



**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FİZİKSEL TIP VE REHABİLİTASYON ANABİLİM DALI**

**METOTREKSAT TEDAVİSİ GÖREN ROMATOİD ARTRİTLİ  
HASTALARDA İLAÇ YAN ETKİSİ İLE  
METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GEN POLİMORFİZMİ  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Şuayb SEVİÇKAN  
UZMANLIK TEZİ**

**SİVAS  
2010**



**T. C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FİZİKSEL TIP VE REHABİLİTASYON ANABİLİM DALI**

**METOTREKSAT TEDAVİSİ GÖREN ROMATOİD ARTRİTLİ  
HASTALARDA İLAÇ YAN ETKİSİ İLE  
METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GEN POLİMORFİZMİ  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Şuayb SEVİÇKAN  
UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Hasan ELDEN**

**SİVAS  
2010**

## ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN:

ÜYE:

ÜYE:

Bu tez, 11/10/ 2010 tarih ve 2010/265 sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet ŞENCAN

Tıp Fakültesi Dekanı

Tıpta Uzmanlık Tez Yazım Yönergesi, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 10/ 02/ 2010 tarih ve 2010/ 1-2 sayılı kararı ile kabul edilerek yürürlüğe girmiştir.

## TEŞEKKÜR

Cumhuriyet Üniversitesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalındaki eğitimim süresince gerek bilimsel gerekse insani açıdan örnek olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum tez danışmanım, Ana Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Hasan ELDEN'e, asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım ve birlikte çalışmaktan kıvanç duyduğum Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Sami HİZMETLİ' ye, Sayın Prof. Dr. Ece KAPTANOĞLU' na, Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem ŞAHİN'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr.Emrullah Hayta'ya uzmanlık eğitimim boyunca yaptıkları akademik katkılarından dolayı teşekkür etmeyi bir borç bilir ve sonsuz saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın istatistiksel incelemesinde emeğini ve deneyimlerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR' a teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım. Tez çalışmamda yardım ve önerilerini esirgemeyen Tıbbi Genetik A. D. Başkanı Sayın Prof. Dr. İlhan SEZGİN, Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR, Dr. Şenol ÇİTLİ ve Uzm. Dr. Nadir KOÇAK'a teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım.

Aynı çalışma ortamını paylaştığım sevgili asistan arkadaşlarıma, hemşirelerimize, sekreterlerimize ve diğer tüm personelimize sonsuz teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her türlü konuda ve her zaman desteğini gördüğüm, yaptıklarını hiçbir şeyle ödeyemeyeceğim anneme, babama, kardeşlerime, her zaman desteğini esirgemeyen sevgili eşime ve yuvamızın neşesi canım kızıma sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Şuayb SEVİÇKAN

## ÖZET

Romatoid Artrit (RA) etyolojisi bilinmeyen, simetrik eroziv sinovitle karakterize, bazı ekstraartiküler tutulumlar yapan, otoimmün bir hastalıktır. RA hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan olan yaygın şekilde kullanılan Metotreksat (MTX) ile 1980'den itibaren tedavi edilmeye başlanmıştır. Folik asit antagonisti olan MTX'in kullanımında, çevresel nedenler yanında bireyin genetik yapısındaki değişkenliklerin etki ve toksisite gelişimine neden olabileceği bildirilmektedir. Folat metabolizmasında yer alan enzimlerde meydana gelen polimorfizmler, farklı etkilerle ilişkili olabilir.

Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR), MTX ile tedaviye yanıtta yer aldığı için, MTX' in etkilerini düzenlemek için kuvvetli bir adaydır. MTX kullanımına bağlı olarak ilaç kaynaklı toksisite ve yan etki oluşumunda, MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerindeki risk faktörü olup olmadığının araştırılması amacıyla çalışma ve kontrol grubu olmak üzere toplam 52 hasta çalışılmıştır.

Bu çalışmaya yan etki gözlenen ve yan etki gözlenmeyen gruplarda Amerikan Romatoloji Cemiyetinin (ACR) 1987 yılında yenilediği RA sınıflama kriterlerine göre belirlenmiş olan 52 RA'li hasta alındı. Her iki grupta tam kan sayımı, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri, Romatoid Faktör (RF), eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), C-reaktif protein (CRP), Anti-Cyclic Citrullin Peptid (anti-CCP) değerleri ölçüldü. Toplam 52 hastadan periferik kan örnekleri aldık. Bu örneklerden DNA izole edildi. MTHFR C677T ve A1298C varyant allelleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle belirlendi.

Çalışmamızda yan etki gözlenen grupta ve yan etki gözlenmeyen gruplarda sırasıyla MTHFR C677T (% 40 CC, % 46,7 CT % 13,3 TT), (% 40 CC, % 45.7 CT, % 14.3 TT) ve A1298C (% 40 AA, % 53.3 CT % 6.7 TT), (% 42.9 AA, % 48.6 AC, % 8.6 CC) genotipleri açısından analiz edildiğinde aralarında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir (  $p>0.05$  ).

Sonuç olarak alışmamızda MTHFR A1298C ve C677T gen polimorfizmlerinin MTX tedavisi gören Romatoid Artrit hastalarında yan etki gelişimi için risk faktörü oluşturmadığı saptanmıştır. Ancak kesin sonuçlara varılabilmesi için daha genis hasta gruplarının incelendiği kapsamlı çalışmalara ihtiyaç oldugunu dşnmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Romatoid Artrit, Metotreksat, Metilentetrahidrofolat Redüktaz

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease that is characterized by symmetric erosive synovitis with some extra-articular involvements and its etiology is unknown. Since 1980 MTX, one of the most widely used disease modifying antirheumatic drugs, has been used for treatment of RA. It is announced that in treatment with MTX which is a folic acid antagonist, with the environmental factors, variabilities in the structure of individuals can contribute developing efficacy and toxicity.

It is possible that polymorphisms in enzymes involved in folate metabolisms may be related to these variable effects. MTHFR is a strong candidate for mediating the effects of MTX, because it is involved in the response to treatment with MTX.

To determine whether the MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms are risk factor for the Methotrexate induced toxicity and side effects, we genotyped MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in fifty two patients which were classified as working group and control group. In occurred side effect and didn't occur side effect groups fifty two RA patients who fulfilled 1987 American College of Rheumatology (ACR) criteria were enrolled in the study. Parameters such as clinical characteristics and treatment were questioned in working group. Complete blood count, kidney and liver function tests, rheumatoid factor (RF), erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, Anti-Cyclic Citrullinated Peptide (anti-CCP), homocysteine values of RA patients were measured in both groups. Disease Activity Score (DAS 28) for disease activity were assessed. Peripheral blood samples were obtained from fifty two patients. DNA was extracted from these samples. MTHFR C677T and A1298C variant alleles were determined by PCR (polymerase chain reaction).

In our study in occurred side effect and didn't occur side effect groups in order MTHFR C677T (% 66.7 CC, %26.7 CT % 6.7 TT), (%77.3 CC, % 22.7CT, % 0.0 TT) and A1298C (% 56.7 AA, %30 AC, % 13.3 CC), (%63.6 AA, % 27.3



AC, % 9.1 CC) analysed in terms of genotypes, no statistically difference was observed ( $p > 0.05$ ).

In conclusion, MTHFR A1298C and C677T polymorphisms were not found as a risk factor for developing side effects in patients with rheumatoid arthritis who were treated with MTX. But we need further investigations including higher numbers of patients to obtain more accurate results.

**Keywords:** Rheumatoid Arthritis, Methotrexate, Metilentetrahydrofolat Redüktaz

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
GRAFİKLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xii
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER .....	4
1.ROMATOİD ARTRİT .....	4
1.1. TANIM .....	4
1.2. TARİHÇE .....	4
1.3. EPİDEMİYOLOJİ.....	4
1.4. ETYOLOJİ.....	5
1.4.1. Genetik .....	5
1.4.2. Çevresel Faktörler .....	5
1.4.3. Cinsiyet.....	6
1.4.4. Enfeksiyöz Ajanlar .....	6
1.5.PATOGENEZ .....	7
1.5.1. Morfoloji.....	7
1.5.2. İmmunopatogenez.....	7
1.6. KLİNİK.....	9

1.6.1 Başlangıç Tipleri.....	10
1.6.2. Eklem Tutulumu .....	11
1.6.3. Ekstra Artiküler Bulgular .....	12
1.7. TANI.....	13
1.8. AYIRICI TANI .....	13
1.9. LABORATUAR.....	14
1.10. TEDAVİ.....	16
1.10.1. Kısa Etkili İlaçlar .....	16
1.10.2. Uzun Etkili İlaçlar .....	18
1.10.3. Romatoid Artritte Yeni Tedaviler.....	22
2. METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ ENZİMİ .....	23
2.1. METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) GENİ .....	25
2.1.1. MTHFR Genin Lokalizasyonu .....	25
2.1.2 MTHFR Psödogenleri .....	27
2.2. MTHFR Proteinin Yapısı.....	28
2.3. MTHFR Geninde Rastlanan Mutasyon Tipleri.....	28
2.3.1.Nonsense Mutasyonlar .....	29
2.3.2. Missense Mutasyonlar.....	30
2.3.3. Diğer mutasyonlar.....	31
2.4. MTHFR Gen Polimorfizmleri.....	31
2.4.1. MTHFR C677T.....	32
2.4.2. MTHFR A1298C .....	32
2.4.3. MTHFR A1298C ve C677T Mutasyonlarının Kombinasyonu .....	33
2.4.4. Diğerleri.....	34

2.5. MTHFR gen polimorfizmlerinin dağılım frekansları.....	34
2.5.1. Sekse Göre Dağılım .....	35
2.5.2. Yaşa Bağlı Prevalans.....	36
OLGULAR VE YÖNTEM .....	36
BULGULAR .....	45
TARTIŞMA.....	55
KAYNAKLAR.....	61

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 1: Romatoid Artrit ile İlişkili Laboratuar Bulguları.....	15
Tablo 2: Her İki Gruptaki Bireylerin anti-CCP ve ESH Değerleri Yönünden Karşılaştırılması .....	46
Tablo 3: Her İki Gruptaki Bireylerin MTHFR C677T Gen Polimorfizmi Yönünden Karşılaştırılması .....	47
Tablo 4: Her İki Gruptaki Bireylerin MTHFR A1298C Gen Polimorfizmi Yönünden Karşılaştırılması .....	49
Tablo 5: Her İki Gruptaki Bireylerin anti-CCP varlığı Karşılaştırılması .....	51
Tablo 6: Her iki gruptaki bireylerin DAS28 Skorlarının Karşılaştırılması.....	52
Tablo 7 : Her İki Gruptaki Bireylerin RF varlığı Karşılaştırılması .....	54

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Methotrexate' in Hücresel Metabolizması .....	21
Şekil 2: MTHFR enziminin rolünü gösteren mekanizma. Enzim iki döngü arasında metil transferinde rol oynar.....	24
Şekil 3: İnsan 1.kromozom idiogramı üzerinde MTHFR genin lokalizasyonu ....	26
Şekil 4: Vienna Lab CVD StripAssay (Manufactured by: ViennaLab Vienna, Austria) .....	44

**GRAFİKLER LİSTESİ**

Grafik 1: Her İki Gruptaki Hastaların MTHFR C677T Gen Polimorfizmi Dağılımı.....	48
Grafik 2: Her İki Gruptaki Bireylerin MTHFR A1298C Gen Polimorfizmi Dağılımı.....	50
Grafik 3: Her İki Gruptaki Hastaların DAS28 Skoru Dağılımı.....	70

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>A</b>	: Adenin
<b>ABC</b>	: ATP-binding cassette
<b>Ala</b>	: Alanin
<b>ARA</b>	: American Rheumatism Association
<b>Arg</b>	: Arjinin
<b>Asn</b>	: Asparajin
<b>RA</b>	: Romatoid Artrit
<b>CRP</b>	: C-Reaktif Protein
<b>ESH</b>	: Eritrosit Sedimantasyon Hızı
<b>RF</b>	: Romatoid faktör
<b>DAS 28</b>	: Hastalık aktivite skoru
<b>DİF</b>	: Distal İnter Falanjiyal Eklem
<b>PİF</b>	: Proksimal İnter Falanjiyal Eklem
<b>MKF</b>	: Metakarpo Falanjiyal Eklem
<b>MTF</b>	: Metatarso Falanjiyal Eklem
<b>ACR</b>	: Amerikan Romatizma Derneği
<b>NSAİİ</b>	: Non steroidal anti inflamatuvar ilaçlar
<b>DMARD</b>	: Hastalık modifiye edici ilaçlar
<b>MRG</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>BT</b>	: Bilgisayarlı tomografi
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	: İnterferon-gama
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktör-alfa
<b>ILGF</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
<b>GM-CSF</b>	: Granülosit monosit- koloni stimüle edici faktör
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
<b>SLE</b>	: Sistemik lupus eritematozus
<b>CPPD</b>	: Kalsiyum pirofosfat birikimi hastalığı
<b>Th2</b>	: T helper 2
<b>Th1</b>	: T helper 1
<b>MMP</b>	: Matrix Metallo Proteinaz
<b>C</b>	: Sitozin



<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>Cys</b>	: Sistein
<b>DHFR</b>	: Dihidrofolat redüktaz
<b>dsDNA</b>	: Çift iplikli DNA
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>G</b>	: Guanin
<b>Gln</b>	: Glutamik asit
<b>Glu</b>	: Glutamin
<b>Gly</b>	: Glisin
<b>HLA</b>	: İnsan Lökosit Antijen
<b>KCFT</b>	: Karaciğer Fonksiyon Testleri
<b>Met</b>	: Metionin
<b>MTX</b>	: Methotrexate
<b>MHC</b>	: Major Histocompatibility Complex
<b>MTHFR</b>	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>RE</b>	: Restriksiyon Enzimi
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RT-PCR</b>	: Real Time PCR
<b>Ser</b>	: Serin
<b>SNP</b>	: Single Nucleotid Polymorphism
<b>T</b>	: Timin
<b>THF</b>	: Tetrahidrofolat
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$
<b>Trp</b>	: Triptofan
<b>TYMS</b>	: Timidilat sentetazı
<b>Val</b>	: Valin
<b>5,10-metilen THF</b>	: 5,10 metilentetrahidrofolat
<b>5-metil THF</b>	: 5-metil tetrahidrofolat

## GİRİŞ VE AMAÇ

RA etyolojisi belli olmayan, tüm sinovyal eklemleri simetrik olarak tutabilen, kronik inflamasyonla seyreden ileri dönemlerde fonksiyon kaybına ve mortaliteye neden olabilen oldukça yaygın otoimmün bir hastalıktır (1)

Romatoid sinoviyumda aktive lenfositler, makrofajlar ve fibroblastlardan salgılanan bir takım maddelerin birikimi mevcuttur. Bu sitokin ve kemokinlerin lokal üretimi RA'nın pek çok klinik tablosunun oluşumuna neden olur. Bu sitokin ve kemokinlerin etkilerine bağlı olarak sinoviyal doku ve sinoviyal sıvı inflamasyonu, sinoviyal proliferasyon, kıkırdak ve kemik hasarı meydana gelir (2). Romatoid Artrit tedavisinde sıklıkla Methotrexate, Leflunomide, Sulfasalizin gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar bazı hastalarda mide ağrısı, kusma, diyare şeklinde ortaya çıkan gastrointestinal sistem komplikasyonları ve karaciğer fonksiyon değerlerindeki artış sonucu hepatotoksisite gelişimi gözleendiği durumlarda tedavinin kesilmesi önerilmektedir (3,4,5). Genel olarak bireyler ilaç tedavilerine karşı farklı yanıtlar vermektedirler. Bu farklı yanıt verme nedenleri arasında, hastanın yaşı, ırkı, cinsiyeti, çevre, ilaç etkileşimleri, eşlik eden başka hastalıklar ve hastanın eş zamanlı aldığı tedaviler gibi pek çok neden sayılabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla ilaçlara karşı oluşan yanıt farklılıklarında bu nedenlerin yanında bireyler arasındaki genomik farklılıkların da önemli oranda etkili oldukları belirtilmektedir (2,6). MTX, diğer hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlara oranla nispeten daha hızlı etkiye ve en iyi etki / toksisite oranına sahip olması nedeniyle daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bunun yanında MTX kullanılan bazı Romatoid artrit hastalarında, MTX kullanımına bağlı olarak gelişen birtakım komplikasyonlar nedeniyle tedaviye devam edilemediği gözlenmiştir (7,8).

Romatoid artrit aktivitesinin baskılanması için gerekli olan MTX dozunun, Romatoid Artritli bazı hastalar arasında farklılıklar oluşturabileceği bazı durumlarda ise MTX tedavisinin etkisiz kalabileceği belirtilmektedir. Sonuç olarak, bazı hastalarda MTX kullanıma bağlı olarak yan etki oluşumu gözlenirken, bazı hastalarda gözlenmediği belirtilmektedir.

Kapsamlı araştırmalara rağmen MTX' ın etki mekanizmasının bugün hala tam olarak bilinmemesi nedeniyle, MTX tedavisinden hangi hastaların yararlanacağı, hangi hastalarda yan etkilerin görülebileceği önceden tahmin edilememektedir. MTX, homosistein-metionin yolağında bulunan biręok metabolik yolakta etkili olan folik asit antagonisti olarak hücre metabolizmasında, dihidrofolat redüktazı inhibe etmesi yanında, 5,10-metilentetrahidrofolatın (5,10-metilen THF) irreversible olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüşümünü engelleyebilir (5).

Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) enzimi folat metabolizmasının en önemli enzimlerinden biri olup, 5,10-metilen THF irreversible olarak 5-metil THF dönüştürür (9). Bugüne kadar yapılan ęalıřmalarla bu enzimini kodlayan MTHFR geninde biręok mutasyon ve polimorfizm tanımlanmıştır (10, 11). MTHFR geninde tanımlanan en önemli polimorfizmlerden biri MTHFR C677T polimorfizmidir. İlk defa 1995 yılında tanımlanan bu genetik değişiklik 1997 yılına kadar mutasyon olarak, sonrasında ise toplumlarda %1 den fazla sıklıkla gözlenmesi nedeniyle polimorfizm olarak tanımlanmıştır (12,13). Bu polimorfizm, MTHFR enzim aktivitesinin azalmasına neden olmakta, azalan enzim aktivitesi sonucunda 5-metil THF düzeyi azalmakta, 5,10-metilen THF miktarı ve plazma homosistein düzeyi ise artmaktadır. Yapılan ęalıřmalarla, MTHFR C677T gen polimorfizminin enzim aktivitesini etkilemesi nedeni ile kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar ve nöral tüp defektlerin gelişiminde önemli bir genetik risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (9). MTHFR geninde 1998 yılında tanımlanan ve yaygın olarak görülen diğer bir polimorfizm A1298C polimorfizmidir (14). A1298C polimorfizmi de C677T polimorfizmine benzer etki göstererek enzim aktivitesini azaltmaktadır. Bu azalan enzim aktivitesinin nöral tüp defektleri, prostat kanseri ve kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü oluşturduğu belirlenmiştir (9,15,16). ęeřitli araştırmalarla, MTX tedavisi gören bazı kanser ve Romatoid artritli hastalarda C677T ve A1298C polimorfizmlerine bağlı olarak toksisite gelişebildiği belirtilmiştir (5,17).

Bu çalışma ile MTX tedavisi gören Romatoid artritli hastalardan ilaç yan etkisi görülen hasta ile ilaç yan etkisi görülmeyen hasta grupları karşılaştırarak MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin ilaç yan etki gelişimi üzerinde etkili olup olmadığının araştırılarak; gen polimorfizmlerinin yan etki gelişimi üzerinde etkili bulunması halinde, yan etki gelişme riski yüksek olan hastaların önceden belirlenip hastalarda oluşabilecek yan etkilerin en aza indirilmesini ve etkin bir tedavinin sağlanmasını amaçladık.

## **GENEL BİLGİLER**

### **1.ROMATOİD ARTRİT**

#### **1.1. TANIM**

RA, özellikle periferik sinovyal eklemleri simetrik tutan, kronik, sistemik, progressif, multifaktoryel orjinli olup; uygun genetik zeminde immün yanıt ve kronik inflamasyonla karakterize, kimi zaman belirgin derecede eklem dışı tutulumun da eşlik ettiği fonksiyon kaybına ve uzun dönemde mortaliteye neden olan inflamatuvar artritler içinde en sık görülen otoimmün bir hastalıktır (18).

