



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ROMATOLOJİ BİLİM DALI**

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA KALICI REMİSYONU
ÖNGÖREBİLECEK BİYOBELİRTEÇLERİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. SİBEL YILMAZ ÖNER
ROMATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL- 2014

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ROMATOLOJİ BİLİM DALI**

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA KALICI REMİSYONU
ÖNGÖREBİLECEK BİYOBELİRTEÇLERİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. SİBEL YILMAZ ÖNER
ROMATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. GÜZİDE NEVSUN İNANÇ**

İSTANBUL- 2014

Bu alışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Fonu tarafından desteklenmiş ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Etik Kurulu tarafından 09.2012.0208 protokol numarası ve B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/120255814 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet	1
İngilizce Özet	3
1.Giriş ve Amaç	4
2.Genel Bilgiler	5
2.1. Romatoid artrit	5
2.1.1.Tanı ve sınıflama	6
2.1.2. Epidemiyoloji	7
2.1.3. Etyoloji ve Patogenez	7
2.2. Romatoid artritte remisyon	13
2.2.1.DAS28 Hastalık Aktivite Değerlendirme Ölçeği	13
2.2.2.Yeni ACR/EULAR RA Remisyon Kriterleri	13
2.3. Romatoid artrit ve sitokinler	14
2.3.1. Calprotectin	14
2.3.2. HELIX-II	15
2.3.3. Matriks Metalloproteinaz-3 (MMP-3)	15
2.3.4. Resistin	16
2.3.5. ICTP	16
2.3.6. Interlökin 6 (IL-6)	17
2.3.7. Leptin	18
3.Materyal Metod	19
3.1. Hasta ve kontrol grupları	19
3.2.Verilerin toplanması	19
3.3.Kan örneklerinin laboratuvar değerlendirmesi	19
3.4.İstatistiksel analiz	20
4. Sonuçlar	20
5.Tartışma	29
6.Referanslar	35

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı'ndaki eğitimim süresince, yetişmemdeki emek ve özverileri için; Romatoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Haner Direskeneli, öğretim üyesi Sayın Prof.Dr.Mehmet Pamir Atagündüz ve uzmanlık tezimin proje ve araştırma safhalarının her birinde eleştiri ve katkılarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr.Güzide Nevsun İnanç'a, çalışma arkadaşlarıma ve her zaman sabır ve desteğini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr Sibel Yılmaz Öner
Ocak , 2014

ÖZET

Amaç: Romatoid artrit (RA) tedavisinde hedef, inflamasyonu en iyi şekilde baskılayarak remisyona ulaşılmasıdır. Çalışmamızda, DAS28 aktivite ölçütüne göre remisyonda olan RA hastalarında, Calprotectin, IL-6, Helix II, ICTP, MMP-3, resistin ve leptin serum düzeylerini ölçerek, remisyona destekleyecek ve kalıcı remisyona öngörebilecek biyobelirteçler bulmayı hedefledik.

Yöntem: DAS28 ölçütüne göre remisyonda olan 80 RA hastası {K/E:54/26, ortalama yaş±SD: 51,45±12,08 yıl, ortalama hastalık süresi±SD: 11,46±8,08 yıl, % 68,7'si (n=55) RF pozitif, % 60,7'si (n=48) anti-CCP pozitif} ve aynı yaş, cinsiyet ve benzer komorbiditelere sahip, romatolojik açıdan sağlıklı 80 bireyin serum örneklerinde ELISA yöntemi ile Calprotectin, IL-6, Helix II, ICTP, MMP-3, resistin ve leptin düzeyleri ölçüldü. Hastaların yeni ACR/EULAR remisyona kriterlerini karşılayanları belirlendi. Veriler SPSS 16.0 kullanılarak analiz edildi.

Bulgular: Hastaların ilk vizitte 33'ü (%41,2) Boolean remisyonda iken, 47'si (%58,8) remisyonda değildi. Öte yandan ilk vizitte SDAI kriterlerine göre hastaların 39'u (%48,7) remisyona, 40'ı (%50) düşük hastalık aktivitesi ve 1 kişi (%1,2) orta düzey hastalık aktivitesine sahipti. CDAI kriterlerine göre ise hastaların 35'i (%43,8) remisyona ve 45'i (%56,2) düşük hastalık aktivitesinde idi. Çalışma grubunda ortalama MMP-3, ICTP, resistin ve IL-6 düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. İlk vizitte Boolean, SDAI ve CDAI remisyona kriterlerini karşılayan hastalarda ICTP, resistin ve IL-6 düzeyleri kontrollerden anlamlı olarak yüksek saptandı. İlk vizitte Boolean remisyondaki hastalarla, remisyonda olmayanların ortalama sitokin düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmamasına karşın, SDAI ve CDAI'e göre remisyonda olmayan hastalarda IL-6 düzeyleri, remisyondakilerden anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır. İlk ve son vizitlerinde DAS28 remisyondaki hastalarla, ilk vizitte remisyonda iken, son vizitte olmayanların ortalama sitokin düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı. İlk ve son vizitlerinde Boolean remisyondaki hastalarla, ilk vizitte remisyonda iken son vizitte remisyonda olmayan hastaların ortalama sitokin düzeylerini karşılaştırdığımızda; MMP-3 düzeyinin son vizitte remisyonda olmayan hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptadık. (20540,57±13084 vs 40567,85±27826,94 pg/ml; p=0,04).

Sonuç: Yeni remisyon kriterleri ile inflamasyon düzeyi ve eklem hasarı oluşturma riski daha çok baskılanmış hastalar saptanmakla birlikte, relaps riskinin tamamen ortadan kalktığını söylemek mümkün değildir. Farklı kompozit ölçeklere göre remisyondaki RA hastalarında, yüksek serum MMP-3 ve IL-6 düzeyleri kısa dönemdeki relaps riskini öngörmede yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: romatoid artrit, kalıcı remisyon, biyobelirteç, sitokin

SUMMARY

Objective: The treatment target of rheumatoid arthritis (RA) is to suppress the inflammation as much as optimally possible and to induce remission. In this study, we have intended to find biomarkers which support and might help to predict sustained remission via measuring serum Calprotectin, IL-6, Helix II, ICTP, MMP-3, resistin and leptin levels of patients in DAS28 remission.

Methods: Serum levels of Calprotectin, IL-6, Helix II, ICTP, MMP-3, resistin and leptin were measured by ELISA in 80 patients {F/M:54/26, mean age \pm SD: 51.45 \pm 12.08 year, mean disease duration \pm SD: 11.46 \pm 8.08 year, 68.7% (n=55) RF positive, 60.7% (n=48) anti-CCP positive} and in 80 controls who were healthy rheumatologically and compatible with patients in terms of age, gender and comorbidities. Patients in new ACR/EULAR remission were ascertained. Data were analyzed using SPSS 16.0 program.

Results: On the first visit, 33 patients (41.2%) were in Boolean remission and 47 (58.8%) were not. In terms of SDAI, on the first visit 39 (48.7%) patients were in remission, 40 (50%) were in low disease activity and 1 (1.2%) was on moderate disease activity. According to CDAI, on the first visit 35 (4.8%) patients were in remission and 45 (56.2%) were in low disease activity. In the study group, mean serum MMP-3, ICTP, resistin and IL-6 levels were meaningfully higher than in the controls. Patients in Boolean, SDAI and CDAI remission on their first visit, had significantly higher serum ICTP, resistin and IL-6 levels than the controls. Although there wasn't a significant difference between mean serum cytokine levels of patients in Boolean remission on the first visit, SDAI and CDAI non-remitted patients had statistically significant higher serum IL-6 levels than remitted ones. The difference between serum cytokine levels of patients in DAS28 remission on the first and last visits and patients who were in remission on the first, but not the last visit was insignificant. When we compared serum cytokine levels of patients in Boolean remission on the first and last visits with patients that were in remission on the first visit, but not the last, we observed that MMP-3 levels were higher in patients that were in non-remission on the last visit (20540.57 \pm 13084 vs 40567.85 \pm 27826.94 pg/ml; p=0.04).

Conclusion: New remission criteria could determine patients with more suppressed inflammation and risk of developing joint damage, but it is not possible to say that the relapse risk is eliminated completely. In RA patients remitted according to different criteria, high serum MMP-3 and IL-6 levels could help to predict the relapse risk in the short term.

Key words: rheumatoid arthritis, sustained remission, biomarker, cytokine

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Romatoid artrit, ağrı, sabah tutukluğu, şiş ve hassas eklemler ile giden ve zamanında yeterli tedavi edilmez ise eklemlerin destruksiyonuna, eklem hareketlerinin kısıtlanmasına, hasta yaşam kalitesinin bozulmasına neden olabilecek kronik, inflamatuvar bir hastalıktır. En sık görülen inflamatuvar artrit olup toplumda görülme sıklığı %0.5-1 civarındadır. Tedavide hedef bu inflamatuvar süreci, en iyi şekilde baskılayarak hastalığa ait sekellerin ortaya çıkmasını engellemek ve hastaların remisyona girmesinin sağlanması olmuştur.

Günümüz koşullarında hastaları uzun süreli ve komplet remisyona sokabilecek olan tedavi modalitelerinin çoğalması ve remisyonun öneminin daha iyi anlaşılması sebebiyle RA hastalık aktivitesinin doğru olarak değerlendirilmesi daha da önemli olmuştur. Aktiviteyi değerlendirmede kompozit indeksler (DAS28 , Boolean vb.) kullanılmaktadır. Bu kompozit indeksleri oluşturan PtGA (hastanın global değerlendirmesi), TJC (hassas eklem sayısı) gibi birtakım ölçütlerin hastalık aktivitesi dışında başka faktörlerden de etkilenebiliyor olmaları (depresyon, fibromyalji, yorgunluk, anksiyete gibi non-inflamatuvar ağrı nedenleri) kompozit indekslerle hastalık aktivitesinin değerlendirilmesini ve sonuçlara göre etkin ve yeterli tedavinin düzenlenmesini güçleştirmektedir. Hastaların Romatoid Faktör (RF) pozitif ve /veya anti-CCP pozitif olmaları hastalığın daha ciddi seyredeceğini, radyolojik progresyonun daha hızlı olacağını öngörmeye yardımcı olabilmektedir. Bununla beraber seronegatif RA olgularında benzer bir yorum yapabilmek olası değildir. Tüm bu sebeplerden dolayı hastalık aktivitesi ve remisyonu öngörmeye kullanılacak güvenilir, spesifik, objektif olarak değerlendirilebilecek marker ve /veya sitokinlere olan ihtiyaç devam etmektedir. Biz de literatürde bu amaçla yapılmış çalışmalarını da göz önünde bulundurarak, RA kohortundaki hastalarımızın DAS28 ölçütüne göre remisyonda olan grubu ve aynı yaş, cinsiyet ve benzer komorbiditelere sahip, romatolojik açıdan sağlıklı 80 bireyin serum örneklerinde ELISA yöntemi ile Calprotectin, IL-6, Helix II, ICTP, MMP-3, resistin ve leptin düzeylerinin ölçülmesini planladık. Ayrıca remisyon grubuna dahil ettiğimiz hastaların çalışmaya dahil edildikten sonraki remisyon vizit sayılarının belirlenmesi suretiyle, farklı remisyon ölçütlerini karşılayan hastalarda remisyonu destekleyecek ve kalıcı remisyonu öngörebilecek biyobelirteçler bulmayı hedefledik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.ROMATOİD ARTRİT

RA, özellikle el ve ayaklardaki küçük eklemlerin birçoğunda hassasiyet ve simetrik sinoviyal effüzyonla karakterize sistemik, otoimmün bir hastalıktır. Hastalığın primer lezyonu sinovit olup, görece aselüler olan sinoviyum dokusunun immün sistem hücreleri tarafından invazyonu sonucunda 'pannus' oluşmaktadır. Hiperplastik ve invaziv özellikte olan pannus dokusu, kartilaj yıkımına, kemik erozyonlarına ve sonuç olarak da etkilenmiş olan eklemlerde fonksiyon kaybına neden olmaktadır. RA hastalarında ateroskleroz riski ve lenfoma gelişme sıklığı artmıştır. Bu sebeplerle bazı çalışmalarda kontrolsüz hastalıkta yaşam beklentisinin 6-7 yıl kadar azaldığı bildirilmiştir (1).

RA hastalarında hem erken ve hem de geç hastalık dönemlerinde, hastalık aktivitesinin eklem hasarı ile yakın ilişkisi, radyografik olarak ve MRI incelemelerinde gösterilmiştir. Bu sebeple RA hastasına yaklaşımın en önemli yanı, hastalık başlangıcını takiben ilk birkaç ay içerisinde hastalığı modifiye edici anti-romatizmal ilaçların (DMARD'lar) başlanmasıdır. Erken DMARD tedavisi başlanabilmesi için hastaların erken dönemde tanı alabilmeleri son derece önemlidir. Erken tedavi başlanan hastalarda hastalığın remisyona girme olasılığının daha yüksek gibi görünmektedir (2).

