



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ROMATOİD ARTRİTTE POTANSİYEL BİYOMARKER
OLABİLECEK EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Zülfinaz Betül ÇELİK

Samsun

Haziran-2019



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ROMATOİD ARTRİTTE POTANSİYEL BİYOMARKER
OLABİLECEK EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Zülfinaz Betül ÇELİK

**Danışman
Prof. Dr. Nurten KARA**

**II. Danışman
Doç. Dr. Şengül TURAL**

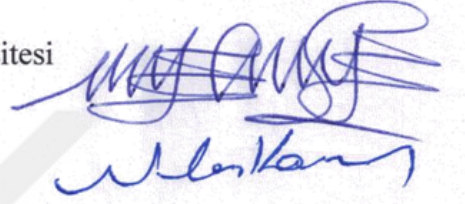
Samsun

Haziran-2019

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Zülfinaz Betül ÇELİK tarafından Prof. Dr. Nurten KARA danışmanlığında hazırlanan “Romatoid Artritte Potansiyel Biyomarker Olabilecek Epigenetik Değişikliklerin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 26/06/2019 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Nurten KARA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gamze ALAYLI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ebru ALP, Giresun Üniversitesi



ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

/ /

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım ve eğitimim boyunca değerli bilgi, yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurten KARA'ya ve ikinci danışman hocam Doç. Dr. Şengül TURAL'a, tez çalışmamdaki değerli bilgi ve katkıları için Sayın Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN hocama, çalışmam için gerekli hastaların değerlendirilmesinde ve çalışma materyallerinin toplanmasında önemli katkılar sağlayan OMÜ Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalının değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Gamze ALAYLI ve Dr. Öğr. Üyesi A. Kıvanç CENGİZ'e ve her zaman yanımda olup beni destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince, 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı burs desteği için TÜBİTAK'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.18.004 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

ROMATOİD ARTRİTTE POTANSİYEL BİYOMARKER OLABİLECEK EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Amaç: Romatoid artrit (RA) çok sayıda genetik ve epigenetik faktörün etkili olduğu kronik bir inflamatuvar hastalıktır. Bu çalışma, RA hastalarında *interlökin-16 (IL-16)* ve *matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3)* genlerinin promotör metilasyon durumlarının ve bu genleri hedeflemesi muhtemel mikro-RNA'lardan olan hsa-miR-93-5p ile hsa-miR-4668-5p'nin ekspresyon düzeylerinin RA ile ilişkisini tespit etmek amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metot: RA teşhisi konulmuş 49 hasta ve 38 sağlıklı kontrol ile çalışma grubu oluşturuldu. Gönüllü bireylere ait periferik kan numunelerinden DNA izolasyonu ile elde edilen genomik DNA'lardaki *IL-16* ve *MMP-3* genlerinin promotör metilasyon profilleri, metilasyon spesifik PZR metodu ile analiz edildi. Toplam 41 RA hastasındahsa-miR-93-5p ve hsa-miR-4668-5p'nin ifade düzeylerini belirlemek için kantitatifreal-time PZR metodu kullanıldı.

Bulgular: RA hastalarında metilasyon sıklığı; *MMP-3* geni için %75.5 (37/49) ve *IL-16* geni için %93.9 (46/49)'du. Kontrol grubunda metilasyon sıklığı; hem *MMP-3*, hem de *IL-16* geni için %97.4 (37/38)'di. Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örneklerinin *MMP-3* promotör bölge metilasyonları karşılaştırıldığında, metilasyon sıklıklarınaçısından anlamlı fark bulundu ($p=0.004$). Ancak, *IL-16* promotör metilasyon sıklıkları açısından bir fark bulunmadı ($p>0.05$). RA grubunda hem hsa-miR-93-5p, hem de hsa-miR-4668-5p'nin ekspresyon düzeylerinde kontrole göre anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

Sonuç: *MMP-3* geninin atipik promotör metilasyonu ve hsa-miR-93-5p ile hsa-miR-4668-5p'nin ekspresyon seviyelerindeki değişimler, RA'nın tanısı ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılabilecek birer biyobelirteç olabilir. Ayrıca, bu biyobelirteçlerin kan örneklerinden analizi kolay uygulanabilir bir yöntem olabilir.

Anahtar Kelimeler: Romatoid artrit; epigenetik; metilasyon; miRNA; *MMP-3*

Zülfinaz Betül ÇELİK, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Samsun, Haziran-2019

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EPIGENETIC CHANGES WOULD BE POTENTIAL BIOMARKERS IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Aim: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease, and it is known that genetic factors and the environment are involved in the disease process. We aimed to determine the relationship between promoter methylation status of *interleukin-16 (IL-16)* and *matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)* genes and RA. Then we aimed to analyze the expression levels of hsa-miR-93-5p and hsa-miR-4668-5p which is possible micro-RNAs targeting these genes in RA.

Material ve Method: The study group consisted of 49 patients diagnosed with RA and 38 healthy controls. Promoter methylation of *IL-16* and *MMP-3* was analyzed by methylation-specific PCR. Expression levels of hsa-miR-93-5p and hsa-miR-4668-5p in 41 RA patients and healthy control were determined by quantitative Real Time PCR.

Results: The frequency of methylation in RA patients; 75.5% (37/49) for the *MMP-3* gene and 93.9% (46/49) for the *IL-16* gene. Methylation frequency in the control group; 97.4% (37/38) for both the *MMP-3* and *IL-16* gene. When patient and control groups were compared, a significant difference was found in terms of *MMP-3* promoter methylation frequency ($p = 0.004$). However, there was no difference in *IL-16* promoter methylation frequencies ($p > 0.05$). In the RA group, expression levels of both hsa-miR-93-5p and hsa-miR-4668-5p were significantly different compared to the control group ($p < 0.001$).

Conclusion: Atypical promoter methylation of the *MMP-3* gene and changes in expression levels of hsa-miR-93-5p and hsa-miR-4668-5p may be biomarkers that can be used to diagnose RA and evaluate treatment efficacy. Furthermore, the analysis of these biomarkers from blood samples can be an easily applicable method.

Key Words: Rheumatoid arthritis; epigenetics; metylation; miRNA; *MMP-3*.

Zülfinaz Betül ÇELİK, Ph. D. Thesis

Ondokuz Mayıs University-Samsun, June-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACPA	: Anti Sitrüline Protein Antikorları
ACR	: American College of Rheumatology
cDNA	: Komplementer DNA
CpG	: Sitozin-fosfat-guanin
CRP	: C-Reaktif Protein
DMARD	: Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Ethylenediamine Tetra Acetic Acid
ESR	: Erythrocyte Sedimentation Rate
EtBr	: Etidyum Bromür
EULAR	:The European League Against Rheumatism
FLS	: Fibroblast-Like Synoviocytes
g	: Gram
g	: Gravite
IL	: İnterlökin
kb	: Kilobaz
lncRNA	: Longnon-coding RNA
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MSP	: Methylation Specific PCR
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

μM	: Mikromolar
miRNA	: MikroRNA
ml	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
ng	: Nanogram
NSAİİ	: Non-Steroidal Anti-İnflamatuar İlaçlar
OMÜ	: Ondokuz Mayıs Üniversitesi
PCR	: Polimerase Chain Reaction
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
pmol	: Pikomol
pre-miRNA	: Precursor miRNA
pri-miRNA	: Primer miRNA
qRT-PCR	: Quantitative Real Time-Polimerase Chain Reaction
RPM	: Rotations per minute
RF	: Romatoid faktör
RISC	: RNA Induced Silencing Complex
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
TBE	: Tris-Borate-EDTA
TNFα	: Tümör Nekroz Faktörü- α
USP	: Unmethylation Specific PCR
UTR	: Untranslated region

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Romatoid Artrit	2
2.1.1. Tanım ve Tarihçe	2
2.1.2. Epidemiyolojisi	2
2.1.3. Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	3
2.1.4. Patolojisi	5
2.1.5. Tanı ve Sınıflandırma.....	7
2.2. Epigenetik ve Romatoid Artrit	10
2.2.1. DNA Metilasyonu	11
2.2.2. Histon Modifikasyonları	15
2.2.3. MikroRNA'lar	16
2.2.4. Long-noncoding RNA'lar (lncRNA)	20
2.3. Tedavi	21
3. MATERYAL ve METOT	24
3.1. Gönüllü Seçimi	24
3.2. Kan Örneklerinin Toplanması	24
3.3. Kullanılan Cihazlar	24
3.4. Kullanılan Kimyasallar	25
3.5. Kullanılan Kitler	25
3.6. Kandan DNA İzolasyonu	26
3.7. Bisüfit Modifikasyon Yöntemi.....	27
3.8. Metilasyona Spesifik PZR (MSP)	29

3.9. Agaroz Jel Elektroforezi	32
3.10. Kandan miRNA İzolasyonu	33
3.11. Revers Transkripsiyon ile cDNA Sentezi	33
3.12. Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR) Yöntemi	35
3.12.1. Primerlerin seçimi	35
3.12.2. hsa-miR-93-5p ve hsa-miR-4668-5p ifade düzeylerinin ölçümü	36
3.13. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Çalışma Grubunun Demografik ve Klinik Özellikleri.....	39
4.2. <i>IL-16</i> ve <i>MMP-3</i> Genlerinin Promotör Metilasyonu	41
4.3. hsa-miR-93-5p ve hsa-miR-4668-5p ifade düzeyleri	45
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	59
EKLER	67
ÖZGEÇMİŞ.....	74

1. GİRİŞ

Romatoid artrit (RA) kronik, inflamatuvar bir otoimmün hastalıktır (Zhang ve ark., 2015). RA, sinoviyal inflamasyon, kemik ve kıkırdak dokusunun yıkımı, fonksiyon bozukluğu, kronik ağrı ve mortalitenin artmasıyla karakterizedir (Fadda ve ark.,2016).Populasyon temelli çalışmalara göre, en sık görülen inflamatuvar artrit olan RA'nın toplumda görülme sıklığı yaklaşık olarak %1'dir ve prevalansı ilerleyen yaşla birlikte artar(Lozano ve ark.,2010). Romatoid artrit hem genetik hem de çevresel etkenler nedeniyle meydana gelen multifaktöriyel bir hastalıktır (Fadda ve ark.,2016).

Hastalığın tedavi sürecinde erken tanı oldukça önemlidir. Bu nedenle henüz hastalık belirtileri ortaya çıkmadan önce, hastalık hakkında bilgi veren özgül biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Özellikle genetik ve epigenetik biyobelirteçler bu konuda büyük öneme sahiptir (Jutley ve ark., 2013).

Sitokin genleri ve matriks metalloproteinazların RA patogenezinde önemli bir rol oynadığı ve hastalığın aktivitesiyle önemli bir ilişkisi olduğu bulunmuştur. RA'da serum ve sinoviyal sıvıda IL-16 ve MMP-3 seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir (Murota ve ark., 2016). IL-16, proinflamatuvar bir sitokin olup, CD4+ ve CD8+ T lenfositleri, monositler, epitelyal hücreler ile fibroblastlar tarafından salgılanan bir lenfosit kemoatraktan faktörüdür (McInnes ve Schett, 2011). IL-16, yardımcı T lenfositleri (Th), makrofajlar, dendritik hücreler ve eozinofiller üzerindeki CD4'e bağlanarak bu hücrelerin proliferasyonuna ve inflamasyonlu bölgelere göçüne neden olur. Böylece, bu sitokin, hem artrit oluşumunda, hem de romatoid artritteki sistemik bulgularda önemli bir rol alır (Skundric ve ark., 2005). Proteolitik bir enzim olan MMP-3 ise, kollajenler, matriks proteinleri ve proteoglikanlar gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin yıkımına neden olur. Böylece, MMP-3, romatoid artritte eklemlerde meydana gelen inflamasyon ve erozyonda önemli rol alır. MMP-3, RA'da esas olarak inflamasyonlu eklemlerde üretilir ve kana salınır (Fadda ve ark., 2016).

Bu tezde, RA hastalarında, *interlökin-16 (IL-16)* ve *matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3)* genlerinin promotör metilasyon durumlarının analizini yaparak ve bu genleri hedeflediği öngörülen mikro-RNA'lardan olan hsa-miR-93-5p ile hsa-miR-4668-5p'nin ekspresyon düzeylerini tespit ederek, RA'nın erken tanısında ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde yol gösterici olabilecek biyobelirteçlerin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit

2.1.1. Tanım ve Tarihçe

Romatoid artrit; eklemlerde ağrı, şişlik, tutukluk ve fonksiyon kaybına neden olan kronik ve sistemik bir otoimmün hastalıktır. Otoimmün hastalıklar, kompleks multifaktöriyel hastalıklar olup, bireyin kendi sağlıklı hücrelerine karşı tanıma yetersizliği ve immünolojik toleransın kaybı nedeniyle sağlıklı doku ve hücrelere karşı immünolojik yanıt oluşmasıyla karakterizedir. Bu nedenle otoimmün hastalıklarda otoreaktif bağışıklık hücrelerinin varlığı ve spesifik otoantikörlerin gelişimi söz konusudur (Zhang ve ark., 2015).

Romatoid artrit ismindeki romatoid; Yunanca ‘akan’ anlamındaki *rheumatos* ve ‘şekilde’ anlamındaki *-oid* ekinden oluşur. Artrit ise; Yunanca ‘eklem’ anlamına gelen ‘*arthr*’ ve ‘inflamasyon içeren durum’ anlamına gelen *-itis* ekinden oluşur. Böylece romatoid artrit eklem inflamasyonu anlamına gelmektedir (Paget ve ark., 2002).

Artritin tarihçesi MÖ 4500’e kadar uzanmaktadır. ABD’de Tennessee’de bulunan yerlilerin iskelet kalıntılarında artrit bulguları tespit edilmiştir. Yine MS 123 tarihli bir metinde de RA semptomlarına benzer belirtiler anlatılmıştır (Rothschild, 2011). Hastalığın tanımlanması ilk olarak Dr. LandréBeauvais Augustin Jacob tarafından 1800 yılında yapılmıştır (Landré-Beauvais, 2001). Hastalığın bugün kullanılan ‘Romatoid artrit’ ismi ise 1859 yılında İngiliz Romatolog Dr. Alfred Baring Garrod tarafından verilmiştir (Garrod, 1859).

2.1.2. Epidemiyolojisi

RA en yaygın inflamatuvar artrit tipi olup, dünya genelinde popülasyonun yaklaşık %1’ini etkilemektedir. RA, kadınlarda erkeklerden yaklaşık 3 kat daha yüksek sıklıkta görülür (Gibofsky, 2014). RA, hemen her yaşta görülebilmektedir. Ancak, çoğunlukla 20-50 yaşlar arasında başlar. Prevalansı ilerleyen yaşla birlikte artar ve 65 yaşın üstündeki kadınlarda prevalansı en yüksek değere ulaşır. Bu durum, östrojen gibi bazı hormonların eksikliğinin patojeniteye yol açabileceğini göstermektedir (Scott ve ark., 2010).

RA prevalansı ırk, etnik köken ve coğrafik dağılıma göre değişiklik gösterir. Bu hastalığın sıklığı, Kuzey Afrika'nın kırsal kesimleri gibi gelişmekte olan ülkelerle kıyaslandığında, Avrupa'nın kuzeyi ve Kuzey Amerika'da daha fazladır. Hastalığın sıklığının farklı coğrafik bölgelerde gösterdiği bu değişkenlik, farklı genetik risk faktörlerinin ve çevresel faktörlerin hastalık üzerine etkisinin bir göstergesidir (Silman ve ark., 1993). Ülkemizde ise Ege, Akdeniz ve Doğu Karadeniz bölgelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, örnekleme yöntemleri tam olarak belirtilmediği için bu sonuçlar kesin veriler olarak kabul edilmemiştir. Ülkemizde tanımlanmış RA prevalansı %0.36 olup, diğer Akdeniz ülkeleri ile benzerlik göstermektedir (Akar ve Akkoç, 2006).

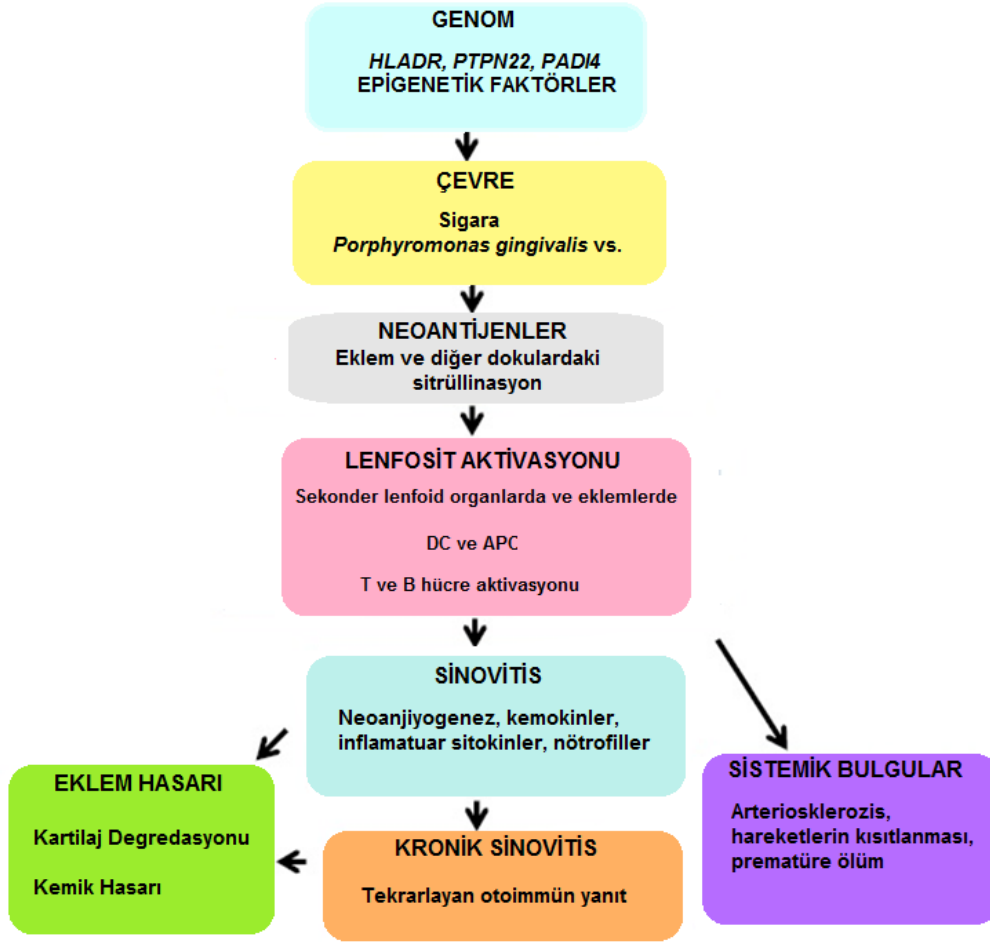
2.1.3. Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

RA patogenezi multifaktöriyeldir (McInnes ve Schett, 2011). Son gelişmeler, genetik yatkınlığı olan bireylerde çevresel faktörlerin RA'yı tetiklediğini göstermiştir. Monozigotik ikizlerde RA konkordansının ikiz olmayan ve dizigotik ikiz bireylere göre daha fazla olması, ortak epitop içeren insan lökosit antijeni (*HLA-DRB1*) allellere sahip olanların RA'ya yatkınlığı ve genom çaplı ilişkilendirme çalışmaları ile tanımlanmış çok sayıda RA risk geninin (*PTPN22*, *STAT4*, *CCR6*, *PADI4*, *TNFAIP3*, *CD40* ve *FCRL3* gibi) varlığı bunu destekleyen kanıtlar olarak gösterilmektedir (Araki ve Mimura, 2017).

Genetik yatkınlığın yanı sıra, sigara kullanımı, Epstein-Barr virüs (EBV) enfeksiyonu, *Porphyromonas gingivalis* nedeniyle oluşan periodonditis, eşey hormonları ve D vitamini eksikliği gibi belli çevresel faktörlerin de RA patogeneziyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca son gelişmeler epigenetik mekanizmaların da RA etiyojisiyle önemli derecede ilişkili olduğunu göstermiştir (Araki ve Mimura, 2016). Romatoid artritte rol alan faktörler ve kaskadların özetlenmiş hali Şekil 1'de gösterilmiştir.

T-hücre aktivasyonunu etkileyen genetik yatkınlıklar (*HLA-DRB1*, *PTPN22*, *CTLA4* ve *STAT4*'ü kodlayan genlerdeki polimorfizmler gibi) ve plazma hücreleri tarafından üretilen romatoid faktör (RF) ve anti-sitrülinlenmiş protein antikoru (ACPA) gibi otoantikörlerin varlığı, doğal bağışıklık sisteminin yanı sıra T ve B lenfositleri gibi kazanılmış bağışıklık sistemi hücrelerinin de hastalık patogeneziye katkıda bulunan etkenlerden olduğunu göstermektedir (Koenders ve ark., 2015).

İnflamasyonda etkili olan temel inflamatuvar kaskadlardan biri TNF'nin aşırı ekspresyonu ve sonuç olarak aşırı üretimidir. Bu yolak, hem sinoviyal inflamasyona hem de eklem hasarına neden olmaktadır. TNF'nin aşırı üretiminin nedenleri arasında; T ve B lenfositleri arasındaki etkileşimler, fibroblast-like sinoviyositler (FLS) ve makrofajlar vardır. Bu olaylar, IL-6 ve daha pek çok sitokinin aşırı üretimine neden olur. IL-6 ise, inflamasyonun devamlılığında ve eklem hasarında itici bir faktör olarak önemlidir (Scott ve ark., 2010).



Şekil 1. Romatoid artritte rol alan faktörler ve kaskadlar (Boissier ve ark., 2012'den uyarlanmıştır)

Genom çaplı ilişkilendirme çalışmaları sonucunda, RA için riskli olan yaklaşık 60 allel tanımlanmıştır. Bunların, RA'ya neden olan tüm etkenlerin sadece %16'sını oluşturduğu düşünülmüştür (Viatte ve ark., 2013). Monozigotik ikizlerde yapılan RA çalışmaları ise, konkordansın yaklaşık %12 olduğunu ve bu nedenle RA'daki genetik katkının az olduğunu, çevresel faktörlerin ve epigenetik değişikliklerin daha fazla etkili

olabileceğini göstermiştir. Monozigotik ikizlerde gözlenen klinik farklılıklar, genetik dışındaki faktörlerin hastalığın oluşumunda etkili olduğunu göstermiştir (Petronis, 2010).

