baz çifti
DM	Şeker Hastalığı (Diabetus Mellitus, DM)
HT	Hipertansiyon
VAS	Görsel Analog Skoru (Visual Analogue Scale, VAS)
BMI	Vücut Kitle İndeksi (Body Mass Index, BMI)
LSD	En Küçük Anlamlı Fark (Least Significant Difference, LSD)
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
α	Alfa
sn	Saniye
dk	Dakika
dH_2O	Distile su

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Romatoid Artrit'le ilgili genetik faktörlere ait bazı polimorfizmler……..15

Tablo 4.1. MTX ve MTX + bDMARDs grupları ile değişkenlerin istatistiksel analizi……..29

Tablo 4.2. İnsan RFC 1 G80A polimorfizmi ile değişkenlerin istatistiksel analizi ……..31

Tablo 4.3. MTX grubu ve İnsan RFC 1 G80A polimorfizmi ile değişkenlerin istatistiksel analizi.....34

Tablo 4.4. MTX + bDAMARDs grubu ve insan RFC 1 G80A polimorfizmi ile değişkenlerin istatistiksel analizi.....35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. MTX'in hücre içine alınması ve çalışma mekanizması.....9
Şekil 2.2. Biyolojik modifiye edici anti-romatizmal ilaçların moleküler mekanizması.....11
Şekil 2.3. İnsan RFC geninin yapısı.....16
Şekil 3.1. İnsan RFC 1 genine ait nükleotid dizilimi ve primerlerin bağlanma bölgeleri.....22
Şekil 3.2. PZR sonrası jel görüntüsü.....24
Şekil 4.1. İnsan RFC 1 geni için RFLP analizi.....30

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Romatoid artrit (RA), toplumun yaklaşık olarak % 0.5-1'ini etkileyen başlıca eklem sıvısı, kıkırdak doku ve kemik dokuyu hedef alan nedeni/nedenleri tam olarak bilinmeyen oto-immün bir hastalıktır. Her yaşta bireyde görülebilir ancak en fazla 35-60 yaşları arasında başlamakta ve özellikle kadınlarda erkeklere oranla 3 kat daha çok görülmektedir (1, 2, 3). Kesin tedavisi olmayan ve son yıllarda hayat süresini kısaltan bu kronik hastalık için etkili bir tedavi uygulanması gerekmektedir (4).

Romatoid artrit tedavisinde hastalık modifiye edici ilaç olarak Metotreksat (MTX), Leflunomide, Sulfasalizin gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Kullanılan bu hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan olan MTX'in kemik yıkımını önlediği veya geciktirdiği ve hastalığın ilerleyişini azalttığı ispatlanmıştır (5). MTX uzun süreli kullanım avantajı, biyolojik ajanlarla birlikte kullanılabilme ve olası yan etkilerinin düşük olması nedeniyle romatoid artrit tedavisinde öncü ilaç olarak kullanılmaktadır (3).

Bireyler yapılan ilaç tedavilerine faklı cevaplar vermektedir. Değişik nedenlere bağlanabilecek olan bu farklılıkların genellikle yaş, cinsiyet, ırk, çevre gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda bireyler arasındaki ilaçlara karşı görülen bu değişikliklerin genetik farklılıklarla da ilgili olduğu belirtilmiştir. Bazı kişilerde genetik yapıdaki değişikliğe bağlı olarak belirli protein tiplerinin ve dolayısıyla ilaç eliminasyonunda rol oynayan enzimlerin ve ilaç etkisini başlatan reseptörlerin yapısında farklılıklar olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bu farklılıklar da Farmakogenetik bilimine giderek önem kazandırmaktadır (6).

Farmakogenetik; ilaç kinetiğinin ve kişinin ilaçlara karşı verdiği cevabın genetik yapıya göre bireyler ve etnik gruplar arasında (inter-etnik) değişmesi ile uğraşan farmakolojinin bir dalıdır. İlaç tüketimindeki artış, advers ilaç etkilerinin ölüm sebepleri arasına girmesi, hasta güvenliği, doğru hasta-doz- ilaç yönetimin kurulması çalışmaları genetik farklılıkların göz önüne alınarak yapılması birçok çalışmanın konusu olmuştur. Romatoid artrit hastalarında yapılan birçok çalışmada bu genetik farklılıklar ele alınmış ve yapılan bu çalışmalar romatoid artrit hastalarının tedavilerinde farmakogenetiğin uygulanabilmesi konusunda yol gösterici olmuştur (6, 7, 8).

MTX, romatoid artrit tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biridir (5). MTX uzun süreli kullanım avantajı biyolojik ajanlarla birlikte kullanılabilme ve olası yan etkilerinin düşük olması nedeniyle romatoid artrit tedavisinde öncü ilaç olarak kullanılmaktadır. Ancak bazı hastalarda MTX'in tek başına tedavide yeterli olmadığı belirtilmiştir (3).

MTX etkinliğinin düşük olduğu hastalarda romatoid artrit aktivitesi hastalık biyolojik modifiye edici anti-romatizmal ilaçlar (Biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs; bDMARDs) ile baskılanabilir (9). MTX'in tek başına tedavide yeterli olduğu hastalar ile MTX yetersizliğinde ilave olarak bDMARDs verilen hastaların genetik olarak aynı gen üzerinde farklı dizilimlere sahip oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (7, 10). MTX'in bağırsaklardan emilimi ve hedef hücrelere alımı başlıca polimorfik SLC19A1 olarak da bilinen insan RFC1 (reduced folate carrier 1) geni tarafından kontrol edilir (11). MTX 'indirgenmiş folat taşıyıcısı 1 (RFC1)' tarafından hücreye alındıktan sonra metotreksat poliglutamata (MTX-PG) dönüştürülerek daha etkin duruma getirilir (12) (Şekil 2.1).

Folat taşıyıcısı olan RFC1 insanlarda SLC19A1 tarafından kodlanan bir proteindir (13). Memeli hücrelerine folat bileşiklerinin ulaştırılması reseptör veya taşıyıcı aracılı mekanizmalarla meydana gelmektedir. MTX, taşıyıcı aracılı mekanizma ile taşınan bir antifolattır. RFC1 hücrelerarası folat konsantrasyonunu korumakla görevlidir (14). RFC1 (80GG) polimorfizmi taşıyan bireylerin folat düzeyleri düşüktür. Metotreksat ile tedavi edilen 80AA polimorfizmi taşıyan bireyler, MTX'e yüksek düzeyde cevap göstermiştir. Hastanın gen polimorfizmine bağlı olarak, ilaç ve doz kişiye göre değişiklik gösterebilmektedir (15).

Bu çalışmanın amacı, Türk romatoid artritli hastalarda MTX etkinliğini tahmin edici bir belirteç olarak insan RFC1 gen polimorfizmlerinin araştırılması ile özellikle bDMARDs kullanımındaki bireysel farklanmaların gösterilmesi ve gereksiz ilaç kullanımını önleyerek gerek romatoid artrit hastalarının tedavi kalitesinin artırılması gerekse de ülke ekonomisine katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ROMATOİD ARTRİT

Romatoid artrit, etiyolojisi tam olarak bilinmeyen, sistemik olarak ilerleyen özellikle eklemlere yerleşerek deformasyonla seyreden bir oto-immün hastalıktır. Her yaşta bireyde görülebilir ancak en fazla 35-60 yaşlarında başlamakta ve özellikle kadınlarda erkeklere oranla 3 kat daha çok görülmektedir (1, 2).

Romatoid artritin diğer artrit formlarından farklı yanı semptomlar aynı anda birçok eklemi etkileyerek yumuşak dokusunun şişmesi ve enflamasyonudur. Hastalık ilerlerken eklem yüzeyinde aşınmalara ve yıkıma sebep olur ve hareket alanına zarar verir (1, 16).

Hastalığın seyri hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Bazı hastalarda kısa süreli ve az ağrılı eklem tutulmaları yaşanırken, bazı hastalarda da yapılan tedavilere rağmen, kısa süreli eklem sakatlanmaları ve buna ek olarak deri, kan damarları, kalp, akciğer ve kaslar gibi eklem dışı önemli organlara da zarar vermektedir (1, 2).

2.1.1. Romatoid Artritin Etiyolojisi

Romatoid artrit, etiyolojisi bugüne kadar tam olarak bilinmeyen, klinik etkilerine göre sınıflandırılan hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir (17, 18). Romatoid artritin genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıktığı kabul edilmiştir. Hastalık tüm dünya populasyonlarında görülebilmekte ancak hastalığın sıklığı toplumlar arası farklılıklar göstermektedir. Hastalığın genetik yatkınlığı araştırılmış ve birinci dereceden akraba olan bireyler arasında 3-4 kat daha çok görüldüğü belirtilmiştir. Romatoid artrit oluşumunda insan genomunda bulunan polimorfik genleri içeren major

histokompatibilite kompleksinde (Major Histocompatibility Complex**;** MHC) yer alan HLA-DR (İnsan Lökosit Antijeni) sistem genlerinin etkili olduğu bildirilmiştir. Romatoid artrit oluşumunda etkili olan genlerin başında HLA DR4 gelmektedir. Bu gen, romatoid faktörün pozitif olduğu hastalarda % 60-70 oranında gözlenirken pozitif olmayanlarda yaklaşık % 25 civarındadır. Bu genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin de romatoid artrit oluşumunda etkisi olduğu bildirilmiştir (2, 16).

2.1.2. Romatoid Artritin Patolojisi

Romatoid artritte kıkırdak altındaki kemik ve eklem boşluğunu döşeyen sinoviyum etkilenir. Normal bir sinoviyumda bir veya üç tabaka hücreden oluşan ve bazal membranı bulunmayan intima tabakası vardır. İntimal bölge, makrofaj ve fibroblast benzeri hücreler olmak üzere iki önemli hücre tipi içerir. İntimal tabakadaki sinovyal hücreler makrofajlara özgü davranışlara sahip olup T hücrelerinin mediyatörleri olarak görev yaparlar. Ayrıca normal sinovya romatoid sinovyaya dönüştüğünde allojenik T-hücre aktivasyonunda son derece etkili olur (16, 19).

Hastalığın erken evresinde dokuda ödem, damarlarda proliferasyon ve yeni damar oluşumu (angiogenezis) görülür. Kronik evreye geçildikçe sinovial hücre sırası artar. Artan hücreler hem makrofaj benzeri hem de fibroblast benzeri sinoviositlerdir. CD4+T lenfositler, B lenfositler, makrofajlar ve plazma hücrelerinin sinoviyumu infiltre ettiği görülür. Romatoid artritte sinoviyum hipertrofisi gelişir özellikle lokal olarak kemik ile kıkırdak arasına doğru ilerler, bu duruma pannus denir ve kemik erozyonlarına neden olur (19).

2.1.3. Romatoid Artritin Klinik Bulguları

Romatoid artrit genellikle öncelikli olarak el, el bilekleri ve ayak eklemlerini tutarak seyrine başlar. Daha sonra diz, ayak bilekleri, dirsek ve omuz eklemlerini tutarak seyrine devam edebilen bir artrittir (20). Hastalığın seyri hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Bazı hastalarda kısa süreli ve az ağrılı eklem tutulmaları yaşanırken, bazı hastalarda da yapılan tedavilere rağmen kısa süreli eklem sakatlanmaları ve buna ek olarak deri, kan damarları, kalp, akciğer ve kaslar gibi eklem dışı önemli organlara da zarar verebilmekte ve hayat kayıpları görülebilmektedir (1, 2).

Sabah tutukluğu romatoid artrit için belirleyici özelliktir. Uykudayken intersitisyel sıvının birikmesiyle, uykudan sonra tutukluk daha çok belirgindir. Ağrı hastaların

çoğununun yakındığı öncelikli problemdir. Bunun yanı sıra şişlik de romatoid artritli eklemlerdeki anahtar özelliktir. Şişkinlik, sinoviyal hipertrofi (şişkin olan eklemde hamur kıvamı alınması) veya sinoviyal hücre birikimine bağlı olabilir. Bu bulgu en çok el ve ayakların küçük eklemlerinde hissedilir. Eklem basıncı fleksiyonda arttığında sinoviyumun bir kısmı hapsedilerek eklemin geri kısmından ayrılarak bir kist oluşturur (Baker kisti). Birçok periferal eklemde kist görülebilir, ama en sık bilineni dizdedir. Eklem ve tendon kılıflarının şişmesi ve ekleme destek yapıların değişikliği sonucunda eklem kısıtlılığı meydana gelir. Bu da zamanla deformitelere sebep olur. Romatoid artritli hastaların % 10'undan fazlasında hastalığın ilk iki yılı içerisinde ellerin küçük eklemlerinde deformite gelişir. Deformiteler oluştuktan sonra kalıcı oldukları için, hastalığın tanısının erken konması ve tedavi sürecinin başlatılması önemlidir (20, 21). Amerikan Romatoloji Koleji Kriterleri (American College of Rheumatology Criteria, ACR)'ne göre romatoid artrit tanısı konacak hastalarda aranan kriterler aşağıda sıralanmıştır:

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

Yukarıda belirtilen 7 kriterden en az 4 tanesinin bulunması ve hastanın şikayetlerinin 6 haftadır devam ediyor olması tanı koymak için yeterlidir (22).

2.1.4. Romatoid Artritin Radyolojik Bulguları

Radyolojik bulgular romatoid artrit tanısının konmasında ayrı bir öneme sahiptirler. Periost reaksiyonunun olmaması ve osteofitlerin bulunmaması ana radyolojik özelliklerdendir (23). Romatoid artrit için yapılan radyolojik incelemede en erken bulgu eklem çevresindeki şişmiş yumuşak dokusudur. Konvansiyonel el ve ayak grafileri tanı ve tedavinin izlenmesi yönünden önemlidir. Ultrasonografi de konvansiyonel radyografiyi destekleyici rol üstenmektedir. Özellikle servikal eklem

tutulumları için bilgisayarlı tomografi ön plandadır. Romatoid artrit radyolojisinde inflamatuvar bir artritin klasik gidişi zaman içinde belirlenir. Manyetik rezonans, yumuşak dokulardaki yüksek çözümleme gücü ile sinoviyal dokulardaki değişiklikleri erken evrede belirlemeye ve erken tanı koymaya imkan sağlamaktadır (23, 24).

2.1.5. Romatoid Artritin Laboratuar Bulguları

Romatoit artrit tanısı konulabilecek tek bir laboratuvar testi bulunmamaktadır. Ancak tanısal kesinliği artırmak için pek çok test geliştirilmiştir. Amerikan Romatoloji Koleji Romatoid Artrit Alt Komitesi (American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis, ACRSRA)'nin önerdiği testler şunlardır (25).

C-reaktif protein (CRP); Spesifik olmamasına rağmen tanı almış kronik hastaların takibinde kıymetli bir parametredir.

