

T.C.
S.S.K. İZMİR EĞİTİM HASTANESİ
KLİNİK BİYOKİMYA
ŞEF : Dr. BAYSAL KARACA

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA
TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR- α ve ERİTROPOETİN DÜZEYLERİ
(UZMANLIK TEZİ)**

Dr. SİBEL BİLGİLİ

İZMİR 2002

ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince değerli bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, tezimin oluşumunda ve yönlendirilmesinde desteği sürekli hissettiğim Sayın Hocam Uzm.Dr.Baysal KARACA'ya,

İlgi ve yardımlarından dolayı şef yardımcımız Uzm. Dr. Nur Uzuncan'a,

Tezimin hazırlanmasındaki büyük katkılarından dolayı Uzm. Dr. Aydan Çavuşoğlu'na, Uzm. Dr. Giray Bozkaya'ya, Dr. Osman Evliyaoğlu'na ve Dr. Esin Kırıkkaya'ya,

Desteklerinden dolayı Uzm. Dr. Ömür Erkızan'a, Uzm. Dr. Ayşe Lale'ye,

Örneklerin toplanma aşamasındaki yardımlarından dolayı Dr. Doğan Özkan'a, Dr. Gülten Sop'a, Dr. Servet Akar'a, Dr. Nuru Akkoç'a, kaynak edinmemdeki yardımından dolayı Dr. Oktay Bilgi'e Dr. Gülriz Özbek'e.

Laboratuar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı S.S.K. İzmir Eğitim Hastanesi Biyokimya Laboratuar teknisyenlerine,

Eğitimim süresince desteğini ve yardımını benden esirgemeyen eşim Uzm. Dr. Gökmen Bilgili'ye, biricik kızım Gülce'me ve üstün fedakarlıklarla yetişmemi sağlayan sevgili annem Şadiye Ergü'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ

2. GENEL BİLGİLER

2 . 1 . ROMATOİD ARTRİT (RA)

2 . 1 . 1 . PATOLOJİ

2 . 1 . 2 . ETİYOLOJİ

2 . 1 . 2 . 1 . GENETİK

2 . 1 . 2 . 2 . CİNSİYET VE SEKS HORMONLARI

2 . 1 . 2 . 3 . İNFEKSİYONLAR

2 . 1 . 2 . 4 . ISI ŞOKU PROTEİNLERİ

2 . 1 . 2 . 5 . TİP II KOLLAJEN

2 . 1 . 2 . 6 . DİĞER NEDENLER

2 . 1 . 3 . ROMATOİD ARTRİTTE LABORATUVAR BULGULARI

2 . 1 . 3 . 1 . ROMATOİD FAKTÖR (RF)

2 . 1 . 3 . 2 . C- REAKTİF PROTEİN (CRP)

2 . 1 . 3 . 3 . ERİTROSİT SEDİMENTASYON HIZI (ESH)

2 . 1 . 3 . 4 . TROMBOSİTOZ

2 . 1 . 3 . 5 . EOZİNOFİLİ

2 . 1 . 3 . 6 . ANEMİ

2 . 1 . 3 . 7 . İMMUN KOMPLEKSLER

2 . 1 . 4 . ROMATOİD ARTRİTTE İMMUN YANIT

2 . 2 . TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR (TNF)

2 . 2 . 1 . HEMATOPOEZDE TNF α

2 . 3 . KRONİK HASTALIK ANEMİSİ

2 . 3 . 1 . KRONİK HASTALIK ANEMİSİNDE SİTOKİNLER

2 . 4 . ERİTROPOETİN (EPO)

- 2 . 4 . 1 . ERİTROPOEZ REGÜLASYONUNDA EPO'İN ROLÜ
- 2 . 4 . 2 . ERİTROPOETİN ÜRETİMİNİN DÜZENLENMESİ
- 2 . 4 . 3 . KRONİK HASTALIK ANEMİSİNDE ERİTROPOETİN
- 2 . 5 . ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA ANEMİ
- 2 . 6 . TNF α , EPO, FERRİTİN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ
 - 2 . 6 . 1 . RADYOİMMUNOASSAY (RIA)
 - 2 . 6 . 2 . İMMUNORADYOMETRİK ASSAY (IRMA)
 - 2 . 6 . 3 . KEMİLÜMİNESAN İMMUNOASSAY
 - 2 . 6 . 4 . ENZİM İMMUNOASSAY (EIA)
 - 2 . 6 . 4 . 1 . ENZİM LİNKED İMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

- 3 . 1 . GEREÇLER
 - 3 . 1 . 1 . KULLANILAN ALETLER
 - 3 . 1 . 2 . TİCARİ KİTLER
- 3 . 2 . DENEY MATERYALİ
- 3 . 3 . YÖNTEMLER
 - 3 . 3 . 1 . ERİTROPOETİN
 - 3 . 3 . 1 . 1 . EPO ELİSA KİT İÇERİĞİ
 - 3 . 3 . 1 . 2 . YÖNTEMİN UYGULANIŞI
 - 3 . 3 . 2 . h-TNF α
 - 3 . 3 . 2 . 1 . h-TNF α KİT İÇERİĞİ
 - 3 . 3 . 2 . 2 . YÖNTEMİN UYGULANIŞI
 - 3 . 3 . 3 . FERRİTİN
 - 3 . 3 . 4 . DEMİR VE TOTAL DEMİR BAĞLAMA KAPASİTESİ
 - 3 . 3 . 5 . KREATİNİN

3 . 3 . 6 . HEMOGRAM

3 . 3 . 7 . CRP-RF

4. İSTATİSTİK

5. BULGULAR

6. TARTIŞMA

7. ÖZET

8. SUMMARY

9. ÖZGEÇMİŞ

10. KAYNAKLAR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik Romatoid Artritte sıklıkla hafif-orta şiddette seyreden anemi görülmektedir. Bu aneminin en sık gözlenen formu ise kronik hastalık anemisi, fakat altta yatan patofizyolojik mekanizma açıklık kazanmamıştır. RA'de görülen kronik hastalık anemisinin patogenezi, inceleleyen birçok çalışma yapılmıştır. Mononükleer fagosit sistemden demir salınımının azalması, demir absorpsiyonunda ve anemiye karşı eritropoetin cevabında azalma ile eritroblast sensitivitesindeki düşüşün kronik hastalık anemisinin patogenezi, rol oynayabileceği rapor edilmiştir. Son dönemlerde yapılan araştırmalar ise inflamatuvar hastalıklarda üretilen tümör nekrozis faktör α (TNF α) gibi lenfokinlerin, RA hastalık aktivitesinde ve hematopoetik hücre proliferasyonunun inhibisyonunda önemli olabileceği görüşünü gündeme getirmiştir. Bazı çalışmaların sonucunda RA'li hastaların serumlarında TNF α düzeylerinin yüksek bulunduğu, TNF α 'nın RA'de patojenik rol oynayabileceği, bunun yanında eritropoezi de inhibe ederek anemiye neden olabileceği bildirilmiştir. Benzer olarak RA'de görülen anemide renal eritropoetinin (Epo) rolü hala çelişkilidir. Bazı görüşler böbreklerden Epo salınımının yeterli olduğunu, diğerleri ise olmadığını savunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Hb ile ferritin düzeyleri göz önüne alınarak RA'li anemik olan ve anemik olmayan hastalarda, serum TNF α düzeyleri ve serum Epo düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırarak aneminin patogenezi, aydınlatmaya çalışmaktır.

2 . GENEL BİLGİLER

2 . 1 . ROMATOİD ARTRİT

Romatoid artrit (RA), başlıca diartrodial eklemlerin noninfektif, kronik inflamasyonu ile karakterize, sistemik bir hastalıktır. Özellikle sinovyal eklemleri ve sinovyal özellikteki tendon kılıflarını etkilediği için başlıca sinovyum hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Hedef organ sinovya olmasına rağmen olguların bir bölümünde eklem dışı tutulumlar görülmektedir. Eklem sinovyasında zamanla pannüs formasyonu oluşturarak kıkırdak, kemik doku ve komşu diğer dokularda yıkıma ve sonuçta da eklem deformasyonlarına yol açar.

RA terimi ilk defa 1859 yılında Garrot tarafından kullanılmıştır. 1940'lı yıllarda Waaler ve Rose tarafından romatoid faktörün bulunması ve bunu takiben kaydedilen gelişmeler RA'de otoimmün mekanizmaların rolünü ortaya çıkarmıştır (35).

RA dünya genelinde populasyonun ortalama %1'ini etkilemekle beraber bu oran değişik toplumlarda farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin; Çin'de insidans %0.3, Kuzey Amerika kıızılderililerinde %5'dir (36). Hastalığın yaş ve cinsiyetle yakın ilişkisi vardır. Diğer birçok otoimmün hastalıkta olduğu gibi kadınlarda daha sık görülmektedir. Kadın/Erkek görülme oranı 2/1-4/1 arasında değişmekte olup ortalama 3/1 oranı kabul edilebilir (1-2). Hastaların %80'i 35-50 yaş arasındadır. Genellikle genç erişkinlerin hastalığı olmakla birlikte hiçbir yaş hastalıktan korunmuş değildir. Yaş ilerledikçe cinsiyet farklılığı azalır. Geç başlangıçlı RA'de kadın/erkek oranı 1.4/1'dir (1). RA önemli morbiditeye neden olması yanında mortaliteyi de artıran bir hastalıktır (37).

2 . 1 . 1 . PATOLOJİ

Romatoid artritinin gerçek nedeni henüz tanımlanabilmiş değildir. Diagnostik ve prognostik yaklaşımlar ile tedavi protokolleri genellikle tanımlanmış olmasına rağmen bu konularda daha fazla ilerlemelere

ihtiyaç vardır. RA kronik, inflamatuvar, sistemik bir hastalıktır ve eklem ağrısı, şişmesi, destrüksiyonu ve pannüs formasyonu ile karakterizedir. RA sinovyumunda T hücreleri, B hücreleri, CD 68⁺ makrofaj-benzeri hücreler, mast hücreleri ve endotelial hücreler yer alır ve inflamatuvar olaya katkıda bulunurlar (B). Yapılan çalışmalar RA'de proinflamatuvar sitokinlerin, özellikle TNF α 'nın patogeneizde önemli rolü olduğunu ortaya koymuştur (39).

RA primer sinovite yol açan bir hastalıktır. Anatomik olarak, normal sinovya iki kısımdan oluşur; eklem aralığında 1-2 hücreden oluşan bazal membransız ince intimal tabaka ve az sayıda hücre ile daha çok damarsal yapılar içeren subintimal tabaka. Bu iki tabaka ortak olarak çalışır. Glikozaminoglikanların yapımını ve vasküler yapılara filtrasyonunu sağlama temel görevleridir. Subintimal matrikste daha çok kollajen, glikozaminoglikan ve fibronektin bulunur. İntimal tabakadaki sinovyal hücreler, makrofajlara özgü davranışlara sahiptir ve T hücrelerinin mediatörleri olarak görev yaparlar. Normal sinovya romatoid sinovyaya döndüğünde, bu hücreler allojenik T hücre aktivasyonunda son derece etkili olurlar.

İleri yapısal çalışmalara göre, sinovyal hücreler makrofaj yapısında veya fibroblast yapısında olmak üzere iki tiptir. Makrofaj yapısında olan sinovyositler, Fc reseptörleri içerirler ve fagositoz yapma yeteneğindedirler. Bu hücreler ayrıca, yüzeylerinde HLA klas 2 moleküllerini de taşırlar. Köken olarak da kemik iliği kaynaklıdır. Fibroblast yapısında olanlar ise mezenşimal kökenlidir ve diğer hücre tipindeki yapısal özellikleri göstermezler. RA sinovyumunda bu iki hücre tipi başlangıçta birlikte artar. Ancak olay kronikleştikçe ibre fibroblast tipi olan sinovyositlerin artmasına doğru kayar. Bu hücreler pannüsün esas hücre grubunu oluşturur. Romatoid sinovyumda histopatolojik olarak inflamatuvar yapı incelendiğinde, mononükleer hücreler, T lenfositler, makrofajlar ve plazma hücreleri ilk bakışta dikkat çekerler. Anjiogenez başlangıçtan itibaren vardır. Anjiogenezin uyarılmasında makrofajlar, fibroblastlar ve lenfositlerden salınan

büyüme faktörlerinin rolü vardır. Kısa zamanda sinovya hücrelerinde artış ve sonucunda da villöz oluşumlar meydana gelir. Bu prolifer olmuş sinovyal oluşumlara pannüs denir. Eklemin anatomisinin bozulmasında ve hastalığın yol açtığı deformitelerin oluşmasında bu pannüsler rol oynayan birinci nedendir. Pannüslerin etkili olduğu alan, kıkırdakla kemiğin birleştiği bölgedir. Büyüme etkili sitokinlerden TGF- β 'nın pannüs oluşumunda rolü olduğu kabul edilmektedir. Sinovyal zarda RA'li olguda egemen olan T hücre grubunu, daha çok CD4+ yardımcı T hücreleri oluşturur.

Polimorfonükleer lökositler sinovyal dokuda az saptanırken, sinovyal sıvının dominant hücrelerini oluştururlar. Bunun nedeni, sinovyal yüzey hücrelerine yapışmaları için gerekli adezyon moleküllerinden olan integrinlerin nötrofillerde olmamasıdır. Buna karşılık T hücreleri, içerdikleri adezyon molekülleri nedeniyle romatoid sinovyumda kolayca yerleşebilirler. Polimorfonükleer lökositlerin sinovyal sıvıda oluşturdukları enzimler de eklem kıkırdağının yıkımında rol oynayan ikinci mekanizma olarak kabul edilmektedir (40).

Romatizmal hastalıklarda görülen kıkırdak harabiyetinin en çok matriks metalloproteinazlarının aktivitesinden kaynaklandığı, bu enzimlerin aktive makrofaj ve fibroblastlardan IL-1 ve TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlere cevap olarak üretildikleri görüşü gündemdedir (13).

RA patolojisinin değişik evreleri 4 ayrı grupta sınıflandırılabilir; birinci evre başlangıç evresidir ve bu evrede hastalığın klinik bulguları görülmemektedir. Patolojik değişiklikler sinovyal zarda kısıtlıdır, radyoloji normaldir. Bunu izleyen ikinci evre erken inflamatuvar evredir, bu evrede klinik bulgular dikkati çeker, pannüsler öncelikle menisküsleri etkiler ancak kıkırdak dokunun ve radyolojinin normallığı dikkati çeker. Destruktif evre üçüncü evredir; gerek menisküs gerekse kıkırdak proliferatif sinovya tarafından yaygın eroziv bir invazyona uğrar, RA ilerlemeye başlamıştır. Son evrede ise

ileri yaygın doku lezyonları ile zengin radyolojik bulgulara rastlanır, hastalık çok ilerlemiş bulunmaktadır (41).

2 . 1 . 2 . ETİYOLOJİ

Uzun yıllardan beri süregelen yoğun araştırmalara rağmen RA etiyojisi henüz bilinmemektedir. Genetik ve genetik dışı faktörlerin rol oynadığı kompleks, multifaktöriyel bir etioloji söz konusudur. Genetik, immunolojik bozukluklar, cinsiyet, hormonal nedenler, infeksiyonlar, travma, stresin etiyojistik rolleri araştırılmaktadır (35).

2 . 1 . 2 . 1 . Genetik:

Hastalık insidans ve prevalansında gözlenen bölgesel değişiklikler, aile ve ikizlerle ilgili araştırmalar RA'de genetik faktörlerin rol oynadığını düşündürmüştür. Son yıllarda doku uygunluk antijenleri (MHC) ile yapılan çalışmalarla bu konu aydınlanmaya başlamıştır. Tek yumurta ikizlerinde kardeşlerden birinde hastalık varsa diğerinde görülme riski %20-30 iken, bu oran çift yumurta ikizlerinde %5'e düşmektedir. Aradaki farkın beş kat fazla oluşu genetik faktörlerin önemini gösterir. Yine seropozitif hastalığı olan bireyle birinci derece akraballığı olanlarda RA gelişme riski yaklaşık 4 kat fazladır. Birçok popülasyon çalışmalarının sonuçlarına göre RA ile insan lökosit antijenleri (HLA)'nın sınıf iki allelleri arasında özellikle HLA DR 4 alleli arasında yakın ilişki vardır. Sınıf II MHC molekülleri yabancı ya da self proteinlerin peptid fragmanlarına bağlanan yüzeyel hücre glikoproteinleridir ve bu bağlantıdan sonra bu kompleks T helper hücrelerine sunulur. HLA DR loküsünün β zinciri üzerindeki 3.değişken bölgedeki epitopların RA gelişimi ya da hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Aynı değişkenlik HLA DRI'de de saptanmıştır. HLA DR molekülünün bu bölgesi yabancı peptidlerin bağlanması ve T lenfositlerine sunulması ile ilgilidir (42).

2 . 1 . 2 . 2 . Cinsiyet ve Seks Hormonları

RA pekçok otoimmün hastalık gibi kadınlarda daha sık görülmekte, daha şiddetli seyretmektedir. Nulliparlarda RA gelişme riski 2-3 kere daha fazladır (1-7). Garnod hamilelerde hastalık seyrindeki değişmelere dikkati çekerek seks hormonlarının rolü üzerinde durmuştur. Genellikle son trimestırda hasta remisyonudadır. Doğumdan hemen sonra atak görülür. RA'li hamile hastaların %75'inden fazlası remisyona girer. Gebelikteki remisyonun nedeni babaya ait HLA antijenlerine karşı allo antikorların gelişmesi olabilir (43). Seks hormonları immün mekanizmalar üzerinde önemli roller oynamaktadır. Östrojenler T hücrelerinin antijen stimülasyon etkilerini baskılar. Aynı şekilde T hücre supresör aktiviteyi azaltır. Progesteron ise T hücre supresör aktiviteyi artırır, fakat lenfosit proliferatif etki gösteren mitojeni inhibe eder. Testosteron T hücre supresör aktiviteyi artırır fakat sitotoksik hücre aktivitesini inhibe eder.

RA'de seks hormonlarının sitokin yapımı üzerine etkileri çok önemli görülmektedir. Östrojen fizyolojik konsantrasyonlarda periferik monositlerden IL-1 yapımını artırır. Ancak farmakolojik konsantrasyonlarda IL- 1 sekresyonunu inhibe eder. Erken yaşta gebelik ve oral kontraseptiflerin kullanımının hastalığın ortaya çıkışını geciktirdiği veya hastalığın şiddetini azalttığı düşünülmektedir.

Ayrıca RA'li hastalarda hipotalamus-pitüiter adrenal siklusunda bir disfonksiyon söz konusudur. İmmün inflamatuvar stimulusa yanıtta bir anomali ve inflamasyon derecesi ile ilgili olarak diüurnal kortizol düzeyi düşük olabilir. Yapılan araştırmalar bu anomalinin hipotalamik düzeyde olduğunu düşündürmektedir (35).

2 . 1 . 2 . 3 . İnfeksiyonlar

RA'te etken olan ajanlar arasında, enfeksiyöz nedenler üzerinde de çok ısrar edilmiştir. Piyojenik bakteriyolojik olayların RA nedeni olmadığı

bugün için genel olarak kabul edilmektedir. Mikoplazmalar olası bir etken olarak akla gelmelerine rağmen yeterli delil bulunamamıştır (2). RA'li bazı hastalarda sinovyal dokuda difteroid benzeri mikroorganizmalar izole edilmiştir. Ancak benzer mikroorganizmalar nonromatoid dokularda da saptanmıştır.

Bazı erken dönem RA'li hastaların sinovyumlarında parvovirüse benzer partiküller ve parvovirüs B19'a karşı oluşan antikorlar saptanmıştır. Ancak bu bulgular az sayıda RA'li hastada gösterilmiştir, ve ayrıca parvovirüs B 19, RA'e benzer bir hastalık tablosu oluşturabilir. Rubella, lentivirüs, sitomegalovirüsün etiyolojik rolleri araştırılmıştır ancak net bir bağlantı kurulamamıştır. Epstein-Barr virüsü (EBV), 1975 yılından itibaren RA patogeneğinde gündeme gelmiştir. Erken dönem RA'lilerin kanlarında EBV ile enfekte B hücrelerinin anormal yüksekliği saptanmasına karşın, bunun RA etiopatogeneğinde rol oynamaktan çok, sekel bir bulgu olduğunu daha sonraki araştırmalar göstermiştir (40). Ancak RA'li hastaların serumlarında EBV antijenlerine karşı yüksek oranda antikor tesbit edilmiştir. RA'li hastalarda EBV'üne karşı bir immünreglatuvar defekt söz konusudur, bu defektin nedeni kesin olarak kanıtlanamamıştır. Ancak bu defekt hastalığın stimülasyonuna neden olabilir. Sonuçta bugün için virüsler, uygun genetik ve daha bilemediğimiz bazı faktörlerin de katkısıyla RA'te tetiği çekebilir olarak kabul edilen faktörlerdendir (35).

2 . 1 . 2 . 4 . Isı şok proteinleri

Bakteri, mikobakteri, protozoa ve helmintlere karşı immun yanıtta antijen tanıyan temel proteinlerdir. İnflamatuvar artritlerde sinovyal hücrelerin ısı şoku proteinleri oluşturdukları ve bunların çapraz reaksiyon veren T hücreler ve antikorlar tarafından tanındığı bilinmektedir (44).

2 . 1 . 2 . 5 . Tip II kollajen

RA 'li hastaların serumlarında danatüre tip II kollajene karşı oluşan antikor titresi yüksek bulunmuştur. Ancak nativ tip II kollajene karşı oluşan antikor titrelerinde artış yoktur. Antikollajen antikorlar RA için özgül değildir, eklem harabiyeti ve inflamasyonun devamında rol oynadıkları düşünülmektedir (35).

2 . 1 . 2 . 6 . Diğer nedenler

Diyetle RA gelişimi arasındaki ilişki incelenmiş, zeytinyağı ve balık yağı tüketiminin koruyucu, selenyum ve bakır eksikliğinin ise RA ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir. Sosyoekonomik düzey ile hastalık ortaya çıkışı arasında bir ilişki saptanamamıştır (35).