Genetik olmayan risk faktörleri içinde cinsiyet önemli bir etkidir. Kadınlarda, erkeklere göre 2-3 kat daha fazla RA gelişmesi progesteron ve östrojenin etkisi ile açıklanmaya çalışılmıştır. Östrojen, B hücrelerinin apoptozunu azaltarak, otoreaktif klonların oluşumuna izin verir. Ayrıca hormonlar, T hücre tiplerinin dengesini de etkiler. Örneğin, hayvan modellerinde östrojen kullanımı, TH1 yanıtını baskılar. Gebelik sırasında, kadınların %75'inde RA spontan remisyona girer (Gibofsky, 2014).

Sigara kullanımı, ortak epitop varlığında RA hastalarında ACPA oluşumunu artırır. Muhtemelen sigara ile hava yolunda inflamasyon gelişmesi ve doğal immün yanıtın aktive olması ile peptidlerin sitrullinasyonu uyarılmaktadır. Ortak epitop taşıyıcıları, genetik olarak immün hiper-reaktivite özelliğine sahiptirler. Bu kişilerin sitrülüne olmuş peptidlere kronik olarak maruz kalması sonucunda da ACPA antikoru sentezlenmektedir (Paira ve ark., 2005).

2.1.4. Patolojisi

Romatoid artrit; sinoviyal bir inflamatuvar hastalık olup, bağışıklık sistemi hücrelerinin eklemlere infiltrasyonu ve ekstraselüler matrikse zarar vermesiyle karakterizedir (Gary, 2018).

Romatoid artrit hastalarında kontrol edilemeyen eklem iltihabı, eklem erozyonuna, eklemlerde güçsüzlüğe, hareket kaybına, kronik ağrıya, vücudun ilgili birçok parçasında eklem hasarına, yaşam standardının düşmesine, kardiovasküler hastalıklara ve diğer komorbiditelere neden olabilmektedir. Bu durumdaki hastalar uygun şekilde tedavi edilmezse, eklemlerdeki ağrı ve hasar daha da şiddetlenir. Ayrıca, RA hastalarında ateroskleroz riski ve lenfoma gelişme sıklığı da artmıştır. Bu nedenle, hastalık kontrol altına alınamazsa, yaşam beklentisinde de azalma görülebilir (Koenders ve ark., 2015).

Vücutta bulunan kemiklerin uçları, hareketler sırasında eklemlerin korunmasına yardımcı olan ve kıkırdak adı verilen elastik doku ile kaplıdır. Bu kıkırdak dokunun yanında da sinoviyum veya sinoviyal membran olarak adlandırılan bir doku bulunur. Sinoviyum, kayganlaştırıcı olarak işlev gören ve kıkırdağın beslenmesini sağlayan sinoviyal sıvıyı üretir. RA hastalarında, otoimmün yanıt nedeniyle, bazı

eklemlerdeki sinoviyumda iltihaplanma yani inflamasyon meydana gelir. Bunun sonucunda da etkilenen eklemlerin her hareketi ile sinoviyal doku şişer ve ağrılı bir hal alır (Bresnihan, 2002). Normal ve sinoviyal inflamasyonlu bir eklemin şematik olarak gösterimi Şekil 2’de verilmiştir.

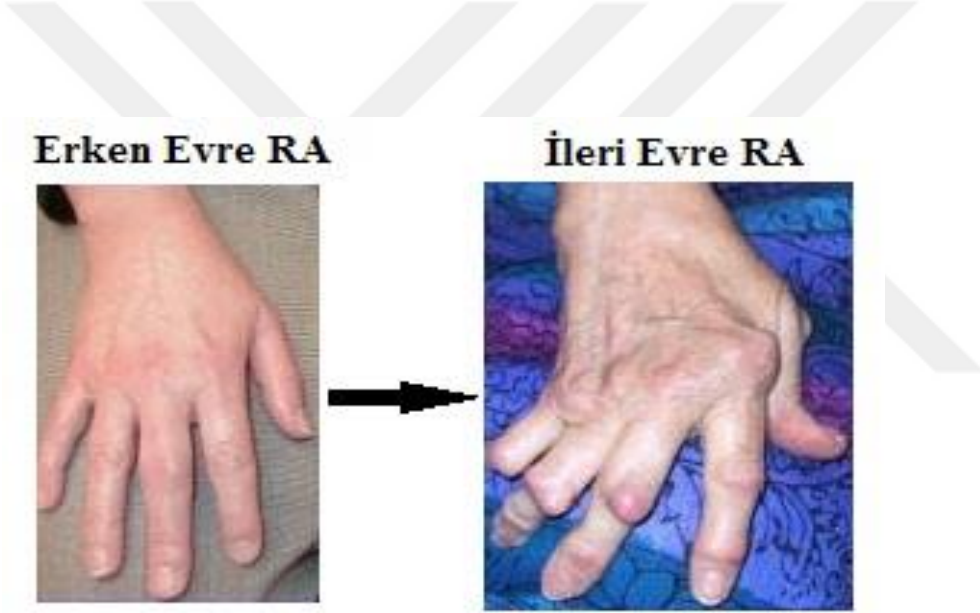


Şekil 2. Normal eklem ve sinoviyal inflamasyonlu RA eklem morfolojisinin şeması (Barhum, 2019’ danuvarlanmıştır).

RA’da görülen ağrının, eklemlerde şişkinlik ve hassasiyeti takiben oluşan kıkırdak yıkımının, kemik erozyonunun ve eklem deformasyonlarının (Şekil 3 ve Şekil 4) temel sebebi sinoviyal inflamasyondur (Özsoy ve ark., 2006). İltihaplanan sinoviyum zamanla yanındaki kıkırdak ve kemikle birlikte aşınır. Eklemleri desteklemek için sinoviyumun etrafında bulunan kas, ligament ve tendonlar gibi tüm yapılar gittikçe zayıflar. RA ile ilişkili ağrıların çoğunun nedeni de, bu yapılardaki bozukluklar ve sinoviyal sıvının artık daha az işlev görmesi sonucunda eklemlerde meydana gelen sürtünmedir. RA’da eklemlerin etkilenme durumu tipik olarak simetrikdir ve bu da diğer artrit formlarında görülmeyen bir özelliktir (Fadda ve ark.,2016).



Şekil 3. Normal ve Romatoid artritli eklemlerin röntgen görüntüsü (My Health, 2019'dan uyarlanmıştır).



Şekil 4. Romatoid artrit evreleri (Hall, 2018'den uyarlanmıştır).

2.1.5. Tanı ve Sınıflandırma

RA'nın etkileri ilk önce el parmakları ve ayak parmakları gibi en küçük eklemlerde hissedilir. RA'nın erken belirtileri arasında küçük eklemlerde ağrı, sertlik, halsizlik ve istemsiz kilo kaybı yer alır (Fadda ve ark.,2016).

RA semptomları, özellikle de erken evrelerde diğer romatizmal veya otoimmün hastalıklarla karıştırılabilir. Bu durumda, araştırmacılar, hastalık belirtileri ile hastaların genetiği ve tıbbi öyküleri arasında bir ilişki aramaktadırlar. RA semptomlarını erken

tespit etmek ve mümkün olan en kısa sürede tedaviye başlamak çok önemlidir (Plenge ve ark., 2007).

RA'nın oluşumuna genetik yatkınlığın etkisi olduğundan aile öyküsü tanıda önemli rol oynar. Bu nedenle, RA tanısında öncelikle aile öyküsüne başvurulur. Ailede RA, diğer artrit türleri veya diğer otoimmün hastalıklar olup olmadığı belirlenir (Plenge ve ark., 2007).

Ağrı öyküsü ve fiziksel eklem muayenesi de hastalık progresyonunun anlaşılmasında ve vücutta hangi bölgelerin hastalıktan etkilendiğinin belirlenmesinde önemli bir değerlendirme ölçütüdür. Eğer, eklemlerde RA gelişmeye başlamışsa, hasta genellikle şişme, sıcaklık ve ağrı ve sınırlı harekete karşı belirti ve hassasiyet gösterir (Smolen ve ark., 2010).

Kan testleri de inflamasyonun bir göstergesi olarak tanıda oldukça önemli yer tutmaktadır. RF ve ACPA gibi otoantikörlerin kanda tespit edilmesi, RA ihtimalini güçlendirir. Bu nedenle, kan testinde RF mevcutsa, hastada RA veya başka bir inflamatuvar hastalık gelişme olasılığı yüksek olacaktır. Bunun yanı sıra, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) veya c-reaktif protein (CRP) gibi akut faz reaktanlarının seviyesi de hastalığın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Jutley ve ark., 2013).

RA'nın neden olduğu eklem hasarı, röntgen, ultrason ve manyetik rezonans gibi görüntüleme teknikleri kullanılarak da tespit edilebilir. Eklemleri incelemek ve eklemlerde erozyonun olup olmadığını belirlemek için bu görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte, RA tanısı pozitif olanlarda hastalık erken bir aşamadaysa, bu tekniklerde hasar her zaman görüntülenemeyebilir (Smolen ve ark., 2010).

Erken RA tanısı konulmasında kullanılan ACR (American College of Rheumatology) /EULAR (The European League Against Rheumatism) tarafından tavsiye edilen sınıflama kriterleri Tablo 1'de verilmiştir. Hastaya kesin RA tanısı konması için, Tablo 1'deki kategorilerden alınacak toplam puanın ≥ 6 olması gerekmektedir (Aletaha ve ark., 2010). Bu kriterlere göre tanı konulabilmesi için önemli iki zorunluluk bulunmaktadır. Öncelikle en az bir eklemden uzman hekim tarafından tespit edilen ve sinovitis gösteren şişlik olması, semptom ve bulguların başka bir teşhis ile açıklanamaması gerekmektedir (Aletaha ve ark., 2010).

Tablo 1. Romatoid Artrit 2010 ACR/EULAR Sınıflandırma Kriterleri (Aletaha ve ark., 2010'dan uyarlanmıştır).

Kategori	Kriter	Puan
Eklem Tutulumu	1 büyük eklem	0
	2-10 büyük eklem	1
	1-3 küçük eklem	2
	4-10 küçük eklem	3
	>10 eklem (en az biri küçük eklem)	5
Seroloji	RF ve ACPA negatif	0
	RF ve ACPA düşük pozitif	2
	RF ve ACPA yüksek pozitif	3
Akut Faz Reaktanları	Normal CRP ve ESR	0
	Yüksek CRP ve ESR	1
Semptom Süresi	<6 hafta	0
	≥6 hafta	1

Hastalık aktivitesinin ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde kullanılmak üzere, bazı kompozit skorlar geliştirilmiştir. Bu skorlar ve değerlendirme esasları Tablo 2'de verilmiştir. Bu skorlar fiziksel fonksiyon ve erozyon gelişiminin gösterilmesinde yarar sağlamaktadır. Ancak, bu değerlendirmeler, bazen gerçek remisyonu yansıtmayabilir (Smolen ve ark., 2016).

Tablo 2. RA hastalık aktivitesini değerlendirmede kullanılan skorlar

Skor	Skor Bileşenleri	Remisyon	Düşük Hastalık Aktivitesi	Orta Hastalık Aktivitesi	Yüksek Hastalık Aktivitesi
DAS28-ESR	Duyarlı eklem sayısı (28 eklem için), Şiş eklem sayısı (28 eklem için), ESR (mm), Genel sağlık durumu	<2.6	2.6-3.2	>3.2≤5.1	>5.1
DAS28-CRP	Duyarlı eklem sayısı (28 eklem için), Şiş eklem sayısı (28 eklem için), CRP (mg/dL), Genel sağlık durumu	<2.6	2.6-3.2	>3.2≤5.1	>5.1
SDAI	Duyarlı eklem sayısı (28 eklem için), Şiş eklem sayısı (28 eklem için), Hastanın genel sağlık değerlendirmesi, Hekimin genel sağlık değerlendirmesi, CRP (mg/dL)	≤3.3	>3.3-11	>11≤26	>26
CDAI	Duyarlı eklem sayısı (28 eklem için), Şiş eklem sayısı (28 eklem için), Hastanın genel sağlık değerlendirmesi, Hekimin genel sağlık değerlendirmesi	≤2.8	>2.8-10	>10≤22	>22

(DAS28: Disease Activity Score 28, ESR: Eritrosit Sedimentasyon Hızı, CRP: c- Reaktif Protein, SDAI: Simplified Disease Activity Index, CDAI: Clinical Disease Activity Index)

2.2. Epigenetik ve Romatoid Artrit

Epigenetik; ilk defa Waddington tarafından gelişim aşamalarının, gen ifadesindeki değişikliklerle düzenlenmesi ile ilgisi vurgulanarak öne sürülmüştür. Diğer yandan, epigenetik; DNA dizisinde herhangi bir değişim olmaksızın kromozomda meydana gelen ve farklı fenotiplere neden olan, kalıtsal bir özellik olarak tanımlanmıştır (Berger ve ark., 2009). Genomun aksine, epigenom ve epigenetik işaretler oldukça dinamik olup, doku ve hücre tiplerine özgül kalıplar sergilerler. Bir

insanın vücudunda bulunan her hücre aynı genetik bilgiye sahiptir. Ancak, her bir hücreyi özgül yapan, ontogenez sırasında farklı gen setlerinin ifade edilmesi yada susturulmasıdır (Glant ve ark., 2014). Epigenetik değişiklikler, mitoz veya mayoz bölünmeler esnasında yeni hücrelere aktarılabilir. Günümüze kadar pek çok önemli epigenetik mekanizma tanımlanmıştır. Bunlar; DNA metilasyonu, post-translasyonel histon modifikasyonları ve mikroRNA (miRNA) gibi kodlanmayan RNA'ların (ncRNA) ekspresyonudur. Bu mekanizmalar spesifik kromatin yapısını belirler ve nihayetinde DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesini etkileyerek farklı fenotiplere yol açar (Golbabapour ve ark., 2011).

2.2.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, sitozinin 5. pozisyonundaki karbonuna (5mC) bir metil grubunun eklendiği işlemdir. Memelilerde DNA metilasyonu genellikle genlerin promotör bölgelerinde kümelenmiş olan CpG adacıkları adı verilen CpG dinükleotitlerinde meydana gelir. Yüksek derece DNA metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin (TF) DNA'ya bağlanmasını engelleyerek gen ifadesinin susturulmasına neden olurken, metile olmayan DNA'da transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlanabilir ve gen ekspresyonu gerçekleşebilir. Ayrıca DNA metilasyonu, genomda potansiyel olarak zararlı olan transpozonlar ve viral elementlerin ifadesinin baskılanmasında da önemli bir rol oynar (Araki ve Mimura, 2017).

Prokaryotlarda DNA metilasyonu, yabancı DNA moleküllerinin parçalanmasında görev yapan restriksiyon endonükleazlara karşı kendi genomik DNA'larını korumada görev yapmaktadır. Yüksek ökaryotlarda ise DNA metilasyonu gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve kontrolünde görev yapmaktadır (Costello ve Plass, 2001).

Memeli genomlarındaki DNA metilasyonunun büyük çoğunluğu, metilasyon olaylarının %80'inin 5'-CpG-3' dinükleotitlerinde meydana gelmesinden dolayı, CpG bölgelerinde incelenmiştir. Memeli genomlarındaki CpG'lerin büyük çoğunluğu metile olarak bulunmuştur. Geri kalan metile olmayan bölgelerin büyük kısmı genlerin promotör bölgelerinde veya ilk ekzonlarında bulunmaktadır (Tirado-Magallanes ve ark., 2017).

DNA metilasyonu DNA metil transferazlar (DNMT) tarafından katalizlenir. Bunlardan DNMT3A ve DNMT3B *de novo* metilasyondan sorumluyken, DNMT1

metilasyonun devamlılığını sağlar. DNMT3A ve DNMT3B enzimleri metile olmayan ya da hemimetile olan CpG bölgelerine bir metil grubu ekler ve metilenmiş yeni DNA bölgelerinin oluşumuna neden olur. DNMT1 ise hücre bölünmesi sırasında yeni oluşan DNA zincirlerindeki hemimetile CpG bölgelerine bir metil grubu ekler ve hücrelerde replikasyon esnasında metilasyon kalıbının devamlılığını sağlar (Araki ve Mimura, 2017).

RA hastalarının, sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında, global DNA hipometilasyonuna sahip oldukları bilinmektedir. RA sinoviyal fibroblastlarında da DNA hipometilasyonu tespit edilmiştir. Sinoviyal fibroblastlardaki DNA hipometilasyonunun, poliaminlerin aşırı kullanımı nedeniyle, insanda temel hücrel metil donörü olan S-adenozil metiyoninin azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Karouzaki ve ark., 2012).

DNA metilasyonunun otoimmünite ve yaşlanmada önemli bir rolü olduğunu ileri süren ilk kanıtlar, otoimmünite ile ilişkili semptomları indükleyebilen bir DNA metiltransferaz inhibitörü olan 5-azacytidine'in etkisinin araştırıldığı çalışmalardan gelmektedir (Richardson, 1986). Özellikle RA için, diferansiyel DNA metilasyonu *IL-6* promotöründe gösterilmiştir. Bu çalışma da Nile ve arkadaşları (2008), periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) genomik DNA'ları izole etmiş ve *IL-6* promotörünün metilasyon durumunu belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, *IL-6* promotör metilasyonunun transkripsiyonu azalttığı tespit edilmiş ve *IL-6* gen ekspresyonunun düzenlenmesinde anahtar rolü olan tek bir CpG tanımlanmıştır. *IL17A* ile ilgili bir çalışma, RA hastalarının inflamasyonlu eklemlerinde promotör metilasyon durumunun değişmiş olduğunu göstermiştir (Janson ve ark., 2011).

RA sinoviyal fibroblastlarının değerlendirildiği genom-çaplı bir çalışma sonucunda, çoğunlukla immün yanıt, inflamasyon ve lökositlerin toplanmasında etkili olan genlerin metilasyon durumlarında hipometilasyon veya hipermetilasyon şeklinde farklılıklar olduğu gösterilmiştir (Nakano ve ark., 2013). RA sinoviyal fibroblastlarında ve PBMC'lerde yapılan geniş çaplı DNA metilasyon araştırmalarında *CXCL12*, *DR3*, *IL-6*, *IL-10* ve *IL1-R2* gibi tek gen promotörlerinde metilasyon profilinin anormal olduğu gösterilmiştir (Picascia ve ark., 2015).

Matriks metalloproteinaz ve sitokin genleri gibi genlerde DNA metilasyonunda meydana gelen düzensizlikler, periapikal inflamasyon ve diyabet gibi birçok hastalıkta bildirilmiştir (Campos ve ark., 2016). Ayrıca, hem RA sinoviyal dokularında, hem de

RA sinoviyal fibroblastlarında (RASf), global DNA metilasyon seviyesinin düşük olduğu da gösterilmiştir. Bu sonuç, DNA metilasyonunun inflamasyonda önemli rol aldığını göstermiştir (Karouzakis ve ark., 2009).

Liu ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışma ile, RA hastalarının periferik kan lenfositlerinde global DNA hipometilasyonu olduğu, DNMT1 ve MBD2 mRNA ifade düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda ise DNA hipometilasyonunun, RA'nın oluşumuna katkıda bulunan otoimmünite ile ilişkili genlerin aşırı ifadesine neden olduğu gösterilmiştir. *IL17A* geni ifadesinin promotör metilasyonu sonucu düzenlendiği ve RA hastalarının inflamasyonlu eklemlerinde Th17 fenotipinin değiştiği tespit edilmiştir (Janson ve ark., 2011).

CD40L bir X kromozom genidir. Bu genin demetilasyonu, genin X kromozom inaktivasyonundan kaçmasına ve özellikle kadın RA hastalarında bu genin aşırı düzeyde ifade edilmesine neden olduğu görülmüştür. Bu durum, RA hastalığının kadınlarda neden erkeklere göre daha baskın görüldüğünü de açıklamaktadır (Liao ve ark., 2012).

Kennedy ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında, RA Treg hücrelerinde *Foxp3* promotörünün DNA metilasyonunda önemli derecede azalma olduğu ve daha düşük seviyede DNA metiltransferaz DNMT1/3A ifadesi olduğu bulunmuştur.

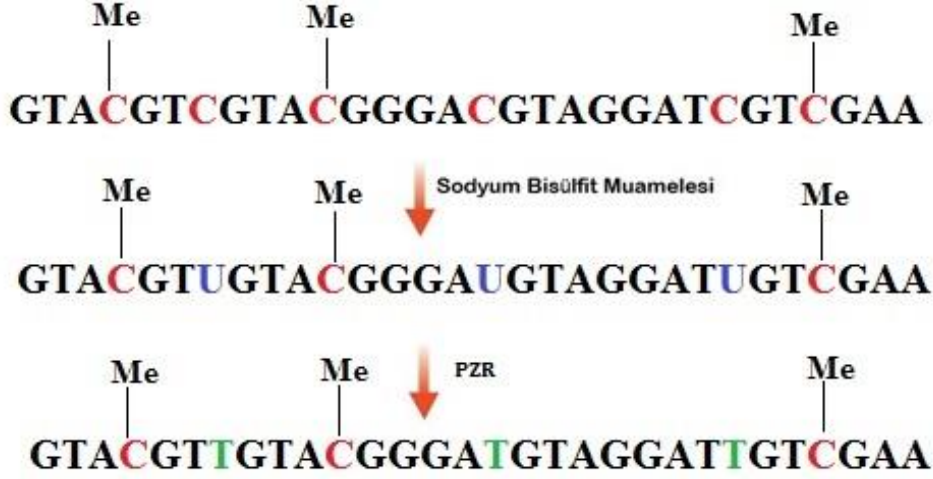
Glossop ve arkadaşlarının (2014) RA ile ilişkili metilasyon değişikliklerini tanımlamak için yaptıkları genom çaplı metilasyon analizinde, seropozitif RA hastaları ve sağlıklı kontrollere ait PBMC'ler kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, RA hastalarında T hücrelerinde 32 CpG'de ve B hücrelerinde 20 CpG'de önemli DNA metilasyon değişimleri tanımlanmıştır. Bu değişimlerin görüldüğü genler ise RA'da T ve B hücrelerinin fonksiyonlarındaki bozukluklar ile yakından ilişkili genlerdir.