Eritrosit sedimantasyon hızı (ESH); genellikle 30 mm/saati geçmektedir; hastalık takibinde kullanılabilir.

Hemoglobilin ve Hemotokrit ; Romatoid artritli hastaların çoğunda anemi beklenen bir durumdur. Romatoid artritli hastalarda ortalama Hb konsantrasyonu 10 g/dL'dir.

Karaciger fonksiyon testleri ; alkalen fosfataz seviyeleri normal veya hafif artar.

Beyaz küre; artabilmektedir.

Trombositler ; sıklıkla artmıştır.

İmmünoglobulinler (Ig); gamaglobulinler (IgG, M ve A) artar.

Serum proteinleri ; serum albumin düzeyleri, akut faz cevabı olarak azalmış üretim nedeniyle düşük bulunur; α-2 globulin ve fibrinojen artışı romatoid artrite özgü değildir bütün enfeksiyon ve inflamatuvar durumlarda da görülebilir.

Romatoid Faktör (RF) ; Romatoid artrit tanı kriterleri arasında yer alan tek laboratuvar bulgusu olan RF kısaca IgG'nin Fc parçası ile reaksiyona giren otoantikorlar olarak tanımlanabilir. Romatoid artrit hastalarının % 75'inde RF pozitiftir. RF romatoid artrite özgü değildir ancak RF pozitif hastalarda hastalık seyri daha ağır olmakta ve eklem dışı komplikasyon sık görülmektedir (26, 27).

Anti Siklik Sitrülinlenmiş Peptit antikorları (Anti- Cyclic Citrullinated Peptide; anti CCP); Romatoid artrit için daha özgün belirteç olarak tanımlanmıştır. Anti CCP Antikorları RF negatif olan romatoid artrirtli hastalarda tanı koymaya yardımcı olabilir. Ayrıca Anti CCP antikorları, romatoid artriti diğer hastalıklardan (enfeksiyonlar,

hepatitler vs.) dolayı RF pozitif olan durumlardan ayırt etmede yardımcı olabilir (28, 29).

2.1.6. Romatoid Artritin Tedavisi

Romatoid artrit klinik seyri açısından hastalar arasında farklılık gösterdiği için verilen tedavi programlarının da bireysel olarak düzenlenmesi gerekmektedir. Tedavideki temel amaç inflamasyonu erken safhada baskılamak ve eklem fonksiyon kayıplarını en aza indirmektir (30).

Romatoid artrit tedavisi "piramid prensibi" olarak isimlendirilen bir yaklaşıma göre yapılmaktadır. Bu tedavide hastalar bir süre sadece birinci basamakta yer alan nonsteroid anti inflamatuvar ilaçlar (NSAII) ile daha sonra ikinci basamağı oluşturan hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar ile tedavi edilmektedir. Nonsteroid ilaçlar, eklem ağrısı ve sabah tutukluğunu giderilmesinde etkilidir. Ancak eklem hasarının önüne geçemedikleri ileri sürülmüştür. İlaçlar seçilirken ilaçların yarılanma süreleri, fiyatları, yan etkileri gibi etkenler göz önünde tutulmuştur. İkinci basamak tedavi ise NSAII ile tedavisine cevap alınamayan hastalarda kullanılmıştır. Bu basamakta kullanılan ilaçlar DMARDs olarak adlandırılırlar. Hastalığın seyrini değiştirerek erozyon gelişimini durdurduğu veya geciktirdiği kabul edilen bu ilaçlar romatoid artritli hastalarda tanı konduktan sonra gecikmeden başlanılmalıdırlar. Metotreksat, sulfasalazin, leflunomid ve hidroksiklorokin bu grupta en çok kullanılan ilaçlardır (2). Kullanılan bu hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan olan MTX'in kemik yıkımını önlediği veya geciktirdiği ve hastalığın ilerleyişini azalttığı ispatlanmıştır (5). MTX uzun süreli kullanım avantajı, biyolojik ajanlarla birlikte kullanılabilme ve olası yan etkilerinin düşük olması nedeniyle romatoid artrit tedavisinde öncü ilaç olarak kullanılmaktadır (3).

2.1.6.1. Metotreksat

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan en önemli ilaç MTX'tir. MTX ilk kez 1940 yılında kanser hastalarında kullanılmak üzere geliştirilen folik asitin spesifik antagonistidir (31). Romatolojik hastalıklarda ilk kez 1972 yılında kullanılmaya başlanmıştır ancak rutin uygulamaya 1980 yılından itibaren geçilebilmiştir (32, 33). 1985 yılından 2000'li yıllara doğru bakıldığında günümüzde MTX ile tedavi edilen

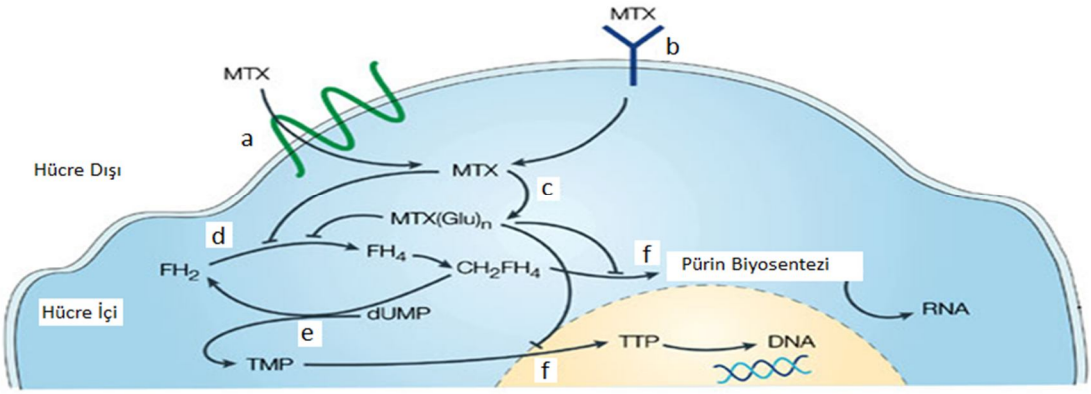
hasta sayısının artış gösterdiği görülmüştür. Bu artışın nedeni MTX ile tedavi edilen hastalarda eklem erozyonlarının ve mortalitenin azalmasıdır. MTX'in sağladığı düşük eklem erozyon ve yüksek hayatta kalma oranı, DMARDs grubuna ait sulfasalazin, hidroksiklorokin, altın ve penicilamin gibi diğer ilaçlar tarafından sağlanamamaktadır (34). Yapılan klinik araştırmalar, monoterapi uygulanan romatoid artrit hastalarının yaklaşık % 10-30'unda toksisite gelişimi nedeniyle MTX tedavisine devam edilemediğini göstermektedir (35, 36). Bununla beraber, son yıllarda yapılan ilaç araştırmalarıyla, ilaca verilen bireysel yanıtta çevre, beslenme, yaş, cinsiyet, kilo, ilaç etkileşimlerinin yanı sıra genetik faktörlerin de önemli olduğu görülmektedir. Romatoid artritli hastaların genetik şifrelerinde görülen polimorfizmler de hastalığa bireysel olarak yaklaşılması gerektiği ve tedavi programlarının bu yaklaşıma göre belirlenmesinin önemli olduğunu göstermektedir (15).

MTX'in etki mekanizması ve metabolizması tam olarak bilinmemesine rağmen çok sayıda enzimin etki mekanizmasında MTX'in önemli olduğu gösterilmiştir (37). MTX hücre içerisine taşıyıcı enzim olan RFC1 ile alınır. Bu girişi ATP bağlayıcı kasetler (ABC=ATP binding cassette), özellikle ABCC1 ve 5, ABCG2 ve ABCB1 gibi taşıyıcılar kolaylaştırır (38, 39). MTX'in hücre içine alınması ve çalışma mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Taşıyıcı enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen polimorfizmlerin MTX tedavi sonucunu etkilediğini ortaya koyan çalışmalar literatürde yer almaktadır. Çalışmış olduğumuz RFC1 genine ait G80A Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)'nin, MTX tedavisi ve etkinliği üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (10, 40, 41).

2.1.6.2. Hastalığı Biyolojik Modifiye Edici Anti - Romatizmal İlaçlar (bDMARDS)

Biyolojik ajanlar özellikle romatoid artrit hastaları için geliştirilen, hastalığı modifiye edici ve hastalığın seyrini değiştiren ilaçlardır. Bu ajanlar yalnızca semptomları hafifletmek için değil, hastalığın radyolojik seyrini de yavaşlatmak için geliştirilmiştir (42, 43). Ancak bu ajanlarla yapılan tedaviler geleneksel DMARD'lardan pahalı ve her hastada etkili değildir. Hastalığın erken aşamada teşhis edilmesi biyolojik ajanlarla tedavi sürecinin maliyetini uygun hale getirebilmektedir (44).



Şekil 2.1. MTX'in hücre içine alınması ve etki mekanizması. MTX, bir folat reseptörü **(b)** tarafından aktifleştirilen endositik yolunu kullanarak indirgenmiş folat taşıyıcı **(a)** vasıtası ile hücre içine girer. Hücre içerisine girdikten sonra, metotreksat, folipoliglutamat sentetaz enzimi ile MTX-poliglutamata dönüşür **(c)**. MTX ve MTX-poliglutamat, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek dihidrofolatın (FH2) tetrahidrofolata (FH4) dönüşümünü engeller **(d)**. FH4 üretimi bloke edildiği için timidilat sentezi azalır **(e)** ve sonucunda DNA sentezi inhibe edilir **(f)**. Uzun zincirli MTX-poliglutamat ve MTX ile hedef enzim olan dihidrofolat redüktaz için aynı afiniteye sahiptir. Her ikisinin de RNA sentezi için gerekli olan timidilat sentezi **(e)** ve purin biyosentezini **(f)** inhibe edici etkileri belirgin şekilde artmıştır. (99 No'lu kaynaktan uyarlanarak alınmıştır).

Tümör Nekroz Faktör (TNF) ve İnterlökin (IL)-1'in romatoid artrit üzerindeki etkileri üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bu stokinlere karşı blokerlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Etanersept, İnfliksimab ve Adalimumab; Gıda ve İlaç İdaresi'nden (Food and Drug Administration; FDA) onay almış TNF blokerleridir. Bu blokaj, Etanersept için rekombinant TNF molekülü olan TNFRSF1B ile veya İnfliksimab ve Adalimumab için anti-TNF-α monoklonal antikoru ile olur. Bu TNF antagonistleri, TNF reseptörlerine TNF bağlanmasını engelleyerek TNF tarafından düzenlenen sinyal yolaklarını bloke eder. Bu bloke sistemi ile semptomlarda azalma izlenmesine rağmen bütün hastalarda aynı derecede yanıt alınamamaktadır (45, 46). Anakinra, FDA tarafından onay almış olan diğer bir biyolojik ajandır. Bu ajan, IL-1'i rekombinant formu olan IL-1 RA'ya dönüştürerek hedef resepterün sinyalini engeller (47, 48).

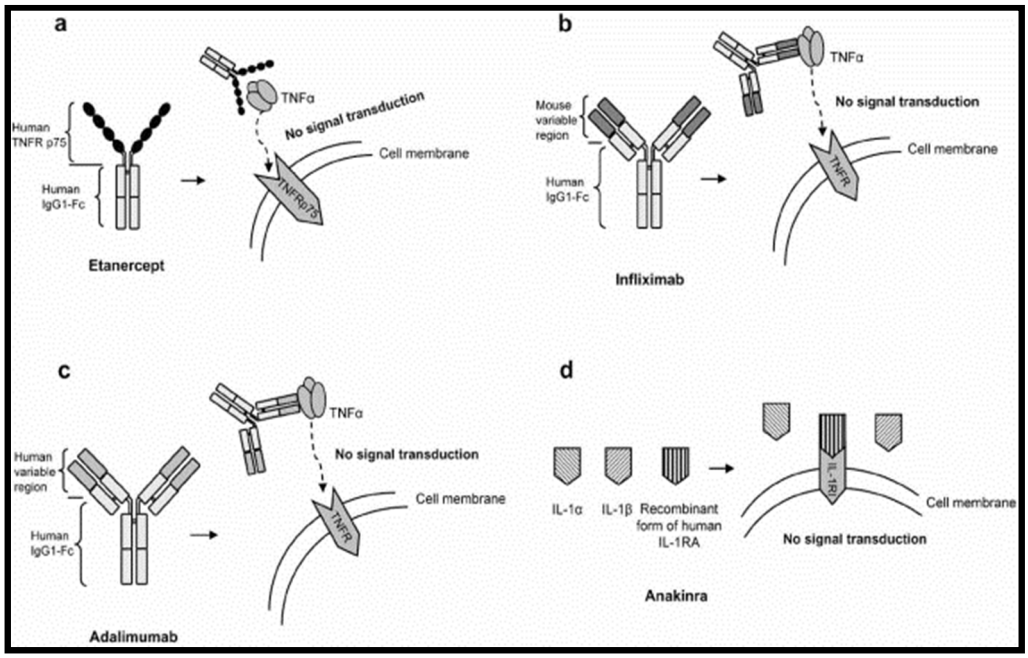
Biyolojik ajanlar, romatoid artrit hastaları için kişiye özel ilaç tedavisi için kullanıma uygundur. Bu ilaçların kullanımındaki risk lenfomada artış meydana gelmesidir. Ancak dikkate alınmalıdır ki, şiddetli romatoid artrit hastalarının lenfoma riski yaklaşık iki kat yüksektir. Bu lenfoma riski taşıyan hasta gruplarında, antiviral bağışıklığın zayıflığını düşünülmektedir (49).

2.1.6.2.1. Etanersept

Etanersept, insan IgG1 bölgesine insan p75 TNF reseptörünün bağlandığı bir dimerik füzyon proteinidir (Şekil 2.2.a). Romatoid artrit ve erken romatoid artrit hastalarında monoterapide ve MTX ile kombine kullanımında etkisi kanıtlanmıştır. Bu ilaç, en az 24 ay süreyle kullanıldığında eklem erozyonlarının radyolojik bulgularında önemli ölçüde azalma görülmüştür. Etanersept ve MTX ile kombine tedavisi daha iyi klinik sonuçlar göstermektedir. Ne yazık ki, Etanersept ile tedavi edilen romatoid artritli hastalarda lenfoma, tüberküloz ve kalp yetmezliği gibi rahatsızlıklar ortaya çıkmıştır (50).

2.1.6.2.2 İnfliksimab

İnfliksimab, TNF-α aktivitesini nötralize eden bir monoklonal antikordur (Şekil 2.2.b). İnsan IgG1 sabit bölgesine, bir fare antikorunun değişken bölgelerinin birleştirilmesiyle geliştirilmiştir. Romatoid artrit tedavisinde TNF-α blokeri olarak ilk kez infliksimab kullanılmıştır ve romatoid artrit patolojisinde TNF-α'nın önemini göstermiştir.



