

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA OKSİDATİF DNA
HASARI VE LİPİT PEROKSİDASYON DÜZEYLERİNİN
PROSPEKTİF OLARAK İNCELENMESİ

Yağmur YAVAŞ

ORCID: 0000-0002-3928-6435

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

Moleküler Tıp Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

HAZİRAN 2021

TEZ KODU: DEU-HSI-MSc-2017970201

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA OKSİDATİF DNA
HASARI VE LİPİT PEROKSİDASYON DÜZEYLERİNİN
PROSPEKTİF OLARAK İNCELENMESİ**

Yağmur YAVAŞ

ORCID: 0000-0002-3928-6435

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gamze TUNA

ORCID: 0000-0002-7311-4020

**Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Müdürlüğü tarafından
2021.KB.SAG.012 proje numarası ile desteklenmiştir.**

İZMİR

HAZİRAN 2021

İÇİNDEKİLER

İçindekiler

İÇİNDEKİLER	i
TABLOLAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR.....	vi
ETİK BEYAN	ix
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Romatoid Artrit	5
2.1.1. Tanı ve Sınıflandırma	5
2.1.2. Risk Faktörleri / Etiyoloji	7
2.1.3. Hastalığın Patogenezi	8
2.1.4. Hastalığın Tedavisi	10
2.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	10
2.2.1. Oksidatif DNA Hasarı	13
2.2.2. Lipit Peroksidasyonu	16
2.3. Oksidatif Stresin Romatoid Artrit ile İlişkisi	19

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Araştırmanın Tipi	22
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	22
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	22
3.4. Çalışma Materyali	24
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	24
3.6. Veri Toplama Araçları.....	24
3.6.1. Kullanılan Cihaz, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	24
3.6.2. İdrarda Hasarlı DNA Nükleozidlerinin LC-MS/MS Yöntemi ile Kantitasyonu.....	26
3.6.3. İdrarda 8-izoprostanın ELISA Yöntemi ile Analizi.....	29
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	32
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	32
3.8.1. İstatistiksel Analizler	32
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	33
3.10. Etik Kurul Onayı	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Tanımlayıcı Bulgular.....	34
4.2. DNA Hasarı Bulguları.....	35
4.3. Lipit Peroksidasyonu Bulguları.....	40
4.4. Klinik Parametreler	41
4.5. Korelasyon Analizleri.....	46
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR.....	61

EKLER	69
-------------	----



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. ACR/EULAR Kriterleri.....	6
Tablo 2. DAS 28 Skoruna göre RA hastalığının evreleri	6
Tablo 3. Serbest radikal olan ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri	11
Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	25
Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler.....	26
Tablo 6. Çalışmada ölçümü gerçekleştirilen DNA nükleozit hasar ürünleri ve iç standartların m/z oranları	27
Tablo 7. Grupların yaş ve cinsiyet verileri.....	34
Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen 69 hastanın ilaç kullanımları	34
Tablo 9. Çalışmaya dahil edilen hastaların DAS 28 skorlarına göre gruplandırılması.....	35
Tablo 10. Oksidatif hasar parametrelerinin kontrol grubu ve hasta grubunda karşılaştırması.....	44
Tablo 11. Altıncı ay kontrollerini tamamlayan hastalarda, klinik verilerin ve oksidatif hasar düzeylerinin tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırması	44
Tablo 12. Tanı aldığı anda remisyonda olan grup (Grup A) ve tanı aldığı anda alevli dönemde olan grupta (Grup B) klinik verilerin ve oksidatif hasar düzeylerinin (0. ay) karşılaştırması.....	45
Tablo 13. Oksidatif hasar parametrelerinin ve klinik verilerin tedaviyle değişen DAS 28 skorlarına göre gruplandırılan hastalarda tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırması	45
Tablo 14. Oksidatif hasar parametrelerinin ve klinik verilerin tedaviyle değişen DAS 28 skorlarına göre gruplandırılan hastalarda gruplar arasında karşılaştırması.....	46
Tablo 15. Tüm hastalara ait korelasyon tablosu	47
Tablo 16. Hastalık aktivitesindeki değişime göre alevli başlayıp tedavi sonrası remisyona giren hasta grubunun, altıncı ay verileri ile klinik bulguların korelasyon tablosu	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sağlıklı eklem yapısı ile RA'lı eklem yapısı arasındaki farklar.....	9
Şekil 2. 8-OH-Gua ve FapyGua oluşum mekanizması	14
Şekil 3. R- ve S-cdA'nın oluşum mekanizması.....	16
Şekil 4. Serbest radikal katalizli lipid peroksidasyonu mekanizması	17
Şekil 5. Araşidonik asidin serbest radikallerle peroksidasyona uğraması sonucu oluşan F2-izoprostanlar	19
Şekil 6. Romatoid artrit – oksidatif stres ilişkisi	20
Şekil 7. 8-OH-dG'nin iyon fragmentasyonları	28
Şekil 8. R-cdA ve S-cdA'nın iyon fragmentasyonları.....	28
Şekil 9. 8-izoprostan standartlarının hazırlanması. Seri dilüsyon oranları.....	30
Şekil 10. RA hasta grubunda ve sağlıklı kontrol grubunda elde edilen kromatogram örnekleri	36
Şekil 11. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında idrar 8-OH-dG ve R-cdA seviyelerinin karşılaştırılması	37
Şekil 12. Altıncı ay kontrollerini tamamlayan hastaların tedavi öncesi ve sonrası DNA hasar seviyelerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 13. Sağlıklı kontrol grubu ve RA grubunun 8-izoprostan seviyelerinin karşılaştırılması.....	40
Şekil 14. Altıncı ay kontrollerini tamamlayan hastaların 8-izoprostan seviyelerinin karşılaştırılması	41
Şekil 15. Altıncı ay kontrolünü tamamlayan hastaların klinik parametrelerinin karşılaştırılması.....	42

KISALTMALAR

15-F2t-IsoP	: 8-izoprostan
4-HNE	: 4-hidroksinonenal
8-izo-PGF2α	: 8-izoprostan
8-OH-dG	: 8-hidroksi deoksiguanozin
8-OH-Gua	: 8-hidroksiguanin
8-okso-Gua	: 8-oksoguanin
AChE	: Asetilkolin esteraz
ACPA	: Anti-sitrüline protein antikoru
ACR	: American College of Rheumatology
APC	: Antijen sunan hücre
BER	: Baz ekzisyon / çıkarma onarımı
Blk	: Blank
BOSS	: Oksidatif Stres Biyobelirteçleri Çalışması
COX	: Siklooksijenaz
CRP	: C-reaktif protein
DAS 28	: Hastalık Aktivite Skoru
DEÜ	: Dokuz Eylül Üniversitesi
DMARD	: Hastalık modifiye edici anti-romatizmal ilaçlar
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESH	: Eritrosit sedimentasyon hızı

EULAR	: European League Against Rheumatism
F2-İzop	: F2-izoprostanlar
FapyGua	: 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
FLS	: Fibroblast benzeri sinoviyositler
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
HAQ	: Sağlık değerlendirme anketi
HLA	: Human Leukocyte Antigen - İnsan Lökosit Antijeni
HLA-DRB1	: HLA-Sınıf 2 Antijen D İlişkili Beta Zinciri 1
hMTH1	: İnsan Mut T homolog'u
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
IgG	: İmmünglobulin G
IL	: İnterlökin
IS	: İnternal standart
iPF2α III	: 8-izoprostan
İzoP	: İzoprostan
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi tandem kütle spektrometre
m/z	: Kütle/yük
MDA	: Malondialdehit
MRM	: Multiple reaction monitoring – Çoklu reaksiyon izleme
MTX	: Metotreksat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NER	: Nükleotit eksizyon onarımı

NIEHS	: National Institute of Environmental Health Sciences - Ulusal Çevre Sağlığı Bilimleri Enstitüsü
NSB	: Non-spesifik binding
PG	: Prostaglandin
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
RA	: Romatoid Artrit
R-cdA	: R-8,5-siklo-2-deoksiadenozin
RF	: Romatoid Faktör
ROT	: Reaktif oksijen türleri
S-cdA	: S-8,5-Siklo-2-deoksiadenozin
SID	: Stable isotope dilution – Stabil izotop dilüsyonu
SPE	: Solid phase extraction – Katı faz ekstraksiyonu
TA	: Total aktivite
TBARS	: Tiyobarbütik asit reaktif bileşikleri
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü – α

ETİK BEYAN

T.C

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “**Romatoid Artrit Hastalarında Oksidatif DNA Hasarı ve Lipit Peroksidasyon Düzeylerinin Prospektif Olarak İncelenmesi**” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Yağmur YAVAŞ

08.06.2021

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından sonuna kadar her aşamasında kıymetli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan ve öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum tez danışmanım değerli hocam **Dr. Öğr. Üyesi Gamze TUNA**'ya;

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini ve deneyimlerini paylaştan, desteğini her zaman hissettiren ve çalışmalarım için kütle spektrometri laboratuvarının kapılarını açan değerli hocam **Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL**'e;

Tezimin planlanması aşamasından itibaren klinik safhada da desteğini ve bilgilerini esirgemeyen değerli hocam **Prof. Dr. Merih Birlik**'e ve DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri AD Romatoloji Bilim Dalında **görevli değerli hocalarıma**;

Yüksek lisans eğitimim süresince almış olduğum eğitimde emeği geçen, başta Moleküler Tıp Anabilim Dalı başkanımız değerli hocam **Prof. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ** olmak üzere anabilim dalımızın tüm **değerli öğretim üyelerine**;

Deneyisel çalışmalarımı yürüttüğüm süre boyunca destek olan başta Tıbbi Biyokimya AD. Başkanı Sayın **Prof. Dr. Sezer UYSAL** olmak üzere Anabilim Dalı'nın **tüm değerli üyelerine**;

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda destek ve yardımcı olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşım **Nazlı Ecem DAL BEKAR**'a;

Her anımda yanımda olan ve beni her konuda destekleyen canım arkadaşlarım **Sinem ANAS GÜZ** ve **Cevza Beliz NALINCIOĞLU**'na;

Her koşulda desteklerini ve sevgilerini hissettiren sevgili ablalarım **Merve - Akife Ece YAVAŞ**'a ve stres topum olan canım kedim **Chiquitta**'ma;

Her adımda yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgmeden bugünlere gelmemi sağlayan canım anne-babam **Nasip - Mustafa YAVAŞ** ve biricik halam **Melek YAVAŞ**'a tüm sabır ve fedakarlıkları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA OKSİDATİF DNA HASARI VE LİPİT PEROKSİDASYON DÜZEYLERİNİN PROSPEKTİF OLARAK İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Yağmur YAVAŞ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilimdalı

ÖZET

Romatoid artrit (RA), eklemlerde tutulum gösteren kronik ve inflamatuvar bir otoimmün hastalıktır. Patogenezi tam olarak bilinmeyen RA’da uygulanan tedaviler semptomları hafifletmeyi amaçlar. Endojen veya ekzojen yollar sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türleri; hücre yapısındaki makromolekülleri oksidatif hasara uğratarak birçok hastalık ile ilişkilendirilen hasarlı ürünlerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu tez çalışmanın amacı; RA hastalarında ve sağlıklı kişilerde oksidatif DNA hasarı ve lipit peroksidasyonu düzeylerinin araştırılması, aynı zamanda RA hastalarının altı aylık rutin tedavileri sonucundaki değişimini oksidatif hasar parametreleri açısından prospektif olarak incelemektir. Ayrıca altı aylık tedavi süreci sonunda hastaların Hastalık Aktivite Skoru (DAS28 skoru), Sağlık Değerlendirme Anketi (HAQ) skoru, C-Reaktif protein (CRP) ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) düzeyleri ile oksidatif makromolekül hasarı düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesidir.

69 RA hastası ve 31 sağlıklı kontrolün dahil edildiği çalışmada oksidatif DNA hasarının başlıca göstergeleri olan 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-dG), 8,5’-siklo-2’-deoksiadenozin’in *R* ve *S* formu (*R*-cdA, *S*-cdA) olan nükleozitler ve lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden 8-izoprostan (8-iso-PGF_{2α}) düzeyleri incelendi. Hasta ve kontrol gruplarında nükleozit hasarını belirlemek için sıvı kromatografi tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) yöntemi; lipit peroksidasyonu düzeyini belirlemek için ise enzim immünoassay (ELISA) yöntemi kullanıldı.

Çalışma sonucunda RA tanısı alan hastaların 8-OH-dG, *R*-cdA ve 8-izoprostan düzeyleri sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,003$; $p=0,005$; $p<0,001$). Hastaların altı aylık tedavi sonrası oksidatif hasar parametreleri incelendiğinde hastaların tedavi sonrası 8-OH-dG, *R*-cdA ve *S*-cdA seviyelerinde tanı aldıkları zamana göre anlamlı düzeyde azalma görülürken (sırasıyla $p=0,001$; $p=0,040$; $p<0,001$); 8-izoprostan seviyesinde ise anlamlı düzeyde yükselme gözlemlendi. ($p=0,010$). Tedavi sonrası hastaların DAS 28 skoru, HAQ skoru, CRP ve ESH düzeyleri tedavi öncesine göre anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla $p<0,001$; $p=0,002$; $p=0,017$; $p=0,001$). Hastalar, altı aylık tedavi sonucunda hastalık şiddetindeki değişime göre (DAS 28 skoru) gruplandırıldığında, tanı

aldığında alevli dönemde olup tedaviyle remisyona giren hastalarda DAS 28 skorundaki düşüşle beraber 8-OH-dG ve S-cdA seviyelerinde de tedavi öncesine göre tedavi sonrasında anlamlı düzeyde azalma görüldü (sırasıyla $p<0,001$; $p=0,003$; $p=0,005$). Hastaların tanı aldıkları dönemde ölçülen ESH ve S-cdA düzeyleri dışında gözlenen ilişki haricinde ($r=0,307$; $p=0,011$) klinik parametreler ve oksidatif hasar düzeyleri arasında korelasyon bulunmadı.

Yapılan çalışma, RA hastalarında aynı anda üç farklı DNA hasarı parametresi ve lipit peroksidasyon ürünü düzeylerinin, hem sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığı hem de hastalara uygulanan tedavi sonrası ölçümün yapıldığı ilk çalışmadır. RA hastalarında tanıyı takiben sağlıklı kontrollere göre artmış oksidatif makromolekül hasarı düzeyleri, hastalığın patagonezinde oksidatif stresin belirleyici rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca uygulanan tedavi sürecinin oksidatif DNA hasarını baskımlarken lipit hasarını ise indüklediği gösterilmiştir. Bu açıdan çalışmamız oksidatif DNA ve lipit hasar oluşumunun RA tedavisi sürecine farklı mekanizmalarla ve birbirlerine göre zıt şekilde cevap verdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamız kapsamında elde edilen bulguların RA'nın ayırıcı tanısına, klinik seyrine ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesine ışık tutacağı görüşündeyiz.

Anahtar Kelimeler: ELISA, oksidatif stres, romatoid artrit, tandem kütle spektrometri

Tez Sayfa Adedi: 96

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gamze TUNA

**PROSPECTIVE INVESTIGATION OF THE OXIDATIVE DNA DAMAGE
AND LIPID PEROXIDATION LEVELS IN PATIENTS WITH
RHEUMATOID ARTHRITIS**

Master Thesis

Yağmur YAVAŞ

**DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH
SCIENCES**

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and inflammatory autoimmune disease that is involving the joints. Current clinical approaches aim to alleviate the symptoms, although the pathogenesis of RA yet to be known. Reactive oxygen species formed both endogenously and exogenously. By attacking cellular macromolecules, they lead to the formation of oxidatively damaged end products which are related to many diseases. This study aims to investigate the changes in DNA nucleoside damage and lipid peroxidation levels in patients with RA after six months of treatment, along with the comparison of healthy controls and patients with RA. We also aim to prospectively examine the relationship between the Disease Activity Score (DAS28 score), Health Assessment Questionnaire (HAQ) score, C-Reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESH) levels and oxidative macromolecule damage levels at the end of the six-month treatment period.

69 RA patients and 31 healthy controls were included in the study. As the main indicators of oxidative DNA damage 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG), *R* and *S* forms of 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine (*R*-cdA and *S*-cdA); and for the evaluation of lipid peroxidation, 8-isoprostane which is one of the end products of peroxidation was investigated. The liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was used to determine nucleoside damage, and the Enzyme immunoassay (ELISA) method was used to determine the level of lipid peroxidation.

As a result of our study, 8-OH-dG, *R*-cdA, and 8-isoprostane levels of the patients found significantly higher than the healthy controls ($p=0.003$; $p=0.005$; $p<0.001$, respectively). After six months of treatment, a significant decrease was observed in the 8-OH-dG, *R*-cdA, and *S*-cdA levels of the patients ($p=0.001$; $p=0.040$; $p<0.001$, respectively); in contrary, the level of 8-isoprostane found higher after treatment than before treatment ($p=0.010$). DAS 28 and HAQ scores, CRP, and ESR levels of the patients were found significantly lower after treatment than before treatment ($p<0.001$; $p=0.002$; $p=0.017$; $p=0.001$, respectively). The patients grouped according to the change in disease severity after six months of treatment, a decrease

in DAS 28 score along with 8-OH-dG and S-cdA levels was observed after treatment than before, in patients who were in flare-up period at the time of diagnosis and went in remission after treatment ($p<0.001$; $p=0.003$; $p=0,005$, respectively). No correlation was found between clinical parameters and oxidative damage levels except ESR measured at diagnosis and S-cdA measured at diagnosis ($r=0.307$; $p=0.011$).

This is the first study in the literature that compares three different DNA damage parameters and lipid peroxidation product levels simultaneously before and after the treatment applied to the patients, besides the comparison of healthy controls and patients with RA. In addition, it has been shown that the applied treatment process suppresses oxidative DNA damage and induces lipid damage. In this respect, our study reveals that oxidative DNA and lipid damage formation respond to the RA treatment process with different mechanisms and in opposition to each other. We believe that the findings obtained within the scope of our study will shed light on the differential diagnosis of RA, its clinical course, and the evaluation of the response to treatment.

Key Words: ELISA, oxidative damage, rheumatoid arthritis, tandem mass spectrometry

Page Number: 96

Advisor: Asst. Prof. Gamze TUNA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Romatoid artrit (RA), periferik eklemlerin simetrik tutulumu ile birlikte kartilaj ve kemik tahribatına yol açan eroziv sinovit ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Kardiyovasküler, pulmoner, psikolojik ve iskelet sistemi rahatsızlıkları gibi multisistemik etkileri de olabilmektedir. Mevcut tedavi stratejileri semptomları hafifletmeye yönelik olup; yeni tanıyı takiben “Hastalık Modifiye Edici Anti-Romatizmal İlaçlar (DMARD)” ile tedavi süreci başlamaktadır. DMARD tedavisine rağmen hastalık aktivite skoru (DAS 28) yüksek seyreden hastalara biyolojik ajan tedavileri uygulanmaktadır. Biyolojik ajanlar, romatizmal hastalıklarda inflamasyonun farklı noktalarında etkili olarak inflamasyonu indükleyen özgün yolları ve sinyalleri inhibe etmektedirler. RA hastalığı, hastaların fonksiyonel kapasitesini azaltırken, morbidite ve mortalite oranlarını arttırmakta; ayrıca sosyal hizmetler ve sağlık alanlarında önemli oranda yüksek harcamalara neden olmaktadır. Bu nedenler göz önünde bulundurulduğunda kronik bir hastalık olan RA’nın mümkün olan en etkin strateji ile tedavisi toplumsal ve ekonomik açıdan önem arz etmektedir (1).

Patojenik koşullarda artan reaktif oksijen ve nitrojen türleri lipid, protein ve DNA gibi makromoleküllere saldırarak oksidatif hasara neden olmaktadır. Karsinojenite, genomik kararsızlık ve mutajenite ile ilişkili olan oksidatif DNA hasarı, uzun vadeli etkileri açısından kritik bir role sahiptir (2). DNA nükleozit hasar ürünlerinden 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-dG), 8,5’-siklo-2’-deoksiadenozin’in *R* ve *S* formu (*R*-cdA, *S*-cdA) oksidatif hasarın güvenilir biyobelirteçleridir (3). Lipit peroksidasyon ürünü olan izoprostanlar ise, oksidatif stresin fizyolojik düzeylerinin en güvenilir göstergelerinden biridir (4). F2 izoprostan ailesinin bir üyesi olan, izoprostanlar arasında vücutta en fazla bulunan ve lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde altın standart olarak belirlenen 8-izoprostan (8-izo-PGF₂α), oksidatif stresin değerlendirilmesinde önemli bir belirteçtir (5–8). 8-izo-PGF₂α, RA hastalarının artan kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkili olması nedeniyle ayrıca önem taşımaktadır (9).

RA patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte hastalığın mekanizmasında oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (1,10,11). RA patogenezinde oksidatif stres ve buna bağlı hasarın önemi göz önünde bulundurulduğunda tedavi stratejilerinin bu hasarı indirgeme yetkinlikleri önem arz etmektedir. Uygulanan RA tedavilerinin yalnızca özgün ve stabil olmayan oksidatif stres belirteçleri ile değerlendirildiği birbirinden bağımsız çalışmalar olmakla birlikte tedavinin oksidatif makromolekül hasarına etkilerinin prospektif olarak incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Çalışmamızda;

- RA hastalarında hastalık tanısı konduğu anda ve tedavi sürecinin altıncı ayında oksidatif DNA hasarı ve lipit peroksidasyonu düzeylerinin değişiminin incelenmesi,
- Ayrıca, sağlıklı kontrol grubu ile hastaların tedavi öncesi oksidatif hasar düzeylerini karşılaştırarak hastaların oksidatif hasar durumunun belirlenmesi,
- Tedavi öncesi ve tedavinin altıncı ayında ölçülen DAS 28 skorlarına göre gruplandırılan hastalarda oksidatif DNA hasarı, lipit peroksidasyonu ve klinik parametrelerdeki farklılıkların incelenmesi,
- İncelenen makromolekül hasar düzeylerinin hastalığın klinik bulguları ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Bu amaçlar doğrultusunda çalışmamızın başlıca hedefleri:

- Hastaların tedaviye başlamadan önceki oksidatif makromolekül hasarı düzeylerinin sağlıklı kişilerdeki hasar düzeyleri ile karşılaştırmak için yeni tanı alan hastalardan ve sağlıklı kişilerden alınan sabah ilk idrar örneklerinde lipit peroksidasyon ürünü olan 8-izoprostan'ın ELISA yöntemiyle; oksidatif nükleozit hasarı ürünleri olan 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA düzeylerinin LC-MS/MS ile ölçülmesi,

- RA’da uygulanan rutin tedavinin lipit peroksidasyonu ve oksidatif DNA hasarı düzeyleri üzerine etkisini uzun vadede değerlendirmek için DMARD/biyolojik ajan tedavisine başlayan hastalardan tedavinin altıncı ayında alınan idrar örneklerinde 8-izoprostan, 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA düzeylerinin ölçülmesi ve ölçülen parametrelerin tedavi öncesi dönemdeki düzeyleri ile karşılaştırılması,
- Hastaların tanı aldığı dönemde ve altı aylık tedavileri sonrası ölçülen hastalık aktivite skoru (DAS 28), sağlık değerlendirme anketi (Health Assessment Questionnaire-HAQ) skoru ve inflamasyon parametrelerinin karşılaştırılması,
- Hastaların tanı aldıkları andaki hastalık şiddeti skorlarına göre alevli dönemde (DAS 28 >2,6-Alevli Grup) ve remisyon döneminde (DAS 28 ≤2,6-Remisyon Grubu) olacak şekilde gruplandırılması ve gruplar arasında tedavi öncesi oksidatif makromolekül hasarı düzeylerinin karşılaştırılması,
- Hastaların tanı aldıkları dönemde (0. ay) ve altı aylık tedavi süreçleri sonundaki DAS 28 skorlarındaki değişime göre gruplandırılması (Remisyonda başlayıp remisyonunda kalan; Alevli başlayıp remisyonunda giren; Alevli başlayıp Alevli kalan) ve grupların 0. ay ve 6. ay oksidatif hasar ve klinik parametrelerinin her bir grupta incelenmesi, ayrıca üç grubun tedavi sonrası oksidatif hasar ve klinik parametrelerinin karşılaştırılması,
- Hastalarda klinik parametreler ile oksidatif hasar parametrelerinin ilişkisini incelemek için; çalışmaya dahil edilen hastalarda lipit peroksidasyonu ve oksidatif DNA hasarı düzeylerinin; DAS 28, HAQ skoru ve inflamasyon parametreleri ile korelasyonunun incelenmesidir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Araştırmamızın başlıca hipotezleri

- ✓ Yeni tanı alan RA hastalarının oksidatif DNA hasarı ve lipit peroksidasyon düzeyleri, kontrol grubuna göre yüksektir.
- ✓ RA tedavisi, oksidatif DNA hasarı ve lipit peroksidasyonu düzeylerine etki etmektedir.