#### **1.2. TARİHÇE**

Tıp tarihçileri, medikal yazılarda RA teriminin ilk kez ne zaman kullanıldığı konusunda hala net bir bilgiye sahip değillerdir. Kimi yazarlar RA'nın yakın zamanlarda ortaya çıktığı yorumunu yaparken, Soranus'un yazılarını yorumlayan diğer bir grupta ikinci yüzyılda RA'li bir hastanın tanımlandığını ileri sürmektedirler. İngiliz genetikçi ve klinisyen olan Sir Alfred Garrot 1876'da ilk kez RA terimini kullanmıştır. Storey ve ark. İngiltere'deki hastane kayıtlarındaki araştırarak yaptıkları bir çalışmada, hastalığın 1600'lü yıllarda Sydenham tarafından tarif edildiğini tespit etmişlerdir (18).

#### **1.3. EPİDEMİYOLOJİ**

RA hemen hemen tüm toplumlarda görülmektedir. Dünya çapındaki prevalansı % 0,8 (değişik toplumlarda sıklığı % 0,3-2,1 arasında bildirilmiştir) olarak tahmin edilmektedir. Hastalığın başlangıcı en sık dördüncü ve beşinci dekatlardadır. RA bayanları erkeklere oranla 2,5 kat daha sık tutmakta birlikte, kadın erkek oranı 2/1– 4/1 arasında değişmektedir. Yaş ilerledikçe cinsiyet farkı azalmaktadır. İnsidansı 60-64 yaş arası kadınlar da 18-29 yaş arası kadınlara göre 6 kat daha fazladır (19).

Hastaların %80'i 35-50 yaşları arasındadır. Genellikle genç erişkinlerin hastalığı olmakla birlikte tüm yaşlarda ortaya çıkabilir. RA insidansı erişkin dönemde dramatik olarak artar; ancak erkeklerde 40 yaşından 60 yaşına doğru artış vardır (20). Hastalık prevalansı dünya genelinde benzer oranlarda olsa da

bunun bazı istisnaları vardır. Örneğin, bazı Kızılderili topluluklarında RA % 5,3-6,8 gibi yüksek oranlarda görülürken, Güney-Doğu Asya, Çin ve Japonya'da çok düşük oranlarda (%0,2-0,3 ) görülmekte; hatta bazı Afrika topluluklarında neredeyse hiç RA hastasına rastlanmamaktadır (21). Ülkemizde RA epidemiyolojisine yönelik yapılan ilk çalışma 1968 yılında ve yaklaşık 10.000 kişi taranarak yapılmış ve prevalansı %0.22 oranında bulunmuştur. Daha sonra yapılan bölgesel çalışmalarda (Karadeniz, Ege) prevalans %0.36 ile %3,7 arasında bulunmuştur (22).

## **1.4. ETYOLOJİ**

### **1.4.1. Genetik**

RA'da genetik bir etki olduğu kabul edilmektedir. RA hastalarının birinci derece akrabalarında RA görülme riski 16 kat artmış olarak bulunmuştur. Bu genetik faktörlerin 6. kromozomda bulunan HLA sistemi genlerine bağlı olduğu ve bir tek genetik bozukluktan çok birkaç genin RA'yı etkilediği düşünülmektedir. Bu özellikle HLA-DR4 ile RA arasındaki ilişkinin tanımlanmasının ardından, hastalığa neden olan genetik faktörlerle ilgili bilgiler hızla artmıştır (24). RA'li hastaların birinci derece yakınlarında hastalık görülme oranı genel popülasyondan daha yüksektir. Monozigotik ikizlerde, ikizlerden biri hastalandığında diğerinde de hastalık görülme oranı %30-50 iken, dizigotik ikizlerde bu oran %2-5 kadardır. Antijen sunan hücreler üzerindeki klas 2 yüzey moleküllerinin yapısı RA'e yatkınlıkta ve RA şiddetinde çok önemlidir. HLA-DR4, RA'li hastaların %70'inde bulunurken bu oran kontrollerde %30 oranındadır. Böylece HLA-DR4 bulunan kişilerde RA olma riski 4 ile 5 kat artmaktadır (23).

### **1.4.2. Çevresel Faktörler**

RA'nın ailesel tekrar riskinin beklenildiği kadar yüksek olmaması, monozigotik ikizlerde konkordansın %100 olmaması ve ikizlerde görülen değişkenliğin ancak %50'sinin genetik faktörlerle açıklanabiliyor olması, RA gelişiminde çevresel faktörlerin de rolü olduğunu düşündürür. Çevresel faktörler

genelde saptanabilen genetik faktörlerin dışında hastalığa yatkınlık oluşturabilecek tüm faktörler olarak ifade edilirler. Ancak bu faktörlerin bir kısmı, diyet, sigara, kahve kullanımı, enfeksiyonlar gibi gerçekten çevresel faktörler olmasına karşın bir kısmı hormonal değişiklikler, gebelik, laktasyon gibi açıkça genetik temeli olmayan internal faktörler de olabileceğinden “genetik dışı konakçı faktörleri” daha uygun bir tanımlama olabilir (22). Sigara içimi RA gelişimi ve hastalık şiddeti ile ilişkili görülmektedir. Ancak henüz sigaranın nasıl olup da hastalık riskini ve şiddetini artırdığı tam olarak aydınlatılamamıştır, Ayrıca kahve tüketiminin RA gelişimi ve romatoid faktör pozitifliği ve vücut kitle indeksinin RA ile ilişkili olabileceğine dair bulgular da bildirilmiştir (25).

### **1.4.3. Cinsiyet**

RA'nın bayanlarda daha fazla görülmesi, gebelikte remisyona girip, gebelik sonrası %90 nüks etmesi, premenopozal ve postmenopozal dönemlerde sıklık ve seyirlerinin farklı olması, erkeklerde daha az görülmesi bu hastalık üzerinde hormonal etkinin olduğuna işaret etmektedir (26). RA kadınlarda daha sık (erkeklerle oranla kadınlarda ortalama 3 kat fazla) görülmekte ve daha şiddetli seyretmektedir. Doğum yapmamışlarda RA gelişme riski 2-3 kat daha fazladır. Hamilelikte RA'lı hastalarda % 75'e varan oranda remisyon gözlenmektedir, hamilelik sonrası olguların % 80-90'ında semptomlar tekrar alevlenmektedir (20).

### **1.4.4. Enfeksiyöz Ajanlar**

RA'e etken olan ajanlar arasında enfeksiyöz nedenler üzerinde de çok durulmakla birlikte, bu güne kadar herhangi bir mikroorganizma ortaya çıkarılamamıştır. Ancak insanlarda birçok bakteri (Mycoplasma Fermentans, Proteus Mirabilis, Mycobacterium Tuberkulozis, E. Coli), virüs (Ebstein- Barr Virüs,, Parvovirüs B-19) ve spiroketler (Lyme artriti) poliartrit oluşturabilirler. Başlıca parvovirus, rubella, Borrelia burgdorferi, Ebstein-Barr virus ve diğerleri sorumlu ajan olarak araştırılmış olmasına karşın hastaların tümüne genellenebilecek tek bir enfeksiyon ajanı ile ilgili epidemiyolojik kanıt henüz elde

olunamamıştır (27). Epstein-Barr virusu (EBV), 1975 yılından beri RA patogenezinde yoğun şekilde araştırılmış, RA'luların kanlarında EBV ile ilgili B lenfositlerin anormal yüksekliğinin saptanmasına rağmen, bunun RA patogenezinde rol oynamaktan çok önce bir bulgu olduğu daha sonraki araştırmalar ile gösterilmiştir (26).

## **1.5.PATOGENEZ**

### **1.5.1. Morfoloji**

Son yıllarda bilgi düzeyinde önemli derecede artış olmasına rağmen, RA'nın etyoloji ve patogenezinin anlaşılması kompleks bir problem olarak devam etmektedir. Tutulan eklemlerde histolojik olarak; sinoviyal hücre hiperplazisi ve proliferasyonu, sinovyumda CD4+ T hücreleri, plazma hücreleri ve makrofajlardan meydana gelen yoğun perivasküler iltihabi hücre infiltrasyonu (sıklıkla lenfoid folliküller), anjiyogenez nedeniyle artmış vaskularite, sinovyumda ve eklem aralığında nötrofil ve fibrin kümelenmeleri, alttaki kemikte sinoviyuma penetre olan ve kemik erozyonuna yol açan, artmış osteoklast aktivitesi ile karakterize kronik sinovitis görülmektedir. Klasik görünüm; iltihabi hücreler, granülasyon dokusu ve bağ dokusuyla karışık, proliferatif dökümlü sinoviyal hücre karışımından oluşan bir pannus görünümüdür. Önce sinoviyal membranda, parmak benzeri villoz çıkıntılar oluşur. Olayın ilerlemesiyle periartriküler yumuşak doku ödemi gelişir ve ilk olarak eklemlerin fusiform şişmesine neden olur. Hastalığın ilerlemesiyle oluşan pannus, komşu eklem kırırdağını erozyona uğratarak tahrip eder; eklem mesafesini dolduran pannus eklemlerde kalıcı kalsifikasyonlara, fibrozise ve ankiloza neden olabilir (28).

### **1.5.2. İmmunopatogenez**

Erken immün yanıtta özellikle CD4+ T lenfositlerinin önemli rolleri bulunur. Bu hücreler sinovyumda antijen sunan hücrelerle yakın temas halindedir. Aktif durumdadırlar ve bol miktarda HLA DR molekülü içerirler. Antijen sunan hücreler üzerinde bulunan antijenleri tanırlar ve bu tanıma sonucu sitokin salınımı, B hücrelerin uyarılması ve regülatuar fonksiyonlar gibi bir dizi



immunolojik olay tetiklenir. T hücrelerin RA'nın ilk aşamasındaki rolü pek tartışma konusu değildir. Ancak kronik RA sinovyumunda bu hücelere ait sitokinlerden ziyade makrofaj sitokinlerin bulunması, patogeneizde T hücre dışındaki immün efektör hücrelerin ve özellikle de makrofajların itici güç olarak rol alabileceği hipotezini doğurmuştur. CD45RO+ Hafıza T hücreleri, burada daha çok düzenleyici özellik taşıyor olabilir (29).

Antijenik stimulasyondan sonra T hücreleri kan damarlarının endotelial duvarından göç eder ve sinovyumda birikirler. Aktive T hücreleri IFN- $\gamma$  gibi sitokinleri üretirler ve bu daha sonra ( inflamasyonun makroskopik belirtileri ortaya çıkmadan önce ) sinovyal iç yüzey tabakasında monosit/ makrofaj birikimini stimule eder. Bu aktive makrofajlar sinovyumda proinflamatuvar mediatörleri salgılatır. Bu sitokinler (IL-1 ve TNF- $\alpha$ ) endotelial hücre proliferasyonunu stimule eder ve endotelial hücreler üzerinde adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu başlatır, böylelikle lenfositlerin ve makrofajların trans-endotelial migrasyonuna katkıda bulunur (30). RA sinovyumunun yoğun miktarda immün efektör hücre ihtiva etmesi dikkat çekicidir. Hücrelerin bu alanda toplanmasında, çeşitli sitokinler kadar özellikle vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiogenezi arttıran ve damarsal yapıları hipergeçirgen hale getiren proteinler de rol oynar (31). Bu alanda prostaglandinlerin de rolü olduğunu unutmamamız gerekir. Bu sürecin gerçekleşmesi için immün efektör hücreleri, öncelikle endotele yapışmaları, endoteli aşmaları ve sinovyuma göç etmeleri gerekir. Bu da adhezyon molekülleri sayesinde gerçekleşir. Bu moleküller lökositler üzerindeki çeşitli integrinler için ligandır. E-selektin, hücre ile endotel arasındaki ilk ilişkiyi kurar. Düşük güçteki bu bağlanma hücrelerin yavaşlamasına yol açar. Daha sonra İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) ve Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1) in devreye girmesiyle daha güçlü endotel, hücre etkileşimleri ve immobilizasyon oluşur. ICAM-1 makrofajlarda, makrofaj benzeri sinovyal hücrelerde ve intimadaki fibroblastlarda bulunur. VCAM-1 ise en çok sinovyal endotelinde eksprese olur. TNF-a, IL-1 ve gamma interferon gibi sitokinler bu adhezyon moleküllerinin sentezini arttırır (29,32).

Romatoid sinoviyumunda lenfositler, makrofajlar ve fibroblastlardan salgılanan bir dizi sitokin saptanmıştır. Bu sitokinlerin lokal üretimi, RA'nın pek çok patolojik ve klinik bulgusuna neden olmaktadır. Bu efektör moleküller; T lenfositlerden salınan IL-2, INF- $\gamma$ , IL-6, IL-10, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-17, CD-154 gibi sitokinler, aktive myeloid hücrelerde üretilip salınan IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL10, IL12, GM-CSF, ILGF, fibroblast, endotel hücresi gibi hücrelerde üretilen VEGF, IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, IL-15, IL-16, IL-18 dir (28). Uyarılmış CD4+ T lenfositlerden salınan IL-2 ve diğer sitokinler makrofaj, B-lenfosit ve endotel gibi hücreleri etkiler. Makrofajlardan salınan IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler inflamatuvar hücrelerin kemotaksisi, proliferasyonu ve diferansiyasyonu için gereklidir. B lenfositler aktive olarak plazma hücrelerine dönüşürler; RF ve benzeri antikoları salgılayarak doku ve eklem hasarında rolü olan immünkomplekslerin oluşmasına neden olurlar. Aynı zamanda aktive makrofajlardan salınan maddeler fibroblast, kondrosit ve sinoviyal hücreleri etkileyerek pannus oluşumunda etkili kollajenaz, elastaz, storomelizin, PGE2 ve bazı enzimlerin salınımına sebep olurlar. Aktive endotel hücrelerin eksprese ettiği adezyon molekülleri iltihabi hücrelerin bölgeye toplanmasını artırır. RF ve benzeri immünglobulinler kompleman sistemini uyarabilmekte bu da inflamasyonu daha fazla alevlendirmektedir. Bütün bu olayların net sonucu pannus oluşumu ve takiben gelişen kıkırdak ve kemik tahribi sonucu oluşan ankilozdur (28).

## 1.6. KLİNİK

RA başlangıçta sıklıkla el, el bilekleri ve ayakları, daha sonra ise tüm sinoviyal eklemleri simetrik olarak tutabilen kronik, poliartiküler bir hastalıktır. Asıl tutulum yeri sinoviyum olmakla birlikte hastaların hemen hemen tamamında sistemik belirtiler de görülür. RA hastaların çoğunda sinsi başlangıçlıdır. Halsizlik, yorgunluk, hafif ateş gibi sistemik bulgular eklem bulgularından önce başlayabilir. Eklem tutulumu çoğunlukla simetrik olmakla birlikte başlangıçta asimetrik de olabilir ve genellikle gezici değil, eklenici niteliktedir. Daha nadir

olarak RA akut başlangıçlı olabilir. Hatta bazı hastalar hastalığın belli bir travmadan hemen sonra başladığını ifade edebilir (33).

### **1.6.1 Başlangıç Tipleri**

#### **Sinsi başlangıç**

Hastaların çoğunda (%55-70) sinsi başlangıç söz konusudur. Yorgunluk, halsizlik, yaygın kas iskelet ağrıları ilk ve spesifik olmayan yakınmalardır. Bazen düşük dereceli ateş, Raynaud fenomeni gibi atipik bulgular olabilir. Tüm bu bulgular aylar öncesinden hastalığa eşlik edebilir. Sinsi başlangıç evresinde artrit bulgular da olabilir. Sık tekrarlamalarla aylarca süren ve giderek kötüleşen inatçı poliartraljiler olabilir. Seyrek olarak yavaş gelişen monoartriküler tutulum görülebilir. Omuz ya da diz eklemi gibi büyük eklem tutulumu karakteristiktir. Zamanla diğer eklem tutulumları ortaya çıkmaya başlar (34).

#### **Akut veya Subakut Başlangıç**

Hastaların % 8 ile 15'inde akut başlangıç görülür. Bir kaç gün içinde semptomlar tepe noktaya ulaşır. Sinsi başlangıca göre daha az simetrik patern vardır. Akut başlangıçlı RA'da teşhis koymak zor olabilir. Sepsis veya vaskülitin mutlaka dışlanması gerekir. İnfeksiyöz süreci düşündüren ateş önemli bir bulgudur. Hastaların yüzde 15 ile 20'sinde subakut başlangıç vardır. Semptomlar günler veya haftalar içinde ortaya çıkar. Komplikasyonlar sinsi başlangıca göre bu grupta çok daha fazladır (35).

#### **Tek veya az sayıda eklemi tutan başlangıç**

Nadir görülen başlangıç şekillerinden biridir. Bu tür başlangıç daha çok genç kadın hastalarda görülür. Diz veya dirsek gibi bir veya birkaç eklem kronik veya aralıklı tutulumu vardır. Genellikle akut faz yanıtı yoktur ve RF negatiftir. Diğer hastalıkları dışlamak için sinovyal biyopsi gerekebilir (36).

#### **Palindromik başlangıç:**

Eklemlerde bir kaç saat ile bir kaç gün devam eden, spontan gerileyen ve iz bırakmayan artritlerle karakterizedir. Bu kısa süreli alevlenmelerin aylar

boyunca sıklığını ve şiddetini artırarak devam etmesi kalıcı bir poliartrit gelişmekte olduğunu düşündürmelidir. Bu olguların en az üçte biri RA'ya dönüşmektedir (35).

#### **Sistemik başlangıç:**

Daha çok orta yaşlı erkeklerde görülen bir başlangıç seklidir. Ağırlıklı bulgular eklem dışındadır ve ateş, anemi, kilo kaybı, halsizlik, kas ağrıları, plörezi, perikardit, döküntü ve organ büyümeleri görülür. Teşhis poliartrit yerleşmesi ve malignite dahil diğer nedenlerin dışlanması ile konulur (36).

#### **1.6.2. Eklem Tutulumu**

RA, diartrodial eklem tutulum paterni ile karakterizedir ve patolojisinin ana bölgesi eklemlerin sinovyumudur (37). Eklemlerde inflamasyonun üç kardinal bulgusu (ısı artışı, hassasiyet, şişlik) bulunurken kızarıklık görülmez. İnflamasyon eklemlerde ağrı, tutukluk ve hareket kısıtlılığına neden olur (20). RA tüm sinovyal eklemleri etkileyebilir ve hastalık çoğunlukla metakarpofalangeal (MKF), proksimal interfalangeal (PİF) ve metatarsofalangeal (MTF) eklemlerde başlar ve ardından el bilekleri, dizler, dirsekler, ayak bilekleri ve kalçalar tutulur. Daha az sıklıkla temporomandibüler, sternoklaviküler ve krikoaritenoid eklemler de tutulabilir. Boyun (özellikle de C1-C2 eklemi) dışında omurga tutulumu olmaz (38). Torakolomber, sakroiliak ve elin distal interfalangeal (DİF) eklemlerinin tutulumu RA'da çok nadirdir (37).

RA en zengin ve karakteristik özelliğini el ve el bileği eklemlerinde gösterir. Bilek eklemının sinoviti RA'nın değişmez bir özelliğidir. Hareket kısıtlılığına, deformiteye ve median sinir sıkışmasına (karpal tünel sendromu) neden olabilir. MKF ve PİF eklemleri, DİF eklemlere göre daha sık tutulur. Kıkırdak ve kemik dokudaki inflamasyona sekonder yıkım, tendonlardaki gevşeme ve yırtılmalar el deformitelerinin gelişmesine katkıda bulunur. Unlar deviasyon, cekiç parmak, pençe parmak, düğme iliği deformitesi, kuğu boynu deformitesi meydana gelen deformitelerdir. Dirsekler sık tutulan ve romatoid nodüllerin en sık görüldüğü eklemlerdir. Diz eklemi, hastaların % 15 kadarında ilk tutulan eklemdir. Sinovyal sıvının popliteal fossaya doğru ilerlemesi sonucu

Baker kisti oluşur. Ayak eklemlerinin tutulumu, yük taşımaları nedeniyle üst ekstremit eklemlerine göre daha ağırlı olur. Ayakta MTF eklemler sıklıkla hastalığa katılır. Hastalığın ilerlemesiyle ciddi deformiteler gelişebilir. Vertebra tutulumu servikal bölge ile sınırlıdır ve daha çok hastalığın ileri evrelerinde görülür (39).

### 1.6.3. Ekstra Artiküler Bulgular

RA nadiren artrit başlangıcında önce extraartikuler bulgularla ortaya çıkabilir. RA primer olarak eklemleri etkileyen, ancak ekstra artikuler tutulumda gösteren sistemik bir hastalıktır (40).