Şekil 2.2. Biyolojik Modifiye Edici Anti-Romatizmal İlaçların Moleküler Mekanizması. (a) TNF-α engelleyici, Etanersept, **(b)** TNF-α engelleyici, İnfliksimab, **(c)** TNF-α engelleyici, Adalimumab, **(d)** IL-1, bloke edici, Anakinra, insan IL-1 reseptör antagonistinin rekombinant formu (IL-1RA).
(16 No'lu kaynaktan alınmıştır).

Yaşam kalitesini artırması, eklem hasarlarını önlemesi ve kemik onarımını geliştirmesi İnfliksimab'ın başlıca faydalarıdır. Hem monoterapide, hem de MTX ile kombine kullanımına uygundur. Ne yazık ki, İnfliksimab ile tedavi edilen Romatoid Atrit' li hastalarda da, infüzyon reaksiyonları, lenfoma, tüberküloz ve kalp yetmezliği gibi Etanersept ile tedavi edilen hastalarda görülen rahatsızlıklar meydana gelmiştir (51).

2.1.6.2.3 Adalimumab

Adalimumab'ın moleküler mekanizması, İnfliksimab'ınkine benzerdir (Şekil 2.2.c). Adalimumab ile bloke olan TNF'lerin biyolojik yanıtları olarak IL-6 ve MMP düzeyleri düşük gözlenmiştir. Hem monoterapide hem de MTX ile kombine kullanılabilir. Adalimumab'ın en önemli etkisi DMARDs kullanılarak yapılan tedavilere etkin bir yanıt alınamayan hastalarda yapısal eklem hasarlarının ilerlemesini durdurmasıdır. Adalimumab'ın kullanımı ile ilgili riskler, Etanersept ve İnfliksimab'a benzer durumlar olarak, enfeksiyonlar, tüberküloz, oto-immün bozukluklar ve kalp yetmezliği olarak ifade edilebilir (52).

2.1.6.2.4. Anakinra

Anakinra, IL-1 ile antagonist çalışan IL-1RA rekombinantı ile biyolojik aktivitesini gösterir (Şekil 2.2.d). Romatoid artrit tedavisinde tek başına yeterlidir. Ayrıca Etanersept ve MTX veya diğer DMARDs ile kullanılabilir (53, 54, 55). Romatoid artritin oluşturduğu yapısal hasarın ilerlemesini durdurmakta faydalıdır. Enjeksiyon bölgesinde meydana gelen yan etki, bu ilaç için en önemli dezavantajdır. Ayrıca pnömoniler ve kütanoz enfeksiyonlar da görülmüştür (55).

2.1.7. Romatoid Artritin Prognozu

Romatoid artritin progresyonunda üç evre (Erken Hastalık, İlerleyici Hastalık ve Geç Hastalık) gözlenmektedir. **Erken Hastalık Evresi;** eklem erozyonu yoktur ve kemik, kıkırdak görülmez. Hastalığa bu evrede tanı konması prognoz açısından hastaya çok fayda sağlamaktadır. Bazı hastalarda bu evrede remisyon görülebilir. Bu evrede gözlenen kontrol edilemeyen inatçı poliartrit varlığı, yüksek RF, yüksek riskli HLA alellerinin varlığı ve eklem dışı bulguların varlığı prognozun kötü olacağını göstermektedir.

İlerleyici Hastalık Evresi; tedavi yapılmasına rağmen hastalık aktivitesi devam eder. İnatçı poliartrite ek olarak radyolojik yaygın eklem erozyonları görülür. **Geç Hastalık Evresi;** bazı komplikasyonların eşliğinde, kesin eklem hasarlarının oluştuğu evredir. Hastalık süresi uzundur. Hasarın oranı, aynı zamanda hasarın şiddetini de göstermektedir (56).

Romatoid artritin klinik seyri konusundaki veriler, hastalığın kronikliği, gösterdiği değişken seyir ve hafif şekillerinin tanısındaki zorluklar nedeni ile kısıtlıdır. Genellikle eklem tutulumunun % 90'a varan bir kısmı hastalığın yaklaşık olarak ilk bir yılı içinde gerçekleşir. Bu nedenle uzun yıllardır romatoid artrit hastası olan bireylerde, o ana kadar tutulum görülmeyen eklemlerde daha sonra hastalığın görülmeyeceği düşünülebilir. Remisyon, yaklaşık % 25 oranında kendiliğinden gerçekleşmektedir. Hasta remisyona girecekse bu hastalığın ilk yılında gerçekleşmektedir. Hastaların geri kalan büyük bir kısmında ilerleyici bir seyir tespit edilmektedir. Bu tip durumlarda hastalar tedavi altında olmalarına rağmen zaman zaman remisyon kısa sürmekte ve 10 yılı içinde hastaların yaklaşık % 50'si çalışamaz hale gelmektedir. Romatoid artrit hastalarında normalden yüksek görülen başlıca ölüm nedenleri infeksiyonlar, pulmoner ve renal hastalıklar, gastrointestinal kanamalar ve lenfoproliferatif hastalıklar sayılabilir (2).

2.2. ROMATOİD ARTRİT ve GENETİK

Birçok hastalık multifaktöriyeldir. Hem çevresel etkiler hem de genetik faktörler hastalığın klinik şiddetine katkıda bulunabilir. En az 10 farklı genetik bölgenin romatoid artrit üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Romatoid artrit ile ilişkili düşünülen bu genetik faktörler hastalığın klinik tablosundaki değişkenlikle ilişkili olabilir (57).

Romatoid artrit oluşumunda insan genomunda bulunan polimorfik genleri içeren MHC'de yer alan HLA-DR sistem genlerinin etkili olduğu bildirilmiştir. Romatoid artrit oluşumunda etkili olan genlerin başında HLA DR4 gelmektedir. Bu gen, romatoid faktörün pozitif olduğu hastalarda % 60-70 oranında gözlenirken pozitif olmayanlarda yaklaşık % 25 civarındadır. HLA bölgesinin romatoid artrit üzerindeki etkisinin tüm genetik faktörlerin % 30'unu teşkil ettiği tahmin edilmektedir (2, 16).

HLA bölgesi DRB molekülünün 67-74. amino asitleri arasında bulunur. Bu bölgenin romatoid artrite genetik yatkınlık yarattığı düşünülmektedir (2, 58). HLA–DR4'ün alt gruplarından HLA DRB1 0401, 0404, 0408 romatoid artritle ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu MHC genlerinin sadece hastalığın başlaması ile değil, seyri ve şiddeti ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir. Hastalık HLA DRB1 0401, 0404, 0408 alellerini taşımayanlarda daha hafif ve seronegatif gözlenmekteyken, DRB1 04 alelini homozigot olarak taşıyan bireylerde daha ağır bir hastalık tablosu oluştuğu bildirilmiştir (59). HLA DR2, DR3 ve DR7'nin alt gruplarının varlığında da hastalık riskinin az olduğu bildirilmiştir (60).

HLA kompleksi dışındaki bazı genler de romatoid artrite genetik yatkınlığa katkıda bulunmaktadır. TNF ve IL-1 gibi çeşitli sitokinlerin, Romatoid artritin patogenezinde oynadığı düşünülen kritik rol dikkate alındığında, bu sitokin üretimini düzenleyen polimorfizmlerin hastalığın doğal seyrini etkilediği düşünülebilir (61). Romatoid artrit ile ilgili genetik faktörlere ait polimorfizmlerin bır kısmı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

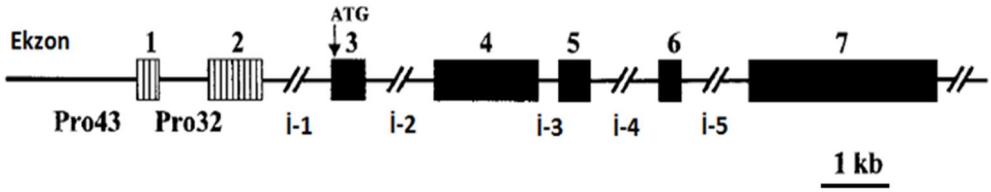
2.3. RFC1 GENİ VE YAPISI

RFC1 geni insan genomunda 21. Kromozom (Kromozom 21- NC_000021.9) üzerinde bulunur. İnsan indirgenmiş folat taşıyıcı 1 (RFC1) geni; ikisi alternatif kodlayıcı olmayan (ekzon 1 ve 2), 7 ekzon yapısından oluşmuş ve yaklaşık 29 kb uzunluğundadır. İnsan RFC1 geni iki tane promotor bölgesi içermektedir. Ekzon 3 içerisinde yer alan ATG kodonu translasyonel başlangıç kodonudur. Ayrıca RFC geni, 5 intron (I-1-2-3-4-5) bölgesi içermektedir (62). Şekil 2.3'de İnsan RFC1 geninin yapısı ve özellikleri bulunmaktadır.

Çözünen madde taşıyıcı ailesinden olan SLC19A1, aynı zamanda RFC1 olarak bilinir. Memeli hücrelerine folat bileşiklerinin ulaştırılması reseptör veya taşıyıcı aracılı mekanizmalarla meydana gelmektedir. İnsan RFC1 de hücrelerarası folat konsantrasyonunu korumakla görevlidir (14). RFC1, 5-metil-tetrahidrofolat yüksek kapasiteli, çift yönlü taşımacılığında ve aynı zamanda düşük bir kapasite ile de olsa, folik asit taşıyabilir aynı zamanda anti-folat madde olan MTX taşınmasını kolaylaştırır. MTX taşıyıcı aracılı mekanizma ile hücreye alınan bir anti-folattır. İnsan RFC1 MTX' in hücreye alınmasına aracılık eder (63).

Tablo 2.1. Romatoid artritle ilgili genetik faktörlere ait bazı polimorfizmler (16)

Gen Sembolü	Polimorfizm Pozisyonu	Aleller	Polimorfizmin Olası Etkileri	Kaynak
TNF α	1304	G A	RA duyarlılık	4
	489	G A	Daha şiddetli hastalık	64
	-238	G A	Daha şiddetli eklem erozyonları Az şiddetli eklem erozyonu	65
	-308	G A	TNFα a normal üretimi TNFα üretimi Up-regülasyonu	66, 67
	-857	C T	RA / Yüksek TNF α üretimine duyarlılık	68
	-863	C A	RA / Yüksek TNF α üretimine duyarlılık	69
	-1031	T C	RA / Yüksek TNF α üretimine duyarlılık	4, 70
TNFRSF1B	Kodon 196	T G	RA yatkınlık artışı Artan IL-6 üretimi	71
IL-1	IL-1α -889	C T	IL-1α değişmiş üretimi	72
	IL-1α 4845 (ekzon 5)	G T	IL-1α değişmiş üretimi / RA karşı artan hassasiyet	73, 74, 75
	IL-1β -511	C T	RA / IL-1 değişmiş üretimi	76
	IL-1β 3953 (ekzon 5)	C T	RA / IL-1 değişmiş üretimi / Şiddetli eklem yıkımı	73, 76, 77
	IL-1RA 2018 (exon2)	C T	Olası pro-inflamatuvar etki	78
IL-6	-174	G C	IL-6 üretimi azalır	79
	-622	G A	IL-6 üretimi azalır	8
IL-10	-1082	G A	IL-10 düşük ekpresyon seviyeleri kadınlarda RA ile ilişkili	80, 81
	-819	T C	IL-10 / Otoimmün belirtilerin düşük sentezleme seviyeleri	80, 82
	-592	A C	IL-10 / Otoimmün belirtilerin düşük sentezleme seviyeleri	80, 82
HLA	(HLA-DR)		RA şiddeti ve Duyarlılığında artış	58, 83



Şekil 2.3. İnsan RFC1 geninin yapısı. İnsan genomunda 21. Kromozom üzerinde bulunan RFC1 geni, 7 ekzon, 5 intron ve 2 promotor bölgesi içerir. Yaklaşık 29 kb uzunluktadır (62 No'lu kaynaktan uyarlanarak alınmıştır).

İnsan RFC1 genine ait polimorfizmlere bağlı olarak MTX'in hücresel düzeyinde değişiklik görülmüştür. İnsan RFC1 80GG polimorfizmi taşıyan bireylerin folat düzeyleri düşüktür. MTX ile tedavi edilen 80AA polimorfizmi taşıyan bireyler, MTX'e yüksek düzeyde cevap göstermiştir. Hastanın gen polimorfizmine bağlı olarak ilaç ve doz kişiye göre değişiklik gösterebilmektedir (15).

2.4. RFC1 ve ROMATOİD ARTRİT

RFC1, MTX'in hücre içine alınmasını kontrol eder (Şekil 2.1, sayfa 9). MTX ile tedavi edilen hastalarda ilaca karşı görülen bireysel farklılıklar, çalışmaları bu gende meydana gelen SNP'lere dikkat çekmiştir. RFC1 genine ait polimorfizmler Hayashi ve arkadaşları tarafından Japon romatoid artrit hastalarında incelenmiştir. İnsan kanından elde edilen genomik DNA'lara uygulanan PZR ve RFLP işlemlerinden sonra incelenen RFC1 geni polimorfizmleriyle hastaların tedaviye verdikleri yanıt karşılaştırılmıştır. Görülmüştür ki RFC1 genine ait G80A polimorfizmi olan (80AA) romatoid artrit hastaları MTX'e olumlu yanıt vermekte ve hastalık aktivitesi düşmektedir. Ancak RFC1 genine ait G80A polimorfizmi bulunmayan (80GG) romatoid artritli hastalarda MTX'e etkili bir yanıt alınamamış, MTX ile birlikte bDMARDs'a ihtiyaç duyulmuştur. Ayrıca 80AA allelinin bulunduğu hastalarda, 80GG'ye nazaran daha uzun süre remisyon gözlendiği bildirilmiştir (7, 10).