Birkaç dekad önce, tedavi ajanlarının sınırlılığı sebebiyle hastada rezidüel hastalık varlığının olup olmaması daha az öneme sahipti. Günümüz koşullarında hastalığı tam remisyona sokabilecek çeşitli tedavi ajanlarının bulunması sebebiyle , hastalık aktivitesinin doğru ve yeterince değerlendirilmesi son derece önemli olmuştur. Düzenli olarak hastalık aktivite takibinin yapılması ve bu doğrultuda remisyon hedeflerine ulaşılabilmesi için gerekli tedavi modifikasyonlarının yapılması son derece önemlidir. Bununla birlikte bir çalışmada, 2 yıllık klinik remisyon sürecinde olan bir hasta grubunda, radyografik olarak hasarın devam etmekte olduğu gösterilmiştir. Buna karşın persistan hastalık aktivitesi gösteren bir hasta grubuyla yapılan çalışmada, TNF inhibitör tedavi alan hastaların Metotreksat ile kombine tedavi alanlarında daha az radyografik progresyon saptandığı gösterilmiştir (3). Bu süreci tümüyle anlamak için hastalık fizyopatolojisi ile ilgili olarak daha fazla bilgiye ihtiyaç var gibi görünmektedir.

2.1.1.Tanı ve Sınıflama

Amerikan Romatizma Derneği'nin (ACR) 1987 yılında geliştirmiş olduğu RA tanı kriterleri uzun bir süre kullanılagelmiş olmakla birlikte bu kriterlerin, tanısı olan ve uzun süreli RA tanısı ile izlenmekte olan, RF pozitif hastalarla yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuş olması ve yine bu sebeple erken inflamatuvar artrit olan ve RA geliştirebilecek hastalarda tanı koymada yetersiz kalışı, hastalığın erken döneminde başlanması gereken yeterli ve etkin tedavisinin gecikmesi gibi birçok sebepten ötürü 2010 yılında ACR ve Avrupa Romatizma Birliği'nin (EULAR) işbirliği ile yeni sınıflandırma kriterleri geliştirilmiştir (Tablo-1)(4).

Tablo 1: 2010 ACR/EULAR Romatoid Artrit Sınıflama Kriterleri

Eklem tutulumu	1 büyük eklem	0
	2-10 büyük eklem	1
	1-3 küçük eklem	2
	4-10 küçük eklem	3
	>10 küçük eklem	5
Seroloji	RF ve anti CCP negatif	0
	RF ve anti CCP düşük pozitif	2
	RF ve anti CCP yüksek pozitif	3
Akut faz reaktanları	ESH ve CRP normal	0
	ESH veya CRP yüksek	1
Semptom süresi	< 6 hafta	0
	≥6 hafta	1
<u>Skor ≥6 RA tanısı için anlamlıdır.</u>		

2.1.2.Epidemiyoloji:

RA yaklaşık olarak Avrupa'lı ve Kuzey Amerika'lı erişkin popülasyonun % 0,5-1'ini etkilemektedir. Prevalansı Güney Avrupa ülkelerinde Kuzey Avrupa ülkelerine göre daha düşüktür, en yüksek oranlar Kuzey Amerika'da bildirilmiştir (1). Kadınlarda hastalık erkeklere göre 3 kat daha siktir. 1. derece yakını RA tanısı alan popülasyonda RA prevalansı, normal popülasyondan 2-10 kat daha siktir ve ciddi tutulumu olan indeks vakaların yakınlarında daha sık rekürrens oranları gözlenmektedir. Türkiye'de yaşa ve cinsiyete göre uyarlanmış RA prevalansı % 0,36 olarak bildirilmiştir.

2.1.3.Etyoloji ve Patogenez:

RA etyolojisi multifaktöryel olan bir hastalıktır. İkizlerle yapılan çalışmalar, genetik faktörlerin hastalığı duyarlılıktaki farklılığın %60'ından sorumlu olduğunu düşündürmektedir. HLA genlerinin hastalığın genetik riskinin %30-50'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir. RA etyopatogenezinde HLA dışı genlerin de rolü olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca hastalığın kadınlarda ve özellikle de premenapozal dönemde daha sık olması, hormonal ve üreme ile ilgili faktörlerin de rolünü gündeme getirmiştir. Doğurganlık, emzirme, egzogen hormon kullanımı, çevresel ve yaşam tarzı faktörleri, obezite, diyetdeki antioksidan maruziyeti, sigara ve kahve tüketimi ve belli bazı meslek gruplarına mensup kişilerdeki riskler etyopatogenezden sorumlu temel öğeleri oluşturmaktadır. Enfeksiyonun etyolojideki rolünü ortaya koyacak kesin bir epidemiyolojik kanıt bulunamamıştır (2).

Patogenez otoantikolar , genetik yatkınlık, hücrel immun yanıt, hormonlar, çevre-genetik ilişkisi başlıkları altında incelenebilir.

2.1.3.1.Otoantikolar

Romatoid artrit patogenezinde otoimmunitenin varlığının ortaya konulması, RA hastalarının kanlarında insan IgG'sinin Fc parçasına karşı olan antikolarların (romatoid faktörler) keşfi ile olmuştur. Romatoid faktörler çoğunlukla IgM-RF olmakla birlikte IgG ve IgA-RF' ler de mevcuttur. Romatoid faktörlerin eklem içinde immun kompleksler oluşturarak komplemanı aktive ettikleri düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak eklemde artmış damar geçirgenliği, kemotaktik faktörlerin salınması ve immun sistemin efektör hücrelerinin eklemde toplanması gerçekleşmektedir. Romatoid faktörler, RA dışında infeksiyonlarda, diğer otoimmun hastalıklarda ve %15 oranında da sağlıklı yaşlı bireylerde bulunabilir. Bu sebeple çalışmalarda RF'nin sensitivitesi %60-70 ve spesifitesi %50-90 oranında saptanmıştır. RF yüksek titrelerinin, özellikle IgA-RF'nin belirgin prognostik değeri vardır, çünkü bunlar

RA'nın şiddeti ile (örn; radyolojik erozyonlar, daha hızlı hastalık progresyonu, romatoid nodul, vaskülit gibi eklem-dışı belirtiler) ilişkilidirler.

Anti-sitrullin antikolar RA'da nispeten daha erken ortaya çıkarlar ve hastalık için yüksek oranda özgüdürler (% 98). Sitrullinasyon , apoptoz esnasında hücre içi proteinlerin yıkımı için önemli olduğu düşünülen fizyolojik bir süreçtir. Posttranslasyonel sitrullinasyon işlemi belirli polipeptidlerdeki argininlerin deiminasyonunu içerir ve Ca⁺⁺ bağımlı peptidil arginin deiminaz (PAD) enzimi tarafından katalize edilir. 1998 yılında RA hastalarının serumlarında, sitrulline filaggrin'e karşı spesifitesi olan antiperinukleer faktörler ve anti-keratin antikoların tespit edilmesinin sonucunda sitrulline proteinlerin RA etyopatogenezindeki yeri araştırılmaya başlanmıştır (5,6). Bundan sonraki süreçte fibrinojen, vimentin ve α -enolaz olmak üzere farklı sitrulline proteinlerin varlığı tespit edilmiştir. Çalışmaların sonucunda RA hastalarında %60-70 sentetik siklik sitrulline peptidleri (CCP) antijen olarak kabul eden antikolar (ACPA) tespit edilmiştir (7). ACPA , RA hastalığı için > %95 spesifik olmasına karşın, hangi ACPA'nın RA patogenezinin direkt sorumlu olduğu halen tartışma ve araştırma konusudur.

ACPA, hastaların serumlarında artritin klinik olarak ortaya çıkmasından yıllar önce saptanabilmektedir (8). Bu antikoların varlığı undiferansiye artrit tanısı ile takip edilen hastaların RA'ya progrese olacağına göstergesidir (9) ve daha ciddi hastalık seyri ile ilişkilidirler (10).

Anti-Sa antikoları, vimentin üzerindeki strulline epitoplara tanırlar ve ACPA'nın diğer bir alt grubunu oluştururlar. Bu antikolar RA hastalarının ortalama %40'ında görülürler ve anti keratin antikoları, anti filaggrin antikoları ve ACPA ile kıyaslandıklarında daha spesifiktirler. Erken RA'lı grupta bu antikolar %20 oranında görülürler ve yüksek prognostik değere sahiptirler (2).

RA'da kırık bileşenlerine karşı otoantikolar bulunur, fakat bunlar bu hastalık için spesifik değildirler. Major kırık bileşen antijeni kollajen II'dir. RA'da antikollajen II antikolarının prevalansı %30-70 olarak bildirilmiştir ve erken hastalık döneminde yüksek gibi görünmektedirler. Çalışmalarda kollajen II otoimmunitesi ile hastalığın şiddeti, aktivitesi ve süresi arasında belirgin bir ilişki bulunmamıştır ve bu sebeple de antikollajen antikolar yararlı tanısal belirteçler olarak kabul edilmezler (2).

Ayrıca RA hastalarında Anti-RA33, stres proteinlerine karşı antikolar, glukoz-6 fosfat izomeraza karşı gelişen antikolar ve kalpastatine karşı gelişen antikolar da bulunabilmekle birlikte spesifite ve sensitiviteyi düşüktür (2).

2.1.3.2. Genetik Yatkınlık

RA gelişimi ile ilgili en güçlü genetik risk faktörü HLA Class II molekülünü kodlayan lokus ile ilişkili bulunmuş olup bu ilişki toplam genetik riskin %30'unu oluşturmaktadır. Bulgular, 6.kromozomun kısa kolunda yer alan major histokompatibilite kompleksinin içindeki HLA DRB1 lokusunda yer alan allellerin bu ilişkiden sorumlu olduğunu göstermiştir. HLA-DRB1 moleküllerinin bir çoğunda 70-74.pozisyonlar arasında orta aminoasit dizilimleri mevcuttur ve bu dizilim RA ile ilişkili bulunmuş olup *ortak epitop* olarak adlandırılmıştır. Çalışmalar sonucunda ortak epitop ile RA'ya yatkınlık ve hastalık şiddeti arasında güçlü bir ilişki varlığı ortaya konmuştur. Ortak epitop taşıyan bireylerde hastalık daha ciddi ve eroziv seyretmektedir, extra-artiküler bulgular bu hastalarda daha sıktır. Ortak epitop varlığı hastalığın ortaya çıkışını kolaylaştırmaktan çok ACPA varlığı ile ilişkili bulunmuştur. Ortak epitop ve polimorfizmlere zıt olarak, birçok HLA-DRB1 alleli tarafından taşınan ve aspartin residuleri içeren bir sekans olan DERA A aminoasit alellini taşıyanların RA geliştirme riski düşüktür. DERA A pozitifliği % 16 oranındadır.

RA patogeneğinde HLA genlerin yanı sıra non-HLA genlerin de rolü olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. İntrasellüler protein tirozin fosfataz N22 (PTPN 22) geninin fonksiyonel bir varyantının diğer birçok otoimmün hastalığın yanı sıra RA riskinde yaklaşık iki kat artışa sebep olduğu gösterilmiştir. STAT4, 6q23 ve 9q33.2, TNFAIP3/OLIG3 ve TRAF-1 bölgelerini kodlayan genlerdeki polimorfizmler ACPA pozitif hastalarda risk faktörü olarak gösterilmiştir .

2.1.3.3. Hücresel İmmün Yanıt

RA'da sinovit, birçok immün efektör hücrenin infiltrasyonuna maruz kalır. Zamanla bu hücrelerin aktivasyonu ile açığa çıkan sitokinler, fibroblast ve osteoklastları aktive ederek kemik ve kıkırdağın yıkımına neden olurlar.

T lenfositler, RA sinoviyumundaki hücrelerin %30-50'sini oluşturmaktadırlar. T hücrelerinin çoğunluğunu CD4+, yardımcı T hücreleri oluşturur. Yardımcı T hücrelerinin Th1 ve Th2 olmak üzere iki alt grubu vardır; Th1 hücreler, Interferon (INF)- γ salgılayarak hücre içi bakterilere karşı savunmayı sağlarken, IL-4 salgılayan Th2 hücreleri hücre dışı parazitlere karşı savunmadan sorumludurlar. Yardımcı T hücrelerinin Th17 olarak adlandırılan bir grubu hücre dışı bakterilere karşı savunma ve Treg hücreler ise, immün toleransın düzenlenmesinden sorumludurlar.

RA patogeneğinde diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, T hücre kaynaklı sitokinlerin sağlıklı bireydeki immün dengesinin bozulması ve Th1 sayısının Th2 sayısına

oranla artışı sorumlu tutulmaktadır. Th17 hücreleri otoimmün inflamasyonda önemli bir rol üstlenmektedirler. Naif prekürsörlerden bu hücre tipinin farklılaşması için ortamda TGF- β , IL-23 ve pro-inflamatuar sitokinler olan IL-6 ve IL-1 β 'nın ortamda varlığı gerekmektedir. Th17 hücreleri TNF- α , IL-6, IL-22, GM-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-17 gibi birçok pro-inflamatuar sitokini salgılayabilirler. Th17 hücrelerinin RA patogeneziindeki önemi, insan RA sinoviyal sıvı, sinoviyum biyopsileri ve hastaların serumlarında, osteoartritli hastalarda saptanmayan IL-17, IL-23 sitokinlerinin saptanması ile ortaya konmuştur. IL-17, oldukça pleiotropik bir sitokin olup, anjiyogenezin artışı ve osteoklastogenezin başlaması yoluyla kemik ve kıkırdak hasarına sebep olmaktadır. Bu sebeple IL-17, son dönemde RA tedavisinde ilgi çeken bir tedavi hedefi olarak görülmektedir. Benzer şekilde, bir IL-6 reseptör antikoru olan tocilizumabın RA tedavisinde onay alması, kısmen IL-6'nın Th17 gelişimi ve farklılaşması üzerine olan etkileri ile açıklanabilir (1).