2 . 1 . 3 . ROMATOİD ARTRİTTE LABORATUVAR BULGULARI

2 . 1 . 3 . 1 . ROMATOİD FAKTÖR (RF):

RF, IgG molekülünün Fc kısmındaki antijenik bölgelere karşı oluşan otoantikorlardır. RF'ün hastalığın etiyolojisi, patogenezi ve hastalık aktivitesindeki rolü yıllardan beri araştırılmaktadır. RF olarak adlandırılan otoantikorlar IgM, IgA, IgG ve IgE cinsinde olabilirler. RA'de RF'ler periferik kan ve sinovyal B hücreleri tarafından yapılırlar. Romatoid sinovyumunda RF oluşturan B hücreleri farklıdır. Bu hücrelerin yapısal germ dizilişinde somatik mutasyonlar olduğu düşünülmektedir. Antikor üretimi yapan B hücrelerinin CD 25+yüzey determinantı ile tanımlanır. Yine bu hücrelerde K/ λ zincir oranında bir anomali olduğu ve olayı başlatan antijenin ancak bu özgül B hücre grupları uyurabileceği ileri sürülmüştür. Yani yalnızca özgül B hücre grupları RF yapabilir. Oluşan antikorlar eklemde büyük immün kompleksler oluşturular. İmmün kompleksler ise lenfositleri uyurarak RF yapımını stimule ederler. RA'de sinovyum potent antikor yapan bir

dokudur. Ancak RF, B hücre hiperaktivitesinin olduğu birçok durumda (infeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, hipergamaglobulinemi, kronik inflamatuvar hastalıklar vs.) ve ileri yaşta pozitif olabilir.(sf 1552). RF romatoid artritli hastaların serumunda %75-80 pozitif olarak bulunur. RF tayininde en sık kullanılan yöntem lateks aglütinasyon (fiksasyon) testidir. Bunun dışında Rose Waaler testi, ELISA, indirekt immünofloresan testi, radyoimmünoassay değerlendirilme yöntemleri de vardır. Genellikle 1:80 (60 IU üstü)'den yüksek titreler pozitif olarak yorumlanır. Klasik IgM RF diagnostik ve prognostik bir test olarak yararlıdır. Yüksek titreler genellikle kötü prognozu belirler. Ancak RF'ün diğer birçok hastalıkta pozitif olduğu göz önünde tutulursa klinik bulguların desteklediği bir RF pozitifliği diagnostik önem taşır (35,45).

2 . 1 . 3 . 2 . C- REAKTİF PROTEİN (CRP)

Romatoid artritte akut faz cevabın direkt bir ölçümüdür. Hastalık aktivitesi açısından eritrosit sedimentasyon hızından daha duyarlı olduğu kabul edilmiştir. Aktiviteyi belirleyen en uygun indikatör olmasının yanı sıra inatçı yüksek seviyelerde seyretmesi eklem destrüksiyonu, erozif hastalığı işaret eder ve daha erken, agresif tedavinin başlatılmasını zorunlu kılar. İnflamasyondan hemen sonra normal değerinin 1000- 2000 katı artabilir, inflamatuvar yanıt tümüyle ortadan kalkmadan normal düzeye inmez. Özgün olmayışı, kişisel ölçüm farklılıklarının oluşu, hastalığın aktivitesini her zaman yansıtmaması olumsuz özellikleridir (35,40).

2 . 1 . 3 . 3 . ERİTROSİT SEDİMENTASYON HIZI (ESH)

30 mm/saat (Westergen metodu) üstündeki değerler aktiviteye işaret eder. Bazen 100mm/saat değerlerine yükselebilir. Ancak nonspesifik bir test olduğu ve eritrositlerin şekil, sayı, büyüklüğünü etkileyen durumlardan (örneğin anemi, yaşlanma) etkilenebileceği

unutulmamalıdır. Normal değerlerde bulunması hastalığın aktif olmadığını göstermez (35).



unutulmamalıdır. Normal değerlerde bulunması hastalığın ~~airn~~ olmadığını göstermez (35).

2 . 1 . 3 . 4 . TROMBOSİTOZ

Kan pıhtılaşmasında görev alan trombositler erken inflamatuvar ~~clay~~ ve yara iyileşmesinde önemlidir. Doku inflamatuvar ~~yanıtı~~ yardımcıdır. Hastalık aktivitesi ile trombosit sayısı arasında belir~~ge~~ ilişki söz konusudur (35,40).

2 . 1 . 3 . 5 . EOZİNOFİLİ

%5 ya da daha yüksek eozinofili ile seyreden RA'de vaski~~it~~ plöroperikardit, pulmonary fibrozis ve subkutan nodül insida~~ns~~ yüksektir. Özellikle vaskülit komplikasyonu açısından eozino~~fil~~ belirleyici bir testtir (35).

2 . 1 . 3 . 6 . ANEMİ

%50 oranında görülür. Özellikle hastalığın başlangıcında hafif ~~tr~~ anemi olabilir (normokromik ve normositer veya mikrositer). Kroni~~k~~ hastalık anemisi ve demir eksikliği anemisi en sık nedendir (35).

2 . 1 . 3 . 7 . İMMUN KOMPLEKSLER

Dolaşımdaki immün kompleksler CRP gibi hastalığın seyrini belirleyen bir indikatördür. Genellikle eklem dışı tutulumun varlığında pozitif~~ir~~ Bu hastalarda vaskülit gelişme olasılığı yüksektir (35).

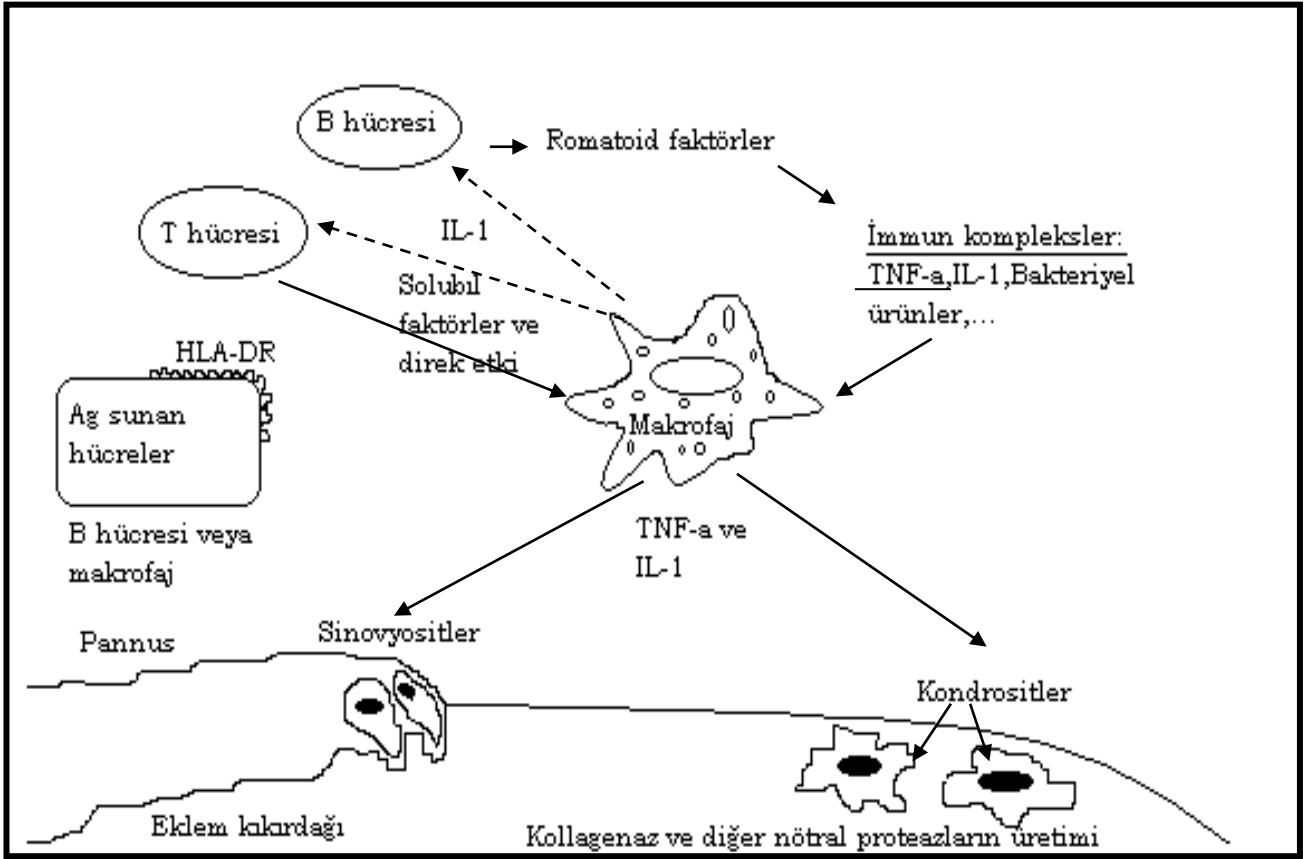
2 . 1 . 4 . ROMATOİD ARTRİTTE İMMUN YANIT

Sitokinler, immün sistemde çeşitli sellüler, inflamatuvar ve patojenik olaylarda yer alan en önemli mediatörlerdir. Belirli sitokinlerin fazla ya da yetersiz üretimi, bazı hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır. Birçok sitokinin arasında IL-1, IL-2, IL-6, interferon gamma (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktör alpha (TNF- α) iyi tanımlanmış, multifonksiyonel sitokinlerdir ve immün cevabın, hematopoezin, akut faz reaksiyonlarının, bazı immün hastalıkların inflamasyonunun regülasyonunda önemlidirler (46).

Son yıllarda birçok sitokinlerin immün ve inflamatuvar cevabın regülasyonunda rol aldıkları düşünüldüğünden, RA'de sitokinlerin analizleri büyük önem kazanmıştır (17,47). RA'de erken gelişen olayların etiolojisi tanımlanamamıştır. Tek bir nedenden çok, genetik ve çevresel faktörlerin kombinasyonunun RA'in başlamasına katkıda bulunabilmesi muhtemeldir. Üzerinde çalışılan hipotezlerden birisi RA'in antijenle uyarılan, T-hücre bağımlı bir hastalık olduğu ve inflamatuvar olayların sinovyal dokuda antijeni tanıyan CD4+T hücreleri ile başlatıldığı şeklindedir (38,48). RA patogeneğinde T hücrelerinin kritik rolü, RA ile belirli HLA haplotipleri arasındaki ilişki ile ve bazı RA hayvan modellerinde RA'in T hücreleri ile aktarılabilmesi ile ortaya çıkarılmıştır (49). Son verilerde romatoid eklemlerin destrüksiyonunun, antijen presente eden hücreler ve CD4+T hücreleri arasındaki kompleks hücre-hücre interaksiyonları ile başlatıldığı belirtilmiştir (50). %80'den fazla RA hastasında DR1 ve DR4 subtiplerinin eksprese edildiği gösterilmiştir. DR'nin bilinen tek fonksiyonu peptidleri CD4+T hücrelerine sunmak olduğundan, bu genetik ilişki T hücrelerinin hastalık patogeneğinde bazı basamaklarda rolü olduğuna işaret eder. Fakat bu basamağın hangisi olduğu bilinmemektedir. En popüler görüş CD4+T hücrelerinin otoantijenlerin presentasyonunda patojenik rolü olduğudur. Son bulgulara göre genetik olarak yatkın olan HLA-DR4 alelleri yatkın olmayanlara göre peptid bağlayıcı bölgelerine farklı peptidler bağlamaktadırlar (51).

Subsinovyal bölgede küçük kapiller civarında ve sinovyumda immun yanıtın başlaması, endotelyal venüllerin oluşmasıyla birlikte, doku makrofajları antijeni T hücrelerine sunarlar. Antijen, DR molekülleri ve IL-1 bir araya geldiklerinde CD4+T hücreleri sitokinlerin salınımını aktive ederler. T hücreleri, bir taraftan proliferer olurken diğer taraftan mononükleer fagositleri aktive eden interferon gamma gibi ürünleri salgılar. Büyük olasılıkla sinovyumda T hücre aktivasyonu devamlılık kazandığında hastalarda semptomlar başlamaktadır. Bir ya da birden fazla antijene karşı T hücrelerinin klonal büyümesi B lenfosit proliferasyonuna ve RF gibi antikorların yapımına neden olur. T lenfosit subgruplarıyla ilgili son bilgilere göre, aktif RA'de supresör T hücre (CD8) sayısında azalmaya karşın helper T hücre (CD4) sayısında artış saptanmıştır (35).

Hastalığın en erken döneminde subsinovyal bölgedeki hakim hücreler lenfositlerdir. Sinovyumda T hücreleri B hücrelerine hakimdir. Romatoid sinovyumunda hücrelerin büyük kısmı CD4'dür. B lenfositlerinin RA'deki rolü de geniş olarak araştırılmıştır, çünkü çoğu hastada IgG'nin Fc bölgesini tanıyan IgM antikorları (Romatoid Faktörler) tesbit edilmiştir. Fakat RF tüm RA hastalarında bulunmamakta ve Sjögren Sendromu gibi diğer hastalıklarda da bulunabilmektedir. RF'ün hastalığın gidişatındaki rolü henüz anlaşılamamıştır, fakat şu andaki görüşler antijen prezentasyonunu kolaylaştırdığı yönündedir. RF ve IgG immun kompleksleri, hastalık aktivitesine kompleman aktivasyonu ve sitokin sentezini stimüle ederek katkıda bulunabilirler (51). Makrofajlardan salgılanan $TNF\alpha$ ve IL-1'in sinovyosit ve kondrositlerde doku yıkıcı enzimlerin üretimine neden olarak eklem harabiyetine neden olacağı belirtilmiştir (Şekil 1) (52).



Şekil I: Romatoid artritte eklem harabiyetinin patofizyolojisinde hücre-hücre interaksyonları.

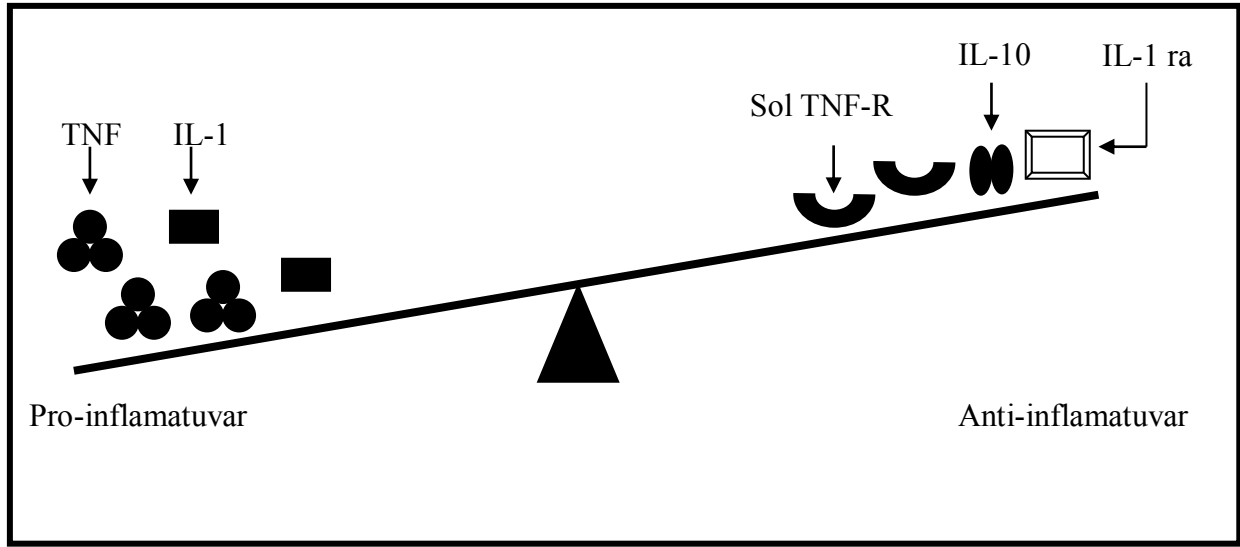
Sitokinler uygun reseptörlerine bağlanarak intrasellüler sinyaller oluşturan ve intersellüler iletişimi sağlayan, sellüler fonksiyonları kontrol eden glikoprotein habercilerdir. RA’de patofizyolojik fonksiyonlarına göre sitokinler üç ana gruba ayrılabilir (35):

1-Proinflatuvar (öncül) sitokinler: IL-1, IL-6, IL-8, Tümör nekrozis faktör (TNF- α), Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF). Bu sitokinler inflamasyonda etkili olan hücrelerin aktivasyonunu regüle ederler.

2-Antiinflamatuvar sitokinler: RA ekleminde, inflamatuvar reaksiyonu baskılamaya yetecek miktarlarda bulunmazlar (IL-4, IL-10), lenfositlerle oluşturulan inflamasyonda potent supresif etkileri vardır. T hücrelerinden salınan sitokinleri inhibe ederler.

3-TNF- α ve IL-1 etkilerini bloke eden antisitokinler: bunların miktarı bu iki sitokinin inflamatuvar etkisini baskılamaya yetmemektedir. İnhibitör etkilerini sitokin reseptörlerine bağlanarak gösterirler. İlk bulunan reseptör antagonisti IL-2 reseptör antagonistidir.

RA'de olduğu düşünülen proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin dengesizliği şekil II'de gösterilmiştir (51).

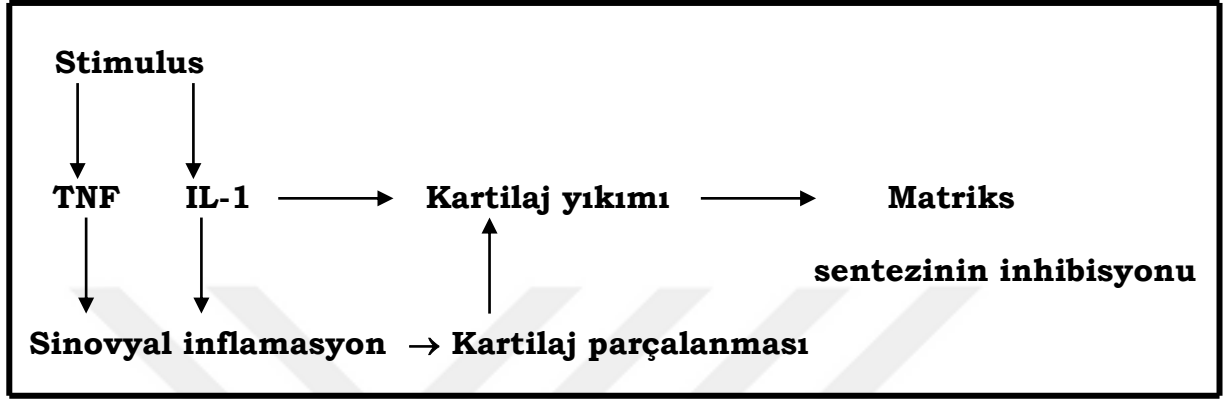


Şekil II: RA'deki sitokin dengesizliği

Birçok hücrenin sitokinelere cevap verebilmesine karşın RA patogenezinde sitokinlerin, aktive edilmiş fibroblastların ve makrofajların çok önemli olduklarına inanılmaktadır (53). Normal sinovyumda sitokin üreten hücreler, özellikle makrofajlar az sayıda bulunurken inflamasyonla birlikte sayıları artar. Bir sitokin diğerinin etkisini başlatabilir ya da antagonize edebilir.

Hastalığın süresi, şiddeti ve tedavi farklılıklarına rağmen tüm RA operasyon örnekleri ile biyopsilerinde aynı geniş aralıkta pro-inflamatuvar sitokin ekspresyonu görülmüştür, bu da mitojenle uyarılmış geçici sitokin üretiminin tersine sinovyal sitokin ekspresyonunun hasarlı dokuda sürekliliğini gösterir (51).

Özellikle IL-1 ya da $TNF\alpha$ RA patogeneğinde çok önemli rol oynarlar. İnflamatuvar yanıtın başlamasında ve eklem destrüksiyonunda önemli etkileri olduğu düşünülmektedir. Sinovyal inflamasyonu başlatarak ya da direkt etki ile kartilaj yıkımına neden olabilir, matriks sentezini inhibe edebilirler (54,55,56). $TNF\alpha$ ve IL-1'in bu etkileri Şekil III'de gösterilmiştir.



Şekil III: Ana sitokinler; TNF ve IL-1

RA'de, sitokin mRNA ve protein analizleriyle, birçok proinflamatuvar sitokinlerin (örn: $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, GM-CSF, IL-8,...) tedaviden bağımsız olarak tüm hastalarda arttığı gösterilmiştir.

Romatoid eklem hücre kültürlerinde spontan olarak IL-1 ile $TNF\alpha$ üretimi IL-1'i regüle eder. Takiben eğer $TNF\alpha$ nötralize edilirse, diğer proinflamatuvar sitokinler de inhibe olurlar. Bir teoriye göre proinflamatuvar sitokinler $TNF\alpha$ apeksine topluca bağlanırlar. Bu da $TNF\alpha$ 'nın RA' de çok önemli olduğunu ve tedavideki hedef olabileceği hipotezini gündeme getirir (13). IL-1 ve $TNF-\alpha$ sinovyal sıvıda tesbit edilebilir (57,58,59,60).

Sitokin döngüsünde IL-1, IL-6, IL-9 ve GM-CSF gibi birçok proinflamatuvar moleküllerin üretimini regüle eden dominant sitokin $TNF\alpha$ 'dır (61,62,63).

2 . 2 . TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR - alpha (TNF )

TNF , organizmanın gram negatif bakterilere olan cevabında rol alan başlıca mediatördür, aynı zamanda diğ r infeksiyöz ajanlara cevapta da önemli olabilmektedir. Gram negatif bakterilerin aktif maddeleri lipopolisakkarit molekülleridir ve bunlar bakteriyel hücre duvarlarından oluşurlar. TNF 'nın majör sellüler kaynağı lipopolisakkaritle aktive edilmiş mononükleer fagositlerdir, bununla beraber antijenle uyarılmış T hücreleri, aktive NK hücreleri ve aktive mast hücreleri de bu proteini salgılayabilmektedir. T hücrelerince üretilen IFN- , lipopolisakkaritle uyarılmış mononükleer fagositler ile birlikte TNF  sentezini artırmaktadır. Yani TNF , hem natürel hem de kazanılmış immunitenin mediatörüdür ve spesifik immun cevap ile akut inflamasyon arasındaki önemli bağılantıdır. TNF  ilk başta 25 kD'luk nonglikolize transmembran proteini olarak sentez edilir, 17 kD'luk fragmanı karboksi terminalini içerir ve salgılanan kısmı oluşturur, dolaşımda ise 51 kD'luk stabil homotrimer şeklinde bulunur. TNF  fonksiyonları solubl trimerin hücre yüzey reseptörlerine bağılanmasıyla başlar. TNF  sentezi büyük miktarlarda olur ve 55 kD ile 75 kD'luk reseptörlerini kolayca satüre edebilir. TNF  reseptörleri incelenmiş hemen hemen tüm hücre tiplerinde bulunmaktadır.