Her ne kadar sonuçlar her zaman uyumlu olmasa da romatoid artrit hastalarının tedavisinde RFC1 geninin etkin rol oynadığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu gene ait bahsi geçen G80A polimorfizminin varlığı/yokluğu hastalara verilen ilaç tedavilerinde yol gösterici olabilir. RFC1 G80A polimorfizmi olmayan romatoid artritli hastalarda başlangıç ilaç olarak MTX tek başına verilmeyebilir ve MTX + dMARDs kombin kullanımıyla hastalar, hastalık aktivitesi yükselmeden tedavi altına alınarak istenmeyen eklem ve kemik erozyonlarının önüne geçilebilir (7, 10, 84, 85).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Projede Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Romatoloji Polikliniği'ne gelmiş olan romatoid artritli hastalardan EDTA'lı tüplere alınarak elde edilen kan örnekleri kullanıldı. MTX kullanan grupta yalnızca MTX ile tedavi edilen 56 (7 Erkek, 49 Kadın) tane romatoid artrit hastası; MTX+bDMARDs kullanan grupta 47 (5 Erkek, 42 Kadın) tane romatoid artrit hastası olmak üzere Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Romatoloji Polikliniği'ne gelmiş olan toplam 103 romatoid artritli hastadan, Hasta Bilgilendirme Formu (Ek 2) okutularak/okunarak rızaları alındı ve yapacak olduğumuz projeye katılımları sağlandı. Ocak 2014 tarihinden Mart 2015 tarihine kadar toplam 103 hastadan kan alındı. Örneklere laboratuvarda DNA izolasyonu, PZR, RFLP yöntemleri uygulanarak örneklerin RFC1 G80A polimorfizmi için analizleri yapıldı.

3.2. GEREÇLER

Demirbaş Malzemeler

1. Mikropipet (Gilson)
2. Santrifüj (Hettich Mikro 220)
3. Vorteks Cihazı (Heidolph)
4. BioSpec Nano (Shimadzu)
5. Buzdolabı (+4 ve -80) (Simens ve BINDER)
6. Termal Cycler PCR Cihazı (SensoQuest)
7. Elektroforez Cihazı (Bio-Rad)

8. Elektroforez Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad Gel-Doc XR+)
9. Mikrodalga fırın (Siemens)
10. Etüv (Nüve)
11. Hassas Terazi (MRC)

Sarf Malzemeleri

1. 0.2 ml Tüp
2. 0.5 ml Tüp
3. 1.5 ml Tüp
4. Pipet Uçları (10 µl -100 µl -1000 µl)
5. Tüplük

Kullanılan Kimyasallar

1. DNA İzolasyon Kiti (Axygen)
2. Etidiyum bromür (Sigma)
3. DNA yükleme tamponu (Thermo)
4. Hha 1 Restriksiyon Enzimi (BioLabs)
5. 10 X Restriksiyon Buffer (BioLabs)
6. DNA Boyut Markırı (100 bç)(Biomatik)
7. % 70'lik Etil Alkol
8. Master Mix (OneTaq Hot Start 2 x MM w/Std Buffer) (BioLabs)
9. Forward primer (5'-AGTGTCACCTTCGTCCCCTC-3') (Alpha DNA)
10. Reverse primer (5'-CTCCCGCGTGAAGTTCTT-3') (Alpha DNA)
11. Tris-Borik asit-EDTA Tamponu (TBE) (1X) (Thermo)
12. Agaroz (Sigma)
13. Distile Su

3.3. MATERYAL VE METOD

3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu; AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit kandan DNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı (Axygen). Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Romatoloji Polikliniği'ne gelmiş olan romatoid artritli hastalardan EDTA'lı tüplere 3 ml kan alındı. Daha sonra

laboratuvarda 1.5 ml'lik Ependorf tüplere kan örneklerinden 200 µl koyularak DNA izolasyonuna başlandı. 200 µl kan üzerine 500 µl AP1 buffer eklenerek 10 saniye (sn) vorteks yapıldı. Daha sonra 100 µl AP2 buffer eklenerek 10 sn daha vorteks yapıldı ve 12000 g'de 10 dakika (dk) santrifüj edildi.
Santrifüj devam ederken 2 ml'lik Ependorf (toplama) tüplere kolon tüpü yerleştirildi. 10 dk'lık santrifüj sonundan elde edilen süpernatant kısım kolon tüplerine aktarılarak 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Kolon tüp yeni bir toplama tüpüne alınarak üzerine 700 µl W1A buffer eklenerek 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Kolon tüp tekrardan yeni bir toplama tüpüne alınarak üzerine 800 µl W2 buffer eklendi. 12000 g'de 1 dk santrifüj edilerek kolon tüp yeni toplama tüpüne alındı. Üzerine 500 µl W2 buffer eklenerek 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Son olarak kolon tüp yeni toplama tüpüne alındı. Kurutma amaçlı 12000 g 'de 1 dk santrifüj edildi.

Kurutma işleminden sonra kolon tüp 1.5 ml'lik yeni bir Ependorf tüpe alındı. Üzerine 100 µl TE buffer eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletildi. Sonra 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda hastaya ait DNA 100 µl TE buffer ile 1.5 ml'lik Ependorf tüp içerisine indirildi. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu NanoDrop cihazı (Shimadzu) kullanılarak ölçüldü ve kaydedildi.

Yukarıdaki işlemler 103 hastanın hepsi için ayrı ayrı uygulandı ve elde edilen DNA örnekleri, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yapılana kadar -80 ºC'de saklandı.

3.3.2. Genomik DNA'ların Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Genomik DNA'ların moleküler incelemelerde kullanılmadan önce varlık, miktar ve kalitesinin belirlenmesi için UV spektrofotometresinde ölçüm yapıldı. UV spektrofotometresinde ölçüm yapılırken DNA'daki heterosiklik halkalar 260 nm dalga boyunda en fazla ışın emdiğinden bu dalga boyunda ölçüm yapılarak genomik DNA'nın miktarı belirlendi. İzole edilen genomik DNA miktar tayininin ardından DNA'nın proteinlerden ne derece izole edildiğini belirlemek için de UV spektrofotometresi kullanıldı. DNA'nın kalitesinin tespiti için hem 280 hem 260 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı, A260/A280 absorbans değeri belirlendi. Protein kontaminasyonu düşük olan DNA'lar için bu değer 1.8-2.0 civarında olması gerekmektedir (86).

NanoDrop cihazı ile yapılan ölçümler sonrasında 200 µl kandan en az 11.10 ng/µl konsantrasyonla en çok 106.4 ng/µl konsantrasyonlu DNA elde edildi. Ortalama DNA

konsantrasyonumuz 40.60 ng/µl ± 19.14 ng/µl olarak hesaplandı. 200 µl kandan elde edilen toplam DNA miktarı en az 1110 ng, en çok 10640 ng olarak belirlendi. Ortalama DNA miktarımız 4060 ng olarak hesaplandı.

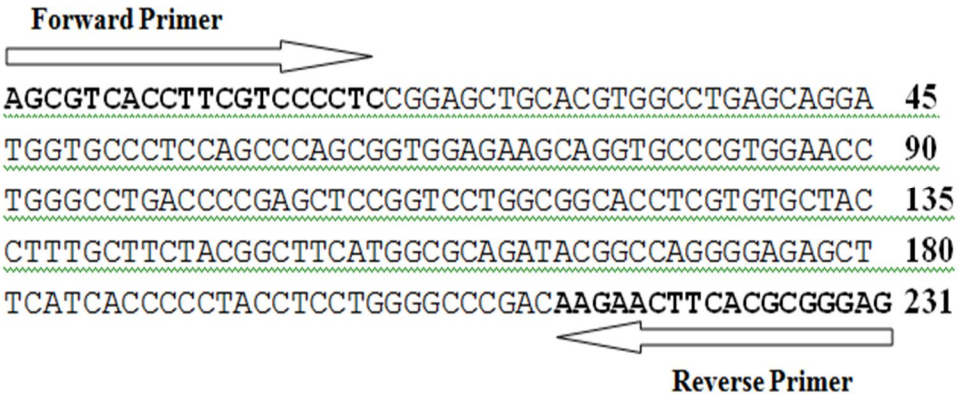
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR), moleküler biyolojide oldukça yaygın olarak kullanılan bir teknik olup basitçe *in vitro* ortamlarda nükleik asitlerin çoğaltılması olarak tanımlanabilir. PZR, reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısıyla birbirinden ayrılması (denatürasyon) daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (bağlanma); sonra zincirin uzamasını (polimerizasyon) (çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PZR siklusunu oluşturur. Her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (sırasıyla 90-94°C; 37°C - 65°C; 72°C).

Romatoid artrit hastalarının PZR işlemi için 103 hastaya ait -80 ºC'de sakladığımız DNA örnekleri kullanıldı. PZR işlemi için DNA üzerinde İnsan RFC1 geninin 230 baz çift (bç)'lik fragmentinin amplifiye edilmesi için özgül bir primer çifti seçildi (Şekil 3.1). Forward primer 5'-AGTGTCACCTTCGTCCCCTC-3' ve Reverse primer 3'-AAGAACTTCACGCGGGAG -5'(Dervieux ve ark (7)). Oligonükleotid primerler Alpha DNA tarafından sentez edildi.

MTX ve MTX + bDMARDs guruplarını oluşturan bireylerin 230 bç'lik insan RFC1 genine ait PZR karışımının içeriği ve uygulanacak olan PZR programı aşağıda belirtilmiştir.

	PZR Karışımı
Master Mix (OneTaq Hot Start 2 x MM w/Std Buffer)	12.5 µl
Forward Primer	2 µl
Reverse Primer	2 µl
Distile su (dH2O)	4.5 µl
DNA	4 µl
Toplam Hacim	**25 µl**



Şekil 3.1. İnsan RFC1 genine ait nükleotid dizilimi ve primerlerin bağlanma bölgeleri Primerler Derveux ve ark.'nın yapmış oldukları 7 No'lu kaynaktaki çalışmaya göre Alpha DNA tarafından sentez edilmiştir.

Yukarıda gösterilmiş olan PZR karışımı 103 bireyin her biri için 21 µl PCR karışımı hazırlandı ve bu karışımın üzerine her bireyin kendine ait genomik DNA'sından 4 µl alınarak 0.2 ml'lik tüplere koyuldu. Termal Cycler PCR (Roche) Cihazına yerleştirilen tüpler aşağıdaki PZR programına tabi tutuldu (7).

Predenaturasyon	**95°C**	**3 dk**	
Denaturasyon	**95°C**	**30 sn**	**35 Döngü**
Bağlanma	**60°C**	**30 sn**	
Uzama	**72 °C**	**30 sn**	
Final Uzama	**72 °C**	**10 dk**	

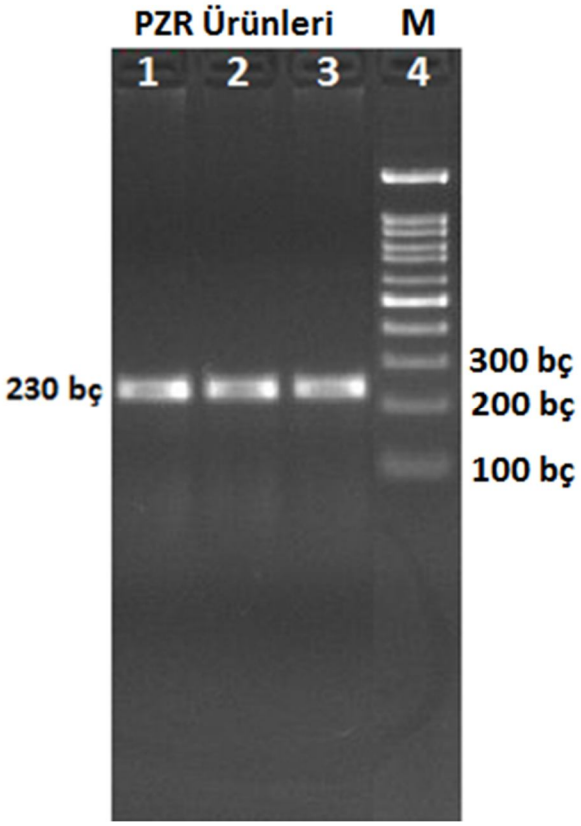
Uygulanan bu PZR programı sonucunda İnsan RFC1 genine ait 230 bç'lik DNA fragmenti her zaman aynı kalitede elde edilemedi. Bu nedenle deneme yanılma ile yeni bağlanma dereceleri denendi. Yapılan denemeler sonucunda aşağıdaki PZR programı ile İnsan RFC1 genine ait 230 bç'lik DNA fragmenti çoğaltıldı. Görüleceği gibi sadece 1°'lik değişiklikle bağlanma derecesi optimize edildi.

Predenaturasyon	**95°C**	**3 dk**	
Denaturasyon	**95°C**	**30 sn**	**35 Döngü**
Bağlanma	**61°C**	**30 sn**	
Uzama	**72 °C**	**30 sn**	
Final Uzama	**72 °C**	**10 dk**	

Oluşan PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde koşturularak analiz edildi. Böylece PZR işlemi ile istenilen bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığı kontrol edildi.

Jelin hazırlanması aşamasında 2 gr agaroz, 100 ml 1X TBE ve 4.5 µl etidiyum bromid (10 mg/ml) kullanıldı. Mikrodalga fırında kaynatılarak hazır hale getirilen jel, dondurulmak üzere tarakların takılı olduğu tepsiye döküldü. Jel donduktan sonra yükleme yapmak için içerisi 1XTBE ile doldululmuş elektroforez tankı içine alındı.

Bir kuyucuğa 2 µl 100 bç'lik DNA boyut markırı yüklendi. 5 µl PZR ürünü, 2 µl 6x DNA yükleme boyası ile karıştırılarak jel üzerindeki diğer kuyucuklara sırasıyla yüklendi. 70 volt (V)'ta 1 saat koşturulduktan sonra jel, elektroforez görüntüleme cihazına alındı. Görüntüleme sonucunda bölgenin çoğaltılıp, çoğaltılmadığı kontrol edildi ve restriksiyon aşamasına geçildi. Şekil 3.5'te üç farklı bireyin genomik DNA'larının PZR ile çoğaltılan 230 bç'lik RFC1 genine ait fragmentlerinin elektroforez jel görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 3.2. PZR sonrası jel görüntüsü; Genomik DNA kullanılarak yapılan PZR sonrası, 5 µl PZR ürünü % 2'lik agaroz jele yüklenerek 70 V'de 1 saat koşturuldu. **1-2-3.** Etidium bromid ile boyanan jelde farklı genomik DNA'lar kullanılarak çoğaltılan insan RFC 1 genine ait 230 bç'lik DNA fragmenti görüntüsü; **4.** 100 bç'lik DNA boyut markırı.

3.3.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) için PZR işlemi sonrası elde edilen 230 bç'lik RFC1 genine ait PCR ürünü *Hha* 1 (*Cfo* 1) (10 U /µl) restriksiyon endonükleaz ile restriksiyona tabi tutuldu (7, 10).