- ✓ Hastaların tanı aldığı dönemde ve tedavi sonrası ölçülen DAS 28 skoru, HAQ skoru ve inflamasyon parametrelerinin düzeyleri farklılık göstermektedir.
- ✓ İncelenen makromolekül hasar düzeylerinin hastalığın klinik bulguları ile ilişkisi vardır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit

Romatoid artrit (RA); eklemlerde simetrik tutulum gösteren, kronik ve inflamatuvar bir otoimmün hastalıktır. Etnik kökene göre değişkenlik gösterse de dünya genelinde ~%1 prevalansa sahip olan RA, en sık görülen kronik inflamatuvar hastalıktır (12–14). RA'nın kardiyovasküler, pulmoner, psikolojik ve iskelet sistemi rahatsızlıkları gibi multisistemik etkileri de olabilmektedir. Hastaların bireysel olarak yaşadığı kas-iskelet sistemi bozuklukları, yaşam kalitesinin düşmesi, fiziksel kısıtlamalar, yüksek hastane ve ilaç masrafları gibi olumsuz etkilerin yanı sıra iş gücünü düşmesi gibi olumsuz sosyoekonomik etkileri de vardır (12,15). Hastalık her yaşta başlayabilir ancak genelde ileri yaş hastalığı olarak ortaya çıkar ve kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülmektedir (13,14). RA etiyolojisi ve patolojisi henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da çevresel ve genetik birçok faktörden etkilendiği bilinmektedir (16).

2.1.1. Tanı ve Sınıflandırma

RA tanısı için kesin bir tanı kriteri bulunmamaktadır. Buna karşın American College of Rheumatology ve European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) tarafından 2010 yılında belirlenen puanlama sistemi ile eklem tutulumu, serolojik bulgular, semptom süresi ve akut faz reaktanlarının konsantrasyonuna göre tanı konulmaktadır (17,18). Kişiye RA tanısı konması için en az bir ekleminde tutulum görülmeli ve kişi ACR/EULAR kriterlerinde on üzerinden en az altı puan almalıdır. (Tablo-1). ImmünoglobulingG'ye karşı oluşan bir otoantikor olan Romatoid Faktör (RF) ve anti-sitrüline protein antikoru (Anti citrulinated peptides/proteins-ACPA), hastaların %80'inde bulunurlar. RF diğer otoimmün hastalıklarda ve hatta sağlıklı kişilerde de görülebilirken ACPA, RA'ya daha spesifiktir (19,20).

Tablo 1. ACR/EULAR Kriterleri

Eklemler Tutulumu (0-5)	
1 büyük eklemler	0
2-10 küçük eklemler	1
1-3 küçük eklemler (büyük eklemler değerlendirilmez)	2
4-10 küçük eklemler (büyük eklemler değerlendirilmez)	3
10'dan fazla eklemler (en az biri küçük eklemler olmalı)	5
Seroloji (0-3)	
Negatif RF ve Negatif ACPA	0
Düşük pozitif RF veya düşük pozitif ACPA	2
Yüksek pozitif RF veya yüksek pozitif ACPA	3
Semptom Süresi (0-1)	
<6 hafta	0
≥6 hafta	1
Akut Faz Reaktanları (0-1)	
Normal CRP ve normal ESH	0
Normalden sapan CRP veya ESH	1

Tedavi boyunca hastalığın seyrini takip etmek ve derecelendirmek için hastanın 28 farklı eklemdeki tutulum derecesi, eritrosit sedimentasyon hızı (erythrocyte sedimentation rate-ESH) ve C-reaktif protein (CRP) değerleri ile hesaplanan hastalık aktivite skoru (Disease Activity Score 28-DAS 28) puanlaması kullanılmaktadır (21,22). DAS 28 skoruna göre remisyon, düşük şiddetli, orta şiddetli ve çok şiddetli olacak şekilde hastalığın aktivitesi belirlenir (Tablo-2). Ayrıca, hastanın cevaplandığı bir anket üzerinden fonksiyonel durumu değerlendirmek için geliştirilmiş Sağlık Değerlendirme Anketi (Health Assessment Questionnaire-HAQ), RA'da hastanın yaşam kalitesini belirlemede kullanılmaktadır (23).

Tablo 2. DAS 28 Skoruna göre RA hastalığının evreleri

Hastalığın Aktivitesi	DAS 28 Skoru
Remisyon	≤ 2,6
Düşük Şiddetli Hastalık	> 2,6 - ≤ 3,2
Orta Şiddetli Hastalık	> 3,2 - ≤ 5,1
Çok Şiddetli Hastalık	> 5,1

2.1.2. Risk Faktörleri / Etiyoloji

RA, genetik temelleri olan ancak çevresel etkenlerle de tetiklenebilen multifaktöriyel bir hastalıktır. Yapılan ikiz çalışmaları, hastalık riskinin ortak genetik faktörlerden etkilendiğini göstermektedir (12,14). Hastalıkla ilişkilendirilen genler “Ortak Epitop (Shared Epitope)” adı verilen ve glutamin-lösin-arjinin-alanin-alanin (QKRAA) aminoasitlerinden oluşan bir bölge içerirler. En iyi bilinen risk geni, kromozom 6’da bulunan HLA (Human Leukocyte Antigen - İnsan Lökosit Antijeni) genleridir. Özellikle HLA-DRB1 (HLA-Class 2 Antigen D Related Beta Chain 1) allellerinin varlığı RA prevalansını artırır. Ortak epitop taşıyan birçok genin varlığıyla artan hastalık riski, seropozitif RA ile ilişkilendirilmiştir (12,16).

Sigara içmek, bilinen en önemli çevresel faktördür. Seropozitif RA riski, sigara kullanımı sıklığına bağlı olarak artar (24). Sigara kullanımını bıraktıktan yaklaşık 20 yıl sonra dahi RA riski, sigara kullanmayan kişilere göre yüksek seyreder (25,26). Sigara tüketimi ve HLA-DRB1 geni arasında gen-çevre etkileşimi vardır. HLA-DRB1 genine sahip olmak ve sigara içmek, sadece sigara içmek veya sadece gene sahip olmaktan çok daha fazla risklidir (26,27).

Enfeksiyöz ajanlar, RA’yı başlatan çevresel etkenler arasında yer almaktadır (16,28). Joo ve arkadaşları 2019 yılında yayınladıkları çalışmada 24,117 hastayı takip ederek viral solunum yolu enfeksiyonlarının RA oluşumunu tetiklediğini göstermiştir. İncelenen 8 virüs arasında parainfluenza virüsü, koronavirüs ve metapneumovirüs artan RA ile ilişkilendirilebilmiştir (29). Virüslerin otoimmün bir hastalığı başlatabilmesi için önerilen çeşitli mekanizmalardan en kabul göreni “Moleküler Taklit”tir ve bir virüs antijeninin, bir konakçı antijeni taklit ederek T hücrelerini aktive etmesi sonucu immün yanıt oluşturmaya ile açıklanmaktadır (16,29). Epstein ± Barr virüsünde ve Escherichia coli’de bulunan prokaryotik sekanslar ile ortak epitop arasındaki dizi homolojisi, moleküler taklitçiliğin RA başlangıcına katkıda bulunma olasılığını cazip kılmaktadır (28,30,31).

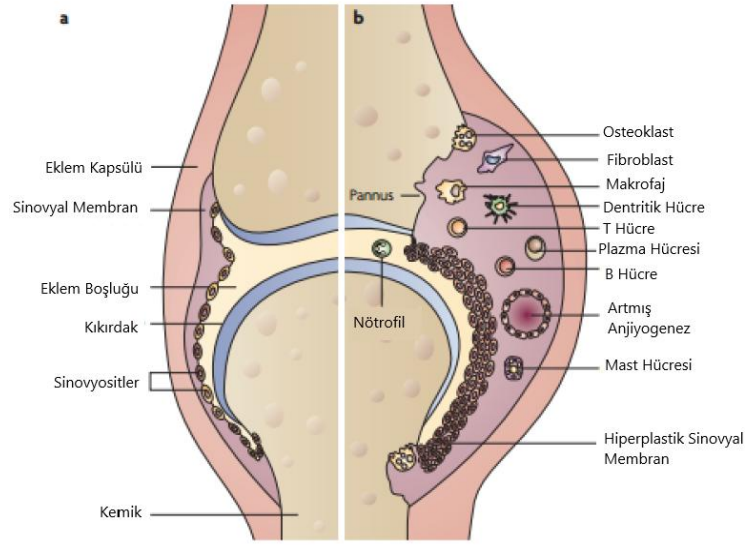
Popülasyonun %1’ini etkileyen RA, sıklıkla 40-50 yaşlarda görülür (28,32). RA’nın kadınlarda 2-3 kat daha sıklıkla görüldüğü bilinmektedir. Bu oran yaşlara göre incelendiğinde 40 yaşa kadar kadınlarda 3 kat sıklıkla, 55-65 yaş aralığında

kadınlarda 2 kat sıklıkla görülen RA, 65 yaş üstü kişilerde ise erkeklerde daha sık görülmektedir (32). RA'nın özellikle menopoz öncesi kadınlarda daha sık görülmesi, östrojen ve progesteronun immün yanıtı ve inflamasyonu düzenleyici etkileriyle açıklanmaktadır (32–34). Hamilelik sırasında birçok kadın remisyona girse de hamileliğin hastalık üzerindeki etkileri kesin olarak bilinmemektedir. Bazı araştırmalar hem erkek hem de kadın RA hastalarında androjen seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir, ancak bunun hastalığın bir nedeni mi yoksa bir etkisi mi olduğu tartışmalıdır (30,32,34).

2.1.3. Hastalığın Patogenezi

Multifaktöriyel olarak epigenetik düzenlemelerle kontrol edilen RA patogenezinin tüm ayrıntıları henüz aydınlatılamamıştır. Buna karşın RA, sinovyal inflamasyon, sinovyal membranın hiperplazisi, otoantikor oluşumu ve eklem tahribatı ile karakterize bir hastalıktır (16).

Sağlıklı koşullarda sinovyum, tek katmanlı ince bir membranla sarıdır. Sinovyal membranda Tip A: makrofaj benzeri sinoviositler ve Tip B: fibroblast benzeri sinoviositler (Fibroblast-like synoviocytes - FLS) olmak üzere iki tip hücre bulunmaktadır. Sinovyal membranın kalınlaşması, RA'yı diğer inflamatuvar artritlerden ayıran bir özelliktir (19). RA koşullarında sinovit adı verilen sinovyum iltihabı, lökositlerin sinovyuma göç etmesiyle başlar. Sinovyumda çok çeşitli hücre tipleri görünmektedir. Bu hücre tipleri başta T ve B hücreler, plazma hücreleri, makrofajlar olmak üzere daha az sayıda dentritik hücreler, mast hücreleri, natural killer hücreler ve çok daha az sıklıkla nötrofillerdir (16,19,35). RA'ya özgü olan yapılardan biri de “pannus” adı verilen dokudur. Sinovyal membrandan köken alan bu yapının kemik tahribatında rol aldığı düşünülmektedir (19,36). Sağlıklı bir eklem yapısıyla RA'lı eklem yapısı arasındaki farklılık Şekil-1'de şematize edilmiştir (37).



a) Sağlıklı eklem yapısı. b) Romatoid artritli eklem yapısı.

Şekil 1. Sağlıklı eklem yapısı ile RA'lı eklem yapısı arasındaki farklar (37)

B hücreler, dentritik hücreler ve makrofajlar anitjen sunan hücrelerdir (APC) ve RA durumunda anormal öz-antijenler (self-antijenler) sunarak T lenfositlerin otoreaktif hale gelmelerini sağlarlar. B hücreler aynı zamanda romaotid faktör olarak bilinen ve RA'nın tanısında ölçümü gerçekleştirilen otoantikorun üretiminden sorumludur (19,35).

Sinovyumdaki inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri romatoid sinovitin oluşumu ve idamesinde rol oynayan moleküllerdir. Tümör nekroz faktör (TNF- α), transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), Interlökin 1 (IL-1), IL-6, 12, 15, 18 ve 23 sinovitin bilinen aracılardandır (19,38). Özellikle TNF- α , birçok sitokinin immün hücrelerden salınımını uyarak pro-inflamatuvar bir etki gösterir. TNF- α , IL-6, 8 ve 10'un ekspresyonunu artırır ancak IL-1 ve GM-CSF'yi baskılar (19,35). IL-6'nın ise vücutta hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar etkileri vardır. Lokal olarak lökosit aktivasyonu ve otoantikor üretimini uyarırken sistemik olarak akut faz reaktanlarının üretimine, anemiye ve lipid metabolizmasının bozulmasına neden olur (16,19). RA hastalarında hem serum hem de sinovyum IL-6 seviyeleri yükselmektedir. IL-6 FLS'lerden üretilse de ana kaynaklarının makrofajlar olduğu düşünülmektedir.

2.1.4. Hastalığın Tedavisi

Ömür boyu takip gerektiren RA hastalığının kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Kronik seyreden hastalık bazı dönemlerde alevlenir, bazı dönemlerde ise belirti göstermeyerek remisyona girer. Güncel RA tedavilerinin birincil hedefi hastayı kalıcı olarak remisyona sokmak; remisyona ulaşamadığı durumlarda ise düşük hastalık seviyesine inmektedir (39). Tedavideki esas amaç kıkırdak ve kemik yapısındaki hasarın oluşmasını veya ilerlemesini engelleyerek fiziksel işlevin, yaşam kalitesinin ve çalışma kapasitesinin iyileştirilmesidir.

Tanı itibarıyla RA hastalarına verilen DMARD grubu ilaçlar; Metotreksat (Methotrexate), Sülfasalazin (Sulfasalazine), Leflunomid (Leflunomide) ve Hidroksiklorokin (Hydroxychloroquine)'dir (40,41). DMARD tedavisi hastanın başlangıç anındaki hastalık şiddetine göre başlangıçtan itibaren monoterapi ya da kombinasyon halinde olabileceği gibi; hastalık gidişatında yeterli kontrol sağlanamazsa tek DMARD tedavisine diğer DMARD'lar eklenerek kombinasyon tedavisi şeklinde de sürdürülebilir. RA'lı erişkin hastalarda; biri metotreksat olmak üzere en az üç farklı DMARD; en az üçer ay kullanmış olmasına rağmen DAS 28 skorunun 5,1'in üzerinde olduğu yani hastalık aktivitesinin kontrol altına alınamadığı durumlarda biyolojik ajan tedavisine başlanır (42). Biyolojik ajan tedavisinde kullanılan ilaçlar, etki mekanizmalarına göre beş ana gruba ayrılır; Tümör Nekroz Faktörü (TNF) inhibitörleri, interlökin-6 reseptör antagonistleri, B hücre baskılayıcıları, T hücre kostimülatör sinyal medyatörleri ve Janus Kinaz inhibitörleri (43,44).

Bunun yanı sıra tedavide sıklıkla kullanılan kortikostreoidler, kısa sürede yanıt almak için kullanılır. Hastaların semptomlarını hızlıca hafifleten bu ilaçlar ciddi yan etkilere sebep olabildiği için uzun süre kullanılması tavsiye edilmez ve genelde üç-dört aylık kullanımları söz konusudur. Ayrıca her ne kadar semptomları hafifletseler de hastalığa bağlı eklem hasarını önlemede herhangi bir etkileri yoktur (18).

2.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Hayatımızın vazgeçilmez bir unsuru olan oksijen molekülü, hücre içi metabolik süreçlerde suya indirgenir (45). Bu indirgenme sürecinin ara basamaklarında oluşan

bazı moleküller yörüngelerinde eşlenmemiş elektron bulunduran serbest radikallerdir (1,2). Serbest radikaller, yapılarında bulunan eşlenmemiş elektronlardan dolayı kararsız yapıdadırlar ve çok reaktiflerdir. Eşlenmemiş elektronlarını eşleyerek kararlı hale gelmek isteyen serbest radikaller, hücre yapısındaki birçok makromoleküle zarar verir (46–48).

Oksijenden köken alan serbest radikaller; reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılır (46,47). Reaktif oksijen türlerinin çoğu; normal, rutin aerobik metabolizma sırasında oluşur ve bu sebeple sağlıklı hücrelerde de ROT görülmektedir. Elektron taşıma zincirinde meydana gelen elektron sızıntıları, ROT oluşumuna sebep olur (49). ROT oluşumunun en önemli kaynaklarından biri bağışıklık sisteminde görevli fagositik hücrelerin çok hızlı oksijen tüketmesidir. Bunun yanı sıra iyonize radyasyon, kullanılan ilaçlar, uygulanan diyet gibi çevresel faktörler de serbest radikal oluşumunu arttırabilmektedir (47,48).

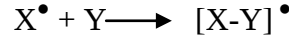
Oksijenden köken alan ve çok reaktif olmasına rağmen radikal olmayan bazı türler de mevcuttur (Tablo-3) (50). Bu moleküller, yapılarında eşleşmemiş elektron bulundurmazlar. Bu sebeple “serbest oksijen radikalleri” yerine “reaktif oksijen türleri” terimi, literatürde daha yaygın kullanılmaktadır (46).

Tablo 3. Serbest radikal olan ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri

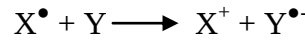
ROT - Serbest Radikaller	ROT - Radikal Olmayan Türler
• Süperoksit, $O_2^{\bullet -}$	• Hidrojen peroksit, H_2O_2
• Hidroksil, $^{\bullet}OH$	• Hipokloröz asit, $HOCl$
• Peroksil, $^{\bullet}RO_2$	• Organik peroksit, $ROOH$
• Alkoksil, $^{\bullet}RO$	• Hipobromöz asit, $HOBr$
• Hidroperoksit, $^{\bullet}HO_2$	• Peroksomonokarbonat, $HOOCO_2^{\bullet -}$

Biyomoleküllerin birçoğu radikal değildir. Bir serbest radikal, radikal olmayan başka bir moleküle reaksiyona girdiğinde yeni bir radikal oluşur ve bir zincirleme reaksiyon başlayabilir (50,51). Bir serbest radikal; radikal olmayan başka bir biyomoleküle dört farklı yolla saldırabilir (50):

- 1) Serbest radikal, diğer moleküle eklenebilir. Oluşan yeni bileşikte eşlenmemiş elektron mutlaka bulunur. En iyi örneği; OH radikalının, DNA'daki guanin halkasında 8. pozisyona katılarak ürettiği ilk üründür.



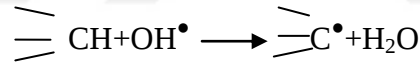
- 2) Radikal, radikal olmayan moleküle elektron vererek indirgen gibi davranabilir. Sonuçta alıcı eşlenmemiş bir elektron kazanmış olur.



- 3) Radikal bir yükseltgen olarak davranır ve radikal olmayandan bir elektron alabilir. Elektron kaybeden radikal olmayan molekülün eşlenmemiş bir elektronu kalır ve böylelikle radikal özelliği kazanır.



- 4) Radikal, radikal olmayan moleküldeki C-H veya N-H bağlarından hidrojen atomunu koparabilir. Hidrojen atomu tek elektronlu olduğu için C veya N atomunda bir elektron boşta kalır.



Vücutta serbest radikal oluşumunun ve dolayısıyla reaktif türler kaynaklı oksidatif hasarın kontrol altında tutulması için geliştirilen savunma mekanizmaları vardır. Bu savunma mekanizmaları antioksidan savunma sistemleri adını alır (50,52). Normal koşullarda reaktif türler ve antioksidan savunma sistemi arasında, mükemmel olmasa da, bir denge vardır. Reaktif türlerin artışına karşılık antioksidanların yetersiz kalması; oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine kayması durumu “oksidatif stres” olarak adlandırılır (47,50,52). Oksidatif stres durumunda kontrol edilemeyen reaktif oksijen türleri, kararlı hale gelebilmek için DNA, lipid ve protein gibi hücre bileşenlerine verdikleri zarara “oksidatif hasar” denmektedir. Oksidatif hasar uzun vadede hücre membranı yapısında ve işleyişinde ciddi bozulmalara sebep olarak birçok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır. Özellikle DNA ve lipid hasar ürünlerinin başlıca kaynağı reaktif oksijen türlerinin saldırısıdır (53). Organizmada sıklıkla rastlanan DNA ve lipid hasar ürünleri, vücut

sıvılarında tespit edilebilir ve kümülatif oksidatif hasarın belirlenmesinde kullanılabilir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, oksidatif hasarı incelemek adına, oksidatif DNA nükleozit hasarının başlıca göstergeleri olan 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden 8-iso-PGF_{2α} düzeylerini inceledik.

2.2.1. Oksidatif DNA Hasarı

Canlıların kalıtım materyali olan DNA, hücrel metabolizma sırasında veya çevresel etkiler sebebiyle sürekli olarak hasara maruz kalmaktadır. Reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan hasar, “oksidatif DNA hasarı” adını alır ve DNA hasarının en önemli kaynaklarından biridir. DNA hasarı DNA’daki çift veya tek zincir kırıkları, bazlarda meydana gelen çeşitli modifikasyonlar, abazik bölgeler, zincirler arası veya DNA-protein çapraz bağları gibi birçok farklı şekilde meydana gelebilir (54,55). Kümülatif oksidatif stresin duyarlı bir göstergesi olan oksidatif DNA hasarı mutajenite, genomik kararsızlık, karsinojenite ve yaşlanma ile ilişkili olması nedeniyle kritik bir role sahiptir (56).

Başta yüksek reaktivitesiyle bilinen hidroksil radikali olmak üzere, reaktif oksijen türleri DNA’nın çeşitli bileşenleriyle reaksiyona girerek yapılarındaki çift bağlara katılırlar veya DNA yapısındaki C-H bağlarından bir H atomunun çıkartılmasına sebep olurlar. Hidrofilik doğası gereği hidroksil radikali, tercihen, yüksek elektron yoğunluğuna sahip olan pürin ve pirimidinlerin yapısındaki çift bağlara eklenir (3).

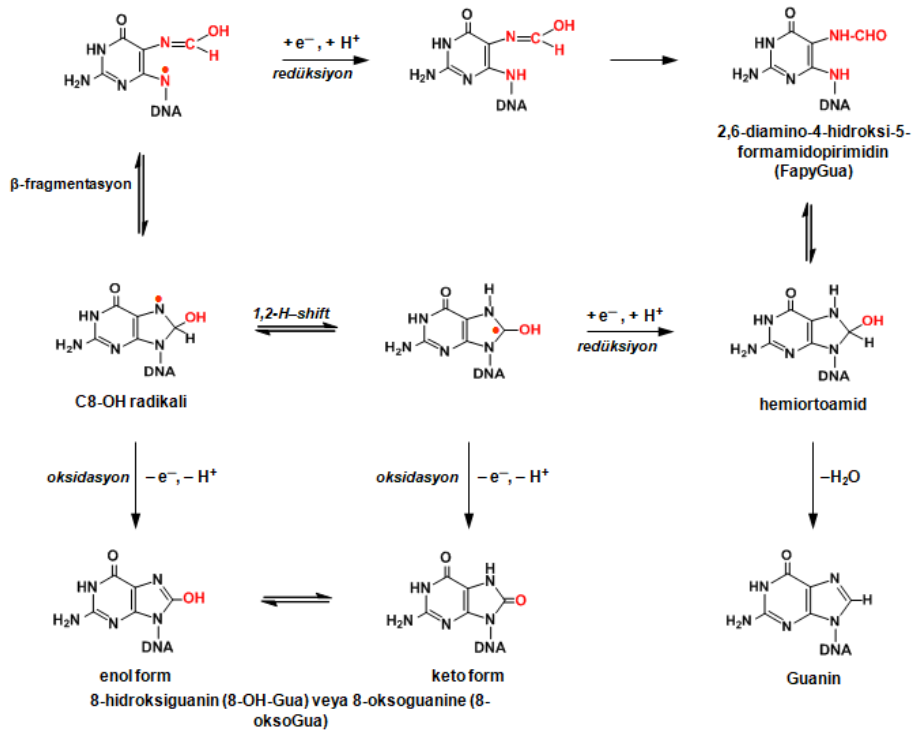
DNA hasarı sonucu ortaya çıkan ürünlerden 8-OH-dG, S-cdA, R-cdA DNA nükleozit hasarının başlıca belirteçleridir (57). İdrarda kolayca tespit edilebilmeleri, kimyasal stabiliteleri ve özgün yapıları göz önünde bulundurularak birçok hastalıkta biyobelirteç olarak kullanıma uygun oldukları düşünülmektedir.