RA'da Eklem Dışı Bulguların başlıcaları aşağıdakilerdir:

**Cilt tutulumu;** Romatoid nodüller, palmar eritem, vaskülitik deri lezyonları.

**Solunum Sistemi;** Plörezi, interstisyel pnömonitis ve fibrozis, nodüler akciğer hastalığı, bronşiolit, pulmoner hipertansiyona yol açan arterit, küçük hava yolları hastalığı.

**Dolaşım Sistemi;** Perikardit, mitral valvülopati, iletim defektleri, miyokardit, koroner arteritis, granümatöz aortitis veya kapak hastalığı.

**Göz tutulumu;** Keratokonjonktivitis sikka, sklerit, episklerit, skleromalasi perforans.

**Nörolojik tutulum;** Bası nöropatileri, periferal nöropati, mononöritis multipleks

**Muskuler tutulum;** Güçsüzlük ve atrofi

**Hematolojik tutulum;** Hafif normositer hipokrom anemi, trombositoz, eozinofili

**Diğerleri;** Romatoid vaskülit, amiloidoz, psikosomatik yakınmalar (41).

### 1.7. TANI

Çok yönlü bir hastalık olan RA tanısını kolaylaştırmak ve bir standarda bağlamak amacıyla 1987 yılında Amerikan Romatizma Derneği (ACR) tarafından belirlenmiş klasifikasyon kriterleri oldukça yol göstericidir.

1987 ACR kriterleri:

1- Sabah tutukluğu; Eklem ve çevrelerinde en az 1 saat süren sabah tutukluğu

2- Üç veya daha fazla eklemden artrit; En az 3 eklemden hekim tarafından kaydedilen yumuşak doku şişliği veya sinovyal sıvı artışı ile beraber olan artrit.

3- El eklemlerinde artrit; El bileği, MKF ve PİF eklemlerinin en az birinde artrit.

4- Simetrik artrit; Vücudun iki yarısında aynı bölgedeki eklemlerin aynı anda tutulması; bilateral PİF, MKF veya mutlak simetri olmaksızın bilateral MTF eklemlerinin artriti.

5- Romatoid nodüller; Kemik çıkıntıları üzerinde, ekstansör yüzeylerde veya eklemlerin çevresinde hekim tarafından gözlenen subkutan nodüller.

6- Romatoid faktör; Herhangi bir metod ile anormal miktarda romatoid faktör pozitifliği

7- Radyolojik değişiklikler; Ön-arka el ve bilek radyografilerinde erezyonlar ve/veya periartiküler osteopeni.

Bir hastayı RA olarak klasifiye etmek için sayılan kriterlerden en az 4 tanesinin bulunması gerekir. İlk 4 kriterin en az 6 haftadır devam ediyor olması gerekir (42).

### 1.8. AYIRICI TANI

RA tüm artrit yapan romatolojik hastalıklarla karıştırılabilir. Hastalığın erken döneminde RA tanısı koymak zordur. Doğru tanıya ulaşmada geç

kalinmasının nedenleri; az sayıda eklem tutulumu, asimetrik tutulum, intermittan artralji yakınmaları, sadece konstitüsyonel yakınmaların bulunması ve RF negatifliği gibi RA için tipik olmayan bulgularla başlayabilmesidir. Kliniklere poliartrit semptomları ile gelen hastaların az bir kısmı RA'dır. RA ayırıcı tanısında en sık karşılaşılan hastalıklar;

1- Bağ dokusu hastalıkları (özellikle SLE başta olmak üzere, skleroderma, polimiyozit, vaskülitler, mikst bağ dokusu hastalığı, polimiyaljiya romatika),

2- Seronegatif spondiloartritler (Ankilozan spondilit, reaktif artrit, Reiter sendromu, psöriatik artrit),

3- Osteoartroz

4- Erişkin still hastalığı

5- Kalsiyum pirofosfat birikimi hastalığı (CPPD)

6- Gut

7- Viral artritler (Hepatit B, rubella gibi).

8- Ayrıca fibromyalji, kronik yorgunluk sendromu, hipertrofik pulmoner osteoartropati, miksödem, akut romatizmal ateş, sarkoidoz, FMF( Ailevi Akdeniz Ateşi), multisentrik retikülohistiyositoz, hemoglobinopatiler, hemofilik artropati, hemokromatozis, hiperlipoproteinemiler, glukokortikoid kesilme sendromu, oral kontraseptif kullanımına bağlı artrit, paraneoplastik sendromlar da gözönüne alınmalıdır (26).

## 1.9. LABORATUAR

RA tanısında laboratuvar testleri, ayrıntılı bir öykü ve fizik bakımın yerini alamaz, ancak klinik değerlendirmeyi tamamlar. Laboratuvar testleri, tanı koymak dışında, RA aktivitesinin izlenmesinde ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de oldukça önemlidir (43). Tek bir tanısalsal test ile RA tanısı kesin doğrulanamaz. American College of Rheumatology (ACR), Romatoid Artrit Alt Komitesi'nin tavsiye ettiği bazı temel laboratuvar testleri Tablo 1'de görülmektedir (44).

**Tablo 1: Romatoid Artrit ile İlişkili Laboratuvar Bulguları**

<b>Laboratuvar Testi</b>	<b>İlişkili Bulgu</b>
C-reaktif protein	Tipik olarak 7 mg/L'yi aşar; hastalığın takibinde kullanılabilir.
Eritrosit sedimentasyon hızı	Genellikle 30 mm/h 'i geçmektedir; hastalığın takibinde kullanılabilir.
Hemoglobin / hematokrit	Düşüş vardır. Hemoglobin yaklaşık 10 g/dL'dir ; normokromik anemi, aynı zamanda normositik veya mikrositik olabilir.



Beyaz küre sayımı	Artmış olabilir
Trombositler	Genellikle artmıştır
Karaciğer fonksiyon testleri	Normal veya hafifçe artmış alkalen fosfataz
Romatoid faktör	Hastalarda hastalık başlangıcından 6-12 ay sonra tekrar edilebilir; pek çok durumda da pozitif olabilir (ör, SLE; skleroderma; Sjögren sendromu ; neoplastik disease; sarcoidosis; various viral, parazitik hastalıklar, veya bakteriyal infeksiyonlar); hastalık progresyonunun tam bir göstergesi değildir.
Antisiklik sitrulline peptid antikorlar	Progresyon ile iyi koreledir; RF ile kombine kullanıldığında sensitivitesi artar; RF'den daha spesifiktir; pek çok laboratuarda ölçülememektedir.
Antinükleer antikorlar	Romatoid artrit tanısında sınırlı değeri vardır.
Kompleman düzeyleri	Normal veya artmış olabilir.
İmmünoglobulinler	$\alpha$ -1 ve $\alpha$ -2 globulinler artabilir.
Sinovyal sıvı incelemesi	Genellikle fibrin ağları olan saman rengi sıvı gözlenir; oda ısısında pıhtılaşabilir; 5000-25000/mm <sup>3</sup> beyaz hücre içerir; bunların da %85'i polimorfonükleer lökositlerdir; kültürde üreme olmaz; kristal yoktur; glukoz düzeyi tipik olarak düşüktür.
İdrar incelemesi	Bağ dokusu hastalıklarında mikroskobik hematüri veya proteinüri olabilir.

## 1.10. TEDAVİ

RA'in erken tanı ve tedavisi oldukça önemlidir ve tedavide multidisipliner yaklaşım gereklidir. Erken tedavi girişimi gereksinimini destekleyen birçok kanıt vardır. Bunlardan bazıları RA'li hastalarda fonksiyonel sağlık durumunun erken bozulması, mortalitenin artması, hastalıkta radyografik değişikliklerin erken görülmesi (çoğunlukla ilk 2 yıl içinde) gibi nedenler sayılabilir (45).

### 1.10.1. Kısa Etkili İlaçlar

**1- Non Steroidal Anti İnflamatuvar İlaçlar (NSAİİ):** NSAİİ'lerin temel etki mekanizması siklooksijenaz yolunu inhibe ederek arazidonik asitin

endoperoksitlere, prostaglandinlere (PG) ve Tromboksan A<sub>2</sub>'ye dönüşümünü engellemektir. Böylece inflamasyonu önleyip ağrıya karşı etkili olurlar. Analjezik etkileri periferaldir. Kimyasal olarak uyarılmış siniri baskırlar, bloke etmezler. Ayrıca antipiretik etkileri vardır. Aspirin COX'u irreversible olarak asetilleyerek inhibe ederken diğer NSAİİ'ler doza bağımlı olarak reversible inhibe ederler. COX enzimi değişik dokulardan farklı miktarda elde edilebildiğinden her dokunun NSAİİ'lere duyarlılığı farklıdır. Dolayısıyla her hastanın farklı ilaca yanıtı farklı olacağından istenen etki alınıncaya kadar birkaç farklı NSAİİ denenebilir (46). NSAİİ'ler genelde her RA hastasına uzun süreli olarak kullanılmasına karşın, hastalığın seyrini değıştirmezler. RA'li hastalarda NSAİİ ilaçlar, eklem ağrısını ve tutukluğunu azaltarak hastaları oldukça rahatlatır. Ancak analjezik ve anti-inflamatuvar özelliklerine karşın, hastalığın seyrini değıştirdikleri ya da eklem hasarını önleyebildikleri gösterilememiştir (47).

**2- Kortikosteroidler:** Kortikosteroidler 1950 den beri kullanılmakta olup bu ilaçlara çok iyi sonuç veren hastalar vardır. Anti-inflamatuvar ve immun supresif etkileri nedeniyle RA tedavisinde kullanılırlar. Düşük doz (< 10mg/gün prednizolon eşdeğeri), pulse (100-1000 mg/gün intravenöz metil prednizolon) ve lokal intra-artikular steroid enjeksiyonları, RA'in aktif dönemlerinde semptomların giderilmesinde çok etkilidir (48). Son yıllarda erken RA tedavisinde düşük doz steroid kullanımı hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Bunun nedeni ise düşük dozlarda kemik hasarını durdurulması yanı sıra eklem şişliği ve duyarlılığını belirgin şekilde azaltmasıdır. Van Everdingen ve arkadaşları 10mg/gün steroid kullanırken (49) Landewe ve arkadaşları RA'lı hastalara 1 hafta boyunca 60mg/gün steroid kullanmış ve tedavinin ardından 6 ay içinde steroidi azaltarak kesmişlerdir. Sonuçta birlikte verilen anti-romatizmal tedaviden bağımsız olarak kemik koruyucu etkisini 5 yıl sonunda da izlemişlerdir (50). Yüksek doz steroid tedavisi, düşük doz steroide yanıt vermeyen hastalarda, vaskülit, cilt ülserleri, akciğer tutulumu ve sklerit gibi ekstra-artiküler tutulumlarda, mononöritis multipleksde verilebilir. Klinik yanıt ve yanıtın süresi

açısından 1000 mg İV, 320 mg İV ve 320 mg İM metil prednizolon kullanan 3 hasta grubunda farklılık bulunmamıştır (51).

### 1.10.2. Uzun Etkili İlaçlar

**1-Antimalaryal İlaçlar:** RA tedavisinde genellikle günlük dozlar klorokin için 4 mg/kg/gün hidroklorokin için ise 6 mg/kg/gündür. Antimalaryal ilaçlar hafif orta derecede romatoid artritte etkilidir. İlacın klinik cevabını görmek için çoğunlukla 6 ay beklemek gerekir (51).

**2- Sulfasalasin:** Sulfasalasin, sulfopiridin ve salisilik asitin bir azo bağıyla birleşmesinden oluşur. Nötrofiller, makrofajlar, T ve B lenfositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri üzerinde çeşitli etkileri vardır. Etkin doz 1-2 mg/gün'dür. RA'da klinik, laboratuvar ve radyolojik iyileşme sağlar. Sulfasalasin diğer DMARD'lar ile birlikte kullanılabilir. En sık yan etkisi GIS, deri ve kemik iliği üzerinedir (52).

**3-Methotreksat:** İlk kez 1972' de romatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmış, rutin tedaviye ancak 1980' lerden sonra girmiştir. RA hastalarının yarısından fazlasının MTX tedavisi görmesi ve yaygın olarak kullanılması, MTX' ı en sık kullanılan hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç haline getirmektedir (53, 54, 55, 56, 57). MTX ile tedavi edilen RA hasta oranının 1985 yıllarında % 10' dan 2000 yıllarında % 76' lara kadar yükseldiği belirtilmektedir. Bu artışa neden monoterapide hastalık aktivitesini ve eklem erozyonlarının oranını azaltması yanında uzun dönem mortalitede azalmaya neden olmasıdır. Bu hayatta kalma şansı, sulfasalazine, hydroxychloroquine, altın ve penicillamine tarafından sağlanamamaktadır. Düşük doz haftalık MTX' ın güvenli profili diğer seçeneklerle karşılaştırıldığında, 1980 yılından itibaren pratiğe dayanan geniş dağılımlı kullanımı ile tamamen kabul görmektedir (58).

Metotreksat hem tek başına hem de diğer ilaçlarla birlikte kombine kullanılabilen en sık ve genellikle de ilk seçilen ilaçtır. MTX esas olarak folik asit antagonistidir ve yüksek dozlarda folik asidin dihidrofolat redüktaz ile reaksiyonunu önleyerek DNA yapımını baskılar. Ülkemizde 2.5 mg'lık tabletleri, 5-50 mg'lık ampülleri vardır. RA için haftada bir gün, 7.5mg gibi düşük dozlarla başlanılır. Bu doz hastanın yanıtına göre ayda bir, 2.5mg kadar arttırılabilir. RA'da

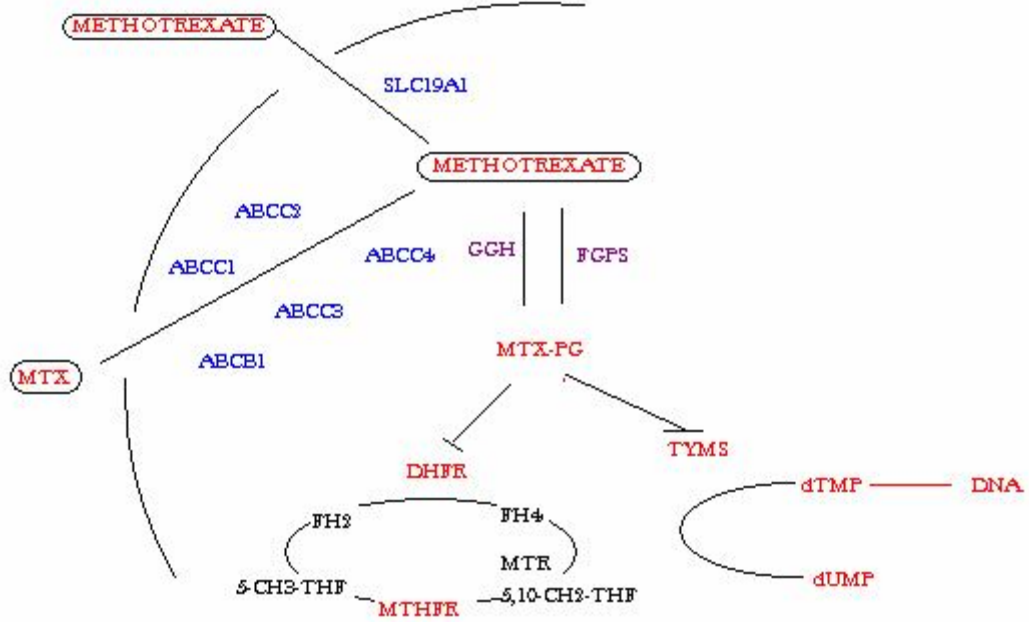
genellikle kullanılan idame doz haftada bir 7.5-15 mg'dır (51). Ancak, MTX kullanımını sınırlandıran bazı etmenler olduğu ve bunlardan en önemlisinin bazı hastalarda toksisite gelişimine neden olduğu bildirilmektedir. Kimi araştırmalarla, RA hastalarının yaklaşık % 10-30'unda toksisite gelişimi nedeniyle MTX tedavisine devam edilemediği gözlenmektedir (55, 56, 7). MTX RA tedavisinde en etkileyici olan tarafı eklem hasarının radyografik olarak azaltılabileceğinin kanıtlanmış olmasıdır. Erken RA hastalarında 2 yıllık kullanım sonucunda, metotreksat neredeyse etenercept kadar etkin bulunmuştur (59). Romatoid artrit aktivitesinin baskılanması için gerekli olan MTX dozunun, Romatoid Artritli bazı hastalar arasında farklılıklar oluşturabileceği bazı durumlarda ise MTX tedavisinin etkisiz kalabileceği belirtilmektedir.

Sonuç olarak, bazı hastalarda MTX kullanıma bağlı olarak yan etki oluşumu gözlenirken, bazı hastalarda gözlenmediği belirtilmektedir (5). Yapılan birçok çalışmada, MTX kullanımına bağlı olarak nodül (% 8), alerjik pneumonit (% 2-5), merkezi sinir sisteminde gözlenen toksisite (% 1-35), doz sonrası reaksiyonlar (% 10), mide bulantısı, kusma, karın ağrısı ve diyare gibi gastrointestinal komplikasyonlar (GI) (% 60), transaminazların yükselmesi ile karaciğer iltihabı (% 20-58), hematolojik anomaliler (% 1-2), vücutta kızarıklık oluşması (% 1-2) ve kellik (% 5) gibi birçok toksisitenin ortaya çıktığı rapor edilmektedir (55, 56). MTX folik asit antagonisti olmasından dolayı yan etkilerinden korunmak için folik asit tedavisi verilir. Her ne kadar bir çok klinisyen günde 1 mg RA hastalarına reçete etse dahi haftada bir 5 mg folik asit verilmesinin yeterli olduğu görülmektedir. MTX ile tedavi edilen hastalarda folik asit kullanımının bir diğer nedeni de plazma homosistein düzeylerini azaltmaktaki etkinliğidir (48, 60). Yapılan bir çalışmada düşük doz MTX tedavisi gören RA' li hastalarda folik asit yada folinik asit alınımının MTX ile ilişkili mukozal ve gastrointestinal yan etki gelişimini azalttığı bildirilmiştir (61).

### **Methotrexate' in Hücresel Metabolizması**

Methotrexate'ın Romatoid artrit ve diğer inflamatuvar hastalıklar üzerindeki etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamakla birlikte, folik asit metabolizması ve toksisite gelişmesi üzerindeki etkisinin önemli olduğu

belirlenmiştir (7,55). Methotrexate, ATP-bağlayıcı kaset (ATP-binding cassette=ABC) ve çözünen taşıyıcıların (Solute carrier=SLC) bütün üyeleri tarafından regüle edilen aktif transport mekanizması ile hücre içine girer ve MTX poliglutamata sentaz (FPGs) enzimi tarafından poliglutamata formuna dönüştürülür. Bu işlem gama glutamil hidrolaz (GGH) tarafından tersine çevrilebilir. Poliglutamata formu MTX' in hücre içinde saklanma, dihidrofolata tetrahidrofolata (THF) indirgeyerek dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe etme özelliğine sahiptir. THF, homosisteinden metioninin sentezlenmesi ve poliaminlerin sentezi için gerekli olan 5-metil THF gibi aktif folat kofaktörlerinin yapımı için önemlidir. MTX' in poliglutamata formu ayrıca de novo pirimidin biyosentetik yolağında deoksiüredilat'ı deoksitimidilat'a dönüştüren timidilat sentetazı (TYMS) inhibe eder. Folik asit yolağında önemi olan metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, MTX tarafından direkt olarak inhibe olmaz. MTX' in dihidrofolat redüktazı inhibe etmesine bağlı olarak homosisteinin metionine dönüşümünü engelleyerek, MTX'in intraselüler folat havuzu üzerindeki etkileri nedeniyle MTHFR enziminin etkilediği belirtilmektedir (5, 56, 62). MTX' in, Romatoid artritli hastalar arasında gözlenen farklı etki ve toksisite oluşturma nedenleri tam olarak açıklanamamasına rağmen, folat metabolizmasında yer alan enzimlerde meydana gelebilecek olası polimorfizmlerin bu farklılıklara neden olabileceği belirtilmektedir (5). Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat metabolizmasının önemli bir enzimi olup Methotrexate metabolizmasında da gerekli olan enzimlerden biridir (9,63). MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde homosistein, transsülfürasyon ve remetilasyon yollarını kullanarak metabolize olur (9). Günümüze kadar yapılan araştırmalarla MTHFR geninde birçok polimorfizm (677C→T, 1298A→C, 1711C→T, 1727C→T, 1762A→T, 1768G→A, 1134G→A, 1793G→A) tanımlanmıştır (10). Bu polimorfizmlerden en çok çalışılan polimorfizmler C677T ve A1298C polimorfizmleri olmuştur (9,11,10). Gen varyasyonları veya polimorfizmler, genel olarak popülasyonun %1' inden daha yüksek oranda görülen DNA dizi değişiklikleri olarak tanımlanırlar. Bireyler arasındaki genetik varyasyonlar, DNA dizisindeki tek baz farklılıklarından meydana gelirler.