RFLP için PZR işlemi sonrası elde edilen 230 bç'lik insan RFC1 genine ait PZR ürününden 15 µl, *Hha 1* enziminden 0.5 µl, 10 X restriksiyon buffer'dan 2.5 µl alınarak reaksiyon karışımı yapıldı. Üzerine son hacmin 25 µl olması için 7 µl distile su (dH_2O) eklendi. Restriksiyon karışımı 37 ºC sıcaklığa sahip kuru etüvde 24 saat bekletildi. RFLP işlemi sonunda oluşan fragmentleri molekül büyüklüklerine göre ayırmak amacıyla % 4'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

Jelin hazırlanması aşamasında 2 gr agaroz, 50 ml 1X TBE ve 4.5 µl etidiyum bromid (10 mg/ml) kullanıldı. Mikrodalga fırında kaynatılarak hazır hale getirilen jel dondurulmak üzere tarakların takılı olduğu tepsiye döküldü. Jel donduktan sonra yükleme yapmak için 1 X TBE ile doldurulmuş elektroforez tankı içine alındı.

Bir kuyucuğa 2 µl 100 bç'lik DNA boyut markırı (Biomatik) yüklendi. 15 µl RFLP ürünü, 2 µl 6x DNA yükleme boyası ile karıştırılarak jel üzerindeki diğer kuyucuklara sırasıyla yüklendi. 50 V'de 3 saat koşturulduktan sonra jel, elektroforez görüntüleme cihazına alınarak RFLP sonucunda oluşan DNA fragmentlerinin ((**GG** için; 125 bç, 68 bç ve 37 bç). (**GA** için; 162 bç, 125 bç ve 68 bç). (**AA** için; 162 bç ve 68 bç)) analizleri yapıldı (Şekil 4.1, sayfa 29).

4. BULGULAR

4.1. MTX KULLANAN VE MTX + BDMARDS KULLANAN ÇALIŞMA GRUPLARININ GENEL ÖZELLİKLERİ VE İSTATİSTİK ANALİZLERİ

MTX kullanan grupta yalnızca MTX ile tedavi edilen 56 (7 Erkek, 49 Kadın) tane Romatoid Artrit hastası; MTX+bDMARDs kullanan grupta 47 (5 Erkek, 42 Kadın) tane Romatoid Artrit hastası olmak üzere Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Romatoloji Polikliniği'ne gelmiş olan toplam 103 romatoid artritli hastadan, Hasta Bilgilendirme Formu okutularak/okunarak rızaları alındı ve yapacak olduğumuz projeye katılımları sağlandı.

MTX ve MTX+bDAMARDs kullanan çalışma gruplarında bulunan romatoid artrit hastalarına ait tıbbi hasta özgeçmişleri ile ilgili veriler toplandı. Laboratuar aşamasında her iki grupta yer alan toplam 103 romatoid artrit hastasının her birinden 3 ml kan örneği alınarak Genomik DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Daha sonra İnsan RFC1 G80A polimorfizm analizi için, PZR ve RFLP yapıldı (Şekil 4.1). Elde edilen veriler, istatistik analizler ve bulgular sırasıyla aşağıda belirtildi.

4.1.1. MTX Kullanan Çalışma Grubu

Romatoid artrit tanısı almış ve MTX kullanan çalışma grubuna ait toplam 56 hastada görülen hastalık süresi ortalama 9.4 ± 7.2 yıl, cinsiyet dağılımı 7 erkek (% 12.5) ve 49 kadın (% 87.5) olarak gözlendi. MTX gurubunda bulunan 56 hastanın yaş ortalamaları 50.18 ± 12.17 olarak saptandı. MTX çalışma grubunda bulunan 56 Romatoid Artrit hastasının MTX'e karşı direnç göstermemiş olup bDMARDs kullanımına ihtiyaç duyulmadığı klinikten alınan bilgilerle doğrulandı. Hastaların % 39.3'ünde romatoid

artrite eşlik eden sistemik hastalıklar görülmüşken, % 60.7'sinde eşlik eden sistemik hastalığa rastlanmadı. MTX çalışma gurubunda bulunan 56 romatoid artrit hastasının genel özellikleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

4.1.2. MTX + bDMARDs KULLANAN ÇALIŞMA GRUBU

Romatoid artrit tanısı almış ve MTX + bDMARDs kullanan çalışma grubuna ait toplam 47 hastada görülen hastalık süresi ortalama 11. 24 ± 7. 5 yıl, cinsiyet dağılımı 5 erkek (% 10. 6) ve 42 kadın (% 89. 4) olarak gözlendi. MTX + bDMARDs gurubunda bulunan 47 hastanın yaş ortalamaları 50. 45 ± 10. 98 yıl olarak saptandı. MTX + bDMARDs gurubunda bulunan 47 romatoid artrit hastası MTX'e direnç göstermiş ve tedaviye olumlu yanıt alınamamıştır. Bu nedenle bu romatoid artrit hastalarına MTX ile birlikte kombine olarak bDMARDs (MTX + bDMARDs) verilmiştir. MTX + bDMARDs gurubunda bulunan 47 romatoid artrit hastasının genel özellikleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

4.2. RFC1 POLİMORFİZM BULGULARI

İnsan RFC1 G80A Polimorfizmi sonucu oluşan GG/GA/AA genotiplerini elde etmek için PZR ve RFLP yöntemleri kullanıldı. PZR sonrası elde edilen 230 bç'lik İnsan RFC1 genine ait DNA fragmentleri, RFLP yöntemiyle daha küçük DNA fragmentleri ((**GG** için; 125 bç, 68 bç ve 37 bç). (**GA** için; 162 bç, 125 bç ve 68 bç). (**AA** için; 162 bç ve 68 bç)) halinde analiz edildi. Şekil 4.1'de RFLP sonrası elde edilen DNA fragmentleri gösterilmektedir.

4.2.1. MTX Kullanan Çalışma Grubu

MTX kullanan çalışma grubunda bulunan romatoid artrit hastalarının İnsan RFC1 G80A polimorfizmi için 13 (% 23. 2) olgunun wild type (GG), 32 (% 57. 1) olgunun heterozigot (GA), 11 (% 19. 6) olgunun homozigot (AA) genotipine sahip oldukları saptandı. Polimorfizmlerin MTX kullanan çalışma grubu içerisinde genotiplere göre dağılımı Tablo 4.1'de**,** Polimorfizlerin MTX kullanan çalışma grubu değişkenlerine göre dağılımı ise Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

4.2.2. MTX + bDMARDs Kullanan Çalışma Grubu

MTX + bDMARDs kullanan çalışma grubunda bulunan romatoid artrit hastalarının insan RFC1 G80A polimorfizmi için 15 (% 31. 9) olgunun wild tip (GG), 18 (% 38. 3)

olgunun heterozigot (GA), 14 (% 29. 8) olgunun homozigot (AA) genotipine sahip oldukları saptandı. Polimorfizmlerin, MTX + bDMARDs kullanan çalışma grubu içerisinde genotiplere göre dağılımı Tablo 4.1'de**,** Polimorfizlerin, MTX + DMARDs kullanan çalışma grubu değişkenlerine göre dağılımı ise Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

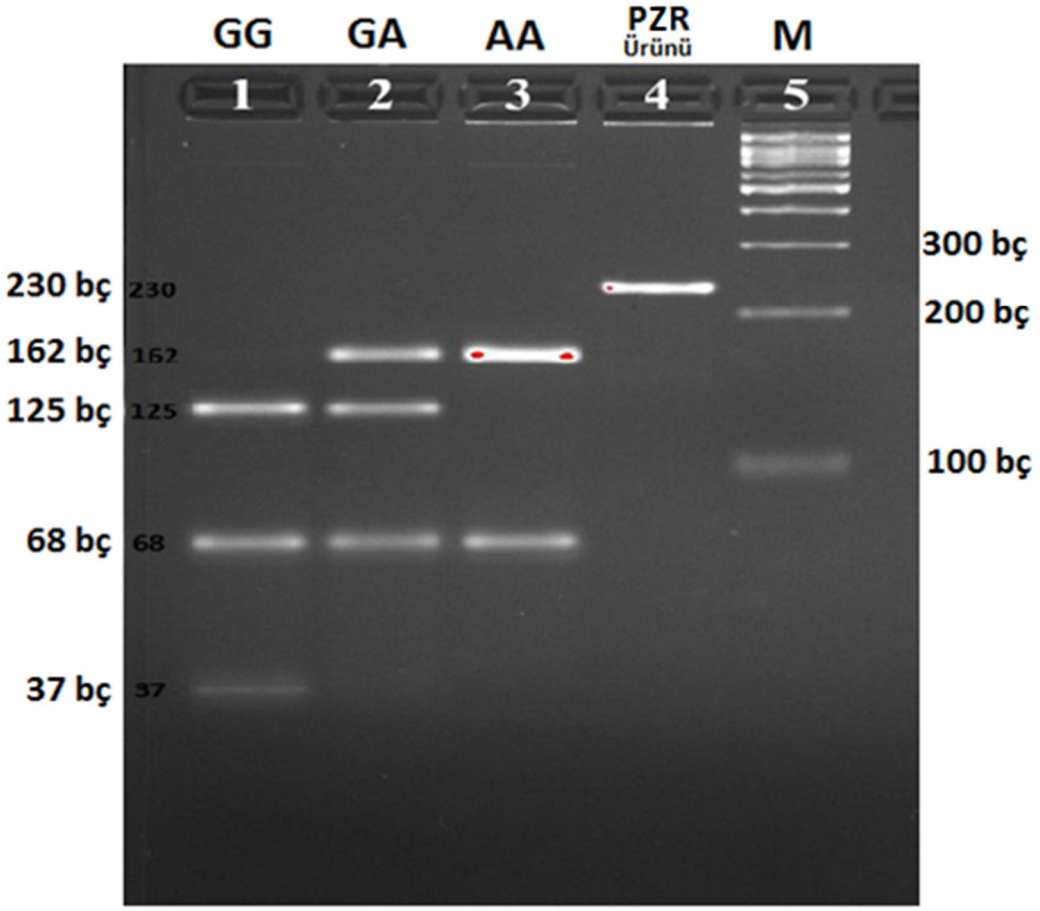
Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram ve q-q grafikleri ile ayrıca Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. MTX grupları arası karşılaştırmalar nicel değişkenler için bağımsız iki örneklem t testi ve Mann-Whitney U testleri ile nitel değişkenler için ki-kare analizleri ile değerlendirildi. G80A polimorfizm grupları arası karşılaştırmalar nicel değişkenler için tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testi ile nitel değişkenler için ki-kare analizleri ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalar LSD testi ile test edildi. Verilerin analizi R 3.2.1 (www.r-project.org) ve MVN (www.biosoft.hacettepe.edu.tr/MVN/) yazılımları ile değerlendirildi. $p<0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

4.3.1. MTX ve MTX + bDMARDs Grupları ile Değişkenlerin İstatistiksel Analizi

MTX ve MTX + bDMARDs kullanan çalışma grupları insan RFC1 G80A polimorfizmi, yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, tanı süresi, sigara ve alkol kullanımı, VAS ağrı skoru, Patient Global ve DR global ağrı şiddeti skorları, eşlik eden sistemik hastalık, yakın akrabada romatizmal hastalık ve hastalığın fonksiyonel evresi değişkenleri ile MTX ve MTX + bDMARDs Grupları istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Numerik ve kategorik karşılaştırmalar sonucunda elde edilen veriler kaydedildi. MTX ve MTX + bDMARDs Grupları ile değişkenlerin analizi sonucu elde edilen p değerleri; İnsan RFC1 G80A polimorfizmi (0. 160), yaş (0. 900), cinsiyet (1. 000), vücut kitle indeksi (0. 458), tanı süresi (0. 127), sigara ve alkol kullanımı (0. 418 ve 0. 456), VAS ağrı skoru (0. 107), Patient Global (0. 170) ve DR global (0. 327) ağrı şiddeti skorları, eşlik eden sistemik hastalık (0. 800), yakın akrabada romatizmal hastalık (0. 506) ve hastalığın fonsiyonel evresi (0. 170) olarak hesaplandı. Grupların değişkenlerle yapılan numerik ve kategorik karşılaştırmaları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. MTX ve MTX + bDMARDs guruplarının değişkenler açısından yapılan analizleri istatistiksel olarak anlamlı bulanamamıştır.

Tablo 4.1. MTX ve MTX + b DMARDs Grupları ile Değişkenlerin İstatistiksel Analizi (Gruplar arası karşılaştırmalar nicel değişkenler için tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testi ile nitel değişkenler için ki-kare analizleri ile değerlendirildi. p<0. 05 düzeyi anlamlı kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalar LSD testi ile test edildi)

Değişkenler	**MTX Grubu** (n = 56)	**MTX + bDMARDs Grubu** (n = 47)	***p* değeri**
İnsan RFC1 G80A Polimorfizmi			
GG Polimorfizmi	13 (% 23.2)	15 (% 31.9)	0.160
GA Polimorfizmi	32 (% 57.1)	18 (% 38.3)	
AA Polimorfizmi	11 (% 19.6)	14 (% 29.8)	
Yaş (Yıl)	50.18 (±12.17)	50.45 (± 10.98)	0.900
Cinsiyet			
Erkek	7 (% 12.5)	5 (% 10.6)	1.000
Kadın	49 (% 87.5)	42 (% 89.4)	
BMI (Vücut Kitle İndeksi)	29.28 (± 6.31)	28.44 (± 4.89)	0.458
Tanı Süresi (Yıl)	8 (5 - 10.75)	10 (6 - 15)	0.127
Sigara Kullanımı			
Hiç Kullanmamış	46 (% 82.1)	42 (% 89.4)	0.418
Uzun Süre Önce Bırakmış	4 (% 7.1)	1 (% 2.1)	
Nadiren / Günde 1'den az	1 (% 1.8)	2 (% 4.3)	
Günde 1 Adetten Fazla	5 (% 8.9)	2 (% 4.3)	
Alkol Kullanımı			
Hiç Kullanmamış	56 (% 100)	46 (% 97.9)	0.456
Uzun Süre Önce Bırakmış	0 (% 0)	1 (% 2.1)	
VAS Ağrı Skoru (Görsel Analog Skala)	3.5 (1 - 5.75)	2 (1 - 4)	0.107
Patient Global (Hasta ağrı şiddeti skoru)	3 (2 - 5)	2 (1 - 4)	0.170
Dr Global (Doktor ağrı şiddeti skoru)	2 (1 - 3)	2 (1 - 3)	0.327
Eşlik Eden Sistemik Hastalık			
DM (Diabetus Mellitus)	5 (% 8.9)	4 (% 8.5)	0.800
HT (Hipertansiyon)	12 (% 21.4)	9 (% 19.1)	
DM+HT	1 (% 1.8)	2 (% 4.3)	
Hipo/Hipertroidi	2 (% 3.6)	4 (% 8.5)	
Diğer	2 (% 3.6)	3 (% 6.4)	
Hastalık Yok	34 (% 60.7)	25 (% 53.2)	
Yakın Akrabada Romatizmal Hastalık			
Romazitmal Hast. Yok	52(% 92.9)	41 (% 87.2)	0.506
Romatoid Artrit	4 (% 7.1)	6 (% 12.8)	
Fonksiyonel Evre			
Evre 1	46 (% 82.1)	39 (% 83)	0.170
Evre 2	9 (% 16.1)	4 (% 8.5)	
Evre 3	1 (% 1.8)	4 (% 8.5)	



Şekil 4.1. İnsan RFC1 Geni İçin RFLP Analizi. Dört ayrı bireyden alınan genomik DNA ile PZR yapıldı. Her bireyin kendine ait PZR ürününden 15 µl alınarak *Hha* 1 enzimi ile kesildi. 15 µl RFLP ürünü, 2 µl 6x DNA yükleme boyası ile karıştırılarak % 4'lük jele yüklendi. **1.** GG; 125 125 bç, 68 bç ve 37 bç.; **2.** GA; 162 bç, 125 bç ve 68 bç.; **3.** AA; 162 bç ve 68 bç.; **4.** Kesilmemiş PZR Fragmenti (230 bç).; **5.** 100 bç'lik DNA boyut markırı (Biomatik).