Aerobik organizmalar, endojen ve ekzojen faktörlerin etkisiyle serbest radikal ataklarına sürekli maruz kalmaktadırlar. Organizma için ölümcül sonuçlara yol açabilecek hasar ürünleri, DNA onarım enzimleri tarafından kesilerek periferik dolaşıma geçer ve idrarla uzaklaştırılır (3,49). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge sebebiyle hasarlı ürünler, çok düşük seviyelerde de olsa sağlıklı bireylerde de tespit edilebilmektedir.

ROT; hücre membranındaki lipitler, hücre içi proteinler veya DNA gibi makromolekülleri oksidatif hasara uğratarak birçok hastalık ile ilişkilendirilen hasarlı ürünlerin oluşumuna yol açmaktadır. RA patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte hastalığın mekanizmasında oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (1,10,11,58). RA patogenezinde oksidatif stres ve buna bağlı hasarın önemi göz önünde bulundurulduğunda uygulanan tedavi stratejilerinin bu hasarı indirgeme yetkinlikleri önem arz etmektedir.

8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-dG)

•OH radikali, guanin yapısına 4, 5 ve 8. karbonlardan katılır. Bu katılma reaksiyonu sonucunda ara ürün olarak guanin radikalleri oluşur. Oluşan guanin radikalleri, oksitlenerek veya redüksiyona uğrayarak hasar ürünlerini oluşturur (3). C8'de oluşan guanin radikalinin tek elektron oksidasyonu sonucunda 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OH-Gua) oluşur. İmidazol halkasının açılıp tek elektron ile redükte olması sonucu ise 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) oluşumu ile sonuçlanır (Şekil-2)(3,59).



Şekil 2. 8-OH-Gua ve FapyGua oluşum mekanizması (57)

8-oksoguanin (8-okso-Gua), 8-OH-Gua'nın keto tautomeridir ve aynı molekül için iki isimlendirme de kullanılmaktadır (55,56). 8-hidroksi deoksiguanozin ise 8-OH-Gua'nın nükleozid formudur ve 8-OH-dG şeklinde gösterilmektedir. Aynı şekilde 8-okso-dG de literatürde sıklıkla kullanılmaktadır (55).

Bütün modifiye bazlar içinde tamir mekanizması en iyi anlaşılan 8-OH-Gua'dır. 8-OH-Gua'nın hücrede yol açacağı zararları engellemek için bu lezyonu DNA'dan uzaklaştıracak spesifik bir mekanizma gelişmiştir. Bu mekanizmanın ilk basamağında insan Mut T homolog'u (hMTH1), 8-OH-dGTP'yi hidrolize ederek hasarlı lezyonu nükleotid havuzundan yok eder. İkinci savunma hattı olarak baz ekzisyon onarımı (base excision repair-BER) devreye girerek DNA'da yanlış eşleşmiş 8-OH-Gua'yı keserek uzaklaştırır (54). Nükleustan ve mitokondriyal DNA'dan uzaklaştırılan 8-OH-Gua bazı, idrar ile vücuttan atılır (54,59).

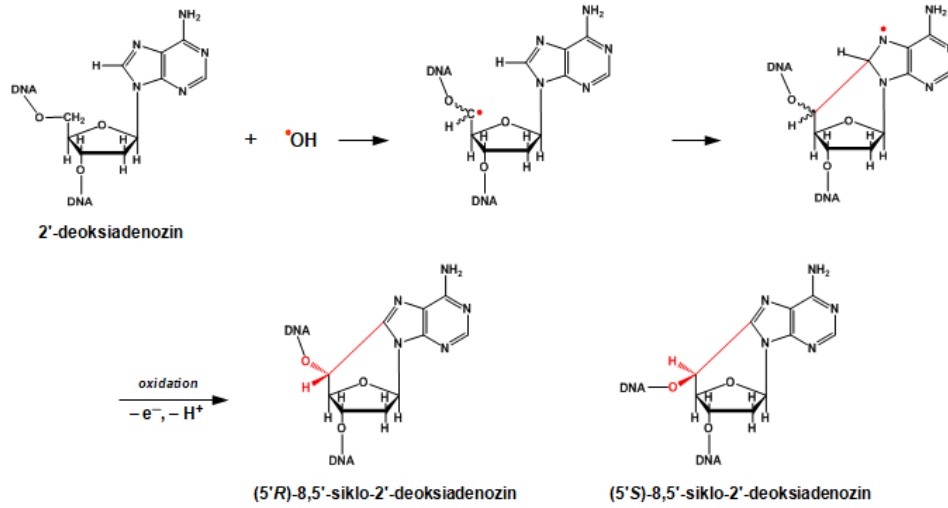
DNA zincirinden baz kesip çıkarma onarım mekanizması ile kesilip direkt olarak idrarla atılması, non-invaziv olarak elde edilen idrarda kolayca tayin edilebilmesi, stabil yapısı ve mutajenik özelliklere sahip olması 8-OH-dG'nin çalışmalarda en çok ölçülen oksidatif biyobelirteci olmasına neden olmuştur (60,61).

8-OH-dG'nin literatürde karşılaşılan bazı diğer adlandırılmaları:

7,8-Dihidro-8-okso-2'-deoksiguanozin; 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin; 8-OH-dG; 8-hidroksi deoksiguanozin; 8-Okso-2'-deoksiguanozin; 8-Okso-dG; 8-Okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; 8-Okso-7,8-dihydro deoksiguanozin.

8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler (R-cdA ve S-cdA)

●OH radikalinin, DNA'nın baz veya şeker yapısında ayrı ayrı hasara sebep olması dışında, oksijen yokluğunda şeker ve baz yapılarına aynı anda etki ettiği eşsiz bir reaksiyonu da söz konusudur. ●OH radikalinin, DNA'da bulunan adeninin şeker molekülündeki 5. karbondan bir H atomunu koparmasını takiben, 5. karbon ile pürin halkasının 8. karbonu arasında halkasal yağıya sahip bir ara ürün oluşur. Oluşan ara ürünün oksidasyonu ile R- ve S-diastomerleri olan 8,5'-siklopürin-2'-deoksiadenozin (R-cdA ve S-cdA) oluşur (Şekil-3)(62,63).



Şekil 3. *R*- ve *S*-cdA'nın oluşum mekanizması (62)

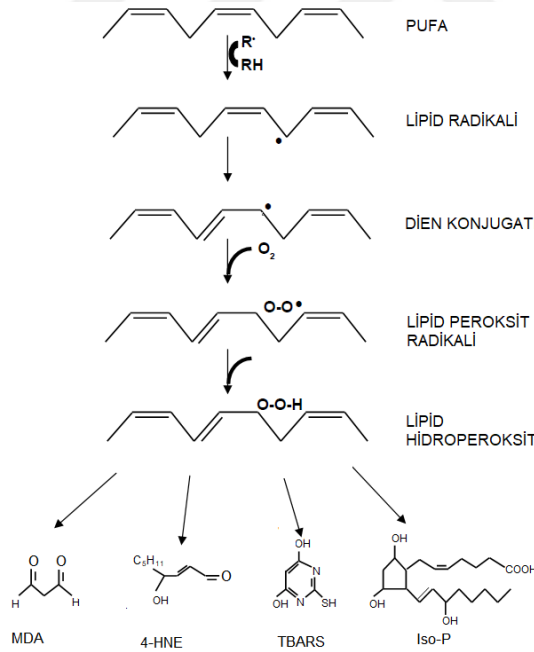
8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidler, yalnızca nükleotid çıkarma onarımı (NER) ile DNA'dan uzaklaştırılarak idrar ile vücuttan atılırlar (63,64). *R*-cdA ve *S*-cdA'nın doğru ve tekrarlanabilir ölçümü için izotop işaretli sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi yöntemi önerilmektedir (63,65). Oldukça stabil yapıları, idrarda non-invaziv olarak belirlenebilmesi ve en önemlisi idrardaki kaynağının bilinmesi sebebiyle *R*-cdA ve *S*-cdA son yıllarda oksidatif stresin güvenilir belirteçleri arasında yerini almıştır (3,66).

2.2.2. Lipit Peroksidasyonu

Oksidatif stresle paralel olarak üretimi artan serbest radikallerin stabilize olabilmek adına saldırdıkları en önemli biyomoleküllerden biri lipitlerdir. Bu sebeple lipit peroksidasyonu, oksidatif stresin belirgin bir göstergesi kabul edilir ve birçok hastalığın patogeneğinde lipit peroksidasyon ürünlerinin aşırı üretimi göze çarpar (5). Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller veya radikal olmayan oksidanların, karbon-karbon çift bağı içeren lipitlere, özellikle de çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFA'lara) saldırarak bir hidrojen koparması ve ardından bu yapıya bir oksijen eklenmesiyle lipit peroksil radikallerinin ve hidroperoksitlerinin oluşma süreci olarak tanımlanır (67). Lipit peroksidasyonu, hücre membranı yapısındaki lipitlerde gerçekleşebildiğinden, membranın biyolojik özelliklerinde değişime neden olabilir. Membran yapısının, bütünlüğünün, akışkanlığının ve geçirgenliğinin değişmesi gibi

etkiler sonucunda membran bağı reseptörlerin veya enzimlerin etkinliklerinde değişime neden olarak normal hücre fonksiyonu bozabilmektedir (5,68).

Serbest radikal katalizli lipit peroksidasyonu, bir serbest radikal etkisiyle membran yapısında bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve daha kararlı bir yapıya sahip olmak için bir dizi değişikliğe uğrar (Şekil-4). Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin göreceli olarak daha kararlı olan aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sonlanır. Lipit peroksidasyon ürünlerinin başlıcaları olan malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve tiyobarbitürik asit reaktif bileşikleri (TBARS) uzun yıllardır lipit peroksidasyonunun önemli biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadır. Bu aldehitlerin bazılarının protein, DNA ve fosfolipitlerle kolayca reaksiyona girerek birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (68).



Şekil 4. Serbest radikal katalizli lipit peroksidasyonu mekanizması (69)

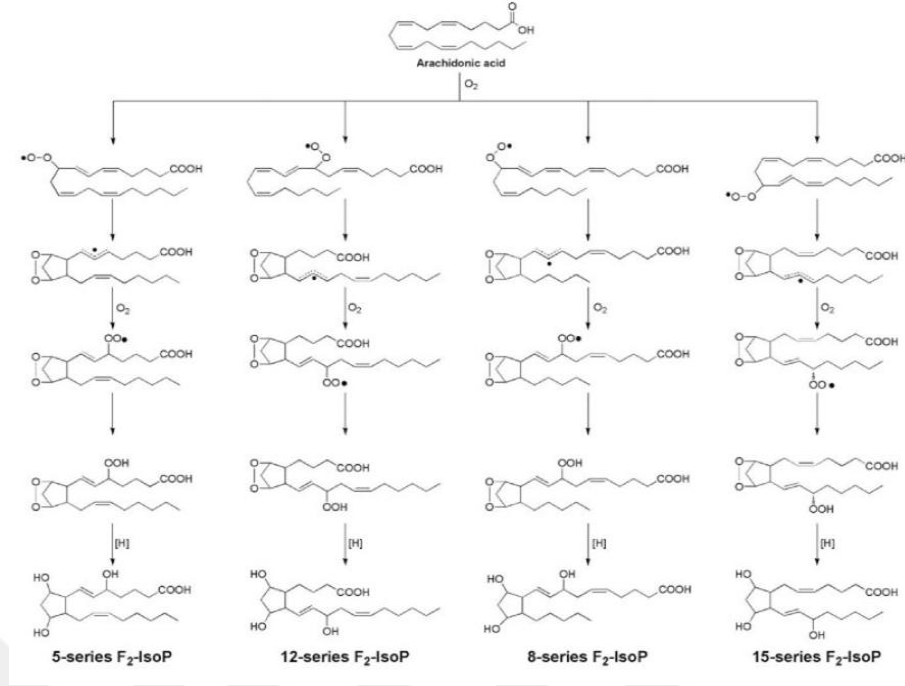
8-izoprostan (8-izo-PGF₂α)

Günümüzde MDA, lipit peroksidasyonunun geçerli bir biyobelirtecidir ve ölçümü spektrofotometrik, spektrofotometrik veya kromatografik yöntemlerle yapılabilmektedir. MDA'nın kararsız yapıya sahip olması ve diğer moleküllerle

çapraz reaksiyonları nedeniyle daha stabil ve özgün lipid peroksidasyonu biyobelirteçlerine ihtiyaç duyulmuştur. Son yıllarda izoprostanlar stabil kimyasal yapıları ve diyetle alınan lipid miktarından etkilenmemeleri nedeniyle lipid peroksidasyonunun güvenilir biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadır.

Daha karmaşık yapıda olan ve genelde ikincil oksidasyon ürünleri olarak adlandırılan lipid peroksidasyon ürünleri; özellikle araşidonik asidin ve diğer PUFA'ların serbest radikal katalizli peroksidasyonundan üretilir. İkincil oksidasyon ürünleri, izoprostanlar (izoP'lar) olarak adlandırılan bir dizi prostaglandin (PG) benzeri ürün içerir (5). F tipi prostan halkası içeren izoprostanlar ise F2-izoprostanlar (F2-izoP) olarak adlandırılırlar ve teorik olarak; esterlenmiş araşidonik asidin serbest radikal katalizli peroksidasyonu sonucu üretilen PGF2 α benzeri 64 bileşikten biridir. F2-izoprostanlar, serbest izoprostanlar olarak idrarla atılmadan önce fosfolipazlar tarafından kesilir ve dolaşıma salınırlar (68). Bu bileşikler karakteristik ve stabil bir yapıyla endojen olarak oluşur ve doku, plazma ve idrarda bulunarak kantitatif tayin için kullanılabilirler. İzoprostanlar insanlarda in vivo olarak lipid peroksidasyonun güvenilir belirteçleri olarak ortaya çıkmıştır. Çalışmalarda 8-izoprostaglandin F2 α (8-izo-PGF2 α , 8-izoprostan, 15-F2t-IsoP, iPF2 α III) ve ana idrar metabolitleri biyobelirteç olarak incelenmektedir (70). Vücutta en fazla bulunan 8-izo-PGF2 α , National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) tarafından gerçekleştirilen Oksidatif Stres Biyobelirteçleri Çalışması'nda (BOSS), kararlı yapısıyla endojen lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde 'altın standart' olarak tanımlanmıştır (6).

Lipid peroksidasyonun başlama aşaması olan bir hidrojen atomunun ayrılmasının ve araşidonik aside bir oksijen molekülünün eklenmesinin ardından; peroksil radikali, 5-ekso siklizasyona uğrar ve ikinci bir oksijen molekülü, prostoglandin benzeri ürünü oluşturmak üzere bileşiğin omurgasına eklenir. Oluşan kararsız ara ürün daha sonra F2-izoP'lara indirgenir. Bu oluşum mekanizmasına dayanarak, toplam 64 bileşik için her biri 8 rasemik diastereomerden oluşan dört F2-izoP regioizomeri üretilir (Şekil-5). Dört regioisomer sınıfı, yan zincir hidroksil grubunun bağlandığı karboksil karbonu 1 numara olacak şekilde adlandırılır (5,71).



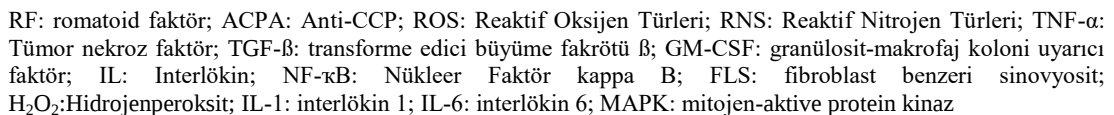
Şekil 5. Araşidonik asidin serbest radikallerle peroksidasyona uğraması sonucu oluşan F2-izoprostanlar (5)

F2-izoP'lar esterlenmiş araşidonattan oluştuktan hemen sonra, plazmaya salınmadan önce hidrolize edilir veya dokularda β -oksidasyona uğrar (72). Fosfolipaz etkisiyle fosfolipit zincirden ayrılan F2-izoP'lar, serbest yağ asitleri olarak dolaşıma salınabilirler. Plazmada hem serbest hem de esterifiye olarak dolaşan F2-IsoP'lar, böbrekte filtrelendir ve idrarda sadece serbest olarak görünür. Ayrıca idrarda tayin edilen izoprostanların büyük çoğunluğu araşidonik asidin serbest radikal katalizli peroksidasyonu sonucu oluşmuştur (5,68). Akut ve kronik inflamasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı, diyabet ve ateroskleroz durumlarında izoprostanların ve β -oksidasyon ürünlerinin oluşumunda artış olduğu hem klinik hem de deneysel hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir (72).

2.3. Oksidatif Stresin Romatoid Artrit ile İlişkisi

Oksidatif makromolekül hasarı ve buna bağlı oluşan son ürünler, birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Patolojik durumlarda ROT üretimi arttığı gibi antioksidan kapasitenin de azaldığı bilinmektedir (10,36,73). Son yıllarda oksidatif stres üzerine yapılan araştırmalar hız kazansa da hastalıklarla serbest radikaller arasındaki ilişkinin mekanizması net olarak ortaya konamamıştır. Oksidatif

Oksidatif stres, RA'daki inflamasyonun başlaması ve devamlılığının sağlanmasında kritik rol oynamaktadır (36,74). Sinovyumda artan makrofajlar, T hücreler ve nötrofiller TNF- α , IL-1 ve IL-6 aracılı ROT üretimini uyarırlar. Artan pro-inflamatuvar sitokinler ise ROT üretimini uyarak hem oksidatif hasarın oluşumuna hem de inflamasyonun devamlılığına sebep olurlar. Dolayısıyla inflamasyon ve oksidatif stres arasında birbirlerini tetikleyen bir pozitif feed-back ilişkisi mevcuttur (Şekil-6) (36,74).



20

Oksidatif stresin hastalık şiddeti ile ilişkisini incelemek için DAS 28 skoru ile korelasyonu sorgulanmaktadır. Ancak farklı dokularda, farklı belirteçlerle ve farklı yöntemlerle çalışılan oksidatif stres parametreleri ile hastalık şiddeti ilişkisini inceleyen çalışmalarda tartışılmalı sonuçlar elde edilmiştir.

Datta ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada, RA hastalarının sinovyal sıvılarında ROT üretiminin, MDA seviyesinin ve protein karbonilasyonunun arttığını göstermiş ve ROT üretiminde meydana gelen artışın DAS 28 skoruyla korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca aynı dokularda IL-6, IL-8 ve TNF- α seviyelerinin de arttığını göstermişlerdir (11).

Rho ve arkadaşları 2010 yılında 169 hastada idrar 8-izo-PGF2 α seviyelerinin RA hastalarında arttığını göstermiş fakat hastalık ile korelasyon bulamamışken; Kwasny-Krochin ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada 46 hastada plazma 8-izo-PGF2 α seviyelerinin DAS 28 skoru ile korelasyonu olduğunu göstermiştir (75,76).

RA'da oksidatif makromolekül hasarının stabil ve spesifik olmayan moleküllerle incelendiği ve sağlıklı kontrollere göre hastalarda kanda, serumda, idrarda ve sinovyumda artmış oksidatif hasar düzeylerini gösteren bir çok çalışma mevcuttur. Buna karşın rutin tedavilerin oksidatif strese etkilerini prospektif olarak inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan tez çalışmasında makromolekül hasarının uygulanan rutin tedavi sonrası değişimi incelendi. Ayrıca RA hastalarında hastalığa bağlı oksidatif makromolekül hasarının durumu sağlıklı kişilerle karşılaştırılarak değerlendirildi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan araştırma; prospektif bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırma, 2018/22-48 karar numarası ile 13 Eylül 2018 tarihli Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul onayını (EK-1) takiben başlatılmıştır. Eylül 2018 – Mayıs 2021 tarihleri arasında gerçekleşen çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi İmmünoloji ve Romatoloji Polikliniği ile iş birliği içerisinde sürdürülmüştür.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hastanesi, İmmünoloji ve Romatoloji Polikliniği'ne başvuran, yeni RA tanısı alarak DMARD tedavisine henüz başlamamış 69 hasta ve DMARD ile tedavi görmekte olan ve hastalık aktivite skorundaki yüksekliğe göre biyolojik ajan tedavisine başlaması uygun görülen 8 hasta dahil edilmiştir.

Yeni tanı almış RA hastalarında bazal oksidatif hasar düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla 31'i sağlıklı gönüllü dahil olmak üzere toplamda 108 kişi dahil edilmiştir. Kontrol grubu, 23.11.2017 tarih ve 3644-GOA protokol numaralı 2017/27-42 karar numarası ile onayı alınan "Sistemik Skleroz Hastalarında Vitamin D Düzeyi ve Moleküler Yolağının, Oksidatif DNA Hasarı ve Klinik Bulguları ile İlişkisi" başlıklı çalışma kapsamında DEÜTF Hastanesi Romatoloji Polikliniği'ne başvuran, otoimmün/kronik herhangi bir hastalığı olmayan ve Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nda alınan örneklerin başka çalışmalarda kullanılmasına onay veren sağlıklı bireylerden alınan ve DEÜTF Tıbbi Biyokimya laboratuvarında -80 °C'de saklanan, çalışma sonrası arta kalan idrar örneklerinden oluşmuştur. Sağlıklı bireylerden yeniden örnek alınmamıştır. Gruplar arasında hastalık aktivite skoru, inflamasyon parametreleri, lipit peroksidasyonu ve oksidatif DNA hasarı farkını 0.05

yanılma düzeyinde %80 güç ile belirlemek için G Power Data Analysis yazılımı üzerinden yapılan hesaplamada, her bir grubun 28 bireyden oluşmasının yeterli olduğu hesaplanmıştır.