T hücreleri üzerindeki CD28 ve antijen sunan hücreler üzerindeki CD80/86 arasındaki iletişimi ortaya çıkan sinyallerin şiddetinin kontrolü, T hücreleri kaynaklı CTLA-4 tarafından yapılmaktadır. Bu mekanizmadan faydalanılarak geliştirilen CTLA-4 Ig fuzyon proteini: abatacept, yeni tedavi ajanlarından biri olarak kullanılmaktadır.

İnflamasyon sırasında, B lenfositler de sinoviyumu infiltre ederler. Sinoviyal dokudaki fibroblast benzeri sinovisitler ve dendritik hücreler B lenfositleri inflamasyon alanına çeken, onların yaşam sürelerini etkileyen faktörler salgırlar. Bu faktörlerin başlıcaları BAFF, CXCL 12, CXCL 13 ve APRIL'dir. B lenfositler, yüzeylerindeki Ig'ler aracılığı ile antijen tanıyan ve prezente eden hücreler olarak görev yaparlar. B lenfositler, TNF- α ve IL-6 salgılayarak makrofajların aktivasyonuna yol açarlar. B lenfositlerden salınan RF immun kompleksler oluşturarak komplemanı aktive ederler. B lenfositlerin RA patogeneziindeki rollerinin anlaşılması ile TNF inhibitör tedavilere dirençli hastalarda tedavide CD20+ B lenfosit sayılarını azaltan Rituksimab, kullanılan tedaviler arasında yerini almıştır.

Mast hücreleri tarafından salınan çeşitli sitokin ve medyatörler, immun hücrelerin inflamasyon alanında toplanması, anjiyogenezin hızlanması ve hem direk hem de indirek yollarla kartilajın yıkımına sebep olmaktadır. Mast hücreleri ayrıca IL-17 salınımı da yaparlar. Mast hücreleri ayrıca ACPA pozitif hastaların patogeneziinde rol almaktadırlar.

Monosit ve makrofajların RA patogeneziindeki rolü kronik inflamasyonun idame edilmesidir. Makrofajlar doğal ve edinilmiş bağışıklık elemanları arasındaki iletişimi sağlarlar. Hem sinoviyal dokuda, hem de kıkırdak/pannus bileşkesinde fazla miktarda bulunan hücrelerdir. Makrofajlar, fagositoz, antijen işleme ve sunma, immun kompleks ve antikorlara cevaben Fc reseptörlerini eksprese etmek, kompleman sisteminin aktivasyonu ve regülasyonu,

toll-like reseptör ekspresyonu, doku yıkımı ve yeniden yapılanma gibi fonksiyonlara sahiptirler. TNF- α , IL-1, IL-6 başta olmak üzere pro-inflamatuar sitokinlerin salınımı, MMP-9 ve 12 enzimleri ile kartilajın yıkımı ve GM-CSF gibi büyüme faktörlerinin salınması makrofajların işlevleri arasındadır. Makrofajlar aynı zamanda östrojene yanıtı hücrelerdir. Fizyolojik östrojen, IL-1 ekspresyonunu indükler, bununla beraber gebelikteki yüksek östrojen düzeyleri IL-1 sekresyonunu inhibe etmektedirler ve bu durum RA'nın aktivitesinde gebelik esnasındaki azalmayı açıklamaktadır. IL-4 makrofaj fonksiyonlarını baskılayarak; IL-10 ise HLA-DR ve Fc reseptör ekspresyonunu ve antijen sunumunu azaltarak inflamasyonu baskılamak yönünde etki ederler (1,2,11).

Erken artriti olan hasta grubu içinde RA'ya progrese olanlarla, remisyona girenler ve başka artrit tanıları alan hastaların sitokin profilleri incelendiğinde aralarında farklılıklar saptanmıştır. RA geliştiren erken artritle hasta grubunda T hücrelerinden kaynaklı sitokinlerin (IL-2, IL-4, IL-13 ve IL-17) düzeyleri artmış olarak saptanırken, makrofaj ve stroma kaynaklı sitokinler olan EGF, bFGF, IL-1 ve IL-15 sitokinlerine rastlanmamıştır. IL-6 ise inflamasyon ile ilişkili olarak bulunmuş ve bu ilişkinin altta yatan RA hastalık tipi ile ilgili olmadığı gösterilmiştir. İlginç olarak bu profile ilerlemiş RA hastalık evrelerindeki hastalarda rastlanmamıştır. Th1 sitokini olan IFN- γ ' ya rastlanmaması ve Th2 sitokinleri olan IL-4 ve IL-13'ün ve Th17 kaynaklı IL-17'nin erken RA fazında bulunması, hastalığın başlamasında T hücrelerinin (özellikle Th2 ve Th17) önemini ortaya koymuştur (1,2,11).

RA ileri hastalık evrelerinde makrofaj kaynaklı sitokinlerin düzeyleri artarken, T hücre kaynaklı sitokinler azalmaktadır. RA hastalarının sinoviyal biyopsilerinde, diffuz lenfositik infiltrasyonlar RF negatif RA olgularında tespit edilmiş ve IFN- γ , IL-4, IL-1 β ve TNF- α seviyeleri düşük bulunmuştur. Biyopsilerinde germinal merkez formasyonu olan hastalarda ise IFN- γ ve IL-10 seviyeleri yüksek bulunurken, IL-4 saptanmamıştır. Ekstra-artikuler tutulumu olan hastaların biyopsilerinde sinoviyal granuloamlar ve yüksek seviyede IFN- γ , IL-4, IL-1 β ve TNF- α saptanmıştır. IL-15 ve IL-18 de patogeneizde rol alırlar. TGF- β , doku yıkımı ve yeniden yapılanmanın önemli regülatörüdür. Pro ve anti-inflamatuar fonksiyonlar üstlenmiştir. IL-6 varlığında Treg gelişimi ve Th17 gelişiminden sorumludur .

İmmun efektör hücreler inflamasyonun başlaması ve devamından sorumlu iken, sinoviyal fibroblastlar ve osteoklastlar, kemik ve kıkırdak hasarından sorumludurlar. Sinoviyal fibroblastlar MMP-1,-3,-14 ve -15 , katepsin B, K, L üretiminden sorumludurlar. Bu enzimler ekstrasellüler matriksi yıkarak T ve B lenfositlerin çoğalmasına neden olan yeni antijen kaynakları oluşumuna yol açarlar. Makrofajlar, sinoviyal fibroblastlar ve T hücreleri IL-1, TNF- α ve RANKL (receptor activator of NF κ B ligand) eksprese ederler ve bunlar

aracılığı ile osteoblastların osteoklastlara dönüşümü gerçekleşerek kemik doku yıkılır ve radyolojik olarak erozyonlar ortaya çıkar (1,2,11).

2.1.3.4. Çevre-genetik ilişkisi

Sigara içmek, RA için bilinen en önemli risk faktörü. Uzun yıllar sigara içmek hem hastalık riski ve hem de hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olarak saptanmıştır. Sigaranın ACPA pozitif RA hastalarında riski arttırdığı ancak aynı etken-hastalık ilişkisinin ACPA negatif hastalıkla olmadığı gösterilmiştir. Ortak epitop ve/veya PTPN 22 risk alleleri taşınması riski daha da arttırmaktadır. Bu gözlemlerden yola çıkılarak sigaranın protein sitrullinasyonunu arttırdığı görüşü ortaya konmuştur.

RA hastalarının ACPA negatif grubunda karbamile edilmiş proteinlere karşı otoantikorlar saptanmıştır. Ayrıca yine ACPA negatif hasta grubunda HLA-DR3 lokusundaki varyansın hastalığa yatkınlığı, hastalığın derecesini ve inflamasyonun düzeyini etkileyebileceği gösterilmiştir. Epstein-Barr Virus, Parvovirus B19, Porphyromonas gingivalis ve diğer bazı infeksiyonların genetik yakınlığı olan bireylerde RA ortaya çıkışını tetiklediği konusundaki görüş birçok çalışmada araştırılmış ancak bugüne değin yapılan araştırmalarda net bir sebep-sonuç ilişkisi gösterilememiştir. Kahve tüketiminin ACPA pozitif RA gelişimi ile pozitif yönde ilişkili olduğunu, alkol kullanımının ACPA pozitif hastalıktan koruduğu ancak ACPA negatif hastalık ile ilişkili olmadığını gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur. Ayrıca ACPA negatif hasta grubu ile artmış vücut kitle indeksi arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar vardır. Adipositlerin de pro-, anti-inflamatuar sitokinlerin kaynağı olduğunun saptanması üzerine, çalışmalar adipoz dokunun immun-modulator etkileri üzerine yoğunlaşmıştır.

Birçok otoimmün hastalıkta olduğu gibi RA popülasyonunda da kadın cinsiyet dominansı gözlenmektedir. Bu durum cinsiyet hormonları ve üreme faktörlerinin RA gelişimi ve ciddiyeti üzerine etkisi olduğunu düşündürmektedir. Erken menarş ile RA gelişim riski azalmakta, gebelik sonrasında ise bu risk artmaktadır. RA aktivitesi gebelik esnasında azalmaktadır. Oral kontraseptif kullanımı hastalık riskini azaltmakta, multiparite ise hastalık ciddiyetini arttırmaktadır (1,2).

2.2.ROMATOİD ARTRİTTE REMİSYON

2.2.1.DAS28 Hastalık aktivitesi değerlendirme ölçeği

DAS28 (Disease Activity Score 28) RA hastalarında 28 eklem muayenesi sonucunda hassas ve şiş eklem sayılarının belirlenmesi, hastanın son 1 haftalık zaman zarfında hastalık ile ilgili olarak değerlendirdiği 0-100 arasındaki genel sağlık durumu ve sedimentasyon hızı (ESR) (mm/saat cinsinden) veya CRP değerlerinin özel bir formüle yerleştirilmesi ile hesaplanan RA hastalık aktivite ölçeklerinden bir tanesidir. Çalışmamıza dahil edilen hastaların DAS28 değerleri ESR sonuçları kullanılarak hesaplanmıştır.

DAS28: $0,56*(\sqrt{HES})+0,039*(\text{ŞES})+0,72* \ln(\text{ESR})+ 0,013$ (genel sağlık)

HES: Hassas eklem sayısı, **ŞES:** şiş eklem sayısı

DAS28 hastalık aktivitesi değerlendirme ölçeğine göre;

1-DAS28 değeri < 2,6 olan hastalar remisyonda,

2-DAS28 değeri <3,2 olan hastalar düşük hastalık aktivitesine sahip,

3-DAS28 değeri $\leq 5,1$ olan hastalar orta düzeyde hastalık aktivitesine sahip ve $> 5,1$ olanlar ise yüksek hastalık aktivitesine sahip hastalar olarak değerlendirilmektedirler (12).

2.2.2. Yeni ACR/EULAR RA Remisyon kriterleri

Yeni ACR/EULAR RA Remisyon kriterleri; Boolean-based definition ve Index-based definition olmak üzere iki tanımlama olarak belirlenmiştir (13).

1-Boolean-based definition: Herhangi bir zamanda yapılan değerlendirmede hastanın;

Hassas eklem sayısı ≤ 1

Şiş eklem sayısı ≤ 1

CRP ≤ 1 mg/dl

Hasta Global Değerlendirmesi: ≤ 1 (0-10'a kadar bir skala üzerinden) olması şartlarının tamamını karşılaması halinde remisyonda olarak değerlendirilir.

2-Index-based definition : Herhangi bir zamanda yapılan değerlendirmede hastanın SDAI (Simplified Disease Activity Index) değerinin $\leq 3,3$ olması durumunda hasta remisyonda olarak değerlendirilir.

SDAI: ŞES28 + HES28+ Hastanın Global değerlendirme (VAS;0-10) + Doktorun Global Değerlendirmesi (VAS;0-10) +CRP (mg/dl) formülüyle hesaplanmaktadır.

SDAI hastalık aktivitesi değerlendirme ölçeğine göre hastalar ;

- 1- $\leq 3,3$ SDAI değeri varsa remisyonda,
- 2- < 11 SDAI değeri varsa düşük hastalık aktivitesine sahip,
- 3- < 26 SDAI değerine sahip olanlar ise orta düzeyde hastalık aktivitesine sahip olarak değerlendirilirler (12).

2.3 ROMATOİD ARTRİTTE SİTOKİNLER

2.3.1. *Calprotectin (major S100 lökosit proteini)*

Calprotectin, nötrofil granulositlerindeki sitozolik proteinlerin % 40-60'ını oluşturan, aynı zamanda monosit-makrofajların da yapısında bulunan, S100 kalsiyum bağlayan proteinler ailesine mensup, 36kDa ağırlığında bir heterodimerdir. Calprotectin'in ağır zincirden oluşan alt ünitesi endotelde bulunan heparan sülfat proteoglikanlarla etkileşerek lökositlerin endotele adezyonu ve damar dışına göçünde rol oynar (14). Calprotectin, bu lökositlerin aktivasyon ve yaşam döngüleri esnasında salınmakta olup, ciddi inflamatuvar hastalığı olan hastaların plazma ve serum örneklerinde artmış olarak saptanmaktadır (15). Calprotectin'in en fazla salındığı yer, kartilaj-pannus bileşkesidir. Çalışmalarda farklı romatolojik hastalıklarda, Calprotectin düzeyinin inflamatuvar aktivite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Hammer ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, RA hastalarında Calprotectin serum düzeyleri ile radyografik hasarın korele olduğu, Calprotectin düzeylerinin 10 yıllık radyografik progresyonu öngörmeye faydalanılabilecek bir marker olduğu ifade edilmiştir (16). Klinik pratikte artrit bulguları devam etmesine karşın normal veya düşük CRP ve /veya ESR düzeyleri olan hastalarda Calprotectin'in yararlı bir inflamatuvar marker olarak kullanılabileceğini öngören çalışmalar mevcuttur (16,17). Daha önceki çalışmalarda Calprotectin düzeylerinin anti-CCP ve IgA/IgM RF düzeyleri ile korele olduğu da gösterilmiştir (18).