Tablo 4.2. İnsan RFC1 G80A Polimorfizmi ile Değişkenlerin İstatistiksel Analizi (Gruplar arası karşılaştırmalar nicel değişkenler için tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testi ile nitel değişkenler için ki-kare analizleri ile değerlendirildi. p<0. 05 düzeyi anlamlı kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalar LSD testi ile test edildi)

Değişkenler	**GG**	**GA**	**AA**	***p* değeri**
Yaş (Yıl)	49 (± 10.4)	50.88 (± 12.3)	49.92 (± 11.7)	0.888
Cinsiyet				
Erkek	4 (% 14.3)	4 (% 8)	4 (% 16)	0.523
Kadın	24 (% 85.7)	46 (% 92)	21 (% 84)	
BMI (Vücut Kitle İndeksi)	30.4 (± 6.0)	28.3 (± 6.1)	28.3 (± 4.2)	0.263
Tanı Süresi (Yıl)	12.8 (± 6.4)	10.8 (± 8.2)	8.14 (± 6.0)	0.231
Sigara Kullanımı				
Hiç Kullanmamış	23 (% 82.1)	44 (% 88)	21 (% 84)	0.628
Uzun Süre Önce Bırakmış	2 (% 7.1)	2 (% 4)	1 (% 4)	
Nadiren / Günde 1'den az	2 (% 7.1)	0 (% 0)	1 (% 4)	
Günde 1 Adetten Fazla	1 (% 3.6)	4 (% 8)	2 (% 8)	
Alkol Kullanımı				
Hiç Kullanmamış	28 (% 100)	50 (% 100)	24 (% 100)	0.207
Uzun Süre Önce Bırakmış	0 (% 0)	0 (% 0)	1 (% 4)	
VAS Ağrı Skoru (Görsel Analog Skala)	3.1 (± 2.6)	3.5 (± 2.3)	2.6 (± 1.9)	0.283
Patient Global (Hasta ağrı şiddeti skoru)	3.25 (± 2.2)	3.6 (± 2.0)	2.4 (± 1.9)	0.054
Dr Global (Doktor ağrı şiddeti skoru)	2.3 (± 1.5)	2.54 (± 1.5)	1.7 (± 0.94)	0.073
Eşlik Eden Sistemik Hastalık				
DM	3 (% 10.7)	6 (% 12)	0 (% 0)	0.326
HT	3 (% 10.7)	14 (% 28)	4 (% 16)	
DM+HT	2 (% 7.1)	1 (% 2)	0 (% 0)	
Hipo/Hipertroidi	2 (% 7.1)	2 (% 4)	2 (% 8)	
Diğer	2 (% 7.1)	1 (% 2)	2 (% 8)	
Hastalık Yok	16 (% 57.1)	26 (% 52)	17 (% 68)	
Yakın Akrabada Romatizmal Hastalık				0.378
Romazitmal Hast. Yok	25 (% 89.3)	47 (% 94)	21 (% 84)	
Romatoid Artrit	3 (%)10.7	3 (% 6)	4 (% 16)	
Fonksiyonel Evre				
Evre 1	24 (% 85.7)	38 (% 76)	24 (% 85.7)	0.427
Evre 2	3 (% 10.7)	8 (% 16)	3 (% 10.7)	
Evre 3	1 (% 3.6)	4 (% 8)	1 (% 3.6)	

4.3.2. RFC1 G80A Polimorfizmi ile Değişkenlerin İstatistiksel Analizi

RFC1 G80A polimorfizmi sonucu oluşan GG/GA/AA genotipleri ile yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, tanı süresi, sigara ve alkol kullanımı, VAS ağrı skoru, Patient Global ve DR global ağrı şiddeti skorları, eşlik eden sistemik hastalık, yakın akrabada romatizmal hastalık ve hastalığın fonksiyonel evresi değişkenleri arasında yapılan numerik ve kategorik karşılaştırmalar sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.2'de gösterilmiştir. RFC1 G80A polimorfizmi ile değişkenlerin istatistiksel analizi sonucu elde edilen p değerleri; yaş (0. 888), cinsiyet (0. 523), vücut kitle indeksi (0. 263), tanı süresi (0. 231), sigara ve alkol kullanımı (0. 628 ve 0. 207), VAS ağrı skoru (0. 283), Patient Global(0. 054) ve DR global (0. 073) ağrı şiddeti skorları, eşlik eden sistemik hastalık (0. 326), yakın akrabada romatizmal hastalık (0. 378) ve hastalığın fonksiyonel evresi (0. 427) olarak hesaplandı. RFC1 G80A polimorfizminin değişkenler açısından yapılan analizleri istatistiksel olarak anlamlı bulanamamıştır.

4.3.3. MTX Grubu ve Polimorfizmler İle Değişkenlerin İstatistiksel Analizi

MTX Grubu ve RFC1 G80A polimorfizmi sonu elde edilen GG/GA/AA genotipleri ile yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, tanı süresi, sigara ve alkol kullanımı, VAS ağrı skoru, Patient Global ve DR global ağrı şiddeti skorları, eşlik eden sistemik hastalık, yakın akrabada romatizmal hastalık ve hastalığın fonksiyonel evresi değişkenleri arasında yapılan numerik ve kategorik karşılaştırmalar sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.3'te gösterilmiştir. MTX Grubu ve RFC1 G80A polimorfizmi ile değişkenlerin istatistiksel analizi sonucu elde edilen p değerleri; yaş (0. 720), cinsiyet (0. 252), vücut kitle indeksi (0. 116), tanı süresi (0. 908), sigara (0. 449) ve alkol kullanımı (--),VAS ağrı skoru (0. 186), Patient Global (0. 156) ve DR global (0. 135) ağrı şiddeti skorları, eşlik eden sistemik hastalık (0. 059), yakın akrabada romatizmal hastalık (0. 217) ve hastalığın fonksiyonel evresi (0. 374) olarak hesaplandı. MTX Grubu ve RFC1 G80A polimorfizminin değişkenler açısından yapılan analizleri istatistiksel olarak anlamlı bulanamamıştır.

4.3.4. MTX + bDAMARDs Grubu ve Polimorfizmler İle Değişkenlerin İstatistiksel Analizi

MTX + bDAMARDs Grubu ve RFC1 G80A polimorfizmi sonucu elde edilen GG/GA/AA genotipleri ile yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, tanı süresi, sigara ve alkol

kullanımı, VAS ağrı skoru, Patient Global ve DR global ağrı şiddeti skorları, eşlik eden sistemik hastalık, yakın akrabada romatizmal hastalık ve hastalığın fonksiyonel evresi değişkenleri arasında yapılan numerik ve kategorik karşılaştırmalar yapıldı.

MTX + bDAMARDs Grubu ve RFC1 G80A polimorfizmi ile değişkenler arasında yapılan istatistiksel analiz sonucu elde edilen p değerleri; yaş (0. 750), cinsiyet (0. 358), vücut kitle indeksi (0. 947), tanı süresi (0. 077), sigara (0. 613) ve alkol kullanımı (0. 300),VAS ağrı skoru (0. 994), Patient Global (0. 451) ve DR global (0. 499) ağrı şiddeti skorları, eşlik eden sistemik hastalık (0. 432), yakın akrabada romatizmal hastalık (0. 455) ve hastalığın fonksiyonel evresi (0. 132) olarak hesaplandı. MTX + bDAMARDs Grubu ve RFC1 G80A polimorfizmi ile değişkenler arasında yapılan numerik ve kategorik karşılaştırmalar Tablo 4.4'te gösterilmiştir. MTX + bDAMARDs Grubu ve RFC1 G80A polimorfizminin değişkenler açısından yapılan analizleri istatistiksel olarak anlamlı bulanamamıştır.

Tablo 4.3. MTX grubu ve İnsan RFC1 G80A Polimorfizmi ile Değişkenlerin İstatistiksel Analizi (Gruplar arası karşılaştırmalar nicel değişkenler için tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testi ile nitel değişkenler için ki-kare analizleri ile değerlendirildi. p<0. 05 düzeyi anlamlı kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalar LSD testi ile test edildi)

Değişkenler	**MTX Grubu** n = 56			***p* değeri**
	GG	**GA**	**AA**	
Yaş (Yıl)	47.8 (± 11.0)	50.62 (± 13.4)	51.6 (± 10.0)	0.720
Cinsiyet				
Erkek	1 (% 7.7)	3 (% 9.4)	3 (% 27.3)	0.252
Kadın	12 (% 92.3)	29 (% 90.6)	8 (% 72.7)	
BMI (Vücut Kitle İndeksi)	32.43 (± 6.98)	28.45 (± 6.25)	27.97 (± 4.71)	0.116
Tanı Süresi (Yıl)	9.08 (± 5.32)	9.6 (± 7.78)	9.15 (± 7.93)	0.908
Sigara Kullanımı				
Hiç Kullanmamış	11 (% 84.6)	27 (% 84.4)	8 (% 72.7)	0.449
Uzun Süre Önce Bırakmış	1 (% 7.7)	2 (% 6.3)	1 (% 9.1)	
Nadiren / Günde 1'den az	1 (% 7.7)	0 (% 0)	0 (% 0)	
Günde 1 Adetten Fazla	0 (% 0)	3 (% 9.4)	2 (% 18.2)	
Alkol Kullanımı				
Hiç Kullanmamış	13 (% 100)	32 (% 100)	11 (% 100)	-
Uzun Süre Önce Bırakmış	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	
VAS Ağrı Skoru (Görsel Analog Skala)	3.62 (± 3.20)	4.04 (± 2.47)	2.37 (± 1.57)	0.186
Patient Global (Hasta ağrı şiddeti skoru)	3.54 (± 2.60)	3.81 (± 2.01)	2.45 (± 1.92)	0.156
Dr Global (Doktor ağrı şiddeti skoru)	2.38 (± 1.90)	2.75 (± 1.61)	1.64 (± 0.93)	0.135
Eşlik Eden Sistemik Hastalık				
DM	1 (% 7.7)	4 (% 12.5)	0 (% 0)	0.059
HT	3 (% 23.1)	9 (% 28.1)	0 (% 0)	
DM+HT	1 (% 7.7)	0 (% 0)	0 (% 0)	
Hipo/Hipertroidi	0 (% 0)	1 (% 3.1)	1 (% 9.1)	
Diğer	0 (% 0)	0 (% 0)	2 (% 18.2)	
Hastalık Yok	8 (% 61.5)	18 (% 56.3)	8 (% 72.7)	
Yakın Akrabada Romatizmal Hastalık				0.217
Romazitmal Hast. Yok	13 (% 100)	30 (% 93.8)	9 (% 81.8)	
Romatoid Artrit	0 (% 0)	2 (% 6.3)	2 (% 18.2)	
Fonksiyonel Evre				
Evre 1	13 (% 100)	24 (% 75)	9 (% 81.8)	0.374
Evre 2	0 (% 0)	7 (% 21.9)	2 (% 18.2)	
Evre 3	0 (% 0)	1 (% 3.1)	0 (% 0)	

Tablo 4.4. MTX + bDAMARDs Grubu ve İnsan RFC1 G80A Polimorfizmi ile Değişkenlerin İstatistiksel Analizi (Gruplar arası karşılaştırmalar nicel değişkenler için tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testi ile nitel değişkenler için ki-kare analizleri ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalar LSD testi ile test edildi. $p<0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi)

Değişkenler	**MTX + bDAMARDs Grubu** n = 47			***p* değeri**
	GG	**GA**	**AA**	
Yaş (Yıl)	51.20 (± 9.98)	51.33 (± 10.4)	48.6 (± 13.14)	0.750
Cinsiyet				
Erkek	3 (% 20)	1 (% 5.6)	1 (% 7.1)	0.358
Kadın	12 (% 80)	17 (% 94.4)	13 (% 92.9)	
BMI (Vücut Kitle İndeksi)	28.64 (± 4.45)	28.13 (± 6.03)	28.62 (± 3.93)	0.947
Tanı Süresi (Yıl)	9.08 (± 5.32)	12.98 (± 8.74)	7.36 (± 4.02)	0.077
Sigara Kullanımı				
Hiç Kullanmamış	12 (% 80)	17 (% 94.4)	13 (% 92.9)	0.613
Uzun Süre Önce Bırakmış	1 (% 6.7)	0 (% 0)	0 (% 0)	
Nadiren / Günde 1'den az	1 (% 6.7)	0 (% 0)	1 (% 7.1)	
Günde 1 Adetten Fazla	1 (% 6.7)	1 (% 5.6)	0 (% 0)	
Alkol Kullanımı				
Hiç Kullanmamış	15 (% 100)	18 (% 100)	13 (% 92.9)	0.300
Uzun Süre Önce Bırakmış	0 (% 0)	0 (% 0)	1 (% 7.1)	
VAS Ağrı Skoru (Görsel Analog Skala)	2.67 (± 1.92)	2.56 (± 1.46)	2.79 (± 2.12)	0.994
Patient Global (Hasta ağrı şiddeti skoru)	3.0 (± 1.74)	3.11 (± 2.03)	2.43 (± 1.95)	0.451
Dr Global (Doktor ağrı şiddeti skoru)	2.20 (± 1.15)	2.17 (± 1.20)	1.72 (± 0.93)	0.499
Eşlik Eden Sistemik Hastalık				
DM	2 (% 13.3)	2 (% 11.1)	0 (% 0)	0.432
HT	0 (% 0)	5 (% 27.8)	4 (% 28.6)	
DM+HT	1 (% 6.7)	1 (% 5.6)	0 (% 0)	
Hipo/Hipertroidi	2 (% 13.3)	1 (% 5.6)	1 (% 7.1)	
Diğer	2 (% 13.3)	1 (% 5.6)	0 (% 0)	
Hastalık Yok	8 (% 53.3)	8 (% 44.4)	9 (% 64.3)	
Yakın Akrabada Romatizmal Hastalık				0.455
Romazitmal Hast. Yok	12 (% 80)	17 (% 94.4)	12 (% 85.7)	
Romatoid Artrit	3 (% 20)	1 (% 5.6)	2 (% 14.3)	
Fonksiyonel Evre				
Evre 1	11 (% 73.3)	14 (% 77.8)	14 (% 100)	0.132
Evre 2	3 (% 20)	1 (% 5.6)	0 (% 0)	
Evre 3	1 (% 6.7)	3 (% 16.7)	0 (% 0)	

5. TARTIŞMA

Romatoid artrit tedavisinde amaç fonksiyon kaybını önlemek, eklem hasarını kontrol etmek ve ağrıyı azaltmaktır. Romatoid artritte en sık kullanılan ilaç MTX'tir ve bDMARDs kullanımı için dayanak noktası olmuştur. MTX'in anti-enflamatuvar etkisi için gerekli doz bireyler arasında farklılıklar göstemektedir. Düşük hastalık aktivitesini korumak için artan dozlarda MTX kullanmak veya MTX ile bDMARDs'ın birlikte verilmesi gerekebilir. Eğer MTX etkinliği tahmin edilebilirse bDMARDs kullanımını erken aşamada mümkün olabilecektir (10).