Önemli üç otoimmün hastalık olan RA, SLE ve pSS ile yapılan genom çaplı bir sitokin metilasyon analizi çalışmasında, sitokin genlerinin promotör bölgelerinde ya da promotör dışı bölgelerindeki metilasyon durumları açısından farklılıklara sahip olan genler bulunmuştur. Çalışmada elden edilen verilere göre, immün toleransın oluşumunda görev alan bir sitokin olan *PIBF1*'in bu üç hastalıkta da hipermetile olduğu tespit edilmiştir. *AZU1*, *LTBR* ve *RTEL1*'in ise üç hastalıkta da önemli derecede hipometile olduğu bulunmuştur. *CCR6*, *CMTM5*, *IL10RA*, *IL21R* ve *IL32*'nin SLE ve pSS'de hipermetile, ancak RA'da hipometile olduğu görülmüştür (Wang ve ark., 2018).

RA hastalarının DNA'sındaki anormal metilasyon durumu ile ilgili önemli nokta, metilasyon değişikliğinin ne zaman ve hangi aşamada oluşudur. Bir çalışma ile çok erken evre RA hastalarından elde edilen sinoviyal biyopsilerdeki fibroblast benzeri sinoviyositler değerlendirilmiş ve yapılan genom-çaplı metilasyon analizi sonucunda, erken RA sinoviyositlerinin osteoartrit hücrelerinden ayırt edilebilir derecede farklı olduğu görülmüştür. Metilasyondaki kümelenmelere bakıldığında, bazı farklı alt gruplar oluşmasına rağmen, erken evre RA sinoviyositleriyle ileri evre RA sinoviyositleri arasında benzerlik olduğu bulunmuştur. Erken ve ileri evre RA arasındaki önemli farklılıklara, integrin ve PDGF proteinleri ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağın darastlanmıştır. RA'daki imprinting, hastalığın erken evrelerinde meydana gelir, ancak, sabit değildir. Metilasyon kalıbı zamanla hastalığın progresyonuna göre değişim gösterir (Ai ve ark., 2015).

DNA metilasyonunun belirlenmesinde birkaç yöntem geliştirilmesine rağmen, bugün en yaygın kullanılan teknikler bisülfid modifikasyonuna dayanmaktadır (Frommer ve ark., 1992). Bisülfid modifikasyonu sonrasında, metilasyon spesifik PZR (MSP), bisülfid sekanslama veya çip teknolojileri ile metilasyon pozisyonu ve miktarı belirlenebilmektedir (Güler ve Peynircioğlu, 2016).

DNA'nın bisülfid ile muamelesi, kimyasal olarak metile olmayan sitozinleri urasile dönüştürürken, metile olan sitozinler değişmeden kalırlar (Şekil 5). Bu nedenle, bisülfid muamelesi yapıldıktan sonra, artık orijinal baz eşleşmesi ortadan kalkar ve DNA genellikle AT içeriği bakımından zengin ve GC miktarı bakımından ise düşük olur. Bisülfid modifikasyonu sonrasında DNA tipik olarak A, U ve T açısından zengin ve tek iplikli yapıya dönüşür. Bisülfid dönüşümü yapıldıktan sonra, DNA'nın metilasyon profili, metilasyon spesifik PCR yöntemi gibi istenilen bir sonraki yolak ile tespit edilebilir (Rakyan ve ark., 2011).



Şekil 5. Bisülfidit modifikasyonu ve PZR sonrasında DNA dizisinde meydana gelen değişiklikler (Me: metil)

2.2.2. Histon Modifikasyonları

Genomik DNA ile ilişkili özel nükleer histon proteinleri, ökaryotik kromatinin temelini oluşturan nükleozomları oluştururlar. Epigenetik modifikasyonların temel hedeflerinden birisi de bu nükleozomlardır. Bir nükleozom; H2A, H2B, H3 ve H4'ün oluşturduğu histon oktamlerinin etrafında çift heliks yaparak sarılan 146bp'lik DNA içerir. Herbir histon alt tipinin asetilasyon, metilasyon, ubikütinasyon, fosforilasyon, sumoylasyon, sitrüllinasyon, ADP ribozilasyonu ve prolin izomerizasyonu gibi post-translasyonel işlemlerle modifiye edilebildiği gösterilmiştir. Bunlar arasında en çok histon asetilasyonu ve metilasyonu çalışılmış olup, bunların, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya erişilebilirliğini etkileyerek gen ekspresyonunu düzenledikleri anlaşılmıştır (Zhao ve ark., 2015). Histon modifikasyonlarının RA ile ilişkisini tespit etmek üzere yapılan çalışmalar, DNA metilasyonu ile miRNA'lar için yapılan çalışmalara göre daha azdır. Histon deasetilaz (HDAC) aktivitesinin azalması, RA'da proinflatuar genlerin transkripsiyonel regülasyonunda önemli rol oynamakta ve histonların kronik hiperasetilasyonuna neden olmaktadır (Picascia ve ark., 2015).

Lee ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışma, sigara içmenin eklemlerdeki gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler üzerine doğrudan etkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, bir histon deasetilaz olan *SIRT6*, romatoid artrit sinoviyal fibroblastlarında sigara dumanı ile indüklenen değişikliklerin aracılardan biri olarak tanımlanmıştır. Sigara içen RA hastalarının sinoviyal dokularında *SIRT6*

seviyelerinin arttığı ve hastalığın ilerlemesiyle *SIRT6* seviyesinin ilişkili olduğu, ancak sigara içmeyenlerde böyle bir etkinin olmadığı görülmüştür.

RA hastalarının sinoviyal dokularında hem HDAC aktivitesinin, hem de ekspresyonunun sağlıklı bireylerle kıyaslandığında, önemli derecede azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni ise muhtemelen, *HDAC-1* ve *HDAC-2* ekspresyonundaki azalmadır. RA hastalarında histon asetilaz/HDAC dengesi histonların hiperasetilasyonu yönünde çok güçlü şekilde kayma göstermiştir (Picascia ve ark., 2015).

Asetilasyon dışında RA'da rolü olan post-translasyonel histon modifikasyonlarını analiz eden yalnızca birkaç çalışma vardır. Artritlerdeki histon fosforilasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, kromatin modifiye edici 84 enzimin taraması yapılarak, PGIA'li (proteoglikan indüklü artrit) fareler ve RA hastalarının PBMC'lerinden elde edilen mononükleer hücrelerde Aurora Kinaz A (AURKA) ve AURKB'nin ekspresyonunda aşırı seviyede artış görülmüştür. PGIA farelerin B hücrelerinde AURKA ve AURKB seviyelerindeki artış, fosforillenmiş histon 3 düzeyinin yükselmesiyle ilişkilendirilmiştir. Artritlik farelerde, bir pan-aurora kinaz inhibitörü verilmesi sonucunda B hücrelerinin apoptozu sağlanmış ve inflamatuvar reaksiyonlar azaltılmıştır (Glant ve ark., 2013).

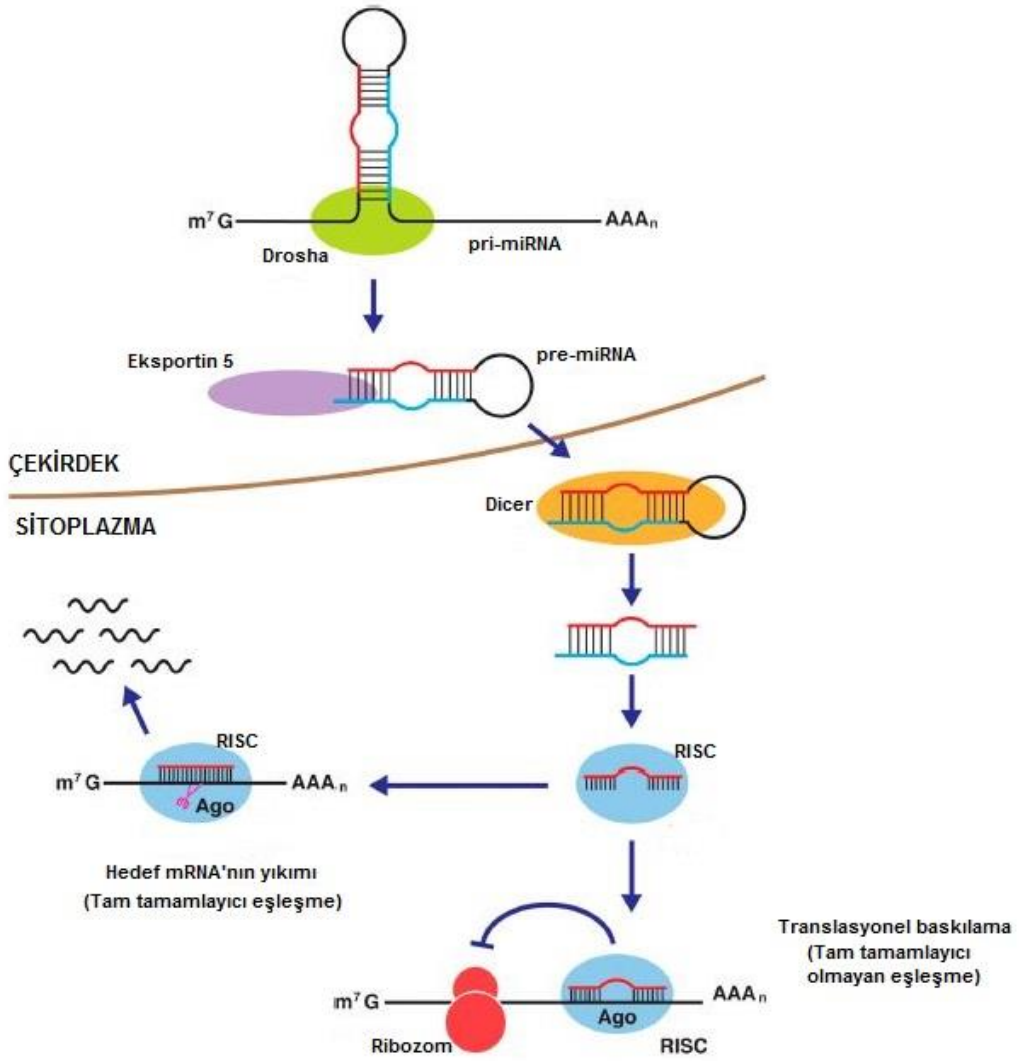
2.2.3. MikroRNA'lar

Olgun miRNA'lar, kısa tek zincirli protein kodlamayan RNA'lar (19-25 nükleotit) olup, bir ya da daha fazla mRNA ile ilişkisi sonucunda mRNA'ların yıkımı veya mRNA translasyonunun baskılanması ile gen ifadesinin susturulmasına neden olurlar (Hausser ve Zavolan, 2014). Bu şekilde insan transkriptomunun yarısı miRNA'ların düzenlenmesi altındadır. MikroRNA'lar hemen her biyolojik işlevde transkripsiyon sonrası kontrol yollarında görev alırlar (Raisch ve ark., 2013). MikroRNA'ların bu biyolojik işlevlerine örnek olarak hücre büyümesi, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve otofaji örnek verilebilir (Xu ve ark., 2012).

MikroRNA'lar hedef gen ifadesinin düzenlenmesini transkripsiyon sonrasında yapmaktadır. MikroRNA'lar genellikle hedef mRNA'nın 3' translasyonu olmayan bölgesine (3'UTR) bağlanarak mRNA'nın yıkımına ve translasyonun engellenmesine neden olur, böylece gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Ancak miRNA'ların

mRNA'lardaki farklı bölgelere bağlanarak gen ifadesini arttırdığına dair sonuçlar da bulunmaktadır (Pasquinelli, 2012).

miRNA'lar genomda kodlanır ve RNA polimeraz II tarafından birkaç kb uzunluktaki uzun birincil miRNA'lar (pri-miRNA'lar) olarak sentezlenir. MikroRNA'lar genler arası bölgelerden, intronlardan (mirtronlar) veya ekzonlardan (protein kodlayan bölge) sentezlenebilirler (Xu ve ark., 2012). Birkaç miRNA geni ise kümelenmiş olarak bulunur ve ortak pri-miRNA'lardan üretilir. Çekirdekte bu pri-miRNA'lar RNaz III enzim ailesinden Drosha adı verilen enzim tarafından işlenir ve bir saç tokası yapısına sahip 60-80 nükleotitlik kısa öncül miRNA'lar (pre-miRNA'lar) meydana gelir. Çekirdekte taşıma yapmakta görevli proteinlerden eksportin-5 (EXP-5) pre-miRNA'ları sitoplazmaya taşır. Sitoplazmada, RNaz III enzim ailesinden Dicer (DCR-1) enzimi pre-miRNA'ları keser ve sonuç olarak iki rehber (miRNA) ve işlevsel olmayan (miRNA*) iplikten oluşan çift sarmal yapı meydana gelir. Bu çift iplikli miRNA oluşumu, yapısında güçlü bir endonükleaz aktivitesine sahip olan Argonat (Ago1) içeren RNA aracılı susturma kompleksi (RISC)'ne bağlanır. RISC kompleksi tarafından tamamlayıcı iplikleri uzaklaştırılan olgun miRNA'lar fonksiyonel hale gelir (Şekil 6). Bazı miRNA'lar rehber iplikten, diğerleri ise yolcu iplikten köken alır. miRNA'lar ve hedefleri olan mRNA'lar arasında tam bir tamamlayıcılık oluşursa hedef mRNA ipliği yıkılır, ancak tam bir tamamlayıcılık oluşmazsa translasyonun baskılanmasına neden olur. Her iki durumda da gen ifadesi susturulmuş olur (Araki ve Mimura, 2017).



Şekil 6. miRNA'ların transkripsiyonu ve işlenmesi. Ago: Argonat, m⁷G: RNA 7-metilguanozin başlığı (Araki ve Mimura, 2017'den uyarlanmıştır).

Kanser, inflamatuvar hastalıklar ve metabolik hastalıklar üzerine yapılan çalışmalarda, epigenetik mekanizmalarda, olmaması gereken epigenetik işaretlerin eklenmesi ve mevcut epigenetik işaretlerin ortadan kalkması gibi hatalara çok sık rastlandığı bildirilmiştir (Glant ve ark., 2014).

miRNA'ların düzensiz ifade edilmesi sonucunda birkaç hastalıkta *MMP* gen ifadesinin anormal olduğu gösterilmiştir (Stanczyk ve ark., 2008). Mikroçip analizleri sonucunda hem miR-155 hem de miR-146a ekspresyonunun RA sinoviyal fibroblastlarında oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. miR-155'in yüksek ekspresyonu, *MMP-3* ekspresyonunu baskılar ve RASF'lerde Tool-like reseptör (TLR) ligandları ve sitokinler tarafından MMP-1 ve MMP-3 indüklenmesini azaltır. miR-155,

RA'da eklem hasarında muhtemelen düzenleyici bir role sahiptir. miR-155, lokal *MMP* ekspresyonunu baskılayarak ve böylece inflamasyon nedeniyle meydana gelen aşırı doku hasarını engelleyerek koruyucu bir miRNA olarak işlev yapabilir (Stanczyk ve ark., 2011). miR-203'ün aşırı ekspresyonu ise MMP-1 üretimini önemli derecede artırmaktadır. Ayrıca başka bir mikroçip çalışmasında, RASF'lerde miR-155 ekspresyonunun artmış olduğu ve bu ekspresyonun TNF- α tarafından indüklenebileceği gösterilmiştir (Long ve ark., 2013).

Murata ve arkadaşları (2010), plazma ve sinoviyal sıvıdaki miRNA'ların, RA için diagnostik biyobelirteçler olabileceğini göstermiştir. miR-132 seviyelerinin, sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında, RA hastalarında daha düşük olduğu bulunmuştur.

Stanczyk ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışma, RA sinoviyal fibroblastlarındaki miR-203 ekspresyonunun metilasyona bağımlı olarak düzenlendiğini göstermiştir. Ayrıca, miR-203 ekspresyondaki artış, NF- κ B yolağı aracılığıyla MMP-1 ve IL-6 salınımının artmasına da neden olmuştur. Bu iki molekül de RA patogeneziyle oldukça ilişkili olup, RA'daki kronik inflamasyona ve eklem hasarına katkıda bulunmaktadır. Bu sonuçlara göre, miR-203 ekspresyonundaki artışın, RA hastalığının aktif fenotipinin bir göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür.

Murata ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada, RA hastalarının plazmalarındaki miRNA'lar çip yaklaşımı ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, miR-24 ve miR-125a-5p plazma konsantrasyonlarındaki artışın, RA için diagnostik bir biyobelirteç olabileceğini göstermişlerdir.

Liu ve arkadaşlarının (2017) RA sinoviyal fibroblastlarında yaptıkları çalışmada, miR-29a ekspresyon düzeyinin çok yüksek olduğu ve STAT3'ü hedefleyerek, apoptozu teşvik etmede, proliferasyonu inhibe etmede ve inflamatuvar sitokin ekspresyonunu baskılamada önemli derecede etkili olduğu tespit edilmiştir.

Zhang ve arkadaşları (2018), RA ile bazı ortak özelliklere sahip otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta (SLE) dolaşımında bulunan ve potansiyel biyobelirteç olabilecek miRNA'ları belirlemek üzere, miRNA çiplerinde analizler yapmıştır. Çalışmalarında plazma miRNA'ları için endojen kontrol olarak tez çalışmamızda da kullanılan snoRNA U6 kullanılmıştır. Çalışmaları sonucunda, sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında, SLE hastalarında miR-103, miR-150, miR-20a, miR-223, miR-15b ve miR-93'ün de arasında olduğu bazı miRNA'ların plazma ekspresyonlarının önemli derecede azaldığı bulunmuştur. Ancak, yapılan ileri

analizlerde, miR-15b'nin SLE'nin aktivitesi ile en çok ilişkili olan miRNA olduğu tespit edilmiştir ve miR-15b'nin SLE için biyobelirteç olabilecek bir miRNA olduğu ileri sürülmüştür.

Son zamanlarda, RA'nın patogenezinde epigenetik düzensizliklerin etkileri ve önemi üzerine yapılan çalışmalarla önemli derecede ilerlemeler sağlanmıştır. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve miRNA gibi protein kodlamayan RNA mekanizmalarındaki anomalileri içeren epigenetik değişim düzensizlikleri, RA'da özellikle MMP'ler ve inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunda artışlara neden olarak sinoviyal inflamasyona, bunun sonucunda da RA'nın şiddeti ve seyrine etki etmektedir.

Günümüzde miRNA'ların hastalıklarla ve özellikle RA ile ilişkilendirilmesi ve prognostik bir faktör olarak aranması ve kullanılması sıklıkla görülmektedir. MikroRNA'ların, RA gibi pek çok hastalığın tanımlanması ve ilerleyişi hakkında bilgi verebileceği üzerine çalışmalar yürütülmektedir. Ayrıca, RA'nın tedavisi veya RA'ya yatkınlığın belirlenmesi için miRNA'lardan yararlanılacağından kuşku yoktur.

2.2.4. Long-noncoding RNA'lar (lncRNA)

Tanım olarak, 200bp'den uzun olan her protein kodlamayan RNA lncRNA olarak adlandırılır. LncRNA'ların protein kodlamafonksiyonu yoktur. Yaygın olarak transkribe edildikleri, ancak sekans, yapı ve fonksiyon açısından oldukça çeşitlilik gösterdikleri bulunmuştur. İlk keşfedilen lncRNA H19 olup, imprinting olan genlerden biridir. H19 lncRNA'nın, RA hastalarının sinoviyal dokularında, osteoartrit hastaları ve sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında aşırı düzeyde ifade edildikleri debilinmektedir (Stuhlmüller ve ark., 2003).

LncRNA genleri özel olarak yalnızca bir allelden eksprese edilirken (örneğin H19 maternal olandır), diğer allel DNA metilasyonu ile susturulur. Damgalanmış genlerin monoallel ekspresyonu düzenli DNA metilasyonuna çok güçlü bir şekilde bağlı olduğundan, hastalıkla ilişkili hipermetilasyon veya hipometilasyon sonucu bu durum bozulabilir (Rachmilewitz ve ark., 1995).

Moleküler seviyede H19, histon metiltransferaz EZH2 ile ilişkilidir ve bu nedenle histon metilasyonu ve dolayısıyla gen ekspresyonundaki değişikliklerde bir rolü olabilir (Luo ve ark., 2013). Ayrıca, H19'un ilk ekzonu miR-675 dizisini içermektedir, ancak bunun H19'un fonksiyonuna nasıl bir etkisi olduğu bilinmemektedir (Kyburz ve ark., 2014).

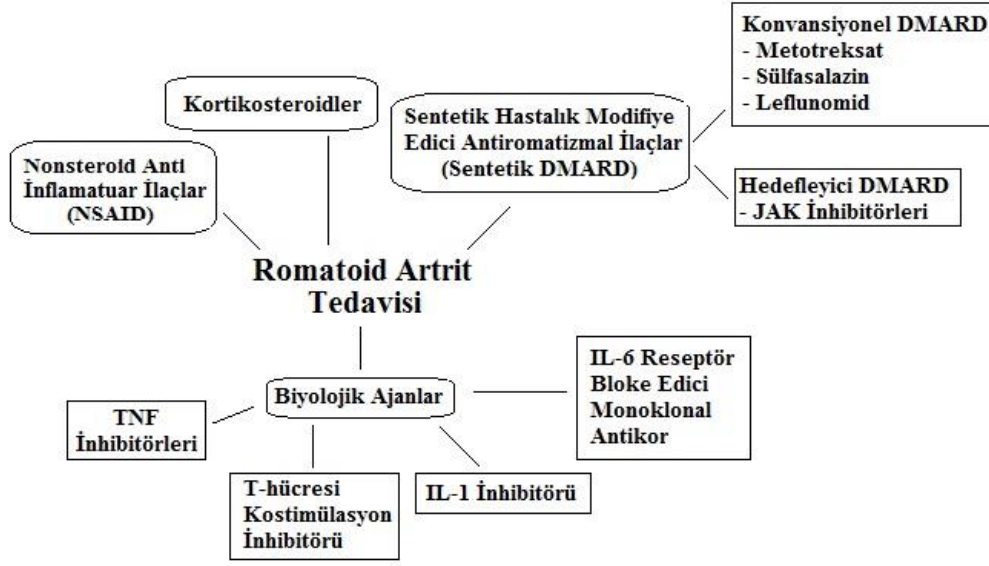
2.3. Tedavi

Son 25 yılda RA hastalığı ve tedavisi ile ilgili önemli veriler elde edilmiştir (Brown ve ark., 2016). EULAR'ın önerilerine göre RA tanısı konulduğunda ilk olarak hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar (DMARD) ile tedaviye başlanılmalıdır. DMARD'ler hastalığın ilerlemesinin ve kötüleşmesinin engellenmesinde kullanılır. Gerektiğinde ağrı kesici olarak nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ve atak dönemlerinde ise kortikosteroidler ile semptomlar hafifletilir. Dengeli egzersiz ve dinlenme ile de tedaviler desteklenebilir (Majithia ve Geraci, 2007).