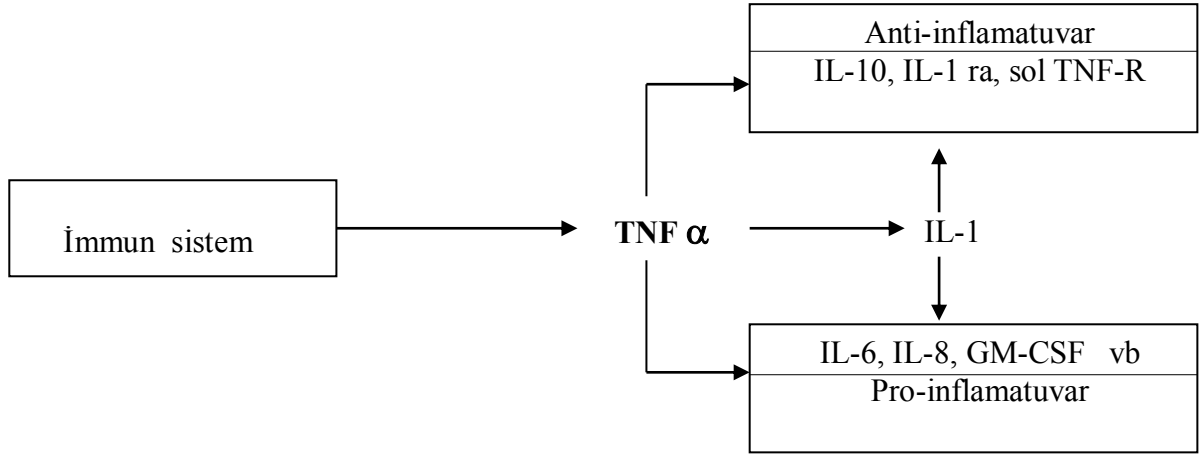
TNF 'nın biyolojik fonksiyonları miktarı ile orantılı olarak değışmektedir. Düşük konsantrasyonlarda ( rn 10^{-9} M) TNF , lokal olarak lökositlerin ve endotelial hücrelerin parakrin ve otokrin regülatörleri şeklinde etki gösterir. Bu etkiler mikroorganizmalara inflamatuvar cevapta kritik rol oynamaktadır. Eğer TNF   retimi için uyarı yeterince güçlüyse daha fazla miktarda sitokin üretimi gerçekleşir. Bu durumda TNF  kan dolaşımına geçer ve endokrin hormon olarak etki eder (64).

TNF  immun sistemdeki güçlü etkilerini proinflamatuvar mediatörleri ( rn: IL-1, nitrik oksit ve prostaglandinler), metalloproteinazları ve adezyon moleküllerini uyararak gerçekleřtirmektedir (65).

Primer olarak monosit- makrofajlardan üretilen bir sitokin olan $TNF\alpha$, çeşitli hastalık durumlarında görülen fizyolojik değişikliklere yol açmaktadır (66). Hem in vitro, hem de in vivo datalar bu molekülün RA'deki kronik inflamasyonda rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. RA'li hastalarda sinovyal sıvı ve sinovyal dokuda yüksek düzeylerde $TNF\alpha$ bulunur ve kartilaj- pannus birleşim yerinde lokalize olmuştur (67,68). Bu kartilaj-pannus bağlantı bölgesi RA'deki eklem destrüksiyonunun gerçekleştiği majör bölgedir (69). Bu destrüksiyonda $TNF\alpha$ 'nın anahtar rolü oynadığına inanılmaktadır, çünkü matriks metalloproteinazlarının üretimini stimüle edebilir ve in vitro kemik rezorpsiyonuna neden olabilir (70). RA'ın hayvan modellerinde $TNF\alpha$ nötralizasyonu, inflamatuvar artrit görölmesini ve şiddetini azaltmakta, bunun yanında $TNF\alpha$ 'nın ayak bileği eklemlerine enjeksiyonu ise artrit ortaya çıkışını hızlandırmaktadır (71,72). Transgenik fareye deregüle $TNF\alpha$ geni verildiğinde kronik inflamatuvar artrit gelişimi gözlenmiştir (53). Tüm bu bulgularla $TNF\alpha$ 'nın RA patogenezinde çok önemli role sahip olduğu düşünülmektedir.

$TNF\alpha$ nötralizasyonu inflamasyon üzerinde çok önemli etkilerde bulunur; C reaktif protein (CRP), akut faz proteini, IL-6 düzeyleri hızla düşme gösterir. Bu da $TNF\alpha$ 'nın sitokin etkileşimlerindeki kritik rolünü ortaya koymaktadır (73).

$TNF\alpha$ aktivitesi normalde natürel inhibitörlerle regüle edilebilir. Bu inhibitörlerden ikisi; $TNF\alpha$ reseptörünün çözünebilir formları (p75 ve p55) tanımlanmıştır ve in vitro $TNF\alpha$ ile uyarılan sitotoksitenin nötralizasyonunu sağladıkları gösterilmiştir (74). Solubıl $TNF\alpha$ reseptörleri RA'li hastaların serumlarında ve sinovyal sıvılarında yüksek düzeylerde bulunurlar (75,76). Bu solubıl $TNF\alpha$ reseptörlerinin tanımlanmasıyla, bu moleküllerin eksojen olarak verilmesinin $TNF\alpha$ aktivitesini inhibe edeceği düşünülmüştür. Bu da tedavi yaklaşımlarında önemlidir. $TNF\alpha$ 'nın RA'de proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin regülasyonunda primer sitokin olarak rol aldığı düşünülmektedir (Şekil IV) (51).



Şekil IV: RA’de sitokin dengesinde $TNF\alpha$ ’nın yeri

Sonuçta $TNF\alpha$, RA’de inflamatuvar mediatör olarak, üretiminin ya da etkilerinin inhibisyonu ile tedavide önemli olabileceği düşüncesiyle önem kazanmıştır (52).

2 . 2 . 1 . HEMATOPOEZDE $TNF\alpha$

$TNF\alpha$, myeloid hücre proliferasyonunun ve diferansiasyonunun hem pozitif hem de negatif regülasyonunda rol alır. $TNF\alpha$, direk ya da indirek olarak diğer hücreleri uyararak hematopoetik büyüme faktörlerini üretir. Daha önceden yapılan birçok çalışma sonucunda $TNF\alpha$ ’nın eritroid koloni formasyonu üzerindeki inhibitör etkileri ortaya çıkarılmıştır (14). Kronik hastalıklarda görülen anemilerin patogenezinde de $TNF\alpha$ ’nın rol oynadığı gösterilmiştir (77). $TNF\alpha$ ’nın in vitro eritropoezi (Epo ile ya da Epo+IL-3 ile birlikte stimüle edilen) potent olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (78,79).

TNF α 'nın hematopoetik stem ve progenitör hücrelerinin büyümesinde bifonksiyonel regülatör olduğu gösterilmiştir. TNF α , IL-3 ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ile stimüle edilmiş hematopoetik progenitör hücrelerinin büyümesini stimüle eder, fakat granülosit-koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ve kök hücre faktörü (stem cell factor-SCF) ile inkübe edilen progenitör hücreleri inhibe eder (80).

2 . 3 . KRONİK HASTALIK ANEMİSİ

İnfeksiyöz, inflamatuvar ya da neoplastik hastalıklarda sıkça rastlanan ve 1-2 aydan uzun süren hafif-orta şiddetli anemi tipidir (2), serum demir azalışı, total demir bağlama kapasitesi azalışı ve demir depolarındaki artış ile karakterizedir (1,2).

Dünyada ikinci sıklıkta görülen anemi formudur. Erken dönemde eritrositler normositikken zamanla mikrositik olurlar. Major olay, kemik iliği eritroid kitlesinin anemiye karşı uygun cevap vererek genişleyememesidir. Kronik hastalık anemisinin enfeksiyon, inflamatuvar hastalık (özellikle RA) ve kanser gibi kronik hastalıklar sonucunda ortaya çıktığı düşünülmüştür. Kronik hastalık anemisi sık görülen ve kolay teşhis edilebilen bir durum olmasına karşın patogenezi henüz aydınlatılabilmiş değildir (2).

Başlıca üç patofizyolojik mekanizma tanımlanmıştır:

1-Kısalmış eritrosit ömrü: Kanser, kronik enfeksiyöz ve granülomatöz hastalıklı kişilerde gösterilmiştir. Bu ekstrakorpusküler eritrosit hasarının gerçek mekanizması belli değildir, ancak bazı kanser hastalarında son zamanlarda 50000 kD'lık bir protein tespit edilmiştir (81).

RA'li anemik hastalarda IL-1 düzeyleri ve kısalmış eritrosit ömrü korelasyon göstermektedir ve in vivo TNF verilen farelerde de bu durum gözlenmektedir. Bu olayın mekanizması kesinlik kazanmamıştır. Aktive edilen makrofajlar dolaşımdaki minimal zarar görmüş eritrositleri hızla temizler (2).

2-Eritropoetin (Epo) üretimi ve kemik iliği cevabında azalma: Normal kemik iliği eritrosit üretimini 6-8 kat artırabilme yeteneğine sahiptir. Kronik hastalık anemisinde ise bu yeteneğini kaybetmekte ve bu da yetersiz eritropoez ile sonuçlanmaktadır. Makrofaj orijinli sitokinler (örneğin: IL-1 β , TNF α , İnterferon β) enfeksiyöz, inflamatuvar durumlarda ve kanserde Epo üretiminde azalmaya yol açarlar. Eritropoezdeki muhtemel yetersizlik üç kategoride incelenebilir bunlar; yetersiz Epo sekresyonu, kemik iliğinin Epo'ya cevabında bozukluk ve demir-limitli eritropoezdir (2,81).

3-İntrasellüler demir metabolizmasındaki bozulmalar: Demirin efektif olarak olgunlaşmamış eritrositlerden başlayan siklusu demir dengesinde kritiktir. Kronik hastalıklarda retikulum hücreleri, olgunlaşmamış eritrositlerde demiri kuvvetlice tutarlar, böylece demir hemoglobin sentezi için kullanılamaz. Retikülositopeni vardır ve eritroid hiperplazisi ile anemi kompanse edilemez. Demir metabolizması bozukluğu ve sonuçlanan eritropoez yetersizliği aynı zamanda inflamatuvar sitokin üretiminden de kaynaklanabilir (81).

Anemi genelde orta şiddetlidir, hemoglobin nadir olarak 8 g/dl altına düşer. Serum ferritin ve transferrin reseptör tayinleri ile demir eksikliği anemisi, kronik hastalık anemisinden ayırdedilebilir. Hematokrit genelde 0,25-0,40 arasındadır fakat %20-30 oranında düşük değerlere rastlanır. Hemoglobin konsantrasyonu ve hematokrit genelde dolaşımdaki kırmızı hücre azalma derecesini gösterirler. Karakteristik olarak serum demir konsantrasyonu azalmıştır, total demir bağlama kapasitesi düşmüştür ve transferrin saturasyonu normal değildir. Enfeksiyon varlığında hastalığın erken döneminde hipoferremi görülür (genelde ilk 24 saatte), enfeksiyon kısa süreli ise serum demiri normale döner ve anemi görülmez, uzayan hastalıkta serum demir düzeyi hastalığın aktif olduğu sürece düşük kalır. Hastalığın gerilemesiyle, serum demir düzeyi normale dönmeden önce anemi genelde kaybolur. Hipoferremi derecesi altta yatan hastalığın şiddeti ile korelasyon gösterir. Serum ferritini, altta yatan kronik bir hastalık olmadığı zaman demir durumu hakkında bilgi veren yararlı bir göstergedir. Fakat kronik hastalık anemisi olan hastalarda serum ferritin düzeyinin uygun

retiküloendotelyal demir depolarını göstermesi için yüksek düzenlemeye ihtiyacı vardır. Serum ferritin düzeyi genelde inflamatuvar hastalıklarda yükselmektedir ve çok fazla yükselişi altta yatan önemli bir hastalığın nonspesifik göstergesi olabilir. Demir eksikliği de eşlik ediyorsa serum ferritin düzeyi düşer fakat komplikasyonsuz demir eksikliğindeki kadar düşük değerlere ulaşamaz. 60 µg/L serum ferritin düzeyi RA'de uygun alt limit olarak belirlenmiştir (X 45,46). RA'li hastalarda %27'ye kadar ulaşan oranda demir eksikliği anemisi kronik hastalık anemisine eşlik edebilmektedir, bu da kronik hastalık anemisinin demir preparatları ile tedavi edildiği şeklindeki çalışma raporlarını açıklamaktadır. Kronik inflamatuvar hastalıklarda eğer serum ferritini 30µg/L'den azsa bu kesin olarak demir eksikliğini göstermektedir, 200µg/L'den büyük değerlerde ise demir eksikliği düşünülmez.

Eritrositlerde serbest protoporfirin konsantrasyonu kronik hastalık anemisinde yükselme eğilimindedir. Bu değişikliğin büyüklüğü demir eksikliğindeki kadar fazla değildir. Solubil transferrin reseptör serum düzeyleri eritroid hiperplazisinde artmaktadır ve demir eksikliği anemisini kronik hastalık anemisinden ayırd edebilir, fakat bu testin henüz rutin kullanımı yoktur. Ayrıca bazı plazma proteinlerinin kronik hastalıklarda düzeylerinde değişimler olmaktadır, bunlar genelde akut faz reaktanları olarak adlandırılırlar. Fibrinojen, seruloplazmin, haptoglobulin, CRP, orosomukoid, C3 ve amiloid A protein gibi plazma protein düzeyleri artmaktadır, fakat albumin ve transferrin karakteristik olarak azalmaktadır. Fibrinojen düzeyinin artışı muhtemelen sedimentasyon oranını artıran en önemli faktördür.

Eritrosit ömrü orta derecede fakat önemli azalış gösterir. Yapılan iki çalışmada RA'li hastalarda 81 gün olan eritrosit ömrünün normal kişilerde 98 gün olduğu, diğer çalışmada ise 90 gün olarak bulunan değer normalde 114 gün olduğu gösterilmiştir.

Kemik iliği, kırmızı hücrelerin ömürlerindeki hafif azalışı kırmızı hücre üreterek yeterli derecede kompanse edemediğinden anemi gelişmektedir.

Anemi derecesi ve altta yatan hastalığın şiddeti arasında genellikle korelasyon bulunmaktadır. RA'de ateş, eklem şişliği ve inflamasyonu, eritrosit sedimentasyon oranı (ESR) ile anemi şiddeti ilişkili bulunmuştur. Malignansilerde ise metastaz varlığında lokalize kansere göre daha şiddetli anemi görülür. Tipik olarak retikülositler normal ya da azalmış sayıda olabilirken, nadir vakalarda hafif yükselmiş olarak saptanabilmektedir. Eritrositler genelde normositik ve normokromiktir fakat hipokromi ve mikrositoz da gözlenebilir. Mikrositoz demir eksikliği anemisindeki kadar fazla değildir. Kronik hastalık anemisinin major ayırıcı tanısı demir eksikliği anemisi ile yapılır (2).

2 . 3 . 1 . KRONİK HASTALIK ANEMİSİNDE SİTOKİNLER

Sistemik otoimmün hastalıklarda kronik hastalık anemisi, immunoloji ya da hematoloji orijinli olabilir. Kronik hastalık anemisi, hücrel immun sistemin stimüle edilmesiyle gelişen kompleks ve geniş metabolik cevapta muhtemelen bir bulgu olabilir. Makrofajların aktivasyonu ve makrofaj sitokinlerinin ortaya çıkışı ile cevap başlatılmaktadır. Bu sitokinler; lenfositler, endotelyal hücreler ve fibroblastlar gibi diğer hücrelerle etkileşime girerler. Kronik hastalık anemisinin patogenezinde önemli olan TNF, IL-1 ve diğer interferonlardır. Çalışmalarda bu sitokinlerin serum ya da plazma konsantrasyonlarının kronik hastalık anemisinde arttığı saptanmıştır, TNF ve interferonun terapötik kullanımı ise anemi gelişimine neden olmuştur.

Normal şartlarda serum ya da plazma eritropoetini ile hemoglobin arasında ters orantı vardır; hemoglobin düştüğü zaman eritropoetin seviyeleri yükselir. RA'de, kanserde, HIV enfeksiyonunda da Hb ve Epo arasında benzer bir ters orantı gözlenir, fakat bu hastalıklardaki anemide Epo düzeyi aynı derecedeki demir eksikliğine göre daha düşüktür, bu da Epo yanıtının bozukluğuna işaret etmektedir. Bu yetersiz Epo cevabının sitokinler yoluyla olabileceği düşünülmüştür. Kronik hastalık anemisinde, demir eksikliği anemisine göre Epo düzeylerinin düşük olmasına rağmen anemik olmayan normal kişilerdeki Epo düzeylerine göre daha yüksek Epo seviyeleri görülür.

Bu da kronik hastalık anemisinde Epo üretiminin inhibisyonunun yanında Epo cevabında da bozukluk olduğunu düşündürmektedir. TNF, IL-1, interferonun in vivo ve in vitro ortamlarda eritropoezi inhibe ettikleri rapor edilmiştir. TNF, human eritroid koloni forming unitlerle (CFU-E) in vitro koloni oluşumunu indirekt olarak inhibe etmektedir.

TNF α , IL-1 ve transforming growth factor β Epo üretimini inhibe edebilirler, bu etki mRNA düzeyinde olmaktadır (2).

2 . 4 . ERİTROPOETİN

Eritropoetin, kırmızı kan hücre üretimindeki başlıca düzenleyici olarak rol alan glikoprotein hormondur (24). Epo keşfedilen ilk büyüme faktörüdür ve özel renal hücrelerden üretilen endokrin hormondur (23). İlk olarak aplastik anemili hastaların idrarlarından purifiye edilmiştir. 34,000 Da moleküler ağırlıklı olan Epo %30 karbonhidrat (%11'i sialik asit, %11'i total hekzos, %8'i N-asetilglukozamin) içerir. Epo miktarları ünite olarak belirtilir. Epo'yu kodlayan gen insanda 7.kromozomda bulunur; 193 amino asit polipeptidde 4 intron ve 5 ekzon içerir (2).

2 . 4 . 1 . ERİTROPOEZ REGÜLASYONUNDA ERİTROPOETİNİN ROLÜ

Eritrositler nükleusları olmayan ve protein sentezleyemeyen hücrelerdir. Bu yüzden yaklaşık 120 gün süren yaşam süreleri vardır. Buna göre günde yaklaşık %0.8 oranında yıkımları olur ve sabit miktarın sağlanması için aynı miktarda üretilmelidir. Eğer eritron normal fonksiyon görebiliyor ve gerekli besinleri alabiliyorsa anemi, hipoksi ya da hemolizin artması durumlarında eritropoez 5-8 kat artabilir. Bunun yanında hiperoksi durumlarında, kırmızı hücre kütlelerinin artmasıyla ya da oksijen kullanımının azalması ile eritropoez oranında azalma olur. Erslev tarafından keşfedilmesinden kısa bir süre sonra Epo'nın normal şartlarda ve stimuluslara cevaplarda, eritropoezin primer düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir.

Hematopoetik hücrelerin yaklaşık %0.1'i kemik iliğinde dinlenme halinde bulunan pluripotent kök hücreleridir (G_0). Bu hücreler aynı zamanda dolaşımda da bulunurlar, stromal hücre yüzeylerinde lektinlerle interaksiyona girerler ve hematopoetik mikroçevreye bağlanırlar. Bağlanmalarının ardından lenfositik, eritrositik, myelomonositik yada megakaryositik hücre serilerini oluşturmak üzere birleşirler. Eritroid serideki en erken birleşen hücre burst-forming unit eritroid (BFU-E)'dir. Stem cell faktör, granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktörler (GM-CSF) ve interlökin-3 (IL-3)'ü içeren büyüme faktörlerine maruz kalırlar. Bu maddelerin spesifik reseptörlerle interaksiyonu, bu hücrelerin hücre döngüsüne girmeleri ile sonuçlanır. Böylece coloni-forming unit eritroid (CFU-E) oluşur. Proeritroblastların öncüleri olan CFU-E, rutin mikroskopik incelemede, kemik iliği aspiratlarında yada biyopsilerinde tespit edilemez. Hemen hemen tüm CFU-E'ler membranlarında maksimum sayıda Epo reseptörleri içeren, dolaşan hücrelerdir. Bu yüzden Epo için primer hedef hücrelerdir. Epo'nun CFU-E üzerindeki spesifik reseptörü ile etkileşimi, eritropoezin günlük oranını belirleyen bir faktördür. Plazma Epo miktarı, CFU-E nin sayısı ve fonksiyonel bütünlüğü ile değişim göstermektedir.

Eritropoetinin geç Bfu-E ve CFU-E üzerindeki reseptörleri ile ilişkisi sonucunda orta ve geç Bfu-E 'ler proliferer olur, CFU-E yaşam süresi apoptosis inhibisyonu ile artar ve CFU-E terminal matürasyonu hızlanır. Terminal matürasyon, CFU-E üzerindeki Epo reseptörünün ligandıyla interaksiyonu sonucunda başlar, normoblastın çekirdeğini kaybetmesi ve retikülositlerin oluşumu ile sonlanır. Takip eden üç gün içinde ise retikülositler olgun eritrositlere dönüşürler (23).

2 . 4 . 2 . ERİTROPOETİN ÜRETİMİNİN DÜZENLENMESİ

Epo üretim miktarı başlıca renal oksijenizasyon derecesine göre regüle edilmektedir. Son çalışmalarda, hipoksiyi algılayan yapının renal hem proteini olduğu düşünülmüştür. Uygun doku oksijenizasyonu sağlandığında bu protein oksijene bağlanabilir ve Epo üretimini inhibe eder, buna karşın

oksijen yokluğunda bu hem proteinin deoksi formu Epo sentezini indükler (24). Epo üretimi ise birçok hormonlarla, nutrisyonel faktörlerle, sitokinlerle ve eritron büyüklüğü ile modüle edilmektedir (23).

Epo, kemik iliğindeki eritroid öncülerinde bulunan spesifik yüksek afiniteli reseptörlere bağlanarak etki gösterir. Bu interaksiyon, eritroid öncülerinin proliferasyonunu ve maturasyonunu stimüle eder. Alternatif olarak Epo'nun DNA hasarını ve eritroid öncülerinin programlı ölümlerini önleyerek onların maturasyonlarını sağladığı da düşünülebilir.