Farmakogenetik; İlaç kinetiğinin ve kişinin ilaçlara karşı verdiği cevabın genetik yapıya göre bireyler ve etnik gruplar arasında (inter-etnik) değişmesi ile uğraşan farmakolojinin bir dalıdır. Farmakogenetik araştırmalarla ilk olarak hastalıklarla ilişkilendirilen özgül gen ve gen ürünlerinin tanımlanması ikinci olarak ilaca verilen yanıtı etkileyen genlerin tanımlanması ve son olarak bu tanımlamalardan elde edilen bilgilerle en uygun ilaç ve doz seçiminin yapılması ve bireye özgü tedavilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir (87, 88).

Eklem tutulmalarıyla başlayan, uzun süren ve tedavisine erken başlanılması gereken bir immün hastalık olan romatoid artrit, son yıllarda yaygın olarak hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan biri olan MTX ile tedavi edilmeye başlanmıştır (33, 89). Hastalık süresi, haftalık ilaç dozu, cinsiyet, yaş ve vücut kitle indeksi dahil olmak üzere son yıllarda yapılan farmakogenetik çalışmalarda MTX'in hücreye alınımına aracılık eden mekanizmalar ve enzimlerde meydana gelebilecek genetik farklılıkların da MTX hücresel metabolizmasını etkilediği bildirilmiştir (7, 10, 84, 85, 90, 91, 92, 93, 94).

MTX'in hücre içine alınmasına aracılık eden mekanizmalar üzerinde yapılan çalışmalarda SNP'lerin MTX'in alınımında farklılıklar oluşturduğunu göstermiştir. Romatoid artritli hastaların insan RFC1 geni üzerinde yapılmış olan polimorfizm çalışmalarında MTX'in hücre içine alınımı ve metabolizasyonunda insan RFC1 genine ait G80A polimorfizminin etkili olduğu gösterilmiştir (7, 10). Ancak mevcut literatür bilgilerine göre Türk romatoid artrit hastalarında bu konuda yapılmış herhangi bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada, Türk romatoid artritli hastalarda MTX etkinliğini tahmin edici bir belirteç olarak insan RFC1 gen polimorfizmlerinin araştırılması ile özellikle bDMARDs kullanımındaki bireysel farklanmaların gösterilmesi ve gereksiz ilaç kullanımını önleyerek gerek romatoid artrit hastalarının tedavi kalitesinin artırılması gerekse de ülke ekonomisine katkı sağlanması amacıyla insan RFC1 geninde meydana gelebilecek G80A polimorfizm analizlerini gerçekleştirildi.

Hayashi ve arkadaşlarının (10) Japon romatoid artritli hastalarda insan RFC1 genine ait G80A polimorfizminin MTX etkinliği üzerindeki etkisini araştırmak ve erken evrede bDMARDS kullanımını mümkün kılmak amacıyla yaptıkları çalışmada, MTX ve MTX+bDMARDs kullanan hasta gruplarının yaş ve insan RFC1 geni G80A SNP' lerinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (10).

Değişmiş MTX plazma seviyelerinin İnsan RFC1 G80A polimorfizmi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (95). Morin ve arkadaşları (96) İnsan RFC1 80 AA genotipi taşıyan hastalarda folat poliglutamat düzeylerinin yüksek olduğunu belirtmiştir (96). Yapılan bu çalışmalar insan RFC1 80 AA genotipini taşıyan romatoid artritli hastaların GA ve GG genotipini taşıyan romatoid artrit hastalarına göre MTX tedavisine daha iyi yanıt verdiğini göstermektedir (10). İnsan RFC1 G80A SNP neden olduğu amino asit değişimi (Arg > His) İnsan RFC1 transfer mekanizmasını değiştireceği tahmin edilmektedir (97). Bir başka çalışmada Tazoe ve arkadaşları (98), RFC1 mRNA ekspresyon düzeylerinin MTX etkinliği ile ilişkili olabileceğini öne sürmüştür (98).

Bizde bu çalışmamızda MTX tedavisi gören Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Romatoloji Polikliniği'ne gelmiş olan Türk romatoid artrit hastalarında MTX etkinliğini tahmin edebilmek ve gerekli olduğu

takdirde bDAMRDs kullanımının erken evrede sağlanabilmesi amacıyla İnsan RFC1 G80A polimorfizminin analizini gerçekleştirdik.

Hayashi ve arkadaşlarının (10) yapmış olduğu çalışmada Japon romatoid artrit hastalarının MTX kullanımı ve MTX + bDAMARDs kullanımına göre çeşitli değişkenler ile karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu değişkenler; yaş, cinsiyet, kilo, hastalık süresi, kreatinin klirensi, MTX dozu ve RFC1 G80A polimorfizmidir. İstatistik analizleri sonucunda yaş ve RFC1 G80A polimorfizminin Japon romatoid artritli hastalarda MTX ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (10). Biz de çalışmamızda Türk romatoid artritli hastalarda, insan RFC1 G80A polimorfizmi, yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, tanı süresi, sigara ve alkol kullanımı, VAS ağrı skoru, Patient Global ve DR global ağrı şiddeti skorları, eşlik eden sistemik hastalık, yakın akrabada romatizmal hastalık ve hastalığın fonksiyonel evresi değişkenlerini kullandık. Değişkenler ile MTX ve MTX + bDMARDs guruplarımız karşılaştırıldı. Yaptığımız istatistiksel analizler sonucunda değişkenlerimiz ile MTX etkinliği arasında $p<0.05$ düzeyine göre anlamlı bir ilişki bulunamadı (*p* değerleri; RFC1 G80A Polimorfizmi (0.160), Yaş (0.900), Cinsiyet (1.000), Vücut Kitle İndeksi (0.458), Tanı Süresi (0.127), Sigara Ve Alkol Kullanımı (0.418 ve 0.456), VAS Ağrı Skoru (0.107), Patient Global (0.170) ve DR Global (0.327), Eşlik Eden Sistemik Hastalık (0.800), Yakın Akrabada Romatizmal Hastalık (0.506) ve Fonksiyonel Evre (0.170)).

Türk romatoid artritli hastaların RFC1 G80A polimorfizmi sonucu ortaya çıkan GG/GA/AA genotipleri ile değişkenlerimiz arasında çoklu istatistik karşılaştırmalar yapıldı. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda RFC1 G80A polimorfizmi ve değişkenlerimiz arasında $p<0.05$ düzeyine göre anlamlı bir ilişki bulunamadı (*p* değerleri; Yaş (0.888), Cinsiyet (0.523), Vücut Kitle İndeksi (0.263), Tanı Süresi (0.231), Sigara ve Alkol Kullanımı (0.628 ve 0.207), VAS Ağrı Skoru (0.283), Patient Global(0.054), DR Global (0.073), Eşlik Eden Sistemik Hastalık (0.326), Yakın Akrabada Romatizmal Hastalık (0.378) ve Fonksiyonel Evre (0.427)).

Yine çalışmamızda, MTX gurubu ve RFC1 G80A polimorfizmi sonucu oluşan genotipler (GG/GA/AA) ile değişkenlerimiz arasında çoklu istatistik analizler yapıldı. İstatistiksel analizler sonucunda $p<0.05$ düzeyine göre anlamlı bir ilişki bulunamadı (*p* değerleri; Yaş (0.720), Cinsiyet (0.252), Vücut Kitle İndeksi (0.116), Tanı Süresi (0.908), Sigara (0.449) Ve Alkol Kullanımı (--),VAS Ağrı Skoru (0.186), Patient Global

(0.156), DR Global (0.135), Eşlik Eden Sistemik Hastalık (0.059), Yakın Akrabada Romatizmal Hastalık (0.217) ve Fonksiyonel Evre (0.374)). Aynı şekilde MTX + bDMARDs gurubu ve RFC1 G80A polimorfizmi sonucu oluşan genotipler (GG/GA/AA) ile değişkenlerimiz arasında çoklu istatistik analizler yapıldı. $p<0.05$ düzeyine göre anlamlı bir ilişki bulunamadı (*p* değerleri; Yaş (0.750), Cinsiyet (0.358), Vücut Kitle İndeksi (0.947), Tanı Süresi (0.077), Sigara (0.613) ve Alkol Kullanımı (0.300), VAS Ağrı Skoru (0.994), Patient Global (0.451) ve DR Global (0.499), Eşlik Eden Sistemik Hastalık (0.432), Yakın Akrabada Romatizmal Hastalık (0.455) ve Fonksiyonel Evre (0.132)).

Yaptığımız çalışmada elde edilen verilerin özellikle Hayashi ve arkadaşlarının (10) verileriyle uyumlu olmamasının en büyük etkenlerinden biri olarak çalışma kapsamına aldığımız hasta sayısının düşük olması gösterilebilir. Çalışma başlangıcında her grupta en az 100'er hasta alınması hedeflenmişti. Ancak sürenin uzatılmasına rağmen çalışma kapsamında sadece 103 hasta toplanabildi. Diğer taraftan Plaza-plaza ve arkadaşlarının (85) MTX toksisitesi ve RFC1 G80A polimorfizmi arasında herhangi bir ilişki bulamazken, MTHFR C677T ve ABCB1 C343T SNP'lerinin romatoid artrit hastalarında MTX toksisitesini etkilediklerini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, yaptığımız çalışmamızda Türk romatoid artrit hastalarında RFC1 G80A polimorfizmi ile MTX etkinliği arasında literatürü destekleyen anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda da belirttiğimiz RFC1 G80A polimorfizmi ile MTX etkinliği arasındaki ilişkinin Türk romatoid artritli hastalarda güvenli sonuç verebilmesi için daha yüksek sayıda romatoid artrit hastasının projeye katılımının sağlanması gerektiği kanaati hâsıl olmuştur. Araştırmanın devam ettirilmesi ve hasta gruplarının genişletilmesine karar verilmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. http://www.medscape.com/rheumatology (24 Aralık 2012).
2. Hamuryudan V, İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Romatolojik Hastalıklar Sempozyum Dizisi. 2007;34:69-86.
3. Yıldırım R, Yazıcı Y. Early treatment in rheumatoid arthritis. Raed Journal 2012;4:59-67.
4. Newton J, Brown MA, Milicic A, et al. The effect of HLA-DR on susceptibility to rheumatoid arthritis is influenced by the associated lymphotoxin alpha-tumor necrosis factor haplotype. Arthritis Rheum. 2003;48:90–96.
5. Wessels J. A. M, Vries-Bouwstra J. K, Heijmans B. T. et al. Efficacy 92 and Toxicity of Methotrexate in Early Rheumatoid Arthritis Are Associated With Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Coding for Folate Pathway Enzymes. Arthritis & Rheumatism 2006;54;4,1087-1095.
6. Daar A. S. and Singer P. A. Pharmacogenetics and geographical ancestry: implications for drug development and global health. Nature Rewiews Genetics 2005;6:241-246.
7. Dervieux T, Furst D, Lein DO. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 2004;50: 2766–2774.
8. Pascual M, Nieto A, Mataran L, et al. IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. Genes Immun. 2000;1:338–340.

9. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. Pharmacogenetics 2002; 12:183-190.

10. Hayashi H, Tazoe Y, Tsuboi S, et al. A single nucleotide polymorphism of reduced folate carrier 1 predicts methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Drug Metab Pharmacokinet 2013;28;2:164-168.

11. Laverdiere, C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 100: 3832-3834.

12. Ünal İnce E, Ertem M. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, Akut Lenfoblastik Löseminin Farmakogenetiği. 2008;2: 6-16.

13. Lapenta V, Sossi V, Gosset P, et al. "Construction of a 2.5-Mb integrated physical and gene map of distal 21q22.3". Genomics 1998;49: 1–13.

14. "Entrez Gene: SLC19A1 solute carrier family 19 (folate transporter), member 1"(26 Aralık 2012).

15. Stanisławska-Sachadyn A, Mitchell LE, Woodside JV, et al. "The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women". Ann. Hum. Genet. 2009;73; 484–491.

16. Ignacio R, Fernández-Moreno M, Carreira-García V, Blanco F.J. Gene polymorphisms and pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. Curr Genomics. 2009;6:268–279.

17. Buch M, Emery P. The etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. Hospital Pharmacist 2002;9:5–10.

18. Mukundan G. A., Mandar N. D. and Ashok R. A. Functional Genomics Approaches in Arthritis. Am J Pharmacogenomics 2004;4: 29-43.

19. Ataman Ş, Ergin S. Romatoid artrit etyopatogenezi. Romatizma 1996;11:191-200.

20. O'dell JR. Rheumatoid Arthritis: the clinical picture. Arthritis and allied conditions. Koopman W J. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 2001;1(58): 1153-1186.

21. Kamusi T,Munro T, Harth M .: “The rheumatoid servical spine”, Semin Arthritis Rheum. 1985;14:187-95.

22. Akıncı A. "Aktivite ve Fonksiyonel Değerlendirme" Romatoid Artrit, MD Yayıncılık, ss: 65-71, Ankara 2002.

23. Gümüşdiş G., Doğanavşargil E. Klinik Romatoloji. ISBN:975-483-397-400. 1999;269-278.

24. Şafak A. Romatoid artritte görüntüleme yöntemleri. Romatoid Artrit Tanı ve Tedavisinde Son Gelişmeler Sempozyumu. 2002;39-44.

25. Rindfleisch JA, Muller D. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis Am Fam Physician. 2005;72:1037-1047.