Tedavideki esas hedef; ağrıyı hafifletmek, inflamasyonu azaltmak, hastalık aktivitesini düşürmek ve hastanın genel fiziksel işlevlerini iyileştirmektir. DMARD başlangıcı sonrasında 3-6 aylık periyotlarla hasta takibe alınır ve eğer herhangi bir iyileşme gözlenmezse tedavi yeniden düzenlenir. Bu durumda DMARD ve steroid kombine tedaviler uygulanır. Ve bu tedavilerin de hastalık seyrinde etkili olmaması durumunda, DMARD'ler ile birlikte biyolojik ajan tedavisine başlanır. RA tedavisinde kullanılan ilaç grupları Şekil 7'de gösterilmiştir (Smolen ve ark., 2010).

Genellikle aktif RA'lı hastalarda DMARD olarak metotreksat başlanması ilk basamak tedavi stratejilerindedir. MTX kontrendikasyonunda sülfasalazin veya leflunomid ilk basamak tedavide düşünülür. Son zamanlarda anti-romatizmal biyolojik ajanlar ve Janus kinaz (JAK) inhibitörleri gibi hedefe özgün yeni tedaviler de geliştirilmiş ve RA tedavisinde önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Ancak randomize klinik denemeler, bu biyolojik ilaçların RA hastalarının ortalama %50'sini başarılı bir şekilde tedavi edebildiğini göstermiştir. Bu biyolojik ilaçlar ve etki mekanizmaları ise aşağıdaki gibidir (Araki ve Mimura, 2017):

- TNF- α inhibisyonu (infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab)
- Dolaşımdaki B hücrelerinin tüketilmesi (rituximab)
- T hücre ko-stimülasyonunun bozulması (abatacept)
- İnterlökin-1 (IL-1) inhibisyonu (anakinra)
- İnterlökin-6 (IL-6) inhibisyonu (tocilizumab)



Şekil 7. RA tedavisinde kullanılan ilaç grupları

RA hastalığı ve tedavisi ile ilgili önemli veriler ve gelişmelerle birlikte yeni tedavi ajanlarının bulunmasına rağmen, RA tedavisi başlangıcında metoreksat (MTX) tercih edilen temel ilaç olarak yerini korumaktadır (Brown ve ark., 2016). Metoreksat 1940'lı yıllarda, dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe eden bir antifolat ajan olarak geliştirilmiştir (Gubner ve ark., 1951). Metotreksat (4-amino-10-metilfolik asit), DHFR'ye bağlanma afinitesini artırmak için tasarlanmış modifiye bir folat formudur (Hazlewood ve ark., 2016).

Yapılan çok sayıda çalışmada, RA tedavisinde MTX'in etkinliği doğrulanmıştır. RA hastalarının tedavisinde %50 iyileşme sağlanmıştır (Lopez-Olivo ve ark., 2014). MTX esas olarak lösemi tedavisi için geliştirilmiş olup, lösemide yüksek dozlarda kullanılır. Düşük dozlarda ise RA tedavisinde kullanılır. Kanseri tedavisinde yüksek dozda kullanımında MTX, pürinlerin ve dolayısıyla DNA'nın sentezini antagonize eder ve S fazında hücre döngüsünün durmasına ve malign hücrelerin apoptozuna neden olur. Ancak RA'da MTX'in etkisi tam olarak aydınlatılmamıştır (Visentin ve ark., 2012).

Wu ve arkadaşları (2018), miR-708-5p'nin RA'daki rolünü araştırmıştır. Bu çalışmada, RA hastalarının sinoviyal dokularında miR-708-5p ekspresyonunun, sağlıklı kontrollere göre, çok düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca, miR-708-5p'nin *in vivo* etkisini araştırmak için, intradermal olarak serum kollajen tip II enjeksiyonu ile oluşturulan RA rat modelinde miR-708-5p gen tedavisi çalışması da yapılmıştır. RA

modeli oluşturulduktan sonra ratlara, kimyasal olarak sentezlenen miR-708-5p mimic'ler verilerek gen tedavisi yapılmıştır. Gen tedavisi uygulaması sonucunda, miR-708-5p'nin, Wnt3a/ β -katenin yolak aktivitesini hem transkripsiyonel seviyede, hem de protein seviyesinde önemli derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, hem *in vivo* hem *in vitro* çalışmalarla miR-708-5p'nin Wnt3a/ β -katenin yolağının inhibisyonu ile RA'da etkili olduğu ve miR-708-5p mimic'leri ile tedavinin RA seyrini azaltabileceği ileri sürülmüştür.

Li ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları bir çalışmada, RA hastalarının sinoviyal dokularında ve FLS'lerinde, sağlıklı kontrole göre, miR-506 ekspresyonunda önemli ölçüde azalma olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, miR-506'nın hücre çoğalmasını ve apoptozunu nasıl etkilediği de araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, miR-506'nin aşırı ekspresyonunun hücre döngüsünü durdurarak, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktiviteleri ile apoptozu teşvik ettiği, bunun yanı sıra TLR4'ü hedefleyerek, RA FLS'lerinde inflamatuvar sitokin salınımını azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, miR-506'nın RA progresyonunu engellemeyi amaçlayan tedavi uygulamaları için önemli bir aday olabileceğini düşündürmüştür.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Gönüllü Seçimi

Çalışmamıza, Samsun ve çevre illerde yaşayan, Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı Polikliniğinde yapılan klinik değerlendirmeler sonucunda RA tanısı konan 49 RA hastası (henüz tedavi uygulanmamış 11 hasta ve tedavi görmekte olan 38 hasta) dahil edildi. Kontrol grubu ise Samsun ve çevre illerde yaşayan, aralarında akrabalık olmayan ve ailesinde ya da kendisinde RA olmayan 38 sağlıklı bireyden oluşturuldu.

Bu araştırma, OMÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun (KAEK) 15.11.2016 tarihli ve OMÜ KAEK 2016/300 nolu etik kurul kararıyla onaylandı. Ayrıca, OMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından PYO.TIP.1904.18.004 proje numarası ile Doktora Tez Projesi olarak desteklendi.

3.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmada biyolojik materyal olarak hasta ve kontrol grubundaki gönüllülere ait periferik kan örnekleri kullanıldı. Gönüllü bireylerden, EDTA'lı tüpler içerisine 2ml periferik kan numuneleri alındı. Alınan kan numunelerinden metilasyon analizinde kullanılacak olanlar OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında -20°C'de, mikroRNA ekspresyonu çalışmasında kullanılacak olanlar ise çalışmada kullanılana kadar -80°C'de muhafaza edildi. Daha sonra bu numuneler DNA ve RNA izolasyonunda kullanıldı.

3.3. Kullanılan Cihazlar

- Otoklav (Nüve OT 4060, Türkiye)
- Isı bloğu (VWR, ABD)
- Vorteks (Clifton Cyclone, İngiltere)
- Santrifüj (Nüve NF048, Türkiye)
- DNA sayacı: Nano-drop (Jenway Genova Nano, İngiltere)
- Isı döngü cihazı: Thermal Cycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD)
- Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)
- Mikrodalga fırın (Arçelik MD 674, Türkiye)

- Yatay elektroforez tankı (Junyi JY300C, Çin)
- UV transillüminatörü (Daihan Scientific, Güney Kore)
- Kantitatif eş zamanlı PZR cihazı: Bio-Rad CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, ABD)

3.4. Kullanılan Kimyasallar

- %100'lük etanol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Agaroz (Prona, Nu micropor)
- Etidyum bromür (SERVA, Almanya)
- 6X yükleme boyası (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- Kloroform (MERCK, Almanya)
- Borik asit (Amresco, ABD)
- Tris (Hydroxymethyl aminomethane) (MERCK, Almanya)
- EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (Sigma, ABD)

3.5. Kullanılan Kitler

- DNA izolasyon kiti: Pure Link® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, ABD)
- Bisülfidit modifikasyon kiti: EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- DNA amplifikasyon kiti: DreamTaq™ Hot Start DNA polimeraz enzimi (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- Pozitif metile ve pozitif unmetile kontrol: Cells-to-CpG™ Methylated and Unmethylated gDNA Controls (Applied Biosystems, USA)
- Agaroz jel elektroforezinde ürün boyutu belirleyicisi: 50bp DNA Ladder (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 ve 50bp DNA fragmentleri içerir) (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- miRNA izolasyon kiti: miRNeasy® Mini Kit (Qiagen, Almanya)
- cDNA sentez kiti: TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Litvanya)
- Revers transkripsiyon primerleri: TaqMan™ MicroRNA Assays (Applied Biosystems, ABD)

- qRT-PZR Master Mix: TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, ABD)
- qRT-PZR primer-problar: TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-93-5p ve TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-4668-5p (Applied Biosystems, ABD)
- qRT-PZR için endojen kontrol primer-prob: TaqMan® MicroRNA Assay RNU6B (Applied Biosystems, ABD)

3.6. Kandan DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden genomik DNA'nın izolasyonu için, genomik DNA izolasyon kiti kullanıldı. Çalışma öncesinde, kullanılacak pipet uçları ve 1.5ml'lik ependorf tüpler otoklavda steril edildi. Lizis işleminde kullanılacak kuru ısı bloğu 55°C'ye ayarlandı. -20°C'de muhafaza edilen kan numuneleri çalışmadan önce oda sıcaklığında tutularak çözdürüldü.

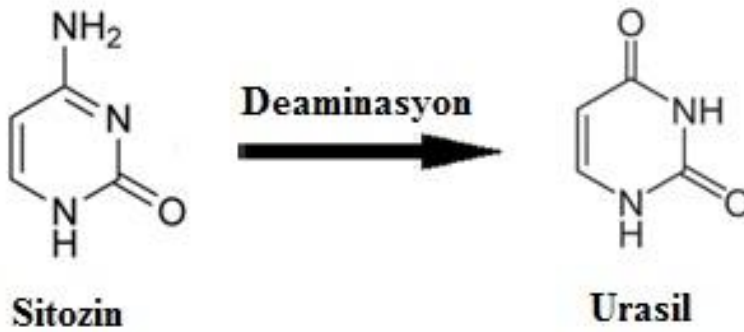
Kan örneklerinden genomik DNA'nın izolasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. İlk kullanımda, DNA izolasyon kiti içerisindeki 'Pure Link® Genomic Wash Buffer 1' ve 'Pure Link® Genomic Wash Buffer 2' ye, üzerinde yazan miktarlarda %100'lük etanol eklendi.
2. Steril 1.5ml'lik bir mikro santrifüj tüpü içine 200µl tam kan örneği alındı.
3. Tüpteki kan örneğine, kitin içinde mevcut olan 20µl Proteinaz K ve 20µl RNase A eklendi. Vorteks ile kısaca karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyon yapıldı.
4. 200µl 'Pure Link® Genomic Lysis/Binding Buffer' eklendi ve homojen bir solüsyon elde edene kadar vorteks ile karıştırıldı.
5. Kuru ısı bloğunda 55°C'de 15 dakika inkübasyon yapıldı, böylece proteinlerin parçalanması sağlandı.
6. Oluşan lizat içerisine 200µl %100'lük etanol eklendi ve vorteks ile 5 saniye karıştırılarak homojen bir solüsyon elde edildi.
7. Elde edilen ~640µl'lik lizat, 'Pure Link® Spin Column' mini kolonuna aktarıldı ve oda sıcaklığında 10.000×g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
8. Toplama tüpü atıldı ve mini kolon, temiz bir 'Pure Link® Collection Tube' toplama tüpüne yerleştirildi.

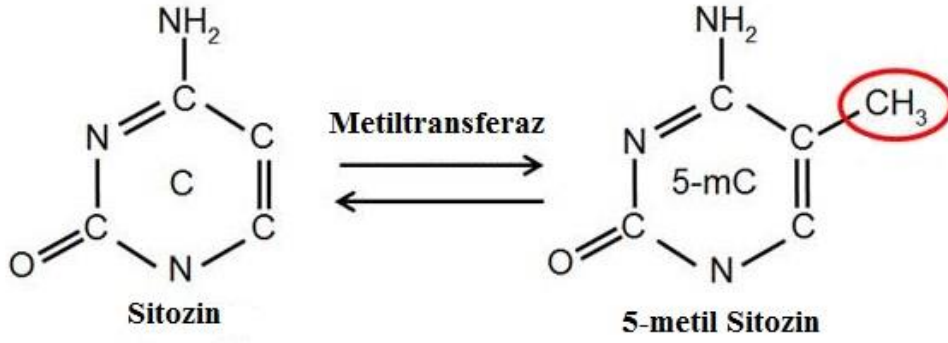
9. Mini kolona 500µl 'Pure Link® Genomic Wash Buffer 1' eklendi.
10. Oda sıcaklığında 10.000×g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
11. Toplama tüpü atıldı ve mini kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
12. Mini kolona 500µl 'Pure Link® Genomic Wash Buffer 2' eklendi.
13. Oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifüj yapıldı ve toplama tüpü atıldı.
14. Mini kolon, steril 1.5 ml'lik bir mikro santrifüj tüpü içine yerleştirildi ve mini kolona 50µl 'Pure Link® Genomic Elution Buffer' eklendi.
15. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon yapıldı. Sonra mini kolon, oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapılarak elde edilen genomik DNA, 1.5ml'lik bir mikro santrifüj tüpünde toplandı. Mini kolon atıldı.
16. Elde edilen DNA örneğinin miktarı ve saflığı DNA sayacı ile ölçüldü.
17. Genomik DNA örneği, sonraki işlemlere kadar, -20°C'de muhafaza edildi.

3.7. Bisülfıt Modifikasyon Yöntemi

DNA'nın bisülfıt ile modifikasyonu, bisülfıt modifikasyon kiti kullanılarak yapıldı. Bisülfıt modifikasyon yöntemi, DNA'nın bisülfıtla muamele edilmesi sonucunda metillenmemiş sitozinlerin deaminasyon ile urasile dönüştürülmesi (Şekil 8) esasına dayanmaktadır. Metillenmiş sitozinlerde (Şekil 9) böyle bir dönüşüm meydana gelmemektedir.



Şekil 8. Metillenmemiş sitozinin bisülfıt modifikasyonu sonrası urasile dönüşümü



Şekil 9. Sitozinin metilasyonu

Genomik DNA örneklerine bisülfid modifikasyonu işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

Ön hazırlık aşaması

Bisülfid modifikasyon kitini kullanmaya başlamadan önce, 9ml ‘Wash Buffer’ içine 25ml %100 etanol eklendi ve 3.5ml ‘Desulfonation Buffer’ içine 10ml %100 etanol eklendi. Wash Buffer ve Desulfonation Buffer oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Bisülfid konversiyonunda kullanılacak ‘Modification Reagent’ solüsyonunu hazırlama:

1. Kuru bir karışım olan ve her biri 10 reaksiyon için kullanılacak ‘Modification Reagent’ içine 0.9ml steril su, 200µl ‘Modification Solution I’ ve 60µl ‘Modification Solution II’ ilave edildi.
2. Oda sıcaklığında 10 dakika süre ile tüp elde çevrilerek karıştırıldı, böylece bisülfid kristalleri çözülerek homojen bir solüsyon elde edildi.

Bisülfid modifikasyonu

1. Steril bir PZR tüpüne 500ng genomik DNA içeren 20µl DNA örneği konuldu. 20µl’den az olan DNA örneklerinin hacmi ise, steril bidistile su ilave edilerek son hacmi 20µl’ye tamamlandı.
2. 500ng/20µl DNA içeren PZR tüpüne, önceden hazırlanmış olan 120µl ‘Modification Reagent’ solüsyonu eklendi, pipetaj yapılarak karıştırıldı.
3. PZR tüpü kuru ısı bloğunda 98°C’de 10 dakika ve hemen ardından 60°C’de 150 dakika bekletildi.
4. Bir toplama tüpü içerisindeki ‘DNA Purification Micro Column’ mini kolonuna 400µl ‘Binding Buffer’ eklendi. Sonra içerisine, 3. Aşamadaki bisülfid

modifikasyonu yapılmış DNA örneği 'Binding Buffer' içerisine ilave edildi ve pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı.

5. Toplama tüpü içindeki mini kolon, oda sıcaklığında 12,000rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
6. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve mini kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
7. Mini kolona 200µl 'Wash Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 12,000rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
8. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve mini kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
9. Mini kolona 200µl 'Desulfonation Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.
10. Toplama tüpü içindeki mini kolon, oda sıcaklığında 12,000rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
11. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve mini kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
12. Mini kolona 200µl 'Wash Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 12,000rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
13. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve mini kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
14. Mini kolona tekrar 200µl 'Wash Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 12,000rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpü ve içindeki sıvı atıldı.
15. Mini kolon, steril 1.5ml'lik bir mikro santrifüj tüpüne yerleştirildi. Mini kolona 10µl 'Elution Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 12,000rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Mini kolon atıldı.
16. Elde edilen bisülfite modifikasyonu yapılmış DNA örneği, Metilasyon Spesifik PZR (MSP)'da kullanıldı. Hemen kullanılmayan örnekler -20°C'de muhafaza edildi.

3.8. Metilasyon Spesifik PZR (MS-PZR)

Metilasyon Spesifik PZR yöntemi, bisülfite dönüşümü yapılmış DNA örneklerinde, CpG adacıklarındaki metilasyon durumunun belirlenmesinde kullanıldı. DNA'nın bisülfite ile muamelesi, kimyasal olarak metile olmayan sitozinleri urasile dönüştürürken, metile olan sitozinler değişmeden kalırlar. Bunun sonucunda, bisülfite muamelesi yapılmış DNA'da artık orijinal baz eşleşmesi ortadan kalkar. Bu nedenle MSP yönteminde *IL-16* ve *MMP-3* genlerinin promotör bölgelerini çoğaltmak için, metilasyona özgül olan primerler (MSP) ve metilasyona özgül olmayan primerler (USP)

tasarlandı. Metilasyona özgül PZR primerlerini tasarlamak için, ‘www.ensembl.org’ sitesinden elde edilen gen promotör dizileri ‘http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi’ adresindeki veri tabanına girilerek MSP ve USP primerler tasarlandı. MSP yönteminde kullanılan primer dizileri ve amplicon uzunlukları Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. MSP primer dizileri, hibridizasyon sıcaklıkları (T_m) ve beklenen amplicon uzunlukları

Primer Adı	Baz Dizisi 5’→3’	Baz Sayısı	T _m (°C)	Amplicon uzunluğu (bp)
<i>IL-16</i> MSP-F	TGATTATTTAAGGATTGAGGAGTGTC	26	58	150
<i>IL-16</i> MSP-R	AACTAAACATAAAAATTCTCCACGTC	27	57	150
<i>IL-16</i> USP-F	TTATTTAAGGATTGAGAGTGTTGG	25	58	150
<i>IL-16</i> USP-R	AACTAAACATAAAAATTCTCCACATC	27	56	150
<i>MMP-3</i> MSP-F	TAAGGATAGAGAGAATTTTAGTTCGG	26	58	100
<i>MMP-3</i> MSP-R	ATTTATTAATAAATAATAAACCCACGTA	28	53	100
<i>MMP-3</i> USP-F	GATAAGGATAGAGAGAATTTTAGTTTGG	28	59	100
<i>MMP-3</i> USP-R	TTATTAATAAATAATAAACCCACATA	26	51	100

(MSP-F: metilasyona özgül forward primer, MSP-R: metilasyona özgül reverse primer USP-F: metilasyona özgül olmayan forward primer, USP-R: metilasyona özgül olmayan reverse primer)

MSP yönteminde, bir DNA polimeraz enzim kiti ve metilasyona özgül oligonükleotit primerler kullanıldı. Metilasyona özgül PZR protokolü Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Metilasyona özgül metile/unmetile PZR protokolü (25µl)

Stok Madde	Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Kullanılan Miktar
10X PZR Tamponu (MgCl ₂ içeren)		1X PZR Tamponu (MgCl ₂ içeren)	2.5µl
dNTP (25mM)		dNTP (200µM)	0.2µl
Forward Primer 100 pmol/µl		Forward Primer 20pmol/µl	0.2µl
Reverse Primer 100 pmol/µl		Reverse Primer 20pmol/µl	0.2µl
Kalıp DNA (Bisülfite modifiye edilmiş) 500ng/10µl		Kalıp DNA 50ng/µl	3µl
DreamTaq™ Hot Start DNA Polimeraz Enzimi (5U/µl)		DNA Polimeraz enzimi (1.25 U)	0.25µl

Çalışmamızda, pozitif metile ve pozitif unmetile genomik DNA'lar kontrol olarak kullanıldı. Metile ve unmetile özgül PZR için reaksiyon karışımları iki farklı steril ependorf tüpte hazırlandı ve PZR tüplerine aktarıldı. PZR tüpleri, gerekli PZR programları yapılarak ısı döngü cihazı içine konuldu ve reaksiyonlar gerçekleştirildi.

IL-16 geni için MSP koşulları (metile ve unmetile) Tablo 5'te verilmiştir. *MMP-3* geni için metile MSP koşulları Tablo 6'da ve unmetile MSP koşulları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 5.*IL-16* geni için MSP ve USP koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	3dk	1
Denatürasyon	95	40sn	
Primer Bağlanması	57	40sn }	40
Zincir Uzaması	72	70sn	
Son Uzama	72	7dk	1

Tablo 6.*MMP-3* geni için MSP koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	3dk	1
Denatürasyon	95	40sn	
Primer Bağlanması	58	40sn }	40
Zincir Uzaması	72	70sn	
Son Uzama	72	7dk	1

Tablo 7.*MMP-3* geni için USP koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	3dk	1
Denatürasyon	95	40sn	
Primer Bağlanması	53	40sn }	40
Zincir Uzaması	72	70sn	
Son Uzama	72	7dk	1

Metilasyona özgül PZR işleminden sonra, bisülfid modifikasyonlu DNA örneklerine ait PZR ürünlerindeki *IL-16* ve *MMP-3* gen promotörlerinin metilasyon durumu, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile analiz edildi.

3.9. Agaroz Jel Elektroforezi

Metilasyona özgül PZR ürünleri için %2'lik agaroz jelde, 50bp'lik marker kullanılarak agaroz jel elektroforezi yapıldı.