Dahil Olma Kriterleri

-Yeni RA tanısı almış olmak

-ACR/EULAR 2010 kriterlerine göre RA tanısı almış olup DMARD ile birinci aşama tedavi sonucunda hastalık aktivite skoru yüksek seyrediyor olmak (Biyolojik ajanla tedavi grubu için)

-18 yaş üstü olmak

Dışlama Kriterleri

-RA dışında herhangi bir otoimmün veya inflamatuvar bozukluğa sahip olmak

-Sigara kullanıyor olmak

-RA dışında herhangi bir romatizmal hastalığa sahip olmak (Ankilozan spondilit, sistemik lupus eritematozus, fibromiyalji gibi)

-Aktif enfeksiyonu bulunmak (diş absesi, pnömoni, deri enfeksiyonu gibi) veya son enfeksiyonun üzerinden en az bir ay geçmemiş olması

-Kronik karaciğer parankim hastalığı veya siroz tanısı

-Hemoglobin düzeyinin <10 g/dL olması

-DMARD tedavisi ve biyolojik ajan tedavisine geçilmeden önce hastaların >10 mg/gün prednizolon ya da eşdeğeri alması

-Herhangi malignite olması ve/veya malignite sebebiyle kemoterapi alıyor olmak

-Kronik böbrek yetmezliği olması veya serum kreatinin düzeyinin >1,3 mg/dL olması

-Hemodiyaliz hastası olmak veya renal transplantasyon geçmişi bulunması

3.4. Çalışma Materyali

DEÜ İmmünoloji ve Romatoloji Polikliniği'ne başvuran/takip edilen hastalara, çalışmada gönüllü olmaları durumunda hasta onam formu (EK-2) imzalatılmıştır. Hasarlı DNA nükleozitleri ve izoprostan ölçümü için hastalardan, tedavilerine başlamadan önce (sıfıncı ay) ve tedavilerinin altıncı ayında sabah ilk idrar örnekleri toplanmıştır. Sağlıklı kontrol grubu için daha önce alınarak -80 °C'de muhafaza edilen örneklerin 1,5 mL'si kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız Değişkenler

-Yaş

-Hastanın DMARD tedavisine başlamadan ölçülen 8-izoprostan, 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA düzeyleri

-Hastanın biyolojik ajan kullanmaya başlamadan önce ölçülen 8-izoprostan, 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA düzeyleri

Bağımlı Değişkenler

-DMARD tedavisinin altıncı ayında ölçülen idrar 8-izoprostan, 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA düzeyleri

-Hastanın biyolojik ajan tedavisinin altıncı ayında ölçülen idrar 8-izoprostan, 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA düzeyleri

-Hastaların hastalık aktivite skorları (DAS 28 ve HAQ)

-Hastaların akut faz reaktanları seviyeleri (CRP ve ESH)

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihaz, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo-4'te; kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler Tablo-5'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka	Mevcut Olduğu Yer	Kullanım Amacı
MS/MS (Tandem kütle spektrometre)	AB Sciex 4000 QTRAP	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin ölçülmesi
HPLC	Shimadzu 20AD	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin ölçülmesi
SpeedVac konsantratrör sistemi	Thermo	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin örnek hazırlık aşaması
Salınımlı santrifüj	Nüve	DEÜTF Biyokimya AD.	Örnek hazırlık aşaması
Santrifüj	Hettich	DEÜTF Biyokimya AD.	Örnek hazırlık aşaması
Otomatik pipet	Eppendorf	DEÜTF Biyokimya AD.	Genel kullanım
Ekstraksiyon manifoldu	Waters	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin örnek hazırlık aşaması
Hassas terazi	Precisa, XB 22A	DEÜTF Biyokimya AD.	Stok çözeltilerinin, tamponların ve diğer kimyasal malzemelerin tartılması
pH metre	Selecta pH 2005	DEÜTF Biyokimya AD.	Tampon çözeltilerin pH ayarlaması
Isıtmalı karıştırıcı	Labnet Vortemp 56	DEÜTF Biyokimya AD.	Tampon çözeltilerin pH ayarlaması
Distile su cihazı	Millipore (Elix3 +Milliq)	DEÜTF Biyokimya AD.	Genel kullanım
Soğutmalı santrifüj	Heraeus, Biofuge Stratos	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitleri ve izoprostanın örnek hazırlık aşaması
Derin dondurucu (-80 °C)	Thermo Scientific	DEÜTF Biyokimya AD.	Örneklerin saklanması
Derin dondurucu (-20 °C)	Beko	DEÜTF Biyokimya AD.	Örneklerin ve kimyasal maddelerin saklanması
Buzdolabı (+4 °C)	Beko	DEÜTF Biyokimya AD.	Kimyasal maddelerin, viallerin saklanması
Vorteks	Labortechnic	DEÜTF Biyokimya AD.	Örnek hazırlık aşaması

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler

Kimyasal / Malzeme Adı	Marka	Mevcut Olduğu Yer	Kullanım Amacı
Filtreli santrifüj tüpü	NANOSEP 3K OMEGA	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin örnek hazırlık aşaması
Asetonitril	Merck	DEÜTF Biyokimya AD.	LC-MS/MS
Formik asit	Merck	DEÜTF Biyokimya AD.	LC-MS/MS
Tris HCL	Sigma	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin örnek hazırlık aşaması
Alkalen fosfataz	Roche	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin örnek hazırlık aşaması
HPLC Amber vial	Shimadzu	DEÜTF Biyokimya AD.	LC-MS/MS
C18 HPLC kolonu	Agilent	DEÜTF Biyokimya AD.	LC-MS/MS
Katı faz ekstraksiyon kartuşu	Waters	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin örnek hazırlık aşaması
8-OH-dG standardı	NIST	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin kantitatif analizleri
8-OH-dG internal standardı	NIST	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin kantitatif analizleri
S-cdA standardı	NIST	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin kantitatif analizleri
R-cdA ve S-cdA internal standartları	NIST	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozitlerinin kantitatif analizleri
ELISA Kiti	Cayman Chemicals	DEÜTF Biyokimya AD.	İzoprostanın ölçülmesi

3.6.2. İdrarda Hasarlı DNA Nükleozitlerinin LC-MS/MS Yöntemi ile Kantitasyonu

Çalışmamızda olgu ve kontrol grubundan alınan idrar örneklerinde hasarlı DNA nükleozitlerinin düzeyleri LC-MS/MS SID-MRM yöntemi ile belirlendi.

Hasarlı DNA nükleozitlerinin analizleri sıvı kromatografi (HPLC) sistemine bağlı (Shimadzu, Japonya) triple quadrupole ion trap tandem kütle spektrometresinde (AB Sciex, ABD) çoklu reaksiyon izleme (Multiple Reaction Monitoring - MRM) modunda, turbo V iyon sprey kaynağı ile gerçekleştirildi. Veri analizi için Analyst Software Version 1.5 kullanıldı.

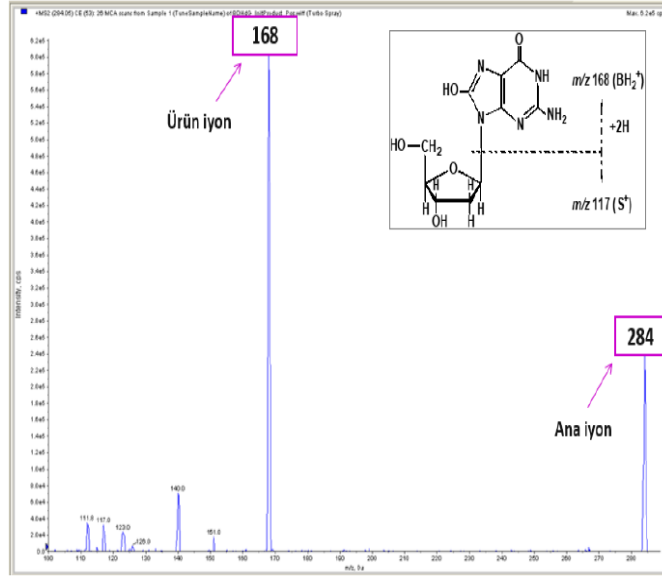
Örnekler, reversed faz C18 kolonu (Zorbax SB Aq 2.1x150 mm, 3,5 µm) ve guard kolonu (Agilent Eclipse XDB C8 2,1x12,5 mm, 5 µm) ile 0,3 mL/dk akış hızında kromatografik olarak ayrımlandı. Mobil faz olarak %0,1 formik asit içeren dH₂O (A) ve asetonitril (B) kullanılarak gradient analiz gerçekleştirildi.

Triple quadrupole ion trap tandem kütle spektrometresi sistemi, iki kütle analizörünün art arda geldiği hibrit bir kütle analizörüdür. MRM, karışık örneklerde istenilen analitin seçilerek analiz edilmesine olanak sağlar. Bu modda birinci quadropol (Q1) önceden belirlenen m/z (kütle/yük oranı) değerindeki ana iyonları filtreler, seçilen ana iyonlar Q2'ye iletilerek collision gaz adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile (inert N₂ gazı) parçalanır ve ürün iyonlar oluşur. Oluşan iyonlar Q3'e gönderilerek belirlenen m/z değerlerine göre ayrımlanır. Daha sonra seçilen ana iyon/ürün iyon ikilisi (transition) detektöre ulaştığında m/z değerine karşı iyonların sinyal yoğunluğu (intensite) kütle spektrumu olarak kaydedilir.

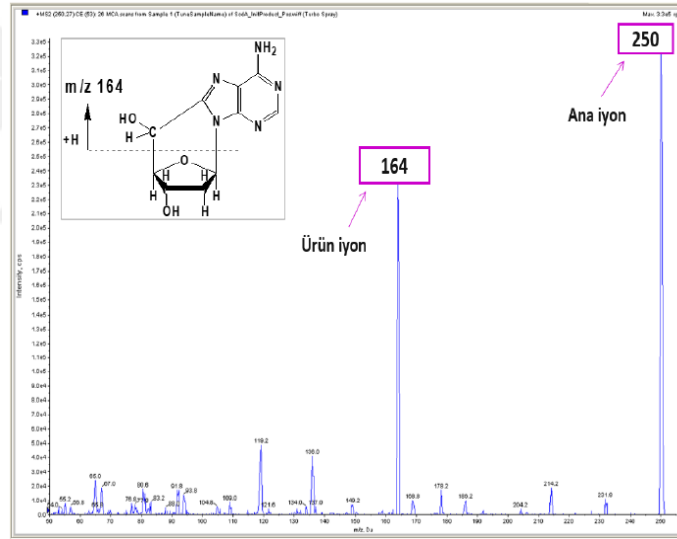
Çalışmada ölçümü gerçekleştirilen DNA nükleozit hasar ürünlerinin ve bu ürünlerin iç standartlarının iyon çiftlerinin m/z (kütle/yük) oranları Tablo-6'da verilmiştir. Oksidatif DNA hasar ürünlerinin ana iyon ve ürün iyon parçalanmaları Şekil-7 ve 8'de gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada ölçümü gerçekleştirilen DNA nükleozit hasar ürünleri ve iç standartların m/z oranları

Ölçüm Yapılan Molekül	Ana iyon → Ürün İyon m/z Oranları	Alıkonma Zamanları
8-OH-dG	284 → 168	5.21
8-OH-dG ¹⁵N	289 → 173	5.21
R-cdA	250 → 164	3.65
R-cdA ¹⁵N	255 → 169	3.65
S-cdA	250 → 164	4.62
S-cdA ¹⁵N	255 → 169	4.62



Şekil 7. 8-OH-dG'nin iyon fragmentasyonları



Şekil 8. R-cdA ve S-cdA'nın iyon fragmentasyonları.

Çalışma sonuçlarının güvenilirliğini arttırmak adına, tüm analizlerden önce örnekler ağır izotop işaretli iç standartlar (İnternal Standart - IS) eklendi. Stabil izotop işaretli IS'lerin kimyasal özellikleri, kromatografik ayrılmaları, iyonizasyon etkinlikleri ve fragment iyon dağılımları açısından hedef analit ile aynıdır. IS'lerin analitlerden tek farkı ¹²C yerine ¹³C'ün, ¹⁴N yerine ¹⁵N'in veya ¹H atomu yerine ²H atomunun geçmesi nedeniyle daha yüksek moleküler kütleye sahip olmalarıdır. Çalışmamızda ağır izotop işareti olarak ¹⁵N atomu kullanıldı.

Hasarlı DNA nükleozit ürünlerinin düzeyleri, idrar kreatinin değerleriyle oranlanarak hesaplanmıştır.

Hasarlı DNA Nükleozidlerinin Ekstraksiyon Basamakları (4)

- DNA nükleozitlerinin analizinde gönüllülerin sabah ilk idrarı kullanıldı. Analizlere başlamadan önce ~400 µL idrar örneği ile kreatinin ölçümü yapıldı.
- Üç nükleozit hasar ürününün stabil izotoplar ile işaretlenmiş internal standartları (IS) (8-OH-dG¹⁵N₅, R-cdA¹⁵N₅ ve S-cdA¹⁵N₅) ile IS karışımı hazırlandı.
- Ekstraksiyon için 1,3 mL idrar örneğine 46,8 µL olacak şekilde IS karışımı eklendi ve 1000 g'de 15 dk oda sıcaklığında santrifüjlendi.
- Süpernatantlar 0,22 µm gözenek çapı olan şırınga filtreleriyle filtrelendi.
- Katı faz ekstraksiyon kartuşları (60 mg) 1 mL metanol ile aktive edildi, 15 dk kuruması beklendi ve 2 mL dH₂O ile yıkandı.
- IS eklenmiş 1 mL idrar örneği katı faz ekstraksiyon kartuşlarına yüklendi ve kartuş 2 mL dH₂O ile yıkandı.
- Örnekler 1 mL %30 metanol ile ekstrakte edildi ve SpeedVac ile gece boyu kurutuldu.
- Kuruyan örnekler, 10 mM Tris ve 1 M sodyum asetat içeren 100 µL digestion buffer'da çözüldü.
- Her bir örnekte 22 U olacak şekilde, örneklere alkalen fosfatase eklendi.
- 37 °C'de 1 saat inkübasyonun ardından örnekler 14000 g'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant 3K santrifüj filtrelerine aktarıldı ve 5000 g'de 50 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant HPLC viallerine aktarıldı ve LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi.

3.6.3. İdrarda 8-izoprostanın ELISA Yöntemi ile Analizi

Hasta ve sağlıklı kontrol grubu idrar örneklerinde 8-izoprostan düzeyinin ölçümü ELISA yöntemi ile analiz edildi.

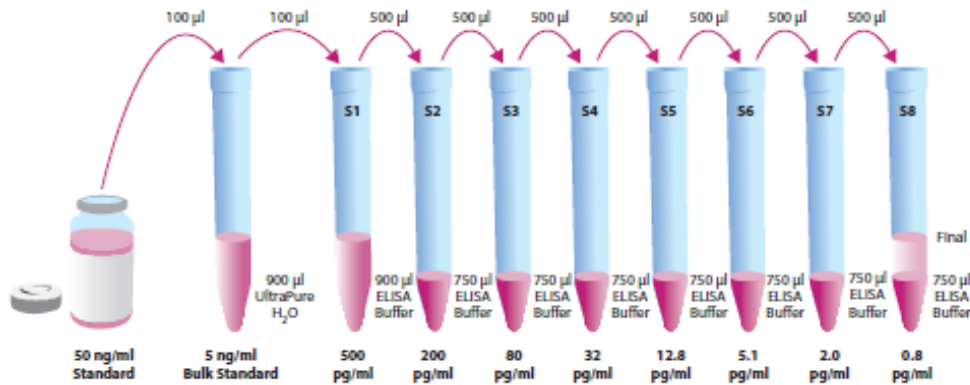
Analizler için ölçüm aralığı 0,8-500 pg/mL olan ve 3 pg/mL hassasiyete sahip Cayman 8-isoprostane ELISA Kit (Cayman Chemical, ABD, Item No. 516351) tercih edildi.

Kullanılan ELISA kitinin ölçüm yöntemi, yarışmalı enzim immunoassay tekniğine dayalıdır. Bu teknikte kuyucuklar 8-izoprostan'a karşı geliştirilmiş antikorlarla kaplanmışır. Kuyucuklara ekstrakte edilen idrar örnekleri/standartlar (işaretsiz antijen içerir) ve konjugat (enzim işaretli antijen içerir) pipetlenir. Örnekler ve konjugat antikor kaplı yüzeye bağlanmak için yarışır. Bağlanmamış materyallerin yıkama ile uzaklaştırılmasından sonra konjugata spesifik substrat eklenerek renk değişimi gözlenir. Belirli dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak analiz gerçekleştirilir. Renk yoğunluğu örnekteki analit konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Örnekteki 8-izoprostan miktarı bilinen standartlardan elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanır.

Analizler üreticinin önerdiği protokol ile gerçekleştirildi (77). Buna göre idrar örneklerine çalışmaya kadar -80 °C'de bekletilirken oluşabilecek herhangi bir yalancı lipid peroksidasyonunu önlemek adına ELISA kiti protokolünde belirtilen oranda (%0,005 olacak şekilde; her 1mL örneğe 10 µL) bütıl hidroksi tolüen eklendi ve çalışma zamanına kadar bu şekilde -80 °C'de saklandı.

Kit içeriğindeki kimyasalların hazırlanması:

1. Standart dilüsyonları kit protokolüne uygun şekilde 8 farklı konsantrasyonda gerçekleştirildi (Şekil-9).



Şekil 9. 8-izoprostan standartlarının hazırlanması. Seri dilüsyon oranları.

2. Bir tüp ELISA Buffer Concentrate (10X) 90 mL su ile çözüldü.
3. 5 mL Wash Buffer Concentrate (400X) 2 L su ile çözüldü. 1 mL Polysorbate 20 eklendi.
4. Liyofilize haldeki 8-izoprostan AChE Tracer, 6 mL ELISA buffer ile çözüldü.
5. Liyofilize haldeki 8-izoprostan ELISA Antiserum, 6 mL ELISA buffer ile çözüldü.
6. Ellman's reagent kullanımdan hemen önce 20 mL su ile çözüldü.

Analizin gerçekleştirilmesi

1. NSB kuyucuklarına 100 µL ELISA Buffer eklendi.
2. B0 kuyucuklarına 50 µL ELISA Buffer eklendi.
3. Standartlar kuyucuklarına 50 µL standart dilüsyonları eklenir.
4. Örnek kuyucuklarına 50 µL örnek eklendi.
5. TA ve Blk dışındaki tüm kuyucuklara 50 µL AChE tracer eklendi.
6. TA, Blk ve NSB kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µL ELISA Antiserum eklendi.
7. Plate plastik filmle kapatıldı ve 18 saat boyunca +4 °C 'de inkübe edildi.
8. Kuyucukları boşaltılır ve 5 kere Wash Buffer'la yıkandı.
9. Her kuyucuğa 200 µL Ellman's reagent eklendi.
10. Ta kuyucuğuna 5 µL tracer eklendi.
11. Plate'i plastik filmle kapatılarak karanlık ortamda orbital shaker'da, 90-120 dk oda sıcaklığında bırakıldı.
12. Plate'in altı, parmak izleri ve tozları temizlemek için temiz bir bezle silindi.
13. Ellman's reagent'ı dökmemeye özen göstererek plate'in üzerindeki plastik film açıldı.
14. 412 nm arasında asorbans okutuldu.

Ayrıca idrar örneklerinde ölçüm öncesinde metot performansını değerlendirmek amacıyla gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları da gerçekleştirildi. Gün içi % CV değeri, kit içeriğinde gelen standardın seri dilüsyonu ile elde edilen 500 pg/mL ve 2 pg/mL konsantrasyonlarının aynı gün içerisinde 5 kez çalışılması ile elde edilen sonuçlar üzerinden hesaplandı. Günler arası % CV değeri

kit içeriğinde gelen standardın seri dilüsyonu ile elde edilen 500 pg/mL ve 5,2 pg/mL konsantrasyonlarının 3 farklı günde birer kez çalışılması ile elde edilen sonuçlar üzerinden hesaplandı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Haziran-Eylül 2018	Etik kurul onayı
Nisan-Temmuz 2019	Tez önerisi hazırlanması
	Tez önerisi sunumu ve kabulü
Haziran 2018-Eylül 2020	Örnek toplama süreci
Eylül-Kasım 2020	LC-MS/MS ön çalışması
	ELISA ön çalışması
Ocak 2021	Projenin kabul edilmesi
Ocak-Mayıs 2021	LC-MS/MS ile örneklerin analiz edilmesi
	ELISA ile örneklerin analiz Edilmesi
Nisan-Haziran 2021	İstatistiksel analizler
	Tez yazım aşaması

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

3.8.1. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 24.0 (SPSS Inc., ABD) programı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümlerden elde edilen değerler medyan ve en düşük-en yüksek değer (min-maks) olarak olarak sunuldu. Çalışma gruplarının normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk normallik testi ile test edildi. Sınırlı örneklem büyüklüğüne ve sürekli değişkenlerin normal olmamasına dayanarak, bağımsız gruplara ait veri setleri ikili gruplar Mann-whitney U testi, üçlü gruplar ise Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi ile; bağımlı gruplar ise Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Kategorik verileri incelemek için Ki-Kare testi kullanıldı. Normal dağılıma uyan bağımsız veri setlerinin ortalamalarını karşılaştırmak için t Testi uygulandı. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Normal dağılım göstermeyen değişkenler arasındaki korelasyonları analiz etmek için Spearman korelasyon katsayıları kullanıldı. Korelasyonun gücü (r), 0,3'ten küçük ise

korelasyon yok; 0,3-0,5 arasında ise zayıf; 0,5-0,7 arasında ise orta ve 0,7-1,0 arasında ise güçlü olarak değerlendirildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamız dahilinde rutin DMARD tedavisi sonrası biyolojik ajan kullanması uygun görülen hastaların da hem biyolojik ajan kullanmaya başladıklarında hem de biyolojik ajanla tedavilerinin altıncı ayında ayrı bir grup olarak çalışmaya dahil edilmesi amaçlanmıştır. Ancak örnek toplama süresi boyunca yalnızca sekiz biyolojik ajan hastasına ulaşıldı ve bu hastaların sadece dördünün altıncı ay kontrolü tamamlandı. Ulaşılan hasta sayısı hedeflenenin altında olduğu için bu hastalar tez çalışması dışında bırakıldı. Buna rağmen toplanan örneklerle ait bulguların istatistiksel analizleri gerçekleştirildi ancak anlamlı bir sonuç elde edilmedi ($p>0,05$).

Tanı alarak ilaç tedavisine başlayan RA hastalarının bir kısmı, Covid-19 küresel salgını sebebiyle altıncı ay kontrolüne gelememi.

RA hastalığı her yaşta görülebilse de ilerleyen yaşlarda görülme sıklığı artmaktadır. Hasta grubumuzun yaş ortalaması yüksek olduğundan sağlıklı kontrol grubunun da buna uygun olarak yüksek yaş aralığında oluşturulması hedeflenmişti. Ancak yaşla birlikte artan komorbiditeler ve uzun süreli sigara kullanımının yaygın oluşu sebebiyle sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması, hasta grubuna göre düşük bulundu.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 13.09.2018 tarih ve 2018/22-48 karar numarası ile etik kurul onayı alındı (EK-1).

4. BULGULAR

4.1. Tanımlayıcı Bulgular

Çalışmamıza RA tanısını yeni alan 69 hasta ve 31 sağlıklı gönüllü katıldı. Yeni tanı alarak DMARD tedavisine başlanan 69 hastanın 48'i altıncı ay kontrolüne geldi. Kontrol grubu ve hasta grubu arasında cinsiyet açısından anlamlı bir fark bulunmazken; gruplar yaşları açısından değerlendirildiğinde RA grubunun yaş ortalaması kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Tablo-7).

Tablo 7. Grupların yaş ve cinsiyet verileri

	Kontrol Grubu (n=31) Medyan (Min-Maks)	RA Grubu (n=69) Medyan (Min-Maks)	p değeri
Yaş	42 (26-50)	49 (22-79)	< 0,001*
Cinsiyet	8E / 23K	15E / 54K	0,798**

K: Kadın sayısı E: erkek sayısı. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. *t testi ile değerlendirilmiştir. ** Chi Square testi ile değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil olan 69 hastanın başlangıç tedavilerine göre %79,7'si (n=55) metotreksat veya metotreksat ile birlikte kortikosteroid kullanmaktadır. %4,3'ü (n=3) leflunomid ile birlikte kortikosteroid; %2,9'u (n=2) hidroksiklorokin ile birlikte kortikostreoid kullanmaktadır. Hastaların %8,6'sı (n=6) ikili DMARD tedavisi veya iki DMARD ile birlikte kortikosteroid almaktadır (Tablo-8).

Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen 69 hastanın ilaç kullanımları

	Kişi Sayısı (n)	%
Sulfasalazin + Hidroksiklorokin	1	1,4
Hidroksiklorokin + Kortikosteroid	2	2,9
Leflunomid + Kortikosteroid	3	4,3
Metotreksat + Hidroksiklorokin + Kortikosteroid	5	7,2
Metotreksat	9	13,0
Metotreksat + Kortikosteroid	46	66,7
Bilgi Yok	3	4,3
Toplam	69	100

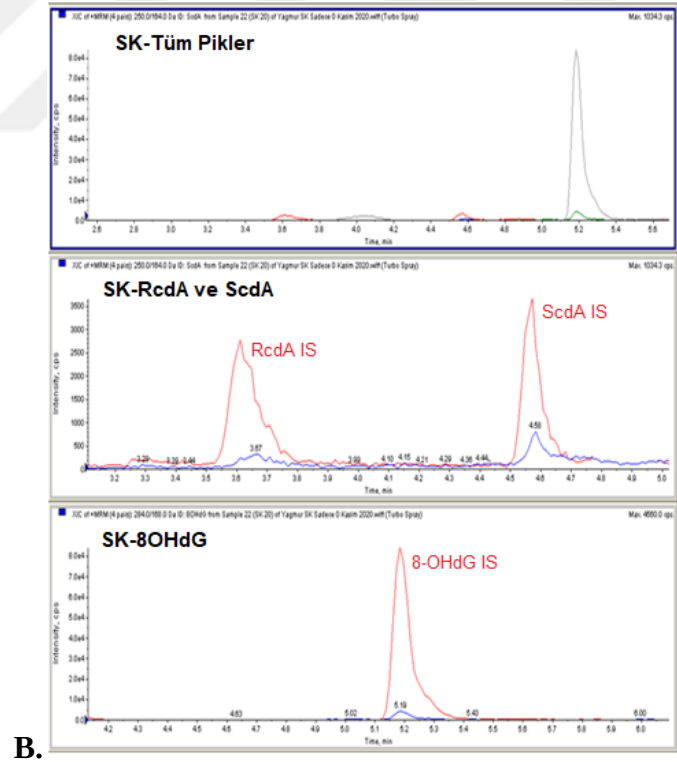
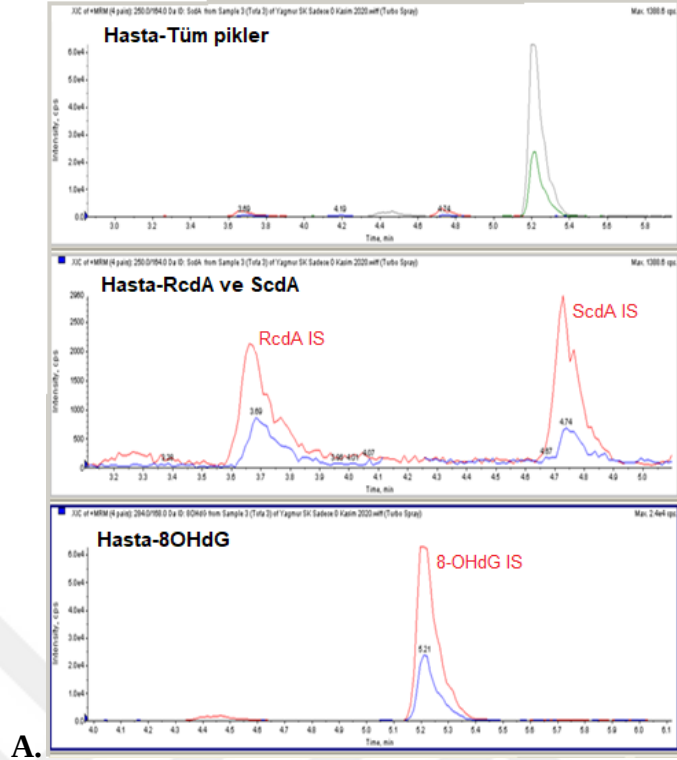
Ayrıca 69 RA hastası çalışmaya katıldıkları dönemde ve tedavilerinin altıncı ayında ölçülen DAS 28 skorlarına göre gruplandırıldı (Tablo 9). Buna göre çalışmaya dahil edildiğinde hastalığın alevli döneminde olan ($DAS >2.6$) 37 hastanın 18'i remisyona girerken; 10'u alevli dönemde kalmıştır. Dokuz hastanın ise altıncı ay kontrolüne gelmediği için DAS 28 skoru bilgilerine ulaşamadı. Çalışmaya dahil edildiğinde remisyon döneminde olan ($DAS \leq 2.6$) 29 hastanın ise 19'u remisyonda devam ederken; biri tedavisine rağmen alevli döneme girmiş olup, 9 hastanın ise altıncı ay kontrolüne gelmediği için DAS 28 skoru bilgilerine ulaşamadı. Çalışmaya dahil edilen 69 hastanın üçünün ise 0. ay DAS 28 skor bilgisi kaydı bulunamadı.

Tablo 9. Çalışmaya dahil edilen hastaların DAS 28 skorlarına göre gruplandırılması

0. Ay DAS 28 Skoru'na Göre Hasta Grupları	6. Ay DAS 28 Skoruna Göre Hasta Grupları		
	DAS ≤ 2.6 (Remisyon) (n)	DAS >2.6 (Alevli) (n)	6. Ay kontrole gelmeyen hastalar (n)
DAS 28 ≤ 2.6 (Remisyon) (n=29) (Grup A)	19 (Grup A1)	1 (Grup A2)	9
DAS 28 > 2.6 (Alevli) (n=37) (Grup B)	18 (Grup B1)	10 (Grup B2)	9

4.2. DNA Hasarı Bulguları

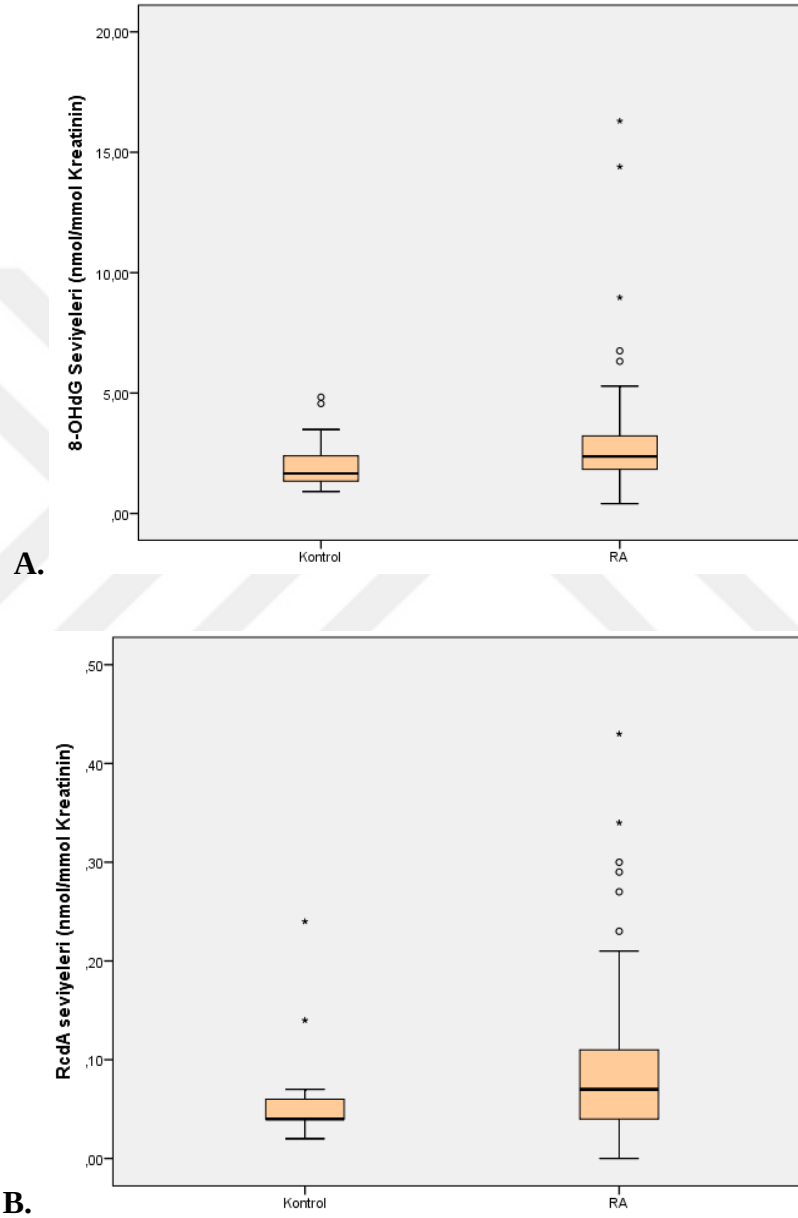
LC-MS/MS ile yapılan analiz sonucunda sağlıklı kontrollerde ve RA hastalarında tespit edilen DNA nükleozit hasar parametrelerinin kromatogram örnekleri Şekil-10'da verilmiştir.



A. RA grubuna ait örnek; **B.** Kontrol Grubuna ait örnek. **RA:** Romatoid artrit; **SK:** Sağlıklı kontrol.

Şekil 10. RA hasta grubunda ve sağlıklı kontrol grubunda elde edilen kromatogram örnekleri

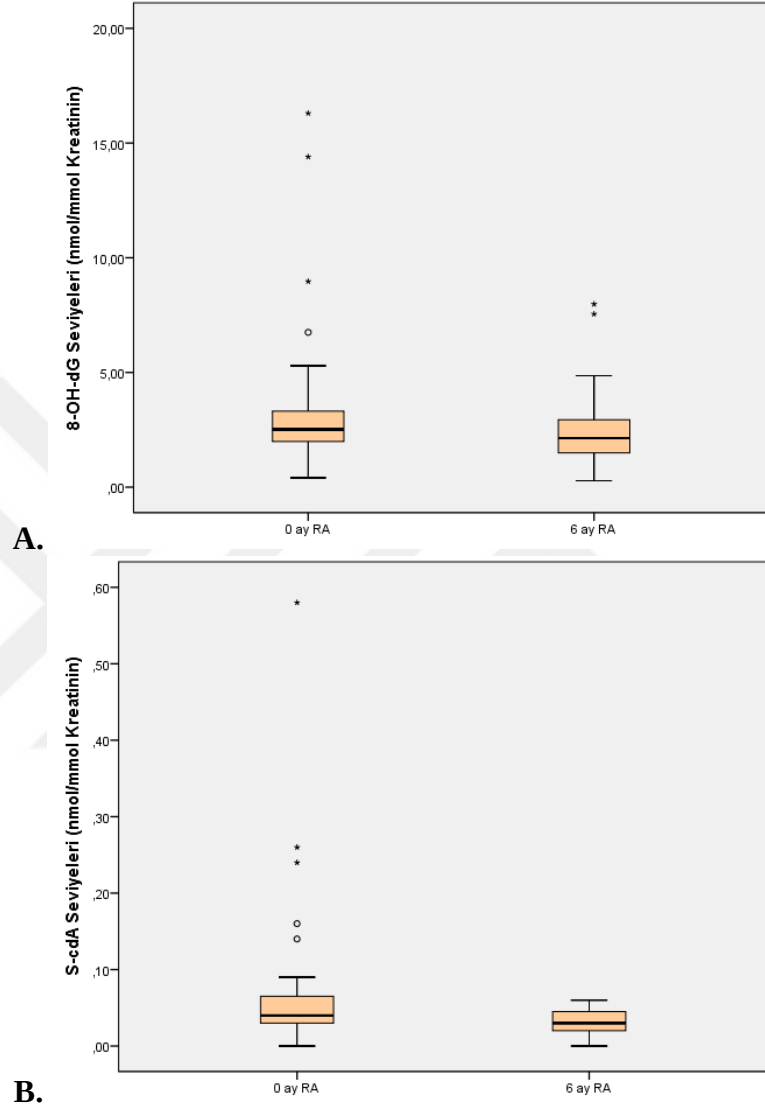
Çalışmaya dahil edilen tüm RA hastalarının (n=69) sıfıncı ay oksidatif DNA hasarı düzeyleri sağlıklı kontrol grubu (n=31) ile karşılaştırıldı. Buna göre, hasar parametrelerinden 8-OH-dG ve R-cdA seviyeleri yeni tanı alan RA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Bunun yanı sıra S-cdA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo-10 ve Şekil-11).

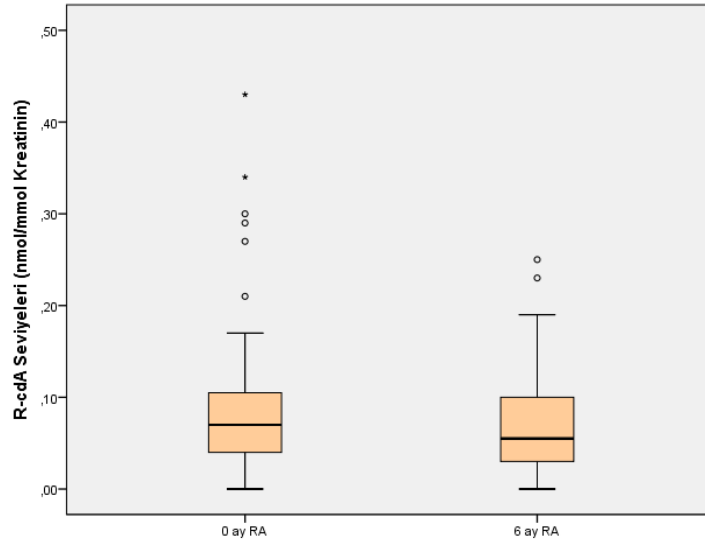


A. Hasta ve kontrol gruplarının idrar 8-OH-dG seviyeleri; B. Hasta ve kontrol gruplarının idrar R-cdA seviyeleri

Şekil 11. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında idrar 8-OH-dG ve R-cdA seviyelerinin karşılaştırılması

Altıncı ay kontrollerini tamamlayan 48 hastanın ise nükleozit hasar seviyeleri incelendiğinde 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA seviyelerinin tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düştüğü görüldü (Tablo-11 ve Şekil-12).





C.

A. Hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası idrar 8-OH-dG seviyeleri; B. Hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası idrar S-cdA seviyeleri; C. Hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası idrar R-cdA seviyeleri

Şekil 12. Altıncı ay kontrollerini tamamlayan hastaların tedavi öncesi ve sonrası DNA hasar seviyelerinin karşılaştırılması

Bununla birlikte başlangıç DAS 28 skoruna göre (0. Ay) gruplandırılan hastalar (Grup A ve B) arasında DNA hasar parametreleri karşılaştırıldığında, 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo-12).

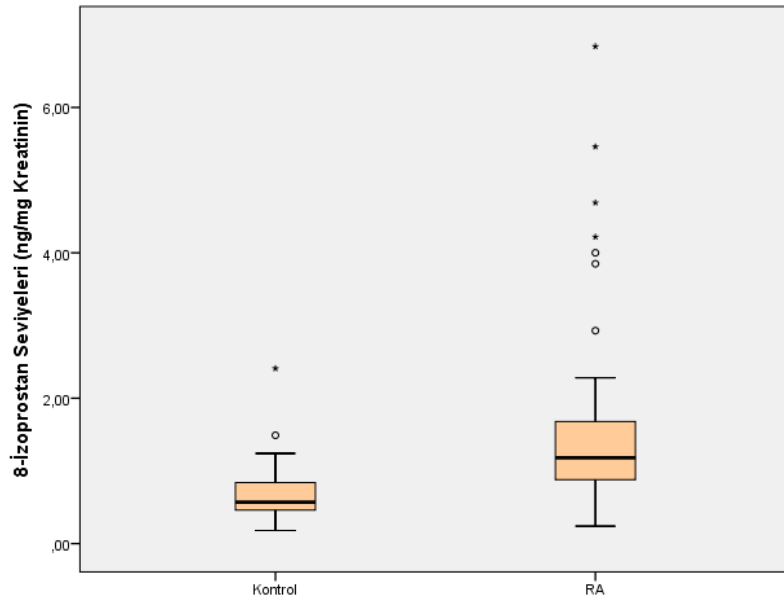
Altıncı ay kontrolüne gelen hastalardan (n=48) DAS 28 skoruna göre remisyonda başlayıp altıncı ayda remisyonda devam eden hastaların (Grup A1) DNA hasar düzeylerinde altı aylık tedavi sonucunda anlamlı bir fark görülmedi. Alevli başlayıp tedavi sonucunda remisyona giren (Grup B1) ve tanı aldıklarında alevli dönemde olup tedavi sonrasında alevli kalan (Grup B2) hasta gruplarında ise tedavi sonrası 8-OH-dG ve S-cdA seviyeleri, tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük bulundu (Tablo-13).

Altıncı ay kontrollerini tamamlayarak tedavi öncesi ve sonrası hastalık aktivite durumlarına göre gruplandırılan hastalar arasında (Grup A1, B1 ve B2) tedavi sonrası ölçülen oksidatif DNA hasarı düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo-14).

4.3. Lipit Peroksidasyonu Bulguları

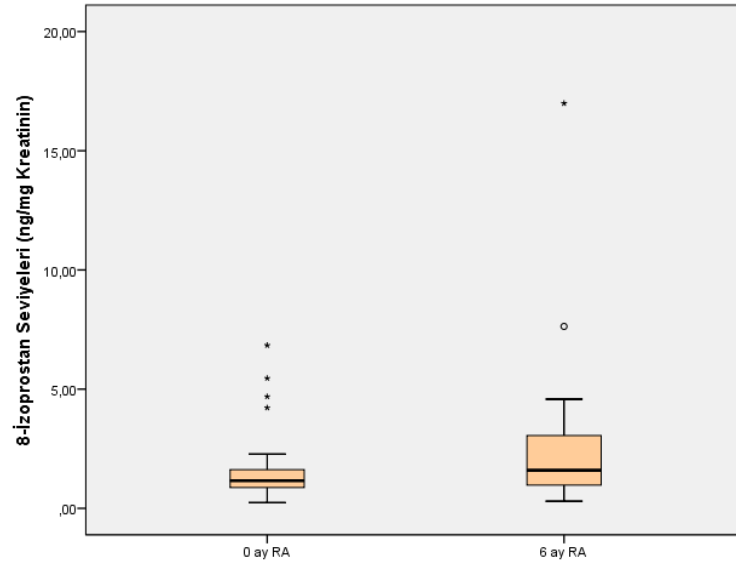
8-izoprostan ölçümü için kullanılan ELISA kiti için verifikasyon çalışması yapıldı. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları için kit içeriğinde bulunan standardın seri dilüsyonu ile hazırlanan 500 pg/mL konsantrasyonunun aynı gün içerisinde 5 kez çalışılması ile %CV değeri %13,62 olarak; 2 pg/mL'nin 5 kez çalışılması ile gün içi %CV değeri %8,75 olarak hesaplanmıştır. Günler arası tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için ise 500 pg/mL konsantrasyon 3 farklı günde bir kez çalışılarak %CV değeri %3,20 olarak; 5,2 pg/mL konsantrasyon 3 farklı günde bir kez çalışılarak %CV değeri %12,14 olarak hesaplanmıştır.

ELISA ile gerçekleştirilen analizler sonucunda 8-izoprostan seviyelerinin RA hastalarında, sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü (Tablo-10 ve Şekil-13).



Şekil 13. Sağlıklı kontrol grubu ve RA grubunun 8-izoprostan seviyelerinin karşılaştırılması

Altıncı ay kontrollerini tamamlayan hasta grubunun tedavi öncesi ve tedavi sonrası 8-izoprostan düzeyleri incelendiğinde 8-izoprostan seviyesinin tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği bulundu (Tablo-11 ve Şekil-14).



Şekil 14. Altıncı ay kontrollerini tamamlayan hastaların 8-izoprostan seviyelerinin karşılaştırılması

Başlangıç DAS 28 skoruna göre remisyonda olan hastalar (Grup A) ve hastalığın alevli döneminde olan hastaların (Grup B) 8-izoprostan düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo-12).

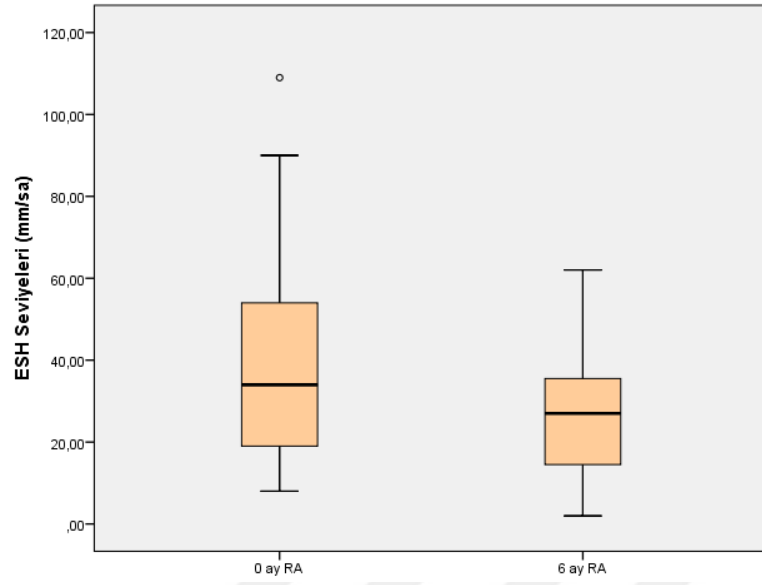
Tanı alındığında ve tedavi sonrası DAS 28 skorları değişimine göre gruplandırılan hastalar (Grup A1, B1 ve B2) incelendiğinde A1 grubundaki hastaların 8-izoprostan düzeylerinde altı aylık tedavi sonucunda anlamlı bir fark bulunmadı. B1 ve B2 gruplarındaki hastalarda ise tedavi sonrası ölçülen 8-izoprostan seviyeleri, tedavi öncesine göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. (Tablo-13).

Altıncı ay kontrollerini tamamlayarak tedavi öncesi ve sonrası hastalık aktivite durumlarına göre gruplandırılan hastalar arasında (Grup A1, B1 ve B2) 8-izoprostan seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo-14).

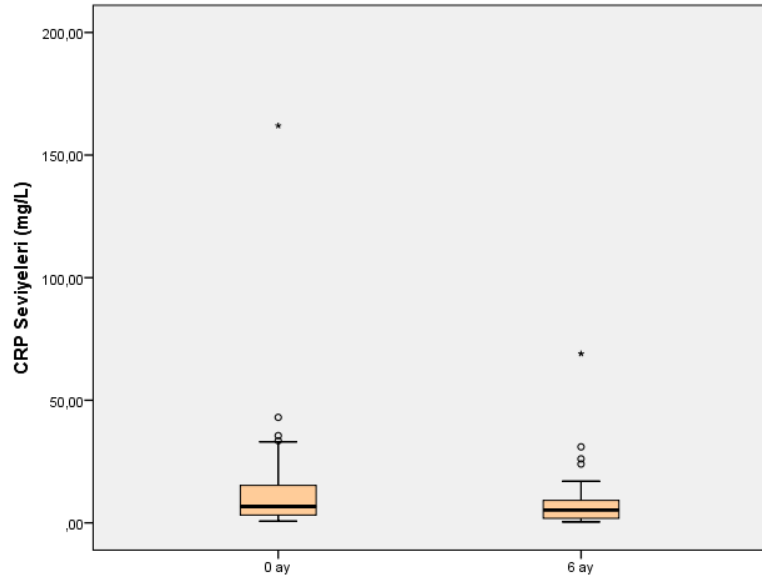
4.4. Klinik Parametreler

Altıncı ay kontrolünü tamamlayan RA hastalarının (n=48) klinik verileri tedavi öncesi ve sonrası değerlendirildi. Hastaların akut faz reaktanları seviyeleri, DAS 28 skorları ve HAQ skorları tedavi öncesine göre tedavinin altıncı ayında istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük bulundu (Tablo-11 ve Şekil-15).

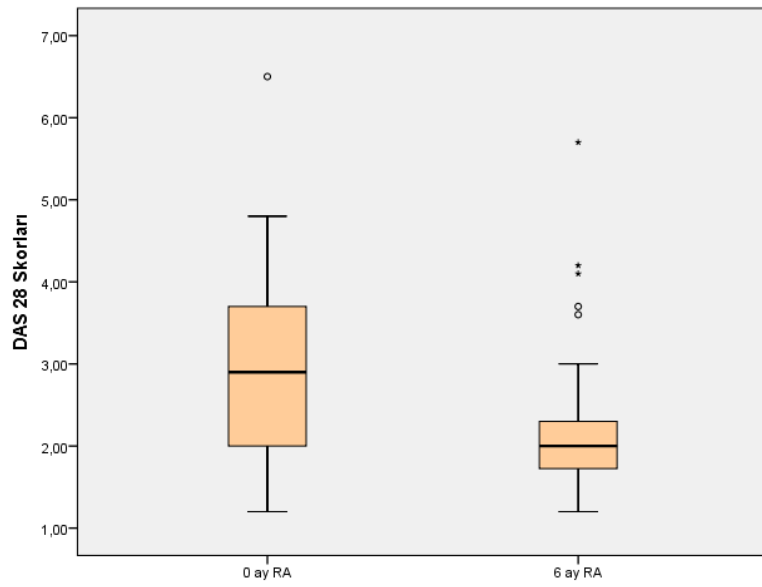
A.