**Şekil 1:** Methotrexate'ın Hücresel Metabolizması

Bunlara tek nükleotid polimorfizmleri veya SNPs (Single Nucleotid Polymorphisms) denir (64). Bir ilacın klinikte kullanılabilmesi için öncelikle bilinmesi gereken, klinik etkinliği ve güvenirligidir. Ancak, ilaçların her hasta üzerinde aynı derecede etkili ve güvenli olması beklenemez. İlaçların eşdeğer dozları bazı bireylerde yeterli etkinlik göstermeyebilir ve diğer bir kısım hastalarda toksisiteye bağlı önemli sağlık problemlerine yol açabilir. İlaç yanıtındaki bu tür farklılıklar, bireylerin farklı fizyolojik durumlarından, hastalık derecelerinden, ilaç etkileşimlerinden veya hastalıkla birlikte bulunan diğer bazı bozukluklardan kaynaklanabileceği gibi çevresel etmenlerden de büyük oranda etkilenir. İlacın etki ve toksisite farklılıklarının oluşmasında önemli yeri olan bir diğer faktör bireyler arasındaki genetik farklılıklardır. Genetik faktörler ilaç yanıtındaki bireyler arasındaki değişkenliğin en az %20-40'ından ve advers etkilerin yaklaşık %50'sinden sorumlu tutulmaktadır (65,66). Bireyin ilaçlara

verdiği yanıtta çevre, diyet, yaş, yaşam stili, sağlık durumu gibi etmenlerin yanısıra genetik yapısına bağlı olarak da farklılıkların oluştuğu bilinmektedir (64).

**4-Leflunamid:** RA tedavisi için geliştirilmiş pirimidin sentez inhibitörü olan yeni bir immuno-modülatör ilaçtır. Etkisini pirimidin sentezinde rol oynayan dihidro-oratat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek gösterir. Bu yolla RA patogeneğinde temel rol oynayan T hücrelerinin proliferasyonunu önler (67).

**5-Altın Tuzları, d-Penisilamin:** Ülkemizde mevcut olmayan altın tuzları iki parenteral şekli gold sodium ve gold thioglucose; ve bir oral formu, triethylphosphine gold thioglucosetetra-acetate vardır. Ülkemizde olmayan d-Penisilaminin etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, RA etkinliği klinik çalışmalarla gösterilmiştir (51).

**6-Azatioprin :** Azatioprinin RA kullanılan günlük dozu 1.25-2.5/mg/kg/gün olup, çoğu kez “steroid’den sakınma ajanı” olarak tek başına ve kombinasyon biçiminde kullanılmıştır (48).

**7-Siklofosfamid:** Siklofosfamidin günlük dozu 1.25-2.5/mg/kg/gündür. Son zamanlarda RA tedavisinde ciddi yan etkileri ve başka ilaç seçeneğinin olması nedenlerinden dolayı pek tercih edilmemektedir (51).

### 1.10.3. Romatoid Artritte Yeni Tedaviler

Romatoid artritin DMARD’lar ile tedavisi etkili olmak ile birlikte halen bir çok hastada hastalık aktivitesi tam olarak kontrol edilememektedir. Romatoid artrit tedavisinde yeni gelişmeler klasik tedaviye yanıtız hastalar için alternatif tedavi rejimleri sağlamıştır. Anti-TNF ve anti-IL-1 ajanlar en sık kullanılan yeni ilaçlardır. Yeni ajanların metotreksat ile kombinasyon tedavisinin romatoid artitte tek başına kullanıldıklarından daha etkili olduğu gösterilmiştir. Anti TNF ilaçlar ile klasik tedaviye dirençli hastalarda iyi sonuçlar alınabilmekte ve radyolojik hasarın ilerlemesi engellenebilmektedir. Bu ajanların ciddi yan etkilerinin olması

nedeni ile tedaviye başlanmadan önce hastanın uygun şekilde değerlendirilmesi ve hastaların dikkatli takip edilmesi gerekir (68).

**1- İnfliksimab :** İnfliksimab anti-TNF monoklonal antikoru olup RA tedavisinde ilk kullanılan anti-TNF ilaçtır. Önerilen doz 3mg/kg, 0. 2 ve 6 haftada daha sonra 8 haftada birdir. Bazı hastalarda idame 4-6 haftada bir verilecek şekilde kısılabılır. İnfliksimabın diğer DMARD'lar ile kombinasyonu ilk çalışmaların ardından yapılmıştır.Yapılan bir çalışmada metotreksat ile kombine infliksimab alan grubun radyolojik ilerlemesi 54 ayın sonunda %0.5 olurken sadece metotreksat alan grubun aylık radyolojik ilerlemesi %10 bulunmuştur (68).

**2-Etenercept:** Etenercept soluble TNF resöptör füzyon proteinidir. Kontrollü çalışmalarda daha yüksek dozda etkinliğinde değişme yapmaksızın yan etkilerde artmaya neden olduğu için önerilen doz haftada 25 mg deri altı uygulamadır (68). Weinblatt ve arkadaşları etenercept metotreksat ile birlikte kullanılmasıyla ACR yanıtlarının dahi iyi olduğunu tesbit etmişlerdir (69).

**3-Adalimumab:** Tamamen insan monoklonal antikordur. RA tedavisinde deri altı 40 mg 15 günde bir yapılır .

**4-Anakinra:** Amerika'da FDA tarafından diğer DMARD'lara cevap vermeyen ve ağır bir seyir gösteren hastalar için onaylanmış rekombinant IL-1 reseptör antogonistidir. Tek başına veya MTX ile kombine kullanılabilir. Günde tek doz subkutan enjeksiyon olarak kullanılır .

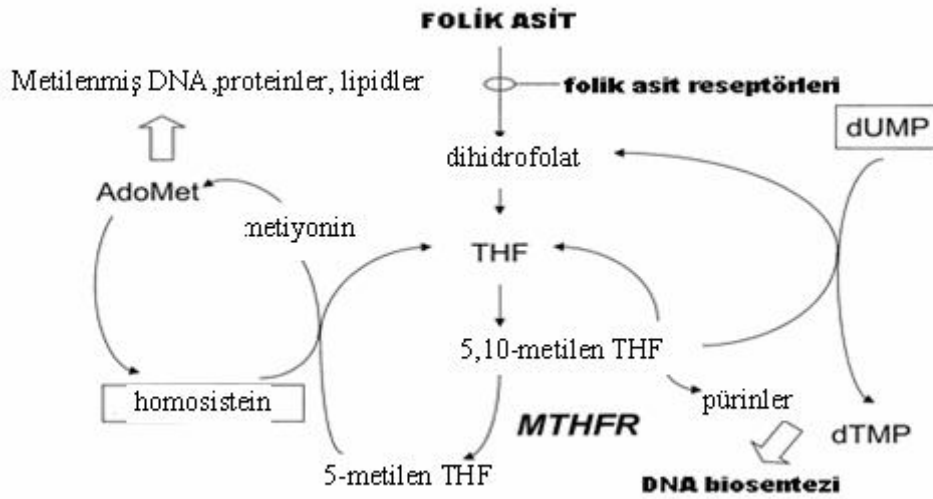
**5-Rituksimab :** Rituksimab anti-CD20 monoklonal antikordur.FDA tarafından 2006 yılında diğer anti-TNF ilaçlara dirençli olan hastalarda rituksimab bir seçenek olarak kullanılabileceğine onay vermiştir (68).

## 2. METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ ENZİMİ

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat metabolizmasında önemli bir enzimdir. İnsan MTHFR geni, kromozom 1p36.3'de lokalize olmuştur ve 656 aminoasitten oluşan MTHFR enzimini kodlar (70). Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat metabolizmasının önemli bir enzimi olup Metotreksat metabolizmasında da gerekli olan enzimlerden biridir (9,63). MTHFR,



5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) irreversible olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür. 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. 5,10- metilen THF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF'a okside olmaktadır. MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon (en yaygın olanı C677T polimorfizmi) enzim aktivitesini azaltmaktadır (71,72,73).



**Şekil 2:** MTHFR enziminin rolünü gösteren mekanizma. Enzim iki döngü arasında metil transferinde rol oynar.

Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5-metilen THF düzeyi azalmakta, 5,10- metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (72,74). Hiperhomosisteinemi ve homosisteinürinin ortaya çıktığı ciddi MTHFR eksikliğinde, periferik nöropati, gelişme geriliği, hipotonia, strok, tromboz gibi klinik özellikler görülür. MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlara popülasyon genelinde oldukça sık rastlanmakta olup, özellikle arterial hastalıkların oluşumunda bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (75). MTHFR geninde

görülen bazı mutasyonlar, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (71,72,74). Mutant T allelinin, nöral tüp defektleri için risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Yine nöral tüp defektlerinde kan folat seviyesinin düşük olması da önemli bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalar, MTHFR polimorfizmi ile birlikte oluşan folat eksikliğinin, nöronal gelişimi etkilediği ve nöral tüp kusuru oluşumunu arttırdığını göstermiştir (71,76,77).

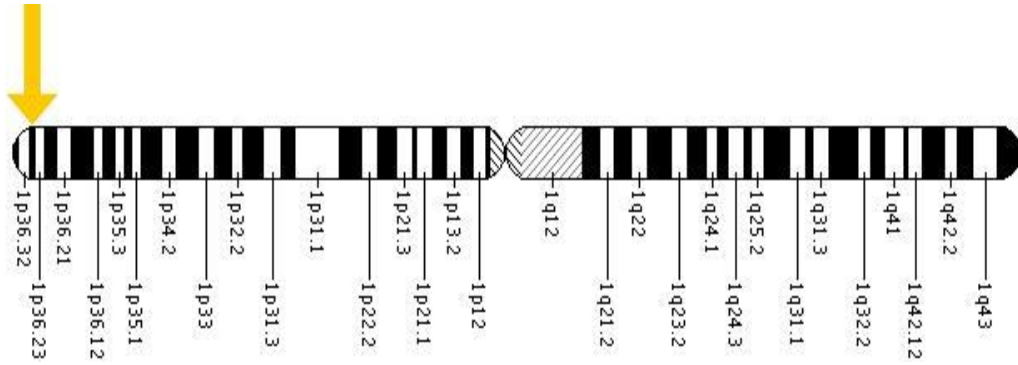
MTHFR polimorfizminden kaynaklanan azalan enzim aktivitesi, tümör süpressör genlerin stabilitesini ve hipometilasyonunu etkiler. Akciğer kanserli hasta örnekleri ile yapılan çalışmalarda, 677T allelinin, bir tümör süpressör gen olan p16'nın ekspresyonunun artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (78). 677T allelinin, muhtemelen, yeterli folat alınımı ile bireylerde timin ve pürin sentezi için artan 5,10 metilentetrahidrofolat düzeyi oluşturarak, koleraktel kanser riskini azalttığı ileri sürülmüştür. 677T allelinin akciğer kanseri, lösemi ve kolon kanserine (76) karşı koruyucu bir potansiyeli olduğu açıklanmasına rağmen, aynı durumun endometrial ve ovarial kanser gibi diğer kanser tipleri için geçerli olmadığı açıklanmıştır. Servikal intraepitelial kanserli kişiler ile yapılan bir çalışmada da 677 TT ve CT genotip sıklığının yüksek olduğu bildirilmiştir (79).

## **2.1. METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) GENİ**

### **2.1.1. MTHFR Genin Lokalizasyonu**

Floresan insitu hibridizasyon (FISH) yöntemiyle, insan MTHFR geni 1p36.3' e lokalize olduğu saptanmıştır (80). Ayrıca MTHFR ve CLCN6 arasında yakın fiziksel bağlantı bulunmuş ve bu daha sonra Gaughan ve ark.(81) tarafından doğrulanmıştır. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizleri kullanılarak, farenin 4. kromozomunun distal parçasında farenin MTHFR geni lokalize edilmiştir. Bu insan ve fare genomları arasında bilinen bir sinteni (Bağlı olsun olmasın, aynı kromozom üzerinde yerleşik gen lokusları) temel alınarak bulunmuş bir pozisyonudur. Bu sinteni farelerin MTHFR ve CLCN-6 genleri

arasında bağlantı gözlemlenmesiyle oluşturulmuştur (82). İnsan MTHFR'si için, MTHFR'yi kodlayan zincirin upstream 11 kb'lık kısmının klonlarının sekansları yapılmıştır. Bu DNA segmentinin GenBank'ın ALO2115 nolu kaydıyla çakıştığı bulunmuştur. Bu veriler MTHFR'nin 5' ucunun CLCN-6, NPPA ve NPPB geni ile kuşatıldığını göstermiştir. Bu genlerin konumu ve NT004488.3' nin genomik komşuluğundaki çok sayıdaki STS (Sequence tagged sites) markerleri FISH yoluyla elde edilmiştir (82,83). İnsan MTHFR genine dair çalışmalardan biri Goyette ve ark. (75) tarafından domuz karaciğer hücrelerinde yapılmıştır. Bu çalışmada bu gene ait 90 bp'lik cDNA'yı izole ederek, insan MTHFR amino asit sekansının bakteri almeF geni ile homolojisi gösterilmiştir.



**Şekil 3:** İnsan 1.kromozom idiogramı üzerinde MTHFR genin lokalizasyonu (83)

Gaughan ve arkadaşları (81) ise RFLP analizi ile fareler üzerinde yaptıkları çalışma ile fare MTHFR geninin 4. kromozom distalinde olduğunu bulmuşlardır. RNA RT-PCR'ını takiben yaptıkları SSCP analizi ile 1998'de Goyette ve arkadaşları (75) da MTHFR geninde iki yanlış anlamlı, bir anlamsız mutasyon belirlemişlerdir. Bu iki yanlış anlamlı mutasyon proteinin termolabilitesini değiştirmektedir. Biri treonin-metiyonin diğeri ise arjinin-glisin değişimine yol açmaktadır. 1995'de ise bu mutasyonlara yine Goyette ve arkadaşları tarafından yedi farklı mutasyon eklenmiştir (75). İnsan MTHFR geninin 11 ekzondan oluştuğu ve insan-fare MTHFR gen intron sınırları ve boyutlarının benzer olduğu, amino asit sekanslarının %90 benzerlik gösterdiği yine Goyette ve arkadaşları tarafından bu yıllarda rapor edilmiştir. MTHFR

geninin bilinen pek çok MTHFR varyantı vardır: Goyette ve arkadaşları 1994'de C-T değişimiyle 559. nükleotiddeki arjinin sonlanma kodonuna dönüşümünü bulmuşlardır (83). 184. kodonu etkileyen bu değişimi ARG-184-TER olarak adlandırmışlardır. Frosst ve arkadaşları ise 1995 yılında 677. nükleotidde alanin-valin dönüşümüne neden olan C-T değişimini tanımlamışlardır (83). Bu gen bölgesinde alternatif kaynaşma (splicing) olayları meydana gelmekte ve bunun sonucunda, değişik dokularda, farklı MTHFR transkriptleri (3 transkript) oluşmaktadır (80,82,84). İnsan genomik klonunun (17 kb), 2.2kb uzunluğundaki MTHFR cDNA sekansının tamamını içerdiği belirlenmiştir. Bu MTHFR cDNA, her biri 102-432 bç (baz çifti) uzunluğunda toplam 11 ekzon ile 250 bç-1,5 kb'a kadar olabilen (bir intron hariç; 4,2 kb uzunluğunda) intronlar içerir. Ekzon1, ATG başlama kodonunu taşır, 5' ve 3' kaynaşma bölgelerinde GT ve AG dinükleotidlerinden oluşan konsensus dizileri yer alır. Ekzon11'in 3'ucu, cDNA'da poliadenilasyon bölgesiyle sonlanmıştır. Poliadenilasyon sinyali (AACCTA), poliadenilasyon bölgesinin 15 bç önünde yer alır. İnsan ve fare MTHFR geni üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda MTHFR geninde 15 farklı mutasyon belirlenmiştir (75,85).

### 2.1.2 MTHFR Psödogenleri

Fare genomunun MTHFR için psödogen içerdiği gösterilmiştir. İlgili lokus (*Mthfr*-ps, 1259 bp) karakterize edilmiştir. Bu nonfonksiyonel psödogen, MTHFR genlerine benzemektedir ve yalnız kaynaşmış MTHFR transkriptlerinin retrotranpozisyona uğraması yoluyla ortaya çıkmaktadır. intron 1'inin kaybı, intron 2'nin parsiyal rotasyonu kromozom 5 üzerinde bir psödogeni gösteren özelliklerdir. Ayrıca fonksiyon eksikliği, kodlanan sekansın budanmış olması ve revers-trankripsiyon incelemelerinin başarısızlığında bunu kanıtlamaktadır. Bu bulgular fare genin PCR-temelli taramaları düzenlendiğinde düşünülmesi gerekir. Bazı DNA'lar RNA örneklerinde sıklıkla mevcuttur, MTHFR genomik veya mRNA sekans çalışmalarında psödogenin ayırt edilmesi gerekir (83,85).

## 2.2. MTHFR PROTEİNİN YAPISI

Memelilerde MTHFR'nin yapısı hakkındaki ilk bilgiler, domuz karaciğer enziminin saflaştırılması ile elde edilmiştir. Enzim sitoplazmik bir protein olup, iki altbirimden oluşan homodimer yapıdadır. İnsanlarda yapılan Western analizler sonucu 2 izoformunun olduğu açıklanmıştır. Bu izoformlar dokulara özgün olup, 70 kDa'luk küçük alt birimlere sahip izoform karaciğerden, 77 kDa'luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan purifiye edilmiştir. Enzim tripsinle proteolizise uğratıldığında, 77 kDa'luk altbirim 40 kDa ve 37 kDa'luk kısımlara ayrılmaktadır. Bu ayrılma sonucunda S-adenozil metiyonin (SAM) inhibisyonu ortadan kalkar, ancak enzimin katalitik aktivitesi bozulmaz. Yapılan çalışmalar sonucunda katalitik bölge olan 40 kDa'luk N-uç bölgenin substrat ve koenzim bağlama kısımlarına sahip olduğu, regülatör bölge olan 37 kDa'luk C-uç bölgesinin ise, SAM bağlama kısmına sahip olduğu gösterilmiştir. Memeli enzimi kendisine nonkovalent olarak bağlı FAD koenzimi içerir. Bu koenzim NADPH 'ın metilentetrahidrofolata transferini sağlar (82,85).

## 2.3. MTHFR GENİNDE RASTLANAN MUTASYON TİPLERİ

MTHFR cDNA/genin klonlanması şiddetli MTHFR eksikliği ve homosistinüri olan hastalarda hastalık meydana getiren mutasyonların tanımlanmasına imkan vermiştir. Bu tip eksiklikle ilgili dünya çapında 50 veya daha fazla hastalık teşhis edilmesine rağmen, folat metabolizması hataları doğuştan çok yaygın olarak bulunmaktadır (86). Nöbet geçirme, trombozis, ve vasküler lezyonlar gibi gelişimsel problemler MTHFR-eksikliği olan hastalardaki klinik semptomlar olarak ortaya çıkmaktadır. DS Rosenblatt ve ark. (86) şiddetli MTHFR eksikliğinde ortaya çıkan klinik özelliklerin daha kapsamlı bir analizini yapmışlardır. Otuzdört mutasyon homosistinüri MTHFR eksikliği olan hastalarda tanımlanmıştır. Bu sonuçlar single strand conformation polymorphism (SSCP) analizi yada PCR veya RT-PCR ürünlerinin direkt sekansı yoluyla elde edilmiştir (84). Ekzonların amplifikasyonu için primerler, yayınlanmış genomik sekanslar temel alınarak düzenlenmiştir. Tanımlanmış mutasyonlar üç kriter

temel alınarak sağlığa zararlı olduğu tahmin edilmektedir: Genel populasyonda pek bulunmayışı, amino asit değişikliklerinin korunum derecesi, ve korunmuş bölge içindeki mutasyonun mevcudiyeti. Mutasyonlar hem in vitro bakteriyel ekspresyon sistemlerinde hemde in vivo maya hücrelerinde ekspresse edilmiş ve enzim aktiviteleri incelenmiştir (85). Otuzdört mutasyonun 12'si hastalarda ancak homozigot şekillerde mevcutken, geri kalan 22'si heterozigot durumdada hastalık ortaya çıkarabilmektedir. 34 mutasyonun 8'i nonsense mutasyon, 23'ü missens, 1'i delesyon ve 2'si splice variant şeklinde sınıflandırılmıştır. Ekzon 5 ve 6 boyutuna göre oldukça fazla sayıda mutasyon göstermektedir. Her iki ekzon katalitik domain içinde olduğundan substratlara bağlanabilir ve bu ekzonlardaki mutasyonlar daha zararlı olabilir (87,88,89).