10X TBE'nin hazırlanışı: 108g Tris ve 55g borik asit tartıldı ve bir erlenmayere aktarıldı, üzerine 20ml 0.5M EDTA (pH:8) eklendi ve hacim 1 litreye tamamlandı. Karışım, homojen ve şeffaf görünüme ulaşuncaya kadar karıştırıldı.

1X TBE'nin hazırlanışı: 100ml 10X TBE üzerine 900ml bidistile su ilave edildi ve iyice karıştırıldı.

%2'lik agaroz jelin hazırlanışı: 50ml 1X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) ölçülerek erlenmayere aktarıldı ve üzerine hassas terazi ile tartılan 1g agaroz ilave edildi. Oluşan heterojen karışım, mikrodalga fırında şeffaf görünüme elde edilene kadar 10 saniyelik aralıklarla çalkalanarak kaynatıldı. Oluşan şeffaf homojen karışım sıcaklığı yaklaşık 80°C'ye kadar soğutulduktan sonra 0.5mg/ml'lik derişimdeki etidyum bromürden (EtBr) 50µl ilave edildi. Erlenmayer hafifçe çalkalanarak EtBr'nin homojen olarak agaroz jel karışımı içinde dağılması sağlandı. Daha sonra jel, tarak yerleştirilmiş olan elektroforez tabağına döküldü ve 45-50 dakika süresince katılaşması için bırakıldı. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkarıldı ve jel 1X TBE içeren yatay elektroforez tankına yerleştirildi.

MSP ürünleri, 1:6 oranında 6X yükleme boyası ilave edilerek jele yüklendi ve 125 voltluk elektrik akımında 15-20 dakika yürütüldü. Marker olarak 50bp DNA Ladder kullanıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra sonuçlar UV transillüminatörü ile görüntülenerek incelendi ve resimleri çekildi.

Agaroz jel elektroforezinde *IL-16* gen promotörünün metilasyona özgül olan ve olmayan ürünlerinin boyutu 150bp olarak, *MMP-3* gen promotörünün metilasyona özgül olan ve olmayan ürünlerinin boyutu ise 100bp olarak belirlendi.

Genlerin promotörlerinin metilasyon durumu, ampikon ürünlerinin hem M hem de U primerle yapılan PZR'de gözlenmesi durumunda metillenmiş (Metile) olarak kabul edildi. Yalnızca U primerlerle yapılan reaksiyonda amplifikasyon görülmesi durumunda ise metillenmemiş (Unmetile) olarak kabul edildi.

3.10. Kandan miRNA İzolasyonu

Gönüllü bireylere ait kan numunelerinden miRNA'ların izolasyonu, miRNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı.

Kan örneklerinden miRNA izolasyon işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Steril ependorf tüp içerisine 200µl tam kan örneği konuldu.
2. Ependorf tüp içerisindeki kan örneği üzerine 700µl 'QIAzol Lysis Reagent' eklendi ve vorteks yapılarak homojenize edildi.
3. Oluşan homojen karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Homojen karışım üzerine 140µl kloroform eklendi ve 20 saniye kuvvetlice çalkalandı. Sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonrasında, +4°C'de 12,000×g'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
6. Santrifüj sonrası tüpte oluşan sıvı faz yeni bir steril tüp içine aktarıldı ve üzerine 1.5 volüm yaklaşık 525µl %100 etanol eklendi, pipetaj yapılarak karıştırıldı.
7. Tüp içerisindeki tüm karışım steril 2ml'lik toplama tüpü içindeki 'RNeasy Mini Column' mini kolonu içine aktarıldı.
8. Oda sıcaklığında >8,000×g'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
9. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve kalan örnek için 8. aşama tekrarlandı.
10. 'RNeasy Mini Column' içine 500µl 'RPE Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında >8,000×g'de 15 saniye santrifüj yapıldı, toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
11. Tekrar 500µl 'RPE Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında >8,000×g'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
12. Toplama tüpü atıldı ve 'RNeasy Mini Column' yeni bir steril 1.5 ml'lik tüp içine konuldu. Daha sonra mini kolondaki membran üzerine 30µl RNaz içermeyen su eklendi, oda sıcaklığında >8,000×g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Mini kolon atıldı.
13. İzolasyon sonrası elde edilen miRNA örneklerinin miktarı ve saflığı Nano-drop ile 260nm'de ölçüldü.
14. RNA örneği, sonraki işlemlere kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.11. Revers Transkripsiyon ile cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA içindeki miRNA örneklerinden, cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi yapıldı. miRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan ters transkripsiyon

PZR reaksiyon karışımının (toplam reaksiyon hacmi 15 μ l) içerikleri Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. cDNA sentezi için kullanılan ters transkripsiyon PZR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Örnek Başına	Hacim (μ l)
10 mM dNTP		0.15 μ l
MultiScribe™ Revers Transkriptaz (50U/ μ l)		1 μ l
10X Revers Transkripsiyon Buffer		1.5 μ l
RNase İnhibitör (20U/ μ l)		0.19 μ l
Nükleaz içermeyen su		4.16 μ l

miRNA örneklerinden cDNA sentez işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Test edilecek her bir RNA örneği ve 5X RT primerler buz üzerinde çözüldü.
2. RT primer tüpleri kullanmadan önce vorteks ile hafifçe karıştırıldı ve kısaca santrifüj yapıldı.
3. Öncelikle, kitin içeriğinde bulunan RT master mix’ten her bir numune için 7 μ l alındı ve 5 μ l RNA örneği ile karıştırıldı. Hafifçe karıştırılan karışım, kısaca santrifüj yapılarak tüpün dibinde toplandı.
4. Elde edilen toplam 12 μ l’lik RT master mix + RNA karışımına 3 μ l 5X RT primer eklendi. Tüpler inversiyon yapılarak iyice karıştırıldı ve karışım kısaca santrifüj yapılarak tüpün dibinde toplandı.
5. Her bir örneğe ait tüplere bu işlemlerden sonra 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyon yapıldı.
6. Daha sonra tüpler ısı döngü cihazı içine konuldu ve Tablo 9’daki PZR programı ile reaksiyonlar gerçekleştirildi.
7. Reaksiyon sonrasında cDNA örnekleri, Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR) analizi gerçekleştirilene kadar -20°C ’de saklandı.

Tablo 9. Ters transkripsiyon PZR programı

Süre	Sıcaklık (°C)
30 dakika	16
30 dakika	42
5 dakika	85
∞	4

3.12. Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR) Yöntemi

qRT-PZR yöntemi, nükleik asit çoğalması sırasında oluşan ürün miktarıyla eş zamanlı olarak artan floresan boya veya problemlerin verdiği sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuçlar veren bir yöntemdir. PZR ürünü ve floresan yoğunluğu arasında korelasyon vardır. Sıcaklık döngüleri ve floresan sinyalin okunması aynı cihazda ve aynı reaksiyonda gerçekleştiği için oldukça hızlı, kullanışlı ve güvenilir bir yöntemdir (Günel, 2007).

Çalışmamızda, özgül dizilere bağlanan, en yüksek sinyal veren prob sistemi olan iki-ışaretleli TaqMan® prob yöntemi kullanıldı. TaqMan® sisteminde, 5' ve 3' uçlarına florokrom maddelerle işaretlenerek tasarlanan problemler kullanıldı. TaqMan® prob yönteminde, öncelikle TaqMan® problemler bağlanır, sonra PZR'nin primer bağlanması evresinde primerler bağlanır Taq polimeraz ile uzama gerçekleşir. Taq polimerazın 5'-ekzonükleaz aktivitesi ile proba bağlı florofor kesilir ve floresan ışımaya açığa çıkar.

3.12.1. Primerlerin seçimi

hsa-miR-93-5p ve hsa-miR-4668-5p'nin mikro-RNA genleri ile ilgili bilgiler 'www.ncbi.nlm.nih.gov' sitesinden elde edildi. Primer seçimi için uygun mikro-RNA'lara ait dizilerin belirlenmesinde ise 'http://www.mirbase.org' veritabanı kullanıldı. Mikro-RNA genlerine ve mikro-RNA'lara ait bilgiler ve primer dizileri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. miR-93-5p ve miR-4668-5p'ye ait tanımlar ve diziler

	miR-93-5p	miR-4668-5p
Gen Adı	MIR93	MIR4668
Gen ID	407050	100616114
Genomik Yerleşim	7q22.1	9q31.3
Ekzon Sayısı	1	1
miRBase ID	hsa-miR-93-5p, MI0000095	hsa-miR-4668-5p, MI0017298
miRBase Erişim Numarası	MIMAT0000093	MIMAT0019745
MikroRNA Dizisi	5'-CAAAGUGCUGUUCGUGCAG GUAG-3'	5'-AGGGAAAAAAAAAAGGAU UUGUC-3'

3.12.2. hsa-miR-93-5p ve hsa-miR-4668-5p ifade düzeylerinin ölçümü

hsa-miR-93-5p ve hsa-miR-4668-5p'nin qRT-PZR'ı için 'TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG' ile 'TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-93-5p' ve 'TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-4668-5p' kullanıldı. Veri normalizasyonu için endojen kontrol olarak 'TaqMan® MicroRNA Assay RNU6B' kullanıldı.

Her bir TaqMan® MicroRNA Assay kutusu içerisinde; miRNA'ya özgül RT primer içeren bir tüp ve miRNA'ya özgül forward PZR primeri, özgül reverse primer ve miRNA'ya özgül TaqMan® MGB prob içeren bir tüp bulunur.

qRT-PZR analiz işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. TaqMan® MicroRNA Assay (20X) ve cDNA örnekleri buz üzerinde çözüldü.
2. 'TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG' kullanmadan önce şişesi hafifçe çalkalanarak karıştırıldı.
3. Her bir assay için yapılacak reaksiyon sayıları hesaplandı. Her reaksiyon üç tekrarlı olarak hesaplandı ve yapıldı.
4. Her plate, cDNA örneklerinin her biri için bir miRNA assay, bir endojen kontrol assay ve bir kalıp içermeyen kontrol (no template control: NTC) içerecek şekilde hazırlandı.
5. qRT-PZR reaksiyonu toplam 20µl hacimle gerçekleştirildi.

6. qRT-PZR reaksiyon karışımı, her bir assay için ayrı ve steril 1.5ml'lik mikro santrifüj tüplerinde, Tablo 11'deki bileşenler ve miktarlar ile hazırlandı. Tüpler hafifçe karıştırıldı ve kısaca santrifüj yapıldı.
7. qRT-PZR reaksiyon karışımı ve cDNA örnekleri, her bir örnek için üç tekrar olacak şekilde 96-kuyucuklu plate içine mikro pipetler ile aktarıldı.
8. Hazırlanan plate, eş zamanlı PZR cihazına yüklendi.
9. Isı döngü cihazı ayarları Tablo 12'de verilen qRT-PZR programına göre ayarlandı ve reaksiyon gerçekleştirildi.

miRNA'ların ekspresyon analizleri, KİTAM'da bulunan qRT-PZR (Bio-Rad CFX96™ Real-Time System) cihazı kullanılarak yapıldı.

qRT-PZR yapıldıktan sonra miRNA ekspresyon düzeyleri, hedef miRNA'ların Ct değerlerinin endojen kontrolün Ct değerine normalize edildiği $\Delta\Delta C_T$ metodu kullanılarak belirlendi. Gen ekspresyonundaki rölatif değişimler $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ile hesaplandı.

Tablo 11. qRT-PZR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Bir reaksiyon için hacim (μ l)
TaqMan® MicroRNA Assay (20X)	1 μ l
cDNA	1,33 μ l
TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG	10 μ l
Nükleaz içermeyen su	7,67 μ l
Toplam hacim	20 μ l

Tablo 12. miR-93-5p ve miR-4668-5p ifade düzeylerinin ölçüldüğü qRT-PZR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	
UNG Aktivasyonu	50	2 dakika	
Enzim Aktivasyonu	95	10 dakika	
Denatürasyon	95	15 saniye	40
Bağlanma/Uzama	60	60 saniye	döngü

3.13. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel güç (power) analizi: Yapılmış olan metilasyon çalışmalarında 12 romatoid artrit hastası ve 12 sağlıklı bireye ait periferik kan numuneleri kullanılmıştır (Glossop ve ark., 2014). Minimum ortalama farklılık $D= 1, 2, 3, 4$ ve standart sapma $SD=1, 2, 3, 4$ için yapılan değerlendirmelerde %95 güven sınırında analizin gücü (power) %90'ın üzerinde bulunmuştur. Çalışmada kullanılan örnek büyüklükleri $n_1=12$ birey (romatoid artrit hastası) ve $n_2=12$ bireyden (sağlıklı kontrol) yola çıkılarak, her bir grup için 3'er tane de yedek birey alınarak, RA hastası olan $n_1=15$ birey ve sağlıklı kontrol için $n_2=15$ birey olarak saptanmıştır. Buna göre, toplam gönüllü sayısı 30 birey olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında ise romatoid artrit hastası olan 49 birey ve sağlıklı kontrol olarak 38 birey çalışmaya dahil edilmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi ve hipoteze uygunlukları test edildi. Metilasyon durumlarındaki farklılıkların değerlendirilmesinde OpenEpi 3.01 sürümü (güncellenme tarihi: 04.04.2013) kullanılarak Ki-kare (χ^2) analizi yapıldı. Diğer analizler ise SPSS 22.0 (Armonk, ABD) sürümü kullanılarak korelasyon (korelasyon kat sayısı: $-1 \leq r \leq +1$) ve One Way ANOVA testi ile yapıldı. Elde edilen sonucun $p < 0.05$ olması durumunda, değerlendirilen parametreler için aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.Çalışma Grubunun Demografik ve Klinik Özellikleri

RA hasta grubunda toplam 49 ve kontrol grubunda ise 38 sağlıklı kişi incelendi. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri ve hastaların klinik verileri Tablo 13 ve Tablo 14’te verilmiştir.

Tablo 13. Çalışma grubunun demografik ve klinik özellikleri

Özellik		RA Hasta Grubu(n=49)	Kontrol Grubu(n=38)
Cinsiyet	Kadın/ Erkek	38/11	32/6
Yaş (Yıl)	Aralık	24-69	19-60
	Ortalama \pm SD	50.39 \pm 10.5	37.84 \pm 10.9
ESR (mm/saat)	Aralık	3-77	-
	Ortalama \pm SD	29.12 \pm 18.5	-
	Normal (0-20 mm/sa) (n)	16	-
	Yüksek (>20 mm/saat) (n)	33	-
CRP (mg/L)	Aralık	0.07-59	-
	Ortalama \pm SD	10.89 \pm 12.5	-
	Normal	24	-
	Yüksek	25	-
RF (IgM, U/L)	<u>Seropozitif (n)</u>	33	-
	Aralık	22-3410	-
	Ortalama \pm SD	321.3 \pm 749.4	-
	<u>Seronegatif (n)</u>	16	-
ACPA	<u>Pozitif(n)</u>	36	-
	Aralık	6-5293	-
	Ortalama \pm SD	504.9 \pm 941.96	-
	<u>Negatif (n)</u>	13	-

n: birey sayısı

Tablo 14. Çalışma grubunun demografik ve klinik özelliklerinin devamı

Özellik		RA Hasta Grubu	Kontrol Grubu
Sigara Kullanımı	Evet	12	-
	Hayır	27	38
	Bırakmış	10	-
Aile Öyküsü	Var	8	-
	Yok	41	38
İlaç Kullanımı	DMARD Naive	11	-
	DMARD+/NSAİİ+/Steroid	19	-
	DMARD+/NSAİİ+/Steroid+ Anti-TNF Ajan	19	-
DAS28 Skor	Remisyon (<2.6)	8	-
	Düşük Hastalık Aktivitesi (2.6-3.2)	9	-
	Orta Hastalık Aktivitesi (>3.2≤5.1)	20	-
	Yüksek Hastalık Aktivitesi (>5.1)	12	-

n: birey sayısı

RA hastalarının 38'i kadın ve 11'i erkeklerden oluşmaktadır. RA hasta grubunun yaş ortalaması 50.39±10.5 yıldır. Kontrol grubunun ise 32'si kadın ve 6'sı erkeklerden oluşmaktadır. Kontrol grubunun yaş ortalaması 37.84±10.9 yıldır.

RA hasta grubunun %24.5'i (12/49) sigara kullanan, % 55.1'i (27/49) sigara kullanmayan ve %20.4'ü (10/49) ise sigarayı bırakanlardan oluşmaktaydı. Kontrol grubu ise sigara içmeyen bireylerden oluşturuldu.

Hasta grubundaki bireylerde, RA hastaları için yaygın olarak kullanılan akut faz belirteçlerinden olan ESR ve DAS28 skorları arasında pozitif bir korelasyon bulundu ($r=0.578$, $p=0.005$). Normal ESR değerine sahip bireylerde remisyon ve düşük hastalık aktivitesi daha fazla gözlemlendi. Yüksek ESR değerine sahip bireylerde ise, orta ve yüksek hastalık aktivitesine sahip bireylerin düşük hastalık seyrine sahip bireylerden çok daha fazla olduğu gözlemlendi (Tablo 15).

Çalışmamızda, bir diğer akut faz belirteci olan CRP değerlerinin normal veya yüksek olması ile DAS28 skoru yani hastalık seyrinin değerlendirilmesi arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($r=0.239$, $p=0.098$).

Çalışmamızda seropozitif RF ve seronegatif RF olan olguların DAS28 skorları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($r=0.239$, $p=0.098$).

Benzer şekilde, ACPA pozitif veya negatif olan olguların DAS28 skorları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($r=0.237$, $p=0.101$).

Tablo 15. RA hastalarında ESR ve DAS28 skorları arasındaki ilişki

DAS28 Skoru					
Eritrosit Sedimentasyon Hızı(ESR)	Remisyon	Düşük Hastalık Aktivitesi	Orta Hastalık Aktivitesi	Yüksek Hastalık Aktivitesi	
Normal (n) (0-20mm/saat)	7	4	5	0	
Yüksek (n) (>20mm/saat)	1	5	15	12	
					* $r=0.578$ $p=0.005$

*Spearman's rho, n: birey sayısı

4.2. *IL-16* ve *MMP-3* Genlerinin Promotör Metilasyonu

Toplam 49 RA hastası ve 38 sağlıklı kontrole ait periferik kan örneklerinde *IL-16* ve *MMP-3* genlerinin promotör metilasyon analizi yapıldı. RA grubunda *IL-16* için metilasyon sıklığı %93.9 (46/49), *MMP-3* geni için ise %75.5(37/49) olarak bulundu. Kontrol grubunda metilasyon sıklığı hem *IL-16* geni, hem de *MMP-3* geni için %97.4 (37/38) olarak bulundu (Tablo 16 ve Tablo 17).

Tablo 16. Hasta ve kontrol grubunda *IL-16* geni promotör bölge metilasyon frekansları

Örnek	Metillenmiş <i>IL-16</i> (%)	Metillenmemiş <i>IL-16</i> (%)	<i>p</i> Değeri
Hasta			
Grubu (n)	46 (%93.9)	3 (%6.1)	* <i>p</i> =0.447
Kontrol			
Grubu (n)	37 (%97.4)	1(%2.6)	

*Fisher exact, n: birey sayısı

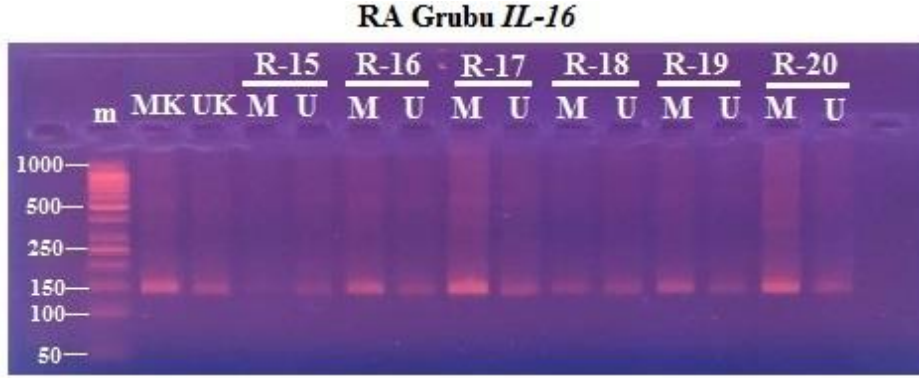
Tablo 17. Hasta ve kontrol grubunda *MMP-3* geni promotör bölge metilasyon frekansları

Örnek	Metillenmiş <i>MMP-3</i> (%)	Metillenmemiş <i>MMP-3</i> (%)	<i>p</i> Değeri
Hasta Grubu (n)	37 (%75.5)	12 (%24.5)	* <i>p</i> =0.004
Kontrol Grubu (n)	37 (%97.4)	1 (%2.6)	

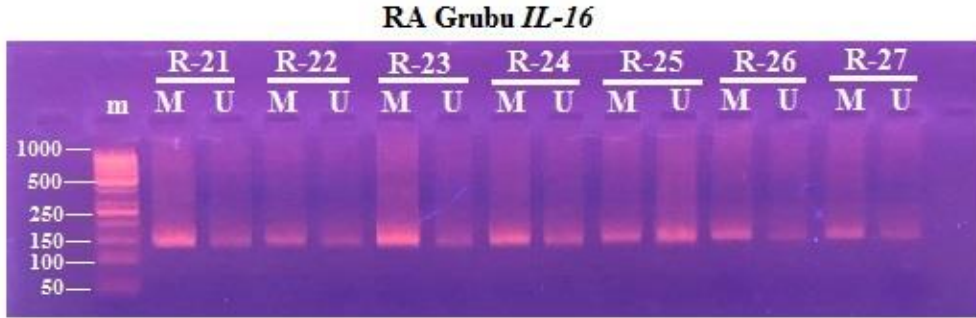
*Fisher exact, n: birey sayısı

Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örneklerindeki *IL-16* promotör bölge metilasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (*p*=0.447). Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örneklerinde *MMP-3* promotör bölge metilasyonları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (*p*=0.004).