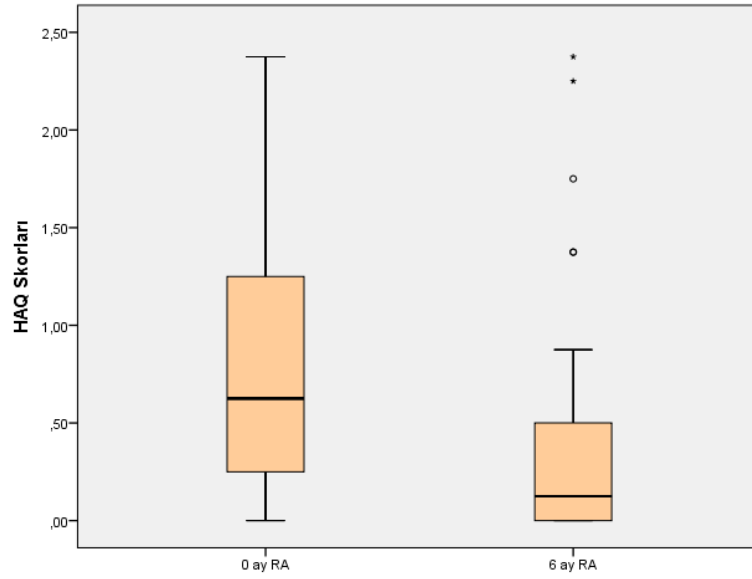


B.



C.





D.

A. Hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası ESH seviyeleri; **B.** Hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası CRP seviyeleri; **C.** Hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası DAS 28 Skorları; **D.** Hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası HAQ Skorları

Şekil 15. Altıncı ay kontrolünü tamamlayan hastaların klinik parametrelerinin karşılaştırılması

Başlangıç DAS 28 skoruna göre remisyonda olan hastalar ve hastalığın alevli döneminde olan hastaların klinik parametreleri incelendiğinde, alevli dönemde olan hastaların klinik bulgularının anlamlı düzeyde yüksek olduğu gösterildi (Tablo-12).

Çalışmaya alındığında remisyonda olup tedavi sonrası remisyonda kalan hastaların DAS 28 skoru tedavi sonrası anlamlı düzeyde düşük bulundu. Grup B1’de tedavi sonrası ESH seviyesi, HAQ skoru ve DAS 28 skorunda tedavi öncesine göre anlamlı bir düşüş görülürken; grup B2’de ise sadece ESH seviyelerinde anlamlı düzeyde düşüş saptandı (Tablo-13).

Altıncı ay kontrollerini tamamlayarak tedavi öncesi ve sonrası hastalık aktivite durumlarına göre gruplandırılan hastalar arasında (Grup A1, B1 ve B2) tedavi sonrası ölçülen DAS 28 ve HAQ skorları açısından anlamlı farklılık tespit edildi. Tedavi sonrası ölçülen DAS 28 skorundaki farklılığın A1-B2 grubu ve B1-B2 grubu karşılaştırmalarından; tedavi sonrası ölçülen HAQ skorunda farklılığın ise A1-B2 gruplarının karşılaştırmasından kaynaklandığı gösterildi (Tablo-14).

Tablo 10. Oksidatif hasar parametrelerinin kontrol grubu ve hasta grubunda karşılaştırması

	Kontrol Grubu (n=31) Medyan (Min-Maks)	RA Grubu (n=69) Medyan (Min-Maks)	p^{Mann-whitney U}
8-OH-dG	1,66 (0,91-4,83)	2,37 (0,41-16,30)	0,003
S-cdA	0,04 (0,00-0,50)	0,04 (0,00-0,58)	0,775
R-cdA	0,04 (0,02-0,24)	0,070 (0,00-0,43)	0,005
8-izo-PGF2α	0,57 (0,18-2,41)	1,18 (0,24-6,84)	< 0,001

8-OH-dG: 8-hidroksi deoksiguanozin; S-cdA ve R-cdA: 8,5-siklo-deoksiadenozin; 8-izo-PGF2 α : 8-izoprostan; p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 11. Altıncı ay kontrollerini tamamlayan hastalarda, klinik verilerin ve oksidatif hasar düzeylerinin tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırması

	RA Grubu 0. Ay (n=48) Medyan (Min-Maks)	RA Grubu 6. Ay (n=48) Medyan (Min-Maks)	p^{Wilcoxon}
8-OH-dG	2,52 (0,41-16,30)	2,14 (0,28-7,98)	0,001
S-cdA	0,04 (0,00-0,58)	0,03 (0,00-0,06)	< 0,001
R-cdA	0,07 (0,00-0,43)	0,05 (0,00-0,25)	0,040
8-izo-PGF2α	1,16 (0,24-6,84)	1,60 (0,30-16,99)	0,010
ESH	34,00 (8,00-109,00)	27,00 (2,00-62,00)	0,001
CRP	6,65 (0,70-162,00)	5,20 (0,40-69,00)	0,017
DAS 28 Skoru	2,90 (1,20-6,50)	2,00 (1,20-5,70)	< 0,001
HAQ Skoru	0,62 (0,00-2,38)	0,12 (0,00-2,38)	0,002

8-OH-dG: 8-hidroksi deoksiguanozin; S-cdA ve R-cdA: 8,5-siklo-deoksiadenozin; 8-izo-PGF2 α : 8-izoprostan; ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı; CRP: C-reaktif Protein; DAS 28: hastalık aktivite skoru; HAQ: sağlık değerlendirme anketi; p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 12. Tanı aldığı anda remisyonunda olan grup (Grup A) ve tanı aldığı anda alevli dönemde olan grupta (Grup B) klinik verilerin ve oksidatif hasar düzeylerinin (0. ay) karşılaştırması

	Grup A n=29 Medyan (Min-Maks)	Grup B n=37 Medyan (Min-Maks)	p^{Mann Whitney-U}
8-OH-dG	2,55 (0,41-6,32)	2,34 (0,87-16,30)	0,605
S-cdA	0,04 (0,01-0,58)	0,04 (0,00-0,26)	0,130
R-cdA	0,06 (0,02-0,17)	0,08 (0,00-0,43)	0,054
8-izo-PGF2α	1,46 (0,24-6,84)	1,17 (0,52-5,46)	0,190
ESH	24,0 (7,0-62,0)	42,0 (11,0-109,0)	<0,001
DAS 28 Skoru	4,40 (0,30-33,50)	15,00 (1,30-162,00)	<0,001
CRP	2,0 (1,20-2,60)	3,64 (2,70-6,50)	<0,001
HAQ	0,25 (0,00-1,25)	1,00 (0,13-2,38)	<0,001

8-OH-dG: 8-hidroksi deoksiguanozin; S-cdA ve R-cdA: 8,5-siklo-deoksiadenozin; 8-izo-PGF2α: 8-izoprostan; ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı; CRP: C-reaktif Protein; DAS 28: hastalık aktivite skoru; HAQ: sağlık değerlendirme anketi; p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 13. Oksidatif hasar parametrelerinin ve klinik verilerin tedaviyle değişen DAS 28 skorlarına göre gruplandırılan hastalarda tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırması

	Grup A1 0. Ay n=19 Medyan (Min-Maks)	Grup A1 6. Ay n=19 Medyan (Min-Maks)	p^{Milcoxon}	Grup B1 0. Ay n=18 Medyan (Min-Maks)	Grup B1 6. Ay n=18 Medyan (Min-Maks)	p^{Milcoxon}	Grup B2 0. Ay n=10 Medyan (Min-Maks)	Grup B2 6. Ay n=10 Medyan (Min-Maks)	p^{Milcoxon}
8-OH-dG	2,37 (0,41-5,01)	2,17 (0,28-7,98)	0,601	2,89 (0,87-14,40)	1,99 (0,67-4,67)	0,003	2,43 (1,80-16,30)	2,29 (0,94-7,55)	0,037
S-cdA	0,04 (0,02-0,58)	0,03 (0,01-0,06)	0,224	0,05 (0,00-0,26)	0,03 (0,00-0,60)	0,005	0,06 (0,02-0,16)	0,03 (0,01-0,06)	0,038
R-cdA	0,06 (0,02-0,17)	0,05 (0,00-0,17)	0,265	0,08 (0,04-0,43)	0,06 (0,02-0,25)	0,077	0,04 (0,00-0,29)	0,05 (0,01-0,14)	0,358
8-izo-PGF2α	1,33 (0,24-6,84)	1,30 (0,30-16,69)	0,841	1,04 (0,62-5,46)	1,53 (0,68-7,63)	0,022	1,06 (0,52-2,28)	2,17 (0,42-3,62)	0,017
ESH	26,0 (8,0-62,0)	27,0 (2,0-61,0)	0,532	37,0 (19,0-86,0)	25,0 (2,0-62,0)	0,026	47,5 (11,0-109,5)	28,0 (5,0-43,0)	0,021
CRP	4,5 (0,70-33,50)	2,2 (0,40-24,0)	0,344	8,35 (1,30-35,60)	5,20 (0,50-15,40)	0,064	15,25 (1,50-162,0)	10,20 (0,60-69,0)	0,241
DAS 28 Skoru	2,0 (1,20-2,60)	1,80 (1,20-2,30)	0,047	3,30 (2,80-4,80)	1,95 (1,20-2,30)	<0,001	3,75 (2,70-6,50)	3,30 (2,80-5,70)	0,085
HAQ	0,12 (0,00-0,88)	0,00 (0,00-0,75)	0,056	0,62 (0,13-1,88)	0,12 (0,00-2,25)	0,041	1,25 (0,75-2,38)	0,50 (0,00-1,38)	0,067

8-OH-dG: 8-hidroksi deoksiguanozin; S-cdA ve R-cdA: 8,5-siklo-deoksiadenozin; 8-izo-PGF2α: 8-izoprostan; ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı; CRP: C-reaktif Protein; DAS 28: hastalık aktivite skoru; HAQ: sağlık değerlendirme anketi; p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 14. Oksidatif hasar parametrelerinin ve klinik verilerin tedaviyle değişen DAS 28 skorlarına göre gruplandırılan hastalarda gruplar arasında karşılaştırması

	Grup A1 n=19 Medyan (Min-Maks)	Grup B1 n=18 Medyan (Min-Maks)	Grup B2 n=10 Medyan (Min-Maks)	p ^{Kruskal Wallis}	p ¹
8-OH-dG	2,17 (0,28-7,98)	1,99 (0,67-4,67)	2,29 (0,94-7,55)	0,674	-
S-cda	0,03 (0,01-0,06)	0,03 (0,00-0,60)	0,03 (0,01-0,06)	0,224	-
R-cdA	0,05 (0,00-0,17)	0,06 (0,02-0,25)	0,05 (0,01-0,14)	0,709	-
8-izo-PGF2 α	1,30 (0,30-16,69)	1,53 (0,68-7,63)	2,17 (0,42-3,62)	0,966	-
ESH	27,0 (2,0-61,0)	25,0 (2,0-62,0)	28,0 (5,0-43,0)	0,949	-
CRP	2,2 (0,40-24,0)	5,20 (0,50-15,40)	10,20 (0,60-69,0)	0,163	-
DAS 28 Skoru	1,80 (1,20-2,30)	1,95 (1,20-2,30)	3,30 (2,80-5,70)	<0,001	*0,595, ∞<0,001, =0,001
HAQ	0,00 (0,00-0,75)	0,12 (0,00-2,25)	0,50 (0,00-1,38)	0,007	*0,258, *0,006, =0,328

p¹: Dunn çoklu karşılaştırma testi, #A1 ve B1 gruplarının karşılaştırılması, ∞A1 ve B2 gruplarının karşılaştırılması, ∞B1 ve B2 gruplarının karşılaştırılması. 8-OH-dG: 8-hidroksi deoksiguanozin; S-cda ve R-cdA: 8,5-siklo-deoksiadenozin; 8-izo-PGF2 α : 8-izoprostan; ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı; CRP: C-reaktif Protein; DAS 28: hastalık aktivite skoru; HAQ: sağlık değerlendirme anketi; RA: Romatoid artrit. p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

4.5. Korelasyon Analizleri

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların oksidatif hasar parametreleri ve klinik verileri arasındaki korelasyon incelenerek kümülatif bir ilişki sorgulandı (Tablo-15).

Tablo 15. Tüm hastalara ait korelasyon tablosu

		0. Ay 8-OH- dG	0. Ay S-cdA	0. Ay R-cdA	0. Ay 8-izop	0. Ay ESH	0. Ay CRP	0. Ay DAS 28	0. Ay HAQ	6. Ay 8-OH- dG	6. Ay ESH	6. Ay CRP	6. Ay DAS 28
Spearman's rho	0. Ay S- cdA Korelasyon Katsayısı	,351											
	Sig. (2-tailed)	,003											
	0. Ay R- cdA Korelasyon Katsayısı	,381	,446										
	Sig. (2-tailed)	,001	,000										
	0. Ay 8- izop Korelasyon Katsayısı	-,135	-,064	,067									
	Sig. (2-tailed)	,268	,601	,585									
	0. Ay ESH Korelasyon Katsayısı	-,076	,307	,209	-,063								
	Sig. (2-tailed)	,537	,011	,086	,609								
	0. Ay CRP Korelasyon Katsayısı	,135	,130	,252	-,003	,585							
	Sig. (2-tailed)	,272	,291	,038	,981	,000							
	0. Ay DAS 28 Korelasyon Katsayısı	,006	,149	,206	-,132	,436	,507						
	Sig. (2-tailed)	,965	,232	,098	,291	,000	,000						
	0. Ay HAQ Korelasyon Katsayısı	,197	,203	,089	-,227	,246	,356	,713					
	Sig. (2-tailed)	,137	,126	,507	,087	,062	,006	,000					
	6. Ay 8- OH-dG Korelasyon Katsayısı	,529	,090	,264	-,042	-,098	,184	-,042	-,041				
	Sig. (2-tailed)	,000	,544	,070	,777	,506	,210	,776	,782				
	6. Ay S- cdA Korelasyon Katsayısı	,032	,374	,021	-,161	-,004	-,094	,021	,131	,141			
	Sig. (2-tailed)	,829	,009	,888	,274	,981	,525	,888	,375	,338			
	6. Ay R- cdA Korelasyon Katsayısı	,186	,089	,257	-,031	-,047	,124	,029	,115	,420			
	Sig. (2-tailed)	,207	,548	,078	,833	,753	,403	,843	,436	,003			
	6. Ay 8- izop Korelasyon Katsayısı	-,148	-,043	,261	,382	-,048	,071	,013	-,021	,043			
	Sig. (2-tailed)	,316	,774	,073	,007	,747	,630	,928	,885	,771			
	6. Ay ESH Korelasyon Katsayısı	-,052	,039	-,068	,063	,351	,196	,100	-,004	-,043			
	Sig. (2-tailed)	,726	,791	,646	,669	,014	,182	,497	,978	,772			
	6. Ay CRP Korelasyon Katsayısı	,228	,099	,064	-,027	,249	,478	,259	,095	,198	,435		
	Sig. (2-tailed)	,119	,505	,665	,854	,088	,001	,075	,522	,176	,002		
	6. Ay DAS 28 Korelasyon Katsayısı	,114	,156	-,026	-,110	,313	,538	,432	,459	,040	,235	,481	
	Sig. (2-tailed)	,442	,288	,860	,457	,031	,000	,002	,001	,786	,108	,001	
	6. Ay HAQ Korelasyon Katsayısı	,179	,201	,051	-,204	,252	,219	,311	,441	,064	,186	,042	,582
	Sig. (2-tailed)	,262	,207	,754	,200	,112	,169	,048	,004	,690	,244	,793	,000

**, Korelasyon 0.01 seviyesinde anlamlı (2-tailed).

*, Korelasyon 0.05 seviyesinde anlamlı (2-tailed).

Tanı alındığında ölçülen 8-OH-dG seviyeleri ile; tanı alındığında ölçülen S-cdA ve R-cdA seviyesi arasında pozitif yönde zayıf düzeyde korelasyon; tedavinin altıncı ayında ölçülen 8-OH-dG seviyesi arasında ise pozitif yönde orta düzeyde korelasyon bulundu.

Tanı alındığında ölçülen S-cdA seviyeleri ile; tanı alındığında ölçülen 8-OH-dG seviyesi, R-cdA seviyesi, ESH seviyesi arasında pozitif yönde zayıf korelasyon; tedavinin altıncı ayında ölçülen S-cdA seviyesi arasında ise pozitif yönde zayıf düzeyde korelasyon bulundu.

Tanı alındığında ölçülen R-cdA seviyeleri ile; tanı alındığında ölçülen 8-OH-dG ve S-cdA seviyeleri arasında pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

Tanı alındığında ölçülen 8-izoprostan seviyeleri ile; tedavinin altıncı ayında ölçülen 8-izoprostan seviyeleri arasında pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

Tedavinin altıncı ayında ölçülen 8-OH-dG seviyeleri ile; tedavinin altıncı ayında ölçülen R-cdA seviyeleri arasında pozitif yönde zayıf korelasyon; tanı alındığında ölçülen 8-OH-dG seviyeleri arasında ise pozitif yönde orta düzeyde korelasyon bulundu.

Tedavinin altıncı ayında ölçülen S-cdA seviyeleri ile; tanı alındığında ölçülen S-cdA seviyeleri arasında pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

Tedavinin altıncı ayında ölçülen R-cdA seviyeleri ile; tedavinin altıncı ayında ölçülen 8-OH-dG seviyeleri arasında pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

Tedavinin altıncı ayında ölçülen 8-izoprostan seviyeleri ile; tanı alındığında ölçülen 8-izoprostan seviyeleri arasında pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

Tanı alındığında ölçülen ESH seviyeleri ile; tanı alındığında ölçülen CRP seviyeleri arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon; tanı alındığında ölçülen DAS 28 skorları, S-cdA seviyeleri ve tedavinin altıncı ayında ölçülen ESH seviyeleri arasında ise pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

Tanı alındığında ölçülen CRP seviyeleri ile; tanı anında ölçülen ESH ve tedavinin altıncı ayında ölçülen DAS 28 skorları arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon; tanı anında ölçülen DAS 28 skorları, HAQ skorları ve tedavinin altıncı ayında ölçülen CRP seviyeleri arasında ise pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

Tanı alındığında ölçülen DAS 28 skorları ile; tanı anında ölçülen ESH seviyeleri, CRP seviyeleri, tedavinin altıncı ayında ölçülen DAS 28 skorları ve HAQ skorları arasında pozitif yönde zayıf korelasyon; tanı alındığında ölçülen HAQ skorları arasında ise pozitif yönde güçlü düzeyde korelasyon bulundu.

Tanı alındığında ölçülen HAQ skorları ile; tanı anında ölçülen CRP seviyeleri, tedavinin altıncı ayında ölçülen HAQ skorları ve DAS 28 skorları arasında pozitif yönde zayıf korelasyon; tanı alındığında ölçülen DAS 28 skorları arasında ise pozitif yönde güçlü düzeyde korelasyon bulundu.

Tedavinin altıncı ayında ölçülen ESH seviyeleri ile; tanı alındığında ölçülen ESH seviyeleri, tedavinin altıncı ayında ölçülen CRP düzeyleri ve yaş arasında pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

Tedavinin altıncı ayında ölçülen CRP seviyeleri ile; tedavinin altıncı ayında ölçülen ESH seviyesi, DAS 28 skorları ve tanı alındığında ölçülen CRP seviyeleri arasında pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

Tedavinin altıncı ayında ölçülen DAS 28 skorları ile; tedavinin altıncı ayında ölçülen HAQ skoru ve tanı alındığında ölçülen CRP arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon; tedavinin altıncı ayında ölçülen CRP seviyeleri, tanı alındığında ölçülen DAS 28 skorları ve HAQ skorları arasında ise pozitif yönde zayıf ilişkili korelasyon bulundu.

Tedavinin altıncı ayında ölçülen HAQ skorları ile; tedavinin altıncı ayında ölçülen DAS 28 skorları arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon; tanı alındığında ölçülen HAQ skorları ve DAS 28 skorları arasında ise pozitif yönde zayıf korelasyon bulundu.

RA hastalarında oksidatif hasar verileri ile klinik parametrelere ait korelasyon analizleri, alevli başlayıp tedavi sonrası remisyona giren grubun altıncı ay verileri ile de incelenmiştir. Böylece klinik olarak etkinliği gösterilen tedavinin oksidatif stresle ilişkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Korelasyon analizleri Tablo-16'da gösterilmiştir.

Tablo 16. Hastalık aktivitesindeki değişime göre alevli başlayıp tedavi sonrası remisyona giren hasta grubunun, altıncı ay verileri ile klinik bulguların korelasyon tablosu

		6. Ay 8-OH-dG	6. Ay S-cdA	6. Ay R-cdA	6. Ay 8-izop	6. Ay ESH	6. Ay CRP	6. Ay DAS 28
Spearman's rho	6. Ay R-cdA Korelasyon Katsayısı	,637**	-,220					
	Sig. (2-tailed)	,004	,381					
	6. Ay 8-izop Korelasyon Katsayısı	-,208	-,459	,119				
	Sig. (2-tailed)	,408	,055	,638				
	6. Ay ESH Korelasyon Katsayısı	-,166	,260	-,174	-,206			
	Sig. (2-tailed)	,510	,297	,491	,411			
	6. Ay CRP Korelasyon Katsayısı	,058	,277	-,239	-,441	,564*		
	Sig. (2-tailed)	,820	,265	,339	,067	,015		
	6. Ay DAS 28 Korelasyon Katsayısı	,212	,080	-,147	-,173	,417	,469*	
	Sig. (2-tailed)	,398	,751	,561	,491	,085	,050	
	6. Ay HAQ Korelasyon Katsayısı	,138	,252	-,059	-,354	,628*	,201	,590*
	Sig. (2-tailed)	,624	,364	,834	,195	,012	,472	,020

**. Korelasyon 0.01 seviyesinde anlamlı (2-tailed).

*. Korelasyon 0.05 seviyesinde anlamlı (2-tailed).

6. ayda ölçülen 8-OH-dG seviyeleri ile; 6. ayda ölçülen R-cdA düzeyleri arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon vardır.

6. ayda ölçülen R-cdA seviyeleri ile; 6. ayda ölçülen 8-OH-dG düzeyleri arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon vardır.

6. ayda ölçülen ESH seviyeleri ile; 6. ayda ölçülen CRP seviyeleri, HAQ düzeyleri ve DAS 28 skorları arasında pozitif yönde güçlü korelasyon vardır.

6. ayda ölçülen DAS 28 skorları ile; 6. ayda ölçülen CRP seviyeleri arasında pozitif yönde zayıf korelasyon vardır.

6. ayda ölçülen CRP seviyeleri ile; 6. ayda ölçülen DAS 28 skorları arasında pozitif yönde zayıf korelasyon vardır.

6. ayda ölçülen HAQ skorları ile; 6. Ayda ölçülen ESH seviyeleri arasında pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyon vardır.

6. ay S-cdA ve 8-izoprostan düzeyleri ile herhangi bir parametre arasında korelasyon bulunmadı.

5. TARTIŞMA

Romatoid artrit yıkıcı ve ilerleyici otoimmün bir hastalıktır. Kemik ve eklem tahribatına yol açan kronik inflamasyonla karakterize olan RA'nın patolojisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Mevcut tedavi stratejisi ise semptomları hafifletmeye yöneliktir. Güncel yaklaşımlarda ise pre-RA olarak adlandırılan, inflamasyon alevlenmeden ve hastalık semptomları ortaya çıkmadan önce hastalığı belirleyerek, önleyici tedavi uygulanması tartışılmaktadır (78).

Oksidatif stresin bir sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif makromolekül hasarı, birçok hastalığın patogenezinde olduğu gibi RA patogenezinde de rol alır. Oksidatif strese yol açan artmış reaktif oksijen türleri (ROT) seviyesi, hastalığın hem bir sonucudur hem de inflamasyonun devamlılığını ve tahribatı sağlayarak hastalığın nedenidir (10,74).

Oksidatif stres ve RA ilişkisini inceleyen sınırlı sayıda klinik araştırma bulunmaktadır (74). Bu çalışmalarda RA hastalarının oksidatif hasar düzeyleri spesifik ve stabil olmayan belirteçlerle incelenmiştir. Ayrıca rutinde uygulanan tedavi süreci sonunda oksidatif hasar düzeylerinin RA hastalarında prospektif olarak incelendiği sadece birkaç çalışma bulunmaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında ve ilgili literatür taraması sonucunda eksik olduğunu düşündüğümüz RA hastalarında oksidatif makromolekül hasarının tedavi sürecindeki değişiminin prospektif olarak incelendiği bir çalışma planladık. Bununla birlikte hastalıktaki oksidatif hasar parametrelerinin bazal durumunu görmek amacıyla yeni tanı alan hastaların oksidatif hasar düzeyleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldı.