Adalimumab ile tedavi edilen RA hasta grubunda, Calprotectin düzeylerinin hastaların Ultrasonografi (USG) skorları ile uyumu ve tedavi yanıtı ile korelasyonunun değerlendirildiği başka bir çalışmada (19), Calprotectin'in devam eden inflamasyonu gösterir bir belirteç olduğu ve Calprotectin düzeyinin RA hastalarının USG değerlendirmeleri ile yüksek oranlarda korele olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak yeni ACR/EULAR remisyon kriterlerine göre, remisyonu öngörmeye normal Calprotectin düzeylerinin yararlı olabileceği vurgusu yapılmıştır.

2.3.2. Helix II

Romatoid artrit en önemli klinik manifestasyonlarından biri de etkilenmiş olan eklemlerde kıkırdağın yapısının bozulması ve yıkımıdır. Genel olarak kıkırdak yıkımının varlığı ve genişliği radyografik olarak değerlendirilirse de, MRI, USG gibi farklı modalitelerden de bu konuda faydalanılabilir. Ancak, RA'da kıkırdak yıkımı hastalığın radyografik olarak saptanmasından çok önce ve erken fazlarında ortaya çıkmaktadır. Bu sebeplerle klinik olarak hastayı değerlendirirken, kıkırdak yıkımını dolayısı ile hastalık progresyonunu gösterebilen, duyarlı biyomarkerların bulunması son derece önemlidir (20,21). Tip 2 kollajen, kıkırdak dokusunu oluşturan en önemli kollajendir. Tip 2 kollajenin yıkılması, kıkırdak yıkımının en önemli parçasıdır ve çoğunlukla da geriye dönüşümsüz kıkırdak hasarı ile sonuçlanmaktadır. Tip 2 kollajenin kıkırdak dokusu için spesifik olması ve yıkımının RA hastalarında hasarın başlamasının erken bir göstergesi olması sebebiyle Tip 2 kollajen yıkım ürünlerinin araştırıldığı (sinovyal sıvı, serum, idrar vb.) çalışmalar yapılmaktadır. Helix II de bu yıkım ürünlerinden bir tanesidir. Helix II düzeylerinin değerlendirilmesi ve RA hastalık progresyonu açısından kullanılabileceğini öngören bir çalışmada (22), yüksek Helix II seviyelerinin, hastalık aktivitesi ve inflamasyondan bağımsız olarak progresyon riskini saptamada kullanılabileceği gösterilmiştir.

2.3.3. Matriks Metalloproteinaz-3 (MMP-3)

MMP-3 (Stromelysin-1), ekstraselüler matriksin birçok komponentini yıkabilecek düzeyde etkinliğe sahip bir enzimdir ve son zamanlarda RA tanı ve tedavisindeki yeri çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Bu çalışmalarda serum MMP-3 düzeyinin hastalık aktivitesi, radyolojik indeksler, ESR, CRP gibi akut faz reaktanları ile korele olduğu gösterilmiştir. Funahashi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada serum MMP-3 düzeylerinin hem IL-6 ve hem de hastalığın klinik aktivitesini göstermede kullanılan kompozit indekslerden biri olan CDAI (Clinical Disease Activity Index) ile korele olduğu saptanmıştır (23). Ribbens ve ark. yaptığı bir başka çalışmada serum MMP-3 düzeyinin sinoviyumdan kaynaklı, RA aktivitesini gösterir bir marker olduğu ve MMP-3 düzeylerindeki erken değişikliklerin hastalık progresyonunu predikte etmede önemli olduğu sonucuna varılmıştır (24). Posthumus ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada da hastalık aktivite ölçütleri, radyolojik skorların yanında kümülatif MMP-3 düzeyinin özellikle eklem aralığındaki daralma ile korele olduğu belirtilmiştir (25).

2.3.4. Resistin

108 amino asitli ve 12,5 kDa ağırlığında bir polipeptit olan resistin proinflamatuvar bir sitokindir (26). İnsanlarda resistin geni 19. kromozom üzerindedir. Dolaşımında resistin iki farklı durumda bulunur: yüksek molekül ağırlıklı heksamer formu ve kompleks formu. Yüksek molekül ağırlıklı olan formu (heksamer) dolaşımında daha yüksek miktarlarda bulunur ve biyolojik olarak aktif olan formudur. Çalışmalarda TNF- α , IL-1 β ve IL-6 ile lipopolisakaritler gibi proinflamatuvar sitokinlerin kandaki mononükleer hücrelerden resistin salgısını arttırdığı gösterilmiştir (27). Başka bir çalışmada resistinin makrofajlarda siklooksijenaz-2 aktivitesini önemli derecede arttırdığı ve anti-resistin antikorunun verildiğinde ise bu etkinin baskılandığı gösterilmiştir (28).

Bokarewa ve ark. (27) çalışmasında resistinin artrit gelişiminde proinflamatuvar bir sitokin olduğu gösterilmiştir. Çalışmada deney hayvanlarına intra-artiküler resistin enjekte ettikten sonra artrit geliştiğini göstermişler ve resistinin proinflamatuvar özelliğini NF- κ B inhibitörü vererek engellemişlerdir. Sonuç olarak Bokarewa ve ark. resistinin inflamasyon bölgesinde toplandığını, ayrıca sitokin üretimi ve NF- κ B aktivasyonu ile inflamatuvar süreci desteklediğini göstermişlerdir. Bu nedenle NF- κ B inhibisyonunun inflamasyon gelişimini önleyebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Klaasen ve arkadaşlarının serum adipositokin düzeylerinde tedaviye bağlı değişiklikleri değerlendirdikleri çalışmalarında (bir grup anti-TNF, diğer grup glukokortikoid kullanmakta) resistin düzeylerindeki azalmanın DAS28, CRP, ESR değerlerindeki düzelme ile korele olduğu saptanmış ve anti-TNF kolunda, başlangıçtaki serum resistin düzeylerinin anti-CCP ve CRP düzeylerinden bağımsız olarak radyolojik progresyonu predikte edebileceği saptanmıştır (29).

2.3.5. ICTP (*C-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteinases*)

Son dönemde kemik ve kıkırdak yıkımını gösterebileceği düşünülen birçok biyomarker ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan bir tanesi de kemik metabolizmasını değerlendirmede kullanılan ve tip 1 kollajenin yıkımını gösteren bir molekül olan ICTP' dir. ICTP düzeyleri erken ve geç RA hastalarında Tip 1 kollajen yıkımını gösterir ve güvenilir bir marker olarak kabul edilmektedir (30,31). Progresif eklem hasarının, tanı esnasındaki yüksek ICTP düzeyi ile kombine pozitif RF ve/veya artmış CRP düzeyleri ile korele olduğunu gösteren bir çalışmada, RF ve ICTP kombinasyonunun, erken RA'da agresif hastalığı belirlemede etkin olacağı sonucuna ulaşılmıştır (32). Yine Garnero ve ark. yapmış oldukları

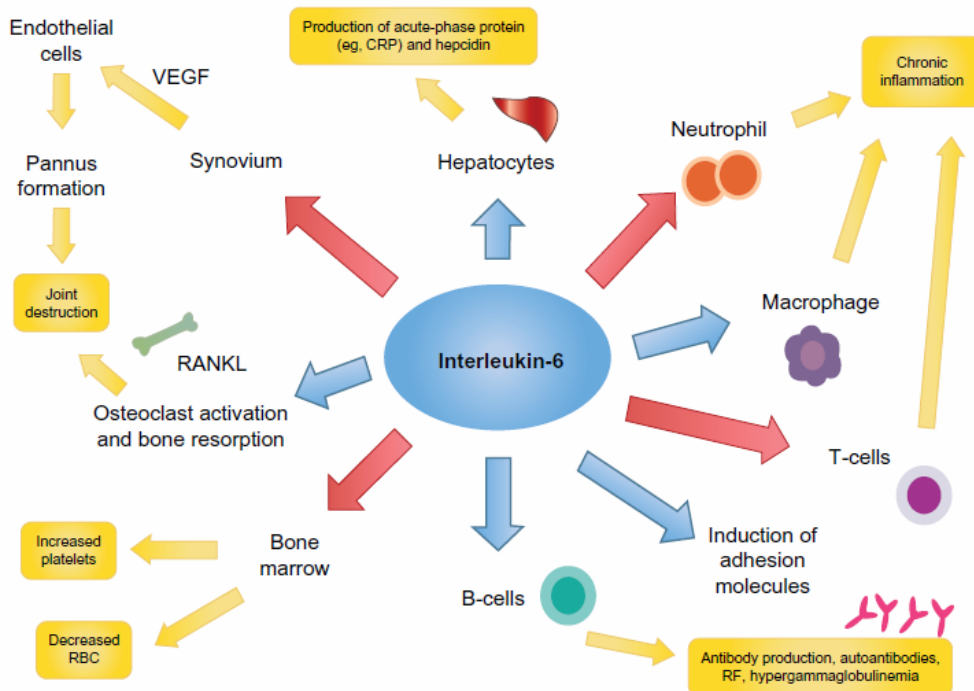
bir çalışmada, anti IL-6R (Tocilizumab) tedavisi alan hasta grubundan, tedavi sonrasında DAS28 remisyonunu (DAS28<2,6) sağlayan grupta ICTP, MMP-3 ve Helix II düzeylerinde, remisyona giremeyen gruba göre daha yüksek düşüşler saptanması, bu markerların remisyonu göstermede kullanılabilir olduğunu göstermiştir (33).

2.3.6. İnterlökin 6 (IL-6)

IL-6 kendi reseptörü ile birleşince geniş spektrumda birçok inflamatuvar olayın ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. IL-6, akut faz reaktanlarının yapımı, lökositlerin inflamasyon olan bölgeye toplanması (34), sinovit proliferasyonu (35), osteoklastların maturasyonu ve aktivasyonu (36), osteoblastların farklılaşması ve fonksiyonları (37) üzerinde etkili olmaktadır. Sonuçta sinoviyal pannus formasyonunun oluşmasına neden olan olayları tetikleyerek, kemik ve kıkırdak destruksyonunda merkezi bir rol oynamaktadır (Şekil 1).

RA hastalarının serum ve sinoviyal sıvılarından yapılan ölçümlerde IL-6 düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur (38,39). Serum IL-6 düzeylerinin RA hastalarında radyografik progresyon ile korele olduğu gösterilmiştir (40). IL-6'nın inflamasyondaki rolünün ve kemik, kıkırdak doku yıkımına yol açtığına güvenilir kanıtları olması nedeni ile bu sitokinin reseptörüne karşı geliştirilmiş monoklonal antikolar (Tocilizumab) bugün özellikle dirençli RA olgularının tedavisinde kullanılmaktadır.

Şekil 1: IL-6'nın aktive ettiği inflamatuvar yollar (CRP:C reaktif protein, RF:Romatoid faktör, RBC: eritrosit, VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü)



2.3.7.Leptin

Yağ dokusu, adipositokinler olarak adlandırılan birçok molekül salgılamaktadır; bunlar leptin, adiponektin, visfatin ve resistindir. Adipositokinler, glukoz metabolizması, iştahın düzenlenmesi gibi fonksiyonlarının yanında inflamasyonda da yer almaktadırlar. Leptin'in insanlarda yiyecek alımı ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde önemli rolü olduğunu gösterilmiştir. Bu görevinin yanında leptin'in obezitede, enerji dengesinin sağlanmasında, metabolizmanın düzenlenmesinde, cinsel gelişim ve pubertenin başlangıç denetiminde, üremede, hipotalamo-hipofizer işlevlerin düzenlenmesinde, hematopoezde, immünyetede, mide bağırsak işlevlerinde, kan damarı gelişiminde, kardiyovasküler sistem, üriner sistem ve sempatik sistemin aktivasyonda rol aldığını ortaya konmuştur (41,42,43,44,45).

Leptin, resistin ve visfatin proinflamatuvar olarak fonksiyon gösterirken, adiponektin anti-inflamatuvar olarak işlev görmektedir. Leptin, T hücre aktivasyonunu ve TNF- α , IL-6 ve nitrik oksit üretimini indükleyerek pro-inflamatuvar aktivite göstermektedir.

RA, SLE ve Behçet Hastalığında leptin düzeyleri ve hastalık aktivitesini değerlendirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. RA hastalarında yapılan değişik çalışmalarda leptinin hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar kadar ilişkisi olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur.

3. MATERİYAL METOD

3.1.Hasta ve kontrol grupları

Çalışma vaka-kontrol şeklinde planlanmıştır. Hasta grubu, 1987 Amerikan Romatoloji Cemiyeti (ACR) kriterleri ile tanı konmuş RA hastalarından oluşmaktadır. Çalışma kapsamında DAS28 hastalık aktivitesi ölçütüne göre remisyonda olan 80 RA hastası ve çalışmaya alınan hasta grubu ile uyumlu yaş, cinsiyet ve komorbiditeye sahip olan ve romatolojik açıdan sağlıklı 80 birey, kontrol grubu olarak alınmıştır.