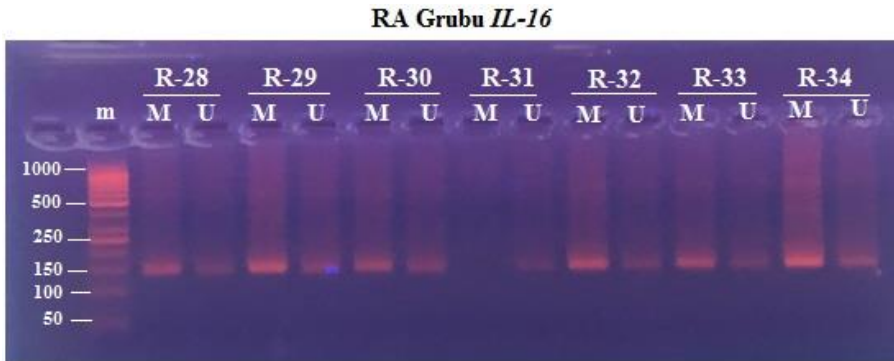
Aşağıda, RA hasta ve kontrol grubuna ait DNA örneklerinde *IL-16* (Şekil 10-13) ve *MMP-3* genlerinin (Şekil 14-17) MSP sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri verilmiştir.



Şekil 10. *IL-16* geni promotör bölge metilasyonunun 15-20 numaralı hastalardaki agaroz jel görüntüsü*

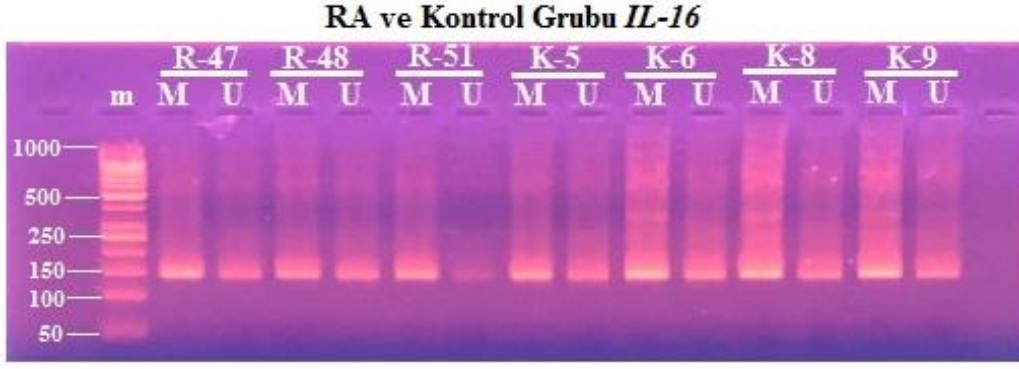


Şekil 11. *IL-16* geni promotör bölge metilasyonunun 21-27 numaralı hastalardaki agaroz jel görüntüsü*

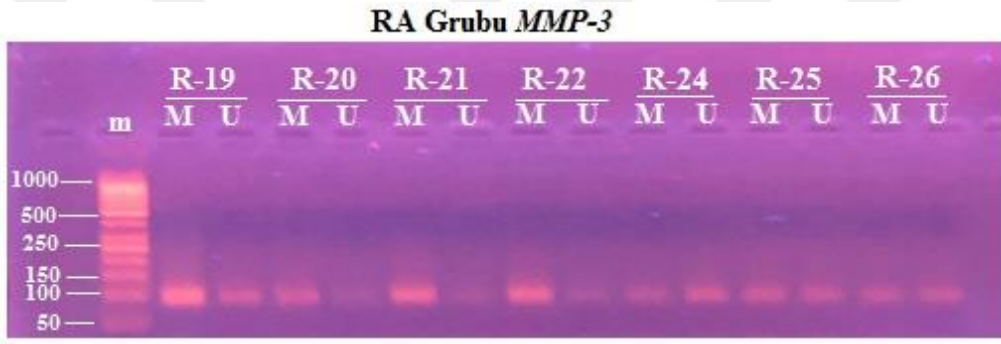


Şekil 12. *IL-16* geni promotör bölge metilasyonunun 28-36 numaralı hastalardaki agaroz jel görüntüsü*

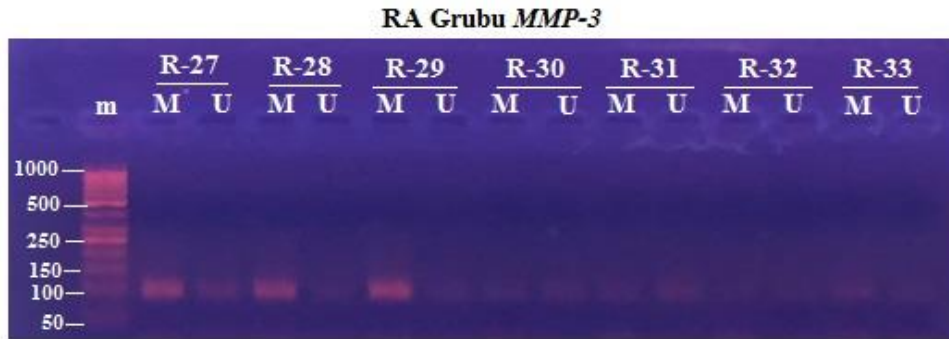
(*m: 50bp marker, M: metile, U: unmetile, MK: pozitif metile kontrol, UK: pozitif unmetile kontrol, R: RA hasta grubu, K: sağlıklı kontrol grubu)



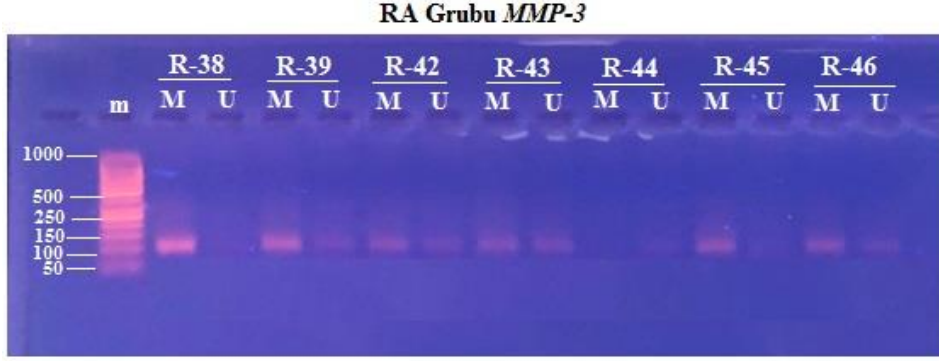
Şekil 13. *IL-16* geni promotör bölge metilasyonunun 47-48, 51 numaralı hasta ve 5-6, 8-9 numaralı kontrollerdeki agaroz jel görüntüsü *



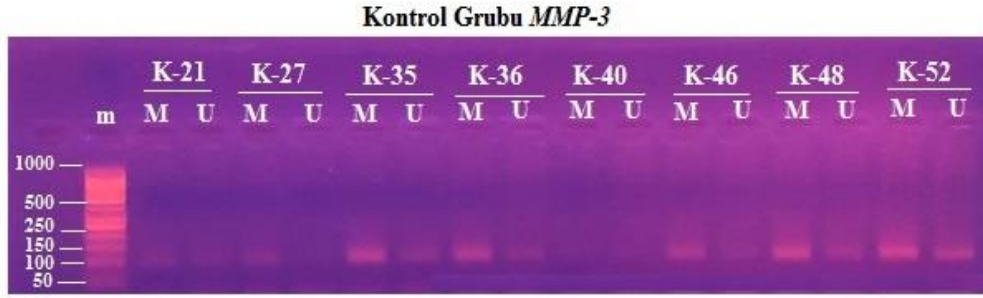
Şekil 14. *MMP-3*geni promotör bölge metilasyonunun 19-22 ve 24-26 numaralı hastalardaki agaroz jel görüntüsü*



Şekil 15. *MMP-3*geni promotör bölge metilasyonunun 27-33 numaralı hastalardaki agaroz jel görüntüsü*
 (***m**: 50bp marker, **M**: metile, **U**: unmetile, **MK**: pozitif metile kontrol, **UK**: pozitif unmetile kontrol, **R**: RA hasta grubu, **K**: sağlıklı kontrol grubu)



Şekil 16. *MMP-3* geni promotör bölge metilasyonunun 38-39 ve 42-46 numaralı hastalardaki agaroz jel görüntüsü *



Şekil 17. *MMP-3* geni promotör bölge metilasyonunun 21, 27, 35-36, 40, 46, 48 ve 52 numaralı kontrollerdeki agaroz jel görüntüsü* (***m**: 50bp marker, **M**: metile, **U**: unmetile, **MK**: pozitif metile kontrol, **UK**: pozitif unmetile kontrol, **R**: RA hasta grubu, **K**: sağlıklı kontrol grubu)

4.3. hsa-miR-93-5p ve hsa-miR-4668-5p ifade düzeyleri

Toplam 41 RA hastasına ve sağlıklı kontrole ait periferik kan örneklerinden izole edilen hsa-miR-93-5p ve hsa-miR-4668-5p mikroRNA'larının ifade düzeyleri kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile analiz edildi. Veri normalizasyonu için endojen kontrol olarak snoRNA-U6 (TaqMan® MicroRNA Assay RNU6B) kullanıldı. qRT-PCR yapıldıktan sonra miRNA ekspresyon düzeyleri, hedef miRNA'ların C_T (cycle threshold) değerlerinin endojen kontrolün C_t değerine normalize edildiği $\Delta\Delta C_T$ (Delta-Delta C_T) metodu kullanılarak belirlendi. Gen ekspresyonundaki rölatif değişimler $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ile hesaplandı. Bu değerlendirme sonucunda, hsa-miR-93-5p ifade düzeyinde gözlenen değişimlere ait sonuçlar Tablo 18'de ve hsa-miR-4668-5p ifade düzeyinde gözlenen değişimlere ait sonuçlar ise Tablo 19'da verilmiştir.

hsa-miR-93-5p'nin ifade düzeyleri kontrol grubunun ifade düzeyleri ile istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.001$). Toplam 41

hastadan 17'sinde miR-93-5p'nin ifade düzeyinde artış ve 23'ünde miR-93-5p'nin ifade düzeyinde azalma gözlemlendi. Birinde ise kontrol grubuna göre farklılık gözlemlenmedi. Hasta grubunda miR-93-5p'nin ifade düzeyinde ortalama 2.28 ± 3.71 kat artış belirlendi. Hasta grubunda miR-93-5p'nin ifade düzeyinde maksimum 14.5 kat artış ve 0.9 kat azalma gözlemlendi.

Tablo 18. RA hastalarında hsa-miR-93-5p ifade düzeyindeki değişimler

	hsa-miR-93-5p			Toplam	<i>p</i> Değeri
	Artma	Azalma	Aynı		
RA Grubu					
Birey Sayısı (n)	17	23	1	41	*<i>p</i><0.001

*One Way ANOVA, n:birey sayısı

hsa-miR-4668-5p'nin ifade düzeyleri kontrol grubunun ifade düzeyleri ile istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.001$). Toplam 41 hastadan 13'ünde miR-4668-5p'nin ifade düzeyinde artış ve 22'sinde miR-4668-5p'nin ifade düzeyinde azalma gözlemlendi. İkisinde ise kontrol grubuna göre farklılık gözlemlenmedi. Hasta grubunda miR-4668-5p'nin ifade düzeyinde ortalama 2.47 ± 4.17 kat artış belirlendi. Hasta grubunda miR-4668-5p'nin ifade düzeyinde maksimum 18.88 kat artış ve 0.91 kat azalma gözlemlendi.

Tablo 19. RA hastalarında hsa- miR-4668-5p ifade düzeyindeki değişimler

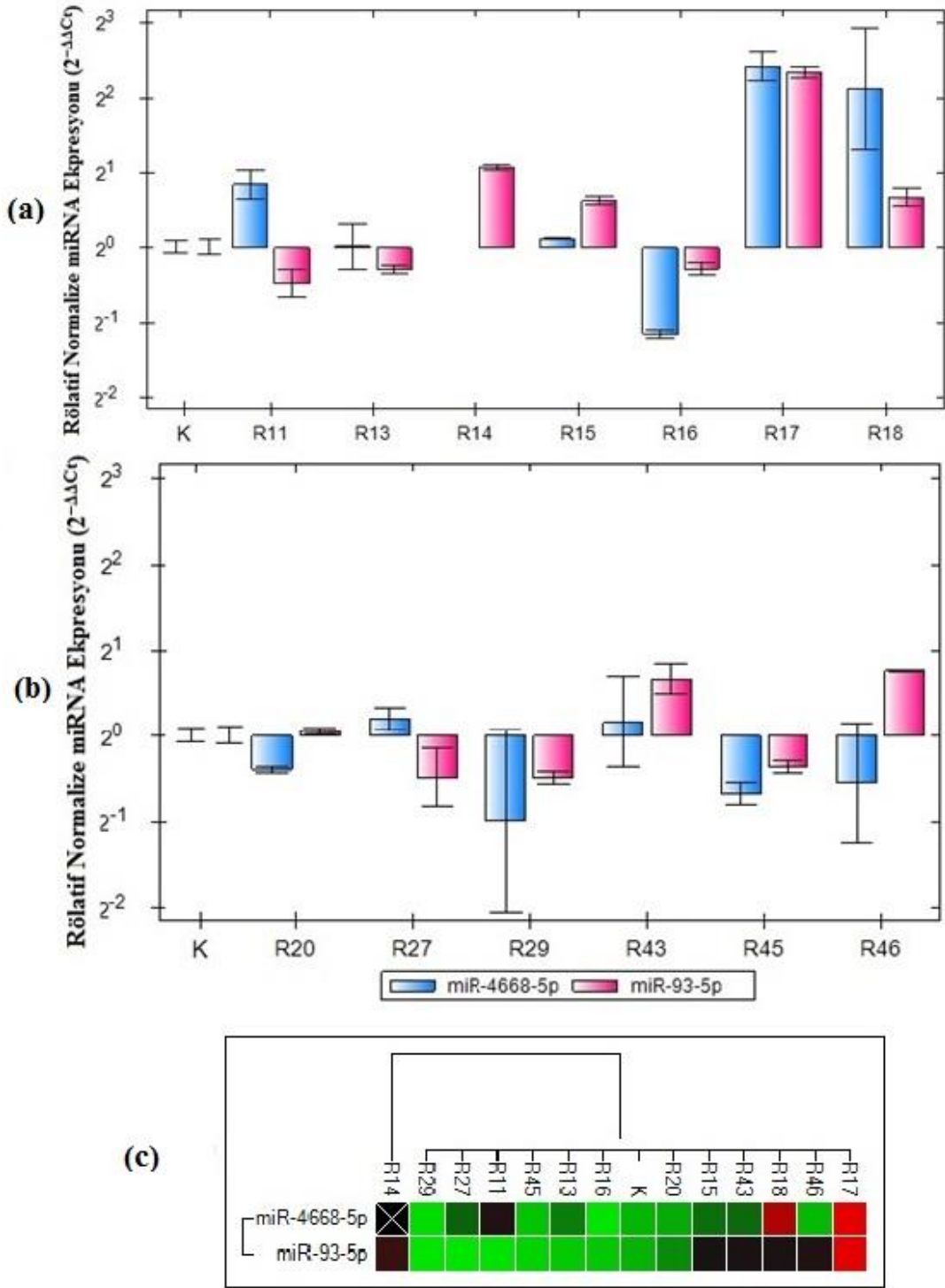
	hsa-miR-4668-5p			Toplam	<i>p</i> Değeri
	Artma	Azalma	Aynı		
RA Grubu					
Birey Sayısı (n)	13	22	2	41	*<i>p</i><0.001

*One Way ANOVA, n:birey sayısı

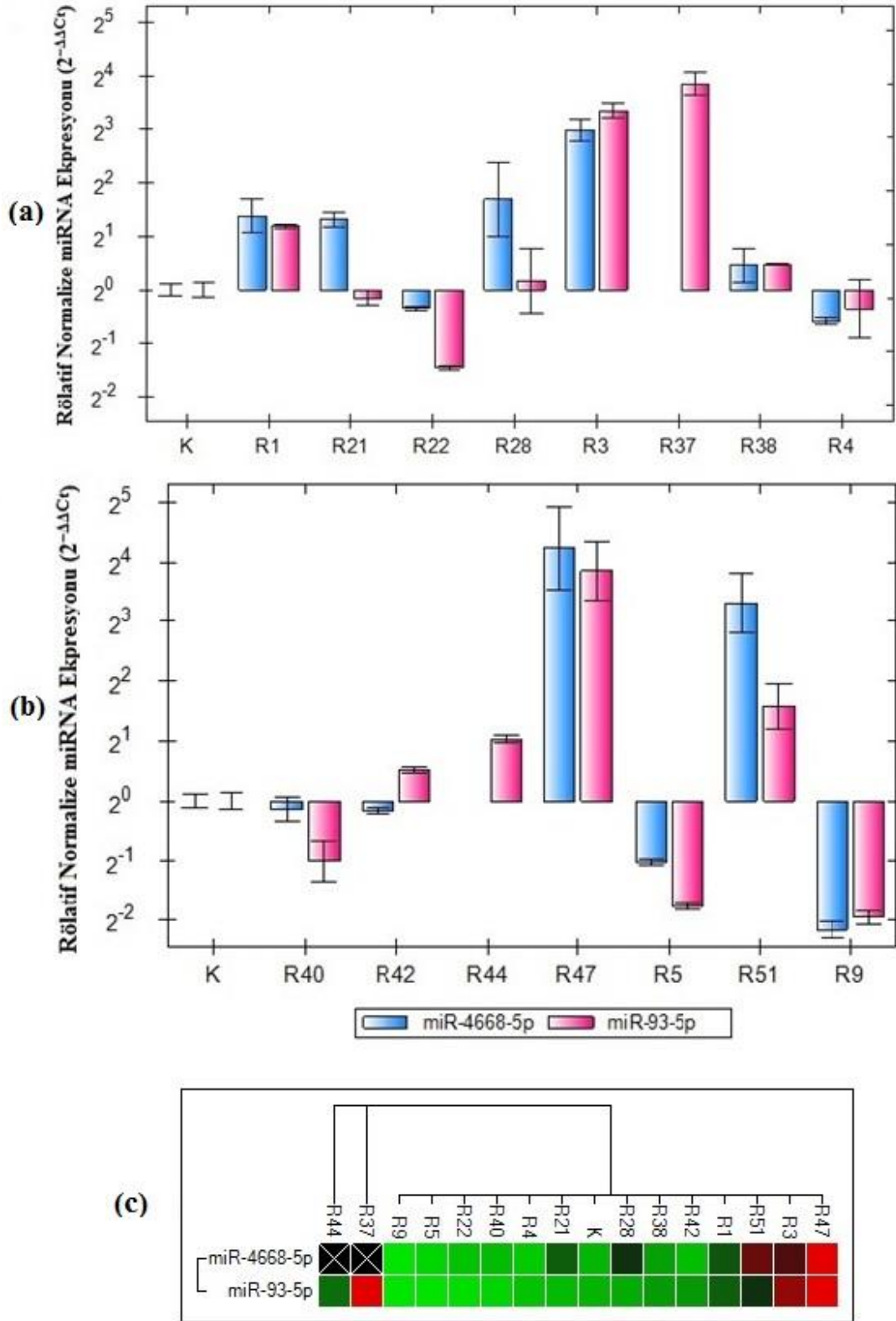
hsa-miR-93-5p ve hsa-miR-4668-5p'nin rölatif normalize ekspresyon kat artışlarını gösteren grafikler Şekil 18-20'de verilmiştir. Bu şekillerdeki bar grafiklerde, mikro-RNA ekspresyonundaki rölatif kat artış ve azalışları gösterilmiştir. Bubar grafiklerin, X-koordinatı ile bağlantısız ve 2^0 değeri temel alınarak çizilmiş olmasının nedeni; rölatif normalize miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin, ' $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ' formülüne göre hesaplanmış olması, böylece, $2^0 = 1$ 'in üstündeki değerlerin,

miRNA gen ifadesindeki artışları, $2^{-1}=0.5$ gibi 1'den küçük değerlerin ise gen ifadesindeki azalmaları göstermesidir. Şekillerdeki clustergram grafiklerde ise, mikro-RNA hedefleri ve farklı RA hastalarına ait örneklerde, normalize ekspresyon seviyelerindeki benzerlik ve farklılıklar hiyerarşik olarak ifade edilmiştir.

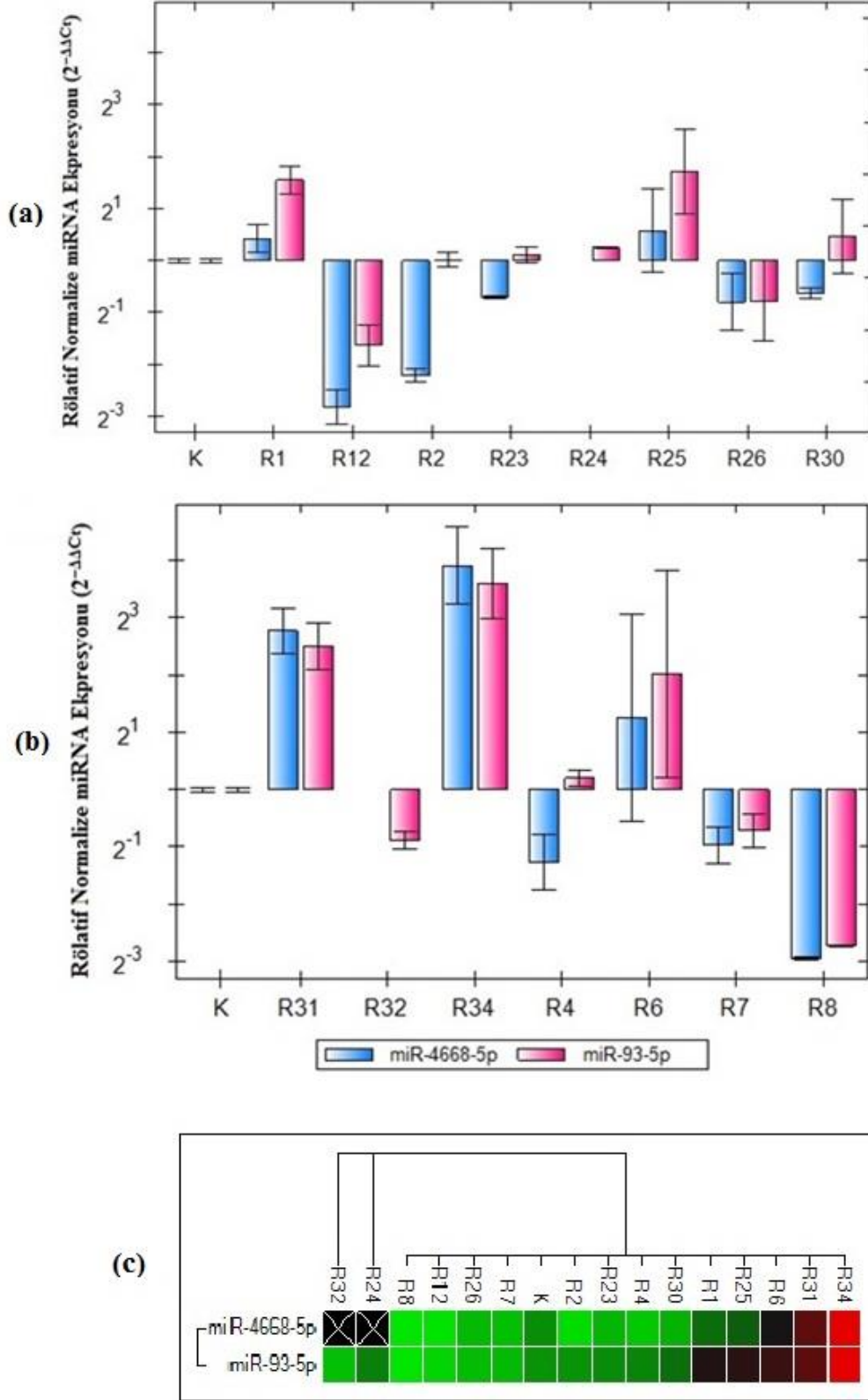




Şekil 18. (a,b) RA hastalarında miR-93-5p ve miR-4668-5p'nin rölative normalize ekspresyonu (**K:** Sağlıklı kontrol, **R:** RA hasta grubu), (c) normalize miRNA ekspresyon seviyelerindeki benzerlik ve farklılıkları ifade eden clustergram grafik (Yüksek normalize ekspresyona sahip örnekler kırmızı, düşük ekspresyon seviyesine sahip olanlar yeşil, ekspresyonunda değişim olmayanlar siyah ve değeri hesaplanmayan örnekler siyah kutu içerisinde 'X' işareti ile gösterilmiştir. Kutulardaki renkler ne kadar açıksa rölative ekspresyon farkı o kadar yüksektir).