Çalışmamızda DNA nükleozit hasar ürünleri olan 8-OH-dG ve R-cdA seviyeleri, RA hastalarında kontrollere göre yüksek bulundu. Sonuçlarımız literatürle uyumlu olmakla birlikte, literatürde bakılan tek parametre olan 8-OH-dG'nin yanı sıra R-cdA ve S-cdA'nın ölçülmesiyle oksidatif DNA hasarının daha spesifik bir şekilde ve sadece RA hastalığına bağlı olarak arttığının gösterilmesiyle literatüre katkı sağlandı. Bununla birlikte tanı alındığında DAS 28 skorlarına göre remisyon döneminde olanlar (Grup A) ya da alevli dönemde olanlar (Grup B) olarak gruplandırılan hastalar arasında DNA hasarı ve lipit peroksidasyonu açısından

anlamalı fark bulunmadı. Bu durum RA'da sağlıklı kişilere göre artan oksidatif hasarın, hastalığın şiddetinden bağımsız olarak artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamız RA hastalarını bu açıdan gruplandırarak inceleyen ilk çalışmadır.

Oksidatif DNA hasarının aynı anda birden fazla hasar ürününün ölçülmesi ile belirlenebilmesi, tek ürün ölçümüne göre sonuçlarımızı daha güvenilir kılmaktadır (3). Ayrıca çalışmamız kullanılan yöntem açısından da yapılan çalışmalara üstünlük sağlamaktadır. Çalışmamızda oksidatif DNA hasar düzeylerinin belirlenmesinde yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle tercih edilen LC-MS/MS SID-MRM yöntemi kullanılmıştır (2). LC/MS-MS yöntemi birden fazla analitin aynı anda ölçülmesini mümkün kılmaktadır.

RA hastalarında 8-OH-dG seviyelerini sağlıklı kontrollerle karşılaştıran üç çalışmaya rastlanmıştır (79–81). Bu üç çalışmada da 8-OH-dG'nin ölçümü için ELISA yöntemi kullanılmış ve çalışmamızla uyumlu şekilde hastaların hasar düzeyleri kontrollere göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca hasta sayıları incelendiğinde Rall ve arkadaşları 8 hasta, 8 sağlıklı kontrol; Seven ve arkadaşları 20 hasta, 15 sağlıklı kontrolde; Hajizadeh ve arkadaşları ise 49 RA hastası, 30 kontrolde inceleme yapmıştır. Bizim çalışmamızda ise diğer çalışmalarda yer alan hasta sayılarından fazla olarak 69 RA hastası, 31 sağlıklı kontrolde oksidatif nükleozit hasarı düzeyleri incelendi.

Stabil yapıları ve idrardaki kaynaklarının bilinmesi sebebiyle daha güvenilir belirteçler olarak kabul edilen *S*-cdA ve *R*-cdA düzeylerinin, RA hastalarında ve sağlıklı kontrollerde karşılaştırmalı olarak incelendiği başka bir çalışmaya rastlanmadı. Çalışmamız bu anlamda literatürdeki ilk çalışmadır ve *R*-cdA düzeyleri hastalarda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Hem 8-OH-dG seviyesinin hem de *R*-cdA seviyesinin RA hastalarında artması, oksidatif nükleozit hasarının RA için bir belirteç olabileceğini göstermektedir. 8-OH-dG'nin idrardaki kaynağı olarak BER mekanizmasının yanı sıra insan Mut T homolog'unun (hMTH1), 8-OH-dGTP'yi hidrolize ederek hasarlı lezyonu nükleotid havuzundan yok etmesi önerilmektedir. Bu sebeple 8-OH-dG hem insan 8-OH-Gua glikozilaz (hOGG1) enzimi ile DNA'dan kesilerek hem de nükleotid havuzundan atılarak idrarda görülmektedir (54). *S*-cdA ve *R*-cdA ise sadece NER mekanizması ile DNA'dan

nükleozit olarak atılmaktadır (62). Bu da S-cdA ve R-cdA'nın idrardaki kaynağının direkt olarak DNA onarımı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla R-cdA düzeyinin RA hastalarında yüksek bulunması, bu hastalarda DNA nükleozit hasarının arttığını daha kesin bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu kapsamda bulgularımız oksidatif DNA nükleozit hasarının inceleneceği sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

Oksidatif makromolekül hasarının güvenilir belirteçlerinden biri olan lipid peroksidasyon ürünü 8-izoprostanın RA hastalarında yükseldiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (9,75,76,82,83). Çalışmamızda literatüre uygun olarak 8-izo-PGF2 α düzeyleri RA hastalarında sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmuştur. Çalışmamız, lipid peroksidasyon ürünü ile birlikte aynı anda DNA nükleozit hasarının da ölçüldüğü ilk çalışmadır. 8-izo-PGF2 α , 8-OH-dG ve R-cdA'nın RA hastalarında yüksek bulunmuş olması, oksidatif makromolekül hasarının RA hastalığında kullanılabilecek bir biyobelirteç olduğu görüşünü destekler niteliktedir.

Bununla birlikte 8-izo-PGF2 α ölçümünde kullanılan ELISA yöntemi için piyasadaki kitlerden en kapsamlı şekilde tasarlanmış, literatürde en sık kullanılan kit ile çalışmamızı tamamladık. Klawitter ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada kullandığımız Cayman Chem. 8-izoprostan ELISA kiti, iki farklı marka kit ile ve LC-MS/MS yöntemi ile karşılaştırılmıştır (84). Ölçümler üçlü tekrar çalışılmış ve çalışma sonucunda üç kitin de LC-MS/MS sonuçlarından daha yüksek sonuç vermesine rağmen en yakın sonucu Cayman Chem. 8-izoprostan ELISA kitinin verdiği gözlemlenmiştir. Biz de bu çalışmadan yola çıkarak kit seçimimizi gerçekleştirdik. Kit protokolü, idrar örneklerini analiz etmeden önce katı faz ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction – SPE) veya 8-izoprostan afinite kolonları ile ön ekstraksiyon yapılmasını önermektedir. Biz de laboratuvar koşullarımıza uygun olarak bir ön çalışma ile SPE yöntemini denedik. Örneklerimizi ELISA ile analiz etmeden önce SPE kartuşlarında ekstrakte ederek kullandık ve SPE uygulamasının sonuçlarımıza göz ardı edilebilecek bir etki ettiğini gözlemledik. Ayrıca her ne kadar ticari bir kit kullanıyor olsak da doğruluk ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yaparak yöntemin laboratuvar içi verifikasyonunu da sağladık. Ek olarak idrar örnekleri çalışmaya kadar -80 °C'de bekletilirken oluşabilecek herhangi bir yalancı lipid peroksidasyonunu önlemek adına ELISA kiti protokolünde belirtilen oranda

örneklere bir antioksidan olan bütül hidroksi toluen ekleyerek, çalışmamızın güvenilirliğini arttırdık (77,85).

Uygulanan tedavi sonrası RA hastalarında oksidatif makromolekül hasarına etkilerini prospektif olarak inceleyen yalnızca üç çalışmaya rastlanmıştır (86–88). Üç çalışmada da 8-OH-dG seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüş ve tedavinin altıncı ayında düşük bulunmuştur. Ancak, çalışmalarda seçilen hasta grupları kullandıkları ilaca göre oluşturulmuştur. Aynı gruba ait olan bu üç çalışmadan birinde sadece metotreksat kullanan hastalar (87), birinde sadece etanercept kullanan hastalar (86), ve son olarak bir diğerinde sadece infliximab kullanan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir (88). Bu çalışmalardan sadece bir biyolojik ajan olan infliximab ile yapılan araştırmada hem 8-OH-dG hem de 8-izoprostan seviyeleri, iki analit için de ELISA yöntemi kullanılarak aynı anda ölçülmüştür. Biz çalışmamızda hastalarımızı kullandıkları ilaçlara göre gruplandıramadık ancak çalışmamız tedavi sonrası hem lipit hem de nükleozit hasarınının birlikte değerlendirilmesiyle, 8-OH-dG'ye ek olarak R-cdA ve S-cdA ölçülmesiyle ve nükleozit hasarı için daha spesifik bir yöntem olan LC-MS/MS'in kullanılmasıyla üstünlük sağlamaktadır.

Çalışmamıza dahil edilen ve altıncı ay kontrolünü tamamlayan hastalarda DNA nükleozit hasar ürünleri seviyeleri, tedavi sonrası anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Ayrıca tedavi sonucunda değişen DAS 28 skoruna göre tedaviye alevli başlayıp tedavi sonucunda remisyona giren ya da alevli devam eden her iki grupta da 8-OH-dG ve S-cdA seviyelerinin, tedavi sonrası düştüğü saptanmıştır. Bu durumda altı aylık tedavi süreci sonunda gözlenen hastalık aktivite değişiminden bağımsız bir şekilde tüm alevli başlangıçlı olan hastalarda tedaviye yanıt olarak DNA hasarı düşmüştür. Ayrıca remisyon döneminde tanı alan, tedavi sonrası da remisyonda kalan hastalarda DNA hasarı düzeyleri açısından fark bulunmamıştır.

Tedaviye alevli dönemde başlayan kişilerde DNA hasarının da tedaviyle birlikte anlamlı düşüş göstermesiyle, verilen tedavi protokolünün DNA hasarı düzeylerini azaltması açısından da etkin olduğunu ve tedavinin izlenebilirliğine DNA hasarı parametrelerinin de katkısı olabileceği gösterilmiştir. Tanı aldığı dönemde alevli dönemde olan hastalarda tedavi sonrası hastalık şiddeti alevli devam etse de bu hastaların DAS 28 skorlarında 0-6. ay arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan

bir azalma gözlenmiştir (0.ay DAS 28 skoru medyan: 3,75 – 6.ay DAS 28 skoru medyan: 3,30). DAS 28 skorlarındaki bu düşüş, hastaların tedaviye cevap vermeye başladıklarını göstermektedir. Bu durum, DNA hasarı parametrelerinin tedaviye yanıtı DAS 28 skoruna göre daha önce gösteren bir biyobelirteç adayı olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Özellikle alevli başlayıp remisyon dönemine girenlerde de DNA hasarının düşük bulunması belirteçlerin tedavi etkinliğini değerlendirmedeki güvenilirliğini arttırmaktadır.

RA hastalarında R-cdA ve S-cdA seviyelerinin hasta – kontrol karşılaştırması olmadığı gibi tedavi öncesi ve sonrası incelemesini yapan bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Çalışmamız sonucunda hem R-cdA hem de S-cdA tedavi sonrası anlamlı ölçüde düşüş göstermiştir. Bununla birlikte 8-OH-dG seviyesinin de düşmüş olması, uygulanan tedavinin oksidatif DNA nükleozit hasarı üzerine olumlu bir etkisi olduğunu göstermektedir. RA tedavisi gören kişilerde oksidatif DNA nükleozit hasarı seviyelerindeki düşüş, bu parametrelerin RA hastalığında tedavi etkinliklerinin sınanmasında biyobelirteç olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır.

Çalışmamızda 8-izoprostan seviyeleri tedavi sonrası, tedavi öncesine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. İlgili literatür taraması yapıldığında RA hastalarında izoprostan düzeylerinin tedavi sonrasını inceleyen tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Kageyama ve arkadaşlarının 2008’de yaptıkları bu çalışmada hasta grubu olarak sadece infliximab kullanan 23 RA hastası ve 7 sağlıklı kontrol değerlendirilmiştir. RA hastalarının 54 hafta boyunca izlendikleri bu çalışma sonucunda 8-izoprostan seviyelerinin tedavi sonrası düştüğü gözlenmiştir (88). Bir biyolojik ajan olan infliximab’ın 8-izoprostan seviyelerini düşürdüğünü gösteren başka çalışmalar bulunmaktadır (89,90). Ancak biz çalışmamızda biyolojik ajan kullanan hastaları dışlayarak değerlendirmeye almadık. Bu sebeple DMARD’ların 8-izoprostan üzerine etkilerini araştırdığımızda, özellikle tedavide öncü ilaç olarak kabul edilen metotreksat (MTX) ile ilgili çalışmalara rastlanmıştır. Çalışmamızda da çoğunluk olarak kullanılan ilaç MTX (55 hasta - %79,7) olduğundan bu çalışmalar dikkate alınmıştır.

Literatürde MTX'in oksidatif hasar parameterelerine etkilerini inceleyen ve akut lenfoblastik lösemi hastası olan çocuklarda yapılan çalışmalarda, MTX kullanımı sonrasında izoprostan seviyelerinin kullanım dozuna ve süresine bağlı olarak arttığı bildirilmiştir (91–93). Buna karşın Baueroval ve arkadaşlarının 2014'te adjuvan kaynaklı artritli sıçanlarda yaptığı çalışmada hayvanların plazma 8-izoprostan seviyelerinin MTX kullanımı sonrası düştüğü gösterilmiştir (94). Rho ve arkadaşları ise RA ve sistemik lupus eritematozus tedavisi devam eden hastaları MTX kullanan ve MTX kullanmayan olarak gruplandırarak değerlendikleri iki çalışmada gruplar arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır (95,96).

Biz de çalışmamızda, altı aylık tedavi sonrası hastalık şiddetindeki değişime göre hastaları gruplandırdık. Tanı aldığı anda alevli grupta olan hastaların altı aylık tedavi sonrası remisyona girmeseler dahi 8-izoprostan seviyelerinde artış görülmüştür. Aynı şekilde DMARD kullanımına başlamadan önce remisyon döneminde olup, altı aylık tedavi sonrası remisyonda kalmaya devam eden hastalarda ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir artış söz konusudur. Bu durum, 8-izoprostan seviyelerindeki artışın DMARD kullanımına bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmalardaki bu farklılıkların farklı ilaçların, farklı etki mekanizmalarına bağlı olduğu düşüncesindeyiz. Aynı zamanda aynı ilacın farklı hastalıklarda, farklı yollar üzerinde etkili olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır. Metotreksat, ilk olarak kanser terapilerinde yüksek dozda kullanılmak üzere geliştirilmiş, daha sonra immün baskılayıcı ve anti-inflamatuar etkileri sebebiyle düşük doz olarak RA'da kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde başlangıç tedavisinde en çok tercih edilen, biyolojik ajan kullanımında dahi ek olarak kullanılan öncü ilaçtır (97,98). Bir folat antagonisti olan MTX, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek nitrik oksit sentezini azaltır ve ROT üretimini artırır (99,100). Artan ROT, T hücrelerin apoptozuna sebep olurken; RA patogeneğinde önemli rol oynadığı bilinen fibroblast benzeri sinoviositlerde (Fibroblast Like Synoviocyte - FLS) MTX'in bu etkisi görülmez (98,100). Aksine Sung ve ark 2000 yılında yaptığı çalışmada FLS'lerde MTX'in ROS üretimini inhibe ettiğini ortaya koymuştur (101). MTX aynı zamanda hücrede kullanılabilir nikotinamid adenosin difosfat (NADPH) seviyesini düşürerek

önemli bir antioksidan olan glutatyonun da etkilerini azaltır. MTX hücreesel antioksidan kapasiteyi düşürerek hücreleri ROT'a duyarlı hale getirir (102).

Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda tedavi sonrası 8-izoprostan seviyelerinin yüksek bulunmasının hastaların kullandıkları ilaçlardan kaynaklandığı düşüncesindeyiz. MTX, RA hastalarında immünbaskılayıcı olarak görev alırken T hücre apoptozunu, FLS'lerde ROT düşürücü etkisinden daha baskın olarak tetikliyor olabilir. Kullanılan ilaçların sistemik etkileri olduğundan tek bir parametreyle değerlendirmek eksik olacaktır. Dolayısıyla daha sonraki çalışmalarda plazma 8-izoprostan seviyeleri ve idrar 8-izoprostan seviyeleri eş zamanlı olarak incelenebilir.

Buna ek olarak tedavi sonrası hastalarda lipit peroksidasyon ürünü artarken DNA nükleozit hasar ürünlerinin azalmış olması; lipitlerin DNA'ya göre oksidatif hasara daha yatkın olmalarından kaynaklanıyor olduğu da düşünülebilir. Bu da DNA hasarının lipit peroksidasyonuna göre daha uygun bir biyobelirteç olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca DNA onarılabılır bir özellikteyken lipit peroksidasyonu geri dönüşümsüz bir şekilde gerçekleşir. RA hastalarında DNA hasar parametrelerine ek olarak hastalarda DNA onarım kapasitesinin de incelenmesi önem taşımaktadır.

RA hastalarında klinik parametreleri tüm hastalarda tedavi öncesi ve sonrası değerlendirildiğinde, klinik bulguların tümünde (DAS 28 skoru, HAQ skoru, CRP ve ESH seviyeleri) tedavi sonrası bir iyileşme/düşüş görülmektedir. Hastaları başlangıç ve tedavi sonrası DAS 28 skorlarına göre gruplandırdığımızda ise tedavisine alevli dönemde başlayan ve tedavi sonrası remisyona giren hastalarda DAS 28 skorunun yanı sıra hastaların ESH seviyeleri ve HAQ skorları da anlamlı seviyede düşük bulunmuştur. Ayrıca tedaviye remisyon döneminde başlayıp remisyonda kalan hasta grubunda, hastalık şiddeti değişmese dahi DAS 28 skorlarında anlamlı bir düşüş görülmüştür. Bu sonuçlar mevcut tedavinin klinik anlamda etkinliğini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz oksidatif hasar ürünlerinin, klinik parametrelerle ilişkisini incelediğimizde tanı anında ölçülen ESH ve tanı anında ölçülen S-cdA haricinde anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Bu konuda

literatürde tartışmalı sonuçlar yer almaktadır. Rho ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada idrar 8-izoprostan seviyelerini 169 hasta – 92 kontrolde, GC-MS yöntemiyle değerlendirmiş ve DAS 28 skoru ile bir korelasyon bulamamıştır (75). Buna karşın Kwasny-Krochin ve arkadaşları 46 hasta – 50 kontrolde, plazma izoprostan seviyelerini ELISA ile ölçerek DAS 28 skoru ile korelasyon bulmuştur (76). Luczaj ve arkadaşları ise 73 hasta- 73 kontrolde yaptıkları çalışmada hem plazma hem de idrar 8-izoprostan seviyelerini LC-MS/MS yöntemi ile ölçmüştür. Korelasyon analizi yapılmayan çalışmada hastalar DAS 28 skorlarına göre yüksek hastalık aktivitesi ve düşük hastalık aktivitesi olarak gruplandırılmış ve yüksek hastalık aktivitesine sahip grupta 8-izoprostan seviyeleri daha yüksek bulunmuştur (83). Kageyama ve arkadaşları etanercept ve metotreksat çalışmalarında 8-OH-dG ile klinik parametreler arasında bir korelasyon bulamazken; infliximab ile yaptıkları çalışmada 54 hafta takip ettikleri hastalarda 8-OH-dG ile CRP seviyesi ve DAS 28 skoru arasında anlamlı bir korelasyon bulmuştur (86–88). Ancak aynı çalışmada 8-izoprostan ile klinik parametreler arasında bir ilişki gözlenmemiştir (88). Bu bağlamda örneklem büyüklüğü ve örnek seçimi öne çıkmaktadır. Hastaların uzun süre takip edildiği ve çok örnekli çalışmalar planlanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızdan elde edilen bulgular, RA'da tedavi öncesinin yanı sıra tedavi sonrası da oksidatif makromolekül hasarında meydana gelen değişimlerin incelenmesi ile literatürde bir boşluğu doldurmuş ve bu konuda gerçekleştirilecek ileriki çalışmalara ışık tutmuştur.

Çalışmamızda RA hastalarında oksidatif makromolekül hasarının arttığı gösterilmiştir. Çalışmamız hem lipid hem de DNA nükleozit hasarının yüksek özgüllüğe ve hassasiyete sahip yöntemlerle, stabil ve spesifik biyobelirteçlerle incelendiği ilk çalışma olmuştur. Çalışmamızda LC-MS/MS yöntemi ile 8-OH-dG'ye ek olarak R-cdA, S-cdA ölçümü ve aynı hasta grubunda 8-izoprostanın da ölçülmesi çalışmamızın en önemli üstünlükleridir.

Çalışmamız uygulanan tedavi sonrası oksidatif makromolekül hasarındaki değişimin prospektif olarak kapsamlı bir şekilde incelendiği ilk çalışmadır. Artan 8-izoprostan seviyesine karşılık DNA nükleozit hasar ürünlerinin seviyeleri tedavi sonrasında düşük bulunmuştur.

Altı aylık tedavi sonrası hastalarda klinik açıdan iyileşme gözlenmiştir. Çalışmamız bu anlamda rutin tedavinin etkinliğini ortaya konmasına destek sağlamıştır. Ancak oksidatif hasar parametreleri ile klinik bulgular arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

Bulgularımız literatüre önemli katkılar sağlamanın yanı sıra gelecek çalışmalar için de bir kaynak niteliğindedir ve yeni hipotezlerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Geleceğe yönelik planlanan diğer çalışmalar:

RA hastalarında makromolekül hasarının, hastaların kullandıkları ilaca göre gruplandırılarak incelendiği bir çalışma literatürde önemli bir eksikliktir. Daha büyük örneklem gruplarıyla, uygulanan tedavilerin etkinlikleri oksidatif hasara etkileri açısından değerlendirilmelidir.

RA hastalarında DNA onarım kapasitesi, özellikle bir onarım enzimi olan PARP-1'in aktivitesi kapsamlı olarak incelenebilir.

Tedavi sonrası yüksek bulunan 8-izoprostan seviyeleri, hem kanda hem de idrarda ölçülerek olası bir farklılık değerlendirilebilir.

RA patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamadığı için yapılacak tüm klinik araştırmalar, mekanizma çalışmaları ve moleküler incelemeler literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

1. Quiñonez-Flores CM, González-Chávez SA, Del Río Nájera D, Pacheco-Tena C. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Biomed Res Int*. 2016;2016(2):1–14.
2. Dizdaroglu M, Coskun E, Jaruga P. Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques. *Free Radic Res*. 2015 May 4;49(5):525–48.
3. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;763:212–45.
4. Kant M, Akış M, Çalan M, Arkan T, Bayraktar F, Dizdaroglu M, et al. Elevated urinary levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines, and 8-iso-prostaglandin F2 α as potential biomarkers of oxidative stress in patients with prediabetes. *DNA Repair (Amst)*. 2016;48:1–7.
5. Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS, Roberts II LJ. Isoprostane Generation and Function. *Chem Rev*. 2011;111(10):5973–96.
6. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of Oxidative Stress Study II: Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med*. 2005 Mar;38(6):698–710.
7. Milne GL, Dai Q, Roberts LJ. The isoprostanes—25 years later. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2015 Apr;1851(4):433–45.
8. Basu S. F2-Isoprostanes in Human Health and Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(8):1405–34.
9. Basu S, Whiteman M, Matthey DL, Halliwell B, Ridge K, Haywood T. Raised levels of F2-isoprostanes and prostaglandin F2 α in different rheumatic diseases. 2001;60:627–31.
10. Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2016;11(4):1–15.
11. Datta S, Kundu S, Ghosh P, De S, Ghosh A, Chatterjee M. Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2014 Nov 10;33(11):1557–64.
12. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016 Oct;388(10055):2023–38.
13. Handa R. Rheumatoid Arthritis. In: Handa R, editor. *Clinical Rheumatology*. springer; 2021. p. 51–67.
14. Weisman MH. Epidemiology. In: Wallace DJ, editor. *Rheumatoid Arthritis*. New York: Oxford University Press; 2011. p. 11–4.