### 2.3.1.Nonsense Mutasyonlar

Sekiz nonsense mutasyon (28A→T, 559C→T, 1084C→T, 1134C→G, 1274G→A,1420G→T, 1711C→T ve 1762A→T) MTHFR polipeptidi boyunca dağılmıştır (83). Proteinin C terminalinin değişik kısımlarında doğal bir şekilde meydana gelen in vivo delesyonlar homozigot nonsense mutasyonların anlaşılmasında faydalı olmuştur. Rapor edilmiş dört homozigot hastadaki üç mutasyon (katalitik domainde 559C→T, linker bölgede 1084C→T, ve regülatuar domainde 1762A→T) bu hastaların fibroblastlarında aşırı enzim eksikliği (% 0-1) neden olmaktadır. Mutasyon barındıran allelerin translese olup olmadıkları veya mRNA'nın nonsense-aracılı mRNA bozulması (nonsense-mediated mRNA degradation - NMD) yoluyla bozulup bozulmadığı bilinmiyor (90). Dört homozigot nonsense mutasyonda Kluijtmans ve arkadaşları (88) tarafından rapor edildi (regülatuar bölgede 1711C→T mutasyonu). Hastaların spesifik enzim aktivitesi yaklaşık % 32'dir. Bu mutasyon C-terminal bölgeye lokalizedir ve çoğu distal nonsense mutasyonu düşük enzim aktivitesiyle ilişkili olmasına rağmen bu mutasyonun enzim aktivitesi üzerinde dramatik bir etki gösterdiği gözlemlenmemiştir. Diğer dört heterozigot mutasyonun etkileri bilinmiyor, fakat bazı etkiler lokalizasyonları temel alınarak tahmin edilebilir. 5'-çoğu mutasyon kodlanan bölgenin başlangıcındadır (28A→T; R6X) ve hastalığın oluşmasına

katkıda bulunması olası değildir. 1134C→G mutasyonu linker bölgenin hemen aşağı bölgesindedir, regülatuar domain SAM-bağlanma bölgesinde potansiyel bir inhibisyon olmaksızın katalatik bölge sağlam kalmaktadır. 1420G→T mutasyonu downstream bölgenin hemen başlangıcındayken, protein seviyeleri normal olduğu zaman, bakteriyel ekspresyon sistemlerinde enzim aktivitesinin wild tipden 4 kat kadar artış gösterdiği saptanmıştır (83,87).

### 2.3.2. Missense Mutasyonlar

Missens mutasyonların çoğu MTHFR'nin katalatik N-terminal domaininde bulunmuştur. 1141C→T, 1172G→A ve 1274G→C mutasyonlarının hepsi tahminen SAM-bağlanma bölgesi içerisinde lokalizedirler ve SAM bağlanmasını etkileyebilmektedirler. 1615C→T, 1727C→T, 1755G→A ve 1768G→A mutasyonları linkerin downstream bölgesindeyken, 1081C→T mutasyonları bu bölgenin içerisinde lokalizedir. 1727C→T mutasyonu haricinde, diğer üç mutasyon ikinci dekada teşhis konulan hastalarda bulunmuştur. Bu mutasyonun enzim aktivitesi üzerinde orta derecede bir etki göstermesi olasıdır. Bundan başka, 1081C→T mutasyonunun invitro ekspresyonu enzim aktivitesinde tespit edilebilir bir etki göstermemiştir. Bu yüzdende etkisinin enzim stabilitesi üzerine olabileceği düşünülmüştür (83). Yedi N-terminal missense mutasyon ise hastalarda ancak homozigot durumda etki göstermektedir: 458G→T, 692C→T, 764C→T, 983A→G, 985C→T, 1010T→C ve 1027T→G. Bu mutasyonların hepsinin, 985C→T'nin haricinde, sağlığa zararlı şiddetli etkilere sahip oldukları tahmin edilmektedir. 458G→T, 692C→T, 983A→G, ve 1027T→G mutasyonlarının zararlı etkilerinin varlığı değişik mutagenesis deneyleri ile doğrulanmıştır. 983 bp'de mutasyon sonucu oluşan enzim invitro FAD yoluyla stabilize edilerek gösterilmiştir. Aynı yolla 677 bp'de mutasyon sonucu oluşan enzimde gösterilmiştir. 985C→T mutasyonun % 20 enzim aktivitesine sahip homozigot hastalarda tespit edilmiş olması ilginçtir, fakat mutasyon invitro ekspresse olduğu zaman, enzim aktivitesinde yaklaşık 5 katlık bir artışa yol açmaktadır. Bu mutasyonun in vivo aktiviteden çok enzim stabilitesinin etkilediği söylenmektedir (83,87).

Bölgeye yönelik mutagenesis çalışmaları bazı heterozigot mutasyonların enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için kullanılmıştır. 164G→C, 980T→C, 1015C→T, 1025T→C mutasyonlarının hepsi düşük enzim aktivitesine sebep olmaktadır (10%). 167G→A ve 1141C→T mutasyonlarının enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı düşünülmektedir. İlginç bir şekilde, ekzon 5'de bulunan 1025T→C mutasyonu, in vivo intron 5'in alkonmasını sağlamaktadır. Bu gözlemin net bir açıklaması olmamasına rağmen, bu bölgedeki ekzon splicing enhanserlerinin varlığının işareti olabilir (75,83,87).

### 2.3.3. Diğer mutasyonlar

İki splice bölge mutasyonu tanımlanmıştır. Bunlardan ilki 249-1G→T intron 1 içindeki splice-akseptör dinükleotid (AG) 'de lokalize olmuştur. İkincisi, 5' splice donör bölgedeki 792+1G→A mutasyonudur ve kriptik splice bölge aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Delesyon mutasyonu sadece 1569. nükleotidde tespit edilmiştir ve bu mutasyonu homozigot olarak bulunduran kişilerde şiddetli MTHFR eksikliğine rastlanmaktadır. 1553 ve 1554. pozisyonda AG 'nin iki nükleotid delesyonu mevcuttur ve frameshift mutasyonlara sebep olmaktadır (83,87).

## 2.4. MTHFR GEN POLİMORFİZMLERİ

Onbir ekzon ve 14583 baz çiftinden (bç) meydana gelen MTHFR geni 1 p36.3'de lokalize olup tarif edilen pek çok nadir rastlanan allelik varyantı, ciddi MTHFR eksikliklerine sebep olur ve nadir görülen bir hastalık olan homosistinürinin sebeplerinden birini teşkil eder (83).

MTHFR geninin şimdiye dek tanımlanmış olan varyantları C559T (Arg184Ter), G482A (Arg158G1n), C677T (Ala222Val), A1298C (Glu429A1a), A983G, T1027G, C1711T (CGA (arg)→TGA (dur)), C1081T ve C1084T (CGA (Arg)→TGA (dur))olarak sıralanabilir (88).



### 2.4.1. MTHFR C677T

C677T polimorfizmi, MTHFR proteinin N-terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda meydana gelir. MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (Sitozin)'in T (Timin)'e değişimi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır. Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda Alanin'in yerine Valin'in geçmesine neden olur. Bunun sonucu MTHFR aktivitesi azalır. Azalan MTHFR aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olur (75,85). MTHFR'nin C677T polimorfizminde, CC (Alanin/Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir (85). MTHFR'nin C677T polimorfizminin, kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp defektleri, strok, Down sendromu, meme ve endometrial kanser gibi hastalıklarda bir risk faktörü olduğu açıklanmıştır. Yapılan çeşitli araştırmalarda, MTHFR 677 TT genotipli hastalarda, akut lösemi, kolorektal ve akciğer kanserlerine yakalanma riskinin azaldığı, endometrial kanserlerine ise yakalanma riskinin arttığı ileri sürülmüştür (84). C677T mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein seviyesi önemli oranda yükselir. MTHFR eksikliğinde, homosisteinden metiyonin oluşumundaki bir bozukluk, organizmayı hem metiyonin (ve S-adenozilmetionin) azalmasına hem de homosistein birikiminden doğan toksik etkilere maruz bırakır (91).

### 2.4.2. MTHFR A1298C

MTHFR geninde belirlenen başka bir mutasyon da, enzimi kodlayan genin 7. ekzondaki 1298. nükleotid olan A(Adenin)'in→C (Sitozin)'e değişimi sonucu, MTHFR proteinindeki Glutamin'in Alanin'e değişimine neden olan nokta mutasyonudur ve enzimin C-uç regülatör bölgesinde etkilidir. Bu mutasyonda da diğer mutasyon tipinde olduğu gibi MTHFR

aktivitesi azalır. A1298C polimorfizminin, plazma homosistein konsantrasyonundaki artışı MTHFR C677T polimorfizmi kadar etkilemediği ileri sürülse de, bu polimorfizmin önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır (84). Nöral tüp defektlerinin gelişmesinde A1298C mutasyonunun ilişkisi yalnızca birkaç çalışmayla açıklanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, nöral tüp defektli çocuklarda, bu mutasyonun görülme sıklığının yüksek olduğu belirtilmiştir (71,76). Lievers ve ark. (92) 1298 A→C mutasyonunda MTHFR enzim aktivitesinde azalma olduğunu ancak bu durumun homosistein düzeyinde önemli bir etki yapmadığını göstermişlerdir. Homosistein'in kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemini yanında 1298A → C mutasyonunun da kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (92).

#### **2.4.3. MTHFR A1298C VE C677T Mutasyonlarının Kombinasyonu**

A1298C ve C677T mutasyonunun sıklığı popülasyonlara göre ve yaşla birlikte önemli farklılık göstermektedir. A1298C ve C677T mutasyonlarının birlikte heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin homozigot normal oluşu durumundaki enzim aktivitesinin %50-60'ı kadardır. Bu aktivite, C677T mutasyonlu heterozigot bireylerin enzim aktivitesinden daha düşüktür. MTHFR 677T/1298C heterozigot durumunun birlikte bulunduğu bireylerde, nöral tüp defektlerinde önemli bir artış olduğu ileri sürülmüştür (71,76). Buna karşılık 677CC/1298AA homozigot normal bireylerde akut lenfoblastik lösemi (ALL) gelişimi fazla iken, 677 CT/1298 AC heterozigot bireylerde, akut lösemi gelişiminin daha az görüldüğü bildirilmiştir (73).

677CC/1298 CC genotipine sahip bireylerde 677CC/1298AA genotipli bireylere göre plazma total homosisteininde azalma olduğu açıklanmıştır. Tek başına C677T homozigot mutasyonlu (TT) genotipine sahip bireylerde ise plazma homosisteini önemli düzeyde artmaktadır. Van der Put ve ark.(77) yaptıkları bir çalışmada, her iki mutasyon bakımından çift heterozigot olan (A1298C/C677T) bireylerde total plazma homosistein konsantrasyonunun

önemli derecede arttığını belirtmişlerdir. A1298C mutasyonu, MTHFR enziminin C-uç regülatör bölgesinde meydana gelmesine karşılık, C677T mutasyonu genin N-uç katalitik bölgesinde meydana gelmekte ve bu nedenle A1298C mutasyonlu bireylerde MTHFR enzim aktivitesindeki azalma C677T mutasyonlu bireylerin enzim aktivitesinden daha az olmaktadır. Daha önceki çalışmalarda da C677T mutasyonun MTHFR aktivitesinde önemli bir etkiye sahip olduğu açıklanmıştır. Hem heterozigot 677CT hem de homozigot mutant 677 TT genotiplerinde, MTHFR enzim aktivitesi homozigot atasal tip (677CC) genotipe göre önemli derecede düşüktür. 677TT genotipi, termolabile MTHFR enzim özelliğine sahiptir (76, 77, 92).1298A→C polimorfizminde azalan enzim aktivitelere rağmen ısı inkübasyonundan sonra 1298A→C genotipinde enzim aktivasyon yüzdesinde önemli bir farklılık görülmediği için, bu polimorfizmin enzimin termostabilitesini etkilemediği bildirilmiştir (92).

#### 2.4.4. Diğerleri

Bir üçüncü variant olan R594Q 1793G→A değişikliği ile sonuçlanmaktadır. Bu polimorfizm 677C→T ve 1298A→C polimorfizimlerinden daha az yaygındır, Kafkas kökenlilerde allel frekansı % 6.9, İspanyol kökenlilerde % 5.8 ve Afrika kökenli Amerikalılarda % 3.1 olarak gözlenmiştir. Homozigotluk sadece Kafkas kökenlilerde gözlenmiştir ( 159 kişiden sadece birinde). 1068T→C alleli (1059T→C olarak rapor edilmiştir ) ise 1298A→C mutasyonu ile linkaj uyumsuzluğuna sahip olduğu ortaya çıkarılmış silent bir mutasyondur (83).

### 2.5. MTHFR GEN POLİMORFİZMLERİNİN DAĞILIM FREKANSLARI

MTHFR mutasyonunun dünyadaki genel dağılımı ile ilgili yapılan önceki çalışmalarda Avrupalılarda yoğun olarak görülmektedir. MTHFR genindeki mutasyon sıklığı Avrupalılarda %24-40 arasında görülürken, Japonlarda %26-37 ve Amerikalı Afrikalılarda %11 oranında görülmektedir. Birbiriyle akraba olmayan dünyada yaygın 16 popülasyonda 881 kişide C677T polimorfizm varlığı

gösterilmiştir. MTHFR polimorfizmi, FV Leiden ve diğer mutasyonların dağılımına benzerlik göstermemektedir. Çünkü bu mutasyonlar öncelikle Avrupa' da yaygınken MTHFR mutasyonu dünyanın her yerinde göreceli olarak daha yüksek oranlarda görülmektedir. C677T mutasyonu Avrupa ve Asya ile karşılaştırıldığında Afrika da (% 7 ) daha düşük olarak belirlenmiştir (93,94). Türk populasyonunda Akar ve ark. (95) trombozlu hastalarda MTHFR C677T homozigot mutasyon sıklığını 121 hastada %13 olarak gösterirlerken, sağlıklı 95 bireyde bu oran %6,32 olarak bulunmuştur. Özmen ve arkadaşları arteriyel trombozlu 20 hastada araştırdıkları MTHFR gen mutasyonunu %45 oranında saptamışlardır. Sağlıklı kontrol grubunda ise 42 bireyin 20'sinde mutasyon (%47) gözlenmektedir (96) C677T allelinin populasyon frekansı bölgesel ve etnik varyasyonlar göstermektedir. Örneğin, allel frekansı İtalya ve Kaliforniyada yaşayan İspanyalılar arasında yüksek ve Amarikalı siyahlar ve Sahra altı Afrikanın bazı bölgelerinde düşüktü. C677T homozigotluk frekansında benzer değişiklikler göstermekteydi (97). Bir çok populasyondaki yüksek allel frekansının nedeni açık değildir değişik bölgelerden elde edilen birleşik sonuçlar özetlenmektedir. Diğer etnik gruplar: Dünya çevresinde diğer populasyonlarda bu MTHFR mutasyonun dağılımı hakkında bilgi, bazı küçük ve izole etnik gruplarla sınırlıdır. Bu çalışmaların çoğu her bir populasyonun subgrupları için sınırlı sayıda kişiyi içermektedir. Bu kişilerin nasıl seçildiği sıklıkla açık olmadığından bu bulgularla bir şey tahmin etmek zordur (93,94,95,96,97,98,99,100,101,102).

### 2.5.1. Sekse Göre Dağılım

Çalışmaların çoğunda örneklemelerin içeriğinin spesifik olmadığı, sek üzerinden genotip frekansının yorumlanmadığı görülmüş veya genotip frekansının kadınlar ve erkekler arasında önemli farklılıklar olmadığı rapor edilmiştir. Bir çalışmada yenidoğan kızlar arasında C677T homozigotluğunun yenidoğan erkeklerden daha düşük olduğu rapor edilmiştir (103).

### 2.5.2. Yaşa Bağlı Prevalans

Japonyada yapılan bir çalışmada yaşlı nüfus arasında C677T frekansının genç nüfustan daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada C677T homozigotluğunun frekansının 80 yaş veya daha yaşlılarda % 7, 55-79 yaş arasında % 14, 14-55 yaş arasında % 19 bulunmuştur. Hollandada C677T mutasyonun frekansı yaşlı erkeklerde ( 85 yaş ve üzeri) genç erkeklerden önemli miktarda daha düşüktü. Kadınlar arasında bu gibi farklılıkların olmadığı düşünülüyor (103).

### OLGULAR VE YÖNTEM

Bu çalışma için, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi (CÜTF) Klinik ve İlaç Araştırmaları Yerel Etik Kurulunun 06. 01. 2010 tarihli onayı alınmıştır. Ayrıca olgular çalışmaya alınmadan önce konu hakkında bilgilendirilip gerekli izinleri sağlanmıştır.

Bu araştırmaya 2010 yılı Ocak ayından 2010 yılı Temmuz ayına kadar CÜTF Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı polikliniğinde ACR'nin 1987 yılında yenilediği RA klasifikasyon kriterlerine göre tanı almış MTX ilaç yan etkisi görülen 30 RA hasta ile MTX ilaç yan etkisi görülmeyen 22 RA hasta kabul edildi .

Her bir olgunun klinik özellikleri ile birlikte, yaş, cinsiyet, hipertansiyon, aile öyküsü, beslenme özellikleri, fiziksel aktivite dereceleri, sigara ve alkol alışkanlıkları, eğitimi ve ailesinin geliri gibi sosyo-kültürel özellikleri sorgulandı.

MTX ilaç yan etkisi olarak bulantı, kusma, karın ağrısı, diyare, dispepsi gibi gastrointestinal yakınmalar, stomatit ve karaciğer fonksiyon testlerindeki bozukluk gibi durumlar sorgulandı ve kayıt edildi. Hastalarda ESH, CRP, RF, anti-CCP, Homosistein ve MTHR gen analizi bakıldı. Hastaların hastalık aktivite skoru (DAS28) hesaplandı, sabah tutukluğu kayıt edildi.

Çalışmaya katılan MTX yan etkisi görülen RA'li hastaların 22'si bayan, 8'i erkek, MTX yan etkisi görülmeyen RA'li kontrol grubu hastaların ise 16'si kadın, 6'si erkekti.

CRP: BECMAN COULTER(USE) marka test kiti ile Becman coulter image marka cihazda otomatik olarak nefelometrik yöntemle çalışıldı.

RF: BECMAN COULTER(USE) marka test kiti ile Becman coulter image marka cihazda otomatik olarak nefelometrik yöntemle çalışıldı.

ESH: Becton Dicson test kitleri ile BD Sedisystem (USE) marka cihazda otomatik olarak çalışıldı.

Anti-CCP: Aeskulisa test kiti ile Triturus marka cihazda tam otomatik olarak çalışıldı. Homosistein: Plazmada ELx-800 cihazında ELISA yöntemiyle, Axis-Norway ticari kitleri kullanılarak belirlendi.

Bu kişilerin MTHFR gen analizi için 2cc periferik venöz kan alınarak EDTA'lı tüpe aktarıldı, tüpler etiketlenerek kullanılmaya kadar -20 C'de muhafaza edildi.