3.2.Verilerin Toplanması

Çalışmaya alınan hastalar, 2002 yılından bu yana hastanemiz Romatoloji polikliniğimizde takipli, RA kohortunda yer alan hastalardır. Hastaların klinik bilgileri; hassas ve şiş eklem sayıları, hastanın hastalığını global olarak değerlendirmesi (PtGA), doktorun hastalığı global değerlendirmesi (PGA), hastaların son bir hafta içindeki hastalığa bağlı ağrılarını değerlendirmeleri (VAS pain), HAQ skorları, laboratuvar verileri her vizitte olmak üzere yılda en az iki kez değerlendirilmektedir. RA kohortundaki hastalardan, 1 yıllık takip vizitleri esnasında DAS28 aktivite ölçeğine göre remisyonu karşılayanlar çalışmaya dahil edilmişlerdir. Ayrıca çalışmaya alınan hasta grubu ile uyumlu yaş, cinsiyet ve komorbiditeye sahip olan ve romatolojik açıdan sağlıklı olan bir grup da kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Remisyon grubuna dahil edilmiş olan hastaların çalışmaya alındıktan sonraki vizitlerden kaçında remisyonda oldukları belirlenmiştir. Her iki grubu oluşturan bireylerden 10 cc periferik venöz kan alınarak serumları ayrılmış ve – 80°C de saklanmıştır. Saklanmış olan serumlarda ELISA yöntemi ile Calprotectin, IL-6, Helix II, ICTP, MMP-3, resistin ve leptin düzeyleri ölçülmüş ve bu sitokin ve/veya marker'lar ile hastalık remisyonunun devamlılığı arasındaki olası ilişkinin araştırılması hedeflenmiştir.

3.3.Kan Örneklerinin Laboratuvar Değerlendirilmeleri

Çalışma süresince toplanan kan örneklerinde, ELISA yöntemi ile Calprotectin (EASTBIOPHARM) (ng/ml), IL-6 (ASSAYPRO) (pg/ml), Helix II (EASTBIOPHARM) (ng/ml), ICTP (USCNLIFE) (ng/ml), MMP-3 (AVISCIERA BIOSCIENCE) (pg/ml), Resistin (ASSAYPRO) (ng/ml) ve Leptin (ASSAYPRO) (ng/ml) düzeyleri ölçüldü.

Deneyler yapılırken PASTEUR marka LP35 model mikropilaka yıkayıcı kullanılmıştır. Okumalar BIOTEK marka ELX-800 model mikropilaka okuyucuda yapılmıştır.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 16.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Demografik ve klinik data ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Dağılımın normal olmadığı değişkenler için medyan değerler verilmiştir. Parametrik dataların analizinde, iki populasyonun ortalamalarının kıyaslanmasında Student's t testi, ikiden fazla populasyonun kıyaslanmasında One-way ANOVA testi, non-parametrik datanın değerlendirilmesinde ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Bağlı analizleri için Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. Anlamli farklılık tanımlaması için $p < 0.05$ değeri alınmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. Grupların genel özellikleri

Çalışma, DAS28 remisyonunda olan 80 RA hastası ve 80 kontrol olmak üzere, toplam 160 kişi ile yapılmıştır. Çalışma grubunda bulunanların 54'ü kadın (%67,5) ve 26'sı (%32,5) erkektir. Grubun ortalama yaşı $51,45 \pm 12,08$ (yıl), ortalama hastalık süresi $11,46 \pm 8,08$ (yıl) dir. RA hastalarının ortalama vücut kitle indeksi (BMI) $26,96 \pm 4,54$ kg/m^2 dir. Kontrol grubunda bulunan bireylerin 54'ü kadın (% 67,5) ve 26'sı (%32,5) erkektir. Kontrol grubunun ortalama yaşı $51,17 \pm 11,70$ (yıl), ortalama BMI'i ise $28,13 \pm 4,62$ kg/m^2 dir. Çalışma ve kontrol gruplarının cinsiyet ($p=1,00$), yaş ($p=0,11$) ve BMI ortalamaları ($p=0,88$) arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

RA hastalarının % 68,7'si ($n=55$) RF pozitif, % 60,7'si ($n=48$) anti-CCP pozitif, % 13,7'sinin ($n=11$) CRP değeri pozitif idi. Grubun ortalama ESR değeri $13,66 \pm 7,88$ mm/sa'tir. Çalışma grubundakilerin son aldıkları tedavilere göre oranları; steroid kullananlar % 41,2 ($n=33$), biyolojik ajan kullananlar %26,2 ($n=21$), DMARD alan hasta sayısı %96,2 (77) şeklindeydi. Çalışma grubuna ait özellikler Tablo 2'de derlenmiştir.

Tablo 2:Çalışma grubunun genel özellikleri

	N	%
Cinsiyet Kadın	54	67,5
Yaş (yıl) (mean±SD)	51,45±12,08	
Hastalık Süresi (yıl) (mean±SD)	11,46±8,08	
*CRP pozitifliği	11	13,75
RF pozitifliği	55	68,75
Anti-CCP pozitifliği	48	60,75
**ESR değeri (mm/sa) (mean±SD)	13,66 ±7,88	
Steroid kullananlar	33	41,2
Biyolojik ajan kullananlar	21	26,2
Extra-artiküler tutulumu olanlar	24	30
Komorbiditesi olanlar	40	50
HAQ (mean±SD)	0,34±0,44	
PGA (mean±SD)	0,87±0,83	
PtGA (mean±SD)	1,86±1,76	
Şiş Eklem Sayısı (median, range)	0 (0-6)	
Hassas eklem sayısı (median, range)	0 (0-4)	

*CRP: mg/dl olarak ölçüldü, cut off:0,5 mg /dl olarak alındı.

**ESR: cut off:20 mm/sa olarak alındı.

4.2. Çalışma grubunda hastalık aktivite belirteçleri ve sitokinlerin ilişkisi

RF pozitif olan hastaların serum sitokin düzeyleri, RF negatiflerle karşılaştırıldığında, pozitif grupta **resistin** düzeyleri negatif gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 3).

Hastaların anti-CCP pozitif olanlarıyla anti-CCP negatif olanlarının ortalama serum sitokin düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Hastaların CRP pozitif ve negatif olanları arasında ortalama sitokin düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

RF titresi ile her bir sitokin serum düzeyinin korelasyonuna bakıldığında; sadece **resistin** düzeyleri ile RF titresi arasında anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (**r=0,339; p=0,008**). Anti-CCP titresi ile sitokin düzeyleri arasında ise anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. CRP titreleri ile **MMP-3** (**r=0,27; p=0,014**) ve **ICTP** (**r=0,23; p=0,042**) serum düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon gösterilmiştir. Öte yandan ESR düzeyleri ile **IL-6** (**r=0,22; p=0,044**) ve **Leptin** (**r=0,28; p=0,012**) serum düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmıştır.

Tablo 3:RF pozitif ve negatif hastaların sitokin düzeyleri

	RF pozitif	RF Negatif	p değeri
Calprotectin (ng/ml)	130,41±161,53	142,98±165,36	0,750
MMP-3 (pg/ml)	31573,28±24597,42	42329,55±33601,68	0,110
ICTP (ng/ml)	5,22±2,21	4,47±1,54	0,130
Helix II (ng/ml)	46,03±44,26	57,26±63,00	0,360
Resistin (ng/ml)	55,29±32,89	43,39±12,08	0,023
Leptin (ng/ml)	9,08±7,64	8,28±10,50	0,700
IL-6 (pg/ml)	25,38±33,78	29,61±37,56	0,610

Şis eklemi olan ve olmayan hastalar arasında ortalama sitokin düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Yine hassas eklemi olan ve olmayan hastalar arasında ortalama sitokin düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Extra-artikuler tutulum olan ve olmayan hastalar arasında ortalama sitokin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Hastaların aldıkları tedavilerle sitokin düzeylerinin ilişkisini incelemek amacıyla ilk olarak hastalar; biyolojik+DMARD ile tedavi olanlar (19 hasta; 3 hasta da sadece biyolojik tedavi almakta olduklarından bu gruba dahil edilerek analizler yapılmış olup grubu oluşturan hasta sayısı 21 olarak alınmıştır) ve yalnızca DMARD (tekli veya kombine) ile tedavi edilmekte olan hastalar iki ayrı grup olarak ele alındı. Her iki hasta grubunun ortalama sitokin düzeyleri incelendiğinde **MMP-3** düzeyleri biyolojik+DMARD ile tedavi edilmekte olan hastalarda yalnız DMARD alanlara göre anlamlı olarak daha yüksek (**51130,47±30779,83** vs **28692±24374,73; p=0,004**) saptandı.

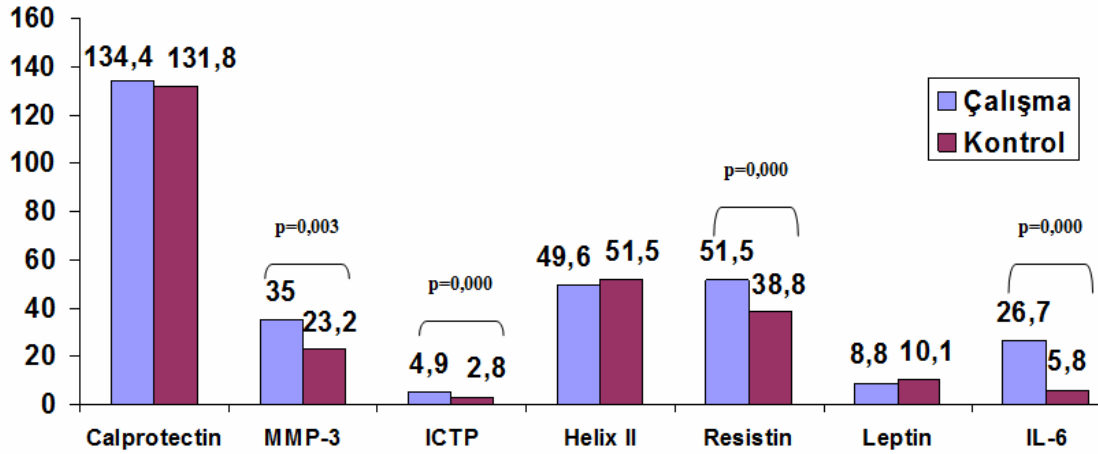
4.3. Çalışma ve kontrol grupları arasında ortalama sitokin düzeyleri arasındaki farklar

Çalışma grubunda ortalama MMP-3, ICTP, resistin ve IL-6 sitokin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. Çalışma ve kontrol gruplarının ortalama sitokin düzeyleri Tablo 4'te gösterilmiştir (Şekil 3).

Tablo 4: Çalışma ve kontrol gruplarında ortalama sitokin düzeyleri

	Çalışma Grubu	Kontrol Grubu	p değeri
Calprotectin (ng/ml)	134,44±161,79	131,85±171,70	0,920
MMP-3 (pg/ml)	35020,80±28036,35	23202,32±19314,85	0,003
ICTP (ng/ml)	4,98±2,04	2,89±1,76	0,000
Helix II (ng/ml)	49,63±50,87	51,53±67,39	0,840
Resistin (ng/ml)	51,57±28,63	38,86±17,71	0,000
Leptin (ng/ml)	8,83±8,57	10,13±11,08	0,41
IL-6 (pg/ml)	26,7±34,82	5,87±3,15	0,000

Şekil 2: Çalışma ve kontrol gruplarında ortalama sitokin düzeyleri



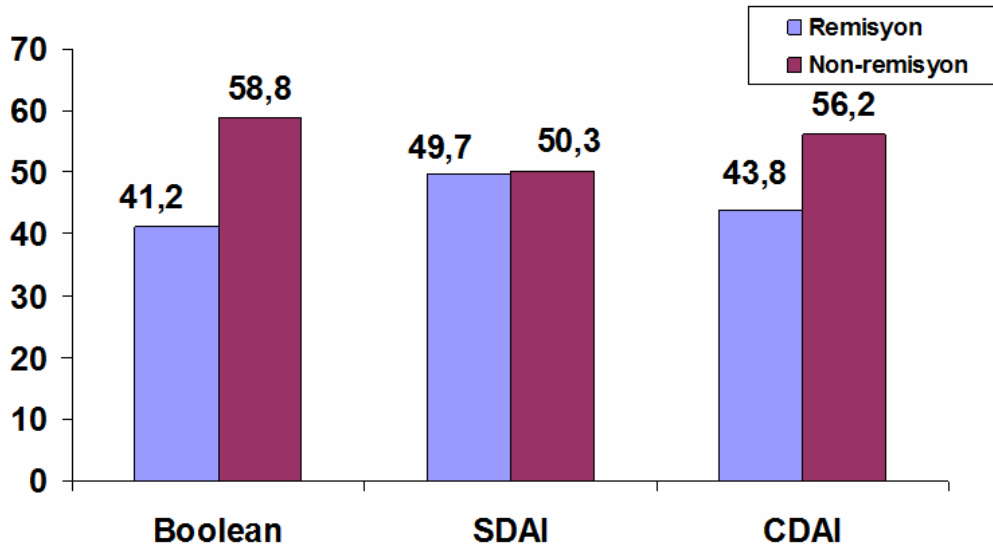
MMP-3 için değerler $\times 10^3$ olarak hesaplanacaktır.

Anlamlı farklılık gösteren sitokinlerin p değerleri şekil üzerinde belirtilmiştir.