Şekil 19. (a,b) RAhastalarında miR-93-5p ve miR-4668-5p'nin rölatif normalize ekspresyonu (c) normalize miRNA ekspresyon seviyelerindeki benzerlik ve farklılıkları ifade eden clustergram grafik



Şekil 20. (a,b) RAhastalarında miR-93-5p ve miR-4668-5p'nin rölatif normalize ekspresyonu (c) normalize miRNA ekspresyon seviyelerindeki benzerlik ve farklılıkları ifade eden clustergram grafik

5. TARTIŞMA

Romatoid artrit en yaygın otoimmün hastalıklardan biridir (Gibofsky, 2014). RA'da eklemlerdeki hasarı ve ileri aşamalarda meydana gelecek bedensel kısıtlamaları engelleyebilmek için erken tanı konulması ve tedaviye olabildiğince erken başlanması çok önemlidir. Tipik semptomları gösteren RA hastaları, hastalığın birinci yılında kolaylıkla teşhis edilebilir. Ancak, çoğu zaman klinik bulgular hastalığın erken evrelerinde belirgin değildir. Bu hastalarda tanı konulduğunda hastalık çok ilerlemiş olabilir (Aletaha ve Smolen, 2011). ACR 2010 kriterlerine göre, RA'nın tanısında, RF ve ACPA otoantikörleri ile akut faz reaktanları olan CRP ve ESR yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan ACPA, RA için daha hassas olmasına rağmen, romatoid faktör RA'ya özgül değildir ve başka hastalıklarda yada sağlıklı bireylerde de bulunabilir (Tuncer ve ark., 2019). Bu durum, hastalık progresyonunun değerlendirilmesinde kullanılan göstergelerdeki sınırlama ve yetersizlikleri de göstermektedir (Aletaha ve Smolen, 2011). RA için kullanılan bu hastalık aktivitesi belirteçleri tamamen artrit için özgül olmadığından, inflamatuvar sitokinler ve yıkıcı enzimler gibi yeni biyobelirteçler belirlenmeye çalışılmıştır (Hamvardzumyan ve ark., 2015).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA'ların dahil olduğu epigenetik mekanizmaların, hastalıklarda etkili olan genetik ve çevresel faktörler ile hastalığın ortaya çıkışı ve ilerlemesi arasındaki ilişkinin anlaşılmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Sitokinlerle ilişkili genlerin epigenetik düzenlenmeye yatkın olduğu da gösterilmiştir. DNA metilasyonundaki farklılıklar, otoimmün hastalıkların gelişimine ve inflamatuvar sitokin seviyelerindeki değişimlere katkıda bulunur. Bu nedenle, otoimmün hastalıklarla ilgili genlerin metilasyon değişimlerinin, potansiyel epigenetik biyobelirteçler olabileceği ileri sürülmüştür (Wang ve ark., 2018).

Çalışmamızda, RA hastalarında ve sağlıklı kontrollerde metilasyon spesifik PZR yöntemi ile *IL-16* ve *MMP-3* genlerinin promotör metilasyonları analiz edildi. Ayrıca, bu genleri hedeflemesi muhtemel mikro-RNA'lardan hsa-miR-93-5p ile hsa-miR-4668-5p'nin ekspresyon düzeyleri de qRT-PZR yöntemi ile tespit edildi. Böylece, RA'nın erken tanısında ve tedavinin değerlendirilmesinde yol gösterici olabilecek biyobelirteçlerin araştırılması amaçlandı.

Yapılan literatür taramaları sonucunda, romatoid artrit hastalarının serumunda *MMP-3* ve *IL-16* seviyelerinin araştırıldığı görülmüştür. Yapılan bu

çalışmada, *MMP-3* ve *IL-16*'nın serum seviyelerinin RA hastalarında, sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında, oldukça yükseldiği anlaşılmıştır (Murota ve ark., 2016). Ancak, bu proteinlerin serum seviyelerinin değişimine neden olan moleküler mekanizmalar henüz tespit edilmemiştir. Bu nedenle, RA'nın gelişmesinde önemli katkısı olan bu proteinlerin genlerinin promotör bölge metilasyonları ve bu genleri hedefleyebilecek hsa-miR-93-5p ile hsa-miR-4668-5p'nin ekspresyon düzeylerinin araştırılması bu tez çalışmasının amacını oluşturdu. *IL-16*, proinflamatuvar bir sitokin olup, yardımcı T lenfositleri (Th), makrofajlar, dendritik hücreler ve eozinofiller üzerindeki CD4'e bağlanarak hücre göç yanıtını uyarır. Böylece, RA'daki sinoviyal inflamasyonda önemli rol alır (McInnes ve Schett, 2011). *MMP-3* ise, proteolitik bir enzim olup, ekstraselüler matriks bileşenlerinin yıkımında rol oynamaktadır. Böylece, *MMP-3*, romatoid artritte eklemlerde meydana gelen inflamasyon ve erozyonda önemli rol alır (Fadda ve ark., 2016). *IL-16* ve *MMP-3* genlerinin promotör metilasyonlarının romatoid artrit ile ilişkisinin olup olmadığını gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmamızda, ilk kez bu genlerin promotör metilasyonlarının RA ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda, *IL-16* geni için metilasyon sıklığı %93.9 (46/49), *MMP-3* geni için ise %75.5 (37/49) olarak tespit edildi. Kontrol grubunda metilasyon sıklığı her iki gen promotörü için de %97.4 (37/38) olarak belirlendi. Hasta ve kontrol grubunda, *IL-16* genlerinin promotör bölge metilasyonları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Hasta grubu ile kontrol grubunun *MMP-3* genlerinin promotör bölge metilasyonları kıyaslandığında, toplam 12 hastanın *MMP-3* promotöründe unmetilasyon tespit edildi ve iki grubun metilasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.004$). Son zamanlarda, *MMP-3* serum seviyelerinin hastalığın aktivitesi ve eklem hasarıyla ilişkisini araştıran bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç (DMARD) tedavisi almamış RA hastalarının, kontrol grubuna göre *MMP-3* serum seviyelerinin önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür (Fadda ve ark., 2016, Tuncer ve ark., 2019). *MMP-3*, RA'da lokal olarak inflamasyonlu eklemlerde üretilir ve kana salınır (Fadda ve ark., 2016). Çalışmamızda, yüksek hastalık aktivitesi bulguları olan hastalara ait periferik kan numunelerinden elde edilen DNA'larda, *MMP-3* genlerinin promotörünün unmetile olduğu bulunmuştur. Literatürde (Fadda ve ark., 2016, Tuncer ve ark., 2019) tespit edilen *MMP-3* serum seviyesindeki artışların, bizim çalışmamız ile belirlenen *MMP-3* gen promotörünün unmetilasyonu sonucunda, genin ifade

düzeyindeki anormal artış ile uyumlu olabileceğini düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışma sonucunda, *IL-16* promotör metilasyonu açısından kontrol grubu ile hasta grubu arasında farklı bir metilasyon durumu gözlenmedi. Hastaların ve kontrollerin çoğunluğunda *IL-16* promotörünün metilenmiş olduğu tespit edildi. Ancak, metilasyon spesifik PZR (MS-PZR) sonrası yapılan agaroz jel elektroforezi ile bazı hastalarda, hem metile hem unmetile primerlerle yapılan MS-PZR sonucunda bant gözlemlendi. Bu, *IL-16*'nın bir sitokin olması ile ilişkili olabilir. Çünkü enzimlerin aksine, sitokinlerin, klinik bulgulardaki değişikliklere daha hızlı yanıt verdiği tespit edilmiştir (Nishimoto ve ark., 2008). Her ne kadar hem serum hem sinoviyal sıvıda bulunsa da, *IL-16* seviyesi esas olarak RA hastalarında sinoviyal sıvıda yükselmektedir. Çalışmamız sonucunda, *IL-16* promotör metilasyonu açısından, hastalarda kontrollerden farklı bir durum gözlenmemiştir. Bu durum, çalışmamızda, periferik kan örneklerinin kullanılması ile de ilgili olabilir. RA hastalarının sinoviyal fibroblastlarında yapılacak çalışmalarda farklı sonuçlar gözlenebilir, çünkü epigenetik düzenlenmeler ile dokuya özgül gen ifadesi farklılıkları meydana gelmektedir. Bu çalışmada, henüz sinoviyal inflamasyon başlamamışken hem *IL-16*, hem de *MMP-3*'ün metilasyon durumlarında değişiklik olup olmadığını araştırmak amacıyla kan örnekleri ile çalışılmıştır.

Son yıllarda, RA'nın tedavisinde önemli yaklaşımlara yer verilmiştir. Etkin DMARD tedavisi ile hastalığın ilerlemesi yavaşlatılmış ve eklem hasarı önlenmiştir. Yeni tedavi ajanları bulunmasına rağmen, metotreksat (MTX), tedavi başlangıcında tercih edilen temel ilaç olmuştur (Brown ve ark., 2016). MTX, dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe eden bir antifolat ajan olarak geliştirilmiştir (Gubner ve ark., 1951) ve ilk başlarda lösemi tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmıştır. Daha sonra, düşük dozlarda RA tedavisinde oldukça etki sağladığı bulunmuştur (Lopez-Olivo ve ark., 2014). MTX'in RA'daki etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, adenozin sinyalizasyonu (T lenfositlerinin aktivasyonu ve proliferasyonunun baskılanması) ile ya da metil grubu donörü işlevi yapması ile etki ettiği ileri sürülmüştür (Brown ve ark., 2016). MTX, modifiye bir folat formudur ve metil donorü olarak işlev yapabilir. Sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında, RA hastalarının global DNA hipometilasyonuna sahip oldukları ve DNA metilasyonunun, MTX kullanımı sonucunda geri dönüştüğü ortaya konmuştur (Kim ve ark., 1996). RA hastalarına uygulanan MTX tedavisi, eklemlerdeki inflamasyonu azaltır. Eklem hasarının son araçları olan MMP'ler üzerine MTX'in etkilerinin araştırıldığı bir çalışma ile, erken evre RA

hastalarının, tedaviden önceki MMP1, MMP3, MMP9 ve MMP13 serum seviyelerinin, 6 aylık MTX tedavisinden sonra önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Fiedorczyk ve ark., 2006). Araştırma sonuçları, tek bir doz MTX'in bile proinflamatuvar sitokinlerin üretimini engelleyebildiğini göstermiştir (Barrera ve ark., 1995). MTX'in RA'daki etkisini gösteren sonuçlar, MTX'in, proinflamatuvar sitokinlerin ve matriks metalloproteinazların üretimini baskıladığını göstermiştir. Çalışmamızda, MTX tedavisi gören hastalarda *MMP-3* ve *IL-16* genlerinin promotörlerinin metile olduğunun tespit edilmesi, bu genlerin promotör metilasyonlarının, tedavinin değerlendirilmesinde önemli biyobelirteçler olabileceğini düşündürmüştür.

RA için özgül olabilecek serum biyobelirteçlerinin araştırıldığı bir çalışma ile hasta ve kontrollerde karşılaştırmalı proteomiks analizi yapılarak, 1128 serum proteini analiz edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, serumda, RA ile en yüksek ilişkiye sahip olanların *IL-16* ve *MMP-3* olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca, MTX-naive ve MTX-IR (MTX'e yetersiz yanıt gösteren) hastalarda erken tedavi aşamalarındaki klinik yanıtla ilişkili olarak *IL-16*'nın, *MMP-3*, CRP ve ESR'den daha etkin bir klinik parametre olduğu tespit edilmiştir (Murota ve ark., 2016). Başka bir çalışma sonucunda, *MMP-3*'ün klinik yanıtla ilişkisinin tedaviden yaklaşık 20 hafta sonra olduğu anlaşılmıştır (Kaneko ve ark., 2012). Bu literatür verileri, romatoid artrit ile *IL-16* serum seviyesinin, *MMP-3*'ten daha fazla ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, çalışmamızda da, RA hasta grubunda CRP ($r=0.239$, $p=0.098$) serum seviyesi ile hastalık aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ancak, hasta grubunda, ESR ve DAS28 skorları arasında pozitif bir korelasyon bulundu ($r=0.578$, $p=0.005$). Orta ve yüksek hastalık aktivitesine sahip bireylerin yüksek ESR değerine sahip olduğu, remisyon ve düşük hastalık aktivitesi gösteren bireylerin ise normal ESR değerine sahip olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda, *IL-16* ve *MMP-3* serum seviyeleri ölçülmemiştir, bu genlerin promotör metilasyonları araştırılmıştır. Ancak, çalışmamızda *MMP-3* geninin promotörününün metilasyonu açısından, hasta ve kontrol grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir. *IL-16* geninin promotör metilasyonu açısından ise iki grup arasında fark bulunmamıştır. Hasta grubunun *MMP-3* geni promotöründeki unmetilasyonların, bu genin aşırı ifadesine neden olarak serum seviyesinin artmasına neden olabileceğini düşündüğümüzde, Murota ve arkadaşlarının (2016) sonuçlarının aksine, *MMP-3*'ün *IL-16*, ESR ve CRP'den daha etkili bir biyobelirteç olabileceğini düşünmekteyiz.

MikroRNA'lar üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, mikroRNA'ların kan dolaşımında oldukça stabil oldukları ve *in vitro* koşullarda uzun süre degradasyona uğramadan korunabileceği tespit edilmiştir. Bu da miRNA'ların yeni bir serum belirteci olarak pek çok hastalıkta kullanıma uygun olduklarını göstermiştir (Shen ve ark., 2012). Kan dolaşımında bulunan miRNA'ların farklı hastalıklarda farklı şekilde ekspresyon gösterdikleri belirlenmiştir. Bazı miRNA'ların ekspresyonunda artma görülürken, bazılarında azalma görülmüştür. Ekspresyon seviyelerindeki bu farklılıkların, miRNA'ların görev aldıkları ve düzenledikleri yollara göre değişiklik gösterdiği anlaşılmıştır (Zhang ve ark., 2018). Son yıllarda RA için yapılan çalışmalarda, RA hastalarının dolaşımdaki miRNA ekspresyonlarında değişiklikler olduğu anlaşılmıştır. Periferik kan mononükleer hücrelerinde, T lenfositlerinde, sinoviyal fibroblastlarda ve osteoklastlarda miRNA ekspresyonlarındaki anormal değişimlerin, inflamasyona ve ekstraselüler matrisin yıkımına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Murata ve ark., 2013).

Çalışmamızda, RA'da *MMP-3* genini ve *IL-16* genini hedeflediği öngörülen miR-93-5p ve miR-4668-5p'nin ekspresyon düzeyleri qRT-PZR yöntemi ile belirlendi. Bu çalışmada, endojen kontrol olarak U6 snoRNA kullanıldı. Bu çalışma sonucunda, miR-93-5p'nin ifade düzeylerinde, kontrole göre, anlamlı bir fark tespit edildi ($p < 0.001$). Toplam 41 hastadan 17'sinde miR-93-5p'nin ifade düzeyinde artma ve 23'ünde miR-93-5p'nin ifade düzeyinde azalma tespit edildi. Birinde ise kontrole göre farklılık gözlenmedi. miR-4668-5p'nin ifade düzeylerinde de, kontrole göre, anlamlı bir fark tespit edildi ($p < 0.001$). Toplam 41 hastadan 13'ünde miR-4668-5p'nin ifade düzeyinde artma ve 22'sinde miR-4668-5p'nin ifade düzeyinde azalma gözlendi. İkisinde ise kontrole göre farklılık gözlenmedi. Yapılan literatür araştırmasında, miR-93-5p yada miR-4668-5p'nin ekspresyon düzeylerinin RA ile ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle, çalışmamız, miR-93-5p ve miR-4668-5p'nin ekspresyon düzeylerinin RA ile ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışma olmuştur. Dolayısıyla, çalışmamızın sonuçları, literatür bilgisi ile tartışılmamıştır. Ancak, bazı kanser tiplerinde miR-93 ekspresyonu bulunmuştur ve böylece, bunun onkogenik bir rolü olabileceği düşünülmüştür. Meme kanseri hastalarında, miR-93 ekspresyonundaki artışın, proliferasyon ve tümör progresyonu ile ilişkilendirildiği vurgulanmıştır. Yapılan bir çalışmada, meme kanseri hastalarında, miR-93-5p'nin hücre adezyon moleküllerinden olan Vimentin ve N-kaderinin ekspresyonunu azalttığı ve E-kaderinin

ekspresyonunu ise artırdığı gösterilmiştir. Hücre adezyon molekülleri, kanser hücrelerinin metastazında çok önemli rol oynamaktadırlar. miR-93-5p'nin hücre adezyon molekülleri üzerine etkili olması kanser hücrelerinin hareketliliğini ve metastazını engellemiştir (Xiang ve ark., 2017). Çalışmamız sonucunda, hem miR-93-5p, hem de miR-4668-5p'nin ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, genellikle yüksek hastalık aktivitesine sahip olan hastalarda miR-93-5p ve miR-4668-5p'nin ekspresyonlarında azalma olduğu görüldü. Düşük hastalık aktivitesine sahip olan hastalarda ise miR-93-5p ve miR-4668-5p'nin ekspresyonlarında önemli seviyede artış tespit edildi. Bu nedenle, çalışmamızda incelenen RA hastalarında, miR-93-5p ve miR-4668-5p'nin ekspresyonundakı bu artışın, miR-93-5p'nin meme kanserindeki baskılayıcı etkisiyle benzer şekilde (Xiang ve ark., 2017), inflamasyonu baskılayıcı bir etki gösterebileceği düşünülmüştür. RA hastalarında, miR-4668-5p'yi araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız, bu konuda yapılan ilk araştırma olmuştur. Bu nedenle, çalışmamızın sonuçları, literatür bilgisi ile tartışılmamıştır. miR-4668 ile ilgili olarak yalnızca ultra korunmuş RNA elementleri (ucRNA'lar) ve hepatik lipit birikimi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmıştır. Guo ve arkadaşları (2018) yapılan bu çalışmanın sonucuna göre, uzun kodlama yapmayan RNA'ların (lncRNA) bir sınıfı olan ucRNA'lardan uc.372'nin pri-miR-195/pri-miR-4668'in olgunlaşmasını baskılayarak lipit senteziyle ilişkili genlerin ekspresyonlarını düzenlediği ve karaciğer yağlanmasına neden olduğu saptanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmayla, ilk kez RA ile miR-4668-5p'nin ilişkisi tespit edilmiştir ve inflamasyonda bir rolü olabileceği düşünülmüştür. Stanczyk ve arkadaşları (2008), RA sinoviyal fibroblastlarında miR-155'in ekspresyonu ile MMP-3'ün doğrudan baskılandığını tespit etmiştir. Ayrıca, RA'da periferik kan mononükleer hücrelerinde, sinoviyal fibroblastlarda, sinoviyal dokuda ve sinoviyal sıvı monositlerinde miR-155 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda ise henüz tedavi görmemiş hastalarda *MMP-3* promotoründe unmetilasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, araştırılan mikroRNA'ların *MMP-3* metilasyonu ile ilişkili olabileceğine dair kanıtlar elde edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz çalışmada, öncelikle romatoid artrit patogenezinde etkili olabileceğini düşündüğümüz *MMP-3* ve *IL-16* genleri ve bu genleri hedefleyebileceğini öngördüğümüz mikroRNA'lerden miR-93-5p ile miR-4668-5p tespit edildi. Daha sonra, RA hastalarında ve sağlıklı kontrollerde *MMP-3* ve *IL-16* genlerinin promotör metilasyon durumlarının belirlenmesi ve miR-93-5p ile miR-4668-5p'nin ifade düzeylerinin analiz edilmesi amaçlandı. Çalışmamız sonucunda, RA hastaları ile sağlıklı kontrollerin *MMP-3* genlerinin promotör metilasyonları arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p=0.004$). *IL-16* geninin promotör metilasyonları açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı. RA hasta grubunda CRP, ACPA ve RF ile hastalık aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ancak, hasta grubunda, ESR ve DAS28 skorları arasında pozitif bir ilişki bulundu ($r=0.578$, $p=0.005$). Orta ve yüksek hastalık aktivitesine sahip bireylerin yüksek ESR değerine sahip olduğu, remisyon ve düşük hastalık aktivitesi gösteren bireylerin ise normal ESR değerine sahip olduğu gözlemlendi. RA hastalarının miR-93-5p ile miR-4668-5p'sinin ifade düzeyleri, kontrol grubunun verileri ile kıyaslandığında, iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Hastaların miR-93-5p ile miR-4668-5p mikroRNA'larının ifade düzeylerinde anormal artışlar ve azalmalar tespit edildi.