Epo'nun kırmızı kan hücrelerinin oluşumunda kritik rol oynamasına karşın, IL-3 ya da GM-CSF gibi diğer hematopoetik growth faktörleri de eritropoezde rol oynamaktadır. Bu faktörler, erken eritroid öncülerinin relatif olarak Epo etkilerine rezistan olma durumlarında önem kazanmaktadırlar. Bunun yanında demir, folik asit, vit B12 gibi eritropoetik kofaktörler de eritropoezde önemlidir (24).

Epo'nun serum düzeyi doku oksijenizasyonu ile ters orantı gösterir. Serum Epo düzeyleri; anemi, sağdan sola kardiyak şant ya da kronik obstrüktif pulmoner hastalıklar gibi doku hipoksisine yol açan durumlarda yükselir. Epo ile kırmızı hücre kütle artımı, doku hipoksisini düzeltir ve serum Epo düzeyi önceki seviyesine döner.

Hipoksi ile regülasyonun yanında Epo düzeyleri, sirkadiyen ve farmakolojik modülasyonlarla da değişim gösterir. Akşamları sabah saatlerine göre serum Epo düzeyleri daha yüksektir. Bunun yanında teofilin ile serum Epo düzeyleri azalma gösterir.

Serum Epo düzeyi ile Hb düzeyleri arasındaki ilişki klinikte yararlıdır. Komplike olmayan demir eksikliği anemisinde (Hb yaklaşık 11g/dl) serum Epo düzeyleri yükselme gösterir, Hb'nin daha fazla düşüşü ile Epo yükselişi artar (82,83).

2 . 4 . 3 . KRONİK HASTALIK ANEMİSİNDE ERİTROPOETİN

Kronik hastalık anemisi inflamatuvar hastalıklar, enfeksiyonlar ya da malignansiler ile ortaya çıkan ve demir eksikliği anemisinden sonra ikinci sıklıkta görülen anemidir (77). Serum Epo düzeyi artmış olmasına rağmen bu artış demir eksikliği anemisindekine göre azdır ve bu bozulmuş cevap olarak adlandırılır (25).

Serum Epo düzeyi ile demir eksikliğindeki Hb'nin ilişkisi rehber alınarak, diğer durumlarda görülen anemilerde serum Epo düzeylerinin, anemi derecesi ile uygun olup olmadığı tesbit edilir. Serum Epo düzeyleri RA, kanser, AIDS hastalarında tesbit edilen kronik hastalık anemilerinde uygunsuz düşüklük gösterir. Ayrıca son dönem böbrek yetmezliği olan anemik hastalarda serum Epo düzeyleri aneminin derecesine göre beklenenden düşüktür. Buna karşın serum Epo düzeylerinin anemi derecesine göre, demir eksikliği anemisiyle karşılaştırıldığında uygunsuz yükseklik gösterdiği durumlar da vardır. Bunlara örnek olarak miyelodisplaziler, miyelofibrozis, aplastik anemi ve zidovudin ile tedavi gören bazı AIDS hastaları verilebilir. Epo düzeylerinin kronik hastalık anemilerinde, demir eksikliği anemisinde beklenen değerlerden sapma göstermesinin nedeni aydınlatılamamıştır. Kronik hastalık anemisinde Epo üretiminin IL-1 ve TNF gibi inflamatuvar mediatörlerin salgılanmasıyla azalabileceği düşünülmektedir (24).

Epo, BFU-E'in hücre döngüsüne girişini sağlar ve CFU-E'in apoptosise gidişini önler. Epo, globin zinciri genlerinin transkripsiyonunu, transferrin reseptörlerinin eritrosit yüzeyindeki ekspresyonunu ve membran proteinlerinin sentezini artırır (84). Kronik akut faz cevabında Epo üretimi ve fonksiyonu birçok sitokin etkisiyle bozulabilir. Epo'nun bozulmuş fonksiyonunun, sistemik otoimmün hastalıklarda görülen kronik hastalık anemisi patogeneğinde rol oynadığı düşünülebilir. Sistemik otoimmün hastalıklarda azalmış Epo üretimine neden olan iki ihtimal vardır: birincisi

böbreklerde interstisyal-peritübüler bölgede sitokinlerin yaptığı hasar, diğeri ise böbrek peritübüler hücre bölgesindeki vasküler lezyondur (1).

2 . 5 . ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA ANEMİ

Romatoïd artrit hastalarının yaklaşık %50'sinde anemi görölmektedir (85), en sık nedenleri ise demir eksikliği anemisi ve kronik hastalık anemisidir (86). Kronik hastalık anemisi, demir eksikliği anemisinden genelde vücut demir depolarının değeriendirilmesiyle ayırd edilir. Kronik hastalık anemisi inflamasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır ve RA'deki hastalık aktivitesinin şiddeti ile ilişkili olduğı gösterilmiştir (77,87,11). RA'de, özellikle yüksek hastalık aktivitesinin bulunduğı durumlarda kronik hastalık anemisi sıklıkla görölmektedir ancak katkıda bulunan mekanizmaların tanımlanmasına karşın kesin patogenezi belli değildir (12). Bunlar; demirin absorpsiyonunda ve makrofajlardan salınımindaki bozuklukları ve inflamatuvar sitokinlerin disregölasyonunu içermektedir. Epo, kırmızı kan hücrelerinin gelişimindeki major fizyolojik büyüme faktörüdür ve yapılan çalışmalarda Epo düzeylerinin anemik RA hastalarında yükselmesine karşın, anemik demir eksikliği olan kontroller kadar yüksek olmadığı gösterilmiştir. Bu da RA'de Epo üretiminin yetersiz olduğunu düşündürür (7).

İnflamatuvar sitokinlerin, özellikle $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, interferon γ RA'deki kronik hastalık anemisine katkıda bulunabilir diye düşünölmektedir. $TNF\alpha$, anti tümör aktivitesinin yanında hematopoetik öncü hücreleri üzerinde de etkilidir; in vitro $TNF\alpha$ 'nın olgun eritroid (CFU-E), olgunlaşmamış eritroid (BFU-E) ve granülosit makrofaj koloni (CFU-GM) oluşumlarını inhibe ettiğı gösterilmiştir (Ü). $TNF\alpha$ 'nın in vitro makrofaj demir salınımini inhibe ettiğı gösterilmiştir ve $TNF\alpha$ verilen hayvanlarda düşük serum demiri ve korunan demir depoları ile seyreden anemi gelişimi olmuştur. $TNF\alpha$ aynı zamanda in vitro ve in vivo kemik iliğı kültürlerinde erken kırmızı hücre kolonilerinin oluşumunu inhibe etmektedir (89). Özellikle $TNF\alpha$ ve IL-6'nın eritrosit

öncülerinin proliferasyonlarını ve diferansiasyonlarını inhibe ederek, demir metabolizmasını düzenleyerek ve/veya Epo üretimini baskılayarak etki gösterdiği düşünülmektedir (12).

TNF α serum düzeylerinin kronik hastalık anemisinde hemoglobin ve RA hastalık parametreleri ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (11,22). Bu bulgular TNF α 'nın, eritroblastların Epo'ya olan sensitivitesini azaltarak kronik hastalık anemisine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

RA'li anemik hastalarda demir eksikliği anemisine de sıkça rastlanmaktadır. RA hastalarında serum ferritin düzeylerinin 60 ng/ml olmasının demir eksikliğini gösteren güvenilir bir indikatör olduğu ortaya konulmuştur (31).

2 . 6 . TNF , EPO , FERRİTİN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

Eritropoetin ölçümlerinde ELISA, RIA ve kemiluminesan yöntemleri kullanılmaktadır. TNF ölçümünde ise ELISA ve IRMA yöntemleri uygulanmaktadır. Ferritin tesbiti de ELISA, IRMA ve kemiluminesan yöntemlerle olmaktadır.

2 . 6 . 1 . RADYOİMMUNOASSAY (RIA)

Ligand ile sabit miktarda bulunan radyoaktif işaretli ligand, belli sayıda bulunan antikor bağlanma bölgeleri için yarışır. İyodun radyoaktif izotopları (^{125}I , ^{131}I) ve tritium (^3H) işaretleyici olarak kullanılır. Antikor konsantrasyonu genellikle işaretli materyalin %30-%80' ini bağlamaya yeterlidir. İşaretli olmayan ligandın eklenmesi total ligand miktarını artırır, fakat antikor bağlanma bölgeleri için yarışma ile antikorla bağlanacak işaretli ligand miktarı azalacaktır. Seperasyon basamağının ardından antikora bağlanan radyoaktivite tesbit edilir (90,91).

2 . 6 . 2 . İMMUNORADYOMETRİK ASSAY (İRMA)

İşaretli antikorun kullanıldığı analizler immunometrik analizlerdir, radyoaktif işaretli antikor kullanımı immunoradyometrik assay (İRMA) olarak adlandırılır. Örnekteki ligand , solid yüzeye tutturulan ligand ile işaretli antikorun bağlanma bölgeleri için yarışır. Solid yüzeye bağlanan işaretli antikor , fazla işaret ve örneğin uzaklaştırılmasının ardından tesbit edilir (90,91).

2 . 6 . 3 . KEMİLUMİNESAN İMMUNOASSAY

Kemiluminesans, kimyasal reaksiyon sırasında üretilen ışık emisyonuna verilen isimdir. İsoluminol ve akridinyum esterleri kemiluminesant işaretleyicilerin en önemli örnekleridir. İsoluminolün hidrojen peroksit ile bir katalist (örn; mikropereksohidaz) varlığında oksidasyonu 425 nm 'de nisbeten uzun süreli ışık emisyonu oluşturur ve akridinyum esterlerinin alkalin hidrojen peroksit ile deterjan (örn; Triton X-100) varlığında oksidasyonu 429 nm 'de hızlı ışık parlaması oluşturur. Akridinyum esterleri yüksek spesifik aktiviteli işaretleyicilerdir (90,91).

2 . 6 . 4 . ENZİM İMMUNOASSAY (EIA)

Enzim immunoassayı enzimlerin katalitik özelliklerini kullanarak tesbit ve miktar belirtimi sağlayan bir immunolojik reaksiyondur. Enzimle işaretlenmiş antikor ya da antijenler ilk olarak ligand ile reaksiyon verirler, daha sonra ise enzimin substratı ortama eklenir. Takiben substratın konsantrasyonunda meydana gelen azalma ya da oluşan ürünün artan konsantrasyonunun ölçümü ile antijen- antikor reaksiyonunun tesbiti ve miktar belirtimi yapılır. Alkalen fosfataz, horseradish peroksidaz, glukoz-6-dehidrogenaz ve β -galaktosidaz en sık kullanılan enzimlerdir.

Monitorizasyonda değişik tesbit edici sistemler kullanılmaktadır. Fotometrik olarak ölçülebilen bileşiklerin ortaya çıkardığı yöntemler çok popülerdir (90,91).

2 . 6 . 4 . 1 . ENZİM LİNKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Heterojen EIA tekniğidir. Bu yöntemde reaksiyon komponentleri bir solid faz yüzeyine (mikrotiter well, manyetik partikül ya da plastik boncuk gibi) nonspesifik olarak adsorplanmıştır. ELISA tekniğindeki en yaygın yaklaşım incelenecek antijen için solid faz yüzeyine bilinen bir antikorun bağlanmasıdır. Antijeni aranacak örnek solid faz yüzeyine uygulanır, antijen-antikor bağlanması sağlanır, yıkama işleminden sonra enzimle işaretlenmiş antikor (bağlı antikordan farklı) eklenmesiyle; solid faz antikoru + antijen + antikor + enzim şeklinde sandviç kompleks oluşur. Bağlanmayan fazla antikor yıkama ile uzaklaştırılır ve enzim substratı eklenir. Enzim katalitik olarak substratı ürüne dönüştürür ve bunun da miktarı örnekte bulunan antijen miktarı ile doğru orantı gösterir. Reaksiyon sonucunda oluşan rengin kolorimetrik ölçümü ile miktar belirtimi yapılır (90).

3 . GEREÇ VE YÖNTEMLER

3 . 1 . GEREÇLER

3 . 1 . 1 . KULLANILAN ALETLER

Santrifüj	Hettich Rotina 48
Derin dondurucu	Sanyo -80°C Ultra Low
Otomatik pipet	Gilson, Scorex
Manyetik karıştırıcı	Elektromag
Yıkayıcı	Washer 400(Mikroelisa system Organon)
Okuyucu	Mikroplate Autoreader (Bio-tek EL3115L)
Kan sayım cihazı	Coulter
Otomatik immunoassay sistem	Immulite One Bio DPC (USA)
Otoanalizör	Olympus AU5200 (Japonya)

3 . 1 . 2 . TİCARİ KİTLER

TNF α	Roche (Cat no:1425 943)
Epo	Roche (Cat no:1693 417)
Ferritin	Bio DPC (Lot no:10245)
Demir	DMA (Lot no:
TDBK	DMA (Lot no:
Kreatinin	Biocon (Lot no: A898)
CRP, RF	RapiTex

3 . 2 . DENEY MATERYALİ

Bu çalışmada, daha önceden RA tanısı alarak SSK İzmir Eğitim Hastanesi Romatoloji Polikliniği ve Dokuz Eylül Üniversitesi Romatoloji Polikliniklerinde takip edilen 32 anemik ve 31 anemik olmayan toplam 63 hasta ile 20 kişiden oluşan sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldı.

Anemik hastalar kadınlarda Hb değerlerinin 12 g/dl, erkeklerde ise 13,5 g/dl altında olmasıyla sınıflandırıldı.

Hasta grubu yaş ortaması $54,6 \pm 11.7$ olan 51 kadın, 12 erkek, sağlıklı kontrol grubu ise ortalaması $43,7 \pm 11.4$ yaş olan 15 kadın, 5 erkek hasta içeriyordu. Hasta grubunun ortalama hastalık süresi $8,95 \pm 8.8$ yıldır.

Demir tedavisi alan, makrositozu, vit B12 ile folat eksikliği, gastrointestinal sistem kanama hikayesi ve bulgusu olan, başka bir inflamatuvar, enfeksiyöz ve malignensi teşhisi alan hastalar çalışmaya alınmadı.

Anemik olan ve olmayan hasta gruplarının aldıkları tedaviler arasında önemli bir fark yoktu.

Her hastadan 20 ml kan alındı, hemen serumları ayrılarak -70°C 'de analiz süresine kadar saklandı. Serum eritropoetin ve $\text{TNF}\alpha$ düzeyleri ELISA ile, ferritin düzeyleri kemiluminesan yöntemle Immulite One (Bio DPC) cihazında, demir- demir bağlama kapasiteleri ile kreatininleri kolorimetrik yöntemle Olympus AU5200 otoanalizöründe, Hb ve Htc değerleri otomatik kan sayım cihazında değerlendirilmiştir.

3 . 3 . YÖNTEMLER

3 . 3 . 1 . ERİTROPOETİN

ELISA yöntemi ile serum Epo düzeyleri Roche marka (Lot no: 90108720) kitle ölçüldü.

Test prensibi 2 basamakta gerçekleşir :

- 1)** Epo simultan olarak, anti-Epo-kaplı mikrotiter plate yüzeyine ve peroksidazla konjuge edilmiş tesbit edici antikora bağlanır.
- 2)** Yıkama işleminden sonra kompleksteki bağlı peroksidaz (HRP) tetrametilbenzidin (TMB) substratı ile reaksiyona girer ve fotometrik tesbit yapılır. Oluşan rengin yoğunluğu Epo konsantrasyonu ile orantılıdır.

Şekil: hEPO ELISA test prensip şeması

3 . 3 . 1 . 1 . YÖNTEMİN UYGULANIŞI

hEPO kontrol serumu ile anti-h EPO-HRP, 500 µl distile su ile çözüldü. hEPO standartları ise 1 ml distile su ile çözüldü. 250 µl anti-h EPO-HRP solusyonu 4.75 ml inkübasyon tamponuna ilave edilip karıştırıldı. Tüm reaktifler kullanımdan önce 15-25°C'ye getirildi (TMB substratı hariç).

-80°C'de dondurulan tüm serum örnekleri oda sıcaklığında çözüldü. Mikrotiter well'lere örnek tamponu (solusyon 5) 30 µl , daha sonra ise kontrol serumu, standartlar ve serum örnekleri 20µl pipetlendi. Takiben 50µl immunoreagent (solusyon 9) ilave edildi. Solid faz yüzeyi üzeri kapatılarak 3 saat 300 rpm'de shaker'a konuldu. Solusyon 6 ile 3 defa (3x300 µl) 1 dakika içinde yıkandı, yıkama solusyonu aspirasyonla uzaklaştırıldı ve TMB substrat (solusyon 7) 100 µl düzeyinde eklendi. Shaker ile 300 rpm'de 20

dakika inkübasyona bırakıldı. 25 µl TMB stop solusyonu eklendikten sonra shaker'da 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Stop solusyonu eklenmesinden sonra 5 dakika içinde 450 nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbanslar Y eksenine, Epo standartlarının konsantrasyonları X eksenine işaretlenerek semilogaritmik kağıda kalibrasyon eğrisi çizildi. Bilinmeyen konsantrasyonlar tespit edildi.

3 . 3 . 2 . h-TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR α

Serum TNF α düzeyleri ELISA yöntemiyle Roche marka (Lot no :90161320) kitle çalışıldı.

Test prensibi 2 basamakta gerçekleşir:

- 1) h TNF α , biotin-işaretli antikora ve peroksidazla konjuge edilmiş tesbit edici antikora bağlanır. Bu kompleks biotin- işaretli antikor ile streptavidin kaplı mikrotiter plate yüzeyine bağlanır.
- 2) Yıkama işlemini takiben peroksidaz (POD) tetrametilbenzidin (TMB) ile reaksiyon verir ve fotometrik olarak tesbit edilir. Renk yoğunluğu, h TNF α konsantrasyonu ile orantılıdır.

3 . 3 . 2 . 1 . YÖNTEMİN UYGULANIŞI

Anti-h TNF α -biotin ve anti-h TNF α -POD 1,2 ml distile su ile standartlar ve kontrol serumu ise 0,5 ml distile su ile çözüldü. Uygun well'lere standartlar, kontrol serumu ve örnekler 20µl pipetlendi. Anti-h TNF α -biotin, anti-h TNF α -POD ve inkübasyon tamponu içeren solüsyon 200 µl pipetlendi ve well'lerin üzeri kapatılarak 350 rpm'de shaker'da inkübe edildi. Solüsyonları uzaklaştırılmasının ardından 3 defa yıkama işlemi yapıldı. 200µl Substrat solusyonu eklendi ve karanlıkta 15-25°C'de shaker'da inkübe edildi. 50µl stop solusyonu eklendi ve 450nm'de fotometrik okuma yapıldı. Standart konsantrasyon ve absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizildi, bilinmeyen konsantrasyonlar tesbit edildi.

3 . 3 . 3 . FERRİTİN

Serum Ferritin düzeyleri kemiluminesan yöntemle İmmulite marka (Lot no: 10245) kitle ölçüldü.

3 . 3 . 4 . DEMİR ve TOTAL DEMİR BAĞLAMA KAPASİTESİ

Serum Demir ve Total Demir Bağlama Kapasitesi ölçümleri fotometrik yöntemle DMA marka (Lot no:) kitle Olympus AU5200 otoanalizöründe çalışıldı.

3 . 3 . 5 . KREATİNİN

Serum Kreatinin düzeyleri ölçümü fotometrik yöntemle Biocon marka (Lot no : A898) kitle Olympus AU5200 otoanalizöründe çalışıldı.

4 . BULGULAR VE İSTATİSTİK

Bu çalışmanın sonuçları RA'de görülen aneminin serum Epo ve $TNF\alpha$ düzeylerinin artışı ile birlikte seyrettiğini göstermiştir. RA'li hastaların $TNF\alpha$ düzeyleri, kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulundu ($p<0,003$). RA'li hastaların Epo düzeyleri de kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek tesbit edildi ($p<0,008$).

Anemik ve anemik olmayan RA'li hastaların $TNF\alpha$ düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptandı ($p<0,008$), ancak ortalaması 92,341 olan kronik hastalık anemili RA'liler ile ortalaması 58,193 bulunan demir eksikliği anemili RA'liler arasındaki fark anlamlı bulunamadı ($p>0,05$).

Benzer olarak anemik RA'li hastalar ve anemik olmayan hastalar serum Epo düzeylerine göre karşılaştırıldığında aralarında önemli fark bulundu ($p<0,001$), kronik hastalık anemisi olan hastalar ile demir eksikliği olan hastalar arasında ise anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0,05$).

$TNF\alpha$ ve Epo düzeylerinin arasında ise kuvvetli bir pozitif korelasyon olduğu tesbit edildi ($r= 0,556$, $p<0,0001$).GRAFİK

CRP düzeylerinin $TNF\alpha$ ile önemli derecede pozitif korelasyon gösterdiği ($r=0,423$ $p<0,001$), benzer şekilde RF düzeylerinin de $TNF\alpha$ seviyeleri ile önemli derecede pozitif korelasyonunun olduğu saptandı ($r=0,352$ $p<0,005$).

CRP ve RF düzeylerinin serum Epo düzeyleri ile kuvvetli bir pozitif korelasyon gösterdiği tesbit edildi ($r=0,515$ $p<0,0001$; $r=0,396$ $p<0,001$).

CRP ve RF düzeyleri de kendi aralarında korelasyon gösteriyordu ($r=0,394$ $p<0,001$).

Hastalık süresi ile Hb, Htc ve demir düzeyleri arasında negatif korelasyon tesbit edildi ($r=-0,407$ $p<0,001$; $r=-0,419$ $p<0,001$; $r=-0,336$ $p<0,007$).

Aynı zamanda hastalık süresinin Epo değerleri ile de pozitif korelasyon gösterdiği saptandı ($r=0,274$ $p<0,03$).

Hb değerleri ile sedim arasında negatif korelasyon vardı ($r=-0,254$ $p<0,045$), Hb ile $TNF\alpha$ düzeyleri arasında da negatif korelasyon vardı ($r=-0,267$ $p<0,034$). Sedim değerleri ile Epo arasında pozitif ilişki vardı ancak sedim ile $TNF\alpha$ arasında korelasyon saptanamadı ($p>0,05$). Htc ile serum Epo düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğu tesbit edildi ($r=-0,250$ $p<0,05$). Ancak EPO ile Hb değerleri arasındaki fark anlamlı değildi ($p>0,05$).