4.4. Çalışma grubunda farklı remisyon kriterlerini karşılayan hasta sayıları

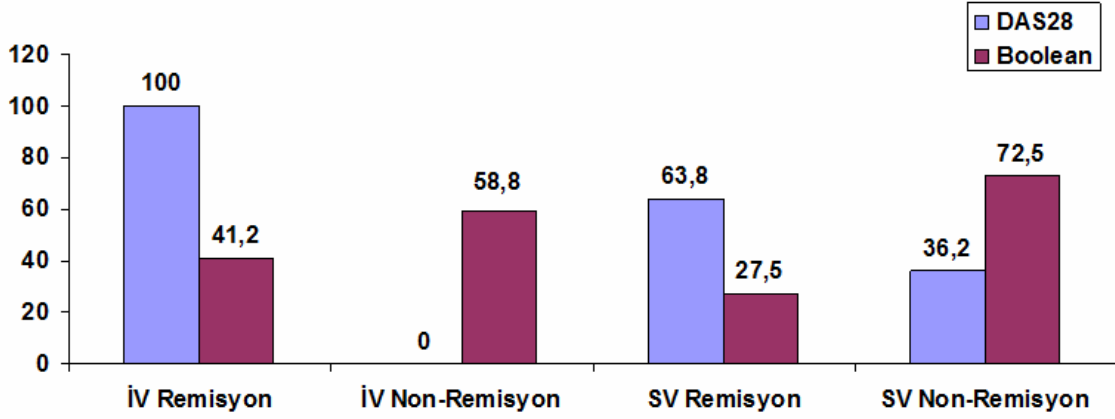
Çalışma grubu, DAS28 remisyonunda olan 80 RA hastasıyla oluşturuldu. Hastaların ilk vizitte 33'ü (%41,2) Boolean remisyonunda iken, 47'si (%58,8) değildi. Öte yandan ilk vizitte SDAI'e göre hastaların 39'u (%48,7) remisyon, 40'ı (%50) düşük hastalık aktivitesi ve 1 kişi (%1,2) orta düzey hastalık aktivitesine sahipti. CDAI'e göre ise hastaların 35'i (%43,8) remisyon ve 45'i (%56,2) düşük hastalık aktivitesinde idi (Şekil 3).

Şekil 3: İlk vizitte farklı remisyon kriterlerine göre hastaların dağılımı (% olarak verilmiştir)



Hastalar çalışmaya alındıktan sonra ortalama $14,63 \pm 5,39$ ay süreyle takip edilmişlerdir. Çalışma sonrasında hastaların ortalama remisyon visit sayısı $1,42 \pm 1,09$ (median:1)(range:0-4) olarak saptanmıştır. Son vizitlerinde DAS28 kriterlerine göre 51 (%63,8) kişi remisyonunda, 15 (%18,8) kişi düşük hastalık aktivitesinde, 13 (%16,2) kişi orta düzeyde hastalık aktivitesinde ve 1 (%1,2) kişi de aktif durumdaydı. Son vizitte Boolean remisyonunda olan 22 (%27,5) ve olmayan 58 (%72,5) hasta mevcuttu (Şekil 4).

Şekil 4: İlk ve son vizitte farklı remisyon kriterlerine göre hastaların dağılımı (% olarak verilmiştir)



IV : İlk Vizit , SV: Son Vizit

Sitokin serum düzeylerinin birbirleri ile korelasyonlarına bakıldığında; Calprotectin düzeylerinin Leptin ile negatif yönde ($r = -0,230$, $p = 0,04$); Helix II ($r = 0,894$, $p = 0,00$) ve IL-6 düzeyleri ile ($r = 0,284$, $p = 0,012$) korele olduğu; ICTP düzeylerinin resistin ile negatif yönde ilişkili ($r = -0,236$, $p = 0,038$) olduğu; Helix II düzeylerinin leptin ile negatif yönde ($r = -0,239$, $p = 0,035$) ilişkili olduğu; leptinin ise IL-6 ile ilişkili ($r = 0,251$, $p = 0,025$) olduğu; bunlara karşın MMP-3 düzeylerinin diğer herhangi bir sitokinle ilişkisinin olmadığı gözlemlendi.

15 kişi, ilk ve son vizitte Boolean remisyonundaydı. 18 kişi, ilk vizitte Boolean remisyonundayken, son vizitte değildi. İlk değerlendirmede Boolean remisyonunda olmayan 7 kişi, son vizitte remisyon grubuna dahil olmuştu.

4.5. Remisyon parametrelerinin sitokinlerle ilişkisi

İlk vizitte Boolean remisyonundaki hastalarda, **ICTP**, **resistin** ve **IL-6** düzeyleri sağlıklı kontrollerden anlamlı olarak yüksek saptandı (Tablo 5).

Tablo 5: İlk vizitte Boolean remisyonundaki hastalarla kontrollerin ortalama sitokin düzeyleri

	Boolean Remisyon Grubu	Kontrol	p değeri
Calprotectin (ng/ml)	127,68±186,88	131,85±171,70	0,911
MMP-3 (pg/ml)	31523,27±24286,17	23202,32±19314,85	0,061
ICTP (ng/ml)	4,94±2,19	2,89±1,76	0,000
Helix II (ng/ml)	43,18±44,36	51,53±67,39	0,448
Resistin (ng/ml)	51,94±35,59	36,86±17,71	0,026
Leptin (ng/ml)	8,90±9,73	10,13±11,08	0,580
IL-6 (pg/ml)	23,85±34,20	5,87±3,15	0,005

İlk vizitte SDAI remisyonunda olan hastalarda, **ICTP**, **resistin** ve **IL-6** düzeylerinin sağlıklı kontrollerden anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü (Tablo 6).

Tablo 6: İlk vizitte SDAI remisyonundaki hastalarla kontrollerin ortalama sitokin düzeyleri

	SDAI Remisyon Grubu	Kontrol	p değeri
Calprotectin (ng/ml)	118,04±174,35	131,85±171,70	0,714
MMP-3 (pg/ml)	30558,20±23285,70	23202,32±19314,85	0,074
ICTP (ng/ml)	4,85±2,10	2,89±1,76	0,000
Helix II (ng/ml)	41,44±41,36	51,53±67,39	0,339
Resistin (ng/ml)	53,31±33,69	36,86±17,71	0,006
Leptin (ng/ml)	9,17±9,23	10,13±11,08	0,680
IL-6 (pg/ml)	16,36±24,70	5,87±3,15	0,013

İlk vizitte CDAI remisyonundaki hastalarda, **ICTP**, **resistin** ve **IL-6** düzeylerinin sağlıklı kontrollerden anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü (Tablo 7).

İlk vizitte Boolean remisyonundaki hastalarla, remisyonunda olmayanların ortalama sitokin düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmamasına karşın, SDAI ve CDAI'e göre remisyonunda olmayan hastalarda **IL-6** düzeyleri, remisyonundakilerden anlamlı düzeyde yüksek

saptanmıştır (SDAI remisyon ve non-remisyon grupları kendi arasında ve aynı şekilde CDAI remisyon ve non-remisyon grupları da kendi aralarında olmak üzere kıyaslama yapılmıştır).

Tablo 7:İlk vizitte CDAI remisyonundaki hastalarla kontrollerin ortalama sitokin düzeyleri

	CDAI Remisyon Grubu	Kontrol	p değeri
Calprotectin (ng/ml)	123,89±181,17	131,85±171,70	0,826
MMP-3 (pg/ml)	30982,66±23866,61	23202,32±19314,85	0,072
ICTP (ng/ml)	4,74±2,10	2,89±1,76	0,000
Helix II (ng/ml)	42,77±42,93	51,53±67,39	0,411
Resistin (ng/ml)	53,61±35,02	36,86±17,71	0,010
Leptin (ng/ml)	9,43±9,56	10,13±11,08	0,740
IL-6 (pg/ml)	17,30±25,55	5,87±3,15	0,012

İlk ve son vizitte DAS28 remisyonundaki hastalarla kontrol grubunun ortalama sitokin düzeyleri açısından değerlendirilmesi tablo 8’de verilmiştir. İlk ve son vizitlerinde DAS28 remisyonundaki hastalarla, ilk vizitte remisyonunda iken, son vizitte olmayanların ortalama sitokin düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo 8:İlk ve son vizitte DAS28 remisyonundaki hastalarla, kontrollerin ortalama sitokin düzeyleri

	DAS28 Remisyon Grubu	Kontrol	p değeri
Calprotectin (ng/ml)	136,92±185,73	131,85±171,70	0,874
MMP-3 (pg/ml)	32676,56±24268,23	23202,32±19314,85	0,022
ICTP (ng/ml)	5,07±2,29	2,89±1,76	0,000
Helix II (ng/ml)	47,40±49,92	51,53±67,39	0,689
Resistin (ng/ml)	54,43±33,61	36,86±17,71	0,001
Leptin (ng/ml)	8,01±8,55	10,13±11,08	0,249
IL-6 (pg/ml)	28,85±39,68	5,87±3,15	0,000

Çalışmanın başında ve sonunda Boolean remisyonunda olan hastalarla, kontrollerin ortalama serum sitokin düzeylerinin karşılaştırılmasında; Calprotectin ve Helix II kontrol grubunda anlamlı olarak daha yüksek (**131,85±171,70** vs **78,09±38,69**; **p=0,01** ve **51,53±67,39** vs **30,13±10,98**; **p=0,01**), ICTP düzeyi ise hastalarda, kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (**4,88±2,89** vs **2,89±1,76** ; **p=0,001**)(Tablo 9).

İlk ve son vizitlerinde SDAI remisyonundaki hastalarla, kontrollerin ortalama serum sitokin düzeylerinin karşılaştırılmasında; **ICTP (5,06±2,65 vs 2,89±1,76; p=0,000)**, **resistin (56,24±39,67 vs 36,86±17,71; p=0,028)** ve **IL-6 (20,1±29,04 vs 5,87±3,15; p=0,025)** düzeyleri hastalarda kontrollerden anlamlı olarak yüksek saptandı.

İlk ve son vizitlerinde Boolean remisyonundaki hastalarla, ilk vizitlerinde remisyondayken, son vizitte remisyonunda olmayan hastaların ortalama sitokin düzeyleri incelendiğinde; **MMP-3** düzeyinin, remisyonundan çıkan hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (**20540,57±13084** vs **40567,85±27826,94**; **p=0,04**).

İlk ve son vizitlerinde Boolean remisyonunda olmayan hastalarda **Calprotectin**, **MMP-3**, **Helix II** ve **IL-6** düzeyleri, remisyonunda olan hastalardan anlamlı olarak daha yüksek saptandı.

İlk ve son vizitlerinde SDAI kriterlerine göre remisyonundaki hastalarla, ilk vizitlerinde remisyonunda iken, son vizitte remisyonunda olmayan hastaların ortalama sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı. Benzer şekilde ilk ve son vizitte SDAI remisyonundaki hastalarla, remisyonunda olmayanların ortalama sitokin düzeyleri arasında da anlamlı fark saptanmamıştır.

Tablo 9:İlk ve son vizitlerinde Boolean remisyonundaki hastalarla, kontrollerin ortalama sitokin düzeyleri

	Boolean Remisyon Grubu	Kontrol	p değeri
Calprotectin (ng/ml)	78,09±38,69	131,85±171,70	0,016
MMP-3 (pg/ml)	20540,57±13084,82	23202,32±19314,85	0,622
ICTP (ng/ml)	4,88±2,89	2,89±1,76	0,001
Helix II (ng/ml)	30,13±10,98	51,53±67,39	0,01
Resistin (ng/ml)	56,38±44,12	36,86±17,71	0,112
Leptin (ng/ml)	6,81±5,69	10,13±11,08	0,262
IL-6 (pg/ml)	12,38±14,89	5,87±3,15	0,113

5. TARTIŞMA

Romatoid artrit, progresif, erozif poliartritle giden, immun sistem ilişkili eklem hasarı ile karakterize bir hastalıktır. İnflamatuar cevabın komponentlerini, akut faz reaktanları, otoreaktif T hücreleri, B lenfositler ve bu hücrelerden salınan çeşitli sitokinler oluşturmaktadır. Kıkırdak ve kemik dokuların yıkımı ise proteolitik enzimler aracılığı ile olmaktadır. Bu süreçte görev alan birçok enzim arasında MMPs ailesinde yer alan enzimlerin, sinoviyal dokunun kıkırdak doku içine invazyonunda, kıkırdak dokunun yıkımında ve kemikte erozyonların oluşmasında önemli rolleri vardır. Kemik ve kıkırdak dokularda yapımı ve yıkımı gösteren çeşitli moleküller, erozif hastalığı belirlemek amacıyla araştırılmışlardır. Kemik yapımını Osteocalcin, kemik yıkımını ICTP, CTX-I (C-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen), kıkırdak metabolizmasını Helix II, PIIANP (N-terminal propeptide of type IIA collagen) ve kıkırdak dokunun yıkımından sorumlu enzimler olan matriks metalloproteinazların seviyelerini ölçerek değerlendirmek mümkündür.

RA hastalarıyla yapılan çalışmalarda vücut kitle indeksi artışının radyografik progresyonla negatif yönde korele olduğunu gösterir çalışmalar mevcuttur (46). Her ne kadar altta yatan mekanizma tam olarak anlaşılammışsa da yağ dokusundan salınan bir takım medyatörlerin bu konuda rolü olabileceği düşünülmektedir. Son dönemde, yağ dokusunun sadece lipid depolayan bir organ olmadığı ve tüm vücut metabolizmasını etkileyebilecek bir takım sitokinlerin de kaynağını oluşturan, endokrin bir doku olduğu bildirilmiştir (47). Yağ dokusundan salgılanan sitokinler arasında TNF- α , IL-6, leptin, resistin ve visfatin proinflamatuvar olarak bilinirken adiponektin moleküler formuna bağlı olarak hem anti-inflamatuar, hem de proinflamatuvar olarak bilinmektedir.