15. Weisman MH. Economic Impact and Disability Issues. In: Wallace DJ, editor. Rheumatoid Arthritis. New York; 2011. p. 75–6.
16. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8;365(23):2205–19.
17. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2569–81.
18. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *JAMA*. 2018 Oct 2;320(13):1360–72.
19. Gravallese EM, Monach PA. Pathogenesis and Pathology of Rheumatoid Arthritis. In: Hochberg MC, editor. Rheumatology. 7. Philadelphia: Elsevier; 2018. p. 811–31.
20. Weisman MH. Laboratory and Imaging Assessments. In: Wallace DJ, editor. Rheumatoid Arthritis. New York; 2011. p. 55–60.
21. Prevoo M, Van't Hof M, Kuper H, Van Leeuwen M, van de Putte L, van Riel PLCM. Modified Disease Activity Scores That Include Twenty-Eight-Joint Counts: Development and Validation in a Prospective Longitudinal Study of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38:44–8.
22. Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VPK, Stamm T, Smolen JS. Remission and active disease in rheumatoid arthritis: Defining criteria for disease activity states. *Arthritis Rheum*. 2005 Sep;52(9):2625–36.
23. Tuncay F, Borman P, Kaygisiz F, Erdem HR, Kurt EE. Measurement of rheumatoid arthritis disease activity with rheumatoid arthritis disease activity index (RADAI) and comparison with other clinical disease activity indexes. *Turkiye Klin J Med Sci*. 2015;35(3):179–85.
24. Di Giuseppe D, Discacciati A, Orsini N, Wolk A. Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: A dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2).
25. Liu X, Tedeschi SK, Barbhaiya M, Leatherwood CL, Speyer CB, Lu B, et al. Impact and Timing of Smoking Cessation on Reducing Risk of Rheumatoid Arthritis Among Women in the Nurses' Health Studies. *Arthritis Care Res*. 2019;71(7):914–24.
26. Liao K. Classification and Epidemiology of Rheumatoid Arthritis. In: Hochberg MC, editor. Rheumatology. 7. Philadelphia: Elsevier; 2018. p. 747–53.
27. Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin J Il. Smoking and rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):22279–95.
28. Kınıklı G. Romatoid Artrit. In: Düzgün N, editor. Romatoloji. Pfizer İnflamasyon; 2011. p. 124–40.

29. Joo Y Bin, Lim Y-H, Kim K-J, Park K-S, Park Y-J. Respiratory viral infections and the risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2019 Dec 30;21(1):199.
30. Ollier WER, Harrison B, Symmons D. What is the natural history of rheumatoid arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2001 Mar;15(1):27–48.
31. Croia C, Bursi R, Sutera D, Petrelli F, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(3):347–57.
32. Favalli EG, Biggioggero M, Crotti C, Becciolini A, Raimondo MG, Meroni PL. Sex and Management of Rheumatoid Arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(3):333–45.
33. Masi AT, Aldag JC, Chatterton RT. Sex hormones and risks of rheumatoid arthritis and developmental or environmental influences. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1069:223–35.
34. Cutolo M, Villaggio B, Craviotto C, Pizzorni C, Serio B, Sulli A. Sex hormones and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2002;1(5):284–9.
35. Weisman MH. Pathogenesis. In: Wallace DJ, editor. *Rheumatoid Arthritis*. New York: Oxford University Press; 2011. p. 15–22.
36. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):415–22.
37. S. O, Staunton L, FitzGerald O, R. S. Biomarkers of Inflammatory Arthritis and Proteomics. In: *Genes and Autoimmunity - Intracellular Signaling and Microbiome Contribution*. intechopen; 2013. p. 237–67.
38. Feldmann M, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics Authors'. *Immunol Reviews*. 2008;223:7–19.
39. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(6):S685–99.
40. Karaarslan Y. DMARD'lar (Hastalığı Modifiye Eden Antiromatizmal İlaçlar). *Türkiye Klin J Rheumatol-Special Top*. 2015;8(3):14–20.
41. Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015;68(1):1–25.
42. T.C. Sağlık Bakanlığı Romatoid Artrit Tedavisinde Kullanılan Hastalık Modifiye Edici Sentetik Ve Biyolojik Antiromatizmal İlaçlar Konulu Sağlık Teknolojisi Değerlendirme Raporu. Ankara; 2019.
43. Harrington R, Al Nokhatha SA, Conway R. Jak inhibitors in rheumatoid arthritis: An evidence-based review on the emerging clinical data. *J Inflamm Res*. 2020;13:519–31.

44. Er Gülbezer E, Keser G. Biological treatments. *RAED Derg.* 2017;9(1–2):11–31.
45. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291–5.
46. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2015. p. 1–30.
47. Opara EC. Oxidative Stress. *Disease-a-Month.* 2006;52(5):183–98.
48. Burçak G;, Andican G. OKSİDATİF DNA HASARI VE YAŞLANMA. *Cerrahpaşa Tıp Derg.* 2004;35(4):159–69.
49. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003 Jul;17(10):1195–214.
50. Sezer K, Keskin M. Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü. *Fırat Üniversitesi Sağlık Billimleri Veterinerlik Derg.* 2014;28(1):49–56.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC. Redox Chemistry: The Essentials. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radical Biology and Medicine*. 5. Oxford University Press; 2015. p. 30–75.
52. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxidative Stress and Redox Regulation: Adaptation, Damage, Repair, Senescence, and Death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5. Oxford University Press; 2015. p. 199–283.
53. Lieberman M, Marks AD, Peet A. Oxygen Toxicity and Free Radical Injury. In: Rhyner S, editor. *Mark's Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
54. Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta.* 2006 Mar;365(1–2):30–49.
55. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Heal - Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120–39.
56. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2002 Jun 1;32(11):1102–15.
57. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* 2012 Dec 31;327(1–2):26–47.
58. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44–84.
59. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. Vol. 567, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 2004. 1–61 p.

60. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012 Apr 26;46(4):382–419.
61. Kaneo T, Tahara S, Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat Res - DNAGing Genet Instab Aging.* 1996;316(5–6):277–85.
62. Jaruga P, Dizdaroglu M. 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: Mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(9):1413–25.
63. Brooks PJ. The cyclopurine deoxynucleosides: DNA repair, biological effects, mechanistic insights, and unanswered questions. *Free Radic Biol Med.* 2017 Jun;107(September):90–100.
64. Chatgililoglu C, Ferreri C, Geacintov NE, Krokidis MG, Liu Y, Masi A, et al. 5',8-Cyclopurine Lesions in DNA Damage: Chemical, Analytical, Biological, and Diagnostic Significance. *Cells.* 2019 May 28;8(6):513.
65. Jaruga P, Xiao Y, Nelson BC, Dizdaroglu M. Measurement of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines in DNA in vivo by liquid chromatography/isotope-dilution tandem mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(4):656–60.
66. Jaruga P, Dizdaroglu M. Identification and quantification of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines in human urine as putative biomarkers of oxidatively induced damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;397(1):48–52.
67. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014.
68. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006;52(4):601–23.
69. Velazquez ALL, Beltrán M de la LM, Panduro A, Ruiz LH. Alternative Medicine and Molecular Mechanisms in Chronic Degenerative Diseases. *Chin Med.* 2011;02(03):84–92.
70. Schwedhelm E, Benndorf R, Boger R, Tsikas D. Mass Spectrometric Analysis of F2-Isoprostanes: Markers and Mediators in Human Disease. *Curr Pharm Anal.* 2007;3(1):39–51.
71. Roberts LJ, Fessel JP, Davies SS. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation. *Brain Pathol.* 2005;15(2):143–8.
72. Basu S, Helmersson J. Factors Regulating Isoprostane Formation In Vivo. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(3):221–35.
73. Phull A-R, Nasir B, Haq I ul, Kim SJ. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chem Biol Interact.* 2018 Feb;281(December 2017):121–36.

74. Fonseca LJS Da, Nunes-Souza V, Goulart MOF, Rabelo LA. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: What the Future Might Hold regarding Novel Biomarkers and Add-On Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Dec 16;2019:1–16.
75. Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, et al. Interaction between oxidative stress and high-density lipoprotein cholesterol is associated with severity of coronary artery calcification in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010 Oct;62(10):1473–80.
76. Kwaśny-Krochin B, Głuszko P, Undas A. Plasma asymmetric dimethylarginine in active rheumatoid arthritis: links with oxidative stress and inflammation. *Polish Arch Intern Med*. 2012 Apr 30;122(6):270–6.
77. Cayman Chemical Company. 8-Isoprostane ELISA Kit (516351). Michigan, ABD: Cayman Chemical Company; 2016.
78. Deane KD, Holers VM. The Natural History of Rheumatoid Arthritis. *Clin Ther*. 2019 Jul;41(7):1256–69.
79. Rall LC, Roubenoff R, Meydani SN, Han SN, Meydani M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a marker of oxidative stress in rheumatoid arthritis and aging: effect of progressive resistance training. *J Nutr Biochem*. 2000 Nov;11(11–12):581–4.
80. Seven A, Güzel S, Aslan M, Hamuryudan V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem*. 2008;41(7–8):538–43.
81. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(5):234–40.
82. Pemberton PW, Ahmad Y, Bodill H, Lokko D, Hider SL, Yates AP, et al. Biomarkers of oxidant stress, insulin sensitivity and endothelial activation in rheumatoid arthritis: A cross-sectional study of their association with accelerated atherosclerosis. *BMC Res Notes*. 2009;2:1–7.
83. Łuczaj W, Gindzienska-Sieskiewicz E, Jarocka-Karpowicz I, Andrisic L, Sierakowski S, Zarkovic N, et al. The onset of lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: Consequences and monitoring. *Free Radic Res*. 2016;50(3):304–13.
84. Klawitter J, Haschke M, Shokati T, Klawitter J, Christians U. Quantification of 15-F2t -isoprostane in human plasma and urine: results from enzyme-linked immunoassay and liquid chromatography/tandem mass spectrometry cannot be compared. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011 Feb 28;25(4):463–8.
85. Halliwell B, Gutteridge JMC. Measurement of Reactive Species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5. Oxford University Press; 2015. p. 284–353.

86. Kageyama Y, Takahashi M, Nagafusa T, Torikai E, Nagano A. Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2008 Jan 28;28(3):245–51.
87. Kageyama Y, Takahashi M, Nagafusa T, Torikai E, Nagano A. Methotrexate reduces the levels of pentosidine and 8-hydroxy-deoxy guanosine in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2007 Oct 19;17(5):398–402.
88. Kageyama Y, Takahashi M, Ichikawa T, Torikai E, Nagano A. Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF- α antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008;26(1):73–80.
89. Miculescu AA, Nordquist L, Hysing EB, Butler S, Basu S, Lind AL, et al. Targeting oxidative injury and cytokines' activity in the treatment with anti-tumor necrosis factor- α antibody for complex regional pain syndrome 1. *Pain Pract.* 2013;13(8):641–8.
90. Di Sabatino A, Santilli F, Guerri M, Simeone P, Ardizzone S, Massari A, et al. Oxidative stress and thromboxane-dependent platelet activation in inflammatory bowel disease: Effects of anti-TNF α treatment. *Thromb Haemost.* 2016;116(3):486–95.
91. Taylor OA, Hockenberry MJ, McCarthy K, Gundy P, Montgomery D, Ross A, et al. Evaluation of Biomarkers of Oxidative Stress and Apoptosis in Patients with Severe Methotrexate Neurotoxicity: A Case Series Southern Arizona VA Health Care System Tucson, Arizona HHS Public Access. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2015;32(5):320–5.
92. Hockenberry MJ, Taylor OA, Gundy PM, Ross AK, Pasvogel A, Montgomery D, et al. F 2 -Isoprostanes. *Biol Res Nurs.* 2014 Jul 15;16(3):303–9.
93. Sands SA, Harel BT, Savone M, Kelly K, Vijayanathan V, Welch JG, et al. Feasibility of baseline neurocognitive assessment using Cogstate during the first month of therapy for childhood leukemia. *Support Care Cancer.* 2017 Feb 10;25(2):449–57.
94. Bauerova K, Acquaviva A, Ponist S, Gardi C, Vecchio D, Drafi F, et al. Markers of inflammation and oxidative stress studied in adjuvant-induced arthritis in the rat on systemic and local level affected by pinosylvlin and methotrexate and their combination. *Autoimmunity.* 2015 Jan 2;48(1):46–56.
95. Rho YH, Oeser A, Chung CP, Milne GL, Stein CM. Drugs used in the treatment of rheumatoid arthritis: Relationship between current use and cardiovascular risk factors. *Arch Drug Inf.* 2009;2(2):34–40.
96. Rho YH, Oeser A, Chung CP, Morrow JD, Stein CM. Drugs to treat systemic lupus erythematosus: Relationship between current use and cardiovascular risk factors. *Arch Drug Inf.* 2008;1(1):23–8.
97. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev.* 2005 Jun;57(2):163–72.
98. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, et al. Methotrexate an old drug with new tricks. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20).

99. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Dec 27;12(12):731–42.
100. Spurlock CF, Gass HM, Bryant CJ, Wells BC, Olsen NJ, Aune TM. Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor κ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2014;54(1):178–87.
101. Sung JY, Hong JH, Kang HS, Choi I, Lim SD, Lee JK, et al. Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology*. 2000;47(1):35–44.
102. Jahovic N, Çevik H, Şehirli AÖ, Yeğen BÇ, Şener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*. 2003 Mar 26;34(4):282–7.

EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 2 58
FAKS	0 2
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4248-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Romatoid Artrit Tedavisinde Kullanılan Biyolojik Ajanların Oksidatif DNA Hasarına ve Lipid Peroksidasyonuna Etkilerinin İncelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna Sağlık Bilimleri Ens.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/22-48	Tarih:13.09.2018
	Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna'nın sorumlusu olduğu "Romatoid Artrit Tedavisinde Kullanılan Biyolojik Ajanların Oksidatif DNA Hasarına ve Lipid Peroksidasyonuna Etkilerinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOŞMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 [REDACTED]
FAKS	0 232 [REDACTED]
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4248-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Romatoid Artrit Tedavisinde Kullanılan Biyolojik Ajanların Oksidatif DNA Hasarına ve Lipid Peroksidasyonuna Etkilerinin İncelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna Sağlık Bilimleri Ens.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
				Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	Araştırmacı dilekçesi	Mevcut				

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2021/14-42	Tarih:06.05.2021
	Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna'nın sorumlusu olduğu "Romatoid Artrit Tedavisinde Kullanılan Biyolojik Ajanların Oksidatif DNA Hasarına ve Lipid Peroksidasyonuna Etkilerinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait araştırmacı dilekçesine ilişkin olarak; -Çalışma adının "Çalışma başlığının "Romatoid Artrit Hastalarında Oksidatif DNA Hasarı ve Lipit Peroksidasyon Düzeylerinin Prospektif Olarak İncelenmesi" olarak değiştirilmesi ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Emel Çalikoğlu (Başkan Yardımcısı)	Preventif Onkoloji	Onkoloji Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr. Aliye Akcalı	Periodontoloji	Diş Hekimliği Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	

EK-2:

**ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ
GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

(Hekimin Açıklaması)

Sayın gönüllü,

“Romatoid Artrit Hastalarında Oksidatif DNA Hasarı ve Lipit Peroksidasyon Düzeylerinin Prospektif Olarak İncelenmesi” başlıklı araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız.

Çalışmamızın amacı, romatoid artrit tedavisinde kullanılan farklı alt gruplardaki biyolojik ajanların oksidatif stresin duyarlı göstergeleri olan oksidatif DNA hasarı ve lipit peroksidasyonu düzeylerine etkisini inceleyerek uzun vadede etkinliklerini değerlendirmektir. Ayrıca, hastaların hastalık aktivite skoru ve inflamasyon parametrelerinin karşılaştırılması ve bu sayede romatoid artrit tedavi süreçlerine katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Katılımınız durumunda sizden tedaviye başladığınız gün ve tedavinizin altıncı ayında sabah ilk idrar örnekleri alınacaktır. İdrar örneklerinin toplanma işlemi için hastaneye gelmeniz gerekmemektedir. Evde aldığınız sabah ilk idrar örneğinin belirli bir süre içinde teslim edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda idrar örneğinizden DNA hasarı ve lipit peroksidasyon ürünleri ölçülecektir.

Çalışmaya katılmakla parasal bir yük altına girmeyeceksiniz ve bu çalışma bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumuna da ek bir mali yükümlülük getirmeyecektir. Tüm çalışma masrafları, araştırma bütçesinden karşılanacaktır. Çalışmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu çalışmada sizin için beklenen bir rahatsızlık ya da risk söz konusu değildir. Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar kişisel bilgilerinizi araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak, kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Çalışmanın sonunda size ait sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Bu bilgiyi sizin dışınızda biriyle paylaşmamız da ancak sizin izninizle olacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz. Reddettiğiniz takdirde de hastalık takibiniz olağan şekilde devam edecektir. Eğer çalışmaya katılmaya karar vererseniz imzalamanız için size bu “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” verilecektir. Çalışmadan herhangi bir zamanda, mazeret belirtmeksizin ayrılmakta özgürsünüz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Kendi başıma belirli bir düşünme süresinden sonra, tıbbi amaç ile gerçekleştirilecek olan bu araştırmaya “katılımcı” olarak katılma kararı aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütölmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Aynı şekilde araştırmacı da beni çalışma dışı bırakabilir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmadım. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime bir zarar

getirmeyeceğini biliyorum. Aklıma takılan herhangi bir soru olur ise 0555
numarasından Uzm. Dr. Aydan KÖKEN AVŞAR'a ulaşabilirim.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyor ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Araştırmacı, saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Bu çalışma için alınan idrar örneklerinin daha sonra farklı bir bilimsel araştırma amacıyla kullanılmasına:

() izin veriyorum

() izin vermiyorum

Romatoid Artrit Hastalarında Lipit Peroksidasyon Düzeylerinin Klinik Bulgular İle İlişkisinin Prospektif Olarak İncelenmesi

Romatoid artrit (RA), kronik, inflamatuvar, otoimmün bir hastalıktır. Tanıyı takiben hastaya hastalık modifiye edici anti-romatizmal ilaçlar (DMARD) verilmektedir. Endojen veya ekzogen yollar sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türleri; hücre membranındaki lipitler, hücre içi proteinler veya DNA gibi makromolekülleri oksidatif hasara uğratarak birçok hastalık ile ilişkilendirilen hasarlı ürünlerin oluşumuna yol açmaktadır (Şekil 1). Esterlenmiş araşidonik asidin serbest radikal katalizli peroksidasyonu sonucu üretilen, F2-izoprostan ailesinin bir üyesi olan 8-izoprostan National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) tarafından gerçekleştirilen Oksidatif Stres Biyobelirteçleri Çalışması'nda, kararlı yapısıyla endojen lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde 'altın standart' olarak tanımlanmıştır .

Serbest Radikal Arçları Oksidatif Hasar

Azotemier, Parkinson, MS, ALS, OCD,
Otim, Depresyon, Bipolar Bozukluk

Beyin

Makula Dejenerasyonu,
Katarakt, Retina GÖZ
Dejenerasyonu

KALP

Kalp Krizi, İmmü-
nite Yetersizliği,
Ateroskleroz

KİÇİKLER

Astım, Akut,
Kronik Bronzit,
Kanserlar

BÖBREK

Kronik Böbrek
Yetmezliği, Renal Nefrit

DAMARLAR

Ateroskleroz,
Yaslı Kolesterl,
Varis

DERİ

Kirpikli, Akne, Egama,
Psoriasis, Kanseri

İMÜN SİSTEM

Otomünitiler, Halk Hastası,
Lupus, Hepes, HIV,
Hepati, Kanseri

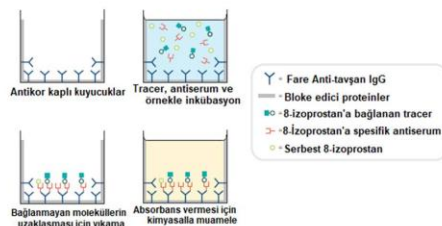
EKLEMLER

Romatoid Artrit,
Osteoartrit, Psoriatik
Artrit

MULTİ-SİSTEMLİK

Dişet, Fibromyalji, Kronik
Yorgunluk Sendromu

DEÜ Hastanesi Romatoloji polikliniğine başvuran ve yeni tanı alan 54 hastanın tanı aldıklarında (0. ay) ve tedavilerinin altıncı ayında sabah ilk idrar örnekleri toplandı. Ayrıca 29 sağlıklı gönüllünün sabah ilk idrar örnekleri çalışmaya dahil edildi (Etik Kurul Karar No: 2018/22-48). Hasta ve sağlıklı kontrol grubu idrar örneklerinde lipit peroksidasyon ürünü 8-izoprostan düzeyinin ölçümü ELISA (Cayman Chemical, ABD) yöntemi ile gerçekleştirildi (Şekil 2). ELISA okuyucusunda belirlenen optik yoğunluklara göre 8-izoprostan konsantrasyonu pg/mL olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar kreatinin ile normalize edildi. Hastalar ileri dönük olarak 6 ay boyunca izlenerek tedavi öncesi ve sonrası 8-izoprostan düzeyleri değerlendirildi ve klinik bulgularla ilişkisi araştırıldı. Tüm istatistiksel analizler SPSS 24.0 ve Graphpad Prism 9 sürümleri ile yapıldı. p değeri 0,05'ten düşük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Hastaların tanı aldıklarında ölçülen 8-izoprostan düzeyleri, sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,001$). Hastaların tedavinin altıncı ayında ölçülen 8-izoprostan seviyelerinde, tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir yükselme gözlemlendi ($p=0,016$) (Şekil 3 ve 4). Hastaların tedavilerinin altıncı ayında ölçülen DAS28 skorlarında anlamlı bir düşüş saptandı ($p<0,001$) (Şekil 5). Hastaların tanı alındığı an ölçülen DAS28 skoru ile HAQ skorları arasında pozitif yönde güçlü korelasyon bulundu ($r=0,714$; $p<0,001$). Hastaların klinik bulguları ve 8-izoprostan seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 6).



Bar chart showing 8-izoprostan levels (ng/mg Kreatinin) for three groups. The y-axis ranges from 0.00 to 2.50. The x-axis categories are Hasta grubu and Sağlıklı Kontrol. The legend indicates three series: Hasta 0.gy (light blue), Hasta 6.gy (dark blue), and Sağlıklı Kontrol (green).

Grup	Hasta 0.gy (ng/mg Kreatinin)	Hasta 6.gy (ng/mg Kreatinin)	Sağlıklı Kontrol (ng/mg Kreatinin)
Hasta grubu	1.47	2.22	-
Sağlıklı Kontrol	-	-	0.71

[illegible]

- Sonuçlarımız, literatürle uyumlu olarak RA hastalarında lipid peroksidasyonunun arttığını göstermiştir.
- Hastaların altıncı ayda ölçülen DAS28 skorlarında tespit edilen düşüş, tedavinin etkinliğini ortaya koymuştur.
- Tedavi sonrası, hastalığın regresyonu ile birlikte beklenen 8-izoprostan seviyesindeki düşüşün aksine 8-izoprostan düzeylerinin yükseldiği görülmüştür.

EK-4: ÖZGEÇMİŞ



YAĞMUR YAVAŞ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Ka [REDACTED]

Telefon

(55 [REDACTED])

E-posta

Y [REDACTED]

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

29 Ocak 2018 - Şu Anda (3 yıl 5 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.35 / 4.0

05 Eylül 2012 - 30 Haziran 2016 (3 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, HALIÇ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PR. (%50 BURSLU)
Diploma Numarası: 560
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.35 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: Orta)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Anahtar Kelimeler

Sıvı Kromatografi-Kütle/Kütle Spektrometri
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri
Oksidatif DNA Hasarı
Lipit Peroksidasyonu
ELİZA

Ar-Ge Yetkinlik

Bildiriler

H. ŞAHİN, G. TUNA, A. S. YENER, S. C. ADIYAMAN, B. ÖZGEN SAYDAM, N. E. DAL, Y. YAVAŞ & G. H. İŞLEKEL, COMPARISON OF IMMUNOASSAY AND LIQUID CHROMATOGRAPHY- TANDEM MASS SPECTROMETRY METHODS FOR MEASURING SALIVARY CORTISOL, Poster Sunumu, 31. ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ , 18 Aralık 2020, 20 Aralık 2020, 45, 52, 70 - null.

Y. YAVAŞ, G. TUNA, N. E. DAL, G. H. İŞLEKEL, A. KÖKEN AVŞAR, Y. EREZ, S. B. KOCAER, F. ÖNEN, G. CAN & A. M. BİRLİK, PROSPECTIVE INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN LIPID PEROXIDATION LEVELS AND CLINICAL FINDINGS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS, Poster Sunumu, 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, 18 Aralık 2020, 20 Aralık 2020, 1303-B29X, 45, 52, 76 - null.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0