5 . TARTIŞMA

Kronik romatoid artrit hafif-orta şiddette seyreden anemi ile karakterizedir, fakat altta yatan patofizyolojik mekanizma açıklık kazanmamıştır. Eritrositlerin kısalmış ömürleri ile azalmış üretimleri en önemli faktörler olarak düşünülmekte ancak mekanizması bilinmemektedir. Kronik hastalık anemisinin patogeneze yönelik iki faktörün rol oynayabileceği düşünülmektedir. Birincisi immunoloji, diğeri ise hematoloji ile ilgili hipotezlerdir. İmmunolojik nedenler ele alındığında en başta birçok sitokinin aktivitesini düzenleyen $TNF\alpha$ akla gelmektedir. $TNF\alpha$ immunitenin ve inflamasyonun önemli bir mediatörüdür, biyolojik aktiviteleri ile (nötrofillerin aktivasyonu, arasıdonik asit metabolitlerinin sinovyal hücrelerden salınımı, kartilaj rezorbsiyonunu uyarması ve kartilaj dokudan proteoglikan salınımını inhibe etmesi) RA'deki kronik inflamasyonun önemli bir mediatörü olabilir diye düşünülmektedir. $TNF\alpha$ özellikle inflamatuvar hastalıklarda üretilmekte ve hematopoetik hücre proliferasyonu ile interferans göstermektedir.

Hematoloji orijinli varsayımlarda ise Epo üretiminde ya da işlevinde bozukluk olması akla gelmektedir. RA'de görülen anemide Epo'nın rolü de açık değildir. RA'deki anemiye eritropoetin cevabını araştıran önceki çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. Bazıları cevabı bozulmuş olarak, bazıları ise normal bulmuşlardır. RA'li hastaların anti- $TNF\alpha$ ajanlarla ya da rekombinant insan Epo'ı verilmesi ile anemilerinin düzelme göstermesi de bu hipotezleri desteklemiştir ().

Eritropoez üzerindeki $TNF\alpha$ etkileri için geliştirilen birçok hipotez vardır. Bunlardan birisi $TNF\alpha$ 'nın monositlerden IL-1 üretimini stimüle ederek eritropoezi baskılaması, diğeri muhtemel etkisi ise eritrosit öncülerine $TNF\alpha$ 'nın direk etkisidir. $TNF\alpha$ 'nın protein sentezini azaltabilme yeteneği vardır ve teorik olarak RA'de anemili hastalarda Epo sentezini baskılayabilir (EJ).

Romatoid eklem hücre kültürlerinde üretilen IL-1'in dominant düzenleyicisinin $TNF\alpha$ olduğu, eğer $TNF\alpha$ nötralize edilirse diğeri

proinflamatuvar sitokinlerin de inhibe olacağı görüşüyle, TNF α 'nın RA'de en büyük öneme sahip olan sitokin olduğı ve tedavideki hedef olabileceğı hipotezi gündeme gelmiştir.

Bir hipoteze göre anti-TNF α terapisi eklemlerde granülosit aktivasyonunu azaltmaktadır. Bazı çalışmalarda, TNF α blokajının endotelial bağlanmayı azalttığı gösterilmiştir (G-9,10,12) ve diğeri bir çalışmada ise sinovyal inflamatuvar hücre infiltratının azalmasının kemotaktik sitokin gradientinin yok oluşuna eşlik ettiğı düşünülmüştür (G). Bu gözlemler de TNF α 'nın RA'de inflamasyon bölgesindeki lökosit hareketliliğinin regülasyonundaki kritik rolünü desteklemektedir.

Romatoid sinovyal sıvısının yaklaşık %50'sinde TNF α proteininin arttığı, bu durumun ise özellikle hastalığın şiddeti ile korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur (M 82). TNF α proteinleri romatoid sinovyumundaki makrofajlarda fazla miktardadır, TNF α içeren hücrelerin kartilaj-pannus birleşim yerinde lokalize oluşu doku yıkımı yaptığını destekleyen bir bulgudur. TNF α 'nın plazma düzeylerinin artışı ise eklem ağrıları ile ilişkili bulunmuştur (J15).

Serum ferritin düzeyi altta yatan kronik hastalık olmadığında demir durumunu gösterir, fakat ferritin bir akut faz reaktandır ve inflamatuvar hastalıklarda genelde artmıştır. Birlikte demir eksikliği bulunduğunda serum ferritini düşer fakat bu düzey komplikasyonsuz demir eksikliğinde tesbit edilen düzeye ulaşamaz. RA'de 60 μ g/L seviyesi normal serum ferritin alt limiti olarak belirlenmiştir (x-45,46). Demir eksikliği, anemik RA'li hastalarda %27'ye kadar anemiye eşlik edebilmektedir. Kronik inflamatuvar hastalığı olan ve serum ferritini 30 μ g/L'den düşük bulunan hastalarda kesin olarak demir eksikliği vardır denebilir, 200 μ g/L'nin üzerindeki değerlerde ise demir eksikliği kesin olarak düşünülmaz (x). Bizim çalışmamızda da ferritini 30 μ g/L'nin altında olan 15 hastada eşlik eden demir eksikliği anemisi olduğı, ferritini 60 μ g/L'nin üzerinde olan 17 hastada ise sadece kronik hastalık anemisi olduğı tesbit edilmiştir.

TNF α 'nın RA 'de görülen kronik hastalık anemisinin patogenezinde yer alıp almadığını, yer alıyorsa bunu Epo üretimini inhibe ederek mi yoksa başka bir mekanizmayla mı (Epo işlevinin bozulması, eritroblastların Epo'ya sensitivitesinin azaltılması) gerçekleştirdiğini araştırma amacıyla yaptığımız bu çalışmada RA'li hastalarda, kontrol grubuna göre TNF α ve Epo düzeylerini anlamlı derecede yüksek tesbit ettik ($p<0,003$ ve $p<0,008$).

RA'li hastalar anemik olan ve olmayanlar olarak sınıflandırıldıklarında ise, anemik olan hastalarda bulduğumuz serum Epo düzeylerinin anemik olmayan hastalardaki düzeylerden ve kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğunu tesbit ettik ($p<0,001$). Serum ferritini 60 μ g/L'nin üzerinde olan hastaların Epo düzeyleri, serum ferritini 30 μ g/L'nin altında olan hastaların Epo düzeyleri ile benzerdi ($p>0,05$).

Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, Boyd ve arkadaşları 97 anemik RA'li hastada yaptıkları çalışmada serum Epo düzeylerini anemik hastalarda anemik olmayan hastalardan anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır, serum Epo'ı ile serum ferritini arasında ise korelasyon bulamamışlardır (h). Hochberg ve arkadaşları da anemik RA'lilerde anemik olmayan RA'lilerden daha yüksek Epo düzeyleri saptamışlardır (a₂-8). Birgegard ve arkadaşları ile Erslev ve arkadaşları bizim bulgularımızda olduğu gibi aneminin nedenine bağlı olmaksızın anemik RA'lilerde Epo'ı anemik olmayanlardan yüksek tesbit etmişlerdir (a₄-12,13). Nielsen ve arkadaşları 35 anemik hastada Epo düzeylerini kontrol grubundan önemli derecede yüksek tesbit etmişler ancak bu grubu ferritinlerine göre kronik hastalık anemisi ve demir eksikliği anemisi olarak sınıflandırdıklarında 2 grup arasında fark bulamamışlardır (a₃). Vreugdenhil ve arkadaşları da RA'li hastaları kronik hastalık anemisi olanlar, demir eksikliği olan anemik RA'liler ve anemik olmayan RA'liler olarak sınıflandırdıklarında 3 grupta da sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek serum Epo düzeyleri saptamışlardır ayrıca yine bizim çalışmamızla uyumlu olarak kronik hastalık anemisi olan RA'li hastalar ile demir eksikliği olan RA'liler arasında fark bulamamışlardır (a₁).

Bizim bulgularımızla çelişkili olarak, Salvarani ve arkadaşları ise anemik olan ve olmayan RA'lilerde serum Epo düzeylerini farklı bulmamışlardır, RA anemisinin patogenezinin bozulmuş Epo cevabı sorumludur diye rapor etmişlerdir (a₂).

Bu konuda yapılan bazı çalışmalarda (a₄, a₄-36, a₅) RA'li anemik hastalarda bulunan Epo düzeylerinin komplikasyonsuz demir eksikliğinde bulunan değerlere göre daha düşük olduğu, bu durumda RA'de Epo üretiminin baskılanıyor olabileceği belirtilmiştir (U-4-6). Farklı sonuç bulan diğer çalışmalarda ise bu hormonun metabolizmasının bozulmuş olabileceği ya da Epo'ya eritroblastların sensitivitesinin azalmış olabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçları, böbreklerden Epo salınımının azaldığı hipotezini desteklemiyordu, çünkü anemik hastalardaki değerler anemik olmayan hastalardan önemli derecede yüksekti. Ancak kronik hastalık anemisi olan hastalardaki düzeyler ile demir eksikliği olan RA'li hastaların sonuçlarının farklı olmayışı konusundaki çelişkili sonuçların, aneminin derecesindeki değişikliklerden ya da demir eksikliği anemisinin kronik hastalık anemisi ile birlikte olma ihtimalinden kaynaklanabileceğini düşündük.

Bulgularımızda anemik olmayan RA'lilerde sağlıklı kontrol grubuna göre Epo değerlerinin artmış bulunması ise, bu artışın kronik hastalık anemisi gelişmesini önleyici bir etkisi olabileceğini bize düşündürmüştür.

Bu çalışmada TNF α 63 RA hastasının 41'inde tesbit edilmiştir. TNF α düzeylerinin RA'li hastalardaki değerlerinin kontrol grubundan önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca TNF α düzeylerinin anemik RA'lilerde anemik olmayan RA'lilerden önemli derecede yüksek olduğu (p<0,008), kronik hastalık anemisindeki değerlerin demir eksikliğindeki değerlerle ise korelasyon göstermediği saptanmıştır. Bu bulgular TNF α 'nın RA'de görülen anemide önemli olduğunu düşündürmüştür.

TNF α düzeyleri ile Epo'nun önemli derecede pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgu, in vitro bazı çalışmalarda rapor edilen TNF α 'nın

Epo'in üretimini azalttığının tesbit edilmesi ile uyumlu değildir (1A-30,31) ancak diğer çalışmalarla uyumludur (1A, a,b).

Borzi ve arkadaşlarının da rapor ettikleri gibi bu çalışmada da anemisi olan ve olmayan tüm RA hasta grubunda bulunan $TNF\alpha$ düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunması, $TNF\alpha$ 'nın eritropoezi inhibe edici etkisinin yanında RA patogenezinde de santral rol oynayabileceğini düşündürmüştür, romatoid faktör (RF) ve C reaktif protein (CRP) ile $TNF\alpha$ 'nın yüksek derecede pozitif korelasyon gösterdikleri saptanmış, RA patogenezinde $TNF\alpha$ 'nın santral rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (f).

Voulgari ve arkadaşları 105 anemik RA'li ve 127 anemik olmayan RA'li hastada serum $TNF\alpha$ düzeylerini ölçmüş, anemiklerde $TNF\alpha$ düzeylerinin önemli derecede yüksek olduğunu saptamışlardır (a). $TNF\alpha$ 'nın RA'de hastalık aktivitesi ve anemi derecesini araştıran Vreugdenhil ve arkadaşları ise 24 hastayı içeren çalışmalarında RA'de kronik hastalık anemisinde serum $TNF\alpha$ düzeylerini yüksek bulmuş, bunun hastalık parametreleriyle korelasyon gösterdiğini saptamışlardır (b). Davis ve arkadaşları da $TNF\alpha$ 'nın kronik hastalık anemisi gelişiminde önemli olduğunu, ancak bunu Epo'yu baskılayarak değil muhtemelen kemik iliği kırmızı hücrelerine direk etkiyle gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir (a7).

Mansour ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise serum $TNF\alpha$ düzeyleri RA'li hastalarda normal bulunmuştur (H). Bir diğer çalışmada ise sinovyal sıvı ve plazmada $TNF\alpha$ düzeyleri tesbit edilemedi diye rapor edilmiştir (XX).

$TNF\alpha$ ve Epo'in eritropoezdeki etkilerini ortaya koymayı amaçlayan, farelerle yapılmış bir deneysel çalışmada $TNF\alpha$ ile eritropoezin supresyonu ekzojen Epo verilmesiyle önlenebilmiştir. Ratlarda $TNF\alpha$ 'nın kronik verilmesi (7 gün) ile eritrosit üretiminin azaldığı ve dolaşımdaki eritrositlerin ömürlerinin kısaldığı gösterilmiştir (ü).

Stockenhuber ve arkadaşları ise RA'li 69 hastada yaptıkları çalışmada serum Epo düzeyleri ile serum TNF α düzeylerini ölçmüşler, Epo düzeylerini anemik olanlarda anemik olmayan hastalardan daha yüksek bulmuşlardır, 19 hastada yüksek serum TNF α düzeyleri tesbit etmişler, bu düzeylerin Epo ile pozitif korelasyon gösterdiklerini saptamışlardır. RA'de Epo'ya cevabın bozulduğu, TNF α 'nın anahtar rol oynamasının muhtemel olduğu sonucuna varmışlardır (1A). Bizim çalışmamızın sonuçları da bu bulguları desteklemektedir.

RA'li anemik hastalarda tesbit ettiğimiz yüksek serum Epo düzeyleri Epo'nin anemiye cevabının olduğunu, ancak bunun bozulmuş bir cevap olma ihtimalini düşündürmüştür. Dolaşımda tesbit edilen TNF α 'nın RA'li hastalarda yüksek olması bu sitokinin hastalığın patogenezinde yer aldığını, anemik hastalarda daha yüksek bulunması ise aneminin etiopatogenezinde de önemli olduğunu destekleyen bir bulgu olarak karşımıza çıkmıştır. Serum Epo düzeyleri ile TNF α düzeylerinin pozitif korelasyon gösterdiklerinin saptanması ile Epo'ya bozulmuş cevaptan TNF α 'nın sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır.

6 . ÖZET

Romatoid artrit hastalarının yaklaşık %50'sinde hafif-orta şiddette seyreden anemi görülmektedir. Özellikle yüksek hastalık aktivitesinin bulunduğu durumlarda sıklıkla kronik hastalık anemisi gelişmektedir, ancak katkıda bulunan mekanizmaların tanımlanmasına karşın kesin patogenezi belli değildir. Sistemik otoimmün hastalıklarda görülen anemi, immunoloji ya da hematoloji orijinli olabilir. İnflamatuvar sitokinlerin, özellikle TNF α 'nın RA'de hastalık aktivitesinde ve aneminin ortaya çıkışında önemli olabileceği düşünülmektedir. RA'de görülen anemide Epo'nin rolü de hala çelişkilidir. RA'nin patogenezinin, teşhisini ve tedavisini aydınlatmada aneminin belirlenmesi ve tedavisi çok önemlidir.

TNF α 'nın ve Epo'nin RA'de görülen aneminin patogeneğinde önemli olabilecekleri düşünöldüğünden bu çalışmada 32 anemik ve 31 anemik olmayan toplam 63 RA hastasında serum TNF α ve Epo düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sonuçta kontrol grubuna göre TNF α düzeyleri anlamlı derecede yüksek tesbit edilmiş ($p<0,003$), serum TNF α konsantrasyonlarının Hb ile negatif korelasyon ($r=-0,267, p<0,03$), Epo ile yüksek derecede pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır ($r=0,556, p<0,0001$). TNF α ile Epo düzeylerinin RA'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı yükselişi yanında, anemik hastalarda da anemik olmayanlara göre daha yüksek olduğunun saptanması ($p<0,008, p<0,001$) bu parametrelerin RA anemisindeki önemlerini göstermiştir. Anemik hastalarda bulunduğumuz yüksek Epo düzeyleri Epo salınımının azalmasının değil, Epo'ya cevapta yetersizliğin olabileceğini, buradaki sorumlu faktörün ise TNF α olabileceğini düşündürmüştür.

9 . KAYNAKLAR

M-Arend W.P., Dayer J.M. (1995) Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism. 38(2):151-160.

a1-Vreugdenhil G., Kontoghiorghes G.J., Van Eijk H.G., Swaak A.J.G. (1991) Impaired erythropoietin responsiveness to the anemia in rheumatoid arthritis. A possible inverse relationship with iron stores and effects of the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one. Clinical and Experimental Rheumatology. 9:35-40.

a4-Vreugdenhil G., Wognum A.W., Van Eijk H.G., Swaak A.J.G. (1990) Anemia in rheumatoid arthritis: the role of iron, vitamin B12, and folic acid deficiency, and erythropoietin responsiveness. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 49:93-98.

a7-Davis, D., Charles, P.J., Potter, A., Feldman, M., Maini, R.N., Elliot, M.J. (1997) Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis: in vivo effects of tumour necrosis factor alpha blockade. *Br J Rheumatol*. 36(9):950-6.

a8-Manicourt D.H., Triki R., Fukuda K., Devogelaer J.P., Nagant de Deuxchaisnes C., Thonar E.J. (1993) *Arthritis Rheumatism*. 36(4):490-9.

g-Kendall R., Wasti A., Harvey A., Hill J., Chapman C., Norfolk D.R., Pullar T. (1993) The relationship of haemoglobin to serum erythropoietin concentrations in the anaemia of rheumatoid arthritis: the effect of oral prednisolone. *Br J Rheumatology*. 32(3):204-8.

h-Boyd H.K., Lappin T.R., Bell A.L. (1991) Evidence for impaired erythropoietin response to anemia in rheumatoid disease. *Br J Rheumatology*. 30(4):255-9.

m-Remacha A.F., Rodriguez-de la Serna A., Garcia-Die F., Geli C., Diaz C., Gimferrer E. (1992) Erythroid abnormalities in rheumatoid arthritis: the role of erythropoietin. *J Rheumatology*. 19(11):1687-91.

U-Davis D., Charles P.J., Potter A., Feldmann M., Maini R.N., Elliott M.J. (1997) Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis: in vivo effects of tumour necrosis factor α blockade. *British Journal of Rheumatology*. 36:950-956.

n-Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunology*. 14:397-440.

1A-Stockenhuber F., Keil M., Wurnig C., Kurz R.W., Gottsauner-Wolf M., Balcke P. (1994) Impaired erythropoietin responsiveness in anaemic

rheumatoid arthritis patients: potential relation to immune mechanisms. *Clinical Science*. 86,633-638.

a-Voulgari P.V., Kolios G., Papadopoulos G.K., Katsaraki A., Seferiadis K., Drosos A.A. (1999) Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology*. 92(2):153-60.

f-Borzi R.M., Arfilli L., Focherini M.C., Pulsatelli L., Meliconi R. (1993) Circulating tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 69(1):39-43.

EJ-b-Vreugdenhil G., Lowenberg B., Van Eijk H.G., Swaak A.J. (1992) Tumor necrosis alpha is associated with disease activity and degree of anemia in patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Clinical Investigation*. 22,488-493.

Ö-Walter F.(1995) Erythropoietin. *Annual Review Nutr*. 15:353-77.

P-Abels R.I., Rudnick S.A.(1991). Erythropoietin: Evolving Clinical Applications. *Experimental Hematology*. 19:842-850.

S-Peeters H.R.M., Lavrencic M.J., Raja A.N., Ramdin H.S., Vreugdenhil G., Breedveld F.C., Swaak A.J.G. (1996). Course and characteristics of anemia in patients with rheumatoid arthritis of recent onset. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 55:162-168.

T-Krantz S.B. (1995) Erythropoietin and the anemia of chronic disease. *Nephrol Dial Transplant*. 10(2):10-17.

X-Means R.T.

V-Lavrencic M.J., Peeters H.R.M., Wognum A., Vreugdenhil G., Breedveld F.C., Swaak A.J.G. (1997). Elevated levels of inflammatory cytokines in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis and anemia of chronic disease. *The Journal of Rheumatology*. 24:1504-9.

a2-Salvarani C., Casali B., Salvo D., Brunati C., Macchioni P.L., Massai G., Lasagni D., Rivasi P., Portioli I. (1991) The role of interleukin 1, erythropoietin and red cell bound immunoglobulins in the anemia of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 9:241-246.

a3-Nielsen O.J., Andersen L.S., Ludwigsen E., Bouchelouche P., Hansen T.M., Birgens H., Hansen N.E. (1990) Anemia of rheumatoid arthritis:serum erythropoietin concentrations and red cell distribution width in relation to iron status. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 49:349-353.

a5-Noe G., Augustin J., Hausdorf S., Rich I.N., Kubanek B. (1995) Serum erythropoietin and transferrin receptor levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Experimental Rheumatology*. 13(4):445-51.

ü-Johnson C.S., Cook C.A., Furmanski P. (1990) In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor- α : reversal with exogenous erythropoietin. *Experimental Hematology*. 18:109-113.

o-Bertero M.T., Cappio F.C. (1997) Anemia of chronic disorders in systemic autoimmune diseases. *Haematologica*. 82:375-381.

H-Al-Janadi M., Al-Balla S., Al-Dalaan A., Raziuddin S. (1993) Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *Journal of Clinical Immunology*. 13(1):58-67.

3-Feldman M., Brennan F.M., Maini R.N. (1996) Rheumatoid arthritis. *Cell. Review*. 85,307-310.

D-Feldmann M., Brennan F.M. Maini R.N. (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol. Review*. 14:397-440.

1-

2-

xx-Holt I., Cooper R.G., Denton J., Meager A., Hopkins S.J. (1992) Cytokine inter-relationships and their association with disease activity in arthritis. *British Journal of Rheumatology*. 31:725-733.

L-Rusten L.S., Jacobsen S.E.W. (1995) Tumor necrosis factor- α directly inhibits human erythropoiesis in vitro:role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood*. 85(4):989-996.

J-Moreland L.W., Baumgartner S.W., Schiff M.H., Tindall E.A., Fleischmann R.M., Weaver A.L., Ettlinger R.E., Cohen S., Koopman W.J., Mohler K., Widmer M.B., Blosch C.M. (1997) treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *The New England Journal of Medicine*. 337(3)141-147.

N-Zhang Y., Harada A., Bluethmann H., Wang J.B., Nakao S., Mukaida N., Matsushima K. (1995) Tumor necrosis factor is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55 deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF α in vitro. *Blood*. 86(8)2930-2937.

I-Maini R.M., Breedveld F.C., Kalden J.R., Smolen J.S., Davis D., Macfarlane J.D., Antoni C., Leeb B., Elliot M.J., Woody J.N., Schaible T.F., Feldman M. (1998) Therapeutic efficacy of multiple IV infusions of anti-TNF α monoclonal antibody combined with low dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 41(9):1552-1563.