#### **MTHFR gen analizi için kullanılan cihaz ve kimyasallar;**

- 1) Hibridizasyon cihazı (Profiblot T48, Tecan)
- 2) Thermal Cycler (Applied Biosystems, 2720)
- 3) Kuru ısı bloğu (CHB-202, Bioer)
- 4) Santrifüj (Micro 120, Hettich)
- 5) 1000'lük, 200'lük ve 10'lük mikropipetler (Eppendorf ve Gilson)
- 6) DNA izolasyon kiti (Invitex,, Invisorb Spin Blood Kit)
- 7) FMF Strip Assay PCR ve hibridizasyon kiti (Vienna Lab)
- 8) Elektroforez (Biorad, Midi)
- 9) Güçkaynağı (Biorad)

- 10) Taq DNA polimeraz (Fermentas)
- 11) Ethidium Bromide (EtBr)
- 12) TAE tamponu (Applichem)
- 13) Agaroz (Nu micropor, Prona)
- 14) Otoklav indikatörü
- 15) Tüp (K3- EDTA, Vacuette)
- 16) Eppendorf tüp (1.5, 2 ve 0.2 ml, Sarstedt)
- 17) Mikropipet uçları (beyaz, sarı ve mavi, Biosphere Filter Tips)
- 18) Etil alkol (Merck)
- 19) Yükleme boyası (Fermentas)

### **DNA İzolasyonu**

Bütün hastalardan genomik DNA izolasyonu periferik kan dokusundan yapıldı. Bunun için Invitek Invisorb Spin Blood DNA İzolasyon Kiti kullanıldı. Yaklaşık 200µl periferik kan dokusunun kullanıldığı teknik sonrasında 30–50 ng /µl ultrapur genomik DNA izole edilmektedir ( $A_{260}:A_{280}$  oranı 1,7- 2 arası). İzolasyon için kullanılan 52 hastalık kit içeriği aşağıdaki gibidir;

- 1) Proteinaz K, 1ml(10µg/µl)
- 2) Liziz tamponu (Lysis Buffer A), 15ml
- 3) Bağlanma tamponu (Binding Buffer B6), 30ml
- 4) Elüsyon tamponu (Eluotion Buffer D), 15ml
- 5) Yıkama Tamponu I, 30ml (Kullanılmadan önce 30ml %100'lük etil alkol eklenir)

6) Yıkama Tamponu II, 18ml (Kullanılmadan önce 42ml %100'lük etil alkol eklenir)

7) 2.0ml'lik toplama tüpleri, 100 adet

8) 1.5ml'lik toplama tüpleri, 50 adet

9) Filtreler, 50 adet

### **Kan Dokusundan DNA İzolasyonu Protokolü**

Çalışmadan önce örnek sayısına yetecek kadar elüsyon tamponu (elution buffer D) 56°C'ye ısıtıldı. Kodlaması yapıldıktan sonra 1,5'lik ependorf tüpe 200µl EDTA'lı kan, 200µl liziz tamponu (lysis buffer A) ve 20µl proteinaz K konuldu. Kapağı kapatılarak tüp 10 sn vortekslenildi ve 56°C'de 10dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüp ortamına 400µl bağlama tamponu (binding buffer B6) tüpe eklendi, 3-4 kez pipetaj yapıldıktan sonra lizatın tamamı filtrelili toplama tüpüne aktarıldı. Filtre toplama tüpü daha sonra 3dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 12 000 rpm'de 2dk santrifüj edildi. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 500µl yıkama tamponu 1 (wash buffer I) eklendi ve 12000rpm'de 1dk santrifüj edildi. Toplama tüpü tekrar değiştirildi, filtre üzerine 800µl yıkama tamponu 2 (wash buffer II) eklenerek ve 12 000rpm'de 1dk santrifüj edildi. Filtre üçüncü kez olarak 2ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, 14 000rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkama tamponlarından gelen alkolden arındırıldı. Alkolden tamamen arındırmak için filtre dördüncü ve son kez yeni 1,5'lik tüpe yerleştirildi ve 3 dk kapağı açık biçimde oda sıcaklığında bekletildi.

Daha sonra filtre membranının tam ortasına 200µl elüsyon tamponu (elution buffer-D) eklendi, 5dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Filtrelili tüp 10.000rpm'de 1 dk santrifüj edildi, filtredeki DNA çözeltisi toplama tüpüne aktarıldı, etiketlendi ve -20°C'de çalışılmak üzere muhafaza edildi.



### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

MTHFR geninin ilgili bölgelerinin çoklu (multipleks) amplifikasyonu için Vienna Lab CVD PCR amplifikasyon kiti kullanıldı. Kit, bir amplifikasyon karışımı (gen bölgesine ait biyotin işaretli primerler, ve diğer amplifikasyon için gerekli bileşenleri içerir) ve Taq DNA polimeraz tamponundan oluşmaktadır.

PCR anakarışım, her hasta için etiketlenmiş 0.2 ml eppendorf tüp ortamı;

Amplifikasyon karışımı : 15µl

Taq DNA polimeraz seyreltici tapon: 4,6µl

Taq DNA polimeraz : 0,4µl

Kalıp DNA : 5µl

Toplam hacim : 25 µl şeklinde hazırlandı.

Multipleks PCR koşulları aşağıdaki gibi ayarlandı:

95°C'de.....2dk (ilk denaturasyon)

95°C'de.....15sn (denaturasyon)

56°C'de.....30sn (bağlanma)

72°C'de.....30sn (uzama)

72°C'de.....3dk (son uzama)

35 döngüden sonra elde edilen PCR ürünleri strip test tekniğinde değerlendirilmek üzere +4°C'de saklandı.

### **Agaroz Jel Elektroforezi**

Hibridizasyon işleminden önce elde edilen PCR ürünleri (4 µl) %1'lik elektroforezde başarılı amplifikasyonlar açısından değerlendirildi. Başarılı

amplifikasyon elde edilen PCR ürünlerinden 10µl ürün revers hibridizasyon analiz için kullanıldı.

### **Revers-Hibridizasyon**

Southern Blot analiz için Revers-hibridizasyon ProfiBlot T48 (Tecan) hibridizasyon cihazı kullanıldı. Revers-hibridizasyon, biyotin işaretli primerlerle çoklu (multiplex) polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında oluşan ürünlerin nitroselluloz membranlar (stripler) üzerindeki kendi komplementer zincirlerine bağlanması ve bir konjugat-substrat reaksiyonu oluşturması esasına dayanan bir tekniktir.

### **Revers Hibridizasyon Basamakları ve Kullanılan solüsyonlar**

Strip test tekniğininde Revers Hibridizasyon 3 temel basamaktan ibarettir;

1) Strip üzerindeki problemler ve PCR ürünlerinin bağlanması-hibridizasyonu;

Cihazın örnek yükleme bölgesine (trey) yüklenen 10µl PCR ürünü kitle birlikte sağlanan 10µl DNAT (NaOH içerikli bir denatürasyon solüsyonu) solüsyonu kullanılarak denatüre edildi. Treye strip yerleştirildi. Denatüre PCR ürünü ve strip, cihazın sallanan platformunda, 45°C de sıcaklıkta (yaklaşık) 1ml hibridizasyon tamponu ile 20 dk inkübe edilerek strip PCR ürünü hibridizasyonu sağlandı. Hibridizasyon solüsyonu aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı.

2) Yıkama

Hibridizasyon sonrasında ortamda bulunması istenmeyen PCR ürünleri ve non-spesifik bağlanma yapan oligonükleotidler kuvvetli bir yıkayıcı olan yıkama solüsyonu A (1ml) ile 45°C'de 15 dakikalık üç yıkama periyodu ile ortamdan uzaklaştırıldı.

3) Renk oluşumu

Stripler oda sıcaklığında 1ml konjugat solüsyonu ile 15 dk inkübe edilerek konjugat solüsyonu içinde bulunan streptavidin-alkalan fosfataz, biyotin işaretli hibrit DNA fragmentlerine bağlanması sağlandı.

Konjuat solüsyonunun artıkları daha yumuşak bir yıkama solüsyonu olan yıkama solüsyonu B ile 10, 5 ve 5 dakikalık üç periyotta temizlendi.

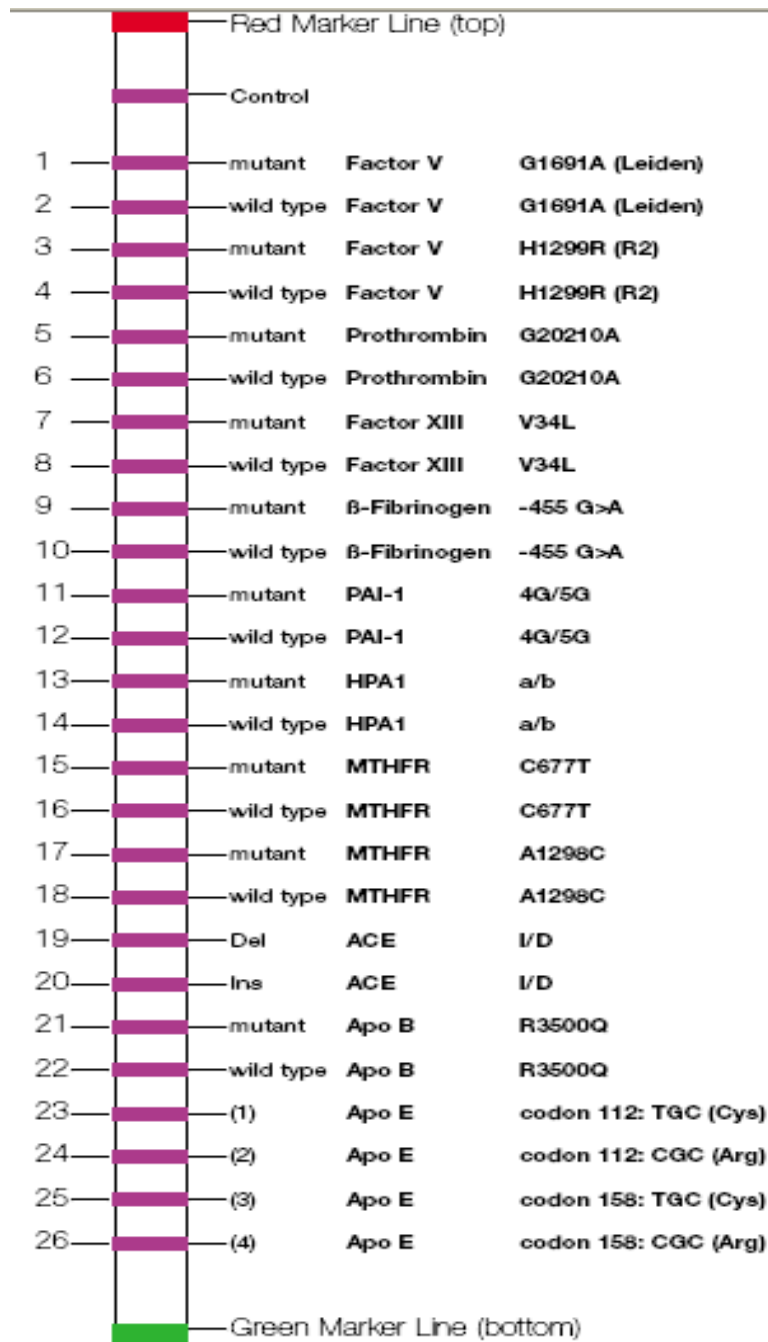
Strip üzerindeki hibridize olmuş bantların görülür hale gelebilmesi için ortama 1ml alkalan fosfatazın substratı olan nitro blue tetrazolium (NBT) ve 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfatdan (BCIP) oluşan renk geliştiricisi (color developer) eklendi, oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona tabi tutuldu. Strip son olarak distile su ile yıkandı, kâğıt havlu ile kurutulduktan sonra değerlendirme tablosuna (Collector) özenle yerleştirildi.

### **Striplerin Değerlendirilmesi**

Her stripin üst tarafında kırmızı ve alt tarafında yeşil bir belirteç bulunmaktadır. Bunun dışında hibridizasyon sonrası striplerin değerlendirmeye alınabilmesi için kontrol bantının oluşmuş olması gerekmektedir. Kontrol bantları oluşmamış stripler değerlendirilmeye alınmazlar. Yabanıl tip gen bölgesine ait 1 prob stripin alt kısmında, mutant gen bölgesine ait 1 prob ise stripin üst kısmında sinyal verecek şekilde dizayn edilmişlerdir (Şekil 7). Hibridizasyon sonrası yabanıl tip bantların mevcut olduğu ve mutant gen bölgesine ait bantın bulunmadığı bir strip profili hastanın mutasyona sahip olmadığını gösterir. Mutant gen bölgelerine ait bantda sinyal alınıyorsa sinyal alınan mutasyonun yabanıl tip kodonuna bakılarak saptanan mutasyonun homozigot ya da heterozigot olma durumuna karar verilir. Mutasyonun yabanıl tip gen bölgesini gösteren bantın mevcut olması durumunda mutasyon **heterozigot**, mevcut olmaması durumunda ise **homozigot** olarak değerlendirilir.

**İstatiksel Analiz :** Çalışmamızın verileri SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 14.0 programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi, Khi-kare testi kullanılmıştır. Verilerimiz

tablolarda aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma, denek sayısı ve yüzdesi şeklinde belirtilmiş olup yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.



**Şekil 4:** Vienna Lab CVD StripAssay (Manufactured by: ViennaLab Vienna, Austria)

## BULGULAR

Olgular 2 grupta toplandı. Birinci grupta, MTX ilaç yan etkisi görülen 22'si bayan, 7'si erkek toplam 30 RA'li hasta, ikinci grupta MTX ilaç yan etkisi görülmeyen 16'sı bayan, 6'sı erkek 22 RA'li hasta kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Her iki gruptaki hastalar tedavi olarak DMARD ve/veya anti-TNF tedavisi alıyordu. Her iki gruptaki hastalar DAS 28'e göre 2,6'nin altında remisyonu, 2,6-3,2 arası düşük hastalık aktivitesini, 3,2-5,1 arası orta hastalık aktivitesini ve 5,1'in üzeri yüksek hastalık aktivitesini gösterecek şekilde sınıflandı. Sabah tutuklukları dakika cinsinden belirtildi. Her iki grup için MTHFR A1298C gen polimorfizmi analiz sonuçları homozigot normal ( AA ), heterozigot ( AC ) ve homozigot mutant ( CC ) olarak kayıt edildi. Her iki grup için MTHFR C677T gen polimorfizmi analiz sonuçları homozigot normal ( CC ), heterozigot ( CT ) ve homozigot mutant ( TT ) olarak kayıt edildi.

Çalışmaya aldığımız MTX ilaç yan etkisi görülen RA'li hasta grubu 30 bireyin yaşları  $49,23 \pm 8,32$ , MTX ilaç yan etkisi görülmeyen RA'li hasta grubu 22 bireyin yaşları  $44,50 \pm 10,59$  olarak bulunmuştur. Yaş yönünden gruplar arası farklılık önemsizdir (  $t=1.80$  ;  $p > 0,05$  ). MTX ilaç yan etkisi görülen RA'li hasta grubunu oluşturan bireylerin 22'si ( %73.3 ) kadın, 8'i ( % 26.7 ) erkektir. MTX ilaç yan etkisi görülmeyen RA'li hasta grubunu oluşturan bireylerin 16'sı ( %72.7 ) kadın, 6'sı ( % 27.3 ) erkektir. Cinsiyet yönünden gruplar arası fark önemsizdir (  $X^2=0,01$  ;  $p > 0,05$  ).

**Tablo 2:** Her İki Gruptaki Bireylerin Anti-CCP ve ESH Değerleri Yönünden Karşılaştırılması

<b>Ölçülen Parametreler</b>	<b>Yan Etki Görülen Grup</b> n: 30 X±S	<b>Yan Etki Görülmeyen Grup</b> n: 22 X±S	<b>Sonuçlar</b>
<b>Anti-CCP (U/ml)</b>	143,21±119,71	163,85±137,41	t=0,57 ; p= 0,566
<b>ESH (mm/h)</b>	26,96±20,74	31,04±24,22	t=0,65 ; p= 0,512

Her iki gruptaki bireyler ESH ve anti-CCP yönünden karşılaştırıldığında gruplar arası fark önemsiz bulunmuştur (  $p > 0.05$  ). Ayrıca her iki gruptaki bireyler sabah tutukluğu ve CRP değerleri yönünden karşılaştırıldığında gruplar arası fark önemsiz bulunmuştur (  $p > 0.05$  ).

**Tablo 3:** Her İki Gruptaki Bireylerin MTHFR C677T Gen Polimorfizmi Yönünden Karşılaştırılması

		MTHFR C677T			Toplam	
		CC	CT	TT		
<b>Gruplar</b>	<b>Yan etki görülen</b>	n	20	8	2	30
		%	66,7	26,7	6,7	100,0
	<b>Yan görülmeyen etki</b>	n	17	5	0	22
		%	77,3	22,7	,0	100,0
<b>Toplam</b>		n	37	13	2	52
		%	71,2	25,0	3,8	100,0

$$X^2 = 1,74$$

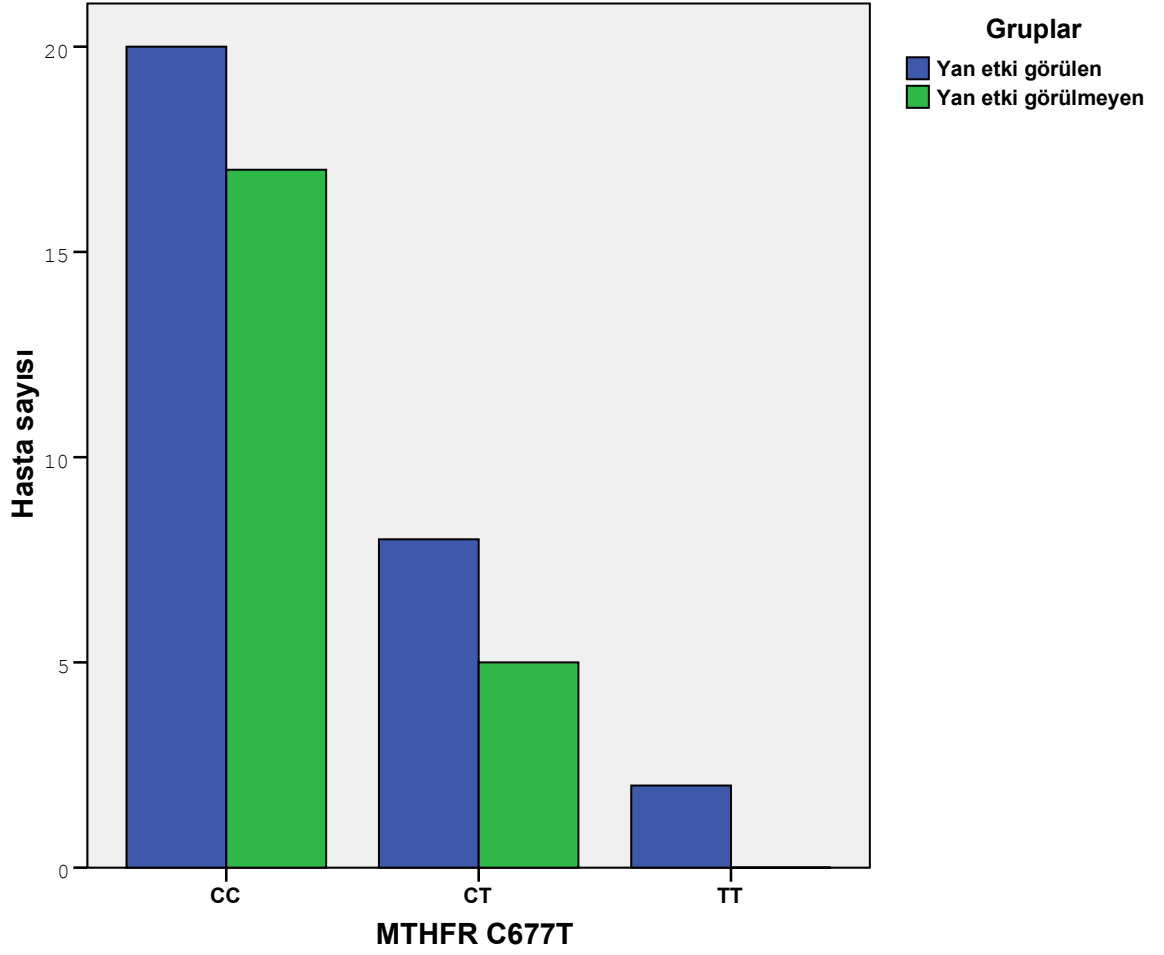
$$p=0,418$$

$$p > 0,05 \text{ önemsiz}$$

Her iki gruptaki bireyler MTHR C677T gen polimorfizmi yönünden karşılaştırıldığında gruplar arası fark önemsiz bulundu.(  $p > 0,05$  )



**Grafik 1:** Her İki Gruptaki Hastaların MTHFR C677T Gen Polimorfizmi Dağılımı



**Tablo 4:** Her İki Gruptaki Bireylerin MTHFR A1298C Gen Polimorfizmi Yönünden Karşılaştırılması

		MTHFR A1298C			Toplam
		AA	AC	CC	
<b>Yan etki görülen</b>	n	17	9	4	30
	%	56,7	30,0	13,3	100,0
<b>Yan etki görülmeyen</b>	n	14	6	2	22
	%	63,6	27,3	9,1	100,0
<b>Toplam</b>	n	31	15	6	52
	%	59,6	28,8	11,5	100,0