RA popülasyonunda eklem hasarının düzeyi, hastadan hastaya farklılıklar göstermektedir. Hastalık progresyonuna katkıda bulunan faktörler tümüyle anlaşılabilmiş değildir. Dirençli hastalarda kullanılabilir yeni tedavi ajanlarının da ortaya çıkması ile, RA'da tedavinin en önemli hedefi, hastalık kontrolünün olabildiğince hızlı sağlanması ve hastanın en kısa sürede remisyona sokulması olmuştur. Son dönemde tedavi hedefinin remisyon olması, ihtiyaç duyulan hastada etkin tedavilere olabildiğince erken dönemde başlamanın hedeflenmesi gibi bir takım haklı gerekçelerle inflamasyonun varlığını ve devamını öngörebilecek belirteçlerin ortaya konulma çabası önemli olmuştur. Biz de bu çalışmada IL-6, Helix II, ICTP, MMP-3, resistin, leptin gibi çeşitli adipositokinler, kıkırdak-kemik yıkımını gösteren marker'ların yanısıra, kartilaj-pannus bileşkesindeki lökositlerden aktivasyon ve yaşam döngüleri boyunca salınan bir major lökosit proteini olan ve RA gibi inflamatuvar hastalıklarda serum düzeyleri artmakta olan Calprotectin düzeylerini, DAS28

remisyonunda olan 80 hasta ve romatolojik açıdan sağlıklı 80 kişiden oluşan kontrol grubunun serumlarında ölçerek; farklı remisyon ölçütlerini karşılayan hastalarda remisyonu destekleyecek ve kalıcı remisyonu öngörebilecek biyobelirteçler bulmayı hedefledik.

Çalışma grubumuzu oluşturan, DAS28 remisyonundaki hastaların serum sitokin düzeyleri ile kontrol grubumuzun sitokin düzeylerinin ortalamalarını kıyasladığımızda MMP-3, ICTP, resistin ve IL-6 sitokin düzeylerinin, DAS28 remisyonunda da olsalar, hasta grubunda, kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptadık. Buna karşın, iki grubun Calprotectin, Helix II ve leptin düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte Boolean, SDAI, CDAI kriterlerine göre remisyonunda olan gruplar ile kontrollerin ortalama sitokin düzeylerini karşılaştırdığımızda; ICTP, resistin ve IL-6 düzeylerinin RA grubunda anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bulduk. Diğer taraftan yeni remisyon kriterleri çerçevesinde önerilen Boolean, SDAI ve CDAI kriterlerinin remisyonunda olarak belirlediği hastaların sitokin profilleri de benzer bulunmuştur. Her 3 remisyon kriteri de benzer hasta popülasyonlarını işaret etmişlerdir. Çalışmamızda MMP-3 düzeyleri, CRP titreleri ile korele olarak saptanmıştır. Literatürde artmış MMP-3 düzeyinin daha erozif seyirli hastalıkla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar (25,48) kadar, hastalığın radyolojik progresyonu ile ilgili olmadığı sonucuna ulaşan çalışmalar da (49,50) mevcuttur. Çalışmamızda MMP-3 düzeylerinin CRP ile korele saptanması ve DAS28 kriterlerini karşılamasına karşın, diğer remisyon kriterlerini karşılamayan grupta daha yüksek saptanması, bu hastaların progrese hastalıklarının olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca ilk vizitlerinde Boolean remisyonundayken, son vizitte remisyonunda olmayan hastalarda serum MMP-3 düzeylerinin ilk ve son vizitlerinde remisyonundaki hastalardan anlamlı olarak daha yüksek bulunması, yüksek MMP-3 düzeylerinin kalıcı olmayan remisyon ve tedaviyi kesme ve/veya doz azaltma açısından uygun olmayan hastaların belirlenmesinde bir gösterge olabileceğine işaret etmektedir.

Hastalarımızın anti-CCP pozitif ve negatif oluşları ile sitokin düzeyleri arasında veya anti-CCP titreleri ile sitokin düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon saptayamadık. Buna karşılık RF pozitif olan grupta negatif gruba göre resistin düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde resistin ile RF titreleri arasında da korelasyon saptanmıştır. RF pozitifliği ile hastalık ciddiyetinin arttığını göz önüne alırsak resistin düzeylerinin aynı zamanda hastalık ciddi seyri ile ilişkili olduğu sonucu çıkarılabilir. Klein-Wieringa IR ve ark. yaptığı, erken romatoid artrit hastalarında bazal serum adipokin düzeylerinin radyografik progresyonu göstermedeki rolünün araştırıldığı çalışmada, anti-CCP pozitif hastalarda TNF- α ve visfatin düzeylerinin antikor negatif gruptan anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmış;

buna karşın, IL-6, resistin, leptin, adiponektin, adiposin düzeyleri arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır ve adipositokinler içinde sadece adiponektinin radyografik eklem hasarı ile hastalık progresyonunu predikte edebilecek bir marker olduğu vurgusu yapılmıştır (51). Klaasen R. ve ark. RA hastalarında, Adalimumab tedavisi ile glukokortikoid tedavisi sonrasında serum sitokin düzeylerindeki değişiklikleri karşılaştırıldığı çalışmalarında, bazal yüksek resistin düzeylerinin inflamasyondan bağımsız olarak bazal radyolojik hasarla korele olduğunu ve bu durumun anti-CCP pozitif veya negatifliğinden bağımsız gerçekleştiğini göstermişlerdir (29).

Çalışmamızda biyolojik+DMARD alan hastaların serum MMP-3 düzeyi, yalnız DMARD ile tedavi olan hastalardan anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Hammer ve ark. (17) ile Andrés Cerezo ve arkadaşları (52) çalışmalarında, RA hastalarında DMARD ve/veya steroid tedavilerinin serum Calprotectin düzeyi üzerine etkisi olmadığını göstermişlerdir. RA hastalarında serum ve sinoviyal sıvılardaki kollajen metabolizma ürünlerinin hastalık seyrini değerlendirmedeki yerini araştıran bir çalışmada (32); DMARD alan hastalarda, olmayan hastalara göre; serum ICTP düzeylerinin daha düşük olduğunu göstermiştir. Klaasen R ve ark. ise Adalimumab tedavisi ile serum resistin düzeylerindeki düşmenin hastalık aktivitesindeki azalmayla paralel olduğunu göstermişlerdir (29). Garnero ve arkadaşlarının aktif RA hastalarında Tocilizumab ve Metotreksat ile tedavi sonrasında DAS28 remisyondaki grupta ICTP, MMP-3 ve Helix II düzeylerinde, remisyona giremeyen gruba göre daha belirgin düşme sağlamış olmaları, bu sitokinlerin hastalığın aktif dönemlerinde serum düzeylerinin arttığını işaret etmektedir (33). Çalışmamızda MMP-3 düzeylerinin, steroid ve biyolojik alan hastalarda, olmayan hastalardan daha yüksek saptanması, bu tedavilere ihtiyaç duyulan hastalarda hastalık aktivitesinin diğer hastalardan daha fazla olabileceği yorumunu akla getirmektedir.

İlk vizitte Boolean remisyonda olan hastalarla, olmayanların ortalama serum sitokin düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptamadık. Yeni ACR/EULAR RA Remisyon kriterleri çerçevesinde tanımlanmış ölçeklerden olan, SDAI ve CDAI remisyon kriterlerini ilk vizitlerinde karşılayan ve karşılamayan hastaların ortalama sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında IL-6 düzeyleri, remisyonda olmayan hastalarda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. SDAI remisyon kriterlerinin hastalık aktivitesini ve remisyon sürecini değerlendirmekteki yeterliliği konusunda son dönemde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Alejandro Balsa ve ark. SDAI ve DAS28 remisyonda olan RA hastalarının aktivitelerini power Doppler USG ile değerlendirdikleri çalışmalarında, SDAI remisyon kriterlerini karşılayan hastalarda, pozitif power Doppler bulgularının olmamasından yola çıkarak, bu

hastalarda inflamatuvar aktivitenin tama yakın ortadan kalktığını, DAS28 remisyonunda olan hastaların ise USG ile değerlendirmelerinde aktivitenin devam etmekte olduğunu göstermişlerdir (53). Çalışmamızda IL-6 serum düzeyleri SDAI ve CDAI non-remisyon gruplarında yüksek olmakla birlikte, sedimentasyon hızı ile de korele bulunmuştur. Klein-Wieringa IR ve ark. yaptığı çalışmada IL-6 düzeyleri inflamasyon marker'ları; ESR ve CRP ile korele saptanmıştır. Bu çalışmada IL-6'nın radyografik progresyonla ilişkisi ESR, CRP ve Vücut kitle indexinden bağımsız olarak bulunmuştur. IL-6'nın etkili olmasındaki önemli mekanizmalardan birisi anti-CCP üreten B hücreleri için bilinen bir büyüme faktörü olmasıdır (51). Gottenberg JE ve arkadaşlarının ESPOIR kohortundaki erken romatoid artrit hastalarıyla yapmış oldukları çalışmada, serum IL-6 düzeylerinin B hücre aktivasyon marker'ları ve radyografik progresyonla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (40). Çalışmamızın hasta grubunun tümü DAS28 remisyonundaki hastalar olup, bunlardan SDAI kriterlerini karşılayanlarla karşılamayanlar arasında IL-6 düzeyinin non-remisyon grubunda anlamlı yüksek saptanması; IL-6'nın DAS28 remisyonunu sağlayan ancak SDAI remisyonunu karşılamayan hastaları ayırt etmede kullanılabilir bir marker olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları, Alejandro Balsa ve arkadaşlarının çalışmasını destekler şekilde, SDAI remisyonundaki hastalarda IL6 düzeyinin; yani inflamasyonun, DAS28 remisyonundaki hastalara göre daha iyi baskılanabildiğini göstermektedir.

Çalışmaya dahil edildikleri vizitte ve son vizitte Boolean remisyonunda olmayan hastalarda, Calprotectin, MMP-3, Helix II ve IL-6 düzeyleri remisyonundaki hastalardan anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. RA hastalarında, radyografik olarak belirgin hasarın ortaya çıkmasından çok önce, kıkırdak doku matriksinde değişikliklerin ortaya çıkmaya başladığının keşfedilmesi, klinisyenler için inflamasyonun düzeyini gösteren marker ve sitokinlerin yanında kartilaj turnover'ını gösteren duyarlı ve non-invaziv marker'ların bulunma çabasını da önemli hale getirmiştir (20,21). Bu sebeple araştırılan, kartilaj yapısındaki Tip II kollajenin yıkım ürünlerinden biri olan Helix II'nin düzeyi, Charni ve ark. tarafından yapılan çalışmada eklem hasarının progresyonuyla korele saptanmıştır (22). Garnero ve arkadaşlarının metotreksat dirençli RA hastalarında, Tocilizumab ve metotreksat tedavileri ile kemik-kıkırdak turnover'ını gösteren marker'larda hızlı ve kalıcı düzelmeyi gösterdikleri başka bir çalışmada ise 24.haftada DAS28 remisyonunu karşılayan hastalarda, DAS28 remisyonunda olmayan hastalara göre Helix II, ICTP, MMP-3 düzeylerinde daha fazla düşüşler kaydedilmiştir. Ayrıca 24.haftada CRP düzeylerindeki azalmanın Helix II ve MMP-3 düzeylerindeki azalma ile belirgin olarak korelasyon gösterdiği saptanmıştır (33). Kıkırdak yıkımını gösteren marker'lardan biri olan Helix II dışında, kartilaj yıkımının ve kemik

erozyonlarının en fazla olduğu, kıkırdak-pannus bileşkesindeki lökositlerden salınan, Calprotectin molekülünün de radyografik progresyonla ilişkisinin incelendiği çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çalışmamızda Calprotectin düzeylerinin RF ve/veya anti-CCP antikollarının varlığı veya titresi ile korelasyonu saptanmamışsa da, Hammer ve arkadaşlarının Calprotectin'i RA'da 10 yıllık radyolojik progresyonu öngörebilecek bir marker olarak saptadıkları çalışmada, sitokin serum düzeylerinin anti-CCP, IgM ve IgA RF pozitif hastalarda daha yüksek olduğu saptanmıştır (16,17). Andrés Cerezo ve arkadaşlarının DMARD/steroid naif olan, erken RA hastalarıyla yaptıkları çalışmada, serum Calprotectin düzeylerinin total şiş eklem sayısı ile korele olduğu, konvensiyonel tedavi ile DAS28 remisyonu sağlanan hasta grubunda sağlıklı populasyondaki normal düzeylere kadar gerilediği gösterilmiştir (52). Yine Hammer ve ark. RA'da Adalimumab tedavisi öncesi ve sonrasında, ultrasonografik sinovit skorları ile serum Calprotectin seviyelerindeki değişiklikler arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında, Calprotectin düzeylerinin B-mode (gri skala) ile tespit edilen sinoviyal hipertrofi bulguları ve power Doppler ile saptanan vaskülarizasyonun şiddeti ile korele seyrettiğini saptanmışlardır. Bu sonuçtan yola çıkılarak, serum Calprotectin düzeylerinin devam eden inflamasyonu yansıttığı ve biyolojik ajanlarla tedavi edilen hastalarda inflamasyonu gösteren bir marker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (19).