F-Maini R.N., Taylor P.C., Paleolog E., Charles P., Ballara S., Brennan F.M., Feldman M.(1999) Anti TNF specific antibody(infliximab) treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis.*Ann Rheum Dis*. 58(1):156-160.

C-Steiner G., Tohidast-Akrad M., Witzman G., Vesely M., Studnicka-Benke A., Gal A., Kunaver M., Zenz P.,Smolen J.S. (1999) Cytokine production by synovial Tcells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 38:202-213.

G-Taylor P.C., Peters A.M., Paleolog E., Chapman P.T., Elliot M.J., McCloskey R., Feldmann M., Maini R.N. (2000) Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints TNF α blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 43(1):38-47.

A-Smolen J.S., Akrad M.T., Gal A., Kunaver M., Eberl G., Zenz P., Falus A., Steiner G. (1996) The role of T-lymphocytes and cytokines in rheumatoid arthritis. Review Article. *Scand J Rheumatol*. 25:1-4.

B-Weyand C.M. (2000) New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 39(1):3-8.

K-Pisetsky D.S.(2000) TNF blockers in rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine*. 342(11):810-811.

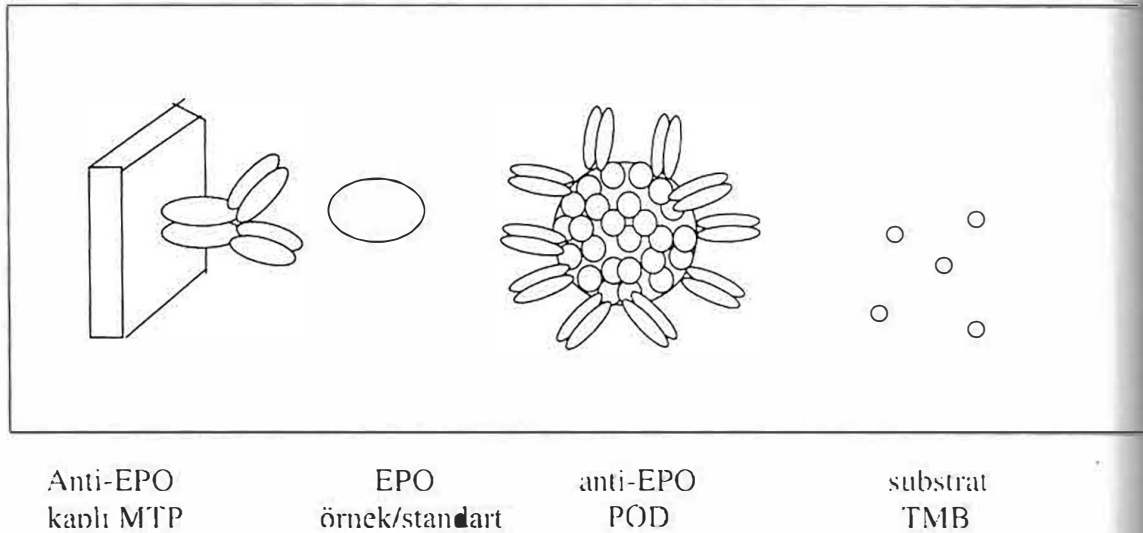
3 . 3 . YÖNTEMLER

3 . 3 . 1 . ERİTROPOETİN

ELISA yöntemi ile serum Epo düzeyleri Roche marka (Lot no: 9010572) kitle ölçüldü.

Test prensibi 2 basamakta gerçekleşir :

- 1) Epo simultan olarak, anti-Epo-kaplı mikrotiter plate yüzeyine peroksidazla konjuge edilmiş tesbit edici antikora bağlanır.
- 2) Yıkama işleminden sonra kompleksteki bağlı peroksidaz tetrametilbenzidin (TMB) substratı ile reaksiyona girer ve fotometrik yapılır. Oluşan rengin yoğunluğu Epo konsantrasyonu ile orantılıdır. Test prensibi şekil.. da gösterilmiştir.



Şekil: hEPO ELISA test prensip şeması

3 . 3 . 1 . 1 . EPO ELISA KİT İÇERİĞİ

Solüsyon 1: hEPO kontrol serumu; insan serumu, pozitif kontrol.

Kontrol Değeri: 80 mIU/ml.

Solüsyon 2: Anti-hEPO-peroksidaz: peroksidaz ile konjuge fare monoklonal antikor, tespit edici antikor.

Solüsyon 3a-3f: hEPO standartları;

3a: 0 mIU/ml.

3b: 11 mIU/ml.

3c: 20 mIU/ml.

3d: 41 mIU/ml.

3e: 86 mIU/ml.

3f: 179 mIU/ml.

Solüsyon 4: İnkübasyon tamponu.

Solüsyon 5: Örnek tamponu.

Solüsyon 6: Yıkama tamponu.

Solüsyon 7: TMB(Tetrametilbenzidin) Substrat solüsyonu.

Solüsyon 8: TMB stop solüsyonu.

3 . 3 . 1 . 2 . YÖNTEMİN UYGULANIŞI

hEPO kontrol serumu ile anti-h EPO-HRP, 500 µl distile su ile çözülür. hEPO standartları ise 1 ml distile su ile çözülür. 250 µl anti-h EPO-HRP solüsyonu 4.75 ml inkübasyon tamponuna ilave edilip karıştırılır. Tüm reaktifler kullanımdan önce 15-25°C'ye getirildi (TMB substratı hariç).

-80°C'de dondurulan tüm serum örnekleri oda sıcaklığında çözülür. Mikrotiter well'lere örnek tamponu (solüsyon 5) 30 µl , daha sonra kontrol serumu, standartlar ve serum örnekleri 20µl pipetlendi. Takiben 50 µl immunoreagent (solüsyon 9) ilave edildi. Solid faz yüzeyi üzeri kapatıldı. 1 saat 300 rpm'de shaker'a konuldu. Solüsyon 6 ile 3 defa (3x300 µl) 1 defa yıkandı.

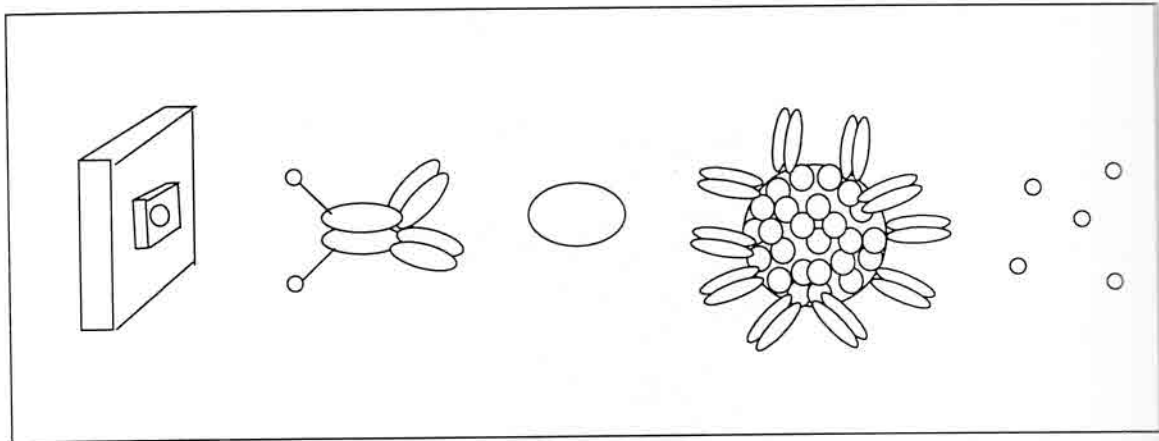
içinde yıkandı, yıkama solusyonu aspirasyonla uzaklaştırıldı ve TMB substrat (solusyon 7) 100 µl düzeyinde eklendi. Shaker ile 300 rpm'de 2 dakika inkübasyona bırakıldı. 25 µl TMB stop solusyonu eklendikten sonra shaker'da 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Stop solusyonu eklenmesinden sonra 5 dakika içinde 450 nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbanstaki X eksenine, Epo standartlarının konsantrasyonları X eksenine işaretlenerek semilogaritmik kağıda kalibrasyon eğrisi çizildi. Bilinmeyen konsantrasyonlar tespit edildi.

3 . 3 . 2 . h-TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR α

Serum TNF α düzeyleri ELISA yöntemiyle Roche marka (Lot no :90161329) kitle çalışıldı.

Test prensibi 2 basamakta gerçekleşir:

- 1) h TNF α , biotin-işaretli antikora ve peroksidazla konjuge edilmiş test edici antikora bağlanır. Bu kompleks biotin- işaretli antikor streptavidin kaplı mikrotiter plate yüzeyine bağlanır.
- 2) Yıkama işlemini takiben peroksidaz (POD) tetrametilbenzidin (TMB) reaksiyon verir ve fotometrik olarak tesbit edilir. Renk yoğunluğu, h TNF α konsantrasyonu ile orantılıdır. Test prensibi şekil...da gösterilmiştir.



Streptavidin
kaplı MTP

anti hTNF- α
biotin

hTNF- α
örnek/standart

anti hTNF- α POD
Fab fragmanı

TMB
substrat

Şekil: hTNF- α ELISA test prensip şeması

3 . 3 . 2 . 1 . hTNF α **ELISA KİT İÇERİĞİ**

Solüsyon 1: Anti-hTNF α -biotin; fare monoklonal antikoru, yakala antikor.

Solüsyon 2: Anti-hTNF α -POD.

Solüsyon 3a-3f: hTNF α standartları.

3a: 0 pg/ml.

3b: 41 pg/ml.

3c: 94 pg/ml.

3d: 208 pg/ml.

3e: 436 pg/ml.

3f: 935 pg/ml.

Solüsyon 4: hTNF α kontrol serum; pozitif kontrol.

Kontrol Değeri: 275 pg/ml.

Solüsyon 5: İnkübasyon tamponu.

Solüsyon 6: Yıkama tamponu.

Solüsyon 7: TMB substrat solüsyonu.

Solüsyon 8: TMB stop solüsyonu.

3 . 3 . 2 . 2 . YÖNTEMİN UYGULANIŞI

Anti-h TNF α -biotin ve anti-h TNF α -POD 1,2 ml distile su ile standartlar ve kontrol serumu ise 0,5 ml distile su ile çözüldü. Uygun well'lere standartlar, kontrol serumu ve örnekler 20 μ l pipetlendi. Anti-h TNF α -biotin, anti-h TNF α -POD ve inkübasyon tamponu içeren solüsyon 200 μ l pipetlendi ve well'lerin üzeri kapatılarak 350 rpm'de shaker'da inkübe edildi. Solüsyonlar uzaklaştırılmasının ardından 3 defa yıkama işlemi yapıldı. 200 μ l Substrat solüsyonu eklendi ve karanlıkta 15-25°C'de shaker'da inkübe edildi. 50 μ l stop solüsyonu eklendi ve 450nm'de fotometrik okuma yapıldı. Standart konsantrasyon ve absorbands değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizildi. bilinmeyen konsantrasyonlar tesbit edildi.

3 . 3 . 3 . FERRİTİN

Serum Ferritin düzeyleri kemiluminesan yöntemle İmmulite marka (Lot no: 10245) kitle ölçüldü. Ölçüm kimyasal reaksiyon sırasında üretilen ışık emisyonuna dayanan bir yöntem olan kemilüminesan yöntemle Immulite E1000 DPC cihazında yapıldı. Her örnekten 10 µL serum kullanıldı, antijen antikor birleşimi monoklonal fare anti-ferritini ile kaplı boncukların üzerinde gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi 30 dk olarak uygulandı. Kemiluminesan madde olarak adamantil dioksietan, enzim olarak ise poliklonal anti-ferritin antikoruna ile konjuge alkalen fosfataz kullanıldı.

3 . 3 . 4 . DEMİR ve TOTAL DEMİR BAĞLAMA KAPASİTESİ

Serum Demir ve Total Demir Bağlama Kapasitesi ölçümleri fotometrik yöntemle DMA marka (Lot no: UD 12-13,UD13-14) kitle Olympus AU5200 otoanalizöründe çalışıldı.

3 . 3 . 5 . KREATİNİN

Serum Kreatinin düzeyleri ölçümü fotometrik yöntemle Biocheman marka (Lot no : A898) kitle Olympus AU5200 otoanalizöründe çalışıldı.

3 . 3 . 6 . HEMOGRAM

Hb ve Htc değerleri Coulter otomatik kan sayım cihazında çalışıldı.

3 . 3 . 7 . CRP ve RF

Lateks aglütinasyon yöntemi ile RapiTeks marka kitle çalışıldı.

4 . İSTATİSTİK

Parametrik ve non parametrik dataların karşılaştırılmasında Student-t ve Mann Whitney U testleri kullanıldı. Gruplar arası korelasyon Spearman'ın korelasyon katsayısı kullanılarak değerlendirildi. 0,05'ten küçük olan p değerleri anlamlı kabul edildi.

5 . BULGULAR

Bu çalışmanın sonuçları; RA'de görülen aneminin, serum Epo ve TNFα düzeylerinin artışı ile birlikte seyrettiğini gösterdi. Tüm RA'li vakaların TNFα ve Epo düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p<0,003$, $p<0,008$).

Hasta grubunun yaş, cinsiyet, hastalık süresi ve Hb, Htc, sedim, demir, total demir bağlama kapasitesi, ferritin, CRP, RF, TNFα ve Epo değerleri Tablo I'de, kontrol grubunun değerleri ise Tablo II'de gösterildi.

Hasta grubunun Hb ve Htc değerleri ortalamaları sırasıyla $12,3\pm1,6$ g/dL ve $37,7\pm4,66$ %, sedim değerleri ortalaması 1 saatte $38,73\pm23,97$, demir ve total demir bağlama kapasitesi ortalamaları $51,5\pm27,9$ ve $313,1\pm89,4$ µg/dL, ferritin ortalaması $60,46\pm62,59$ ng/mL, TNFα ortalaması $57,6\pm10,5$ pg/mL, Epo ortalaması $20,47\pm38,62$ mIU/mL olarak saptandı. Kontrol grubu Hb ve Htc ortalamaları ise $13,48\pm0,99$ g/dL ve $40,73\pm2,70$ % olarak sedim değerleri ortalaması $8,85\pm2,5$ mm, demir ve total demir bağlama kapasiteleri ortalamaları $75,9\pm22,1$ ve $313,2\pm62,07$ µg/dL, ferritin ortalaması $51,05\pm24,74$ ng/mL, TNFα ortalaması $5,81\pm7,9$ pg/mL, Epo ortalaması ise $4,82\pm3,24$ mIU/mL olarak tespit edildi.

Kontrol grubu ile RA'li hastaların (anemik olan ve olmayan hastalar olarak ayrıca anemik hastalar ise kronik hastalık anemili olanlar ve demir eksikliği anemili olanlar şeklinde sınıflandırılarak) TNFα ve Epo değerleri ortalamaları arasındaki ilişkiler Grafik I ve Grafik II' de gösterildi.

Anemik ve anemik olmayan RA'li hastaların TNF α düzeyleri arasında anlamlı bir fark varken ($p<0,008$), kronik hastalık anemili RA'liler ile demir eksikliği anemili RA'liler arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Benzer olarak anemik ve anemik olmayan RA'li hastalar serum Epo düzeylerine göre karşılaştırıldığında, aralarında önemli fark bulunurken ($p<0,001$), kronik hastalık anemisi olan hastalar ile demir eksikliği olan hastalar arasında ise anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

TNF α ve Epo düzeylerinin arasında pozitif korelasyon olduğu tesbit edildi ($r= 0,556$, $p<0,0001$) bu korelasyon Grafik III 'de gösterildi.

CRP ve RF düzeyleri ayrı ayrı TNF α ve Epo düzeyleri ile pozitif korelasyon gösteriyordu (sırasıyla $r=0,423$ $p<0,001$, $r=0,352$ $p<0,005$, $r=0,556$ $p<0,0001$, $r=0,396$ $p<0,001$).

CRP ve RF düzeylerinin de kendi aralarında korelasyonu vardı ($r=0,396$ $p<0,001$).

Hastalık süresi ile; Hb, Htc ve demir düzeyleri arasında negatif korelasyon tesbit edilirken ($r=-0,407$ $p<0,001$; $r=-0,419$ $p<0,001$; $r=-0,336$ $p<0,001$) Epo değerleri ile pozitif korelasyon gösterdiği saptandı ($r=0,274$ $p<0,03$).

Hb değerleri ile; sedim ve TNF α düzeyleri arasında negatif korelasyon vardı ($r=-0,254$ $p<0,045$, $r=-0,267$ $p<0,034$). Sedim değerleri ile Epo arasında pozitif ilişki vardı ancak sedim ile TNF α arasında korelasyon saptanmadı ($p>0,05$). Htc ile serum Epo düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğu tesbit edildi ($r=-0,250$ $p<0,05$). Ancak EPO ile Hb değerleri arasında korelasyon anlamlı değildi ($p>0,05$).

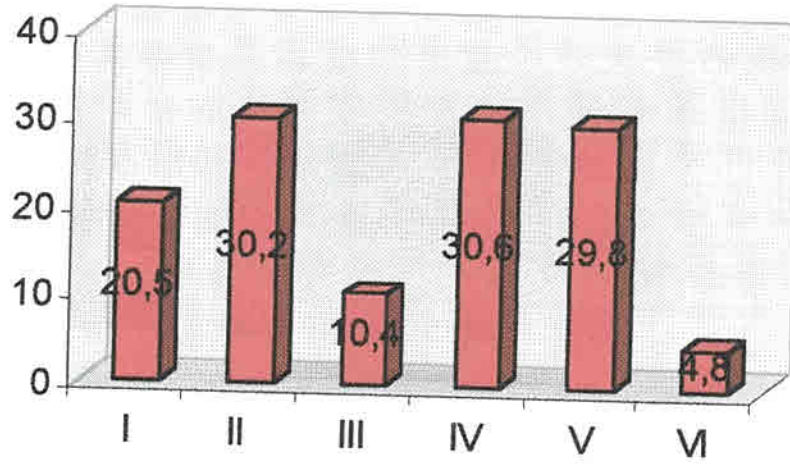
TABLO I: Hasta grubunun tanımsal ve biyokimyasal değerleri.

No	Adı Soyadı	Cins	Yaş (yıl)	H.Sür (yıl)	Hb (g/dL)	Htc (%)	Sedim (1saat)	Fe (µg/dl)	TDBK (µg/dl)	Ferritin (ng/ml)	CRP (mg/l)	RF (IU/ml)	TNF-α (pg/ml)	ESR (mm/s)
1	A.I	K	60	10	13,6	42,3	30	76	369	37	<6	<12	208	7
2	E.K	K	42	6	11,1✓	30	36	17	368	4,4	12	<12	23	46
3	H.Ç	K	40	4	11,1✓	32,4	42	37	440	18,6	>48	>96	126	168
4	F.Ö	K	41	2	12	35,9	2	115	260	7,9	<6	<12	20	92
5	A.U	E	53	2	13,2✓	41,3	16	43	384	71	24	>96	81	97
6	A.I	K	66	2	12,7	39,6	51	67	343	50,5	<6	<12	42	77
7	G.E	K	53	2	11,7✓	36,8	38	37	328	18,6	<6	48	-	70
8	N.U	K	53	28	9,9✓	32,4	25	20	267	11,4	<6	<12	-	32
9	R.K	K	70	20	8,7✓	28,6	67	14	344	7,2	>48	>96	214	20
10	F.A	K	46	1	12,3	36,9	30	48	312	63,4	<6	<12	-	37
11	N.G	K	58	16	11,9✓	38,5	30	38	30	96,1	<6	<12	14,3	33
12	H.Y	K	45	2	14	43	17	62	373	24,6	<6	>96	28	107
13	N.Ş	K	70	10	12,4	38,6	32	92	362	27,8	6	12	11	9
14	M.D	K	50	4	12,9	44,3	30	25	397	5,7	<6	8	-	32
15	H.T	K	60	16	9,8✓	31,3	40	27	394	26,9	<6	>96	14,3	57
16	E.D	E	56	7	14,2	42,9	26	78	247	55,8	<6	<12	-	32
17	I.Ş	K	68	18	9,5✓	30,5	83	45	211	214	6	<12	35	53
18	N.K	E	50	3	16,5	48,9	2	68	351	122	<6	>96	-	30
19	H.S	E	49	2	13,1✓	41,4	6	28	277	27,4	<6	<12	-	38
20	F.H	E	49	12	13,2✓	41,3	66	48	236	203	>48	>96	495	17
21	Y.Y	K	17	3	11,9✓	38,2	16	46	268	10	6	>96	29	16
22	A.K	K	66	30	9,3✓	30,2	95	29	242	60,6	<12	>96	20	87
23	F.E	K	43	1	13,5	41,6	21	114	284	40,1	<6	<12	-	11
24	E.A.H	K	48	28	11,6✓	35,6	49	43	239	164	24	<12	-	70
25	H.G	K	57	2	11,4✓	37,4	36	42	321	66,1	<6	<12	353	34
26	B.Ç	K	49	3	9,6✓	32,4	42	27	426	4	<6	<12	132	15
27	G.A	K	63	8	14	42	17	83	207	59,1	>48	>96	32	17
28	N.B	K	0	1	13,5	42,5	53	42	321	111	6	24	50	20
29	F.M	K	36	2	13,1	39,1	7	71	437	10,3	<6	<12	-	11
30	S.K	K	51	1	13	40	58	40	240	220	6	<12	-	11