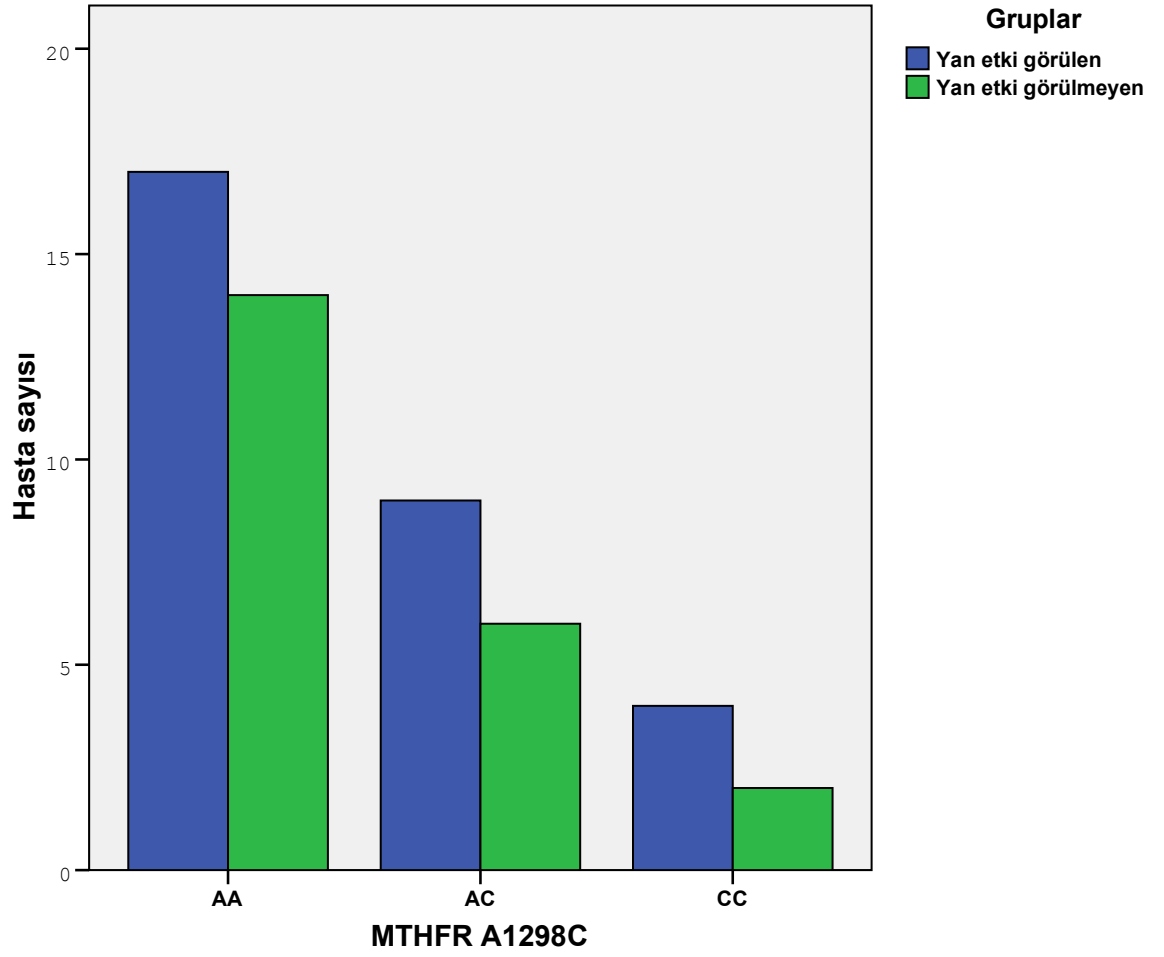
$$X^2 = 0,33$$

$$p=0,846$$

$$p > 0,05 \text{ önemsiz}$$

Her iki gruptaki bireyler MTHR A1298C gen polimorfizmi yönünden karşılaştırıldığında gruplar arası fark önemsiz bulundu.(  $p > 0,05$  )

**Grafik 2:** Her İki Gruptaki Bireylerin MTHFR A1298C Gen Polimorfizmi Dağılımı



**Tablo 5:** Her İki Gruptaki Bireylerin anti-CCP varlığı Karşılaştırılması

		anti-CCP varlığı		Toplam	
		negatif	pozitif		
<b>Gruplar</b>	<b>Yan etki görülen</b>	n	8	22	30
		%	26,7	73,3	100,0
	<b>Yan etki görülmeyen</b>	n	7	15	22
		%	31,8	68,2	100,0
<b>Toplam</b>		n	15	37	52
		%	28,8	71,2	100,0

$X^2 = 0,16$        $p=0,685$        $p > 0,05$  önemsiz

Her iki gruptaki bireyler anti ccp varlığı yönünden karşılaştırıldığında gruplar arası fark önemsiz bulundu (  $p > 0,05$  ).

Her iki gruptaki hastaların hepsi DMARD kullanmaktaydı. Her iki gruptaki hastaların homosistein düzeyleri normaldi.

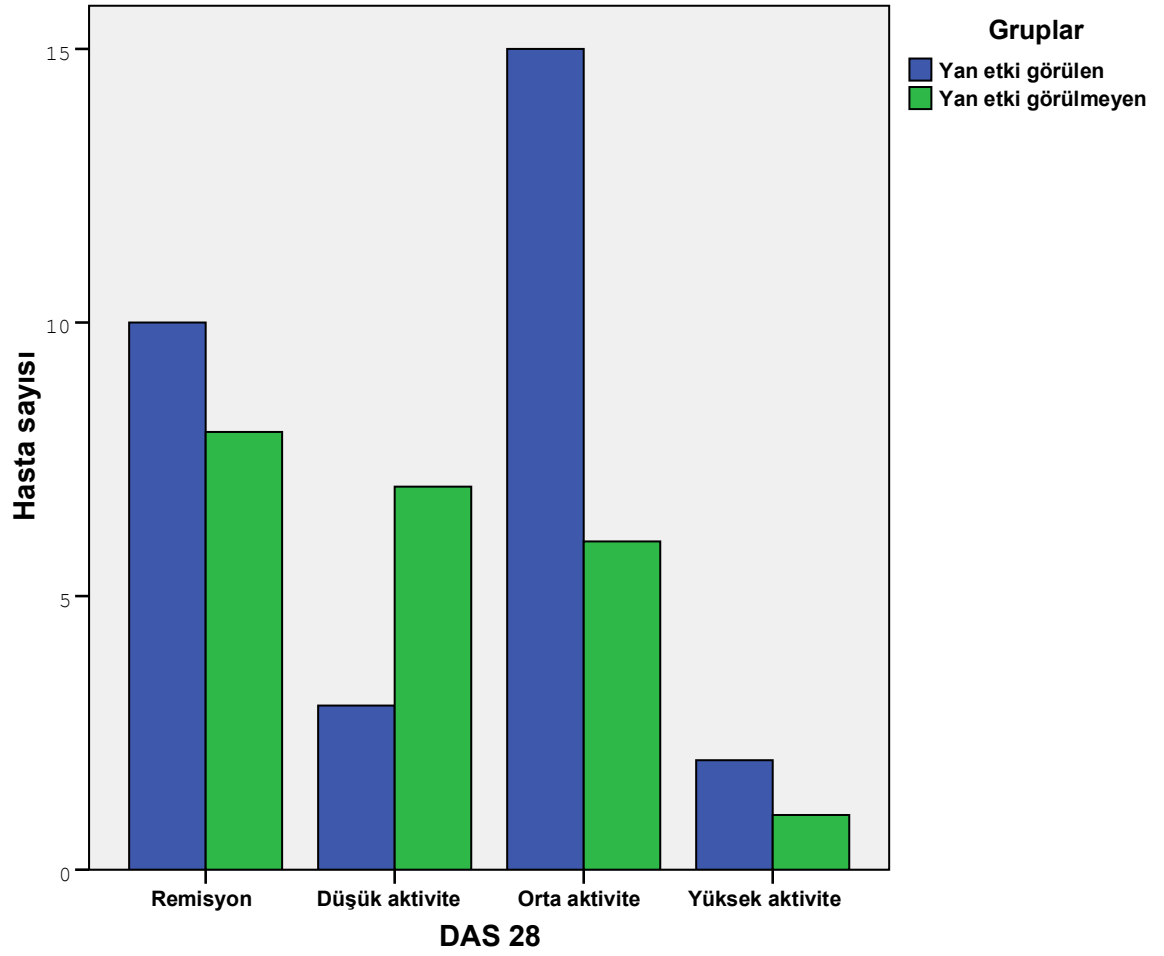
**Tablo 6:** Her iki gruptaki bireylerin DAS28 Skorlarının Karşılaştırılması

		DAS 28				Toplam	
		Remisyon	Düşük Aktivite	Orta Aktivite	Yüksek Aktivite		
<b>Gruplar</b>	<b>Yan etki görülen</b>	n	10	3	15	2	30
		%	33,3	10,0	50,0	6,7	100,0
	<b>Yan etki görülmeyen</b>	n	8	7	6	1	22
		%	36,4	31,8	27,3	4,5	100,0
<b>Toplam</b>		n	18	10	21	3	52
		%	34,6	19,2	40,4	5,8	100,0

$$X^2 = 4,89 \quad p=0,179$$

$p > 0,05$  önemsiz

Her iki gruptaki bireyler DAS28 skoru olarak karşılaştırıldığında gruplar arası fark önemsiz bulundu. (  $p > 0,05$  )



**Grafik 3:** Her İki Gruptaki Hastaların DAS28 Skoru Dağılımı

**Tablo 7 : Her İki Gruptaki Bireylerin RF varlığı Karşılaştırılması**

		RF varlığı		Toplam	
		negatif	pozitif		
<b>Gruplar</b>	<b>Yan etki görülen</b>	n	13	17	30
		%	43,3	56,7	100,0
	<b>Yan etki görülmeyen</b>	n	10	12	22
		%	45,5	54,5	100,0
<b>Toplam</b>		n	23	29	52
		%	44,2	55,8	100,0

$X^2 = 0,02$

$p=0,879$

$p > 0,05$  önemsiz

Her iki gruptaki bireyler RF varlığı yönünden karşılaştırıldığında gruplar arası fark önemsiz bulundu. (  $p > 0,05$  )

## TARTIŞMA

RA etyolojisi belli olmayan, tüm sinovyal eklemleri simetrik olarak tutabilen, kronik inflamasyonla seyreden ileri dönemlerde fonksiyon kaybına ve mortaliteye neden olabilen yaygın bir otoimmün hastalıktır. RA'te immün aktivasyonun primer bölgesi sinoviyumdur. Sinoviyumun özellikle T hücreler ve makrofajlar gibi mononükleer hücrelerle infiltrasyonu ve sinoviyal intimal çizgi hiperplazisi hastalığın özellikleridir. Sitokinler, hücreler arası iletişimi sağlayan ve biyolojik olaylarda rol alan haberci moleküllerdir. Hücre büyüme ve farklılaşmasında, inflamasyonda, doku onarım ve yeniden yapılanmasında ve immün yanıtın düzenlenmesinde rol oynarlar. Hücresel ve humoral immün yanıtta dengeyi sağlarlar. Proinflamatuvar veya antiinflamatuvar etki gösterirler (104). Romatoid sinoviyumda aktive lenfositler, makrofajlar ve fibroblastlardan salgılanan bir takım maddelerin birikimi mevcuttur. Bu sitokin ve kemokinlerin lokal üretimi romatoid artrit pek çok klinik tablosunun oluşumuna neden olur (2).

Farmakogenetik araştırmalarla ilk olarak hastalıklarla ilişkilendirilen özgül gen ve gen ürünlerinin tanımlanması, ikinci olarak ilaca verilen yanıtı etkileyen genlerin ve alelik varyantlarının tanımlanması ve son olarak bu tanımlamalardan elde edilen bilgilerle en uygun ilaç ve doz seçiminin yapılması ve bireye özgü tedavilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir (105).

Eklem tutulmalarıyla başlayan, uzun süren ve tedavisine erken başlanması gereken bir immün hastalık olan RA, son yıllarda yaygın olarak hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan biri olan MTX ile tedavi edilmeye başlanmıştır (106). MTX, haftalık doz uyarlamaları yapılarak yıllarca kullanılabilmesi açısından da önemlidir (107).

Hastalık süresi, haftalık ilaç dozu, cinsiyet, yaş, obezite, folik asit kullanımı, vücut kütle indeksi ve son yıllarda farmakogenetik çalışmalarla MTX' in metabolik yolağında yer alan enzimlerde meydana gelebilecek genetik farklılıklar gibi etmenlerin MTX kullanımına bağlı olarak gelişebilen hepatotoksisite ve gastrointestinal komplikasyonların oluşmasında risk faktörleri arasında olduğu rapor edilmiştir (108,107,109,110,111, 112). Bu belirtilen risk



faktörleri arasında üzerinde en çok durulan faktör, bireyler arasındaki tek nükleotid değişikliği ( SNP) ile ortaya çıkan genetik farklılıklardır.

Son yıllarda yapılan araştırmalarla, MTX' in etki ve toksisite oluşturma özelliği üzerinde genetik faktörlere bağlı olan farklılıkların nedenleri tam olarak belirlenememesine rağmen, folat metabolizmasında yer alan enzimlerde meydana gelebilecek polimorfizmlerin bu farklılığın ortaya çıkmasına neden olabileceği rapor edilmektedir (113).

MTHFR enziminin folat metabolizmasında yer alması ve homosisteinin metiyonine remetilasyonunu sağlayan enzimlerden bir tanesi olması nedeniyle MTX' in etkilerinin düzenlenmesinde güçlü bir aday olduğu belirtilmektedir (40, 71). Bugüne kadar MTX tedavisi gören RA' li hastalarda, MTHFR geninde en sık görülen C677T ve A1298C polimorfizmlerinin toksisite gelişmesi üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla birçok çalışma yapılmış ancak farklı sonuçlar elde edilmiştir (5, 7, 62, 108, 109, 113,110, 111, 112).

Bizde yaptığımız bu çalışmada, MTX tedavisi gören RA' li hastalarda uygulanan ilaç tedavisi sonucu oluşabilecek yan etkilerin en aza indirilmesini ve etkin bir tedavinin sağlanmasına katkıda bulunmak amacıyla yan etki gelişimi üzerinde, güçlü bir aday olduğu belirtilen, MTHFR enziminde meydana gelebilecek C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin analizlerini gerçekleştirdik.

Wako Urano ve arkadaşları (5) MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerin, MTX etki ve toksisitesi ile ilişkili olup olmadığını 106 hastada araştırmışlar ve toksisite gelişiminin 677T aleline sahip hastalarda (% 26.9) 677C (% 8,6) aleline göre daha sıklıkla görüldüğünü ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, A1298C polimorfizminin toksisite oluşumunda etkili olmadığını belirtmişlerdir. Haplotip analizi yaptıklarında 677C-1298C haplotipine sahip hastalarda diğerlerine göre daha düşük dozlarda MTX kullanıldığını, 677T-1298A haplotipli bireylerde de yan etki oranının daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda yan etki gözlenen grupta ve yan etki gözlenmeyen gruplarda sırasıyla MTHFR C677T (% 40 CC, % 46,7 CT % 13,3 TT), (% 40 CC, % 45.7 CT, % 14.3 TT) ve A1298C (% 40 AA, % 53.3 CT % 6.7 TT), (% 42.9 AA, % 48.6 AC, % 8.6 CC) genotipleri açısından analiz edildiğinde aralarında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir (  $p>0.05$  ).

Diğer bir çalışma da Annelies E. van Ede ve arkadaşları (111) MTX ile tedavi edilen 236 RA'li hasta üzerinde MTHFR C677T polimorfizminin ilaç etkisi ve toksisite etkisini araştırmışlar, bu gen polimorfizminin MTX tedavisine bağlı olarak toksisite gelişme ve tedavinin sonlanma riskinin arttığını ileri sürülmüştür. Ayrıca elde ettikleri bulgularla folik veya folinik asit alınımının, MTX tedavisinden kaynaklanan toksisite insidansını azalttığı bildirmişlerdir.

Yaptığımız mevcut çalışmada MTX ile tedavi edilen ve tedavi esnasında yan etkisi görülen ve görülmeyen grupla MTHFR C677T polimorfizmi karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir (  $p > 0.05$  ).

Parshant Aggarwal ve arkadaşlarının 150 RA hastasında yaptıkları çalışmada metilentetrahidrofolat reduktaz genindeki C667T polimorfizmi metotreksat tedavisinin etkinliği ya da toksisitesinin öngörüsü olmadığını belirtmişlerdir. Toksisite ve klinik yanıtta değişkenliklerden sorumlu olabilecek diğer enzimlerdeki polimorfizmlere bakma ihtiyacı olduğunu belirtmişlerdir (114). J P Mena ve arkadaşları MTX ilaç tedavisi alan Meksikalı 70 RA hastada karaciğer enzimlerindeki yükseklik ile MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmi arasındaki ilişkiyi incelediklerinde MTHFR A1298C polimorfizmi ile ilişkili olduğunu saptamışlardır.(115)

Bizim yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlarda MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmi ile ilaç yan etkisi arasında ilişki tespit edilmemiştir. Yapılan istatistiksel analizde iki grup arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir (  $p>0.05$  ). Haagsma ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, MTX tedavisinin başlangıcından 1 yıl sonra C677T polimorfizmi için heterozigot

genotipe sahip hastaların yüksek homosistein konsantrasyonuna sahip olduklarını bulmuşlar ve RA'li hastalarda MTX tedavisinde MTHFR genotipinin homosistein artışıyla ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (108).

Bizim çalışmamızda MTX yan etkisi görülen ve görülmeyen grupta MTHFR C677T polimorfizmi için bakılan homozigot normal, homozigot mutant ve heterozigot genotipe sahip hastaların homosistein düzeyleri normaldi ve homosistein düzeyleri karşılaştırıldığında iki grup arasındaki fark önemsizdi ( $p>0.05$ ).

Y Berkun ve arkadaşları (17), 93 RA'li hasta ve kontrol grubunda, MTHFR A1298C alel ve genotip dağılımını analizi ettiklerinde 1298CC genotipini hasta grubunda % 27,4, kontrol grubun da ise % 12,8 olarak belirlemişler ve aralarında belirgin bir farklılık olduğunu bildirmişlerdir. Ancak iki grup arasında alel frekansı bakımından farklılık bulamamışlar ve A ve C alellerinin dağılımının benzer olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca 677TT genotipinin homosistein konsantrasyonu ve meydana gelen yan etki üzerinde etkili olmadığını belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda MTX ilaç yan etkisi görülen ve görülmeyen grupta MTHFR C677T polimorfizmi incelendiğinde ilaç yan etkisi görülme ve homosistein düzeyleri ile ilişkisi önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Kazuhiko Kumagai ve arkadaşları 163 hastada MTX kullanan ve kullanmayan 2 grup arasında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerini alel frekansları incelediklerinde benzer bulmuşlar ve bu polimorfizmler ile toksisite gelişimi arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (113). Bizim yaptığımız mevcut çalışmada MTX yan etkisi görülen ve görülmeyen grupta MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmleri incelendiğinde iki grup arasında farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edildi ( $p>0.05$ ).

A. E. Van Ede ve arkadaşlarının (7) 113 hastada yaptıkları çalışmada plazma homosistein değişimi ile MTX tedavisinde gözlenen toksisite gelişimi arasında bir ilişki bulunmamıştır. Aynı analiz sadece MTX ve MTX ile birlikte

folik asit yada folinik asit kullanan alt gruplarda da yapıldığında, bütün MTX ile birlikte folik asit yada folinik asit kullanan alt gruplarda plazma homosistein konsantrasyonundaki değişimin toksisite gözlenen ve gözlenmeyen hastalar arasında bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir. MTX tedavisi sırasında plazma homosistein konsantrasyonunun değişimi C677T polimorfizmi varlığında ya da yokluğundan etkilenmediğini, diğer taraftan folat alımının homosistein konsantrasyonundaki artışı önlediğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da A. E. Van Ede ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçları destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubu ve çalışma grupları plazma homosistein seviyesi ve MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmleri açısından analiz edildiklerinde iki grubun genotip dağılımları ile homosistein düzeyleri arasında belirgin bir farklılık bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Yaptığımız bu çalışmada MTX tedavisi süresince plazma homosistein konsantrasyonunun değişiminin MTHFR geninde meydana gelen C677T polimorfizminin var olup olmasından etkilenmediği bulunmuştur. Bu ilişkinin belirlenebilmesi için 677TT genotipine sahip hasta sayısının az olmasından kaynaklandığı bu ilişkinin belirlenebilmesi için hasta sayısının artırılması gerektiği düşünülebilir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarla MTX tedavisinin folik asit yada folinik asit alımıyla önlenemeyen hiperhomosisteinemi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. MTHFR C677T gen polimorfizminin var olup olmasının bu etkiyi düzenlemediği belirtilmektedir. Hiperhomosisteinemi kalp hastalıkları ve serebrovasküler hastalıklarla ilişkili olması, MTX tedavisinde folat alımının başka bir tartışma konusu olduğu belirtilmektedir.