26. Bridges SL. Rheumatoid factor. Arthiritisand allied conditions. Koopman W. J. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 2014;1: 1223-1244.

27. Özgöçmen S. Romatolojide Sınıflama Kriterleri ve Kısa Kllinik Metroloji. Veri Medikal Yayıncılık. 2008 s:16.

28. Jansen LM,van Schaardenburg D, van der Horst –Bruinsma I, et al. The predictive value of anti –cycliccitrulinated peptid antibodies in early arthritis. J Rheumatol 2003;30:1691-1695.

29. Van Gaalen FA,Linn-Rasker SP,van Venrooji WJ, et al. Autoantibodies to cyclic citrulinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. Arthritis Rheum 2004:50:709-715.

30. Levent Ö, Ataman Ş. Romatoid Artrit Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. T Klin Ftr 2:124-142.

31. Chan ESL, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. Arthritis Research. 2002;4: 266-273.

32. Fresko I. Romatizmal Hastalıklarda Tedavi İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Romatizmal Hastalıklar Sempozyumu 25, İstanbul 1999;45-54.

33. Yazıcı Y, Soka T, Kautiainen H, Swearingen C, Kumlan I, Pincus T. Long term safety of methotrexate in routine clinical care: discontinuation is unusual and rarely the result of laboratory abnormalities. Ann Rheum Dis. 2005;64; 207-211.

34. Lynden J R, Leslie G C, Ranjeny T, Ssanna M P. Early combination disease modifiying antirheumatic drug treatment for rheumatoid arthritis. MJA 2006;184: 122- 125.

35. Van Ede A E, Laan R F J M, Blom H J, et al. Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology 2002;41: 658-665.

36. Ranganathan P, McLeod H L. Methotrexate Pharmacogenetics The First Step Toward Individualized Therapy in Rheumatoid Arthritis. Arthritis & Rheumatism 2006;54: 1366-1377.

37. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Seriolo B, Straub RH. Antiinflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2001;60: 729-735.

38. Norris MD, De GD, Haber M, et al. Involvement ofMDR1 P-glycoprotein in multifactorial resistance to methotrexate. Int J Cancer 1996;65:613-619.

39. Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, et al. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. Cancer Res.1999;59: 2532-2535.

40. Chatzikyriakidou A, Georgiou I, Voulgari PV, et al. Transcription regulatory polymorphism -43T>C in the 5'-flanking region of SLC19A1 gene could affect rheumatoid arthritis patient response to methotrexatetherapy. Rheumatol Int, 2007;27:1057-1061.

41. Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. Eur J Clin Pharmacol 2008; 64: 1057-1068.

42. Genovese MC, Bathon JM, Martin RW, et al. Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: Two-year radiographic and clinical outcomes.Arthritis Rheum. 2002;46:1443–1450.

43. Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT, et al. Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: A randomized, placebo-controlled, 52-week trial. Arthritis Rheum. 2004;50:1400–1411.

44. Ferraccioli G. The possible clinical application of pharmacogenetics in rheumatology. J. Rheumatol. 2003;30:2517–2520.

45. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, et al. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-

Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. N. Engl. J. Med. 2000;343:1594–1602.

46. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, et al. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. Scand. J. Immunol. 1996;43:456–463.

47. Smolen J.S, Emery P. Infliximab: 12 years of experience. Arthritis Res Ther. 2011; 13:2.

48. Dinarello C. A, Simon A. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. Nat Rev Drug Discov. 2012; 11: 633–652.

49. Callan MF. Epstein-Barr virus, arthritis, and the development of lymphoma in arthritis patients. Curr. Opin. Rheumatol. 2004;16:399-405.

50. Mohan N, Edwards ET, Cupps TR, et al. Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides. Arthritis Rheum. 2001;44:2862-2869.

51. Baecklund E, Ekbom A, Sparen P, Feltelius N, Klareskog L. Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: nested case-control study. BMJ. 1998;317:180-181.

52. Emery P, van de Putte LBA, van Riel PLCM, Rau R, Schattenkirchner M, Burmester GR. Changes in Pro-MMP-1 in relation to standard measures of disease activity over a 6-month treatment period with adalimumab (D2E7) in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2001;44:215.

53. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. Arthritis Rheum. 1998;41:2196–2204.

54. Cohen S, Hurd E, Cush J, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 2002;46:614-624.

55. Fleischmann RM, Schechtman J, Bennett R, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 2003;48:927–934.

56. Gümüş A. Romatoid artritli hastalarda vasküler endothelial büyüme faktörü ve anti siklik sitrülinlenmiş protein antikoru seviyelerinin değerlendirilmesi,

Uzmanlık Tezi, T.C Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul 2007:15.

57. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu. Rev. Immunol. 1996;14:397–440.

58. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ . The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1987;30:1205–1213.

59. Öncel S, Peker Ö, Göğüş F. Romatoid Artritte Etiyopatogenez, Klinik ve Laboratuar Bulgular. Göksoy T (ed). Romatizmal Hastalıkların Tanı ve Tedavisi. Yüce Reklam/Yayım/Dağıtım A.Ş. 2002;422-431,436-449.

60. Hajeer AH, Dababneh A, Makki RF, et al. Different gene loci within the HLA-DR and TNF regions are independently associated with susceptibility and severity in Spanish rheumatoid arthritis patients. Tissue Antigens 2000;55: 319-325.

61. Padyukov L, Lampa J, Heimburger M, et al. Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 2003;62:526–529.

62. Zhang L, Wong S. C, Matherly L. H. Structure and organization of human reduced folate carrier. Biochim Biophys Acta. 1998; 389-393.

63. Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. Vitam Horm. 2003;66:403–456.

64. Verweij CL. Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 1999;58:20–26.

65. Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, Breedveld FC, Verweij CL. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of disease? Br. J. Rheumatol. 1997;36:516–521.

66. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, et al. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. J. Exp. Med. 1993;177:557–560.

67. Jacob CO, Fronek Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990;87:1233–1237.

68. Kuo NW, Lympany PA, Menezo V, et al. TNF-857T, a genetic risk marker for acute anterior uveitis. Invest. Opthalmol. Vis. Sci. 2005;46:1565–1571.

69. Udalova IA, Richardson A, Denys A, et al. Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. Mol. Cell Biol. 2000;20:9113–9119.

70. Akman A, Sallakci N, Coskun M, et al. TNF-alpha gene 1031 T/C polymorphism in Turkish patients with Behcet's disease. Br. J. Dermatol. 2006;155:350–356.

71. Santee SM, Owen-Schaub LB. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. J. Biol. Chem. 1996;271:21151–21159.

72. Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, et al. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-2 alpha. Immunogenetics. 2002;54:82–86.

73. Hulkkonen J, Laippala P, Hurme M. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals. Eur. Cytokine Netw. 2000;11:251–255.

74. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum.1999;42:1093–1100.

75. van den Velden PA, Reitsma PH. Amino acid dimorphism in IL1A is detectable by PCR amplification.Hum. Mol. Genet. 1993;2:17-53.

76. Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. Scand. J. Immunol. 1998;47:195–198.

77. Buchs N, di Giovine FS, Silvestre T, et al. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. Genes Immun. 2001;2:222–228.

78. Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, et al. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000;162:755–758.

79. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an

association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J. Clin. Invest. 1998;102:1369–1376.

80. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur. J. Immunogenet. 1997;24:1–8.

81. Padyukov L, Hytonen AM, Smolnikova M, et al. Polymorphism in promoter region of IL-10 gene is associated with rheumatoid arthritis in women. J. Rheumatol. 2004;31:422–425.

82. Braun N, Michel U, Ernst BP, et al. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and it's influence on the regulation of TNF-alpha production. Neurosci. Lett. 1996;215:75–78.

83. Reveille JD. Genetic studies in the rheumatic diseases: present status and implications for the future. J. Rheumatol. Suppl. 2005;72:10–13.

84. Kung T. N, Dennis J, Ma Y, et al. RFC1 80GA Is a Genetic Determinant of Methotrexate Efficacy in Rheumatoid Arthritis A Human Genome Epidemiologic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Arthritis Rheum. 2014;66:1111-1120.

85. Plaza-Plaza J.C, Aguilera M, Cañadas-Garre M, et al. Pharmacogenetic Polymorphisms Contributing to Toxicity Induced by Methotrexate in the Southern Spanish Population with Rheumatoid Arthritis. Omics. 2012;16:589-595.

86. Sambrook J, Russell D.W, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratary Manual. 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York, 1989.

87. Karakurt Ö, Melli M. Antineoplastik Kemoterapinin Bireyselleştirilmesi Ve Farmakogenetik, Uluslar Arası Hematoloji-Onkoloji Dergisi, Uhod. 2005;3-15.

88. Wolf C. R., Smith G. and Smith R. L. Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics; BMJ 2000;320;987-990.

89. Yılmaz L, Aslan G, Bodur H. Romatoid Artritli Hastalarda ikinci basamak İlaç kullanımı. Romatizma. 2003;18:141-150.

90. Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, et al. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1999;58:79-84.

91. Hoekstra M, E van Ede A, Haagsma C. J, van et al. Factors associated with toxicity, final dose, and efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2003; 62: 423 - 426.

92. Judith A. M. Wessels, Jeska K. de Vries-Bouwstra, Bas T. Heijmans, et al. Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Early Rheumatoid Arthritis Are Associated With Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Coding for Folate Pathway Enzymes. Arthritis Rheum 2006;54: 1087-1095.

93. Ranganathan P., Eisen S., Yokoyama W. M. and McLeod H. L. Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis? Annals of the Rheumatic Diseases 2003;62:4-9.

94. Samara S. A, Irshaid Y. M, Mustafa K. N. Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. Int J Clin Pharmacol Ther. 2014;52:746-755.

95. Laverdière C. Chiasson S. Costea I. Moghrabi A. Krajinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002;100:3832-3834.

96. Morin I, Devlin AM, Leclerc D, et al. Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. Mole Genet Metabolism 2003;79:197-200.

97. Whetstine J.R, Gifford A.J, Witt T, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His(27) and Arg(27) carriers. Clin Cancer Res. 2001;7:3416-3422.

98. Hayashi H, Tazoe Y, Tsuboi S, et al. A single nucleotide polymorphism of reduced folate carrier 1 predicts methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Drug Metabolism and Pharmacokinetics 2015;30: 227-230.

99. Bruce A. Chabner & Thomas G. Roberts. Chemotherapy and the war on cancer. Nature Reviews Cancer 2005; 5:65-72.

EKLER

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULUN ADI	: ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 66
E-POSTA	: byenisu@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Romatoid artritli hastalarda metotreksat etkinliğinin rfc1 (indirgenmiş folat taşıyıcı 1) tek nükleotid polimorfizmi ile ilişkisinin incelenmesi				
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU					
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/AD/SOYADI	Prof.Dr. Halit Canatan				
KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji				
KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/AD/SOYADI	Prof.Dr. Halit Canatan				
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı/Kayseri				
DESTEKLEYİCİ					
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
ARAŞTIRMA FAZI	FAZ 1				
	FAZ 2				
	FAZ 3				
	FAZ 4				
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon				
	Yüksek Öğr.Araştırması				
	Diğer İse Belirtiniz	X	Yüksek Lisans Tezi		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ X	ÇOKMERKEZ	ULUSAL X	ULUSLARARASI	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe	İngilizce	Diğer
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe	İngilizce	Diğer
ÖLÇÜ RAPOR FORMU			Türkçe	İngilizce	Diğer
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe	İngilizce	Diğer

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI		Açıklama
TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ		
SİGORTA		
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		
BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU		
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ		
İLAN		
YILLIK BİLDİRİM		
SONUÇ RAPORU		

Aslı gibidir

T.C.

Şükrü YENİSU

Etik Kurul Üyesi

ASLI gibidir

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER			
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

T.C.
Şükriye Yıldız SU
Etik Kurul Üyesi

KARAR BİLGİLERİ		
Karar No : 2013/25	Karar Tarihi : 08.01.2013	
Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üyesi tam oyçokluğu ile karar verilmiştir.		

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Etik Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	Bilgi (*)	Kurum (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Nazan DOLU	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ulus Bahçecioğlu	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Fatih TANRIVERDİ	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Leyla HASDIRAZ	Göğüs Cerrahisi	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr. Ertuğrul MAVİLİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Hasan B. ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mehmet A. SOMDAŞ	KBB	Kayseri Eğitim Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Ferhan ELMALI	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
AV. [illegible]	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yusuf Oğuz ALTUNTAŞ	Sivil Üye	Sivil Toplum Temsilcisi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF) (Romatoid artritli hastalar)

BİLGİLENDİRME:

Araştırmanın Adı; Romatoid artritli hastalarda metotreksat etkinliğinin rfc1(indirgenmiş folat taşıyıcı 1) tek nükleotid polimorfizmi ile ilişkisinin incelenmesi.

Araştırmanın Amacı: Türk Romatoid artritli hastalarda Metotreksat(MTX) etkinliğini tahmin edici bir belirteç olarak RFC 1 gen polimorfizmlerinin özellikle hastalığı biyolojik modifiye edici antiromatizmal ilaçların(bDMARD) kullanımının gerektiği durumlardaki muhtemel ilişkilerini araştırmaktır.

Araştırmanın Süresi; Yaklaşık 1 yıl, 6 ay

Araştırmaya Katılan Gönüllü Sayısı; 200

Araştırmada İzlenecek Yöntem; MTX etkinliği ve RFC 1 gen polimorfimlerinin ilişkisini araştırmak için MTX ve MTX ile BDMARD kombine kullanan Romatoid artritli hastalardan bir defaya mahsus ETDA'lı tüplere 5 ml tam venöz kan alınacaktır. Çalışma için ayrıca bir ilaç uygulaması ya da tıbbi müdahale yapılmayacaktır. Bu nedenle çalışmanın size herhangi bir yan etkisi bulunmamaktadır.

Bu çalışmaya katılmakta özgürsünüz. Başlangıçta kabul edip daha sonra fikir değiştirip, hiçbir gerekçe göstermeden çalışmadan ayrılabilirsiniz.

Kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlarınız gizli tutulacaktır; kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde bile kimliğiniz gizli kalacaktır.

Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilecek Kişi Adı / Soyadı / Telefonu:

Prof. Dr. Salih ÖZGÖÇMEN

0 352 207 66 66 / 21825 / 20827

GÖNÜLLÜ OLURU

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

Gerekiyorsa Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekiyorsa Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Mehmet Akif BÖLÜKBAŞI
Uyruğu : Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri : 16.09.1988 / KAYSERİ
Medeni Durumu : Bekâr
Tel : 554 403 02 88
Email : m.a.bolukbasi38@gmail.com
Yazışma Adresi : Erciyes Mahallesi Osmanlı Caddesi No. 8 Hisarcık/ Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi	2010
Lise	Hisarcık Lisesi	2005

YABANCI DİL

İngilizce,