No	Adı Soyadı	Cins	Yaş (yıl)	H.Sür (yıl)	Hb (g/dL)	Htc (%)	Sedim (1saat)	Fe (µg/dl)	TDBK (µg/dl)	Ferritin (ng/ml)	CRP (mg/l)	RF (IU/ml)	TNF-α (pg/ml)	EPR
32	N.A	K	29	2	9,3✓	30,5	5	47	255	69	<6	<12	41	30
33	S.A	K	32	1	13,6	42,3	20	63	311	110	<6	<12	20	54
34	N.D	K	60	10	9,8✓	32,5	87	26	387	64,4	<6	<12	11,5	-
35	S.G	K	60	4	12,5	38,8	40	68	251	69,3	24	<12	27	5
36	S.Y	K	35	7	13,5	39,3	37	39	463	12,6	<6	96	10	44
37	G.B	K	63	1	11,1✓	33,8	97	46	216	84,8	>48	>96	20	740
38	Z.Y	K	71	1	13,5	40,7	36	58	404	54,8	24	>96	57	28
39	F.U	K	60	7	11,8✓	33,8	19	44	355	23,9	24	<24	11,6	53
40	N.C	K	67	10	11,9✓	36,9	66	39	302	92,6	>48	>96	126	130
41	N.G	K	65	45	12,3	36,3	53	126	617	19,9	6	>96	-	37
42	G.B	K	59	15	13,6	40,0	23	54	314	48,4	<6	96	-	23
43	N.Ö	K	59	10	13,2	38,6	81	58	410	24,9	<6	>96	52	10
44	R.A	K	46	15	10,8✓	32,0	27	23	215	19,2	12	<12	20	117
45	N.Y	K	71	16	10,0✓	32,0	30	21	120	61	<6	<12	-	85
46	M.K	E	70	16	11,7✓	36,3	70	20	273	16,6	24	96	27	26
47	M.D	K	50	15	10,9✓	33,2	28	26	202	62,2	12	>96	175	20
48	A.T	E	70	8	14,8	50,4	81	54	272	144	>48	>96	41	40
49	Y.K	E	67	16	12,9✓	39,8	28	20	341	11,1	>48	>96	221	40
50	Ş.K	K	55	4	14,1	41,5	3	95	315	33,7	<6	<12	-	117
51	Ş.A	K	37	8	12,1	35,0	24	53	344	43,9	24	48	-	117
52	Ö.Ç	K	58	3	13,2	39,3	19	59	255	18,3	<6	48	-	117
53	A.B	K	62	1	13,7	40,2	37	101	233	73,9	<6	<12	-	117
54	F.C	K	63	9	10,8✓	32,7	74	27	268	94,1	24	<12	56	117
55	F.A	K	72	9	10,9✓	32,9	57	22	207	13,8	6	96	19	24
56	R.Ö	E	48	1	14,4	42,2	83	36	325	109	6	>96	-	117
57	H.K	E	56	5	14,9	46,2	40	68	460	42	12	>96	16,3	117
58	A.Ç	E	49	8	14,0	40,4	15	143	248	28,5	12	<12	-	117
59	C.K	E	55	3	13,2✓	39,8	46	31	314	60	24	>12	-	117
60	F.A	K	71	2	12,6	37,0	44	84	285	27,9	12	>96	572	117
61	S.I	K	55	5	11,1✓	33,3	19	35	431	60,6	<6	24	86	117
62	Y.A	K	40	3	13,0	38,8	31	54	351	8	<6	48	-	117
63	N.D	K	53	30	10,6✓	33,2	15	48	374	356	>48	>96	56	117

Tablo II: Kontrol Grubunun Tanımsal ve Biyokimyasal Değerleri

No	Adı Soyadı	Cins	Yaş	Hb	Htc	Sedim	Fe	TDBK	Ferritin	CRP	RF	TNF- α
			(yıl)	(g/dL)	(%)	(1saat)	(μ g/dl)	(μ g/dl)	(ng/ml)	(mg/l)	(IU/ml)	(pg/ml)
1	S.G	K	40	13,9	40,8	8	68	286	24	<6	<12	3,6
2	G.B	E	30	14	42,8	9	86	311	44	<6	<12	11
3	Ş.E	K	61	13,1	40,9	11	54	218	12	<6	<12	25
4	N.K	K	30	13,4	41	6	68	382	32	6	<12	20
5	F.A	K	51	14,1	42,1	4	92	324	65	<6	<12	-
6	S.K	E	39	14,9	44	10	84	356	68	<6	<12	-
7	Z.B	K	46	12,7	37,6	8	49	350	14	6	<12	-
8	A.Ö	E	60	15,2	44,7	9	143	248	96	<6	<12	-
9	N.U	K	32	12,5	37,6	11	80	280	54	12	12	15
10	R.K	K	35	12,5	36,9	8	58	346	38	6	<12	15
11	A.O	K	40	12,3	41	10	59	255	60	<6	<12	-
12	F.Ö	K	70	12,1	36,5	14	58	410	21	<6	<12	-
13	T.K	K	36	13	42,2	11	63	311	52	<6	<12	12
14	Ş.B	E	43	14,9	44	6	95	315	62	6	<12	-
15	T.S	K	37	12,3	37,7	6	47	255	84	6	<12	-
16	S.B	E	38	15	45	8	101	233	92	<6	<12	-
17	Ş.İ	K	60	13,2	40,8	12	83	239	67	<6	<12	9,6
18	F.İ	K	50	13,9	41,1	9	82	321	58	<6	<12	-
19	R.U	K	36	12,6	37	6	71	437	24	<6	<12	-
20	S.H	K	39	13,9	40,9	11	76	387	54	6	<12	-



Grafik I: Serum Epo Düzeyleri Ortalamaları (mIU/ml)

I: RA'lı hastalar (n:63)

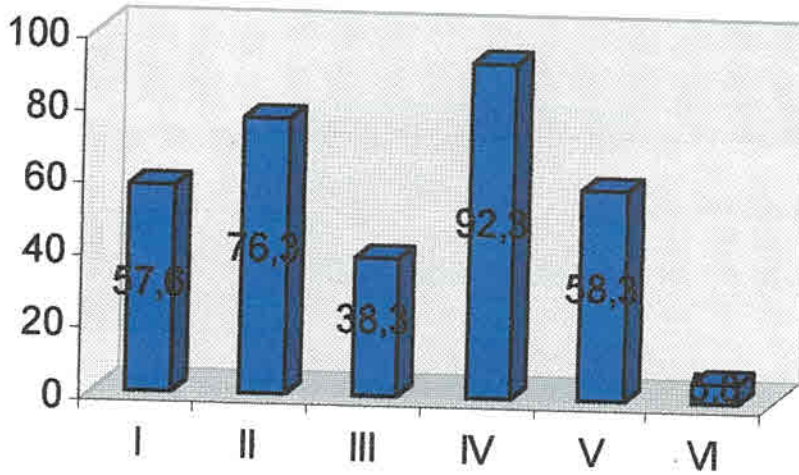
II: Anemik RA'lı hastalar (n:32)

III: Anemik olmayan RA'lı hastalar (n:31)

IV: Kronik hastalık anemisi olan RA'lı hastalar (n:17)

V: Demir eksikliği anemisi olan RA'lı hastalar (n:15)

VI: Kontrol grubu (n:20)



Grafik II: Serum TNF-α Düzeyleri Ortalamaları (pg/mL)

I: RA'lı hastalar (n:63)

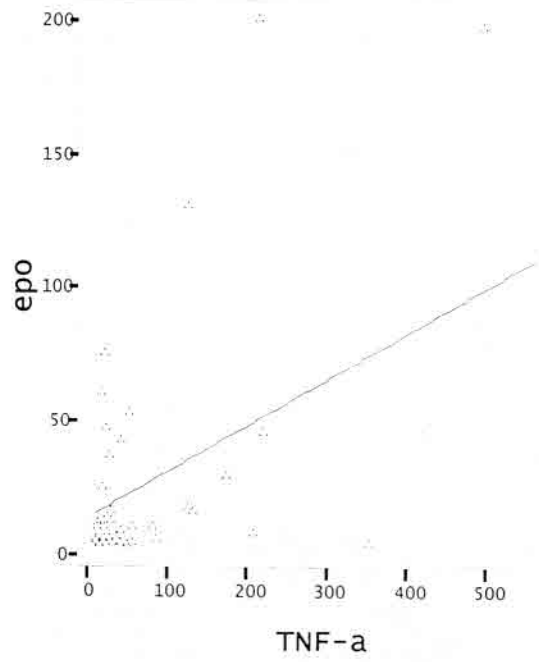
II: Anemik RA'lı hastalar (n:32)

III: Anemik olmayan RA'lı hastalar (n:31)

IV: Kronik hastalık anemisi olan RA'lı hastalar (n:17)

V: Demir eksikliği anemisi olan RA'lı hastalar (n:15)

VI: Kontrol grubu (n:20)



Grafik III : TNF α ve Epo düzeyleri ortalamaları

6 . TARTIŞMA

Kronik romatoid artrit, hafif-orta şiddette seyreden anemi ile karakterizedir fakat altta yatan patofizyolojik mekanizma açıklık kazanmamıştır. Eritrositlerin kısalmış ömürleri ile azalmış üretimleri en önemli faktörler olarak düşünülmekte ancak mekanizması bilinmemektedir. Kronik hastalık anemisinin patogenezeine yönelik iki faktörün rol oynayabileceği düşünülmektedir. Birincisi immunoloji, diğeri ise hematoloji ile ilgili hipotezlerdir (1,2,3,7).

İmmunolojik nedenler ele alındığında en başta birçok sitokinin aktivitesini düzenleyen TNF α akla gelmektedir. TNF α immunitenin ve inflamasyonun önemli bir mediatörüdür, biyolojik aktiviteleri ile (nötrofillerin aktivasyonu, arasıdonik asit metabolitlerinin sinovyal hücrelerden salınımı, kartilaj rezorbsiyonunu uyarması ve kartilaj dokudan proteoglikan salınımını inhibe etmesi) RA'deki kronik inflamasyonun önemli bir mediatörü olabilir diye düşünülmektedir. TNF α özellikle inflamatuvar hastalıklarda üretilmekte ve hematopoetik hücre proliferasyonu ile interferans göstermektedir (4-18).

Hematoloji orijinli varsayımlarda ise Epo üretiminde ya da işlevinde bozukluk olması akla gelmektedir. RA'de görülen anemide Epo'nin rolü açık değildir. RA'deki anemiye eritropoetin cevabını araştıran önceki çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. Bazıları cevabı bozulmuş olarak bazıları ise normal bulmuşlardır. RA'li hastaların anti-TNF α ajanlarla ya da rekombinant insan Epo'i verilmesi ile anemilerinin düzelme göstermesi de bu hipotezleri desteklemiştir (19-34).

Eritropoez üzerindeki TNF α etkileri için geliştirilen birçok hipotez vardır. Bunlardan birisi TNF α 'nın monositlerden IL-1 üretimini stimüle ederek eritropoezi baskılaması, diğeri muhtemel etkisi ise eritrosit öncülerine TNF α 'nın direk etkisidir. TNF α 'nın protein sentezini azaltabilme yeteneği vardır ve teorik olarak RA'de anemili hastalarda Epo sentezini baskılayabilir (11).

Romatoid eklem hücre kültürlerinde üretilen IL-1'in dominant düzenleyicisinin TNF α olduğu, eğer TNF α nötralize edilirse diğer proinflamatuvar sitokinlerin de inhibe olacağı görüşüyle, TNF α 'nın RA'de büyük öneme sahip olan sitokin olduğu ve tedavideki hedef olabileceği hipotezi gündeme gelmiştir.

Bir hipoteze göre anti-TNF α terapisi eklemlerde granülosit aktivasyonunu azaltmaktadır. Bazı çalışmalarda, TNF α blokajının endotelial bağlanmayı azalttığı gösterilmiştir (92,93,94) ve diğer bir çalışmada ise sinovyal inflamatuvar hücre infiltratının azalmasının kemotaktik sitokin gradientinin yok oluşuna eşlik ettiği düşünülmüştür (95). Bu gözlemler de TNF α 'nın RA'de inflamasyon bölgesindeki lökosit hareketliliğinin regülasyonundaki kritik rolünü desteklemektedir.

Romatoid sinovyal sıvısının yaklaşık %50'sinde TNF α proteininin arttığı, bu durumun ise özellikle hastalığın şiddeti ile korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur (96). TNF α proteinleri romatoid sinovyumundaki makrofajlarda fazla miktardadır, TNF α içeren hücrelerin kartilaj-pannus birleşim yerinde lokalize oluşu doku yıkımı yaptığını destekleyen bir bulgudur. TNF α 'nın plazma düzeylerinin artışı ise eklem ağrıları ile ilişkili bulunmuştur (97).

Serum ferritin düzeyi altta yatan kronik hastalık olmadığında demir durumunu gösterir, fakat ferritin bir akut faz reaktanıdır ve inflamatuvar hastalıklarda genelde artmıştır. Birlikte demir eksikliği bulunduğu serum ferritini düşer fakat bu düzey komplikasyonsuz demir eksikliğinde tesbit edilen düzeye ulaşamaz. RA'de 60 μ g/L seviyesi normal serum ferritin alt limiti olarak belirlenmiştir. Demir eksikliği, anemik RA'li hastalarda %27'ye kadar anemiye eşlik edebilmektedir. Kronik inflamatuvar hastalık olan ve serum ferritini 30 μ g/L'den düşük bulunan hastalarda kesin olarak demir eksikliği vardır denebilir, 200 μ g/L'nin üzerindeki değerlerde ise demir eksikliği kesin olarak düşünülmez (2). Bizim çalışmamızda da ferritin 30 μ g/L'nin altında olan 15 hastada eşlik eden demir eksikliği anemisi olduğu, ferritini 60 μ g/L'nin üzerinde olan 17 hastada ise sadece kronik hastalık anemisi olduğu tesbit edildi.

TNF α 'nın RA 'de görülen kronik hastalık anemisinin patogenezinde yer almadığını, yer alıyorsa bunu Epo üretimini inhibe ederek mi yoksa başka bir mekanizmayla mı (Epo işlevinin bozulması, eritroblastların Epo'ya sensitivitesinin azaltılması) gerçekleştirdiğini araştırma amacıyla yaptığımız bu çalışmada; RA'li hastalarda, kontrol grubuna göre TNF α ve Epo düzeylerini anlamlı derecede yüksek tesbit ettik ($p<0.003$ ve $p<0.008$).

RA'li hastalar anemik olan ve olmayanlar olarak sınıflandırıldıklarında ise anemik olan hastalarda bulduğumuz serum Epo düzeylerinin anemik olmayan hastalardaki düzeylerden ve kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğunu tesbit ettik ($p<0.001$). Serum ferritini 60 μ g/L'nin üzerinde olan hastaların Epo düzeyleri, serum ferritini 30 μ g/L'nin altında olan hastaların Epo düzeyleri ile benzerdi ($p>0.05$).

Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, Boyd ve arkadaşları (20) 97 anemik RA'li hastada yaptıkları çalışmada serum Epo düzeylerini anemik hastalardan anemik olmayan hastalardan anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır, serum Epo'yu ile serum ferritini arasında ise korelasyon bulamamışlardır. Hochberg ve arkadaşları (98) da anemik RA'lilerde anemik olmayan RA'lilerden daha yüksek Epo düzeyleri saptamışlardır. Birgegard ve arkadaşları ile Erslev ve arkadaşları bizim bulgularımızda olduğu gibi aneminin nedenine bağlı olmaksızın anemik RA'lilerde Epo'yu anemik olmayanlardan yüksek tesbit etmişlerdir (99). Nielsen ve arkadaşları (27) 35 anemik hastada Epo düzeylerini kontrol grubundan önemli derecede yüksek tesbit etmişler ancak bu grubu ferritinlerine göre kronik hastalık anemisi ve demir eksikliği anemisi olarak sınıflandırdıklarında 2 grup arasında fark bulamamışlardır. Vreugdenhil ve arkadaşları (100) da RA'li hastaları kronik hastalık anemisi olanlar, demir eksikliği olan anemik RA'liler ve anemik olmayan RA'liler olarak sınıflandırdıklarında 3 grupta da sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek serum Epo düzeyleri saptamışlardır ayrıca yine bizim çalışmamızla uyumlu olarak kronik hastalık anemisi olan RA'li hastalar ile demir eksikliği olan RA'liler arasında fark bulamamışlardır.

Bizim bulgularımızla çelişkili olarak, Salvarani ve arkadaşları (26) ise anemik olan ve olmayan RA'lilerde serum Epo düzeylerini farklı bulmamışlardır, RA anemisinin patogenezinin bozulmuş Epo cevabı sorumludur diye rapor etmişlerdir.

Bu konuda yapılan bazı çalışmalarda, RA'li anemik hastalarda bulunan Epo düzeylerinin komplikasyonsuz demir eksikliğinde bulunan değerlere göre daha düşük olduğu, bu durumda RA'de Epo üretiminin baskılanıyor olabileceği belirtilmiştir. Farklı sonuç bulan diğer çalışmalarda ise bu hormonun metabolizmasının bozulmuş olabileceği ya da Epo'ya eritroblastların sensitivitesinin azalmış olabileceği belirtilmiştir (22,28,99,101).

Bizim çalışmamızın sonuçları, anemik hastalardaki Epo değerlerinin anemik olmayan hastalardan önemli derecede yüksek bulunmasının Epo'ya olan sensitivite azalmasından kaynaklanabileceğini, ancak kronik hastalık anemisi olan hastalardaki düzeyler ile demir eksikliği olan RA'li hastaların sonuçlarının farklı olmayışı konusundaki çelişkili sonuçların, aneminin derecesindeki değişikliklerden ya da demir eksikliği anemisinin kronik hastalık anemisi ile birlikte olma ihtimalinden ileri gelebileceğini düşündürmüştür.

Bulgularımızda anemik olmayan RA'lilerde sağlıklı kontrol grubuna göre Epo değerlerinin artmış bulunması ise, bu artışın kronik hastalık anemisi gelişmesini önleyici bir etkisi olabileceğini bize düşündürdü.

Bu çalışmada TNF α , 63 RA hastasının 41'inde yüksek tesbit edildi. TNF α düzeylerinin RA'li hastalardaki değerlerinin kontrol grubundan önemli derecede yüksek olduğu tesbit edildi. Ayrıca TNF α düzeylerinin anemik RA'lilerde anemik olmayan RA'lilerden önemli derecede yüksek olduğu ($p<0,008$), kronik hastalık anemisindeki değerlerin demir eksikliğindeki değerlerle ise korelasyon göstermediği saptandı. Bu bulgular bize TNF α 'nın RA'de görülen anemide önemli olduğunu düşündürdü.

Çalışmamızda TNF α düzeyleri ile Epo'nun pozitif korelasyon gösterdiği saptandı. Bu bulgu, in vitro bazı çalışmalarda rapor edilen TNF α 'nın Epo'ün üretimini azalttığına tesbit edilmesi ile uyumlu değildi, ancak diğer çalışmalarla uyumluydu (9,11,22).

Bu çalışma; anemisi olan ve olmayan tüm RA hasta grubunda bulunan TNF α düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseltilmesi, RF ve CRP düzeyleri ile TNF α 'nın pozitif korelasyon göstermesi ile, TNF α 'nın eritropoezi inhibe edici etkisinin yanında RA patogenezinde de santral rolü olabileceğini destekledi. Bu bulgular Borzi ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu bulundu (10).

Voulgari ve arkadaşları (9) 105 anemik RA'li ve 127 anemik olmayan RA hastada serum TNF α düzeylerini ölçmüş, anemiklerde TNF α düzeylerini önemli derecede yüksek olduğunu saptamıştır. TNF α 'nın RA'de hastalık aktivitesi ve anemi derecesini araştıran Vreugdenhil ve arkadaşları (11) ise 24 hastayı içeren çalışmalarında RA'de kronik hastalık anemisinde serum TNF α düzeylerini yüksek bulmuş, bunun hastalık parametreleriyle korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Davis ve arkadaşları (102) ise TNF α 'nın kronik hastalık anemisi gelişiminde önemli olduğunu, ancak bu Epo'yu baskılayarak değil muhtemelen kemik iliği kırmızı hücrelerine direkt etkiyle gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir.

Bizim bulgularımızla çelişkili olarak, Mansour ve arkadaşlarının (4) yaptıkları bir çalışmada ise serum TNF α düzeyleri RA'li hastalarda normal bulunurken, farklı bir çalışmada ise sinovyal sıvı ve plazmada TNF α düzeyleri tesbit edilemedi diye rapor edilmiştir (16). Manicourt ve arkadaşları (103) ise serum TNF α düzeylerini RA'li hastalarda normal kontrollere göre önemli derecede yüksek bulmuşlardır.

TNF α ve Epo'ün eritropoezdeki etkilerini ortaya koymayı amaçlayan, farelerle yapılmış bir deneysel çalışmada TNF α ile eritropoezin supresyonu ekzoj

ile eritrosit üretiminin azaldığı ve dolaşımdaki eritrositlerin ömürleri kısaldığı gösterilmiştir (88).

RA'li 63 hastada yapılan bu çalışmada; serum Epo düzeylerinin anemik hastalarda anemik olmayan hastalardan daha yüksek olduğu, 41 hasta yüksek serum TNF α düzeyleri tesbiti ve bu düzeylerin Epo ile pozitif korelasyon gösterdikleri saptandı. RA'de Epo'ya cevabın bozulduğu ve bu TNF α 'nın anahtar rol oynamasının muhtemel olduğu düşünülüyor. Stockenhuber ve arkadaşlarının bulguları da bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir (22).

RA'li anemik hastalarda tesbit edilen yüksek serum Epo düzeyleri; EPO anemiye cevap olarak sentezlendiğini, ancak bunun bozulmuş bir cevap olabileceğini düşündürdü. Dolaşımda tesbit edilen TNF α 'nın RA'li hastalarda yüksek olması bu sitokin hastalığın patogeneğinde yer aldığını, anemik hastalarda daha yüksek bulunması ise aneminin etiopatogeneğinde önemli olduğunu destekleyen bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Serum Epo düzeyleri ile TNF α düzeyleri arasındaki pozitif korelasyonun tespiti Epo'ya bozulmuş cevaptan TNF α 'nın sorumlu olabileceği sonucuna varılmaktadır.

RA patogeneğinde kartilaj harabiyeti ve matriks inhibisyonu yoluyla anemisinde ise Epo'ya eritroblastların sensitivitesini azaltarak ka- bulunduğu düşünülen, en önemli sitokin olan TNF α 'ya karşı, anti-TNF α antikoru ile son dönemlerde denenmekte olan tedaviler başarılı yapılmaktadır (47,65,73,95,104). Bu nedenle TNF α 'nın RA teşhis ve tedavisindeki yerinin araştırılmasının önemi çok büyüktür.

7 . ÖZET

Romatoid artrit (RA) hastalarının yaklaşık %50'sinde hafif-orta şiddette seyreden anemi görülmektedir. Özellikle yüksek hastalık aktivitesinin bulunduğu durumlarda sıklıkla kronik hastalık anemisi gelişmektedir, ancak katkıda bulunan mekanizmaların tanımlanmasına karşın kesin patogenezi belli değildir. Sistemik otoimmün hastalıklarda görülen anemi, immunoloji ya da hematoloji orijinli olabilir. İnflamatuvar sitokinlerin, özellikle tumor necrosis factor (TNF)- α 'nın RA'de hastalık aktivitesinde ve aneminin ortaya çıkışında önemli olabileceği düşünülmektedir. RA'de görülen anemide eritropoetin'in (Epo) rolü de hala çelişkilidir. RA'in patogenezi, teşhisini ve tedavisini aydınlatmada aneminin belirlenmesi ve tedavisi çok önemlidir.