Bu çalışmalara ek olarak MTX kullanımında yan etki oluşumu ve önlenmesi konusunda ayrıca folik asit yolağındaki Timidilat sentaz enziminde veya MTX tarafından etkilenen diğer yollardaki diğer genlerde meydana gelebilecek farklı polimorfizmlerinde bu fenotiplere etkisi olup olmadığının araştırılmasının önemli olduğu belirtilmektedir (113, 110).

Bizim yaptığımız mevcut çalışmada MTX yan etkisi görülen ve görülmeyen grupta MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmleri incelendiğinde iki grup arasında farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edildi. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların hasta sayımızın kısıtlı olmasıyla da ilişkili olabilir. Ayrıca yaptığımız bu çalışmayı diğerlerinden ayıran en önemli özellik, konuyla ilgili Türkiye’de daha önce yeterli düzeyde araştırma yapılmamış olmasıdır. Bu nedenle RA’ li hastalarda MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin MTX ilaç yan etki ve toksisitesi üzerinde etkili olup olmadığının belirlenebilmesi için hasta grubunun genişletilerek yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

**KAYNAKLAR**

1. Maini RN, Zvaifler NJ. Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy. Klippel JH, Dieppe PA (ed). Rheumatology. St Louis: Mosby; 3:1, 1-4, 1994
2. Top C, Yılmaz B, Keskin Ö ve ark. Romatoid artiritli hastalarda serum interlökin 1 $\alpha$  düzeyleri ile insülin direnci arasındaki ilişki. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi; 28 (3): 81-84, 2002
3. Bettembourg-Brault I, Gossec L, Pham T, Gottenberg JE, Damiano J, Dougados M. Leflunomide in rheumatoid arthritis in daily practice: treatment discontinuation rates in comparison with other DMARDs. Clin Exp Rheumatol. 24(2):168-171, 2006
4. Mundo A., Pedone V., Lamanna G., Cervini C. Sulfasalazine: side effects and duration of therapy in patients with rheumatoid arthritis. Clin Ter.;148(1-2):7-13, 1997
5. Urano W., Taniguchi A., Yamanaka H., Tanaka E., Nakajima H., Matsuda Y., Akama H., Kitamura Y., Kamatani N. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. Pharmacogenetics. 12(3):183-190, 2002
6. Daar A. S. and Singer P. A. Pharmacogenetics and geographical ancestry: implications for drug development and global health Nature Reviews| Genetics 6 : 241-246, 2005
7. van Ede A. E., Laan R. F. J. M., Blom H. J., Boers G. H. J., Haagsma C. J., Thomas C. M. G., ve ark. Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology; 41: 658-665, 2002

8. Whittle SL and Hughes RA, Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review, *Rheumatology*; 43:267-271, 2004
9. Dikmen M. Methilentetrahydrofolat Redüktaz (MTHFR) enziminin Moleküler Biyolojisi ve Hastalıklarla İlişkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5:9-16, 2004
10. Radha Rama Devi A., Govindaiah V, Ramakrishna G , Naushad SM (2004) Prevalence of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in South Indian population *Current Science*; 86 (3):440-445, 2004
11. Sibani S., Christensen B., O'Ferrall E., Saadi I., Hiou-Tim F., Rosenblatt D. S., and Rozen R. Characterization of Six Novel Mutations in the Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in Patients With Homocystinuria. *Human Mutation*; 15(3):280-287, 2000
12. Frosst P., Blom HJ., Milos R., Goyette P., Sheppard CA., Matthews RG., Boers GJ., den Heijer M., Kluijtmans LA., van den Heuvel LP., ve ark. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*; 10(1):111-113, 1995
13. Stevenson RE., Schwartz CE., Du YZ., Adams MJ. Jr. Differences in methylene tetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. *Am J Hum Genet*; 60(1):229-230, 1997
14. van der Put N. M. J., Gabreeëls F., Stevens E. M. B., Smeitink J. A. M., Trijbels F. J. M., . Eskes T. K. A. B, van den Heuvel L.P. and Blom H. J. (). A Second Common Mutation in the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? *Am J Hum Genet*; 62:1044-1051, 1998
15. Heijmans B.T., Boer J.M., Suchiman H.E., Cornelisse C.J., Westendorp R.G., Kromhout D., ve ark. A common variant of the

methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Res*; 63:1249-1253, 2003

16. Kimura F, Franke KH, Steinhoff C, Golka K, Roemer HC, Anastasiadis AG, ark. Methyl group metabolism gene Polymorphisms and susceptibility to prostatic carcinoma. *Prostate* 45: 225-231, 2000
17. Berkun Y., Levartovsky D., Rubinow A., Orbach H., Aamar S., Grenader T., Abou Atta I., Mevorach D., Friedman G. and Ben-Yehuda A. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis*; 63:1227-1231, 2004
18. Firestein GS: Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. Harris ED, Budd CR Firestein GS (ed), *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 7th Ed. Philadelphia; 996-1042, 2005
19. Rindfleisch JA, Daniel M. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis *American Family Physician*; 72:1038-1047, 2005
20. Ergin S: Romatoid Artrit ve Sjögren Sendromu. Beyazova M, Gökçe KY(eds). *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Cilt 2*. Güneş Kitabevi Ankara; 1549-1576, 2000
21. Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. *Classification and epidemiology. Rheumatology*. 3rd ed. New York: Mosby; 753-937, 2003
22. Akar S, Akkoç N. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*;2:1-6, 2006



23. Seçkin B, Başaran P Romatoid Artritin Etyoloji ve Patogenezi Harris ED, Budd CR, Frestein GS Çeviri Editörü: Arasıl T. Kelley Romatoloji 7. baskı. Ankara Güneş Kitabevi; 65:996-1042, 2006
24. Maini RN, Feldmann M: Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. In Maddison P, Isenberg D, Woo P, Glass D (eds). Oxford Textbook of Rheumatology, Oxford University Press 1998; 983-1004
25. Wolfe F. The effect of smoking on clinical, laboratory, and radiographic status in rheumatoid arthritis. J Rheumatol; 27(3): 569-570, 2000
26. Gümüşdiş G: Bağ Dokusu Hastalıkları: Romatoid Artrit. Gümüşdiş G, Doğanavşargil E (eds). Klinik Romatoloji El Kitabı, Güven Matbaası, İzmir; 209-227, 2003
27. Symmons DP. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. Best Pract Res Clin Rheumatol; 16(5):707-722, 2002
28. Richard N. Mitchell. İmmün Bozukluklar. Çeviri editörü Erez S, Robbins Temel Patoloji 7.baskı. Nobel Tıp Kitabevi İstanbul; 103-164, 2003
29. Fresko İ. Romatoid Artrit Etyoloji ve Patogenezi. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci; 2:7-11, 2006
30. VanderBorgh A, Geusens P, Raus J, Stinissen P. The Autoimmune Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Role of Autoreactive T Cells and New Immunotherapies. Semin Arthritis and Rheum; 31(3):160-175, 2001
31. Maruotti N, Cantatore FP, Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. Histol Histopathol; 21:557-566, 2006
32. Vergunst CE, van de Sande MG, Lebre MC, Tak PP. The role of chemokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Scand J Rheumatol; 34:415-425, 2005

33. Synimons DP. Epidemiology of rheumatoid arthritis determinants of onset persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*; 16:707-722, 2002
34. Süreyya E. Romatoid Artrit ve Sjögren Sendromu Beyazova M, Gökçe-Kutsal Y (eds) *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Cilt 2*. Güneş Kitabevi Ltd.Şti. Ankara; 1549-1576, 2000
35. Yalçın P: Romatoid Artritin Klinik Özellikleri. Harris ED, Budd CR, Firestein GS çeviri editörü: Arasıl T. *Kelley Romatoloji 7. baskı*. Ankara Güneş Kitabevi; 66:1043-1078, 2006
36. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G; *Temel İç Hastalıkları, Romatoid Artrit*. Ertem Matbaası İstanbul; 2702-2713, 2003
37. Elliot JR, O'Dell J. Romatoid Artrit. Sterling G West MD. Çeviri ed: Şirinoğlu I. *Romatolojinin Sırları*. Nobel Tıp Kitabevleri; 117-128, 2005
38. Hamuryudan V. Romatoid Artrit: Klinik Bulgular. *Türkiye Klinikleri J Immunology-Rheumatology*; 1:4-7, 2001
39. Edward D, Harris J. Clinical features of rheumatoid arthritis. In S Ruddy ark.(eds). *Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th Ed Philadelphia, W.B.Saunders*; 970-987, 2001
40. O'dell JR. Rheumatoid arthritis: the clinical picture. Koopman WJ (ed). *Arthritis and Allied Conditions Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1153-1186, 2001
41. Harris ED. Clinical features of rheumatoid arthritis. Harris ED, Budd CR Firestein GS (ed), *Kelley's Textbook of Rheumatology seventh (7th) edition Philadelphia*; 1043-1078, 2005
42. Arnett. FC. Edworthy SM ark. The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the classification of rheumatoid arthritis *Arthritis and Rheumatism*; 31(3): 315-324, 1988

43. Keser G. Romatoid Artitte Laboratuar Testleri. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci; 7:31-34, 2006
44. Rindflisch J A, Muller D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. Am Fam Physician; 72:1037-1050, 2005
45. Sivrioğlu K. Romatoid artitin tedavisi. Genovese MC, Harris ED Çeviri Editörü: Arasıl T. Kelley Romatoloji 7. baskı. Güneş Kitabevi; 67:1079-1100, 2006
46. Furst DE, Hilson J: Aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs, Koopman WJ (ed): Arthritis and Allied Conditions. Lippincott Williams and Williams, Philadelphia; 665-716, 2001
47. Kayaalp S. O: Non Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar. Tıbbi Farmakoloji, Ankara Feryal Matbaacılık; 2035-2062, 1992
48. Harris ED, Budd CR, Firestein GS çeviri editörü: Arasıl T. Kelley Romatoloji 7. baskı. Güneş Kitabevi; 67:1079-1100, 2006
49. Van Everdingen AA, Jacobs JW, Siewertsz Van Reesema DR, Bijlsma JW. Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis: clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Ann Intern Med; 136(1):1-12, 2002
50. Landewe RB, Boers M, Verhoeven AC. COBRA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: long-term structural benefits of a brief intervention. Arthritis Rheum; 46(2):347-356, 2002
51. Karadağ Ö, Kiraz S. Romatoid Artrit Tedavisinde Kısa Etkili İlaçlar. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci; 2(25):46-51, 2006
52. Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. Drugs; 65(13):1825-1849, 2005

53. Gaffney L.A. Y. N., and Scott D. G. I. Methotrexate-induced pancytopenia: serious and under-reported? Our experience of 25 cases in 5 years. *Rheumatology*; 44:1051-1055, 2005
54. Fresko İ. Romatizmal Hastalıklarda Tedavi İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Romatizmal Hastalıklar Sempozyumu 25, İstanbul, s. 45-54, 1999
55. Ranganathan P., Eisen S., Yokoyama W. M. and McLeod H. L. (). Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*; 62:4-9, 2003
56. Ranganathan P. and McLeod H. L. Methotrexate Pharmacogenetics The First Step Toward Individualized Therapy in Rheumatoid Arthritis *Arthritis Rheumatism*; 54 (5):1366 –1377, 2006
57. Yazıcı Y., Soka T., Kautiainen H., Swearingen C., Kumlan I. and Pincus T. Long term safety of methotrexate in routine clinical care: discontinuation is unusual and rarely the result of laboratory abnormalities. *Ann Rheum Dis*; 64:207-211, 2005
58. Lynden J. R., Leslie G. C, Ranjey T. And Ssanna M. P. (2006). Early Combination disease modifying antirheumatic drug treatment for rheumatoid arthritis. *MJA*; 184 (3): 122-125
59. Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*.; 343:1586–1593, 2000
60. Morgan SL, Baggott JE, Lee JY, Alarcon GS. Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during longterm, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular disease prevention. *J Rheumatol*; 25(3):441-446, 1998

61. Ortiz Z, Shea B, Suarez-Almazor ME, Moher D, Wells GA, Tugwell P. The efficacy of folic acid and folinic acid in reducing methotrexate gastrointestinal toxicity in rheumatoid arthritis. A metaanalysis of randomized controlled trials. *J Rheumatol*; 25(1):36-43, 1998
62. Ranganathan P, Eisen S. Pharmacogenomic approaches to therapies in rheumatic diseases. *Drug Dev. Res.* 62:161-171, 2004
63. Ranganathan P. Pharmacogenetics of therapies in rheumatoid arthritis. *Drugs Today (Barc)*; 41(12):799-814, 2005
64. Akhtar S. Pharmacogenomics: Are Pharmacists. Ready for Genotyped Prescribing ? *The Pharmaceutical Journal*; 268:296–299, 2002
65. Ingelman-Sundberg M, Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. *J Intern Med*; 250:186-200, 2001
66. Spear BB ark, Clinical applications of pharmacogenetics. *Trends Mol Med* 7:201-207, 2001
67. Ryan L, Brooks P: Disease-modifying antirheumatic drugs. *Curr Opin Rheumatol*; 11:161-166, 1999
68. Ertenli İ. Romatoid Artritte Yeni Tedaviler. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci*;2(25):60-64, 2006
69. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, Jackson CG, Lange M, Burge DJ. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med*; 340:253–259, 1999
70. Homberger G, Linnebank M, Winter C, ve ark. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*; 8: 725-729, 2000

71. Weisberg I, Tran P, Christensen B, ve ark. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*; 64: 169-172, 1998
72. Daly SF, Molloy AM, Mills JL, ve ark. The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue. *Brit J Obstet Gynaec*; 106: 1214-1218, 1999
73. Kim Y. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev*; 58:205-217, 2000
74. Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, ve ark. Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate- adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr*; 130:2238-2242, 2000
75. Goyette P, Pai A, Milos R, ve ark. Gene structure of human mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*; 9: 652-656, 1998
76. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G. Molecular biology of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol*; 13(1): 20-33, 2000
77. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EMB, ve ark. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects. *Am J Hum Genet*; 62:1044-1051, 1998
78. Skibola CF, Smith MT, Kane E, ve ark. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Med Sci*; 96:12810-12815, 1996
79. Piyathilake CJ, Macaluso M, Johanning GL, ve ark. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisim increases

- the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res*; 20:1751-1757, 2000
80. Chan M, Tran P, Goyette P ve ark. Analysis of the 5' region of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene reveals multiple exons with alternative splicing, and an overlapping gene. *FASEB J*; 13:A1375, 1999
  81. Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LAJ ve ark. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: Genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*; 257:279-289, 2000
  82. Tran P, Leclerc D, Chan M ve ark. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mammalian Genome*; 13:483-492, 2002
  83. Leclerc D, Sibani S, Rozen R. SJ. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/Polymorphisms. In: Ueland PM, Rozen R, editors. *MTHFR polymorphisms and disease*. Texas: Landes Bioscience/Eurekah.com; 15:17, 2004
  84. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: *Am J Epidemiol*; 151: 862-77, 2000
  85. Goyette P, Rozen R. The thermolabile variant 677CT can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Hum Mutat*; 16:132-138, 2000
  86. Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS ve ark, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 3897-3933, 2001

87. Sibani S, Leclerc D, Weisberg IS ve ark. Characterization of mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency reveals an FAD-responsive mutation. *Hum Mutat*; 21: 509-520, 2003
88. Kluijtmans LA, Wendel U, Stevens EM ve ark. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Eur J Hum Genet*; 6: 257-65, 1998
89. Guenther BD, Sheppard CA, Tran P ve ark. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol*; 6: 359-365, 1999
90. Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet*; 8: 1893-1900, 1999
91. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM, ve ark. Total homocystein and cardiovascular disease. *J Int Med*; 246: 425-454, 1999
92. Lievers KJA, Verhoef V, Heijer M. A second common variant in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine and cardiovascular disease risk, *Journal of Molecular Medicine*; 79(9): 522-528, 2001
93. Schneider J, Rees D, Lui Y, ve ark. Worldwide Distribution of a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation. *Am J Hum Genet*; 62: 1258-1260, 1998
94. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden; *Lancet*; 346: 1133-1134, 1995
95. Akar N, Mısırlıoğlu M, Akar E, ve ark. (1998 ). Prothrombin gene 20210 G-A mutation in the Turkish population. *Am J Hemat*; 58: 249, 1998



96. Özmen F, Özmen MM, Akar E, ve ark. Genetik mutasyon varlığı periferik arteriyel tromboz riskini artırır mı? V. Pediatrik moleküler patoloji kongresi; 119-120, 1998
97. Lorenzo D, Botto Y, Quanhe Y. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies. *Am J Epidemiol*; 9; 151-866, 2000
98. Markus HS, Ali N, Swaminathan R, ve ark. A common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke*; 28: 1739, 1997
99. Molloy AM, Daly S, Mills JL, ve ark. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet*; 349:1591–3, 1997
100. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, ve ark. Gene polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a coronary risk factor. *J Cardiol* ; 29: 309–315, 1997
101. Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K, ve ark. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. *Am J Med Genet*; 74: 526–528, 1997
102. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, ve ark. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol*; 148: 30–7, 1998
103. Matsushita S, Muramatsu T, Arai H, ve ark. The frequency of the methylenetetrahydrofolate reductase-gene mutation varies with age in the normal population. *Am J Hum Genet*; 61: 1459-60, 1997
104. Seçkin B, Başaran P Romatoid Artritin Etiyoloji ve Patogenezi Harris ED, Budd CR, Frestein GS Çeviri Editörü: Arasıl T. Kelley Romatoloji 7. baskı. Ankara Güneş Kitabevi; 65:996-1042, 2006

105. Wolf C. R, Smith G. and Smith R. L. Science, Medicine and the Future: Pharmacogenetics BMJ; 320:987-990, 2000
106. Yılmaz L, Aslan G, Bodur H. Romatoid Artritli Hastalarda İkinci Basamak İlaç Kullanımı, Romatizma; 18(3):141-150, 2003
107. Hoekstra M, E van Ede A, Haagsma CJ ve ark . Factors Associated with Toxicity, Final Dose, and Efficacy of Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis. Ann Rheum Dis., 62(5): 423 – 426, 2003
108. Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van de Putte LB.. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis., 58(2):79-84, 1999
109. Judith A. M. Wessels, Jeska K. de Vries-Bouwstra, Bas T. Heijmans ve ark. Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Early Rheumatoid Arthritis Are Associated With Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Coding for Folate Pathway Enzymes. Arthritis Rheum., 54(4):1087–1095, 2006
110. Ranganathan P., Eisen S., Yokoyama W. M. and McLeod HL., Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis? Annals of the Rheumatic Diseases;62:4-9 Arthritis and Rheumatism, 54(4):1087-1095, 2003
111. van Ede A.E, Laan R.F, Blom H.J ve ark. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum., 44(11) :2525-2530, 2001
112. Weisman MH., Furst DE., Park GS ve ark., Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., 54(2):607-612, 2006

113. Kumagai K., Hiyama K., Oyama T., Maeda H., Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med.*, 11(5):593-600, 2003
114. Parshant Aggarwal, Sita Naik, K.P. Mishra, Amita Aggarwal and Ramnath Misra. Correlation Between Methotrexate Efficacy and Toxicity with C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Gene in Rheumatoid Arthritis Patients on Folate Supplementation. *Indian J Med Res.*, 124:521-526, 2006
115. Mena JP , Salazar-Páramo M , L González-López ve ark. Polymorphisms C677T and A1298C in the MTHFR gene in Mexican patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: implication with elevation of transaminases. *The Pharmacogenomics Journal* advance online publication 1 June 2010; doi: 10.1038/tpj.2010.32