İlk ve son vizitlerinde Boolean remisyonundaki hastalarımızda ICTP düzeyi kontrollerden anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. Hastalarımızın serum ICTP düzeyleri CRP titreleri ile korelasyon göstermektedir. Aman S. ve ark. erken romatoid artrit hastalarını 3 yıl boyunca izledikleri bir çalışmada, ICTP, RF ve CRP düzeylerinin hastalık progresyonu ile ilişkisi irdelenmiş ve erken RA'da başlangıçta yüksek olan ICTP serum düzeyleri ve RF pozitifliğinin kombinasyonu ile agresif hastalığı öngörebilecek bir kombinasyon elde edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır (32). RA hastalarının Tocilizumab ve metotreksat kombinasyonu ile tedavi edildikleri başka bir çalışmada 24.haftada DAS28 remisyonu sağlanan grupta, remisyona ulaşamamış gruba göre serum ICTP düzeylerinde daha fazla düşüş sağlanmıştır (33). Sağlıklı kontrollerin ortalama sitokin serum düzeyleriyle en az iki vizitte Boolean remisyonunda kalan hastaları karşılaştırdığımızda, ICTP kalıcı remisyonunda varsaydığımız hastalarda bile yüksek kalmaya devam etmiştir. Bu durumda da bu hastalarda relaps olasılığının tamamen ortadan kalktığını söylemek doğru olmayacaktır.

Adipositokinlerden biri olan leptin düzeyi ile hasta ve kontrol gruplarının ortalama sitokin düzeyleri arasında yapılan karşılaştırmalarda anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bununla beraber hasta grubunun ortalama sedimentasyon hızları ve Vücut kitle indeksleri ile

ortalama serum leptin düzeyleri arasında korelasyon saptanmıştır. Leptin'in RA hastalarında hastalık aktivitesi ve aktivite belirteçleri ile ilişkisini araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. Hizmetli ve ark. (54), Kopec-Medrek ve ark. (55), Targońska-Stepniak ve ark. (56), yaptıkları çalışmalarda serum leptin düzeyleri inflamasyon marker'ları ile ilişkisiz olarak saptanmış , Popa ve ark. çalışmasında ise inflamasyon belirteçlerinin hasta serum leptin düzeyleri ile negatif yönde korele olduğu saptanmıştır (57). Leptin'in inflamasyondaki rolü halen tartışmalı olup, RA hastalarında hastalık aktivitesi ile ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar kadar, hastalık aktivitesi ile ilişkisiz olduğunu gösteren de çok sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda hasta grubunu oluşturan DAS28 remisyon grubundaki RA hastaları ile sağlıklı kontroller arasında ortalama leptin düzeyleri arasında fark saptanmamıştır. Benzer şekilde Boolean, SDAI ve CDAI kriterlerine göre remisyonda olan hastalarla, remisyonda olmayan hastaların ortalama serum leptin düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Farklı kompozit ölçeklere göre remisyondaki hastalar arasında, özellikle serum MMP-3 ve IL-6 düzeyleri daha gerçeğe yakın remisyon değerlendirmelerinin yapılmasına ve kısa dönemdeki relaps riskini öngörmeye olanak sağlayabilir. Diğer taraftan yeni remisyon kriterleri ile inflamasyon düzeyi ve hasar oluşturma riski daha çok baskılanmış hastalar saptanmakla birlikte, relaps riskinin tamamen ortadan kalktığını söylemek mümkün değildir. Calprotectin, Helix II, MMP-3 ve IL-6, RA hasta grubunda devam etmekte olan hastalık aktivitesini göstermekte kullanılabilecek biyobelirteçlerdir.

6. REFERANSLAR

1- Eular Online Course on Rheumatic Diseases Module 3: Pathogenesis and Clinical Aspects of Rheumatoid Arthritis.

2- Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. Rheumatology textbook. Volume I.2010. 751-915.

3- Eular Online Course on Rheumatic Diseases Module 8: Measuring Disease Activity And Damage in Inflammatory Arthritis.

4- Funovits J, Aletaha D, Bykerk V, Combe B, Dougados M, Emery P, Felson D, Hawker G, Hazes JM, Huizinga T, Kay J, Kvien TK, Smolen JS, Symmons D, Tak PP, Silman A. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010 Sep;69(9):1589-95.

5- Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998 Jan 1;101(1):273-81.

6- Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, et al. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol.* 1999 Jan 1;162(1):585-94.

7- van Gaalen F, Ioan-Facsinay A, Huizinga TW, Toes RE. The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2005 Nov 1;175(9):5575-80.

8- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and rheumatism.* 2004 Feb;50(2):380-6.

9- van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004 Mar;50(3):709-15.

10- Meyer O, Nicaise-Roland P, Santos MD, Labarre C, Dougados M, Goupille P, et al. Serial determination of cyclic citrullinated peptide autoantibodies predicted five-year radiological outcomes in a prospective cohort of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res & Ther.* 2006;8(2):R40.

11- Eular Online Course on Rheumatic Diseases Module 5 : Immunology and the rheumatic diseases.

12- Eular Online Course on Rheumatic Diseases Module 8 : Measuring Disease Activity And Damage In Inflammatory Arthritis.

13- Felson DT, Smolen JS, Wells G et al. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Arthritis Rheum.* 2011 Mar;63(3):573-86.doi:10.1002/art.30129.

14- Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, et al. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3658-65. Epub 2001 Nov 26.

15- B Johne, M K Fagerhol, T Lyberg, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997;50:113-23.

16- H Berner Hammer , S Ødegård, S W Syversen, et al. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jan;69(1):150-4.doi:10.1136/ard.2008.103739.Epub.

17- Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007 Aug;66(8):1093-7. Epub 2007 Jan 18.

- 18-** Hammer HB, Haavardsholm EA, Kvien TK. Calprotectin (a major leucocyte protein) is associated with the levels of anti-CCP and rheumatoid factor in a longitudinal study of patients with very early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2008 May-Jun;37(3):179-82. doi: 10.1080/03009740701874451.
- 19-** Hammer HB, Fagerhol MK, Wien TN, Kvien TK. The soluble biomarker calprotectin (an S100 protein) is associated to ultrasonographic synovitis scores and is sensitive to change in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R178. doi: 10.1186/ar3503. Epub 2011 Oct 26.
- 20-** Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases [review]. *Arthritis Rheum* 2000;43:953–68.
- 21-** Poole AR. Biochemical/immunochemical biomarkers of osteoarthritis: utility for prediction of incident or progressive osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:803–18.
- 22-** Charni N, Juillet F, Garnero P. Urinary type II collagen helical peptide (HELIX-II) as a new biochemical marker of cartilage degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005 Apr;52(4):1081-90.
- 23-** Funahashi K, Koyano S, Miura T, Hagiwara T, Okuda K, Matsubara T. Efficacy of tocilizumab and evaluation of clinical remission as determined by CDAI and MMP-3 level. *Mod Rheumatol.* 2009;19(5):507-12. doi: 10.1007/s10165-009-0203-z. Epub 2009 Jul 17.
- 24-** Ribbens C, Andre B, Jaspard JM, Kaye O, Kaiser MJ, De Groot D, Malaise MG. Matrix metalloproteinase-3 serum levels are correlated with disease activity and predict clinical response in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2000 Apr;27(4):888-93.
- 25-** Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH. Serum matrix metalloproteinase 3 in early rheumatoid arthritis is correlated with disease activity and radiological progression. *J Rheumatol.* 2000 Dec;27(12):2761-8.

- 26-** Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Jan 16;98(2):502-6.
- 27-** Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, et al. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5789-95.
- 28-** Zhang J, Lei T, Chen X, et al. Resistin up-regulates COX-2 expression via TAK1-IKK-NF-kappaB signaling pathway. *Inflammation*. 2010 Feb;33(1):25-33. doi: 10.1007/s10753-009-9155-x.
- 29-** Klaasen R, Herenius MM, Wijbrandts CA, et al. Treatment-specific changes in circulating adipocytokines: a comparison between tumour necrosis factor blockade and glucocorticoid treatment for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Sep;71(9):1510-6.
- 30-** Paimela L, Leirisalo-Repo M, Risteli L, et al. Type I collagen degradation product in serum of patients with early rheumatoid arthritis: relationship to disease activity and radiological progression in a 3-year follow-up. *Br J Rheumatol*. 1994 Nov; 33(11):1012-6.
- 31-** Kotaniemi A, Isomäki H, Hakala M, et al. Increased type I collagen degradation in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1994 Sep;21(9):1593-6.
- 32-** Aman S, Paimela L, Leirisalo-Repo M, et al. Prediction of disease progression in early rheumatoid arthritis by ICTP, RF and CRP. A comparative 3-year follow-up study. *Rheumatology (Oxford)*. 2000 Sep;39(9):1009-13.
- 33-** Garnero P, Thompson E, Woodworth T, et al. Rapid and sustained improvement in bone and cartilage turnover markers with the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate: results from a substudy of the multicenter double-blind, placebo-controlled trial of tocilizumab in inadequate responders to methotrexate alone. *Arthritis Rheum*. 2010 Jan;62(1):33-43. doi: 10.1002/art.25053.

- 34-** Romano MM, Sironi C, Toniatti N, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6: 315–25.
- 35-** Mihara M, Moriya Y, Kishimoto T, et al. Interleukin-6 (IL-6) induces proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. *Br J Rheumatol* 1995;34:321–5.
- 36-** Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, et al. Soluble interleukin receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 11924–8.
- 37-** Franchimont N, Wertz S, Malaise M. Interleukin-6: an osteotropic factor influencing bone formation? *Bone* 2005;37:601–6.
- 38-** Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, et al. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988;31:784–8.
- 39-** Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, et al. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:202–13.
- 40-** Gottenberg JE, Dayer JM, Lukas C, et al. Serum IL-6 and IL-21 are associated with markers of B cell activation and structural progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jul;71(7):1243-8.
- 41-** Sierra-Honinmann MR, Nath AK, Murakami C, et al. : Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science.*1998; 281: 1683 – 6.
- 42-** Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. : Effects of the obese gene production body weight regulation in ob/ob mice. *Science.*1995;269: 540 –3.
- 43-** Mercer JG, Moar KM, Rayner DV, et al: Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold exposed lean mice. *FEBS Lett.*1997; 402:185 – 8.

- 44-** Lord GM, Matarese G, Howard J, et al: Leptin modulates the T-cell immune response and reverse starvation – induced immuno suppression. *Nature*.1998; 394: 897 – 901.
- 45-** Mantzoros CS, Ilich JZ, Skugor M, et al. : Leptin is inversely related to age to at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab*.1997; 82: 3239 – 45.
- 46-** Westhoff G, Rau R, Zink A. Radiographic joint damage in early rheumatoid arthritis is highly dependent on body mass index. *Arthritis Rheum*. 2007 Nov;56(11):3575-82.
- 47-** Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2548-56. Review.
- 48-** Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, Cats HA, Stewart RE, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH. Serum levels of matrix metalloproteinase-3 in relation to the development of radiological damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 1999 Nov;38(11):1081-7.
- 49-** Cunnane G, Fitzgerald O, Beeton C, Cawston TE, Bresnihan B. Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001 Oct;44(10):2263-74.
- 50-** Ateş A, Türkçapar N, Olmez U, Tiryaki O, Düzgün N, Uğuz E, Duman M. Serum pro-matrix metalloproteinase-3 as an indicator of disease activity and severity in rheumatoid arthritis: comparison with traditional markers. *Rheumatol Int*. 2007 Jun;27(8):715-22. Epub 2007 Apr 11.
- 51-** Klein-Wieringa IR, van der Linden MP, Knevel R, Kwekkeboom JC, van Beelen E, Huizinga TW, van der Helm-van Mil A, Kloppenburg M, Toes RE, Ioan-Facsinay A. Baseline serum adipokine levels predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Sep;63(9):2567-74. doi: 10.1002/art.30449.
- 52-** Andrés Cerezo L, Mann H, Pecha O, Pleštilová L, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L.

Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jul 26;13(4):R122. doi: 10.1186/ar3426.

53- Balsa A, de Miguel E, Castillo C, Peiteado D, Martín-Mola E. Superiority of SDAI over DAS-28 in assessment of remission in rheumatoid arthritis patients using power Doppler ultrasonography as a gold standard. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Apr;49(4):683-90. doi: 10.1093/rheumatology/kep442. Epub 2010 Jan 4.

54- Hizmetli S, Kisa M, Gokalp N, Bakici MZ. Are plasma and synovial fluid leptin levels correlated with disease activity in rheumatoid arthritis ? *Rheumatol Int*. 2007 Feb;27(4):335-8. Epub 2006 Nov 11.

55- Kopec-Medrek M, Kotulska A, Widuchowska M, Adamczak M, Więcek A, Kucharz EJ. Plasma leptin and neuropeptide Y concentrations in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab, a TNF- α antagonist. *Rheumatol Int*. 2012 Nov;32(11):3383-9.

56- Targońska-Stepniak B, Majdan M, Dryglewska M. Leptin serum levels in rheumatoid arthritis patients: relation to disease duration and activity. *Rheumatol Int*. Published Online First: 30 Oct 2007;2008 ;28:585-591.

57- Popa C, Netea MG, Radstake TR, van Riel PL, Barrera P, van der Meer JW. Markers of inflammation are negatively correlated with serum leptin in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. Published Online First: 24 Feb 2005;64:1195-1198.