TNF α 'nın ve Epo'nun RA'de görülen aneminin patogenezinde önemli olabilecekleri düşünüldüğünden bu çalışmada 32 anemik ve 31 anemik olmayan toplam 63 RA hastasında serum TNF α ve Epo düzeyleri arasındaki ilişki araştırıldı. Sonuçta RA'li hastalarda kontrol grubuna göre TNF α ile Epo düzeyleri anlamlı derecede yüksek tesbit edildi ($p<0,003$, $p<0,008$). Serum TNF α konsantrasyonlarının Epo ile pozitif korelasyon gösterdiği saptandı ($r=0,556$ $p<0,0001$). TNF α düzeylerinin hastalık aktivitesi parametreleri olan C-reaktif protein (CRP) ve Romatoid faktör (RF) ile de pozitif korelasyonu vardı ($r=0,423$ $p<0,001$, $r=0,515$ $p<0,0001$). TNF α ile Epo düzeylerinin RA'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı yükselişi yanında, anemik hastalarda da anemik olmayanlara göre daha yüksek olduğunun saptanması ($p<0,008$, $p<0,001$), bu parametrelerin RA anemisindeki önemlerini gösterdi. Anemik hastalarda bulduğumuz yüksek Epo düzeyleri Epo'ya cevaptan yetersizliğin olabileceğini, buradaki sorumlu faktörün ise TNF α olabileceğini düşündürdü.

8 . SUMMARY

A mild to moderate anemia is seen in approximately half of the patients with rheumatoid arthritis. Anemia of chronic disease frequently develops in patients with high disease activity. Although the mechanisms have been defined, the exact pathogenesis is not clear. The anemia seen in systemic autoimmune diseases may be of immunologic or hematologic origin. It has been thought that inflammatory cytokines, especially tumor necrosis factor (TNF)- α may be important in the disease activity of rheumatoid arthritis and the development of anemia. There is also controversy about the role of erythropoietin (Epo) in anemia of rheumatoid arthritis.

As TNF α and Epo are supposed to be important in the pathogenesis of anemia of rheumatoid arthritis, the relationship between serum TNF α and Epo levels is investigated in 32 anemic and 31 non-anemic (total 63 patients) rheumatoid arthritis patients in this study. As a result TNF α and Epo levels were significantly higher in rheumatoid arthritis patients compared with the control group ($p < 0.003$, $p < 0.008$) and serum TNF α concentrations showed positive correlation with Epo levels ($r = 0.556$ $p < 0.0001$). TNF α levels were also positively correlated with C reactive protein (CRP) and rheumatoid factor (RF), which are indices of disease activity ($r = 0.423$ $p < 0.001$, $r = 0.515$ $p < 0.0001$). The significant rise in TNF α and Epo levels in rheumatoid arthritis patients compared with the control group, and also the finding that their levels were significantly higher in the anemic group compared with the non-anemic group ($p < 0.008$, $p < 0.001$), suggested that these parameters are important in anemia of rheumatoid arthritis. The higher Epo levels observed in anemic patients suggested failure of erythroid precursors to respond to Epo, for which TNF α might be responsible.

9 . ÖZGEÇMİŞ

24.11.1971 yılında Ankara'da doğdum.

İlk, orta ve lise eğitimimi Ankara'da tamamladım.

1996 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İngilizce Bölümü'nü mezun oldum.

1997 yılında Salih Omurtak Sağlık Ocağı'nda 8 ay çalıştım.

1997 Eylül dönemi TUS sonucunda S.S.K. İzmir Eğitim Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümünü kazandım.

5 yıllık evliyim. 2 yaşında Gülce adında bir kızım var.

10 . KAYNAKLAR

1. Bertero M.T., Caligaris-Cappio F. (1997) Anemia of chronic disorder systemic autoimmune diseases. *Haematologica*. Review. 82(3):375-81.
2. Wintrobe M.M., Lee G.R., Foerster J., Lukens J., Paraskevas F., G J.P., Rodgers G.M. (1999) *Wintrobe's Clinical Hematology*. S.1011-10 Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A.
3. Smith M.A., Knight S.M., Maddison P.J., Smith J.G. (1992) Anaemi chronic disease in rheumatoid arthritis: effect of the blunted respons erythropoietin and of interleukin 1 production by marrow macroph Annals of the Rheumatic Diseases. 51:753-757.
4. Isomaki p., Punnonen J. (1997) Pro- and anti-inflammatory cytokine rheumatoid arthritis. *Ann Med*. Review. 29(6):499-507.
5. Feldmann M., Maini R.N. (1999) The role of cytokines in the pathoger of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. Review. 38(2):3-7.
6. Sebbag M., Parry S.L., Brennan F.M., Feldmann M. (1997) Cyto stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monoc production of tumor necrosis factor- α , but not interleukin-10:pos: relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immu* 27:624-632.
7. Davis D., Charles P.J., Potter A., Feldmann M., Maini R.N., Elliott (1997) Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis:in vivo effec tumour necrosis factor α blockade. *British Journal of Rheumato* 36:950-956.
8. Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. (1996) Role of cytokine rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunology*. Review. 14:397-440.

9. Voulgari P.V., Kolios G., Papadopoulos G.K., Katsaraki A., Seferiadis Drosos A.A. (1999) Role of cytokines in the pathogenesis of anemia in chronic disease in rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology*. 92(2):160.
10. Borzi R.M., Arfilli L., Focherini M.C., Pulsatelli L., Meliconi R. (1997) Circulating tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Boll Ital Biol Sper*. 69(1):39-43.
11. Vreugdenhil G., Lowenberg B., Van Eijk H.G., Swaak A.J. (1997) Tumor necrosis factor alpha is associated with disease activity and degree of anemia in patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Clinical Investigation*. 22:488-493.
12. Lavrencic M.J., Peeters H.R.M., Wognum A., Vreugdenhil G., Breedveld F.C., Swaak A.J.G. (1997). Elevated levels of inflammatory cytokines in the bone marrow of patients with rheumatoid arthritis and anemia of chronic disease. *The Journal of Rheumatology*. 24:1504-9.
13. Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol. Review*. 14:397-440.
14. Rusten L.S., Jacobsen S.E.W. (1995) Tumor necrosis factor- α directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood*. 85(4):989-996.
15. Moreland L.W., Baumgartner S.W., Schiff M.H., Tindall E., Fleischmann R.M., Weaver A.L., Ettlinger R.E., Cohen S., Koopman W., Mohler K., Widmer M.B., Bloch C.M. (1997) Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p55) Fc fusion protein. *The New England Journal of Medicine*. 337(3):141-149.
16. Holt I., Cooper R.G., Denton J., Meager A., Hopkins S.J. (1992) Cytokine inter-relationships and their association with disease activity in rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology*. 31:725-733.

17. Steiner G., Tohidast-Akrad M., Witzman G., Vesely M., Studnicka Benke A., Gal A., Kunaver M., Zenz P., Smolen J.S. (1999) Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38:202-213.
18. Smolen J.S., Akrad M.T., Gal A., Kunaver M., Eberl G., Zenz P., Falz A., Steiner G. (1996) The role of T-lymphocytes and cytokines in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol. Review*. 25:1-4.
19. Kendall R., Wasti A., Harvey A., Hill J., Chapman C., Norfolk D.F., Pullar T. (1993) The relationship of haemoglobin to serum erythropoietin concentrations in the anaemia of rheumatoid arthritis: the effect of oral prednisolone. *Br J Rheumatology*. 32(3):204-8.
20. Boyd H.K., Lappin T.R., Bell A.L. (1991) Evidence for impaired erythropoietin response to anemia in rheumatoid disease. *Br J Rheumatology*. 30(4):255-9.
21. Remacha A.F., Rodriguez-de la Serna A., Garcia-Die F., Geli C., Diaz C., Gimferrer E. (1992) Erythroid abnormalities in rheumatoid arthritis: the role of erythropoietin. *J Rheumatology*. 19(11):1687-91.
22. Stockenhuber F., Keil M., Wurnig C., Kurz R.W., Gottsauner-Wolf M., Balcke P. (1994) Impaired erythropoietin responsiveness in anaemic rheumatoid arthritis patients: potential relation to immune mechanism. *Clinical Science*. 86:633-638.
23. Walter F. (1995) Erythropoietin. *Annual Review Nutr.* 15:353-77.
24. Abels R.I., Rudnick S.A. (1991). Erythropoietin: Evolving Clinical Applications. *Experimental Hematology. Review*. 19:842-850.
25. Krantz S.B. (1995) Erythropoietin and the anemia of chronic disease. *Nephrol Dial Transplant*. 10(2):10-17.
26. Salvarani C., Casali B., Salvo D., Brunati C., Macchioni P.L., Massi G., Lasagni D., Rivasi P., Portioli I. (1991) The role of interleukin

erythropoietin and red cell bound immunoglobulins in the anem
rheumatoid arthritis. Clinical and Experimental Rheumatology. 9
246.

27. Nielsen O.J., Andersen L.S., Ludwigsen E., Bouchelouche P., H
T.M., Birgens H., Hansen N.E. (1990) Anemia of rheur
arthritis:serum erythropoietin concentrations and red cell distri
width in relation to iron status. Annals of the Rheumatic Dis
49:349-353.
28. Noe G., Augustin J., Hausdorf S., Rich I.N., Kubanek B. (1995) :
erythropoietin and transferrin receptor levels in patients with rheur
arthritis. Clinical Experimental Rheumatology. 13(4):445-51.
29. Vreugdenhil G., Swaak A.J. (1990) The role of erythropoietin
anaemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. Clin Rheu
Review. 9(1):22-7.
30. Takashina N., Kondo H., Kashiwazaki S. (1990) Suppressed
erythropoietin response to anemia and efficacy of recom
erythropoietin in the anemia of rheumatoid arthritis. J Rheu
17:885-7.
31. Vreugdenhil G., Baltus C.A.M., Van Eijk H.G., Swaak A.J.G.
Anaemia of chronic disease: diagnostic significance of erythrocy
serological parameters in iron deficient rheumatoid arthritis p
British Journal of Rheumatology. 29:105-110.
32. Boyd H.K., Lappin T.R.J., Bell A.L. (1991) Evidence for ir
erythropoietin response to anaemia in rheumatoid disease.
Journal of Rheumatology. 30:255-259.
33. Camacho J., Arnalich F., Zamorano A.F., Vazouez J.J. (1991)
erythropoietin levels in the anemia of chronic disorders. Jou
Internal Medicine. 229:49-54.

34. De Marchi S., Pirisi M., Ferraccioli G.F. (1993) Erythropoietin and anemia of chronic diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology Review*. 11:429-444.
35. Beyazova M., Kutsal Y.G. (2000) Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. S.1519-1576. Güneş Kitabevi, Ankara.
36. Kelley W.N., Harris E.D., Ruddy S., Sledge C.B. (1993) Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Textbook of Rheumatology*, 4th ed. S.833-874. WB Saunders Company, Philadelphia.
37. Wolfe F., Mitchell D.M., Sibley J.T. (1994) The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 37:481-94.
38. Weyand C.M. (2000) New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 39(1):3-8.
39. Arend W.P., Dayer J.M. (1995) Inhibition of the production and release of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 38:151-160.
40. Gümüşdiş G., Doğanavşargil E. (1999) Klinik Romatoloji. S.261-262. Deniz Matbaası, İstanbul.
41. Zvaifler N.J., Firestein G.S. (1994) Pannus and pannocytes. *Arthritis Rheum*. 37:783-9.
42. Gregerson P.K., Silver J., Winchester R.J. (1987) The shared epitope hypothesis an approach to understanding the molecular genetics of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum*. 30:1205-1213.
43. Harris E.D. (1989) Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Textbook of rheumatology*. Kelley W.N., Harris E.D., Ruddy S., Sledge C.B. (Ed) 3rd ed. 932. WB Saunders Company. Philadelphia.
44. Firestein G.E. (1997) Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Textbook of rheumatology*. Kelley W.N., Harris E.D., Ruddy S., Sledge C.B. (Ed). 4th ed. 932. WB Saunders Company. Philadelphia.

of Rheumatology, 3. Ed. S.851-897. WB Saunders Company, Philadelphia.

45. Henry J.B. (1996) Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. S.1019-1020. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
46. Al-Janadi M., Al-Balla S., Al-Dalaan A., Raziuddin S. (1993) Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *Journal of Clinical Immunology*. 13(1):58-67.
47. Maini R.M., Breedveld F.C., Kalden J.R., Smolen J.S., Davidoff M., Macfarlane J.D., Antoni C., Leeb B., Elliot M.J., Woody J.N., Schiffman T.F., Feldman M. (1998) Therapeutic efficacy of multiple IV infusions of anti-TNF α monoclonal antibody combined with low dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 41(9):1552-1563.
48. Klimiuk P.A., Yang H., Goronzy J.J., Weyand C.M. (1999) Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin Immunol*. 90:65-78.
49. De Keyser F., Elewaut D., Vermeersch J. (1995) The role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 14(2):5-9.
50. Arend W.P. (1997) The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis (Editorial). *Arthritis Rheum*. 40:595-597.
51. Feldman M., Brennan F.M., Maini R.N. (1996) Rheumatoid arthritis. *Cell. Review*. 85,307-310.
52. Arend W.P., Dayer J.M. (1995) Inhibition of the production and release of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism. Review*. 38(2):151-160.
53. Baumgartner S.W. (2000) Tumor necrosis factor inhibition in the management of rheumatoid arthritis. Current concepts. *Southern Medical Journal*.

54. Hauseelmann H.J. (1997) Mechanism of cartilage destruction novel nonsurgical therapeutic strategies to retard cartilage injury in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 9(3):241-250.
55. Kim H.K., Kerr R.g., Cruz T.F., Salter R.B. (1995) Effects of continuous passive motion and immobilization on synovitis and cartilage degradation in antigen induced arthritis. *J Rheumatol.* 22:1714-1721.
56. Müller-Ladner U., Gay R.E., Gay S. (1997) Cellular pathways of cartilage destruction. *Curr Opin Rheum.* 9(3):213-220.
57. Di Giovine F.S., Nuki G., Duff G.W. (1988) Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Ann Rheum. Dis.* 47:768-72.
58. Saxne T., Palladino M.A., Heinegard D., Talal N., Wollheim O. (1988) Detection of tumor necrosis factor α but not tumor necrosis factor β in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum.* 31:1041-45.
59. Hopkins S.J., Humphreys M., Jayson M.I. (1988) Cytokines in synovial fluid. The presence of biologically active and immunoreactive IL-1. *Exp. Immunol.* 72:422-27.
60. Hopkins S.J., Meager A. (1988) Cytokines in synovial fluid. The presence of tumor necrosis factor and interferon. *Clin. Exp. Immunol.* 73:88-92.
61. Brennan F.M., Chantry D., Jackson A. (1989) Inhibitory effect of monoclonal antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2:244-247.
62. Butler D.M., Maini R.N., Feldmann M. (1995) Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cultures. Comparison of monoclonal anti TNF α antibody with the soluble TNF receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw.* 6:225-230.

63. Haworth C., Brennan F.M., Chantry D. (1991) Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol.* 21:2579.
64. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (1994) Cellular and Molecular Immunology. S. 241-249. W.B. Saunders Company, United States of America.
65. Pisetsky D.S. (2000) TNF blockers in rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine.* 342(11):810-811.
66. Eigler A., Sinha B., Hartmann G. (1997) Taming TNF : strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today.* 18:487-492.
67. Saxne T., Palladino M.A. Jr., Heinegard D. (1988) Detection of tumor necrosis factor α but not tumor necrosis factor β in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum.* 31:1041-1045.
68. Chu CQ., Field M., Fieldmann M. (1991) Localization of tumor necrosis factor α in synovial tissues and the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34:1125-1132.
69. Allard S.A., Muirden K.D., Camplejohn K.L. (1987) Chondrocyte-derived cells and matrix at the rheumatoid cartilage-pannus junction identified with monoclonal antibodies. *Rheumatol Int.* 7:153-159.
70. Dayer J.M., Beutler B., Cerami A. (1985) Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E_2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med.* 162:2163-2168.
71. Wooley P.H., Dutcher J., Widmer M.B. (1993) Influence of recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor Fc protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol.* 151:6602-6607.

72. Cooper W.O., Fava R.A., Gates C.A. (1992) Acceleration of onset collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta. *Clin Exp Immunol.* 89:242-250.
73. Maini R.N., Taylor P.C., Paleolog E., Charles P., Ballara S., Brennan F.M., Feldman M. (1999) Anti TNF specific antibody (infliximab) treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum Dis.* 58(1):156-160.
74. Cope A.P., Aderka D., Doherty M. (1992) Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 35:1160-1169.
75. Roux-Lombart P., Punzi L., Hasler F. (1993) Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum.* 36:485-489.
76. Steiner G., Studnichenko A., Witzmann G. (1995) Soluble receptors for tumor necrosis factor and interleukin-2 in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, reactive arthritis, and osteoarthritis. *Rheumatol.* 22:406-412.
77. Means R.T., Krantz S.B. (1992) Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood.* 80:1639-1647.
78. Backx B., Broeders L., Bot F.J., Lowenberg B. (1991) Positive and negative effects of tumor necrosis factor on colony growth from highly purified normal marrow progenitors. *Leukemia.* 5:66.
79. Caux C., Favre C., Saeland S., Duvert V., Durand I., Mannoni F., Banchereau J. (1991) Potentiation of early hematopoiesis by tumor necrosis factor- α is followed by inhibition of granulopoietic differentiation and proliferation. *Blood.* 78:635.

80. Zhang Y., Harada A., Bluethmann H., Wang J.B., Nakao S., Mukaida N., Matsushima K. (1995) Tumor necrosis factor is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55 deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF α in vitro. *Blood*. 86(8):2930-2937.
81. Beers M.H., Berkow R. (1999) *The Merck Manual*. 17th Ed. S.856-861. Merck & Co. Inc. England.
82. Bakris B., Sauter E., Hussey J. (1990) Effects of theophylline on erythropoietin production in normal subjects and in patients with erythrocytosis after renal transplantation. *N Engl J Med*. 323:86.
83. Wide L., Bengtsson C., Biregegard G. (1989) Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. *Br J Haematol*. 72:85.
84. Krantz S.B. (1991) Erythropoietin. *Blood*. 77:419-34.
85. Remacha A.F., Rodriguez-De La Serna A., Garcia-Die F., Geli C., Diaz C., Gimferrer E. (1992) Erythroid abnormalities in rheumatoid arthritis: the role of erythropoietin. *J Rheumatol*. 19:1687-91.
86. Peeters H.R.M., Lavrencic M.J., Raja A.N., Ramdin H.S., Vreugdenhil G., Breedveld F.C., Swaak A.J.G. (1996). Course and characteristics of anemia in patients with rheumatoid arthritis of recent onset. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 55:162-168.
87. Krantz S.B. (1994) Pathogenesis and treatment of the anemia of chronic disease. *Am J Med Sci. Review*. 307:353-9.
88. Johnson C.S., Cook C.A., Furmanski P. (1990) In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor- α : reversal with exogenous erythropoietin. *Experimental Hematology*. 18:109-113.

89. Johnson R.A., Waddelow T.A., Caro J., Oliff A., Roodman G.D. (1989) Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice. *Blood*. 74:130-8.
90. Burtis C.A., Ashwood E.R. (1999) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. S.205-226. W.B.Saunders Company. United States of America.
91. Kaplan L.A., Pesce A.J. (1996) *Clinical Chemistry*. 3rd Ed. S.226-269 Mosby. United States of America.
92. Tak P.P., Taylor P.C., Breedveld F.C., Smeets T.J.M., Daha M.R., Kluij P.M. (1996) Decrease in cellularity and expression of adhesion molecule by anti- tumor necrosis factor- α monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 39:1077-81.
93. Taylor P.C., Maini R.N., Tak P.P., Breedveld F.C., Smeets T.J.M., Daha M.R. (1997) Reply (letter). *Arthritis Rheum*. 40:789-90.
94. Paleolog E.M., Hunt M., Elliott M.J., Feldmann M., Maini R.N., Wool J.N. (1996) Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti tumor necrosis factor α antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 39:1082-91.
95. Taylor P.C., Peters A.M., Paleolog E., Chapman P.T., Elliott M., McCloskey R., Feldmann M., Maini R.N. (2000) Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints TNF α blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 43(1):38-47.
96. Tetta C., Camussi G., Modena V., DiVittorio C., Baglioni C. (1999) Tumor necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with acute and severe rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 49:665-667.
97. Beckham J.C., Caldwell D.S., Peterson B.L. (1992) Disease severity in rheumatoid arthritis: relationships of plasma tumor necrosis factor alpha, soluble IL-2 receptor, soluble CD4/CD8 ratio, neopterin, and fibrinogen.

dimer to traditional severity and functional measures. *J Clin Immunol.* 12:353-61.

98. Hochberg M.C., Arnold C.M., Hogans B.B., Spivak J.L. (1988) Serum immunoreactive erythropoietin in rheumatoid arthritis: impaired response to anemia. *Arthritis Rheum.* 31:1318-21.
99. Vreugdenhil G., Wognum A.W., Van Eijk H.G., Swaak A.J.G. (1990) Anemia in rheumatoid arthritis: the role of iron, vitamin B12, and folic acid deficiency, and erythropoietin responsiveness. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 49:93-98.
100. Vreugdenhil G., Kontoghiorghe G.J., Van Eijk H.G., Swaak A.J.G. (1991) Impaired erythropoietin responsiveness to the anemia in rheumatoid arthritis. A possible inverse relationship with iron stores and effects of the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one. *Clinical and Experimental Rheumatology.* 9:35-40.
101. Baer A.N., Dessypris N., Goldwasser R. (1987) Blunted erythropoietin response to anemia in rheumatoid arthritis. *Br J Haematol.* 66:559-64.
102. Davis, D., Charles, P.J., Potter, A., Feldman, M., Maini, R.N., Elliot, M.J. (1997) Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis: in vivo effects of tumour necrosis factor alpha blockade. *Br J Rheumatol.* 36(9):950-6.
103. Manicourt D.H., Triki R., Fukuda K., Devogelaer J.P., Nagant de Deuxchaisnes C., Thonar E.J. (1993) *Arthritis Rheumatism.* 36(4):490-9.
104. Smolen J.S., Breedveld F.C., Burmester G.R., Combe B., Emery P., Kalden J.R., Klareskog L., Maini R.V., Numo R., Putte L.B.A., Riel P.L.C.M., Valverde V.R. (2000) Consensus statement on the initiation and continuation of tumor necrosis factor blocking therapies in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 59:504-505.