Çalışmamızda, promotör metilasyon analizleri yapılan *MMP-3* ile *IL-16*'nın, RA hastalarının sinoviyal sıvılarındaki hücrelerde daha yüksek düzeyde ifade edildiği bilinmektedir. Ancak, periferik kan lenfositleri ile yapılan çalışmalar ile *MMP-3*'ün dolaşımdaki ifade düzeylerinin de belirleyici olabileceği ileri sürülmüştür. Periferik kan lenfositleriyle yaptığımız çalışmada, RA hastalarının kan örnekleriyle yapılacak metilasyon çalışmaları için *MMP-3*'ün belirleyici özelliğe sahip olabileceği görülmüştür. Ancak, *IL-16* için yapılacak çalışmalarda sinoviyal hücrelerin çalışılması daha uygun olabilecektir. Bunun yanı sıra, miR-93-5p ile miR-4668-5p'nin ifade düzeylerindeki değişimleri kan örneklerinden tespit etmenin kolay olduğu da anlaşılmıştır. RA tanısı için kanda tespit edilebilir biyobelirteçlerin bulunması dikkate alınarak, sinoviyal dokudan örnek alınması yerine, hastaya daha az acı veren bir yöntem olan kan örneklerinin alınmasının pratikliği de düşünülerek, kan örnekleri tercih edilebilir.

Çalışmamızda periferik kandan yapılan metilasyon ve mikroRNA gen ifadesinin değerlendirilmesinin yanı sıra, sinoviyal sıvıdaki sinoviyal fibroblast

hücreleri, farklı doku hücreleri ve RA hayvan modellerinin de çalışması gerekmektedir. Böylece, mevcut çalışmamızın sonuçları gibi, farklı doku hücrelerinin RA ile ilişkisi değerlendirilmelidir. RA hastaları ve sağlıklı kontroller üzerinde yaptığımız *MMP-3* ile *IL-16*'nın promotör metilasyonları ve miR-93-5p ve miR-4668-5p'nin ifade düzeyleriyle ilgili çalışma, gelecekte daha büyük RA popülasyonlarında yapılarak desteklenmelidir. İleride yapılacak benzer çalışmaların destekleyici sonuçları, *MMP-3* promotör metilasyonundaki değişikliklerin ve miR-93-5p ile miR-4668-5p'nin ifade düzeylerindeki farklılıkların, RA'nın prognozu için özgül biyobelirteçler olarak kullanılmasına imkan verecektir. Mevcut çalışma ile elde edilen sonuçlar, ilerde RA ile ilgili olarak yapılacak başka çalışmalara, hücrel tedavilerin geliştirilmesine ve RA'da etkili olan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına öncülük edecektir.

KAYNAKLAR

- Ai R, Whitaker JW, Boyle DL, Tak PP, Gerlag DM, Wang W, Firestein GS. DNA methylome signature in synoviocytes from patients with early rheumatoid arthritis compared to synoviocytes from patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2015; 67(7): 1978-1980.
- Akar S, Akkoç N. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2006;2(25): 1-6.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis & Rheumatism* 2010;62(9): 2569-2581.
- Aletaha D, Smolen JS. Joint damage in rheumatoid arthritis progresses in remission according to the Disease Activity Score in 28 joints and is driven by residual swollen joints. *Arthritis Rheum* 2011;63(12): 3702-3711.
- Araki Y, Mimura T. The mechanisms underlying chronic inflammation in rheumatoid arthritis from the perspective of the epigenetic landscape. *Journal of Immunology Research* 2016: 1-11.
- Araki Y, Mimura T. The histone modification code in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Mediators of Inflammation* 2017: 1-13.
- Barhum L. Osteoarthritis vs. Rheumatoid Arthritis – Understanding the Differences. <https://www.news-medical.net/health/Osteoarthritis-vs-Rheumatoid-Arthritis-e28093-Understanding-the-Differences.aspx>. Erişim tarihi: 20.05.2019.
- Barrera P, Haagsma CJ, Boerbooms AM, Van Riel PLCM, Borm GF, Van De Putte LBA, van der Meer JW. Effect of methotrexate alone or in combination with sulphasalazine on the production and circulating concentrations of cytokines and their antagonists. Longitudinal evaluation in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1995;34(8): 747-755.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes & Development* 2009; 23(7): 781-783.
- Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saldenber-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *Journal of Autoimmunity* 2012; 39(3): 222-228.
- Bresnihan B. Preventing joint damage as the best measure of biologic drug therapy. *J Rheumatol* 2002;29 Suppl 65:39-43.
- Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nature Reviews Rheumatology* 2016; 12(12): 731.

- Campos K, Gomes CC, Farias LC, Silva RM, Letra A, Gomez RS. DNA methylation of MMP9 is associated with high levels of MMP-9 messenger RNA in periapical inflammatory lesions. *Journal of Endodontics* 2016; 42(1): 127-130.
- Cansın G, Peynircioğlu BB. DNA metilasyonu ve hastalıklarla ilişkisi. *ACU Sağlık Bil Derg* 2016(2): 61-68.
- Costello JF, Plass C. Methylation matters. *Journal of Medical Genetics* 2001;38(5):285-303.
- Fadda S, Abolkheir E, Afifi R, Gamal M. Serum matrix metalloproteinase-3 in rheumatoid arthritis patients: Correlation with disease activity and joint destruction. *The Egyptian Rheumatologist* 2016; 38(3): 153-159.
- Fiedorczyk M, Klimiuk PA, Sierakowski S, Gindzienska-Sieskiewicz E, Chwiecko J. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with early rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2006; 33(8): 1523-1529.
- Firestein GS. Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: The intersection of genetics and epigenetics. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2018;129: 171–182.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 1992; 89(5): 1827-1831.
- Garrod AB. The nature and treatment of gout, and rheumatic gout. Longmans & Company 1876.
- Gibofsky A. Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis: A Synopsis. *The American Journal of Managed Care* 2014; 20(7 Suppl): 128-35.
- Glant TT, Besenyei T, Kádár A, Kurkó J, Trynieszewska B, Gál J, et al. Differentially expressed epigenome modifiers, including aurora kinases A and B, in immune cells in rheumatoid arthritis in humans and mouse models. *Arthritis & Rheumatism* 2013;65(7): 1725-1735.
- Glant TT, Mikecz K, Rauch TA. Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *BMC Medicine* 2014;12(1): 35.
- Glossop JR, Emes RD, Nixon NB, et al. Genome-wide DNA methylation profiling in rheumatoid arthritis identifies disease-associated methylation changes that are distinct to individual T- and B-lymphocyte populations. *Epigenetics* 2014; 9(9): 1228-1237.

- Golbabapour S, Abdulla MA, Hajrezaei M. A concise review on epigenetic regulation: insight into molecular mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 2011;12(12): 8661-8694.
- Gubner R, August S, Ginsberg V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am J Med Sci* 1951;221: 176–182.
- Guo J, Fang W, Sun L, Lu Y, Dou L, Huang X, et al. Ultraconserved element uc. 372 drives hepatic lipid accumulation by suppressing miR-195/miR4668 maturation. *Nature Communications* 2018;9(1): 612.
- Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2007;27(5): 763-767.
- Hall MM. Late stages of rheumatoid arthritis. <https://viewthegoals.com/late-stages-of-rheumatoid-arthritis/medications-and-treatments>. Erişim tarihi: 15.01.2019
- Hambardzumyan K, Bolce R, Saevarsdottir S, et al. Pretreatment multi-biomarker disease activity score and radiographic progression in early RA: Results from the SWEFOT trial. *Ann Rheum Dis* 2015;74(6): 1102–1109.
- Hausser J, Zavolan M. Identification and consequences of miRNA–target interactions–beyond repression of gene expression. *Nature Reviews Genetics* 2014;15(9): 599.
- Hazlewood GS, Barnabe C, Tomlinson G, Marshall D, Devoe DJ, Bombardier C. Methotrexate monotherapy and methotrexate combination therapy with traditional and biologic disease modifying anti-rheumatic drugs for rheumatoid arthritis: A network meta-analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016;(8).
- Janson PC, Linton LB, Bergman EA, Marits P, Eberhardson M, Piehl F, et al. Profiling of CD4+ T cells with epigenetic immune lineage analysis. *The Journal of Immunology* 2011;186(1): 92-102.
- Kaneko A, Kida D, Saito K, Tsukamoto M, Sato T. Clinical results for tocilizumab over one year in the clinical setting as assessed by CDAI (clinical disease activity index): CRP at week 12 and MMP-3 at week 24 are predictive factors for CDAI. *Rheumatology International* 2012;32(11): 3631-3637.
- Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M. Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Nature Reviews Rheumatology* 2009;5(5): 266.
- Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M. Increased recycling of polyamines is associated with global DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2012;64: 1809–1817.
- Kennedy A, Schmidt EM, Cribbs AP, Penn H, Amjadi P, Syed K, et al. A novel upstream enhancer of FOXP3, sensitive to methylation-induced silencing, exhibits

- dysregulated methylation in rheumatoid arthritis Treg cells. *European Journal of Immunology* 2014;44(10): 2968-2978.
- Kim YI, Logan JW, Mason JB, Roubenoff R. DNA hypomethylation in inflammatory arthritis: reversal with methotrexate. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1996;128(2): 165-172.
- Klein K, Gay S. Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Current Opinion In Rheumatology* 2015;27(1): 76-82.
- Koenders MI, van den Berg WB. Novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Trends in Pharmacological Sciences* 2015;36(4): 189-195.
- Kyburz D, Emmanuel K, Caroline O. Epigenetic changes: the missing link. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2014;28(4): 577-587.
- Landre-Beauvais AJ. The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text of the doctoral dissertation presented in 1800 (2001): 130-143.
- Lee HS, Ka SO, Lee SM, Lee SI, Park JW, Park BH. Overexpression of sirtuin 6 suppresses inflammatory responses and bone destruction in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2013;65(7): 1776-1785.
- Li D, Zhou Q, Hu G, Wang G. MiRNA-506 inhibits rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes proliferation and induces apoptosis by targeting TLR4. *Bioscience Reports* 2019;39(5).
- Liao J, Liang G, Xie S, Zhao H, Zuo X, Li F, et al. CD40L demethylation in CD4+ T cells from women with rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology* 2012;145(1): 13-18.
- Liu CC, Fang TJ, Ou TT, Wu CC, Li RN, Lin YC, et al. Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunology Letters* 2011;135(1-2): 96-99.
- Liu J, Fei D, Xing J, Du J. MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;96: 173-181.
- Long L, Yu P, Liu Y, Wang S, Li R, Shi J, et al. Upregulated microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells and fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Clinical and Developmental Immunology* 2013.
- Lopez-Olivo MA, Siddhanamatha HR, Shea B, Tugwell P, Wells GA, Suarez-Almazor ME. Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014;6.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a

- systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 2012;380(9859): 2095-2128.
- Luo M, Li Z, Wang W, Zeng Y, Liu Z, Qiu J. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Letters* 2013;333(2): 213-221.
- Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *The American Journal of Medicine*, 2007;120(11): 936-939.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* 2011;365(23): 2205-2219.
- Miranda-Carús ME, Balsa A, Benito-Miguel M, de Ayala CP, Martín-Mola E. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate. *The Journal of Immunology* 2004;173(2): 1463-1476.
- Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, Nakamura T. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2010;12(3):86.
- Murata K, Furu M, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Hashimoto M, et al. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. *PloS One* 2013;8(7): 69118.
- Murota A, Suzuki K, Kassai Y, Miyazaki T, Morita R, Kondo Y, et al. Serum proteomic analysis identifies interleukin 16 as a biomarker for clinical response during early treatment of rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2016;78: 87-93.
- My Health. Rheumatoid arthritis. Erişim tarihi: 15.01.2019
<https://myhealth.alberta.ca/Health/pages/conditions.aspx?hwid=zm6061>.
- Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Annals of The Rheumatic Diseases* 2013;72(1): 110-117.
- Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2008;58(9): 2686-2693.
- Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 2008;112(10): 3959-3964.
- Özsoy MH, Altinel L, Başarır K, Çavuşoğlu AT, Dinçel VE. Romatoid artritte eklem hastalığının patogenezi. *TOTBID Dergisi* 2006;3: 101-110.


- Paira S, Roverano S, Rillo O, Barrionuevo A, Mahieu S, Millen N. Cytidine deaminase in polymyalgia rheumatica and elderly onset rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* 2005;24(5): 460-463.
- Paget SA, Lockshin MD, Loebel S. *The Hospital for Special Surgery Rheumatoid Arthritis Handbook Everything You Need to Know*. New York: John Wiley & Sons 2002:32. ISBN 9780471223344.
- Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 2012;13(4): 271-82.
- Petronis A. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature* 2010;465(7299): 721.
- Picascia A, Grimaldi V, Pignalosa O, De Pascale MR, Schiano C, Napoli C. Epigenetic control of autoimmune diseases: from bench to bedside. *Clinical Immunology* 2015;157(1): 1-15.
- Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1–C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis—a genomewide study. *New England Journal of Medicine* 2007; 357(12): 1199-1209.
- Rachmilewitz J, Elkin M, Rosensaft J, Gelman-Kohan Z, Ariel I, Lustig O, et al. H19 expression and tumorigenicity of choriocarcinoma derived cell lines. *Oncogene* 1995;11(5): 863-870.
- Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HTT. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroentero* 2013;19(20): 2985-96.
- Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nature Reviews Genetics* 2011;12(8): 529.
- Richardson B. Effect of an inhibitor of DNA methylation on T cells. II. 5-Azacytidine induces self-reactivity in antigen-specific T4+ cells. *Human Immunology* 1986;17(4): 456-470.
- Rothschild BM. Tennessee Origins of Rheumatoid Arthritis <https://mcclungmuseum.utk.edu/1991/04/01/tennessee-origins-of-rheumatoid-arthritis>. Erişim tarihi: 20.02.2019.
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis, Seminar. *Lancet* 2010;376: 1094-1108.
- Shen N, Liang D, Tang Y, De Vries N, Tak PP. MicroRNAs—novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Nature Reviews Rheumatology* 2012;8(12): 701.
- Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WER. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Rheumatology* 1993;32(10): 903-907.

- Singh JG, Latif ZP, Raza K. Symptoms in individuals at risk of rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2017; 31(1): 59-70.
- Skundric DS, Zhou W, Cruikshank WW, Dai R. Increased levels of bioactive IL-16 correlate with disease activity during relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun* 2005;25:206-214.
- Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Annals of The Rheumatic Diseases* 2010;69(6): 964-975.
- Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Annals of The Rheumatic Diseases* 2016;75(1): 3-15.
- Stanczyk J, Pedrioli DML, Brentano F, Sanchez-Pernaut O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2008;58(4): 1001-1009.
- Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, Filer A, Raza K, Kolling C, et al. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis & Rheumatism* 2011;63(2): 373-381.
- Stuhlmüller B, Kunisch E, Franz J, Martinez-Gamboa L, Hernandez MM, Pruss A, et al. Detection of oncofetal h19 RNA in rheumatoid arthritis synovial tissue. *The American Journal of Pathology* 2003;163(3): 901-911.
- Svendsen AJ, Gervin K, Lyle R, Christiansen L, Kyvik K, Junker P, et al. Differentially methylated DNA regions in monozygotic twin pairs discordant for rheumatoid arthritis: an epigenome-wide study. *Frontiers in Immunology* 2016;7: 510.
- Tirado-Magallanes R, Rebbani K, Lim R, Pradhan S, Benoukraf T. Whole genome DNA methylation: beyond genes silencing. *Oncotarget* 2017;8(3): 5629.
- Tuncer T, Kaya A, Gulkesen A, Kal GA, Kaman D, Akgol G. Matrix metalloproteinase-3 levels in relation to disease activity and radiological progression in rheumatoid arthritis. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2019:1-6.
- Viatte S, Darren P, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2013;9(3): 141.
- Visentin M, Zhao R, Goldman ID. The antifolates. *Hematology/Oncology Clinics* 2012; 26(3): 629-648.
- Wang X, Lei D, Ding J, Liu S, Tao L, Zhang F, et al. A DNA-Methylated Sight on Autoimmune Inflammation Network across RA, pSS, and SLE. *Journal of Immunology Research* 2018.

- Wu J, Fan W, Ma L, Geng X. miR-708-5p promotes fibroblast-like synoviocytes' cell apoptosis and ameliorates rheumatoid arthritis by the inhibition of Wnt3a/ β -catenin pathway. *Drug Design Development and Therapy* 2018;12: 3439.
- Xiang Y, Liao XH, Yu CX, Yao A, Qin H, Li JP, et al. MiR-93-5p inhibits the EMT of breast cancer cells via targeting MKL-1 and STAT3. *Experimental Cell Research* 2017;357(1): 135-144.
- Xu JZ, Wang YF, Tan XR, Jing HJ. MicroRNAs in autophagy and their emerging roles in crosstalk with apoptosis. *Autophagy* 2012;8(6): 873-82.
- Zhang Z, Zhang R. Epigenetics in autoimmune diseases: pathogenesis and prospects for therapy. *Autoimmunity Reviews* 2015;14(10): 854-863.
- Zhang H, Huang X, Ye L, Guo G, Li X, Chen C, et al. B cell-related circulating microRNAs with the potential value of biomarkers in the differential diagnosis, and distinguishment between the disease activity and lupus nephritis for SLE. *Frontiers in Immunology* 2018;9: 1473.
- Zhao M, Wang Z, Yung S, Lu Q. Epigenetic dynamics in immunity and autoimmunity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2015;67: 65-74.

EKLER

Ek 1.Etik Kurul Raporu



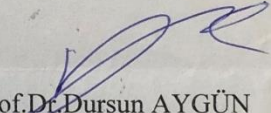
T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/455-546 15.11.2016

Sayın Öğr.Gör.Dr. Şengül TURAL

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Romatoid Artrit'te Potansiyel Biyomarker Olabilecek Epigenetik Değişikliklerin İncelenmesi** başlıklı OMÜ KAEK 2016/300 Karar nolu Genetik çalışma+ Biyokimya çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 29.09.2016 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.



Prof.Dr.Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

Romatoid Artrit'te Potansiyel Biyomarker Olabilecek Epigenetik Değişikliklerin İncelenmesi

(İltihaplı eklem romatizması hastalığında çevresel faktörlerin (sigara, alkol, ilaçlar, beslenme gibi) genetik/ırsi yapı üzerine etkilerinin incelenmesi)

Gönüllünün Baş Harfleri <>>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığımız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

Araştırmanın konusu, İltihaplı eklem romatizması hastalığında çevresel faktörlerin (sigara, alkol, ilaçlar, beslenme gibi) genetik/ırsi yapı üzerine etkilerinin incelenmesidir. Araştırmanın amacı, henüz kesin bir tedavisi olmayan iltihaplı eklem romatizması hastalığının teşhisi ve tedavi aşamasındaki değerlendirmeler için etkin olabilecek belirteçlerin araştırılması amaçlanmaktadır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Araştırma için gönüllülerden yalnızca 2 ml tam kan örneği alınacak ve rutin kan testleri yapıldıktan sonra, kan örneklerinden DNA saflaştırılarak incelemeler yapılacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Kan örnekleri için açlık durumunda (aç karnına) olmanız gerekmektedir (su dışında başka hiçbir yiyecek ve içeceğin tüketilmemesi gerekmektedir). Çalışma doktorunuzu ziyarete belirlenen günlerde gelmelisiniz ve bir sonraki ziyaretiniz de, ziyaretten ayrılmadan önce planlanmalıdır. Yine çalışmadan önce veya çalışma sırasında aldığınız başka herhangi bir tıbbi tedaviyi de çalışma doktoruna söylemeniz önemlidir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Araştırmada sadece kolunuzdaki damardan girilerek küçük bir tüpe 2 ml kan alınacaktır. Kan alma işleminde iğnenin batmasına bağlı olarak biraz acı duyabilirsiniz.

GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ

Eğer denek / hasta doğurganlık döneminde / emziren bir kadın ise çalışmaya dahil edilmeyecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

İltihaplı eklem romatizması hastalığının sebepleri ve tedavisi için yararlı olabilecek bilgilerin edinilmesinde katkı sağlamış olacaksınız.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğimin veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilceğimin bilincindeyim. Çalışmadan her hangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIşMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma doktoru ziyaretleri ve çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyici tarafından karşılanacak ve size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir. Ayrıca çalışmaya bağlı makul miktardaki yol gideriniz makbuzları gösterildiğı takdirde karşılanacaktır.

Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

KİŐİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kiŐisel bilgilerinizi (“alışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışma destekleyicisi firma ile paylaşılan çalışma verileri size özel bir numara olan bir kod (“Kod”) numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin alışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma doktorunuzun denetimindedir. Çalışma destekleyicisi firma düzenleyici otorite veya diğer denetim kurumları tarafından atanmiş kişiler doktorunuz tarafından tutulan çalışma verilerinizi inceleyebilirler.

Doktorunuz alışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Çalışma destekleyicisi firma; çalışmanın yürütülmesi, teşhis ve tıbbi yardım gereçlerinin geliştirilmesi için çalışma verilerinizi kullanabilir. Doktorunuzun çalıştığı kurum ve çalışma destekleyicisi

firmanın her ikisi de yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar.

Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Doktorunuz ya da çalışma destekleyicisi firmadan, toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkına sahiptir. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkına da sahiptir. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen gerekirse sizin çalışma destekleyicisi firma ile temasa geçmenize yardımcı olabilecek doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızdan vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Çalışma destekleyicisi firma onayınızdan vazgeçmeden önceki çalışma verilerinizi kullanmaya devam edebilir.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Arş. Gör. Zülfinaz Betül ÇELİK Cep. Tel:05302946325

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:

Kendi isteğinizle ayrılmanız dışında ayrılmanızı gerektirecek bir durum bulunmamaktadır.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

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

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

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

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Ek 3. Tabakalandırılmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

TABAKALANDIRILMIŞ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

A. Örneklerin gelecekteki kullanımı: *Lütfen işaretleyiniz.*

İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

Sadece bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.

Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum (*Bu kutuyu seçmem durumunda, bu çalışmaya katılmayacağımı anlıyorum*).

B. Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (*kimlik bilgileriniz*) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

Tarafımdan alınmış kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı tüm çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

**Kodlanmış örnek*: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Zülfinaz Betül Çelik

Doğum Yeri: Erzurum

Doğum Tarihi:27.04.1988

Medeni Hali:Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü-2010

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji/Moleküler
Biyoloji Anabilim Dalı-2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2015-
Devam ediyor (Araştırma Görevlisi)

Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2013-2015
(Araştırma Görevlisi)

E-posta: betul.celik@omu.edu.tr, zbcelik25@gmail.com